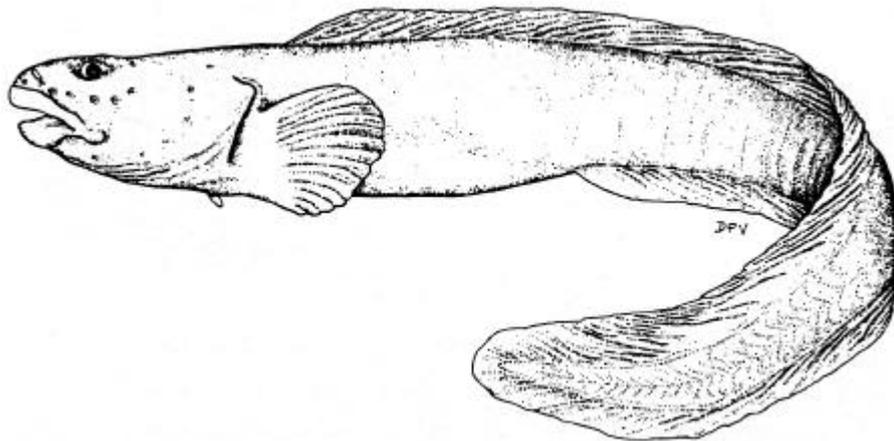


# **Sauerstoffabhängigkeit der Temperaturtoleranz bei marinen Fischen?**

Untersuchungen mit Hilfe der *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie



vorgelegt von

Felix Christopher Mark

Münster, im März 2001

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>3</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>4</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>11</b>
2.1 VERSUCHSTIERE.....	11
2.2 AUFBAU UND DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE.....	11
2.2.1 VERSUCHSPROTOKOLL.....	12
2.3 RESPIRATION.....	14
2.4 NMR-MESSUNGEN .....	17
2.4.1 HARDWARE/SOFTWARE .....	17
2.4.2 BLUTFLUSS.....	17
2.4.3 $T_2^*$ -GEWICHTETE BILDGEBUNG.....	18
2.4.4 $^{31}\text{P}$ -NMR-SPEKTREN.....	18
2.4.5 SÄTTIGUNGSTRANSFER .....	19
2.5 ANGEWANDTE STATISTIK .....	20
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>22</b>
3.1 RESPIRATION.....	22
3.2 NMR-EXPERIMENTE.....	25
3.2.1 BILDGEBUNG.....	25
3.2.2 BLUTFLUSS.....	30
3.2.3 $T_2^*$ -GEWICHTETE BILDGEBUNG .....	33
3.2.4 ENERGISTOFFWECHSEL UND PH-REGULATION .....	35
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>42</b>
4.1 METHODEN .....	42
4.2 $\text{O}_2$ -BEDARF UND $\text{O}_2$ -VERSORGUNG.....	45
4.3 ENERGETIK & $\text{pH}_i$ -REGULATION .....	51
4.4 CHARAKTERISIERUNG TEMPERATURABHÄNGIGER TOLERANZGRENZEN .....	53
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>58</b>
<b>6 LITERATUR.....</b>	<b>60</b>
<b>7 ANHANG.....</b>	<b>67</b>
7.1 PARAMETER FÜR DIE NMR MESSUNGEN: .....	67
7.2 OPTODENCONTAINER .....	68
7.3 $T_1$ -WERTE.....	69

**Abkürzungsverzeichnis**

<b><sup>31</sup>P</b>	<sup>31</sup> Phosphor
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ATP</b>	Adenosin-5'-triphosphat
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>E<sub>a</sub></b>	Aktivierungsenergie
<b>FG</b>	Frischgewicht
<b>GPC</b>	Glycerophosphocholin
<b>GPE</b>	Glycerophosphoethanolamin
<b>M<sub>O2</sub></b>	molarer Sauerstoffverbrauch
<b>MS 222</b>	3-Aminobenzoessäureethylester
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>n</b>	Anzahl der Versuchstiere
<b>NMR</b>	Kernspinresonanz
<b>p</b>	Irrtumswahrscheinlichkeit
<b>P<sub>CO2</sub></b>	Kohlendioxidpartialdruck
<b>PCK</b>	Phosphokreatinkinase
<b>PCr</b>	Phosphokreatin
<b>PDE</b>	Phosphodiester
<b>P<sub>H2O</sub></b>	Wasserdampfdruck
<b>pH<sub>i</sub></b>	intrazellulärer pH-Wert
<b>P<sub>i</sub></b>	freies anorganisches Phosphat
<b>PME</b>	Phosphomonoester
<b>P<sub>O2</sub></b>	Sauerstoffpartialdruck
<b>Q<sub>10</sub></b>	Beschleunigungsfaktor eines physiologischen Prozesses bei einer Temperaturänderung von 10°C
<b>R<sup>2</sup></b>	quadrierter Korrelationskoeffizient
<b>StAbw</b>	Standardabweichung
<b>StF</b>	Standardfehler
<b>T</b>	Temperatur
<b>T<sub>crit</sub></b>	kritische Temperatur, die durch den Übergang zum anaeroben Stoffwechsel gekennzeichnet ist
<b>T<sub>p</sub></b>	<i>pejus</i> -Temperatur, definiert durch den Übergang vom Optimum- zum <i>pejus</i> -Bereich
<b>T<sub>let</sub></b>	Letale Temperatur
<b>vgl.</b>	vergleiche
<b>z. B.</b>	zum Beispiel

# 1 Einleitung

Die Neubesiedelung des antarktischen Ozeans mit rezenten Knochenfischen (*Teleostei*), wie den in dieser Arbeit untersuchten Vertretern der *Zoarcidae*, setzte im frühen Miozän vor etwa 25 Millionen Jahren ein (Anderson, 1994). Zu dieser Zeit begann sich das polare Klima in der Antarktis langsam zu stabilisieren (Arntz *et al.*, 1994), wurde bis zur letzten Eiszeit aber immer wieder durch wärmere Perioden unterbrochen. Die Entstehung des Antarktischen Zirkumpolarstroms und der Antarktischen Konvergenz vor etwa 23 Millionen Jahren isolierte die Wassermassen des Südlichen Ozeans von den umliegenden Meeren und begünstigte die Entwicklung eines kalt-stabilen antarktischen Ökosystems, in dem die nahezu konstant niedrigen Wassertemperaturen ganzjährig nur zwischen  $-1,9$  und  $1,0^{\circ}\text{C}$  schwanken (Olbers *et al.*, 1992).

Für die ektothermen Organismen in diesem Ökosystem, die ihre Körpertemperatur gegenüber der Umgebungstemperatur nicht regulieren können, bedeutet dies, dass sie ihre Lebensstrategie auf die Umweltbedingungen in der Antarktis einstellen mussten. So produzieren die meisten antarktischen (und arktischen) Fischarten Frostschutzproteine, um ihre dem Meerwasser gegenüber hypoosmotischen Körperflüssigkeiten bei niedrigen Temperaturen vor dem Gefrieren zu bewahren. Bei der in dieser Arbeit untersuchten antarktischen Aalmutter *Pachycara brachycephalum* wurden drei solcher Peptide gefunden (bestehend aus 13 bis 14 Aminosäuren,  $M_r$  6900), die an Eiskristalle adsorbieren und so eine Barriere zwischen Eisoberfläche und Wassermolekülen bilden (Kock, 1992). In der Kälte steigt auch der Gehalt ungesättigter Fettsäuren in Zellmembranen, um ihre Fluidität zu erhalten (homöoviskose Adaptation, siehe Moran & Melani, 2001).

Um die kältebedingt erhöhte Viskosität des Blutes zu erniedrigen, haben viele polare Fische einen niedrigeren Hämatokrit als Meeresfische gemäßigter Breiten. Im Sonderfall der antarktischen Eisfische (*Channichthyidae*) fehlen rote Blutzellen und Hämoglobin sogar ganz. Die verringerte Sauerstoffkapazität des Blutes wird zum einen durch eine passivere Lebensweise und eine höhere Sauerstoffaffinität kompensiert (Wells & Jokumsen, 1982; Sidell, 1998), zum anderen ist bei niedrigen Temperaturen die physikalische Löslichkeit von Sauerstoff im Blut und in anderen Körperflüssigkeiten gesteigert. Im Vergleich zu Fischen, die über Hämoglobin verfügen, besitzen die Eisfische zusätzlich noch ein größeres Herz- und Blutvolumen sowie eine höhere Mitochondriendichte im Herzen (Sidell, 1991; O'Brien & Sidell, 2000).

Niedrige Temperaturen können auch im Cytosol zu einem Viskositätsanstieg und einer Herabsetzung von Diffusionsprozessen führen, so dass es mit sinkender Temperatur möglicherweise zu einer Verringerung des Sauerstofftransportes zu den Mitochondrien kommt (Sidell, 1991). In Kombination mit einer temperaturbedingten Erniedrigung von Enzymaktivitäten kann dies letztlich eine Einschränkung der Stoffwechselrate bedingen. Um trotz der niedrigen Temperaturen physiologische Funktionen aufrecht zu erhalten und eine funktionelle Hypoxie vermeiden zu können, bedarf es daher einer Anpassung des Stoffwechsel an die Kälte.

Scholander *et al.* (1953) und Wohlschlag (1960) fanden bei niedrigen Temperaturen für polare Fischarten deutlich höhere Stoffwechselraten, als es die auf die gleichen Temperaturen extrapolierten Stoffwechselraten tropischer Fische erwarten ließen. Diese Befunde führten zur Hypothese der *metabolic cold adaptation* (MCA), die aufgrund neuerer Untersuchungen kontrovers diskutiert, vor allem von Holeton (1974) und Clarke (1983, 1991, 1993) stark kritisiert und von Clarke & Johnston (1999) für die polare Gruppe der *Notothenoidae* widerlegt wurde. Der heutige Stand der Untersuchungen lässt vermuten, dass bei antarktischen Fischen eine MCA nur in geringem Ausmaß vorliegt und eine vollständige Kompensation nicht erreicht wird (Hardewig *et al.*, 1998).

Kaltadaptierte Arten besitzen höhere Mitochondriendichten als Arten aus gemäßigten Breiten (Dunn, 1988 in Hardewig *et al.*, 1998). Eine Temperaturabhängigkeit der Mitochondriendichte konnte auch im Verlauf von Akklimationsprozessen beobachtet werden (Johnston & Dunn, 1987; Sidell, 1998) (Akklimation: Anpassung an einen bestimmten Faktor, z. B. Temperatur, über mehrere Wochen im Labor, vgl. hierzu Clarke, 1991). Eine höhere Mitochondriendichte verkürzt zum einen die Diffusionswege z. B. für Sauerstoff zwischen den Kapillaren und den Mitochondrien, zum anderen erhöht sie die oxidative Kapazität des Organismus (Sidell, 1998). Ein ebenfalls in antarktischen Fischen beobachteter erhöhter Lipidgehalt erleichtert die Diffusion, den Transport und die Speicherung von Sauerstoff im Gewebe, da Sauerstoff in Lipiden 4 bis 5 mal besser diffundieren kann als im Cytosol (Sidell, 1991).

Auf der anderen Seite führt eine hohe Mitochondriendichte zu einer erhöhten Ruhestoffwechselrate (*standard metabolic rate*, SMR) und einem erhöhten Energiebedarf durch Protonenleckströme über die innere Mitochondrienmembran (Review: Pörtner, 2001). Dies kann über Veränderungen von Membraneigenschaften eingedämmt werden (Pörtner *et al.*, 1998a), des Weiteren weisen mitochondriale Enzyme mancher kälteadaptierter Fische eine höhere Aktivierungsenergie auf als diejenigen in Fischen gemäßigter Breiten

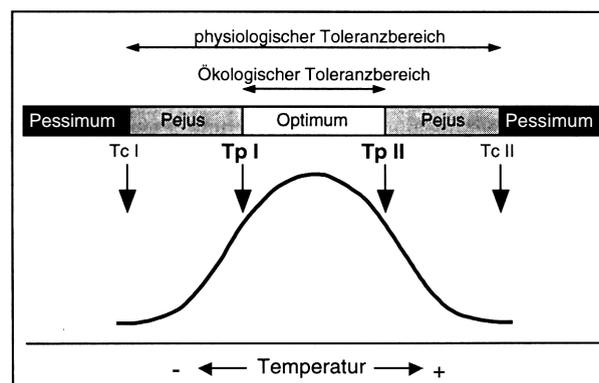
(Hardewig *et al.*, 1999; Pörtner *et al.*, 1999b, 2000b). Auf diese Weise kann die Stoffwechselrate bei niedrigen Temperaturen (und niedriger Umgebungsenergie) auf einem Niveau gehalten werden, das man von der Extrapolation der Stoffwechselraten von Fischen aus gemäßigten Breiten mit einer geringeren Mitochondriendichte erwartet. Insgesamt aber erhalten die Tiere durch diese Art der Kälteadaptation eine erhöhte Temperatursensibilität, die in ihrer Stenothermie zum Ausdruck kommt (Pörtner *et al.*, 1999a): Bei steigender Temperatur kommt es bei diesen Tieren zu einem starken Anstieg der Stoffwechselrate, sobald durch die Umgebungsenergie Aktivierungsenergie für den mitochondrialen Stoffwechsel bereitgestellt wird. Dadurch sind einer tolerierbaren Temperatursteigerung nach oben hin sehr enge Grenzen gesetzt. Stenothermie könnte demnach als das direkte Resultat einer Kälteadaptation angesehen werden.

Eine solche Temperatursensibilität existiert auch bei eurythermen Fischen gemäßigter Breiten, deren artspezifisches 'Temperaturfenster' zwar etwas größer ist, aber dennoch den Temperaturbereich markiert, auf den die Tiere zur Erhaltung ihrer Lebensfunktionen angewiesen sind. Gerade vor dem Hintergrund der globalen Erwärmung wird die Bedeutung der Temperaturtoleranz ektothermer Meeresorganismen ersichtlich, wie an einer temperaturbedingten Artenverschiebung von Zooplankton und anderen Invertebraten im Englischen Kanal (Southward *et al.*, 1995) oder am Rückgang des Dorschbestandes in der Nordsee (O'Brien *et al.*, 2000) gezeigt werden konnte.

Shelford legte 1931 mit seinem Toleranzgesetz den Grundstein für ein dreistufiges Modell für die Temperaturtoleranz ektothermer Organismen, das in der Folge von mehreren Autoren aufgegriffen wurde: Southward beschrieb 1958 ein Modell für marine Invertebraten, das sich in einen aktiven, einen inaktiven und einen komatösen Bereich gliedert. Ober- und unterhalb eines Aktivitätsbereichs schließt sich ein Bereich an, in dem die Tiere keine spontane Aktivität mehr zeigen, aber noch auf äußere Reize reagieren. Auf diesen *irritability range* folgt ein Bereich, in dem die Tiere in einen komatösen Zustand verfallen, auf die der Tod folgt. Weatherley (1970) vermutete, dass ein Anstieg im Sauerstoffbedarf mit steigender Temperatur solange durch eine Steigerung der Ventilation und des Blutflusses gedeckt werden, bis die respiratorischen und zirkulatorischen Systeme ihre maximale Kapazität erreicht haben, darüber tritt eine Sauerstofflimitierung ein. Jones (1971, in Johnston & Dunn, 1987) schlug vor, dass der Aktivitätsbereich eines marinen Organismus durch diejenigen Temperaturen eingeschränkt sein kann, an denen die aerobe Kapazität (*aerobic scope*) zu sinken beginnt, weil der Energiebedarf der Ventilation und

der Zirkulation zu groß wird und die Belieferung des Gewebes mit Sauerstoff somit nicht mehr gesteigert werden kann.

Gleichermaßen scheint es auch mit sinkender Temperatur zu einer temperaturinduzierten Kapazitätsreduktion des Kreislaufsystems zu kommen, die ebenfalls in eine Sauerstoffunterversorgung des Gewebes mündet. In ihren Arbeiten an *Sipunculus nudus* und *Arenicola marina* ermittelten Zielinski & Pörtner (1996) und Sommer *et al.* (1997) die hohen und niedrigen Temperaturen, an denen durch ein Missverhältnis von Sauerstoffbedarf und Sauerstoffbereitstellung ein Übergang zum anaeroben Stoffwechsel stattfindet und jenseits derer daher nur ein zeitlich limitiertes Überleben möglich ist. Diese definierten Zielinski & Pörtner (1996) als untere und obere kritische Temperaturen  $T_{crit I}$  und  $T_{crit II}$ . Weiterhin lassen sich innerhalb der kritischen Temperaturen noch Southward's *activity range* und *irritability range* unterscheiden, die durch einen konstanten bzw. durch eine Abnahme des *aerobic scope* gekennzeichnet sind. In Anlehnung an Shelford's Toleranzmodell definierten Frederich & Pörtner (2000) daher in ihrer Arbeit an der Seespinne *Maja squinado* die Temperaturen, an denen der Sauerstoffpartialdruck  $P_{O_2}$  in der Hämolymphe von *M. squinado* zu sinken begann – also eine Verschlechterung der Lebensbedingungen für die Tiere eintrat –, als untere und obere *pejus*-Temperaturen  $T_p I$  und  $T_p II$  (*pejus* = schlechter). Demnach finden ektotherme Organismen innerhalb von  $T_p I$  und  $T_p II$  optimale Lebensbedingungen vor (Abb. 1.1), zwischen  $T_p$  und  $T_{crit}$  ist ein Überleben zwar gewährleistet, allerdings mit zunehmenden Einschränkungen in Aktivität, Reproduktion und Wachstum (Pörtner, 2001).



**Abb. 1.1:** Modell der Übergangstemperaturen bei der Temperaturtoleranz (aus Frederich, 1999)

Die Übergangstemperatur  $T_p$  zwischen dem Optimums- und *pejus*-Bereich markiert vermutlich auch die geographischen Verbreitungsgrenzen einer Art (Pörtner, 2001). Hier

werden erste Limitierungen des Stoffwechsels sichtbar, die ein langfristiges Überleben im *pejus*-Bereich nicht zulassen. So kann es zu einer Abnahme im *aerobic scope* und auch zu temperaturbedingten Konfigurationsänderungen oder Störungen von Enzymen oder Membrantransportern kommen, die sich z. B. auf die pH-Regulation auswirken.

Für ektotherme Organismen ist es notwendig, trotz Temperaturschwankungen eine gleichmäßige Pufferkapazität des Blutes aufrecht zu erhalten, ein solcher pH-Regulationsmechanismus wird durch die a-stat Hypothese beschrieben. Die a-stat Hypothese wurde Anfang der siebziger Jahre vor dem Hintergrund der Beobachtung entwickelt, dass sich der pH-Wert der Intra- und Extrazellulärflüssigkeiten ektothermer Tiere mit der Temperatur verändert (Reeves, 1972). Die pH-Änderung folgt in Richtung und Ausmaß ( $-0,015$  bis  $-0,020$  pH/°C) der Verschiebung des pK der Imidazolgruppen von Histidylresten mit der Temperatur. Histidin ist die einzige Aminosäure, die mit einem Imidazolring eine funktionelle Gruppe besitzt, deren pK im physiologischen pH-Bereich liegt (pK' = 6,92). Damit spielt Histidin eine wichtige Rolle im Puffersystem des Organismus. Eine Ansäuerung mit steigender Temperatur wirkt dem Dissoziationsbestreben der Imidazolgruppen entgegen und erhält somit die Pufferkapazität und die funktionellen Eigenschaften eines Proteins aufrecht.

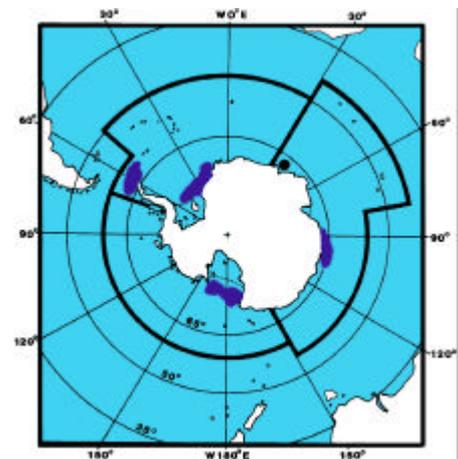
Ursprünglich als Modell für eine passive Regulation des Blut-pH entwickelt, wurde die a-stat Theorie im Lauf der Zeit immer wieder korrigiert und erweitert. Reeves (1985) entdeckte, dass auch aktive Mechanismen beteiligt sind, Cameron (1989) schlug als Verfeinerung die Z-stat Hypothese vor, die die Erhaltung einer konstanten Nettoladung der Enzyme in den Vordergrund stellt, weniger die Erhaltung einer konstanten Dissoziation der Histidin-Imidazolreste, wie es a-stat vorsieht. Schließlich spielen noch Eurythermie oder Stenothermie in Abhängigkeit vom Lebensraum eine Rolle. Während kalt stenotherme Tiere einen höheren passiven Anteil für die pH-Einstellung nutzen, findet man bei eurythermen Tieren einen größeren aktiven Anteil – vermutlich, damit die Tiere flexibler auf schwankende Temperaturen reagieren können (Pörtner *et al.*, 1998a; van Dijk *et al.*, 1997; Sartoris *et al.*, 2001). Bei Anneliden (*A. marina*) läuft eine pH-Regulation nach dem a-stat Muster nur im Bereich zwischen den kritischen Temperaturen ab (Sommer *et al.*, 1997), dies lässt vermuten, dass auch die pH-Regulation von einer Sauerstofflimitierung betroffen ist.

Nach dem bisherigen Stand des Wissens ist denkbar, dass die Verfügbarkeit von Sauerstoff eine zentrale Rolle in der Temperaturtoleranz ektothermer Organismen spielt. Die Sauerstoffversorgung ist also möglicherweise das schwächste Glied in einer Kette von

Mechanismen, die eine Temperaturtoleranz aufrecht erhalten. Demnach könnte Sauerstoff der limitierende Faktor sein, dessen unzureichende Aufnahme schließlich zum temperaturbedingten Tod des Organismus führt.

Die Bedeutung von Sauerstoff als möglichem Schlüsselfaktor in der Temperaturtoleranz soll in dieser Arbeit an einer stenothermen antarktischen Fischart untersucht werden, da bei stenothermen Arten die Temperaturtoleranz weitaus weniger ausgeprägt ist als bei eurythermen Arten und die Effekte der Temperatur auf die Stoffwechselprozesse deutlicher hervortreten. Als Versuchstier kam dafür die kalt-adaptierte stenotherme antarktische Aalmutter (*Pachycara brachycephalum*) in Frage, die relativ einfach zu fangen und in Aquarien zu halten ist. Zudem sind diese trägen benthischen Tiere sehr inaktiv, wodurch sie sich für Langzeituntersuchungen und Sauerstoffverbrauchsmessungen in einer Tierkammer sehr gut eignen. Aalmuttern sind außerdem weltweit vertreten, daher lassen sich gut vergleichende Untersuchungen zwischen stenothermen antarktischen und eurythermen Arten der gleichen Familie aus gemäßigten Breiten (z. B. Nord- und Ostsee) durchführen.

Die Familie der Aalmuttern (*Zoarcidae*) umfaßt etwa 220 Spezies. Die Aalmuttern gehören zu den perciformen Fischen und bewohnen die Kontinentalschelfe und küstennahen Hänge der borealen Meere. Ursprünglich vor etwa 50 Millionen Jahren (Eozän) im Nord-Pazifischen Raum entstanden, haben sie sich über die ganze Welt verbreitet (Anderson, 1994). So kommen einzelne Arten von der Tiefsee über pazifische Hydrothermalquellen bis in die höchsten Breiten der Antarktis vor, 22 Arten besiedeln allein den Südlichen Ozean, eine davon ist die untersuchte Art *Pachycara brachycephalum*.



**Abb. 1.2:** Die antarktische Aalmutter *Pachycara brachycephalum* und ihr Vorkommen in der Antarktis (nachgewiesene Verbreitungsgebiete sind dunkelblau schattiert. Foto: C. Held)

Die antarktische Aalmutter *Pachycara brachycephalum* lebt zirkumantarktisch an küstennahen Hängen in einer Tiefe von 200 bis etwa 1800m. Die Nahrung dieser streng stenothermen Grundfische setzt sich aus Muscheln, Schnecken, kleineren Amphipoden und Würmern zusammen (Anderson, 1990; Wohlschlag, 1963). Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere stammten aus einer Population der antarktischen Halbinsel in der Nähe von Deception Island.

In einigen Arbeiten an Invertebraten (Pörtner et al., unveröffentl. Daten; Frederich & Pörtner, 2000; Sommer et al., 1997) ist gezeigt worden, dass die Sauerstoffversorgung die erste kritische Schwelle in der Temperaturtoleranz darstellt und dass diese Schwelle durch eine zusätzliche Sauerstoffgabe verschoben werden kann (Pörtner et al., unveröffentl. Daten). In der vorliegenden Diplomarbeit sollte daher versucht werden, die Theorie der Sauerstofflimitierung der Temperaturtoleranz auf der Ebene der Vertebraten zu untersuchen. Es sollten  $T_p$  II und  $T_{crit}$  II von *P. brachycephalum* ermittelt und darauf überprüft werden, ob sie sich durch eine erhöhte Sauerstoffkonzentration hin zu höheren Temperaturen verschieben lassen.

Hierzu wurde je eine Messreihe unter Normoxie und unter Hyperoxie durchgeführt, in denen die Tiere über mehrere Tage hinweg konstant erwärmt wurden. In den Experimenten sollten die Tiere möglichst schonend über einen weiten Temperaturbereich beobachtet werden, um Aussagen über Temperatureinflüsse auf den Organismus in seiner Gesamtheit treffen zu können. Daher wurden Sauerstoffverbrauchsmessungen in Kombination mit *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR-spektroskopischen und  $^1\text{H}$ -NMR-tomographischen Messungen durchgeführt, um Respiration, Energiehaushalt, den intrazellulären pH-Wert sowie den arteriellen und venösen Blutfluss und den Oxygenierungsgrad ausgewählter Gewebe in Abhängigkeit von Temperatur und Sauerstoffpartialdruck am lebenden Tier verfolgen zu können.

## 2 Material und Methoden

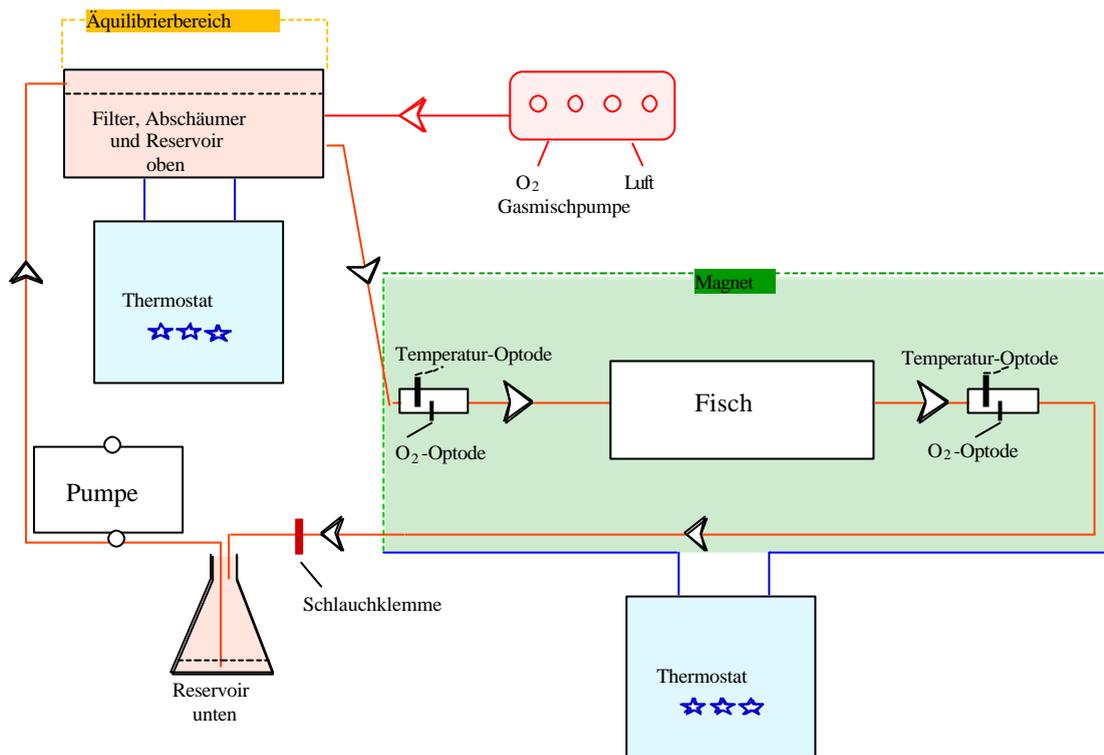
### 2.1 Versuchstiere

Die in den Versuchen eingesetzten antarktischen Aalmuttern der Art *Pachycara brachycephalum* wurden während der POLARSTERN-Expedition ANT XVII/3 im März 2000 in der Nähe von Deception Island (Station 170; 62° 55,83'S, 60° 26,88'W) in beköderten Reusen in 475m Wassertiefe gefangen. Die Temperatur betrug 0,4°C bei einer Salinität von 34,5‰. Bis zu ihrem Eintreffen am 14.5.2000 in Bremerhaven wurden die Tiere im Aquariencontainer an Bord der POLARSTERN bei 0°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) gehältert. In Bremerhaven wurden sie bis zum Beginn der Versuche im Aquarium des Alfred-Wegener-Instituts bei 0°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ) in Seewasser aus der Nordsee (Tiefe Rinne, Helgoland) gehalten, die Salinität betrug 32,5‰. Vor Beginn der Versuchsreihen wurden die Tiere mit Garnelen gefüttert, später erhielten sie Muscheln, da die schwer verdaulichen Panzer der Garnelen im Magen der Fische Artefakte in der NMR-Bildgebung hervorriefen. Die Fische wurden zehn Tage vor Versuchsbeginn nicht mehr gefüttert, um sicherzustellen, dass ihr Energieumsatz weitgehend unbeeinflusst von Verdauungsprozessen war.

Die Fische hatten eine Länge zwischen 24 und 30cm und wogen 36 bis 74g.

### 2.2 Aufbau und Durchführung der Versuche

Für die Versuche wurden die Tiere im Aquarium in eine Plexiglaskammer eingesetzt und darin in das Zentrum der Magnetbohrung überführt. Die Kammer (Fa. Rietzel, Langenhagen) hatte ein Volumen von ca. 300ml und bot den Tieren genügend Raum, um sich zu bewegen. Über Klickventile (Colder Products Company GmbH, Groß-Gerau) und Kunststoffschläuche („gasdicht“; Tygon, Norton Plastics, USA) war die Kammer mit einem Reservoir verbunden, das etwa 30l Seewasser enthielt. Das Reservoir befand sich auf höherem Niveau als die Tierkammer, so dass das Wasser aufgrund des hydrostatischen Druckunterschiedes aus dem Reservoir in die Tierkammer und von dort weiter in einen Sammelbehälter floss, aus dem es mit einer Peristaltikpumpe (Fa. Masterflex, Barrington, IL, USA) zurück ins Reservoir gepumpt wurde. Über eine Schlauchklemme vor dem Sammelbehälter konnte die Flussrate auf  $\pm 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  eingestellt werden (siehe *Abb. 2.2.1*).



**Abb. 2.2.1: Schema des Versuchsaufbaus.** Rechts im Bild befindet sich der Magnet (grün) mit der Fischkammer und den Containern, die die Sauerstoff- und Temperaturoptoden enthielten, darüber die Gasmischpumpe, die das obere Reservoir begast, aus dem das Wasser hydrostatisch durch die Fischkammer im Magneten in das untere Reservoir fließt. Eine Pumpe schließt den Kreislauf, die Flußgeschwindigkeit ist über eine Schlauchklemme regulierbar. Die Temperaturen im Schlauch, Reservoir und Magnet werden über Thermostate reguliert.

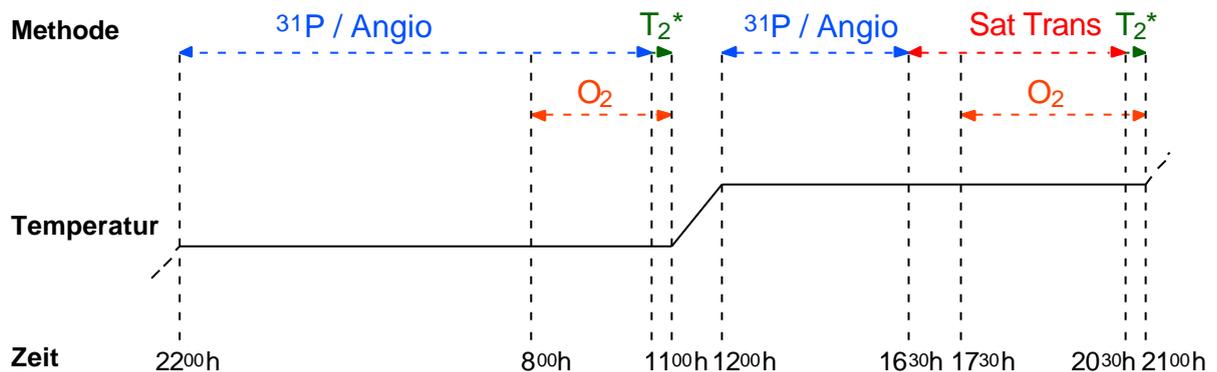
Das Reservoir selbst bestand aus einer isolierten und abgedichteten 50-l-Plastiktonne, in der sich ein Aquarienfilter und Eiweiß-Abschäumer (Eheim GmbH, Deizisau) befanden. Das Wasser in der Tonne wurde über Sprudelsteine und den Abschäumerzufluss wahlweise mit einer Luftpumpe oder einer 4-Kanal Gasmischpumpe (Fa. Wösthoff, Bochum) begast. Über drei Kühlthermostate (Fa. Lauda, Königshofen; Fa. Julabo, Seelbach) wurde die Temperatur des Reservoirs, die der Schlauchbrücke zum Magneten und die des Gradientenrohres im Magneten reguliert.

## 2.2.1 Versuchsprotokoll

Zwei Versuchsreihen mit je fünf Versuchstieren in einem Temperaturbereich von 0°C bis 16°C bilden die Grundlage dieser Arbeit. Bei einer Kontrollreihe unter Normoxie erfolgte die Begasung des Seewasserreservoirs mit Raumluft, der Sauerstoffpartialdruck im Wasser betrug etwa 20,0 bis 21,4 kPa (150 bis 160 Torr). In einer zweiten Versuchsreihe (Hyperoxie) wurde das Reservoir mit einer Gasmischpumpe begast, das Gasgemisch bestand aus 30% Sauerstoff und 70% Raumluft, so dass der Sauerstoffpartialdruck im Reservoir bei 45,3 kPa (340 Torr) lag. Die Tiere wurden jeweils 12 Stunden vor Beginn

der Experimente in den Versuchsaufbau eingesetzt, um eine ausreichende Erholung zu gewährleisten, da viele antarktische Fischarten nach Fang und Manipulation zwischen 8 und 48 Stunden benötigen, um zu einem konstanten Ruhestoffwechsel zurückzukehren (Holeton, 1974; Wells, 1986; Johnston *et al.*, 1991). Der Erholungszustand wurde anhand von Kontroll- $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren überprüft. Im Verlauf von 24 Stunden wurde die Temperatur in zwei Schritten um jeweils  $1^\circ\text{C}$  erhöht, die Zeitintervalle bei konstanter Temperatur betragen neun (tagsüber) bzw. 13 Stunden (nachts). Die Temperaturerhöhung erstreckte sich über eine Stunde, jeweils vier Stunden zuvor wurde die Flussrate reduziert und der Sauerstoffverbrauch gemessen.

Parallel dazu wurden tagsüber Messungen zur Gewebeoxygenierung ( $T_2^*$ -gewichtete Bildgebung, siehe Abschnitt 2.4.5) und *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR-Sättigungstransfer (spektroskopische Messungen) durchgeführt. Dazwischen wurden abwechselnd *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -Spektren zum Verfolgen des Energiestoffwechsels und flussgewichtete Bilder (Messung des Blutflusses, ‚Angiographie‘) aufgenommen (siehe Abb. 2.2.2).

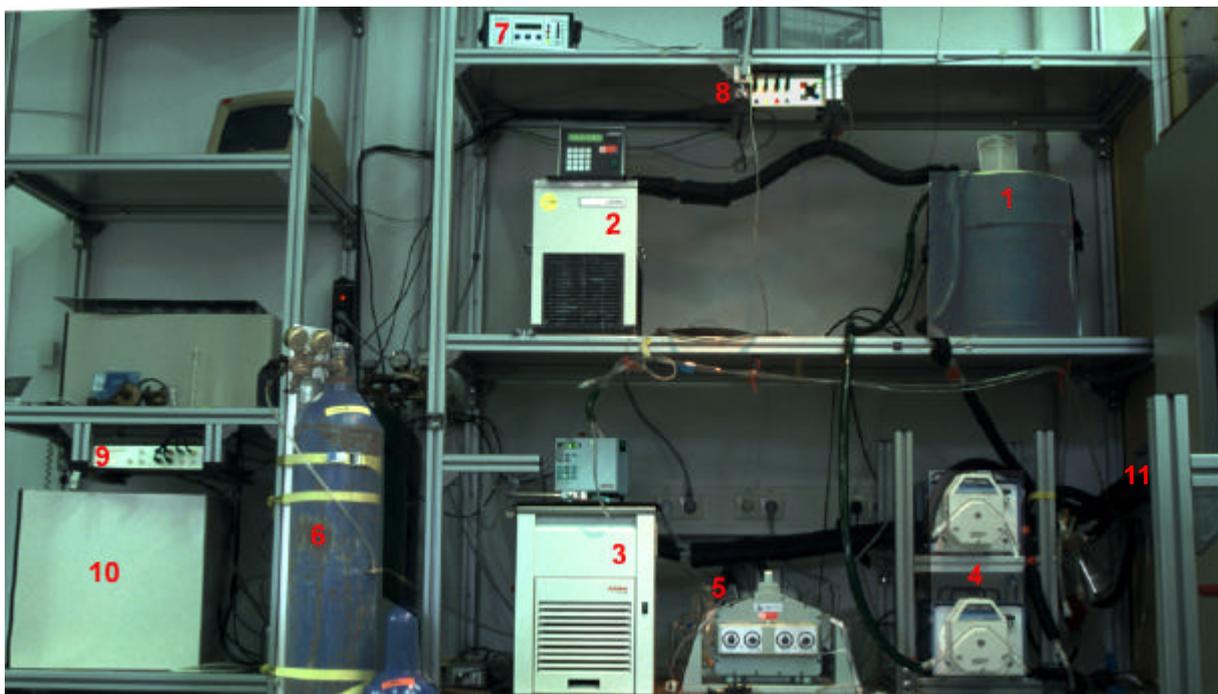


**Abb. 2.2.2: Protokoll eines Versuchstages.** Dargestellt ist das Temperaturprofil über 24h sowie Dauer und Zeitpunkt der Sauerstoffverbrauchsmessungen ( $\text{O}_2$ ) und der NMR-Experimente. ( $^{31}\text{P}$ :  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie; **Angio**: Flussgewichtete Bildgebung;  $T_2^*$ : Gewebeoxygenierung; **Sat Trans**: Sättigungstransferexperimente).

Die Experimente endeten mit dem Tod der Versuchstiere. Nach Abschluss der Experimente wurden alle Tiere vermessen, gewogen und auf Parasiten untersucht. Für eine Metabolitenbestimmung (nicht Teil dieser Arbeit) wurden vier Tiere der Kontrollreihe lebend bei  $12^\circ\text{C}$  aus dem Versuchsaufbau entnommen, mit MS 222 (0,5 g/l) betäubt und auf Eis präpariert. Nach Abschluss der Probennahme wurden die Tiere dekapitiert.

## 2.3 Respiration

In einem Magnetfeld ist es schwierig bis unmöglich, Sauerstoffgehalt und Temperatur mit elektrochemischen oder elektronischen Sensoren zu messen, ohne dass ihre Funktionen durch die Hochfrequenzimpulse des NMR-Systems beeinflusst werden. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Temperatur und Sauerstoffverbrauch über optische Methoden bestimmt: Die Sauerstoffverbrauchsmessungen wurden mit Hilfe eines 4-Kanal-O<sub>2</sub>-Messgerät (MOPS-4, COMTE GmbH, Hannover) durchgeführt, dessen Funktion auf Fluoreszenzquenching eines lichtsensitiven Farbstoffes an der Spitze eines Lichtleiters (Optode) durch Sauerstoffmoleküle beruht. Die Temperaturmessung erfolgte ebenfalls auf optischem Wege durch fluoroptische Temperatursensoren (Luxtron 504, Polytec, Waldheim). Ein Sauerstoffsensor und ein Temperatursensor wurden in einen kleinen Plexiglascontainer (Zeichnung siehe Anhang) montiert, je ein Container befand sich unmittelbar vor und hinter der Kammer. Auf diese Weise ließen sich der Sauerstoffgehalt und die Temperatur des ein- und ausfließenden Wassers kontinuierlich aufzeichnen, die Genauigkeit der Temperaturmessung betrug  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ . Die Länge der Optoden (6m) beeinflusste die Messungen nicht. Über Klickventile ließen sich die Container zum Eichen der Sauerstoffoptoden aus dem Kreislauf entfernen, die 100%-Eichung erfolgte im Fluss direkt vor der Tierkammer, die 0%-Eichung in einem separaten Seewasserkreislauf, der mit Stickstoff begast wurde.



**Abb. 2.2.3:** Darstellung des Versuchsaufbaus außerhalb des Magneten

1: Reservoir, 2: Kühlthermostat des Reservoirs, 3: Kühlthermostat der Schlauchbrücke zum Magneten, 4: Peristaltikpumpen, 5: Gasmischpumpe, 6: O<sub>2</sub>-Gasflaschen, 7: Optodengerät, 8: Temperatursensoren, 9: MacLab-System, 10: MacLab-Computer, 11: Durchführung zum Magneten

Die Sauerstoff- und Temperaturdaten wurden über ein 8-Kanal PowerLab/800 (ADInstruments, Castle Hill, Australien) digitalisiert und in einen Computer gespeist, auf dem die Auswertung mit der zugehörigen Software (Chart v3.5.4, ADInstruments) erfolgte (siehe *Abb. 2.2.3*).

Die Flussrate durch die Tierkammer wurde so eingestellt, dass die Fische 10 - 15% des zur Verfügung stehenden Sauerstoffs verbrauchten. Der Zeitraum bis zur Einstellung eines Gleichgewichts in der Sauerstoffverteilung in der Kammer ist abhängig von der Flussrate und kann über folgende Gleichung von Lasiewski *et al* (1966) bestimmt werden:

$$t = \left( 2,3 \times \frac{A}{\dot{V}} \right) \times \log \left( \frac{1}{1-z} \right)$$

mit

$t$  : Zeit, in der  $z$  erreicht wird  
 $A$  : Kammervolumen  
 $\dot{V}$  : Durchflussrate  
 $z$  : % Gleichgewicht

für  $z = 99\%$  gilt:  $t = 4,6 \times \frac{A}{\dot{V}}$

Nach Einstellung des Gleichgewichts wurde für bis zu drei Stunden die Sauerstoffpartialdruckdifferenz  $DP_{O_2}$  zwischen ein- und ausfließendem Wasser bestimmt und aus deren Mittelwert der Sauerstoffverbrauch  $\dot{M}_{O_2}$  nach folgender Gleichung berechnet:

$$\dot{M}_{O_2} = \left( \frac{\Delta P_{O_2} \times b_{O_2} \times \dot{V}}{TG} \right)$$

mit

$\dot{M}_{O_2}$  : Sauerstoffverbrauch [ $\mu\text{mol} \cdot \text{gFG}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ]  
 $DP_{O_2}$  : Partialdruckdifferenz zwischen ein- und ausfließendem Wasser [Torr]  
 $b_{O_2}$  : Sauerstoffkapazität des Wassers [ $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{Torr}^{-1}$ ]  
 $\dot{V}$  : Durchflussrate [ $\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$ ]  
 $TG$  : Tiergewicht [g]

Aufgrund der geringen Gewichts- und Größenunterschiede zwischen den Versuchstieren wurde auf einen Gewichts-Exponenten, wie er beispielsweise von Beamish (1963) vorgeschlagen wurde, verzichtet. Werte für die Sauerstoffkapazität des Wassers  $b_{O_2}$  und den Wasserdampfdruck  $P_{H_2O}$  zur Berechnung der Sauerstoffkonzentration  $C_{O_2}$  und des Sauerstoffpartialdrucks  $P_{O_2}$  entstammen Tabellen aus Boutilier *et al* (1984).

Um mit der Arrhenius-Aktivierungsenergie  $E_a$  ein Maß für die Temperaturabhängigkeit des Stoffwechsels zu bekommen, wurde der natürliche Logarithmus der Sauerstoffverbrauchswerte gegen die inverse absolute Temperatur in einem Arrhenius-Plot aufgetragen. Anhand der Steigung der Regressionsgeraden wurde die Aktivierungsenergie  $E_a$  nach einer modifizierten Gleichung von Segel (1976) berechnet:

$$E_a = -R \cdot m$$

$E_a$ : Aktivierungsenergie ( $J \cdot mol^{-1}$ )  
 $R$ : allgemeine Gaskonstante ( $8,314 J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$ )  
 $m$ : Steigung

Mit einer *Minimum Sum of Squares*-Analyse lassen sich die Steigungen der Regressionsgeraden auf Diskontinuitäten untersuchen, die auf *Arrhenius-Break-Temperatures* (ABT) hinweisen. ABT geben mögliche Diskontinuitäten in der Temperaturabhängigkeit des Stoffwechsels an.

Parallel zur Arrhenius-Aktivierungsenergie wurden für den Bereich zwischen 2 und 12°C die  $Q_{10}$ -Werte für den Sauerstoffverbrauch unter Normoxie und Hyperoxie bestimmt. Der  $Q_{10}$ -Wert gibt an, um welchen Faktor eine Reaktion beschleunigt wird, wenn die Reaktionstemperatur um 10°C erhöht wird. Zur Berechnung der  $Q_{10}$ -Werte diente die folgende Formel:

$$Q_{10} = \left( \frac{\dot{M}_{O_2 T_2}}{\dot{M}_{O_2 T_1}} \right)^{\frac{10}{(T_2 - T_1)}}$$

mit

$T_1$ : Ausgangstemperatur [°C]  
 $T_2$ : erhöhte Temperatur [°C]  
 $\dot{M}_{O_2 T_1}$ : Sauerstoffverbrauch bei  $T_1$   
 $\dot{M}_{O_2 T_2}$ : Sauerstoffverbrauch bei  $T_2$

## 2.4 NMR-Messungen

### 2.4.1 Hardware/Software

Die NMR-Experimente wurden an einem 4,7 Tesla Bruker Biospec DBX System (Resonanzfrequenz  $^1\text{H}$ : 200MHz) mit aktiv abgeschirmten Gradientenspulen (Fa. Bruker Medical, Ettlingen) durchgeführt. Die Bohrung des Magneten betrug 40cm. Als Sende- und Empfangsspule diente eine  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$  Oberflächenspule (Durchmesser 5cm). Die Steuerung und Auswertung der Experimente erfolgte durch das Programm ParaVision (Fa. Bruker Medical, Ettlingen) auf Unix Workstations (Fa. Silicon Graphics, USA). Zum Ausdrucken von Spektren wurde das Programm XWinPlot (Fa. Bruker, Ettlingen) verwendet.

Die in den Versuchen benutzten spektroskopischen und tomographischen *in vivo* NMR-Methoden werden im folgenden kurz dargestellt.

### 2.4.2 Blutfluss

Mit der flussgewichteten Bildgebung, die erstmals von A. Haase vorgestellt wurde (Haase *et al.*, 1986), lassen sich Änderungen in der Flussgeschwindigkeit z. B. in einem Blutgefäß verfolgen. Dazu werden in der zu untersuchenden Schicht gebundene Protonen gezielt gesättigt, so dass nur bewegte Protonen (z. B. im Wasser) detektiert werden, deren Flussdichte und -geschwindigkeit sich in der Intensität des erhaltenen Bildes widerspiegelt. Um den Einfluss von kurzfristigen temperaturinduzierten Schwankungen zu minimieren, wurde erst gegen Ende jeder Temperaturphase untersucht, inwiefern die Zirkulation in den Blutgefäßen von Temperatur und Sauerstoffkonzentration im umgebenden Wasser beeinflusst wird.

Bei reduziertem Wasserfluss wurde eine Sequenz von sechs Bildern aufgenommen. Die Schnittebene wurde so gewählt, dass sie durch den Rumpf des Tieres verlief und sowohl Rückenmuskulatur als auch Lebergewebe im Bild zu erkennen waren. Die Bilder aller Temperatursequenzen wurden in ihrer Intensität aufeinander abgestimmt. Über die *Aorta dorsalis* und *Vena cardinalis posterior* wurden *ROIs* (Region Of Interest) von etwa 16 *pixel units* (4\*4 pixel) gelegt, sowie ein *ROI* von etwa 12 *pixel units* über ein angeschnittenes großes Lebergefäß. Die mittlere Intensität der *ROIs* wurde automatisch durch XTip (ParaVision) bestimmt. Um andere Effekte auszuschließen, wurden die Intensitäten aller *ROIs* durch das Grundrauschen im Bild außerhalb der Tierkammer dividiert. Die Intensitäten der im Fischquerschnitt gewählten *ROIs* wurden durch die

Intensitäten von *ROIs* gleicher Abmessungen in einem Bild, das in gleicher Position ohne Fisch aufgenommen wurde, dividiert, um dem halbkugelförmigen Anregungsprofil der Oberflächenspule gerecht zu werden. So konnten die Intensitäten von *ROIs* an verschiedenen Positionen im Anregungsprofil untereinander verglichen werden.

Alle sechs Einzelwerte einer Bildsequenz wurden zu einem Gesamtwert der jeweiligen Temperatur gemittelt.

### 2.4.3 $T_2^*$ -gewichtete Bildgebung

Die von Ogawa entwickelte  $T_2^*$ -gewichtete Bildgebung (Ogawa *et al.*, 1990) ist eine NMR-Methode, mit der Unterschiede im Oxygenierungsgrad eines Gewebes dargestellt werden können. Hierbei macht man sich die unterschiedlichen magnetischen Eigenschaften von oxygeniertem und desoxygeniertem Hämoglobin zunutze, die sich auf die effektive Spin-Spin-Relaxationszeit  $T_2^*$  auswirken und somit den Bildkontrast beeinflussen. Mit Hilfe der  $T_2^*$ -gewichteten Bildgebung wurden die Auswirkungen von Temperatur und Hyperoxie auf die Gewebeoxygenierung in Muskulatur und Leber untersucht.

Die Auswertung der  $T_2^*$ -gewichteten Aufnahmen erfolgte im Prinzip wie für die Blutflussdaten beschrieben. Hier wurden vier bis acht Bilder pro Temperaturphase zu einem Mittelwert zusammengefasst. Die Schnittebenen der Bilder wurden so gewählt, dass sie mit den Ebenen der entsprechenden Blutfluss-Aufnahmen in ihrer Positionierung übereinstimmten. In den homogenen Bereich der Muskulatur links und rechts der Wirbelsäule sowie in die Leber wurde jeweils ein *ROI* von etwa 25 *pixel units* gelegt. Die Signal/Rausch-Optimierung und Intensitätsabgleichung der Bilder untereinander erfolgten auf die gleiche Weise wie für die Blutflussdaten beschrieben.

### 2.4.4 $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren

Die *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie erlaubt es, Konzentrationsänderungen sowie Verschiebungen in den Konzentrationsverhältnissen einiger phosphathaltiger Metabolite der Zelle (z. B. Phosphokreatin (PCr), Adenosintriphosphat (ATP), freies anorganisches Phosphat ( $\text{P}_i$ ) und Phosphodiester (PDE)) zu verfolgen. Darüber hinaus ist die chemische Verschiebung des freien Phosphates  $\text{P}_i$  abhängig von der Protonenkonzentration in der Zelle und lässt sich somit als Indikator des intrazellulären pH-Wertes ( $\text{pH}_i$ ) nutzen. In allen Versuchen wurden kontinuierlich  $^{31}\text{P}$ -Spektren aufgenommen, um die Abhängigkeit des

$\text{pH}_i$  von Temperatur und  $\text{P}_{\text{O}_2}$  sowie die Konzentrationsverhältnisse zwischen den am Energiestoffwechsel beteiligten Substanzen zu untersuchen.

Über das Programm ParaVision wurden Position sowie Breite, Intensität und Integrale der Signale von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -ATP, Phosphokreatin und freiem Phosphat berechnet und über das Macro *MergeMacLab&NMR* (programmiert durch R. Wittig) mit den Temperaturdaten verknüpft. Aus den Flächen (Integrale) wurden die Verhältnisse von  $\text{P}_i/\text{PCr}$ ,  $\gamma\text{-ATP}/\text{PCr}$  und  $\text{P}_i/\gamma\text{-ATP}$  gebildet, um etwaige Änderungen im Adenylatstoffwechsel aufzudecken.

Der  $\text{pH}_i$ -Wert wurde aus der Position des freien Phosphats  $\text{P}_i$  im Spektrum relativ zum Phosphokreatin PCr bestimmt. Dazu wurde eine  $\text{P}_i/\text{PCr}$ -Lösung mit Ionenkonzentrationen, die das intrazelluläre Milieu mariner Fische simulierten, bei verschiedenen pH-Werten gemessen, um die chemische Verschiebung des anorganischen Phosphates in Abhängigkeit vom pH zu bestimmen (Bock *et al.*, 2001). Aus den erhaltenen Titrationskurven ergab sich die folgende Formel, die zusätzlich noch einen Faktor zur Kompensation von Temperatureffekten beinhaltet:

$$\text{pH} \cong \left[ \frac{1979,5}{(T + 273)} - 5,4409 + 0,018567 \times (T + 273) \right] + \log \left[ \frac{d_0 - 0,67 + (0,003579 \times T)}{3,2 + (0,001888 \times T) - d_0} \right]$$

mit

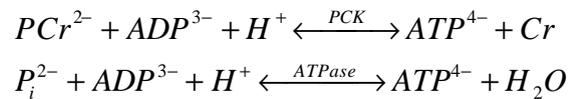
$d_0$  = chemische Verschiebung, geeicht auf 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$   
 $T$  : Temperatur in °C (verändert nach Kost *et al.*, 1990)

Mit dieser Formel lässt sich der  $\text{pH}_i$  im Gewebe der Fische mit einer relativen Genauigkeit von  $\pm 0,02$  pH Einheiten und absolut mit  $\pm 0,05$  pH Einheiten berechnen. Der pH-Wert wurde pro Temperatur und Versuch aus jeweils etwa 15 Spektren des Endverlaufs jeder Temperaturphase gemittelt.

## 2.4.5 Sättigungstransfer

Durch Sättigung der Magnetisierung des einen von zwei Reaktionspartnern einer chemischen Reaktion erster Ordnung kann der Einfluss des chemischen Austausches auf die Signalintensität beobachtet werden. Daraus lässt sich der unidirektionale Austausch zwischen den beiden Reaktionspartnern ableiten. Mit den Sättigungstransferexperimenten wurden die von der Phosphokreatinkinase (PCK) katalysierte Reaktion der

Phosphorylgruppenübertragung vom Phosphokreatin (PCr) auf ADP und die von der mitochondrialen ATPase katalysierte Phosphorylierung von ADP zu ATP untersucht:



Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  der Reaktionen erfolgte über die folgende Formel (Ouwerkerk *et al.*, 2000):

$$k = \left( 1 - \frac{M_0^S}{M_0^C} \right) \frac{1}{T_1^S}$$

$M_0^S$ : Magnetisierung des PCr- bzw. P<sub>i</sub>-Signals im Sättigungsexperiment

$M_0^C$ : Magnetisierung des PCr- bzw. P<sub>i</sub>-Signals im Kontrollexperiment  
(Spiegelfrequenz)

$T_1^S$ : T<sub>1</sub> Zeit des PCr- bzw. P<sub>i</sub>-Signals im Sättigungsexperiment

## 2.5 Angewandte Statistik

Als Voraussetzung für die statistischen Analysen wurden alle erhaltenen Datenreihen zunächst auf Normalverteilung und Varianzhomogenität getestet. Für die Normalverteilung wurde ein Kolmogorov-Smirnov Test, für die Varianzhomogenität ein  $\chi^2$ -Test angewandt (STATISTICA 4.0, StatSoft). Bei einem negativen Ergebnis wurden die Daten nach logarithmischer Transformation erneut auf Varianzhomogenität und Normalverteilung untersucht. Waren die Voraussetzungen für eine Varianzanalyse erfüllt, wurden die Datenreihen mit einer einfaktoriellen ANCOVA ( $p < 0,05$ ) und einem post-hoc Student-Newman-Keuls Test (Super ANOVA, Abacus Concepts Inc., USA) auf signifikante Unterschiede in den Kurvenverläufen zwischen Normoxie und Hyperoxie und einzelnen Kurvenabschnitten untersucht. Steigungen von Regressionsgeraden wurden über einen ungepaarten t-Test (Engel, 1997) auf signifikante Unterschiede überprüft. Innerhalb einer Temperaturreihe wurden einzelne Abschnitte über eine Contrasts Analyse ( $p < 0,05$ ) miteinander auf signifikante Unterschiede verglichen (Super ANOVA). Mit Hilfe einer Analyse der *Minimum Sum of Squares* (Super ANOVA) wurden Regressionsgeraden auf Diskontinuitäten und deren Lage untersucht (Nickerson *et al.*, 1989).

Die Regressionsgeraden der im Ergebnisteil dargestellten Diagramme wurden mit Sigma Plot 2000 (SPSS, USA) erstellt, die Geradengleichungen und der quadrierte

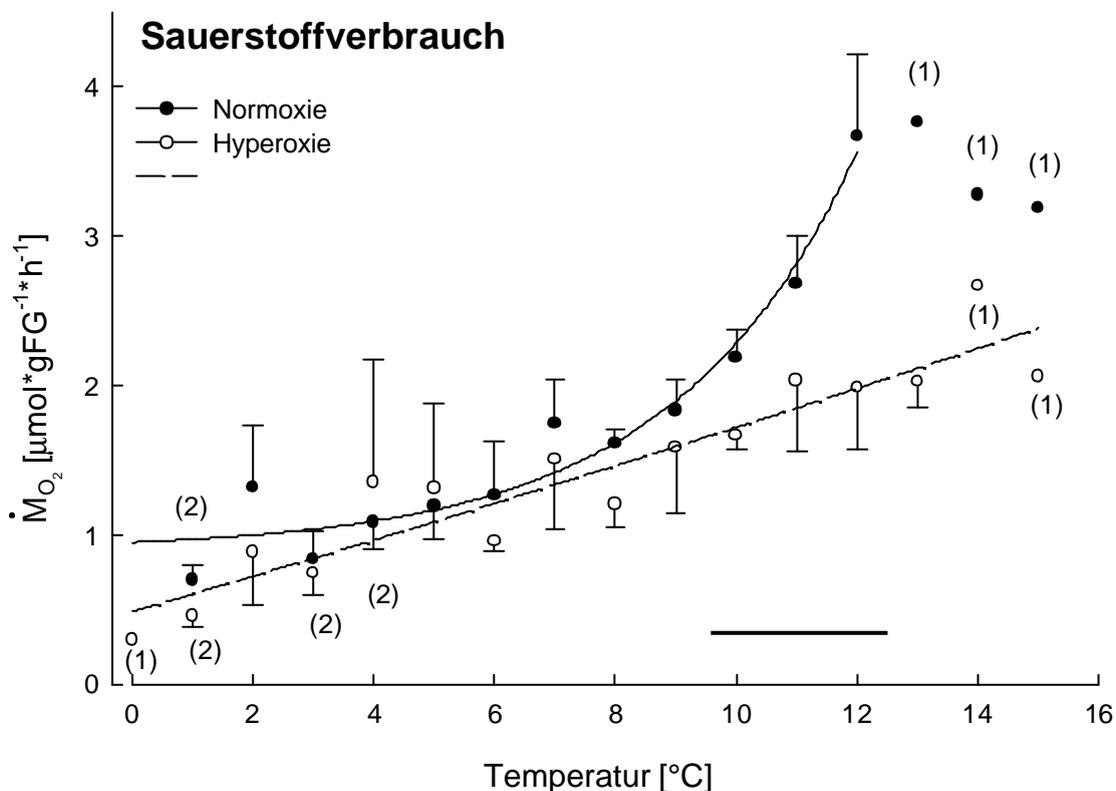
Korrelationskoeffizient  $R^2$  (Bestimmtheitsmaß) sind jeweils aufgeführt.  $R^2$  gibt an, welcher Anteil der Varianz (1,0 entspricht 100%) zwischen zwei normalverteilten Variablen auf Wechselwirkungen untereinander zurückzuführen ist (Engel, 1997).

Für eine bessere Vergleichbarkeit sind die Ergebnisse der Normoxie- (Kontroll-) und der Hyperoxierihe jeweils in einer Abbildung dargestellt. Falls nicht anders angegeben, wurden die Messwerte aller Versuchstiere einer Reihe für jede Temperatur zu einem Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (MW $\pm$ StF) zusammengefasst. Die Anzahl der Tiere je Datenpunkt (n) ist in der Legende angegeben, davon abweichende Werte für n sind in Klammern in den Abbildungen aufgeführt. Für n=2 wird statt des Standardfehlers (StF) die mittlere Abweichung (MA) angegeben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Respiration

Der Sauerstoffverbrauch der Tiere unter Normoxie und Hyperoxie im Bereich von 0-15°C ist in *Abbildung 3.1.1* dargestellt. Unter Normoxie ist ein exponentieller Anstieg des Sauerstoffverbrauchs mit steigender Temperatur zu erkennen. Überraschend ist der annähernd lineare Verlauf unter Hyperoxie ( $f(0-13^{\circ}\text{C}) = 0,1279x+0,4637$ ;  $R^2 = 0,88$ ), der sich oberhalb von 9°C signifikant von der Sauerstoffverbrauchskurve unter Normoxie ( $f(1-12^{\circ}\text{C}) = 0,6805e^{0,1229x}$ ;  $R^2 = 0,88$ ) unterscheidet. Ein exponentieller Anstieg konnte bei Hyperoxie nicht beobachtet werden.

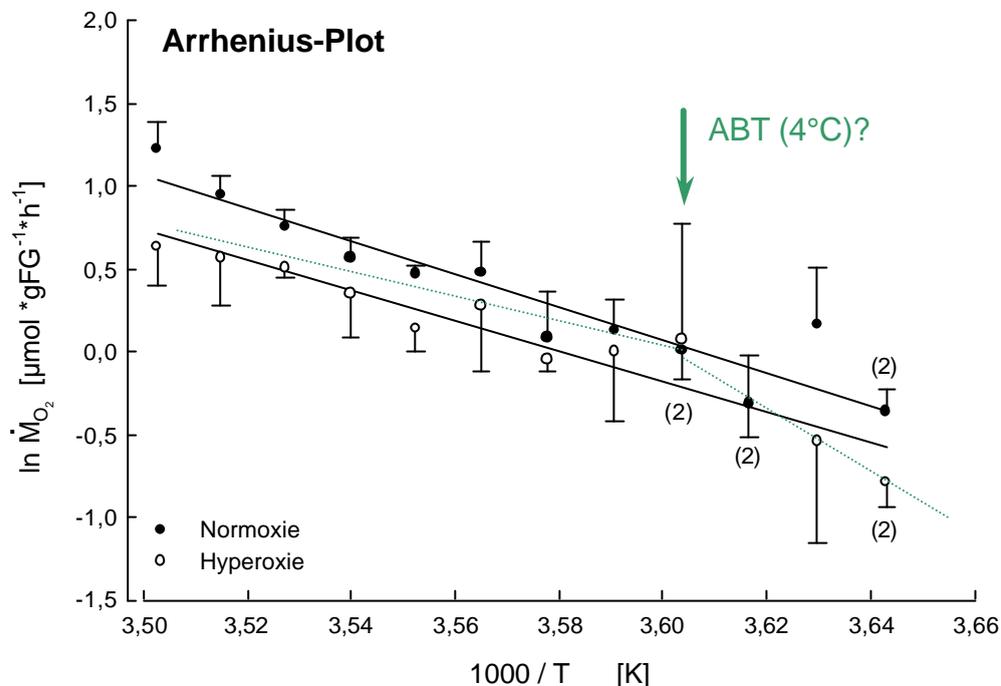


**Abb. 3.1.1: Sauerstoffverbrauch bei Hyperoxie und Normoxie während schrittweiser Temperaturerhöhung um 1°C alle 9 bzw. 13 Stunden**

Bei Normoxie erkennt man einen exponentiellen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs mit der Temperatur, im Unterschied zu einem eher linearen Verlauf bei Hyperoxie.

Die niedrigen n am oberen Ende der Temperaturskala sind durch einsetzende Mortalität, die niedrigen n im unteren Temperaturbereich durch methodische Probleme (Einfrieren des Systems bei zu niedrigen Flussraten) bedingt. n = 1 sind in den Ausgleichsgeraden nicht berücksichtigt (Normoxie: n = 3-7; Hyperoxie: n = 3-6; —: signifikanter Unterschied zwischen Normoxie und Hyperoxie).

In einem Arrhenius-Plot (Abbildung 3.1.2) wurde der natürliche Logarithmus der Sauerstoffverbrauchswerte gegen die inverse Temperatur aufgetragen, um die Aktivierungsenergien  $E_a$  unter Normoxie und Hyperoxie für den Bereich von 0–12°C berechnen zu können.



**Abb. 3.1.2: Arrhenius-Darstellung des Sauerstoffverbrauchs bei Hyperoxie und Normoxie während schrittweiser Temperaturerhöhung um 1°C alle 9 bzw. 13 Stunden**

**ABT:** mögliche *Arrhenius-Break-Temperature* bei Hyperoxie, die gepunktete Linie verdeutlicht den Verlauf der Regression bei dieser ABT (Normoxie: n = 3-7; Hyperoxie: n = 3-6)

Die Arrhenius-Darstellung lieferte für Normoxie und Hyperoxie folgende Regressionsgleichungen:

**Normoxie:**  $f(0-12^\circ\text{C}) = -9,914x + 35,757$   $R^2: 0,88$

**Hyperoxie:**  $f(0-12^\circ\text{C}) = -7,737x + 27,614$   $R^2: 0,72$

Aus den Steigungen der Arrhenius-Plots lassen sich über die Formel  $E_a = -R \cdot m$  (Segel, 1976) die Aktivierungsenergien für den Bereich von 0-12°C berechnen:

**Normoxie:**  $E_a = 89,12 \pm 8,57 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  (MW $\pm$ StF)

**Hyperoxie:**  $E_a = 63,53 \pm 10,00 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  (MW $\pm$ StF)

Unter Hyperoxie erscheint die Aktivierungsenergie erniedrigt, ein signifikanter Unterschied zwischen den Aktivierungsenergien ließ sich jedoch nicht nachweisen. Bei Hyperoxie lässt sich ein weiterer Trend erkennen (gestrichelte Linie): der Verlauf zwischen 1 und 4°C weist eine andere Steigung auf als zwischen 4 und 12°C, möglicherweise liegt zwischen 4 und 5°C eine *Arrhenius-Break-Temperature* (ABT), die

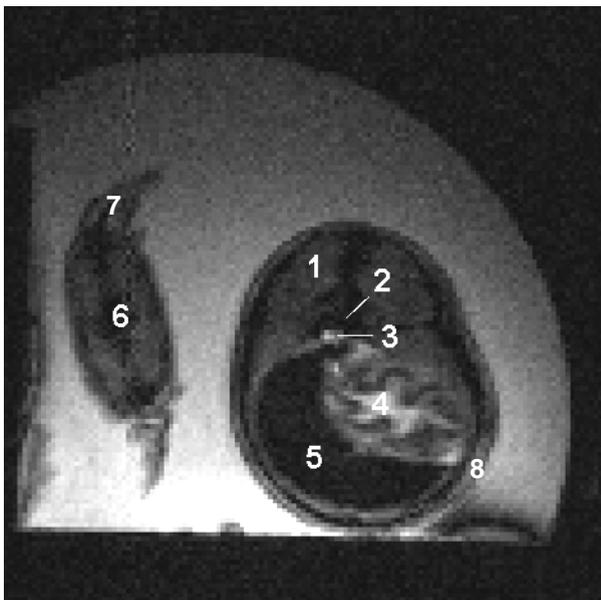
sich aufgrund der hohen Streuung der Einzelwerte jedoch statistisch nicht nachweisen lässt.

Der  $Q_{10}$ -Wert für den Bereich zwischen 2 und 12°C beträgt bei Normoxie  $3,40 \pm 0,55$ , bei Hyperoxie  $2,63 \pm 0,48$  (MW $\pm$ StF).

## 3.2 NMR-Experimente

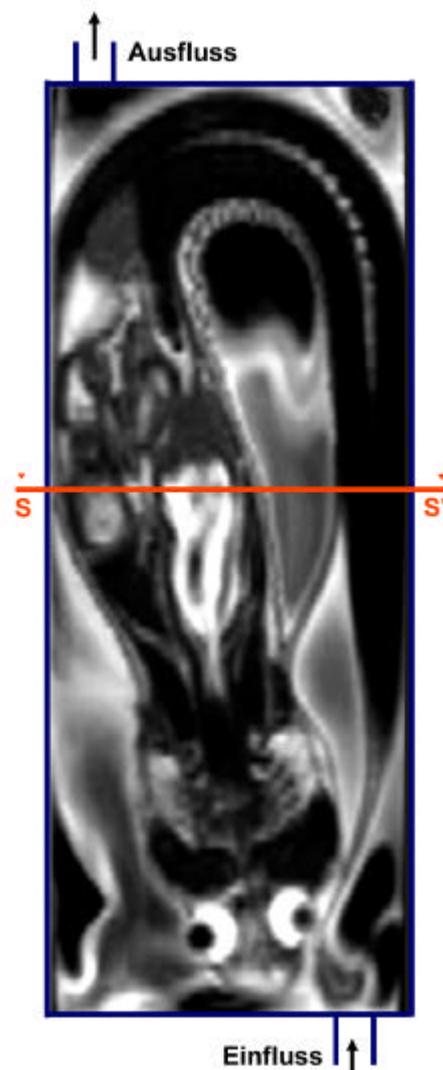
In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der tomographischen und spektroskopischen NMR-Experimente dargestellt. Zu Beginn eines jeden Abschnitts werden grundlegende Eigenschaften der Methoden vorgestellt, um dann vor diesem Hintergrund die Ergebnisse der untersuchten Parameter zu präsentieren.

### 3.2.1 Bildgebung



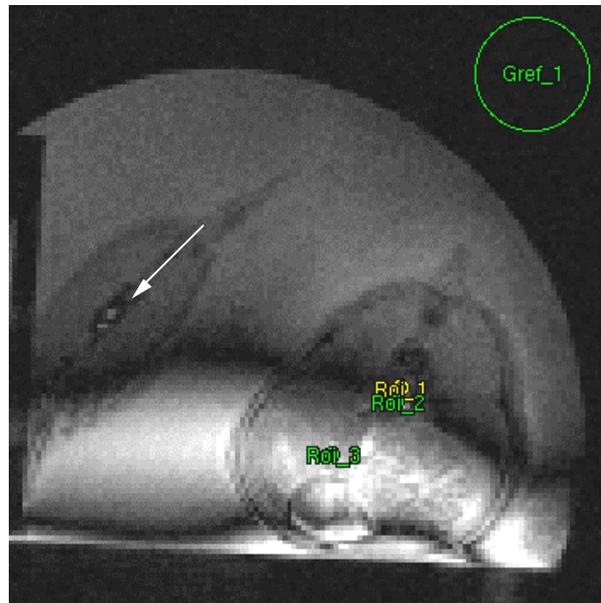
**Abb. 3.2.1 (oben):** Anatomischer Transversalschnitt durch die Bauchregion von *Pachycara brachycephalum*  
 1: Rückenmuskulatur; 2: Wirbelsäule;  
 3: Aorta dorsalis; 4: Magen; 5: Leber; 6: Schwanz;  
 7: Rückenflosse; 8: Epidermis

**Abb. 3.2.2 (rechts):** Beispielhafte Aufsicht auf die Position einer Aalmutter (*Pachycara brachycephalum*) in der Versuchskammer zur Verdeutlichung der Schnittebene des in Abb. 3.2.1 dargestellten Transversalschnitts. **S-S'**: Schnittebene



Stellvertretend für die bildgebenden Experimente dieser Arbeit zeigt *Abbildung 3.2.1* einen Transversalschnitt durch die Bauchregion einer antarktischen Aalmutter. Das Tier ruht in einer U-förmigen Stellung, die in *Abbildung 3.2.2* verdeutlicht wird, mit der Schwanzspitze in Richtung Kopfspitze weisend auf dem Boden der Plexiglaskammer,

deren äußere Begrenzungen (schwarz) zu erkennen sind. Man erkennt Leber, Magen und Blutgefäße, sowie Strukturen der Rückenmuskulatur, der Wirbelsäule und der Epidermis.



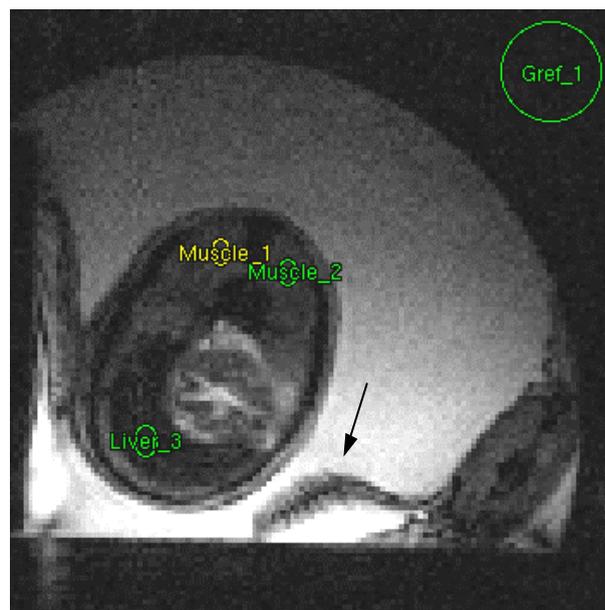
**Abb. 3.2.3: Beispiel für ein flussgewichtetes Bild.**

Dargestellt ist ein Transversalschnitt durch die Bauchregion von *P. brachycephalum*. Signalintensitäten wurden in den regions of interest (ROIs) bestimmt. Der Pfeil weist auf die Blutgefäße im Schwanz hin.  
 (Aufnahmezeit: 60 s, Temperatur 8°C; Hyperoxie)  
 ROI 1&2: *A. dorsalis* & *V. cardinalis post.*  
 ROI 3: Lebergefäß  
 Gref 1: Intensitätsreferenz

Abbildung 3.2.3 zeigt ein Beispiel für einen flussgewichteten Transversalschnitt aus dem vorderen Rumpfbereich (Schnittebene siehe Abb. 3.2.2), in den für die Auswertung bereits zwei ROIs auf die *Aorta dorsalis* und *Vena cardinalis posterior* im Rückenbereich und ein ROI auf ein Leberblutgefäß gelegt wurden. Man erkennt zum oberen Rand des Bildes einen Abfall der Signalintensität, der durch das halbkugelförmige Anregungsprofil der Spule hervorgerufen wird. Die Umrisse des Fischkörpers sind nur schemenhaft zu erkennen, da stationäre Spins in dieser Methode gesättigt werden und somit nur geringfügig zum Bildkontrast beitragen. Da es sich um eine flussgewichtete Messung handelt, sollte man im Idealfall nur die Blutgefäße erkennen, Gewebestrukturen hingegen gar nicht (vgl. Abschnitt 2.4.6). Dies ist hier recht gut gelungen, man erkennt kaum Intensitätsunterschiede zwischen Leber- und Muskelgewebe, dafür sind aber selbst im Schwanz die Rückenarterie (oben) und Rückenvene (unten) zu erkennen (siehe Pfeil). Die Regionen seitlich des Fisches erscheinen besonders hell, da hier Wasserzirkulation durch

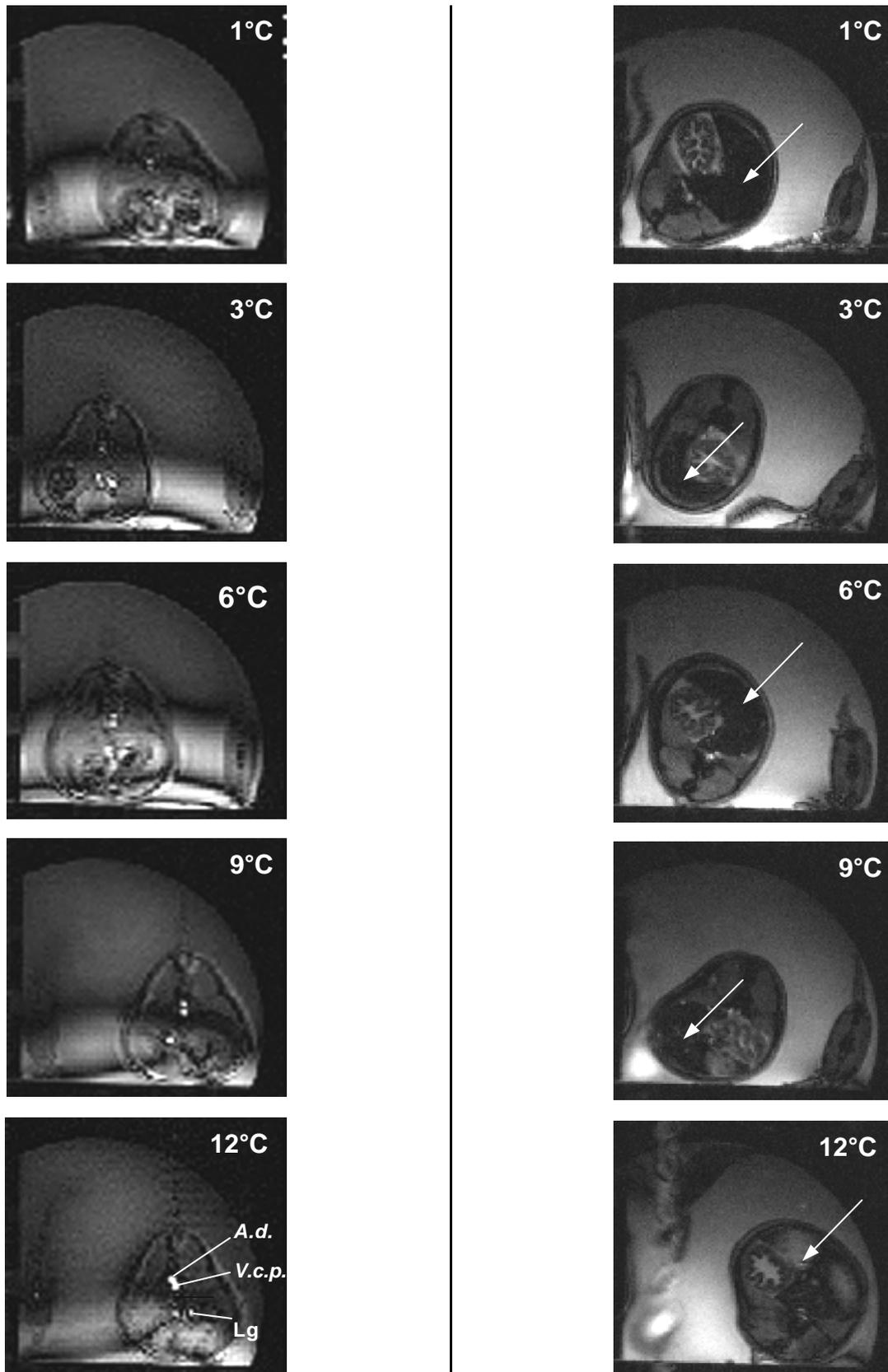
das Pumpen der Kiemendeckel auftritt. Dies ist in der Wahl der Schnittebene im vorderen Rumpfbereich begründet.

Ganz anders verhalten sich die Kontrastunterschiede in dem Bild einer  $T_2^*$ -gewichteten Messung, das in *Abbildung 3.2.4* dargestellt ist. Hier ist wieder ein Transversalschnitt durch die vordere Bauchregion von *Pachycara brachycephalum* abgebildet, in diesem Fall wurden auch die Brustflossen mit angeschnitten. Wiederum sind die für die Auswertung verwendeten *ROIs* in Muskulatur und Leber, sowie das als Intensitätsreferenz herangezogene *ROI* außerhalb des Kammervolumens zu sehen. Im  $T_2^*$ -Bild sind viel deutlichere Intensitätsunterschiede zwischen Muskel- und Lebergewebe zu erkennen, auch das Magengewebe tritt in diesem Bild viel kontrastreicher hervor als in *Abbildung 3.2.3*. Selbst die Brustflossen (siehe Pfeil) sind gegen die Umgebung abgesetzt. Wie in *Abbildung 3.2.3* ist auch hier wieder ein Abfall in der Signalintensität zum oberen Bildrand festzustellen, allerdings nicht so deutlich abgegrenzt wie in der flussgewichteten Aufnahme.



**Abb. 3.2.4: Beispiel für ein  $T_2^*$ -gewichtetes Bild.**

Dargestellt ist ein Transversalschnitt durch die Bauchregion von *P. brachycephalum*. Signalintensitäten wurden in den regions of interest (*ROIs*) bestimmt. Der Pfeil weist auf die Brustflosse hin.  
(Aufnahmezeit: 60 s; Temperatur 8°C; Normoxie)  
*Muscle 1&2*: Muskulatur  
*Liver 3*: Leber  
*Gref 1*: Intensitätsreferenz



**Abb. 3.2.5:** Flussgewichtete (linke Seite) und  $T_2^*$ -gewichteten Messungen (rechte Seite) unter Hyperoxie bei zunehmender Erwärmung. Links erkennt man eine Helligkeitszunahme beider Rückengefäße und der Lebergefäße mit der Temperatur. Auf der rechten Seite sind zwischen  $1^\circ\text{C}$  und  $12^\circ\text{C}$  Kontraständerungen in der Leber, Positionswechsel des Tieres und bei  $12^\circ\text{C}$  am linken Bildrand durch einen geringen Fluss in der Kammer erzeugte Artefakte zu erkennen. Jede Bildserie stammt von einem einzelnen Tier. Die Pfeile in der rechten Bildserie deuten die Position der Leber an. Im  $12^\circ\text{C}$  Bild der linken Bildserie sind exemplarisch die Blutgefäße beschriftet. **A.d.:** Aorta dorsalis; **V.c.p.:** Vena cardinalis posterior; **Lg:** Lebergefäß.

Die unterschiedlichen Kontraste der flussgewichteten und  $T_2^*$ -gewichteten Bilder werden auch in der in *Abbildung 3.2.5* gezeigten Bildserie von flussgewichteten und  $T_2^*$ -gewichteten Aufnahmen aus der Bauchregion von *Pachycara brachycephalum* bei verschiedenen Temperaturen deutlich. In der linken Bildserie (flussgewichtet) liegt wieder ein schlechteres Signal/Rausch-Verhältnis als in der rechten Serie ( $T_2^*$ -gewichtet) vor, nur die Umrisse des Fisches sind zu erkennen. Im 1°C-Bild erkennt man als hellen Punkt in der Mitte des Tieres die *Aorta dorsalis*, die im Verlauf der Temperaturserie immer größer und heller erscheint. Ab 6°C sind auch die *Vena cardinalis posterior* und die Lebergefäße zu erkennen, die bis 12°C ebenso in ihrer Helligkeit zunehmen. Bei 12°C ist sogar ein Blutgefäß im Schwanz zu erkennen, was auf einen Anstieg des Blutflusses schließen läßt.

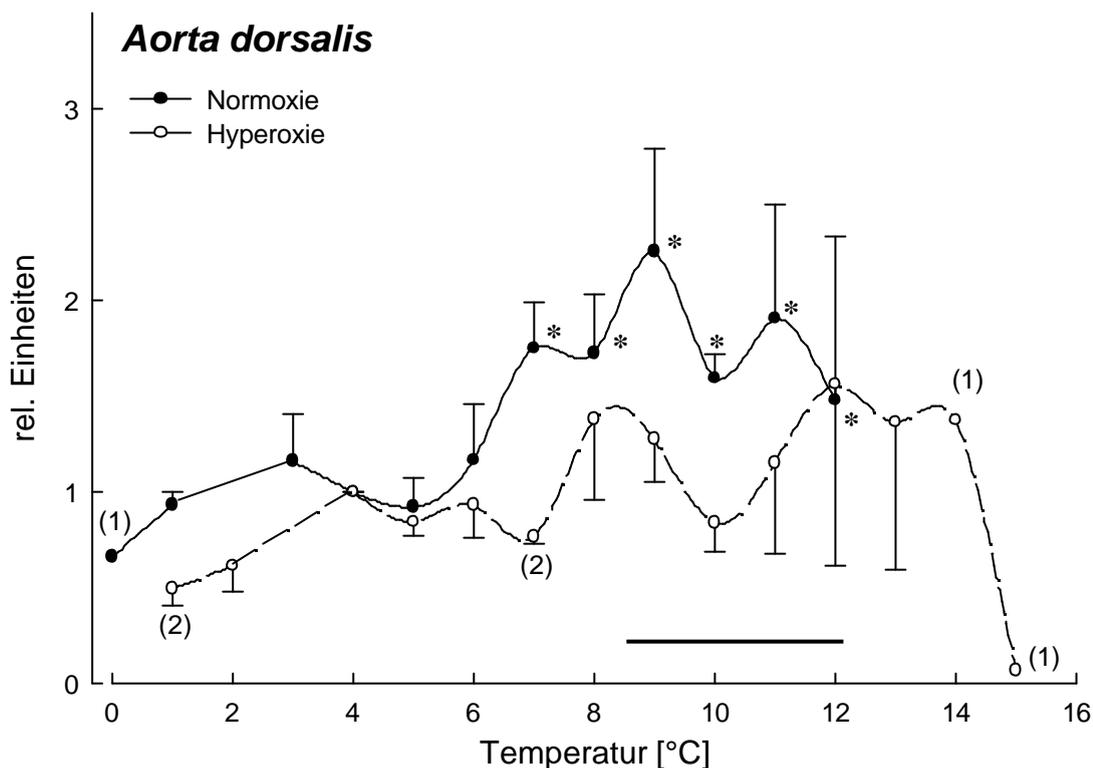
Auf der rechten Seite von *Abbildung 3.2.5* ist die Temperaturreihe von  $T_2^*$ -gewichteten Aufnahmen zu sehen. Die Blutgefäße lassen sich in diesen Aufnahmen nur sehr schwer erkennen, statt dessen ist ein Intensitätsunterschied im Lebergewebe festzustellen, das Gewebe erscheint bei 12°C heller als bei 1°C. In der Rückenmuskulatur hingegen ist mit bloßem Auge keine Veränderung der Intensität erkennbar.

In beiden Bildserien fällt auf, dass die Tiere über den Versuchsverlauf ihre Position in der Kammer veränderten, teilweise sogar vorübergehend auf dem Rücken lagen. Diese Positionsveränderungen traten bei allen Fischen beider Versuchsreihen zu unterschiedlichen Zeiten auf, so dass sie keiner bestimmten Temperatur zugeordnet werden können, sondern viel mehr auf das natürliche Verhalten der Tiere zurückzuführen sind.

In der  $T_2^*$ -gewichteten Aufnahme rechts unten (12°C) ist am linken Bildrand ein Artefakt zu erkennen, der durch leichte Wasserbewegungen in der Kammer hervorgerufen wurde. Bilder, in denen sich solche Artefakte auch auf den Körperbereich der Tiere erstreckten, wurden nicht ausgewertet.

### 3.2.2 Blutfluss

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der flussgewichteten NMR-Messungen zusammengestellt. Sie beinhalten die relativen Änderungen des Blutflusses in der *Aorta dorsalis*, *Vena cardinalis posterior* sowie in dem größten Lebergefäß in normoxen und hyperoxen Tieren in Abhängigkeit von der Temperatur.



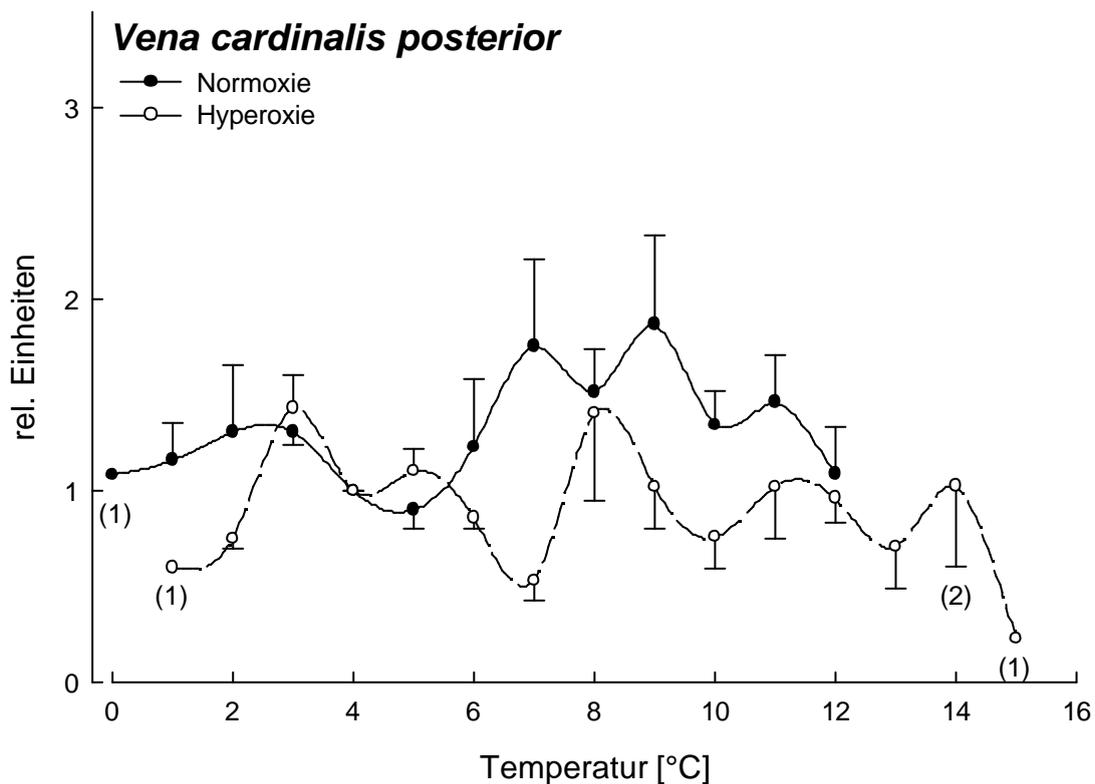
**Abb. 3.2.6: Blutfluss in der *Aorta dorsalis* bei Hyperoxie und Normoxie während schrittweiser Temperaturerhöhung um 1°C alle 9 bzw. 13 Stunden**

Der Datenpunkt bei 15°C bei Hyperoxie stammt von einem Tier, das kurz nach der Messung verstarb. (Normoxie: n = 3-6; Hyperoxie: n = 4-6; \*: signifikanter Unterschied zu den übrigen Werten der Versuchsreihe. — : Temperaturbereich mit signifikanten Unterschieden zwischen den Versuchsreihen)

Die relativen Änderungen des Blutflusses in der *Aorta dorsalis* bei Hyperoxie und bei Normoxie sind in *Abbildung 3.2.6* wiedergegeben. Es ist zu erkennen, dass in beiden Tiergruppen der Blutfluss bis etwa 6°C langsam anstieg, wobei im Bereich von 0 bis 4°C die Normoxietiere ein scheinbar höheres Ausgangsniveau hatten (Unterschiede nicht signifikant). Zwischen 6 und 7°C war unter Normoxie ein rapider Anstieg des Flusses auf ein signifikant höheres Niveau als zwischen 0 und 6°C zu verzeichnen, mit einem möglichen Maximum bei 9°C. Um 1°C versetzt folgte der Verlauf unter Hyperoxie, er blieb allerdings auf einem niedrigeren Niveau. Zwischen 9 und 12°C unterscheiden sich die Kurven bei Normoxie und Hyperoxie signifikant, in diesem Bereich steht ein leicht

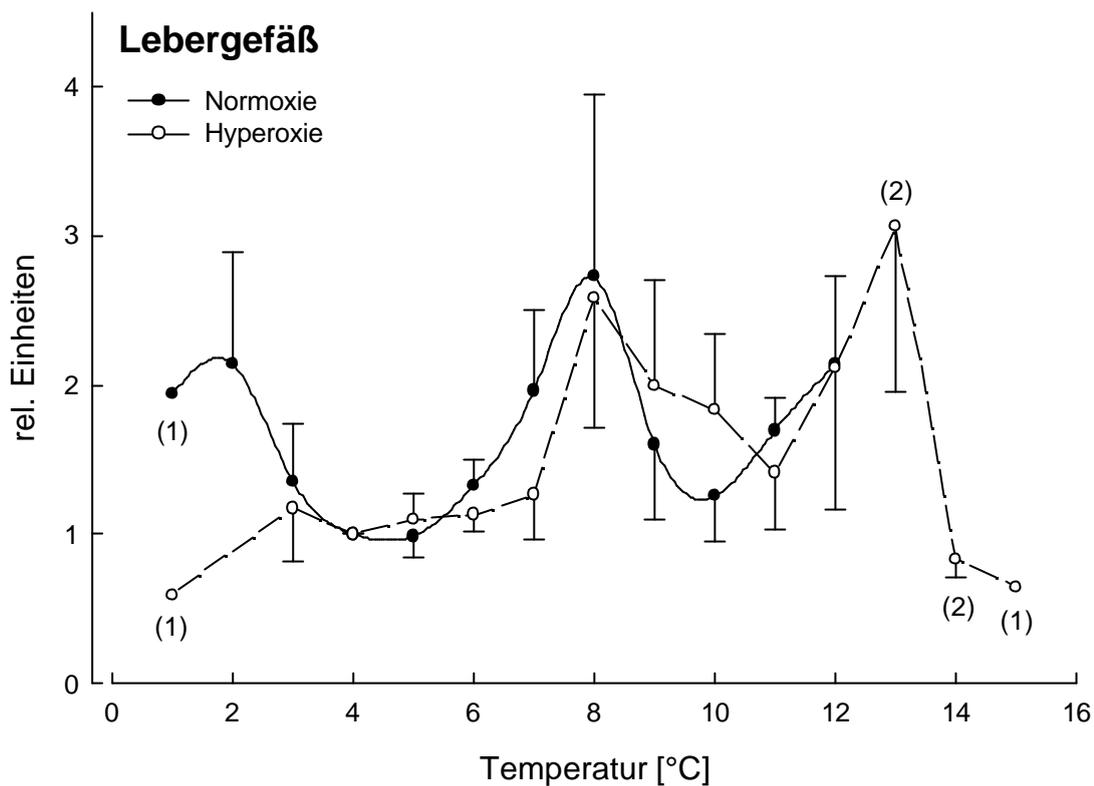
abwärts deutender Trend bei Normoxie einem in etwa gleichbleibenden Niveau bei Hyperoxie gegenüber. Der letzte Datenpunkt der Hyperoxiereihe stammt von einem Tier, das kurze Zeit nach dieser Messung verstarb. Da zu diesem Zeitpunkt bereits kein Blutfluss mehr sichtbar war, wurde dieser Wert für die Quantifizierung der Daten als Nullwert genutzt.

Für die Blutflussänderungen in der *Vena cardinalis posterior* (Abbildung 3.2.7) ergibt sich ein ähnliches Bild wie für die *Aorta dorsalis*, wenn auch in abgemilderter Form, da es sich hier um ein venöses Gefäß handelt, in dem Blutflussschwankungen durch Gefäßerweiterungen besonders abgeschwächt werden können. Bei den Tieren unter Normoxie deutete sich oberhalb von 6°C ein vorübergehender Anstieg in der Perfusion an, der zwischen 9 und 12°C wieder rückgängig gemacht wurde, während die hyperoxen Tiere um einen gleichbleibenden Mittelwert schwankten. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsreihen ließ sich nicht nachweisen.



**Abb. 3.2.7:** Blutfluss in der *Vena cardinalis posterior* bei Hyperoxie und Normoxie während schrittweiser Temperaturerhöhung um 1°C alle 9 bzw. 13 Stunden

(Normoxie: n = 4-6; Hyperoxie: n = 3-7)



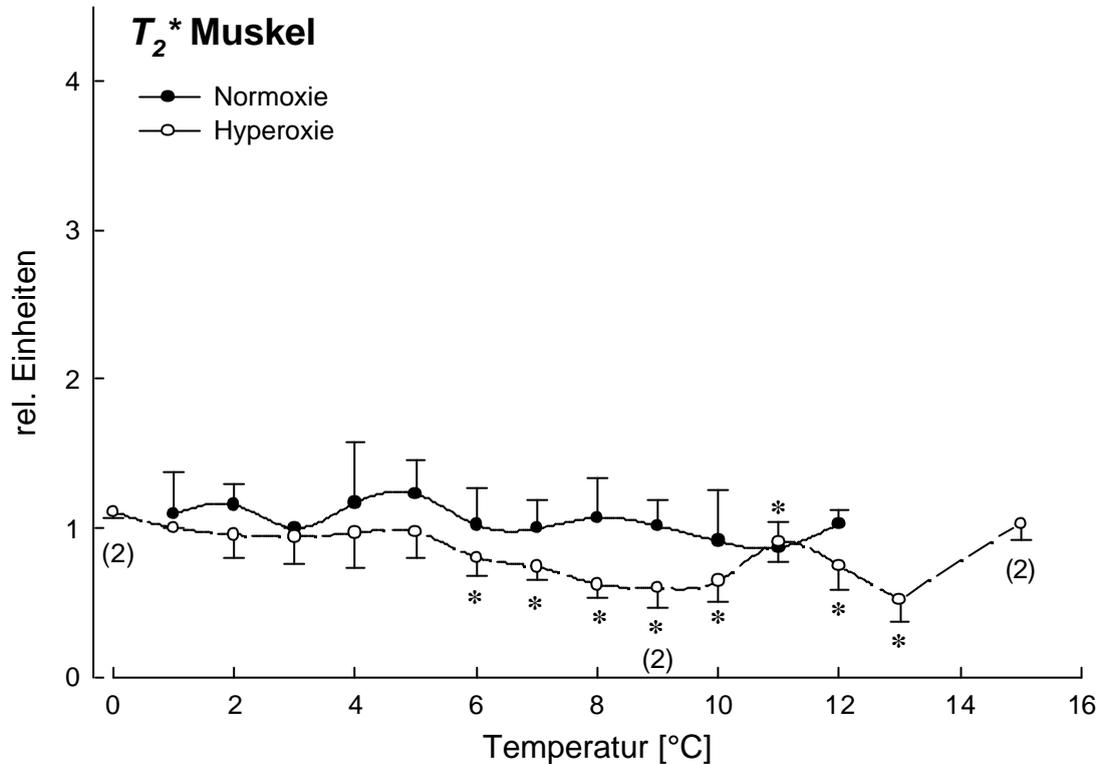
**Abb. 3.2.8: Blutfluss im Lebergefäß bei Hyperoxie und Normoxie während schrittweiser Temperaturerhöhung um 1°C alle 9 bzw. 13 Stunden**

(Normoxie: n = 3-5; Hyperoxie: n = 4-6)

In *Abbildung 3.2.8* sind die Blutflussänderungen im größten Lebergefäß in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Bis auf die Ausgangswerte (1 und 2°C) schien es zwischen Normoxie und Hyperoxie keine Flussunterschiede in den Lebergefäßen zu geben, ab 3°C zeigten beide Tiergruppen interessanterweise den gleichen, auffällig wellenförmigen Verlauf. Ein erstes Maximum wurde bei 8°C erreicht, danach sanken die Flussraten auf Werte nahe dem Ausgangsniveau ab, um dann bei 12°C (Normoxie) bzw. 13°C (Hyperoxie) ein weiteres Maximum zu erreichen.

### 3.2.3 $T_2^*$ -gewichtete Bildgebung

Änderungen im  $T_2^*$ -Kontrast korrelieren mit der Oxygenierung des Hämoglobins, hier gezeigt für die Rückenmuskulatur (Abb. 3.2.9) und die Leber (Abb. 3.2.10):



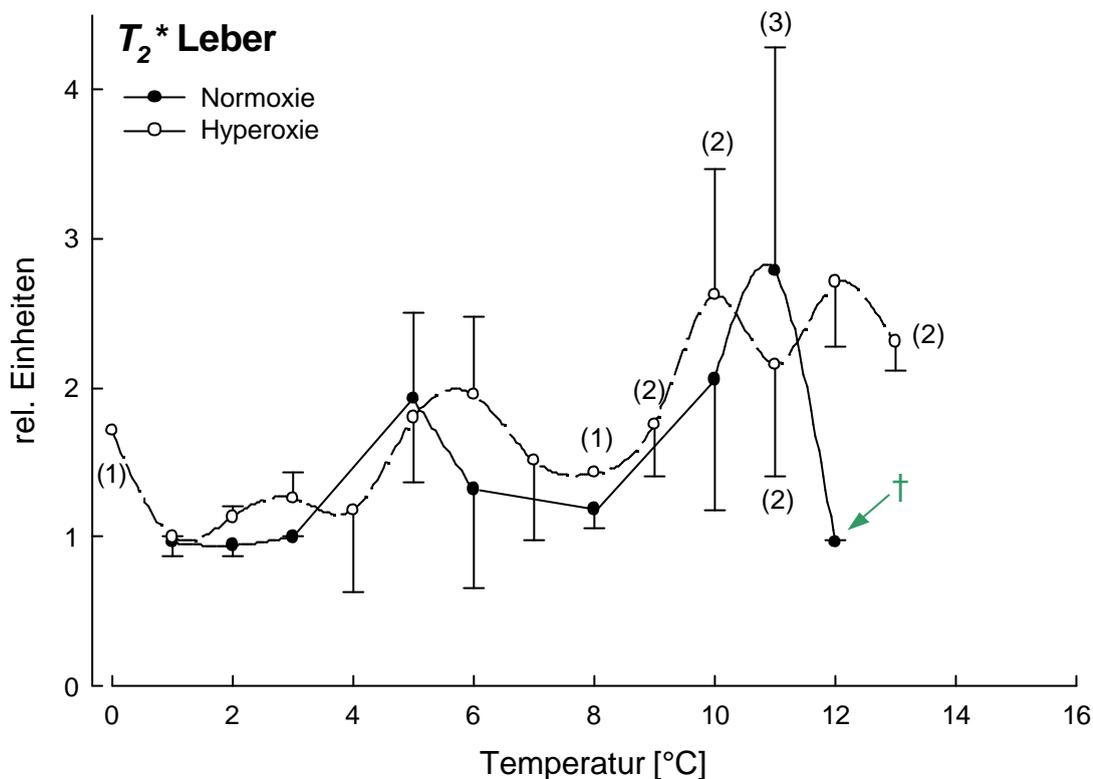
**Abb. 3.2.9:**  $T_2^*$ -Kontrast in der Rückenmuskulatur bei Hyperoxie und Normoxie während schrittweiser Temperaturerhöhung um 1°C alle 9 bzw. 13 Stunden

(Normoxie: n = 23; Hyperoxie: n = 35; \*: signifikanter Unterschied zu den übrigen Werten der Versuchsreihe)

Die  $T_2^*$ -Kontraste in der Muskulatur der normoxen Tiere blieben bei Erwärmung mehr oder weniger konstant, mit einer leichten Tendenz, oberhalb von 5°C abzunehmen. Bei Hyperoxie ist diese Abnahme der Oxygenierung oberhalb von 5°C signifikant, zwischen normoxen und hyperoxen Tieren bestehen jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Im Gegensatz dazu ist bei der Oxygenierung des Lebergewebes, die in *Abbildung 3.2.10* dargestellt ist, eine positive Abhängigkeit von der Temperatur zu verzeichnen. Bis 11°C steigen die Kurven unter Normoxie und Hyperoxie parallel an, während die Tiere unter Hyperoxie weiterhin den hohen Grad an Gewebeoxygenierung halten können, ist bei den Normoxietieren ein plötzlicher Einbruch der Gewebeoxygenierung bei 12°C zu verzeichnen, der auf den Tod der beiden in diesem Fall untersuchten Tiere zurückzuführen

ist. Zwischen 5 und 6°C zeichnet sich ebenfalls ein Maximum ab, das bei Hyperoxie etwas später erreicht wird.



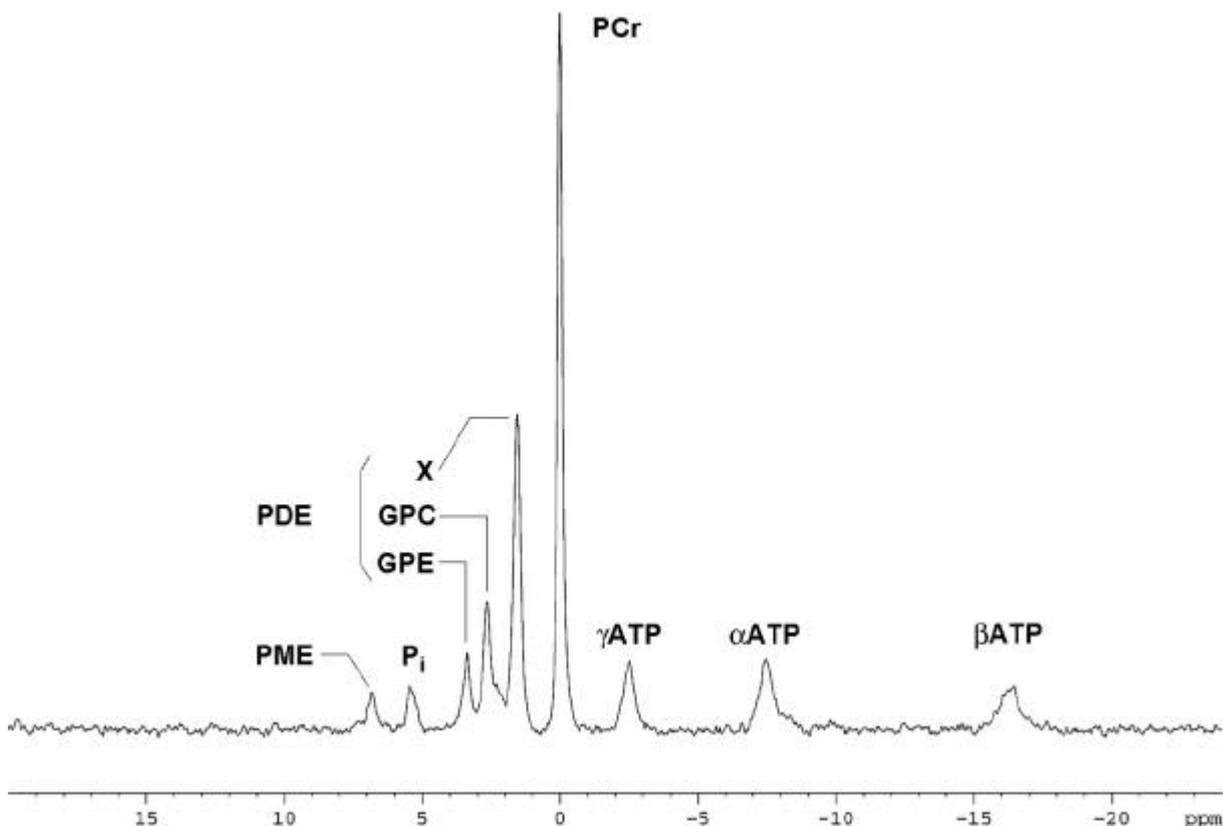
**Abb. 3.2.10:**  $T_2^*$ -Kontrast in der Leber bei Hyperoxie und Normoxie während schrittweiser Temperaturerhöhung um 1°C alle 9 bzw. 13 Stunden

Der Pfeil zeigt einen Wert für zwei tote Fische an. (Normoxie: n = 2; Hyperoxie: n = 3-5)

Die  $T_2^*$ -gewichteten Bilder, aus denen die Gewebeoxygenierung für den 12°C Wert (siehe Pfeil in Abb. 3.2.10) der normoxen Tiere berechnet wurde, stammen von zwei toten Tieren. Unter der Voraussetzung, dass der  $P_{O_2}$  auf 0 fällt ist ersichtlich, dass auch bei totem Gewebe der  $T_2^*$ -Kontrast nicht auf Null sinkt, sondern immer einen gewissen Grundwert behält, der als Quantifizierungsgrundlage herangezogen werden kann. Allerdings spielen hier neben der Oxygenierung des Hämoglobins vermutlich noch weitere temperaturabhängige Prozesse eine Rolle, so dass eine Kalibrierung der Werte nur in einem engen Temperaturbereich von wenigen Grad Celsius möglich ist.

### 3.2.4 Energiestoffwechsel und pH-Regulation

Ein typisches *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum der Muskulatur einer antarktischen Aalmutter unter Kontrollbedingungen ist in *Abb. 3.2.11* dargestellt, neben den Signalen von  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -ATP lassen sich PCr- und  $\text{P}_i$ -Signale, Phosphodiester (Glycerophosphoethanolamin, Glycerophosphocholin sowie ein nicht zuzuordnender Phosphodiester) und Phosphomonoester detektieren.



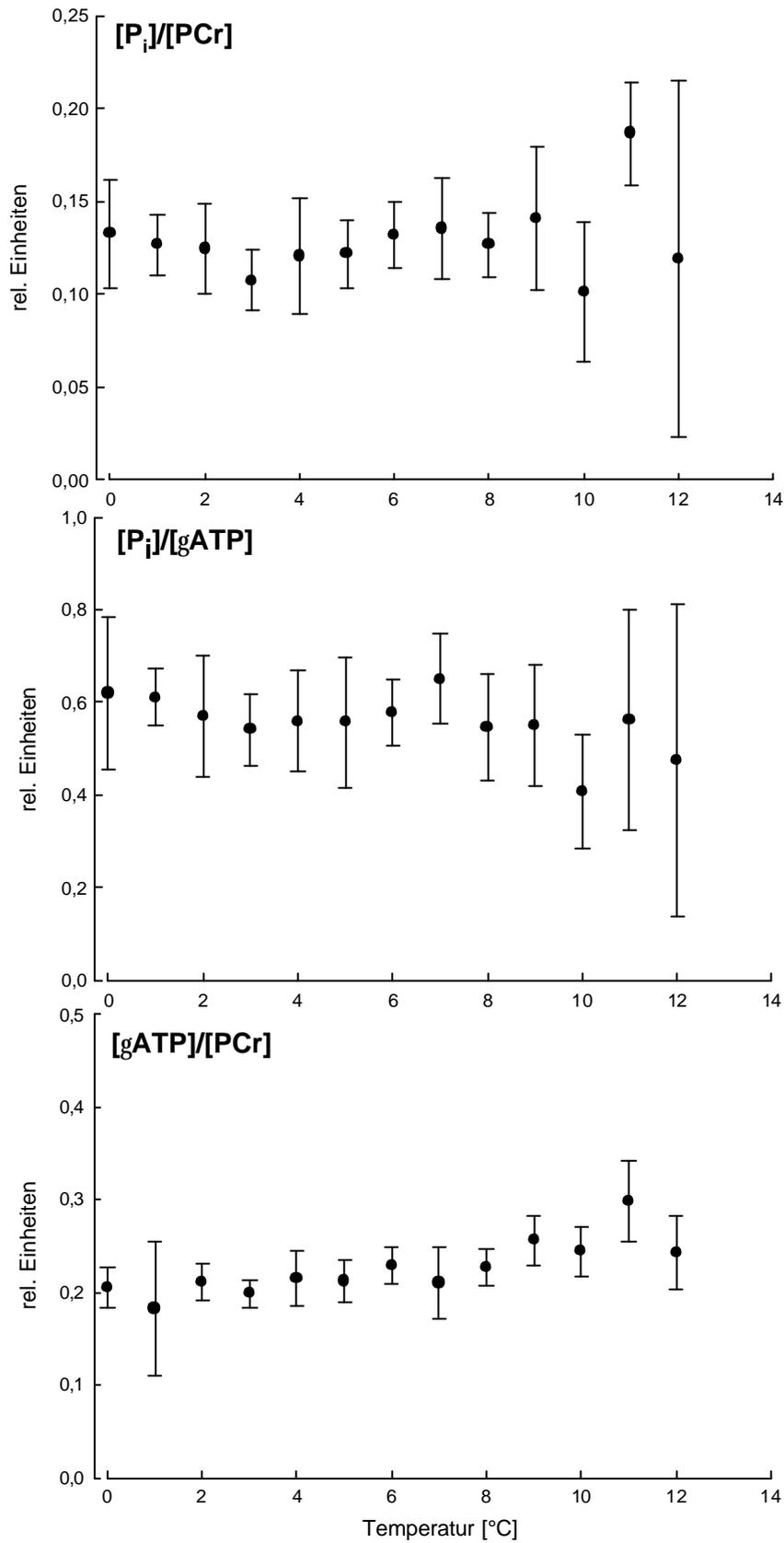
**Abb. 3.2.11:** *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum aus der Muskulatur einer antarktischen Aalmutter (Aufnahmezeit: 10 Minuten, Temperatur  $3^\circ\text{C}$ , Normoxie)

Abkürzungen:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -ATP: Adenosintriphosphat; GPC: Glycerophosphocholin; GPE: Glycerophosphoethanolamin;  $\text{P}_i$ : freies anorganisches Phosphat; PCr: Phosphokreatin; PDE: Phosphodiester; PME: Phosphomonoester; X: unbekannte Phosphodiesterverbindung

Die Intensität des  $\text{P}_i$ -Signals änderte sich über den gesamten Temperaturbereich kaum und betrug etwa zwei Drittel des  $\gamma\text{ATP}$ -Signals, auch bei längerer Inkubation bei Kontrolltemperaturen ( $0^\circ\text{C}$ ) blieb das Signal des  $\text{P}_i$  konstant (Ergebnisse hier nicht dargestellt).

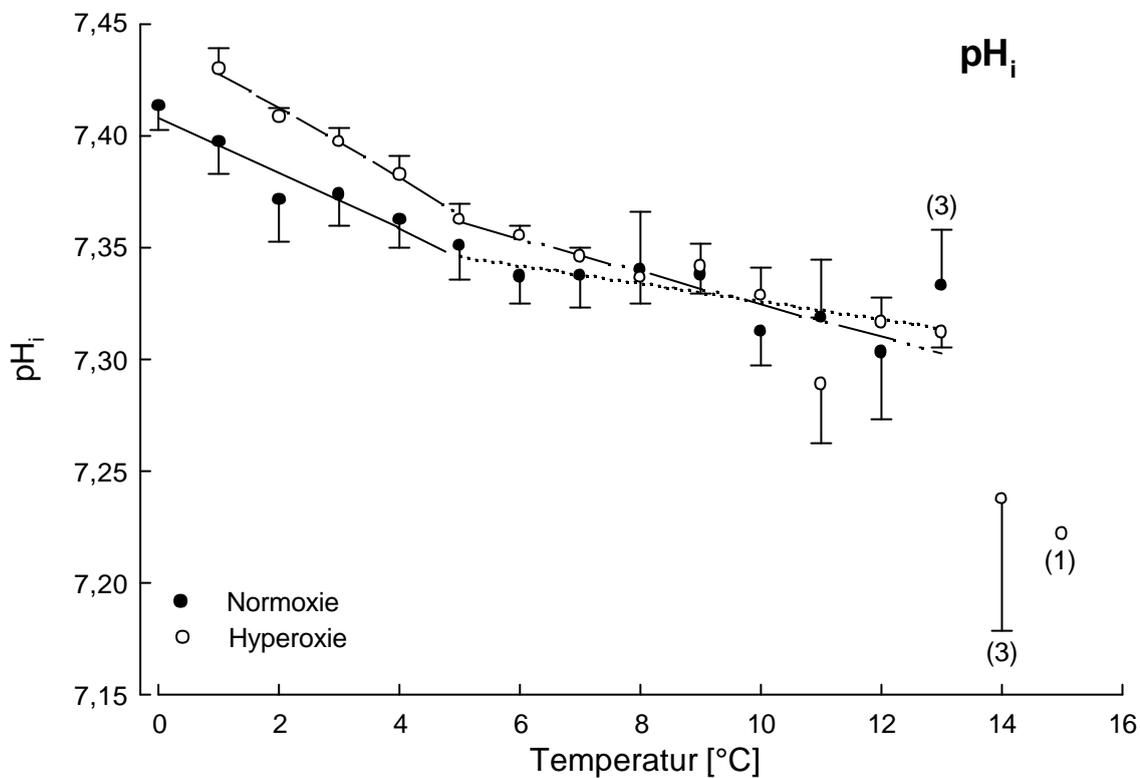
In *Abbildung 3.2.12* ist der Zeitverlauf der Verhältnisse der anderen energiereichen Phosphatverbindungen zueinander am Beispiel eines Einzeltieres der Normoxierihe dargestellt. Die Werte blieben über einen weiten Temperaturbereich zwischen  $0$  und  $10^\circ\text{C}$  konstant, erst gegen Ende des Versuchs ab etwa  $11^\circ\text{C}$  ist eine leichte Veränderung der

Verhältnisse erkennbar, die aber immer noch im Bereich der Streuung der Daten liegt. Erst kurz vor dem Tod der Versuchstiere kam es zu einem drastischen Anstieg des  $P_i$ -Signals bei gleichzeitiger Abnahme des PCr-Signals. Die geringen Schwankungen unter Kontrollbedingungen zeigen an, dass die Tiere auf Temperaturstress nicht mit erhöhter Muskelaktivität reagieren. Außerdem sprechen sie für die stabilen und gut kontrollierten physiologischen Versuchsbedingungen im Magneten.



**Abb. 3.2.12:** Verhältnisse der Konzentrationen verschiedener energiereicher Phosphate bei Normoxie während schrittweiser Temperaturerhöhung um 1°C alle 9 bzw. 13 Stunden am Beispiel eines einzelnen Tieres (MW über die Zeit ±StAbw).

Aus der chemischen Verschiebung des  $P_i$ -Signals lässt sich mit der in Abschnitt 2.5.1 erläuterten Formel der intrazelluläre pH-Wert bestimmen. *Abbildung 3.2.13* stellt die Veränderungen des  $pH_i$  in Abhängigkeit von der Temperatur für normoxe und hyperoxe Tiere dar:



**Abb. 3.2.13:**  $pH_i$  bei Hyperoxie und Normoxie während schrittweiser Temperaturerhöhung um  $1^\circ\text{C}$  alle 9 bzw. 13 Stunden

Regressionsgleichungen unter Normoxie ( $n = 5-7$ ):

$$f(0-4^\circ\text{C}) = -0,01245x + 7,408 \quad R^2: 0,89 \quad f(5-13^\circ\text{C}) = -0,00398x + 7,336 \quad R^2: 0,51$$

Regressionsgleichungen unter Hyperoxie ( $n = 4-5$ ):

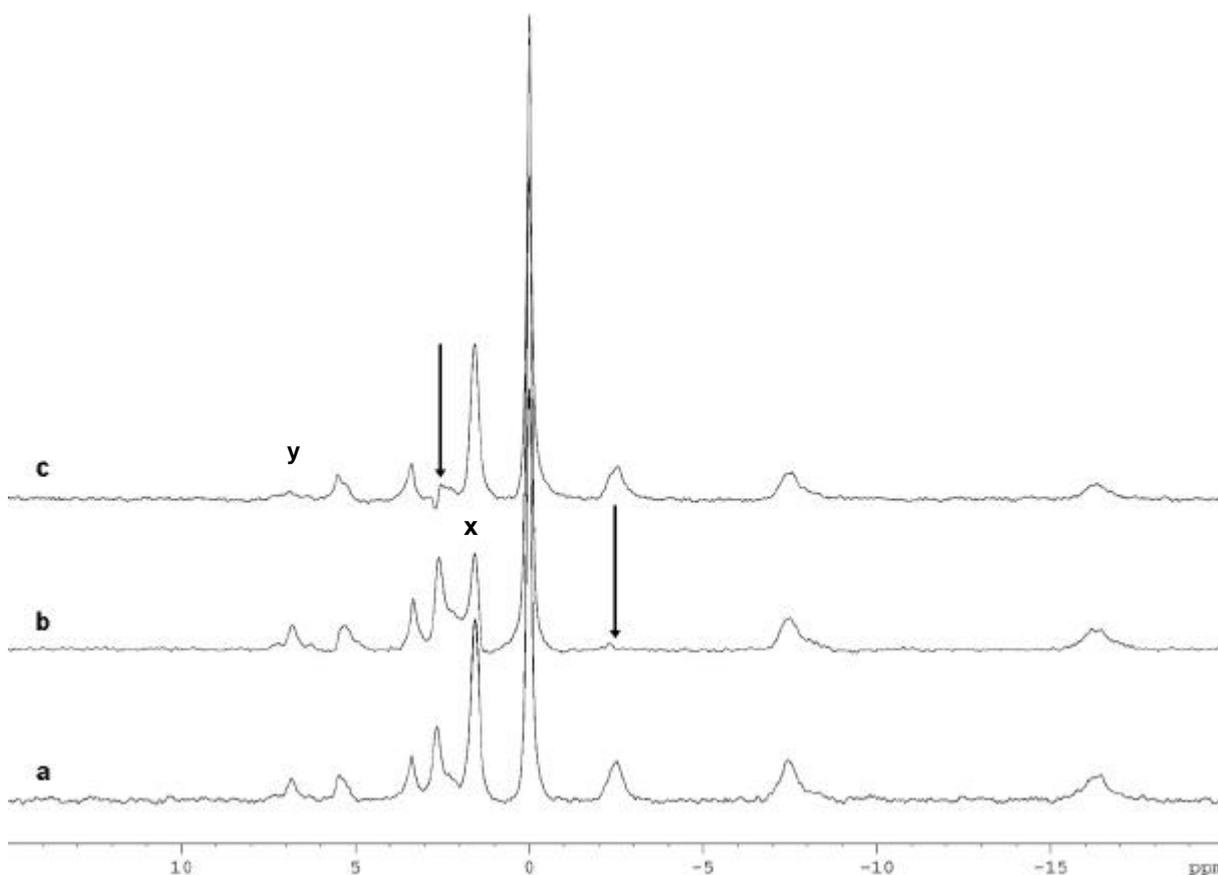
$$f(0-4^\circ\text{C}) = -0,01529x + 7,443 \quad R^2: 0,98 \quad f(5-13^\circ\text{C}) = -0,00734x + 7,398 \quad R^2: 0,75$$

Der Ausgangswert des  $pH_i$  bei  $1^\circ\text{C}$  lag bei Hyperoxie mit  $7,430 \pm 0,021$  etwas höher als bei Normoxie ( $pH_i \ 7,397 \pm 0,031$ ), ein signifikanter Unterschied ließ sich jedoch nicht nachweisen. Mit steigender Temperatur konnte ein Absinken des intrazellulären pH-Wertes sowohl unter Normoxie als auch unter Hyperoxie beobachtet werden. In beiden Versuchsreihen ist bei etwa  $5^\circ\text{C}$  eine Diskontinuität zu erkennen, die Steigung der Regressionsgeraden im Bereich von  $0-4^\circ\text{C}$  ist signifikant höher als zwischen  $5$  und  $13^\circ\text{C}$ . Die Diskontinuitäten in den Regressionsgeraden wurden jeweils mit einer *Minimum Sum of Squares*-Analyse ermittelt.

Bei Hyperoxie erfolgte insgesamt eine etwas größere Änderung des  $pH_i$  als bei Normoxie, so dass trotz der unterschiedlichen Ausgangswerte zwischen  $12$  und  $14^\circ\text{C}$  die gleichen Endwerte erreicht werden.

Jenseits von 13°C ist eine abrupte Ansäuerung zu erkennen, auf die in der Regel der Tod der Tiere folgte.

Mit den  $^{31}\text{P}$ -NMR-Sättigungstransferexperimenten wurde versucht, die Enzymkinetiken von ATPase und Phosphokreatinkinase in Abhängigkeit von Temperatur und  $\text{P}_{\text{O}_2}$  zu verfolgen.



**Abb. 3.2.14:** *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -Spektren eines Sättigungstransferexperimentes zur Bestimmung von  $k$  der von der Phosphokreatinkinase katalysierten Reaktion bei 6°C unter Hyperoxie: (a) ungesättigtes Kontrollspektrum; (b) Spektrum mit gesättigtem  $\gamma$ -ATP; (c) Spiegelfrequenz relativ zum PCr-Signal. Die Pfeile geben die Position der eingestrahlten Sättigungspulse an. (x) zusätzliche Absättigung des unbekanntes Phosphodiesters durch den  $\gamma$ -ATP-Sättigungspuls, (y) zusätzliche Absättigung des PME-Signals durch Einstrahlen des Sättigungspulses.

In Abb. 3.2.14 sind als Beispiel drei Spektren eines Sättigungstransferexperimentes zur Bestimmung von  $k$  der Phosphokreatinkinase bei Hyperoxie dargestellt. In Abb. 3.2.14b ist das  $\gamma$ -ATP-Signal gesättigt worden, im Vergleich zum Kontrollspektrum (Abb. 3.2.14a) erkennt man, dass auch die unbekanntes Phosphodiester Verbindung (x, vgl. Abb. 3.2.11) zum Teil mit abgesättigt wurde. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, die Spiegelfrequenz zur Sättigungsfrequenz einzustrahlen, um im Vergleich die Artefakte des Sättigungspulses

identifizieren und ausschließen zu können. Da in dem dargestellten Experiment die Geschwindigkeitskonstante  $k$  der von der Phosphokreatinkinase katalysierten Reaktion vom  $\gamma$ -ATP zum PCr bestimmt werden sollte, wurde eine Spiegelfrequenz relativ zum PCr-Signal eingestrahlt (*Abb. 3.2.14c*). Hier ist deutlich zu erkennen, dass das zuvor gesättigte unbekannte Signal genau wie das gesättigte  $\gamma$ -ATP wieder die gleiche Intensität erreicht wie im Kontrollspektrum. Durch die Spiegelfrequenz wurde das Signal des Glycerophosphoethanolamins (GPE) gesättigt, außerdem wurden auch die Phosphomonoester (PME) ( $\mathbf{y}$  in *Abb. 3.2.14*; vgl. auch *Abb. 3.2.11*) im Vergleich zum Kontrollspektrum gesättigt - ein Hinweis dafür, dass sie in chemischem Austausch mit GPE stehen.

Bei der Auswertung der Experimente ergab sich ein vorher nicht berücksichtigtes Problem: Da die Versuchstiere in der Kammer weder betäubt noch besonders eingeeignet wurden, hatten sie die Möglichkeit, sich frei zu bewegen – wovon sie trotz träger benthischer Lebensweise durchaus Gebrauch machten (vgl. *Abb. 3.2.5*). Da sich die Sättigungsexperimente über einen Zeitraum von mehreren Stunden erstreckten (vgl. *Abb. 2.2.2*), war es möglich, dass die Tiere während der Experimente ihre Position relativ zur Sende-/Empfangsspule veränderten, was sich in Intensitätsänderungen widerspiegelt. Während Phosphokreatin im Muskelgewebe als schnell mobilisierbarer Speicher für Phosphorylgruppen dient (Stryer, 1996), ist es im Lebergewebe kaum vorhanden. Aus den unterschiedlichen Konzentrationen resultierten verschiedene Intensitäten der PCr-Signale in den Spektren, die dann nicht mehr untereinander vergleichbar waren. Konstante Verhältnisse sind jedoch Voraussetzung für eine fehlerfreie Bestimmung von  $k$ ; da dieses nicht gewährleistet war, ergaben sich teilweise negative  $k$ -Werte. Dies ist aus den in *Tabelle 3.2.1* wiedergegebenen  $k$ -Werten für die von der PCK katalysierte Reaktion der Kreatinphosphorylierung und der von der ATPase katalysierten ADP-Phosphorylierung ersichtlich.

**Tabelle 3.2.1:** *k*-Werte für die PCK und ATPase bei Normoxie (n=4) und Hyperoxie (n=3) (MW±StAbw)

Temperatur [°C]	k PCK [s <sup>-1</sup> ] Hyperoxie		k PCK [s <sup>-1</sup> ] Normoxie		k ATPase [s <sup>-1</sup> ] Hyperoxie		k ATPase [s <sup>-1</sup> ] Normoxie	
	MW	StAbw	MW	StAbw	MW	StAbw	MW	StAbw
0-1	0,067	0,041	0,072	n=1	0,019	0,237	0,063	n=1
2-3	0,344	0,365	-0,645	1,197	0,282	0,219	-0,150	0,370
4-5	0,095	0,019	0,059	0,087	-0,070	0,111	-0,014	0,043
6-7	0,005	0,056	-0,055	0,075	-0,086	0,043	-0,081	0,033
8-9	0,007	0,034	0,045	0,011	-0,206	0,369	-0,088	0,259
10-11	-0,041	0,088	0,019	0,053	-0,283	0,653	0,331	0,313
12-13	-0,044	0,070	-0,004	0,094	-0,484	0,688	0,152	0,145

Die Einzelwerte der Daten weisen eine noch größere Streuung negativer und positiver Werte auf. Aus diesem Grund soll auf die Austauschraten, die aus den Ergebnissen der Sättigungstransferexperimente berechnet wurden, nicht weiter eingegangen werden. Unabhängig davon konnten die  $T_I$ -Werte für ATP, Phosphokreatin und anorganisches Phosphat  $P_i$  ermittelt werden, sie sind im Anhang beigefügt.

## 4 Diskussion

Mit den in den vorigen Kapiteln beschriebenen Versuchen wurde die Bedeutung von Normoxie und Hyperoxie für die Temperaturtoleranz der antarktischen Aalmutter *Pachycara brachycephalum* untersucht. Anhand des Sauerstoffverbrauchs konnte der Energieumsatz der Tiere verfolgt werden. Mit den flussgewichteten tomographischen Messungen ließ sich untersuchen, ob temperaturbedingte Änderungen im Blutfluss auch abhängig vom Sauerstoffgehalt des die Tiere umgebenden Wassers waren. Änderungen im Oxygenierungsgrad des Gewebes wurden an Muskel- und Lebergewebe mit Hilfe der  $T_2^*$ -gewichteten Bildgebung untersucht. Die Einflüsse von Temperatur und Sauerstoffgehalt auf zellulärer Ebene - Energiehaushalt,  $\text{pH}_i$ -Regulation und enzymatische Umsatzraten (ATPase, Phosphokreatinkinase) - sollten durch *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Sättigungstransferexperimente verfolgt werden.

In diesem Kapitel soll zunächst auf methodische Schwierigkeiten eingegangen, in der Folge dann die erhaltenen Ergebnisse zu einem Gesamtbild zusammengefügt werden.

### 4.1 Methoden

#### *O<sub>2</sub>-Verbrauch*

Bei der Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs polarer Fische bei niedrigen Temperaturen treten häufig Schwierigkeiten auf, die zum einen auf die niedrigen Stoffwechselraten ektothermer polarer Tiere zurückzuführen sind, zum anderen auch durch die Temperaturen selbst hervorgerufen werden. So berichten einige Autoren (z. B. Wohlschlag, 1963, Wells, 1986) von einer hohen Variabilität des Sauerstoffverbrauchs antarktischer Fische bei Umgebungstemperaturen zwischen  $-2$  und  $2^\circ\text{C}$ , dies kann einerseits an einem größeren Spielraum der Stoffwechselprozesse unter natürlichen Bedingungen liegen, andererseits mag auch die niedrige Stoffwechselrate bei tiefen Temperaturen die Messgenauigkeit beeinflussen.

Im unteren Temperaturbereich zwischen  $0$  und  $4^\circ\text{C}$  war es oft schwierig, die Flussrate durch das System dem geringen Sauerstoffverbrauch der Tiere anzupassen, um einen messbaren  $?P_{O_2}$  zu erhalten, da bei niedrigen Flussraten sehr leicht das Wasser in den gekühlten Zuleitungsschläuchen der Tierkammer gefror. Diese Problematik wurde bereits von Wells (1986) beschrieben. Daraus resultieren die niedrigen n-Zahlen vor allem bei Hyperoxie, unter der bei doppelter Sauerstoffkonzentration die Flussrate entsprechend noch einmal halbiert werden musste, um den gewünschten prozentualen  $?P_{O_2}$  zu erhalten.

Bei niedrigen Temperaturen wäre es unter Umständen sinnvoll gewesen, mit einem *intermittent-flow* System zu arbeiten, in dem der Fluss durch die Kammer für die Dauer der O<sub>2</sub>-Verbrauchsmessungen unterbrochen wird (wie in der Arbeit von van Dijk *et al.* (1999) eingesetzt). In Kombination mit den NMR-Messungen ließ sich dies jedoch nicht realisieren, da ein für solche Messungen zweckmäßiger kleinvolumiger Wasserkreislauf innerhalb des Magneten nicht konstruiert werden konnte.

Durch eine individuelle Abstimmung der drei an der Kühlung des Versuchsaufbaus beteiligten Thermostate war es dennoch in vielen Fällen möglich, auch bei konstant niedriger Temperatur eine reduzierte Flussrate aufrecht zu erhalten.

#### *NMR: Flussgewichtete und T<sub>2</sub>\*-gewichtete Bildgebung*

Zu den NMR-Messungen ist allgemein zu bemerken, dass es aufgrund der starken Streuung der Daten nur sehr eingeschränkt möglich war, statistische Vergleiche einzelner Datenpunkte oder zwischen den Versuchsreihen durchzuführen. Diese Streuung ist zum Teil auf individuelle Variation zwischen den Versuchstieren zurückzuführen, aber auch auf die Empfindlichkeit der verwendeten *in vivo* NMR-Methoden gegenüber Faktoren, die die Homogenität des Magnetfeldes stören – allem voran das ionenreiche Seewasser. Hinzu kommt noch, dass es sich bei den verwendeten Methoden nur um sogenannte gewichtete Messungen handelte, die zwar den Fluss bzw. den T<sub>2</sub>\*-Kontrast stark hervorhoben, aber dennoch auch anderen Einflüssen unterworfen waren. Aus diesem Grund sind z. B. in den flussgewichteten Bildern neben den Blutgefäßen noch weitere Gewebestrukturen zu erkennen, die im (hypothetischen) Idealfall ausgelöscht sein sollten.

Ein weiterer wichtiger Punkt wird in der rechten Bildserie der *Abbildung 3.2.5* noch deutlich: Es ist zu erkennen, dass die Versuchstiere in der Lage waren, ihre Position in der Kammer frei zu verändern. Diese deutlichen Positionswechsel kamen etwa ein bis zwei Mal pro Tag vor. Wenn die Tiere dabei ab und zu auf dem Rücken oder der Seite lagen, ist dies nicht als ein Anzeichen von ungünstigen physiologischen Bedingungen zu werten, sondern liegt in ihrem Verhalten begründet, sich an die Gegebenheiten eines als Unterschlupf dienenden Hohlraumes anzupassen. Dieses Verhalten konnte auch bei Tieren, die im Aquarium probeweise in die Versuchskammer eingesetzt und dort belassen wurden, beobachtet werden. Der Preis dieser relativen Freiheit der Versuchstiere war allerdings eine Beeinträchtigung der Messergebnisse, wie es vor allem bei den <sup>31</sup>P-NMR-Sättigungstransferexperimenten deutlich geworden ist, sich aber auch in der großen Streuung der Bildgebungsdaten niederschlägt.

Im Vergleich zur Oxygenierung des Muskelgewebes traten bei den  $T_2^*$ -gewichteten Aufnahmen in der Leber für diese Methode untypisch hohe Kontraständerungen auf. Dies kann z.T. an der angewandten Methode selbst liegen: Die  $T_2^*$ -gewichtete Bildgebung findet ihre Anwendung im wesentlichen bei der funktionellen Bildgebung im Gehirn (Ogawa *et al.*, 1990), wobei Änderungen in der Gewebeoxygenierung als Reaktion auf die neuronale Stimulation bestimmter Gehirnbereiche gefunden werden. Überträgt man nun diese Methode auf andere Gewebetypen, wird man – zumindest im Fall der Leber – mit einer Reihe von Einflüssen konfrontiert, die sich nachteilig auf die Messgenauigkeit auswirken können.

Der  $T_2$ -Wert im Lebergewebe ist, verglichen mit den Werten für Gehirn- und Muskelgewebe, sehr kurz (Mansfield & Morris, 1982),  $T_2^*$  ist demnach entsprechend noch kürzer. Dies kann daran liegen, dass in der Leber, in der viele detoxifizierende enzymatische Reaktionen ablaufen, höhere Konzentrationen an paramagnetischen Ionen vorliegen als im Gehirn, z. B. erhöhte Werte für  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$ , die  $T_2^*$  nachhaltig beeinflussen. Zudem ist der Wassergehalt in der Leber niedriger als im Gehirn (Mansfield & Morris, 1982), auch dies kann den Kontrast beeinflussen. Ist  $T_2^*$  ohnehin schon klein, lassen sich Veränderungen nur schlecht eindeutig nachweisen. Es ist auch vorstellbar, dass sich durch den Temperaturstress bei den Tieren eine Verschiebung der Konzentrationen paramagnetischer Ionen ergeben hat, die sich in einer Änderung des  $T_2^*$ -Kontrastes ausdrückt. Eine solche Änderung würde die geringen Kontrastunterschiede, die auf eine Oxygenierungsänderung zurückzuführen sind, deutlich überlagern (Bock, 1995).

Darüber hinaus ist bei der hier verwendeten  $T_2^*$ -gewichteten Methode immer auch eine potentielle Flussgewichtung vorhanden, die sich ebenfalls auf den  $T_2^*$ -Kontrast auswirken kann (Kim *et al.*, 1994) und deren Einfluss deshalb durch geeignete Wahl der Messparameter minimiert werden sollte. Dies war in dieser Arbeit jedoch nur unvollständig möglich, so dass die Änderungen im  $T_2^*$ -Kontrast nicht allein durch eine Verschiebung des  $\text{Hb}_{\text{ox}}/\text{Hb}_{\text{deox}}$  Verhältnisses hervorgerufen wurden, sondern auch durch eine Änderung in der Gewebepfusion beeinflusst sein könnten. Ein Anstieg in der Perfusion könnte sich demnach in einer leichten Intensitätszunahme widerspiegeln, dies wiederum würde zu einem Anstieg des Kontrastes in den Aufnahmen führen. Möglicherweise ist dies der Grund für die ähnlichen Verläufe in Blutfluss und Oxygenierung des Lebergewebes. Um dieses Problem zu umgehen, schlagen Kim *et al.* zur Korrektur vor, jeder  $T_2^*$ -gewichteten Messung eine perfusionsgewichtete Messung voranzustellen, um aus der Differenz der Bilder den echten  $T_2^*$ -Kontrast zu berechnen.

Dies war im Rahmen der vorliegenden Arbeit aber nicht möglich, da bisher keine perfusionsgewichteten NMR-Methoden für aquatische Organismen existieren.

## 4.2 O<sub>2</sub>-Bedarf und O<sub>2</sub>-Versorgung

### *O<sub>2</sub>-Verbrauch*

Die Sauerstoffverbrauchsdaten bei Kontrolltemperaturen (0 bis 1°C) stimmen sehr gut mit den Ergebnissen anderer Arbeiten an antarktischen (van Dijk *et al.*, 1999; Wells, 1986; Wohlschlag, 1963) und arktischen Aalmuttern (Holeton, 1974) überein, die für den Bereich zwischen -1,5 und +1°C einen Sauerstoffverbrauch zwischen 0,4 und 0,8  $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FG} \text{ h}^{-1}$  angeben. Diese Werte befinden sich alle auf ähnlichem Niveau wie die Sauerstoffverbrauchswerte von Fischarten gemäßigter Breiten, die auf 0°C extrapoliert wurden (Wohlschlag, 1963; Wells, 1987). Dies bestätigt die Vermutung, dass bei polaren *Zoarcidae* keine oder nur eine geringe *metabolic cold adaptation* vorliegt (Hardewig *et al.*, 1998; Wells, 1987). Eine Analyse von Clarke und Johnston (1999) belegt dies auch für die größte Gruppe polarer perciformer Fische, die *Notothenoidae*.

Der maximale Sauerstoffverbrauch unter Normoxie lag in den Experimenten dieser Arbeit bei etwa 4  $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FG} \text{ h}^{-1}$  bei 12°C. Über diesem Wert scheint eine Limitierung der Sauerstoffaufnahmekapazität einzutreten, an die sich der Tod der Tiere anschließt. Dies ist auch an dem in *Abbildung 3.1.1* für ein Einzeltier dargestellten rückläufigen Sauerstoffverbrauch bei Normoxie oberhalb 13°C zu erkennen. Van Dijk *et al.* (1999) fanden in Respirationsmessungen in einem *intermittent-flow* System für *Pachycara brachycephalum* aus der Region der Antarktischen Halbinsel einen geringeren Maximalwert von etwa 2,2  $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FG} \text{ h}^{-1}$ . Dieser trat zudem bereits bei 9°C auf, wo auch die kritische Temperatur  $T_{crit}$  der Tiere gefunden wurde. Diese Werte liegen deutlich unter denen, die durch die Ergebnisse dieser Arbeit angedeutet werden. Möglicherweise liegt dies daran, dass die Experimente van Dijk an Bord der POLARSTERN mit kurz zuvor gefangenen Fischen durchgeführt wurden, die auf dem Schiff in Aquarien gehalten wurden und acht Tage vor Beginn der Experimente nicht mehr gefüttert wurden. Es kann daher sein, dass die Fische vom Fang und der unruhigen Umgebung an Bord des Forschungsschiffes gestresst waren und deshalb auf die Temperaturerhöhung mit einer geringeren Steigerungsfähigkeit des O<sub>2</sub>-Verbrauches reagierten. Van Dijk *et al.* (1999) schreiben außerdem, dass sie in ihren Experimenten den P<sub>O<sub>2</sub></sub> in ihrem geschlossenen Kammersystem auf bis zu 80% des ursprünglichen Sauerstoffpartialdrucks absinken ließen. So könnten die Tiere unter Umständen stärker unter Hypoxie gelitten haben als in

den Experimenten dieser Arbeit. Hier wurde mit einem Durchflusssystem mit einer Partialdruckdifferenz von maximal 15% (in der Regel niedriger) gearbeitet, Hypoxie würde ebenfalls die Steigerungsfähigkeit des aeroben Stoffwechsels reduzieren.

Ein weiterer Faktor, der einen Einfluss auf die Stoffwechselrate haben kann, ist die Aquarienhaltung. Saint-Paul (1988) hat bei tropischen Sägesalmern (*Colossoma brachypomum*) festgestellt, dass Tiere, die längere Zeit in Aquarien gehalten wurden, einen signifikant niedrigeren Sauerstoffverbrauch aufwiesen als Wildfänge. Offensichtlich können sich also auch die äußeren Bedingungen mittelfristig auf die Stoffwechselrate der Fische auswirken. Die identischen Stoffwechselraten, die unter Kontrollbedingungen an Bord bzw. nach sechsmonatiger Hälterung am AWI gemessen wurden, sprechen jedoch gegen einen starken Einfluss der Aquarienhaltung auf die Stoffwechselraten der Tiere. Trotzdem wurden Normoxie- und Hyperoxie-Experimente immer abwechselnd durchgeführt, um zumindest eine unterschiedliche Beeinflussung der beiden Versuchsreihen durch die Hälterungszeit auszuschließen.

Bei Normoxie nahm die Sauerstoffverbrauchskurve mit steigender Temperatur einen typisch exponentiellen Verlauf an, wie er von Krogh (1914) erstmals beschrieben und seither immer wieder bestätigt wurde (z. B. van Dijk *et al.*, 1999; Weatherley, 1970; Wohlschlag, 1963). Im Gegensatz dazu stieg der Sauerstoffverbrauch bei Hyperoxie nahezu linear an (vgl. Abb. 3.1.1). Bei Kontrolltemperaturen scheint Hyperoxie den Sauerstoffverbrauch nicht zu beeinträchtigen, dies wird auch durch die Arbeit von Gilmour & Perry (1994) an der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) bestätigt. Bei der antarktischen Aalmutter verlaufen die Sauerstoffverbrauchskurven sogar bis etwa 8°C fast parallel, darüber steigt der Sauerstoffbedarf bei Normoxie exponentiell an. Daraus lässt sich schließen, dass eine erhöhte Sauerstoffkonzentration offenbar das Ausmaß der Stoffwechselprozesse, die den raschen Anstieg des Sauerstoffbedarfs jenseits von 8°C bedingen, vermindert.

Da die Kinetiken vieler Enzyme lediglich temperatur- aber nicht sauerstoffabhängig sind, bedeutet dies für *Pachycara brachycephalum*, dass nicht die enzymatischen Umsatzraten ausschlaggebend für den exponentiellen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs mit der Temperatur sind, sondern eine erhöhte Stoffwechselaktivität, die möglicherweise auf einen Anstieg von Ventilation und Zirkulation aufgrund einsetzenden Hypoxiestresses zurückzuführen ist. Dies spiegelt sich auch in den erhöhten  $Q_{10}$ - und  $E_a$ -Werten der den Sauerstoffverbrauch beeinflussenden Stoffwechselprozesse bei Normoxie gegenüber

Hyperoxie wider ( $3,40 \pm 0,55$  gegenüber  $2,63 \pm 0,42$  bzw.  $89,12 \pm 8,57$   $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  gegenüber  $63,53 \pm 10,00$   $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ).

Unter Hyperoxie starben die Tiere bei  $14 \pm 2^\circ\text{C}$  bei einem Sauerstoffverbrauch, wie ihn Tiere unter Normoxie zwischen  $9$  und  $10^\circ\text{C}$  aufwiesen. Möglicherweise befanden sich die Tiere zu diesem Zeitpunkt noch nicht im hypoxen Bereich, so dass die Todesursache bei Hyperoxie nicht durch Sauerstofflimitierung, sondern durch andere Faktoren bedingt wird.

### *O<sub>2</sub>-Versorgung*

Der Sauerstoffverbrauch bei Normoxie reflektiert offensichtlich einen erhöhten Energieumsatz gegenüber dem Sauerstoffverbrauch bei Hyperoxie, das wird auch im Blutfluss deutlich. Obwohl eine starke Oszillation als Grundmuster in den Blutflussdaten auffällt, werden dennoch eindeutige Einflüsse der Temperatur und des Sauerstoffgehalts auf den Blutfluss in der *Aorta dorsalis*, der *Vena cardinalis posterior* und in den Lebergefäßen sichtbar.

Bei Normoxie hatte die Temperatur im Einklang mit dem zunächst geringen Anstieg im O<sub>2</sub>-Verbrauch nur eine moderate Auswirkung auf den Blutfluss in der *Aorta dorsalis* (Abb. 3.2.6). Zwischen  $6$  und  $7^\circ\text{C}$  war jedoch mit der einsetzenden Steigerung des Energieumsatzes ein deutlicher Anstieg im Blutfluss zu erkennen, der in allen Blutgefäßen sichtbar wurde und im Fall der *Aorta dorsalis* ein signifikant höheres Niveau gegenüber dem Bereich zwischen  $0$  und  $6^\circ\text{C}$  erreichte. Hier haben die Tiere entweder über eine Steigerung des Herzschlagvolumens oder der Herzfrequenz (oder einer Kombination aus beidem, dem Herzzeitvolumen HZV) die Durchblutung und damit die Sauerstoffversorgung der Organe erhöht bzw. den durch Ventilation und Zirkulation erhöhten Sauerstoffbedarf gedeckt. Hierbei wird ein negativer Rückkopplungsprozess sichtbar: Möglicherweise sind Ventilation und Zirkulation nicht nur für die Bereitstellung des benötigten Sauerstoffes verantwortlich, sondern auch als erste von einer Sauerstoffmangelsituation betroffen (Pörtner, 2001).

Ein gesteigerter Blutfluss und eine ebenso gesteigerte Ventilation trugen zur anfangs noch konstanten Gewebeoxygenierung bei (siehe *Abbildung 3.2.9*). Dementsprechend konnten Hardewig *et al.* (1999) bei der stenothermen antarktischen Art *Lepidonotothen nudifrons* einen leichten Anstieg der Ventilationsrate zwischen  $0$  und  $7^\circ\text{C}$  beobachten, bei höheren Temperaturen blieb sie konstant, erreichte also eine Sättigung.

Nach dem Anstieg blieb der Blutfluss bei Normoxie in den Rückengefäßen bis  $12^\circ\text{C}$  mehr oder weniger stabil bzw. zeigte möglicherweise noch eine leichte Steigerung bis  $9^\circ\text{C}$ , um

dann bis 12°C auf das Niveau der Flussrate bei Hyperoxie abzusinken. Dies weist darauf hin, dass das Herz-Kreislauf-System der Tiere bei Normoxie zwischen 7 und 9°C sein Kapazitätslimit erreicht hat, eine Steigerung des Blutflusses durch Erhöhung des Herzzeitvolumens also nicht mehr möglich war. Der sinkende Trend zwischen 9 und 12°C kann durch einen zunehmend limitierenden Einfluss der Temperatur auf den Kreislauf erklärt werden.

Bei Hyperoxie stieg in beiden Rückengefäßen der Blutfluss geringfügiger und erst zwischen 7 und 8°C an, im Vergleich zur Normoxie bei einer um etwa 1°C erhöhten Temperatur. Der Reiz zur Steigerung des Blutflusses setzte bei Hyperoxie also etwas später ein, da die Tiere vermutlich von vornherein eine bessere Sauerstoffversorgung besaßen.

Dieser Unterschied im Blutfluss zwischen Normoxie und Hyperoxie wird im Muskelgewebe allerdings nicht sichtbar, die konstante Gewebeoxygenierung in der Rückenmuskulatur lässt auf eine sehr gut abgestimmte Sauerstoffversorgung schließen. Bei Hyperoxie, aber auch bei Normoxie, kam es oberhalb von 5°C zu einer leichten, aber im Fall der Hyperoxie signifikanten, Absenkung des Oxygenierungsniveaus. Da sich die Tiere während der Versuche in der Kammer nur selten bewegten, sind die leichten Änderungen in der Gewebeoxygenierung eher auf eine abnehmende Sauerstoffversorgung als auf eine Aktivitätszunahme zurückzuführen.

Für diese Befunde bietet sich folgende Erklärung an: Ein durch Hyperoxie hervorgerufener Anstieg im Blut- $P_{O_2}$  und damit auch leicht erhöhter venöser  $P_{O_2}$  kann über einen vermutlich venösen  $O_2$ -Sensor (Wilkes *et al.*, 1981; Holeton, 1972) das Atemzentrum beeinflussen und wie bei der Forelle (*Oncorhynchus mykiss*; Gilmour & Perry, 1994) und beim Katzenhai (*Scyliorhinus stellaris*, Barrett & Taylor, 1984; *Scyliorhinus canicula*, Heisler *et al.*, 1988) Hypoventilation und in der Folge auch eine Absenkung der Herzfrequenz hervorrufen. Dies könnte auch die Abnahme im Blut- $P_{O_2}$  der Muskulatur bei Hyperoxie erklären.

Daraus ergeben sich für das Herz-Kreislauf-System geringere Transportkosten bei gleicher Sauerstoffversorgung der Organe, die sich wiederum in einem geringeren Gesamtsauerstoffverbrauch widerspiegeln. Über diesen Rückkopplungsmechanismus kann das System auf einem niedrigeren Niveau stabil gehalten werden. Am oberen Ende der Temperaturtoleranz besteht zwar auch bei Hyperoxie Bedarf einer erhöhten Zirkulation, doch hier setzt bereits eine funktionelle Limitierung durch die Temperatur ein, das spiegelt

sich im Zusammenlauf der Normoxie- und Hyperoxiekurve bei 12°C in der *Aorta dorsalis* als auch in der *Vena cardinalis posterior* wider.

Im Lebergefäß (Abb. 3.2.8) stellt sich gegenüber den Rückengefäßen ein etwas anderes Bild dar: Über 3°C folgte der Blutfluss bei Hyperoxie dem Verlauf bei Normoxie, teilweise war er um etwa 1°C zu höheren Temperaturen verschoben. Parallel zum Flussanstieg in der *Aorta dorsalis* erfolgte zwischen 6 und 8°C ebenfalls eine erhöhte Durchblutung des Lebergefäßes, die aber nicht aufrecht erhalten wurde. Möglicherweise ist diese Beobachtung in der Kapazitätslimitierung der *Aorta* begründet, die bei Hyperoxie wiederum etwas später eintritt: Zwischen 10 und 12°C erreichte der Blutfluss in der Leber bei Hyperoxie das Minimum etwa 1°C später als bei Normoxie. Der sich anschließende Wiederanstieg des Blutflusses bis 12°C bei Normoxie und bis 13°C bei Hyperoxie ist nicht ganz eindeutig zu erklären, möglicherweise kam es zu einer Umverteilung des Blutstroms, so dass Organe mit geringerer Bedeutung für den Stoffsstoffwechsel (z. B. Muskulatur, Verdauungssystem) zugunsten der Leber unterversorgt wurden. Eine andere Erklärung für den unregelmäßigen Verlauf des Blutflusses in der Leber bietet die Anatomie dieses Organs. Da die Leber von *P. brachycephalum* von sehr vielen Blutgefäßen durchzogen ist, war es nicht möglich, anhand der NMR-Transversalschnitte den arteriellen oder venösen Charakter eines einzelnen Blutgefäßes zu bestimmen. Es wurde daher versucht, immer das gleiche, größte angeschnittene Lebergefäß auszuwerten, durch die Positionswechsel der Tiere führte aber auch dieses Vorgehen nicht immer zu exakten Ergebnissen. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass eine fehlerhafte Auswertung der Grund für den unregelmäßigen Verlauf des Blutflusses in der Leber ist, da alle Tiere aus beiden Versuchsreihen ein ähnliches Bild aufwiesen.

Auch die Änderungen in der Gewebeoxygenierung der Leber fügen sich nur schlecht in das bisher erhaltene Gesamtbild ein. Bis 12°C bei Normoxie und 14°C bei Hyperoxie war eine stetige Zunahme des  $T_2^*$ -Kontrastes zu beobachten. Führt man diese Zunahme allein auf Änderungen in der Oxygenierung des Gewebes zurück, bedeutete dies eine Steigerung der Oxygenierung zwischen 0 und 15°C um mindestens 100%, wenn man den für totes Gewebe erhaltenen Wert als Kalibrierungsgrundlage für deoxygeniertes Hämoglobin (0% O<sub>2</sub>-Sättigung) verwendet. Umgekehrt hieße das, dass unter Kontrollbedingungen zwischen 0 und 3°C die Sauerstoffsättigung im Lebergewebe nur maximal die Hälfte des möglichen Wertes betrug. Dies ist kaum mit den allgemeinen Befunden zu vereinbaren, dass bei poikilothermen Tieren der Sauerstoffbedarf mit der Temperatur ansteigt (Schmidt-Nielsen,

1999), demnach würde man mit steigender Temperatur eine Abnahme des Verhältnisses zwischen oxygeniertem und deoxygeniertem Hämoglobin ( $Hb_{ox}/Hb_{deox}$ ) erwarten, die sich in sinkenden  $T_2^*$ -Kontrastwerten manifestieren sollte.

Eine mögliche Erklärung für den Anstieg im  $T_2^*$ -Kontrast wäre, dass die Tiere den  $P_{O_2}$  im Blut dem Sauerstoffbedarf ihres Stoffwechsels angepasst haben. Es ist jedoch nicht wahrscheinlich, dass dies allein eine so drastische Zunahme des  $T_2^*$ -Kontrasts hervorrufen konnte, da man in der funktionellen Bildgebung am menschlichen Gehirn lediglich  $T_2^*$ -Kontraständerungen zwischen 5 und 10% auf Oxygenierungsänderungen zurückführt (Kim *et al.*, 1994). Beim Dorsch (*Gadus morhua*) konnte festgestellt werden, dass sich der arterielle Sauerstoffpartialdruck  $P_{aO_2}$  mit der Temperatur nur sehr wenig ändert, im Gegensatz zum venösen Sauerstoffpartialdruck  $P_{vO_2}$ , der mit steigender Temperatur abnimmt (Pörtner *et al.*, 2000b). Der erhöhte Sauerstoffbedarf wird hier nicht über eine höhere Sauerstoffsättigung, sondern über eine gesteigerte  $O_2$ -Extraktion aus dem Blut gedeckt, was sich in einer größeren Partialdruckdifferenz zwischen arteriellem und venösem Blut widerspiegelt – auch dies würde eher zu einer Abnahme des  $T_2^*$ -Kontrastes im Lebergewebe führen.

Weiterhin spielt auch die Sauerstoffaffinität des Blutes, die durch den Halbsättigungsdruck  $P_{50}$  des Hämoglobins charakterisiert wird, bei Temperatureffekten eine Rolle. Allgemein steigt bei eurythermen Vertebraten der  $P_{50}$  mit der Temperatur an, um im Gewebe die Sauerstoffabgabe zu erleichtern (Schmidt-Nielsen, 1999), dies ist auch bei Fischen der Fall, nur liegt bei ihnen der  $P_{50}$  deutlich niedriger als bei luftatmenden ektothermen Vertebraten. Auch die Lebensweise scheint einen großen Einfluss auf die Temperatursensitivität zu haben (Graham *et al.*, 1985; Korsmeyer *et al.*, 1997). Inaktive kalt-stenotherme antarktische Fische sowie Tiefseefische weisen einen sehr niedrigen  $P_{50}$  auf, der gegenüber Temperatur relativ unempfindlich ist (Qvist *et al.*, 1977; Wells & Jokumsen, 1982), Untersuchungen von Zielinski *et al.* (2001) bestätigen dies auch für antarktische Cephalopoden.

Dennoch würde man auch hier bei gesteigerter Temperatur durch einen Anstieg im  $P_{50}$  einen leicht erhöhten Anteil an deoxygeniertem Hämoglobin erwarten, der  $T_2^*$ -Kontrast müsste demnach sinken.

Die hier dargestellten Überlegungen lassen vermuten, dass die  $T_2^*$ -gewichteten Messungen im Lebergewebe von Einflüssen überlagert wurden, die nicht allein auf Änderungen im  $Hb_{ox}/Hb_{deox}$  Verhältnis zurückzuführen sind, sondern auf eine Änderung der Konzentrationen von paramagnetischen Ionen oder eine Überlagerung des Kontrastes mit Perfusionseffekten.

### 4.3 Energetik & $\text{pH}_i$ -Regulation

Neben einem protektiven Effekt auf den Metabolismus der Fische – das Aufheben einer Sauerstofflimitierung – hat Hyperoxie jedoch auch negative Auswirkungen, die gerade bei hohen Temperaturen zu Stress führen und den Energiehaushalt der Tiere belasten können. Im Vergleich zu anderen Studien (Barrett & Taylor, 1984; Dejours & Beekenkamp, 1977; Hobe *et al.*, 1984) wurde zwar bei den hier beschriebenen Experimenten mit einem  $P_{O_2}$  von 45,3 kPa (340 Torr) eine recht moderate Hyperoxie gewählt, dennoch sollten die für unnatürlich hohe Sauerstoffkonzentrationen beschriebenen Reaktionen bei der Diskussion der Daten nicht unberücksichtigt bleiben. Starke Hyperoxie (1500 kPa) ruft bei Forellen bereits nach kurzer Zeit (90 min) eine Verringerung der Kiemenoberfläche durch eine Abflachung der Struktur hervor (Barthelemy *et al.*, 1981). Dies verursacht einen verminderten Gasaustausch über die Kiemen.

Des Weiteren kommt es bei Atmungsprozessen in der Zelle permanent zu einer geringen Sauerstoffradikalbildung, die mit  $P_{O_2}$ , Temperatur und Stoffwechselrate ansteigt. Ab einem bestimmten Punkt können die auf Normoxie und möglicherweise auch niedrige Temperaturen ausgelegten Enzyme Superoxiddismutase und Katalase erhöhte Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies nicht mehr kompensieren, so dass durch Hyperoxie Zellmembranen, Proteine und DNA geschädigt werden könnten.

Aufgrund der sehr viel besseren Wasserlöslichkeit von  $\text{CO}_2$  gegenüber  $\text{O}_2$  fungiert bei Fischen im Gegensatz zu luftatmenden Vertebraten der  $P_{O_2}$  als Atemreizgeber. Aus dem verminderten Atemreiz bei Hyperoxie resultiert bei höheren wasseratmenden Organismen allgemein eine Reduktion der Ventilationsrate, die eine respiratorische Azidose zur Folge hat, da der  $P_{\text{CO}_2}$  im Blut ansteigt (Dejours & Beekenkamp, 1977). Eine solche respiratorische Azidose ist auch allgemein bei Fischen, Teleostern wie Elasmobranchiern, zu finden (Burlison & Smatresk, 2000; Gilmour & Perry, 1994; Heisler *et al.*, 1988; Hobe *et al.*, 1984; Wood & Jackson, 1980). Sie lässt sich über zwei Mechanismen kompensieren: Beim Zwergwels (*Ictalurus punctatus*) wurde ein kurzzeitiger Anstieg der Ventilationsrate beobachtet (Burlison & Smatresk, 2000), um überschüssiges  $\text{CO}_2$  auszuscheiden, bis längerfristige Kompensationsmechanismen greifen. Diese bestehen in einer aktiven Aufnahme von  $\text{HCO}_3^-$  über die Kiemen, die innerhalb von 48 Stunden die respiratorische Azidose ausgleicht (Heisler *et al.*, 1988; Wood & Jackson, 1980; Hobe *et al.*, 1984). Eine mögliche leichte Überkompensation kann zu dem bei Hyperoxie beobachteten erhöhten Ausgangs-Wert des  $\text{pH}_i$  führen (vgl. Abb. 3.2.13).

Grundsätzlich ist allerdings auffällig, dass sich kaum Unterschiede im temperaturabhängigen Verlauf des  $pH_i$  zwischen Normoxie und Hyperoxie ergaben und beide Verläufe eine signifikante Diskontinuität aufweisen, die auf eine Beteiligung unterschiedlicher Mechanismen an der  $pH_i$ -Regulation schließen lässt. Die Steigungen der Regressionsgeraden im Bereich zwischen  $0^\circ\text{C}$  und  $4^\circ\text{C}$  von  $-0,015$  bei Hyperoxie und  $-0,012$  bei Normoxie entsprechen Werten zur temperaturinduzierten  $pH$ -Änderung aus der Literatur, die teils mit *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie, teils mit anderen Methoden ermittelt wurden:

Mit der Homogenatmethode (nach Pörtner *et al.*, 1990) fanden van Dijk *et al.* (1999) für die Muskulatur von *Pachycara brachycephalum* einen  $pH$ -Abfall von  $-0,015 \text{ pH}/^\circ\text{C}$  zwischen  $0$  und  $3^\circ\text{C}$ , oberhalb von  $3^\circ\text{C}$  blieb der Verlauf deutlich flacher, ähnlich den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen. Für den Amerikanischen Aal (*Anguilla rostrata*) fanden Walsh & Moon (1982, 1983) in *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen mit der DMO-Methode für Leber und Herz eine temperaturabhängige  $pH$ -Änderung zwischen  $-0,0177$  und  $-0,0203 \text{ pH}/^\circ\text{C}$ ; für Blut, weiße und rote Muskulatur betrug  $\Delta\text{pH}/^\circ\text{C}$  jedoch nur  $-0,0033$  bis  $-0,0090$ . Mit der *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie wurde bereits zwischen  $0$  und  $6^\circ\text{C}$  für die Muskulatur von *Pachycara brachycephalum* ein  $\Delta\text{pH}/^\circ\text{C}$  von  $-0,015$  ermittelt (Bock *et al.*, 2001), ähnliche Ergebnisse ergaben sich aus Untersuchungen an der verwandten Art *Zoarces viviparus* aus Nord- und Ostsee im Temperaturbereich zwischen  $10$  und  $24^\circ\text{C}$  (Sartoris *et al.*, 2001).

Abweichungen zwischen den einzelnen Autoren dürften auf die Wahl der Methode (vgl. hierzu Pörtner & Sartoris, 1999) bzw. die Unterschiede zwischen invasiven und *in vivo* Messungen zurückzuführen sein. Zudem besteht die Möglichkeit, dass der  $pH_i$  in unterschiedlichen Geweben verschieden reguliert wird (Butler & Day, 1993; Walsh & Moon, 1982).

Die zwischen  $0$  und  $4^\circ\text{C}$  für die Muskulatur gefundenen  $pH_i$ -Änderungen kommen dem von der  $\alpha$ -stat Hypothese geforderten Wert von etwa  $-0,018 \text{ pH}/^\circ\text{C}^{-1}$  nahe, während der  $pH_i$  oberhalb von  $5^\circ\text{C}$  einen Verlauf aufwies, der von diesem Muster abweicht.

Van Dijk *et al.* (1997) fanden für die eurytherme Nordseeaalmutter *Z. viviparus* einen passiven Anteil an der  $\alpha$ -stat Regulation von etwa 35% ( $-0,006 \text{ pH}/^\circ\text{C}$  von  $-0,016 \text{ pH}/^\circ\text{C}$ ), bei der stenothermen antarktischen Aalmutter müsste der passive Anteil höher ausfallen (Pörtner *et al.*, 1998a). Für eine mögliche Erklärung des  $pH_i$ -Verlaufs bei *P. brachycephalum* über  $5^\circ\text{C}$  ( $\Delta\text{pH}/^\circ\text{C}$ :  $-0,004$  bei Normoxie bzw.  $-0,007$  bei Hyperoxie)

bietet es sich an, eine Verschiebung des Verhältnisses zwischen aktiver und passiver Regulation in Betracht zu ziehen. Hier bestehen zwei Interpretationsmöglichkeiten: Durch eine temperaturbedingte Inaktivierung von Carriern würde der Anteil der aktiven Regulationsmechanismen immer weiter abnehmen, während der passive Bestandteil, der auf die physikochemische Reaktion der intrazellulären Puffersysteme auf die Temperatur zurückzuführen ist, davon unbeeinflusst bleibt. Die  $\text{pH}_i$ -Regulation würde dann etwas flacher mit der Temperatur verlaufen. Eine Erklärung für das Abweichen des  $\text{pH}_i$  von der a-stat-Regulation in ein alkalischeres Milieu kann jedoch dadurch nicht gegeben werden – eigentlich würde man bei einer durch Temperaturstress hervorgerufenen Inaktivierung der Carrier wie  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher eher eine zusätzliche metabolische Ansäuerung als eine Alkalisierung erwarten.

Eine andere Möglichkeit ist, dass bei sinkendem extrazellulären pH eine Übersäuerung der Zelle durch Aktivierung des  $\text{Cl}/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers vermieden wird (Reeves, 1985). Gerade unter Stress durch Energielimitierung werden besonders die  $\text{HCO}_3^-$ -abhängigen Mechanismen wie der  $\text{Cl}/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher eingesetzt (Pörtner *et al.*, 2000a), eine kompensatorische Aktivierung dieses Austauschers würde eine Alkalisierung des intrazellulären Milieus erklären.

#### 4.4 Charakterisierung temperaturabhängiger Toleranzgrenzen

In dieser Arbeit ist deutlich geworden, dass Sauerstoff nicht als der alleinige Faktor angesehen werden kann, der die Temperaturtoleranz der antarktischen Aalmutter *Pachycara brachycephalum* limitiert. Er stellt aber das erste Glied einer Kette von Ereignissen dar, die zum Tod der Tiere führen. Ist der Sauerstoffmangel durch Hyperoxie ausgeschaltet, treten dahinter andere limitierende Prozesse zum Vorschein, die gleichfalls einen temperaturbedingten Tod des Organismus hervorrufen. Die letale Temperatur kann durch Hyperoxie daher nicht sehr weit verschoben werden, es ist wahrscheinlich, dass die Tiere bei Hyperoxie eine leicht erhöhte Letaltemperatur in weniger gestresstem Zustand erreichen (dies kann man aus dem geringeren Sauerstoffverbrauch und dem Flussprofil in der *Aorta* ableiten) und sie daher über einen längeren Zeitraum ertragen können. Das wird auch aus Weatherley's Experimenten an Goldfischen (*Carassius auratus*), die an verschiedene Temperaturen akklimiert waren, deutlich (Weatherley, 1970 & 1973). Er konnte nachweisen, dass bei Hyperoxie die Letaltemperatur gegenüber Normoxie bei allen Akklimationstemperaturen um etwa  $2^\circ\text{C}$  gesteigert werden konnte, und sich die Überlebenszeiten der Fische bei einer stabilen Temperatur gegenüber Normoxie

verdoppelten bis verfünffachten. Der positiven Auswirkung von Sauerstoff auf die Überlebensspanne sind dennoch Grenzen gesetzt: Oberhalb eines  $O_2$ -Partialdruckes von 5atm  $O_2$  ließ sich keine weitere Steigerung der Sauerstoffeffekte mehr erzielen. Des Weiteren hatte Sauerstoff keinen Einfluss auf die Überlebenszeit der Tiere oberhalb von  $35^\circ C$  – hier war wohl jenseits von *pejus*- und kritischer Temperatur der Schwellenwert erreicht, an dem andere Faktoren limitierend wirkten. Weatherley vermutete eine Denaturierung vor allem respiratorischer Proteine, eine Hitzezerstörung der Lipoproteine der Zellmembran oder auch Nervenzellschädigungen.

Es gilt nun anhand der diskutierten Ergebnisse zu ermitteln, ob – wie bei Invertebraten gezeigt (Pörtner *et al.* an *Laternula elliptica*, unveröffentl. Daten; Frederich & Pörtner, 2000 an *Maja squinado*) – auch bei antarktischen Fischen die Schwellentemperaturen  $T_p$  und  $T_{crit}$  auftreten und ob sie durch Hyperoxie verschoben werden können, wie dies bei der antarktischen Muschel *Laternula elliptica* der Fall war.

Bei *L. elliptica* fanden Pörtner *et al.* (unveröffentl. Daten) eine Sauerstofflimitierung an der *pejus*-Temperatur von  $4^\circ C$ , an der auch die Aktivität der Tiere deutlich nachließ (Urban, 1998 in Pörtner, 2001). Jenseits der *pejus*-Temperatur  $T_p$  nimmt der *aerobic scope* eines Organismus immer weiter ab, bis  $T_{crit}$  erreicht wird (Frederich & Pörtner, 2000). So könnte die mögliche *Arrhenius Break Temperature* im  $O_2$ -Verbrauch zwischen  $4$  und  $5^\circ C$  (siehe Abb. 3.1.2) auf eine temperaturbedingte Reduktion der mitochondrialen Kapazität *in vivo* hinweisen. Ein niedriger *aerobic scope* wiederum spiegelt sich laut Pörtner *et al.* (1999a) im Unvermögen wider, eine a-stat pH-Regulation aufrecht zu erhalten. Möglicherweise markiert also die Änderung in der  $pH_i$ -Regulation die *pejus*-Temperatur  $T_p$ . Als mögliche kompensatorische Reaktion auf einen sinkenden *aerobic scope* kommt es zu einer weiteren Steigerung des Herzzeitvolumens zwischen  $6$  und  $7^\circ C$ , mit der Folge, dass der Blutfluss ansteigt, bis das Kapazitätslimit oberhalb von  $7^\circ C$  erreicht ist und eine Sauerstofflimitierung einsetzt. Diese Interpretation des Geschehens deckt sich mit den Befunden von Frederich & Pörtner (2000): Bei  $T_p$  stieg in der Seespinne (*M. squinado*) bei maximaler Ventilationsfrequenz die Herzfrequenz zwar etwas weiter an, der  $P_{O_2}$  in der Hämolymphe konnte aber trotzdem nicht weiter aufrecht erhalten werden, so dass es zu einer fortschreitenden Reduktion der aeroben Kapazität der Tiere kam.

Bei *Pachycara brachycephalum* könnte man daher die Sättigung des Blutflusses im Bereich zwischen  $6$  und  $7^\circ C$  als Anzeichen für die *pejus*-Temperatur  $T_p$  sehen. Die leicht

zu höheren Temperaturen verschobenen Maxima der Kurvenverläufe des Blutflusses und der Gewebeoxygenierung bei Hyperoxie lassen vermuten, dass  $T_p$  bei Hyperoxie um etwa 1°C ansteigt.

Die Lage der kritischen Temperatur  $T_{crit}$  lässt sich nicht mit letzter Gewissheit bestimmen, da die Ergebnisse dieser Arbeit eine einsetzende Anaerobiose nicht eindeutig belegen können. Sommer *et al.* (1997) haben gefunden, dass im Wattwurm *Arenicola marina* etwa bei  $T_{crit}$  die  $\alpha$ -stat pH-Regulation eingestellt wird. Überträgt man dies auf die antarktische Aalmutter, müsste man eine  $T_{crit}$  zwischen 4 und 6°C annehmen, was in starkem Widerspruch zu den bisher aufgeführten Argumenten liegt. Allerdings wurde bei *A. marina* bisher keine  $T_p$  identifiziert, so dass ein Vergleich der Kriterien der Schwellentemperaturen zwischen Polychaeten und Fischen an dieser Stelle nicht angebracht erscheint.

Aus der Arbeit von van Dijk *et al.* (1999) geht hervor, dass bei Normoxie  $T_{crit}$  vermutlich zwischen 9 und 10°C liegt, hier fanden die Autoren bei *P. brachycephalum* einen sprunghaften Anstieg der Succinatkonzentration im Lebergewebe. 9°C wird auch bei einigen weiteren antarktischen Arten als  $T_{crit}$  angenommen (siehe Pörtner *et al.*, 2000a). Bei der Seespinne *Maja squinado* ist  $T_{crit}$  durch einen beginnenden Rückgang der Ventilations- und Herzfrequenz gekennzeichnet (Frederich & Pörtner, 2000). Berücksichtigt man den möglichen (nicht signifikanten) Maximalwert der Blutflussdaten unter Normoxie, spräche dies ebenfalls für 9°C als  $T_{crit}$  bei Normoxie. Van Dijk *et al.* (1999) werteten aufgrund ihrer Beobachtungen allerdings auch einen extremen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs als Anzeichen von  $T_{crit}$ , demzufolge würde  $T_{crit}$  bei Normoxie in dieser Arbeit höher angesetzt werden müssen. Da der Sauerstoffverbrauch der einzige Parameter ist, der in der vorliegenden Arbeit bezüglich  $T_{crit}$  eine klare Aussage erlaubt, sollte davon ausgegangen werden, dass die kritische Temperatur  $T_{crit}$  von *Pachycara brachycephalum* auch in dieser Arbeit im Bereich des maximalen Sauerstoffverbrauchs bei Normoxie liegt, damit liegt sie etwa bei 12°C - leicht erhöht gegenüber den Experimenten von Dijk *et al.* (1999).

Eine Verschiebung von  $T_{crit}$  durch Hyperoxie, wie dies Pörtner *et al.* bei *L. elliptica* gelang, ist schwieriger zu belegen, da für die hyperoxe Versuchsreihe keine Gewebeproben vorliegen, um eine einsetzende Anaerobiose zu dokumentieren. Auf der anderen Seite wurden die meisten Tiere der Versuchsreihe bei Normoxie für eine solche Gewebeprobennahme lebend bei 12°C aus dem Versuchsaufbau entnommen, so dass ein direkter Vergleich der letalen Temperaturen bei Normoxie und Hyperoxie nicht möglich

ist. Zusammen mit dem Sauerstoffverbrauch, der zu keiner Zeit einen so drastischen Anstieg zeigte wie unter Normoxie, ist der konstante Blußfluss ein Hinweis dafür, dass die kritische Temperatur  $T_{crit}$  – im Sinne ihrer Definition als Übergangstemperatur zum anaeroben Stoffwechsel (Zielinski & Pörtner, 1996) – durch Hyperoxie hin zu einer (hypothetischen) höheren Temperatur verschoben werden kann. Diese liegt jedoch jenseits einer letalen Temperatur, die anderweitig bestimmt ist. Damit könnte ein limitierender Einfluss von Sauerstoff bei Hyperoxie ausgeschaltet sein, jedoch treten dahinter noch weitere limitierende Faktoren zutage.

Diese Überlegungen werden auch durch Weatherleys Arbeiten unterstützt (Weatherley, 1970 & 1973), der beim Goldfisch oberhalb einer limitierenden Temperatur keinen protektiven Einfluss von Sauerstoff mehr nachweisen konnte.

Für antarktische Aalmuttern wäre es durchaus sinnvoll, wenn Letal- und kritische Temperatur nahe beieinander lägen. Unter normalen Umständen besteht für sie keine Notwendigkeit eines großen passiven Toleranzbereiches zwischen  $T_p$  und  $T_{crit}$ , da sie zum einen eine sehr inaktive Lebensweise besitzen, zum anderen ihre Umgebung durch sehr stabile Temperaturen und einen  $P_{O_2}$  des Wassers nahe an der Sättigungsgrenze charakterisiert ist (Wells & Jokumsen, 1982).

Abschließend wird deutlich, dass im Fall der antarktischen Aalmutter *Pachycara brachycephalum* die temperaturbedingte Sauerstofflimitierung nur ein Teilaspekt einer Serie von Vorgängen sein kann, die letztlich eine letale Temperatur  $T_{let}$  definieren. Es konnte eine *pejus*- und eine kritische Temperatur nachgewiesen werden, sowie ein protektiver Einfluss von Sauerstoff auf den Organismus, der sich in einer leichten Verschiebung von  $T_p$  zu höheren Temperaturen bemerkbar machte. Eine vermutliche Verschiebung von  $T_{crit}$  konnte nicht eindeutig belegt werden, da bei *P. brachycephalum* eine letale Temperatur neben Sauerstoffmangel noch von anderen Prozessen definiert wird.

Es ist möglich, dass diese limitierenden Prozesse, wenn Sauerstoff als Faktor einmal ausgeschaltet ist, nicht auf organismischer, sondern auf Zell- oder molekularer Ebene zu suchen sind (Pörtner, 2001). So kann es zu einer temperaturbedingten Inaktivierung von Enzymen kommen (Storelli *et al.*, 1998), vielleicht sind die Ursachen aber auch auf nervöser Ebene zu suchen: Es gibt Hinweise auf eine Affinitätsabnahme der Acetylcholinesterase bei hohem Temperaturen (Baldwin & Hochachka, 1970; Baldwin, 1970), die ein Versagen nervös gesteuerter Prozesse (wie z. B. der Ventilation) bedingen könnte. Moran & Melani (2001) entdeckten, dass es oberhalb von 16°C zu einer plötzlichen Abnahme der

Nervenleitfähigkeit arktischer Aalmuttern (*Lycodes ssp.*) kam, diese Temperatur lag allerdings bereits jenseits der Letaltemperatur der Tiere. Hierbei wird ein Problem deutlich, das häufig bei der Untersuchung einzelner zellulärer Prozesse auftritt: isoliert betrachtet weisen viele Prozesse eine höhere Temperaturtoleranz auf, als - in ihrer Summe - der gesamte Organismus (vgl. hierzu auch Pörtner *et al.*, 1999b, 2000b, Pörtner, 2001).

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Hyperoxie auf die Temperaturtoleranz der antarktischen Aalmutter *Pachycara brachycephalum* untersucht. Die Grundlage dieser Arbeit bildete die Annahme, dass die unzureichende Versorgung aerober Stoffwechselprozesse mit Sauerstoff bei steigender Temperatur den ersten limitierenden Faktor in der Temperaturtoleranz darstellt. Dies konnte bereits bei antarktischen Invertebraten nachgewiesen werden. Um zu prüfen, ob sich diese Hypothese auch auf Vertebraten erweitern lässt, sollte ermittelt werden, ob sich durch die Bereitstellung zusätzlichen Sauerstoffs die obere kritische Temperatur  $T_{crit}$ , die den Übergang zum anaeroben Stoffwechsel charakterisiert, zu höheren Temperaturen verschieben und sich die Temperaturtoleranz dadurch erweitern lässt.

Dazu wurden die Tiere bei Normoxie und bei Hyperoxie ( $P_{O_2}$ : 45,3 kPa) schrittweise von 0°C auf etwa 15°C erwärmt (1°C ? 12 h<sup>1</sup>). Respirationsmessungen wurden in Kombination mit *in vivo* <sup>31</sup>P-NMR-spektroskopischen und <sup>1</sup>H-NMR-tomographischen Messungen durchgeführt, um Sauerstoffverbrauch, Energiehaushalt, den intrazellulären pH-Wert sowie den arteriellen und venösen Blutfluss und den Oxygenierungsgrad ausgewählter Gewebe in Abhängigkeit von Temperatur und Sauerstoffpartialdruck am lebenden Tier zu verfolgen.

Die *pejus*-Temperatur  $T_p$ , die den Übergang von optimalen zu eingeschränkten physiologischen Bedingungen markiert, liegt bei *Pachycara brachycephalum* im Bereich zwischen 6 und 7°C. Darauf lassen eine bei 7°C einsetzende Kapazitätslimitierung des Herz-Kreislauf-Systems bei Normoxie, die sich in einem nicht mehr zu steigenden Blutfluss in den Rückengefäßen (*Aorta dorsalis* und *Vena cardinalis posterior*) oberhalb von 7°C widerspiegelte, und eine leichte Reduktion der Gewebeoxygenierung in der Rückenmuskulatur oberhalb von 5°C schließen.

Der intrazelluläre pH-Wert ( $pH_i$ ) sank mit einem  $\Delta pH_i/\Delta T$  von  $-0,012 \text{ ? } ^\circ\text{C}^{-1}$  bei Normoxie bzw.  $-0,015 \text{ ? } ^\circ\text{C}^{-1}$  bei Hyperoxie im Bereich zwischen 0 und 5°C gemäß der a-stat Theorie. Oberhalb dieses Temperaturbereichs folgte die  $pH_i$ -Regulation einem anderen Muster, das sich mit einem  $\Delta pH_i/\Delta T$  von  $-0,004 \text{ ? } ^\circ\text{C}^{-1}$  bei Normoxie bzw.  $-0,007 \text{ ? } ^\circ\text{C}^{-1}$  bei Hyperoxie signifikant von der a-stat Regulation unterschied. Dies deutet auf eine Abnahme in der aeroben Kapazität der Tiere hin und unterstreicht die Lage von  $T_p$  im Bereich zwischen 6 und 7°C. Bei Hyperoxie lag  $T_p$  etwa 1°C höher als bei Normoxie.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass *Pachycara brachycephalum* bei Hyperoxie oberhalb von 9°C einen signifikant niedrigeren Sauerstoffverbrauch besitzt als bei

Normoxie, dies kann auf eine Reduktion von hypoxiebedingtem Stress zurückzuführen sein. Bei einem maximalen Sauerstoffverbrauch von etwa  $4 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{FG} \cdot \text{h}^{-1}$  wurde bei Normoxie  $T_{\text{crit}}$  bei  $12^\circ\text{C}$  erreicht. Bei Hyperoxie fand sich ein fortgesetzter Anstieg im Blutfluss (*Aorta dorsalis*) bzw. ein gleichmäßiger Verlauf (*Vena cardinalis posterior*) in den Rückengefäßen, in denen sich keine Limitierung abzeichnete. Dies deutet auf eine Verschiebung von  $T_{\text{crit}}$  zu höheren Temperaturen hin.

Insgesamt wurde deutlich, dass Hyperoxie einen protektiven Einfluss auf die Stoffwechselprozesse zu haben scheint. Dadurch kann der aerobe Bereich möglicherweise ausgedehnt und  $T_{\text{crit}}$  zu höheren Temperaturen verschoben werden. Dies ist aber mit den vorhandenen Daten nicht eindeutig zu belegen, da bei den Tieren unter Hyperoxie der Tod bereits eintrat, bevor Anzeichen von Hypoxie im Sauerstoffverbrauch und auf organismischer Ebene (Blutfluss, Gewebeoxygenierung) sichtbar wurden. Dies deutet auf eine Beteiligung weiterer limitierender Mechanismen, wie z. B. nervöses Versagen oder die Inaktivierung von Proteinen, an der Temperaturtoleranz hin.

## 6 Literatur

- Anderson, M E** (1990). Zoarcidae. *in: Fishes of the Southern Ocean; eds.: O Gon & PC Heemstra; Smith Institute for Ichthyology, S. 256-276.*
- Anderson, M E** (1994). Systematics and osteology of the Zoarcidae (Teleostei: Perciformes). *Ichthyol Bull*, **60**:120.
- Arntz, W E; Brey, T und Gallardo, V A** (1994). Antarctic zoobenthos. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev*, **32**:241-304.
- Baldwin, J** (1971). Adaptation of enzymes to temperature: acetylcholinesterase in the central nervous system of fishes. *Comp Biochem Physiol*, **40**:181-187.
- Baldwin, J & Hochachka, P W** (1970). Functional significance of isoenzymes in thermal acclimation: acetylcholinesterase from trout brain. *Biochem J*, **116**:883-887.
- Barrett, D J & Taylor, E W** (1984). Changes in heart rate during progressive hyperoxia in the dogfish *Scyliorhinus canicula* L.: Evidence for a venous oxygen receptor. *Comp Biochem Physiol A*, **78**(4):697-703.
- Barthelemy, L; Belaud, A und Chastel, C** (1981). A comparative study of oxygen toxicity in vertebrates. *Respir Physiol*, **44**:261-268.
- Beamish, F J W** (1964). Respiration of fishes with special emphasis on standard oxygen consumption. II. Influence of weight and temperature on respiration of several species. *Can J Zool*, **42**:177-188.
- Bloch, F** (1946). Nuclear induction. *Phys Rev*, **60**:470-474.
- Bock, C** (1995). Untersuchungen zur osmotischen Akklimatisation der antarktischen Grünalge *Prasiola crispa* mit *in vivo* Kernspinresonanzspektroskopie. Dissertation am Fachbereich 1 (Physik/Elektrotechnik) der Universität Bremen.
- Bock, C; Sartoris, F J; Wittig, R M und Pörtner, H O** (2001). *In vivo* NMR studies of fish at different temperatures: observation of alpha-Stat pH regulation in stenothermal Antarctic and eurythermal temperate eelpout (Zoarcidae). *Polar Biol, (im Druck)*.
- Boutilier, R G; Heming, T A und Iwama, G K** (1984). Appendix: Physicochemical parameters for use in fish respiratory physiology. *Fish Physiology*, **XA**:403-430.
- Burleson, M L & Smatresk, N J** (2000). Branchial chemoreceptors mediate ventilatory responses to hypercapnic acidosis in channel catfish. *Comp Biochem Physiol A*, **125**:403-414.
- Butler, P J & Day, N** (1993). The relationship between intracellular pH and swimming performance of brown trout exposed to neutral and sublethal pH. *J Exp Biol*, **176**:271-284.
- Cameron, J N** (1989). Acid-base homeostasis: past and present perspectives. *Physiol Zool*, **62**(4):845-865.

- Clarke, A** (1983). Life in cold water: the physiological ecology of polar marine ectotherms. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev*, **21**:341-453.
- Clarke, A** (1991). What is cold adaptation and how should we measure it? *Amer Zool*, **31**(81):81-92.
- Clarke, A** (1993). Seasonal acclimatization and latitudinal compensation in metabolism: do they exist? *Funct Ecol*, **7**:139-149.
- Clarke, A & Johnston, N M** (1999). Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *J Anim Ecol*, **68**:893-905.
- Dejours, P & Beekenkamp, H** (1977). Crayfish respiration as a function of water oxygenation. *Respir Physiol*, **30**:241-251.
- Dunn, J F** (1988). Low-temperature adaptation of oxidative energy production in cold-water fishes. *Can J Zool*, **66**:1098-1104.
- Ellington, W R** (1983). Phosphorus nuclear magnetic resonance studies of energy metabolism in molluscan tissues: effect of anoxia and ischemia on the intracellular pH and high energy phosphates in the ventricle of the whelk, *Busycon contrarium*. *J Comp Physiol*, **153**:159-166.
- Engel, J** (1997). Signifikante Schule der schlichten Statistik. *Filander Verlag, Fürth*.
- Frederich, M** (1999). Ökophysiologische Ursachen der limitierten geographischen Verbreitung reptanter decapoder Krebse in der Antarktis (Dissertation). *Ber Polarforsch*, **335**.
- Frederich, M & Pörtner, H O** (2000). Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in spider crab, *Maja squinado*. *Am J Physiol*, **279**:R1531-R1538.
- Gilmour, K M & Perry, S F** (1994). The effects of hypoxia, hyperoxia or hypercapnia on the acid-base disequilibrium in the arterial blood of rainbow trout. *J Exp Biol*, **192**:269-284.
- Graham, M S; Haedrich, R L und Fletcher, G L** (1985). Hematology of three deep-sea fishes: a reflection of low metabolic rates. *Comp Biochem Physiol*, **80A**(1):79-84.
- Haase, A; Frahm, J; Matthaei, D; Hänicke, W und Merboldt, K D** (1986). FLASH imaging. Rapid NMR imaging using low flip-angle pulses. *J Magn Reson*, **67**:258-266.
- Hardewig, I; Peck, L S und Pörtner, H O** (1999). Thermal sensitivity of mitochondrial function in the Antarctic Notothenoid *Lepidonotothen nudifrons*. *J Comp Physiol B*, **169**:597-604.
- Hardewig, I; van Dijk, P L M und Pörtner, H O** (1998). High-energy turnover at low temperatures: recovery from exhaustive exercise in Antarctic and temperate eelpouts. *Am J Physiol*, **274**:R1789-R1796.

- Heisler, N; Toews, D P und Holeyton, G F** (1988). Regulation of ventilation and acid-base status in the elasmobranch *Scyliorhinus stellaris* during hyperoxia-induced hypercapnia. *Respir Physiol*, **71**:227-246.
- Hobe, H; Wood, C M und Wheatly, M G** (1984). The mechanisms of acid-base and ionoregulation in the freshwater rainbow trout during environmental hyperoxia and subsequent normoxia. I. Extra- and intracellular acid-base status. *Respir Physiol*, **55**:139-154.
- Holeyton, G F** (1972). Gas exchange in fish with and without hemoglobin. *Respir Physiol*, **14**:142-150.
- Holeyton, G F** (1974). Metabolic cold adaptation of polar fish: fact or artefact? *Physiol Zool*, **47**(3):137-152.
- Johnston, I A & Dunn, J** (1987). Temperature acclimation and metabolism in ectotherms with particular reference to teleost fish. *in: Temperature and animal cells (Symposia of the Soc Exp Biol)*, **41**:67-93.
- Jones, D R** (1971). Theoretical analysis of factors which may limit the maximum oxygen uptake of fish: the oxygen cost of the cardiac and branchial pumps. *J theor Biol*, **32**:341-349.
- Kim, S G; Hendrich, K; Hu, X; Merkle, H und Ugurbil, K** (1994). Potential pitfalls of functional MRI using conventional gradient-recalled echo techniques. *NMR Biomed*, **7**:69-74.
- Kock, K H** (1992). Antarctic fish and fisheries. *Cambridge University Press*.
- Korsmeyer, K E; Lai, N C; Shadwick, R E und Graham, J B** (1997). Oxygen transport and cardiovascular responses to exercise in the yellowfin tuna *Thunnus albacares*. *J Exp Biol*, **200**:1987-1997.
- Kost, G J** (1990). pH standardisation for phosphorus-31 magnetic resonance heart spectroscopy at different temperatures. *Magn Reson Med*, **14**:496-506.
- Krogh, A** (1914). The quantitative relation between temperature and standard metabolism in animals. *Int Z Phys Chem Biol*, **1**:491-508.
- Kugel, H** (1988). <sup>31</sup>P- und <sup>23</sup>Na-Kernspinresonanzspektroskopische Untersuchungen des Energiemetabolismus der euryhalinen Mikroalge *Platymonas subcordiformis*. Dissertation am Fachbereich 1 (Physik/Elektrotechnik) der Universität Bremen.
- Lasiewski, R C; Acosta, A L und Bernstein, M H** (1966). Evaporative water loss in birds I. Characteristics of the open flow method of determination, and their relation to estimates of thermoregulatory ability. *Comp Biochem Physiol*, **19**:445-457.
- Mansfield, P & Morris, P G** (1982). NMR imaging in biomedicine. *in: Advances in Magnetic Resonance; ed.: J S Waugh; Academic Press, London*.
- Moran, O & Melani, R** (2001). Temperature-dependent conduction properties in Arctic fish peripheral nerve. *Polar Biol*, **24**:9-15.

- Nickerson, D M; Facey, D E und Grossman, G D** (1989). Estimating physiological thresholds with continuous two-phase regression. *Physiol Zool*, **62**(4):866-887.
- O'Brien, C M; Fox, C J; Planque, B und Casey, J** (2000). Climate variability and North Sea cod. *Nature*, **404**:142.
- O'Brien, K M & Sidell, B D** (2000). The interplay among cardiac ultrastructure, metabolism and the expression of oxygen-binding proteins in Antarctic fishes. *J Exp Biol*, **203**:1287-1297.
- Ogawa, S; Lee, T M; Kay, A R und Tank, D W** (1990). Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**:9868-9872.
- Olbers, D; Gouretski, V und Seifl, G** (1992). Hydrographic Atlas of the Southern Ocean. *Bibliothek des AWI, Bremerhaven*.
- Ouwerkerk, R; Lee, R; Weiss, R G und Bottomley, P A** (2000). A new FAST method for in-vivo measurement of chemical exchange rates. *Abstract, 8th annual meeting of the ISMRM, Denver*.
- Pörtner, H O** (2001). Climate change and temperature dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. (*Eingereicht*).
- Pörtner, H O; Boutilier, R G; Tang, Y und Toews, D P** (1990). Determination of intracellular pH and Pco<sub>2</sub> after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. *Respir Physiol*, **81**:255-274.
- Pörtner, H O; Hardewig, I; Sartoris, F J und van Dijk, P L M** (1998a). Energetic aspects of cold adaptation: critical temperatures in metabolic, ionic and acid-base regulation? *in: Cold Ocean Physiology; eds.: H O Pörtner & R C Playle; Cambridge University Press*. S. 88-120.
- Pörtner, H O; Reipschläger, A und Heisler, N** (1998b). Acid-base regulation, metabolism and energetics in *Sipunculus nudus* as a function of ambient carbon dioxide level. *J Exp Biol*, **201**:43-55.
- Pörtner, H O & Sartoris, F J** (1999). Invasive studies of intracellular acid-base parameters: quantitative analyses during environmental and functional stress. *In: Regulation of tissue pH in plants and animals; eds.: Taylor, EW; Eggington, S & Raven, JA. SEB Seminar Series. Cambridge University Press*, S. 69-98.
- Pörtner, H O; Peck, L S; Zielinski, S und Conway, L Z** (1999a). Intracellular pH and energy metabolism in the highly stenothermal Antarctic bivalve *Limopsis marionensis* as a function of ambient temperature. *Polar Biol*, **22**:17-30.
- Pörtner, H O; Hardewig, I und Peck, L S** (1999b). Mitochondrial function and critical temperature in the Antarctic bivalve, *Laternula elliptica*. *Comp Biochem Physiol, Part A*(124):179-189.
- Pörtner, H O; Bock, C und Reipschläger, A** (2000a). Modulation of the cost of pH<sub>i</sub> regulation during metabolic depression: a <sup>31</sup>P-NMR study in invertebrate (*Sipunculus nudus*) isolated muscle. *J Exp Biol*, **203**:2417-2428.

- Pörtner, H O; van Dijk, P L M; Hardewig, I und Sommer, A** (2000b). Levels of metabolic cold adaptation: tradeoffs in eurythermal and stenothermal ectotherms. *in: Antarctic Ecosystems: Models for a wider understanding ; eds.: W Davison & C W Williams; CaxtonPress, Christchurch, New Zealand.*
- Qvist, J; Weber, R E; de Vries, A L und Zapol, W M** (1977). pH and haemoglobin from the Antarctic cod *Dissostichus mawsoni*. *J Exp Biol*, **67**:77-88.
- Reeves, R B** (1972). An imidazole alaphstat hypothesis for vertebrate acid-base regulation: tissue carbon dioxide content and body temperature in bullfrogs. *Resp Physiol*, **14**:219-236.
- Reeves, R B** (1985). Alaphstat regulation of intracellular acid-base state? *in: Circulation, Respiration and Metabolism; ed.: R Gilles; Springer-Verlag, Heidelberg, S. 414-423.*
- Saint-Paul, U** (1988). Diurnal routine O<sub>2</sub>-consumption at different O<sub>2</sub> concentration by *Colossoma macropomum* and *Colossoma brachypomum* (Teleostei: Serrasalmidae). *Comp Biochem Physiol*, **89A**(4):675-682.
- Sartoris, F J; Bock, C und Pörtner, H O** (2001). Temperature dependent pH regulation in eurythermal and stenothermal marine ectotherms: An interspecies comparison using <sup>31</sup>P-NMR. (*in Vorbereitung*).
- Schmidt-Nielsen, K** (1999). *Physiologie der Tiere. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.*
- Scholander, P F; Flagg, W; Walters, V und Irving, L** (1953). Climatic adaptation in arctic and tropical poikilotherms. *Physiol Zool*, **26**:67-92.
- Shelford, V E** (1931). Some concepts of bioecology. *Ecology*, **12**(3):455-467.
- Segel, I H** (1976). *Biochemical calculations. 2nd edition; J. Wiley & Sons, USA.*
- Sidell, B D** (1991). Physiological roles of high lipid content in tissues of Antarctic fish species. *in: Biology of Antarctic Fish; eds.: G di Prisco, B Maresca & B Tota; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 221-231.*
- Sidell, B D** (1998). Intracellular oxygen diffusion: the roles of myoglobin and lipid at cold body temperature. *J Exp Biol*, **201**:1118-1127.
- Sommer, A; Klein, B und Pörtner, H O** (1997). Temperature induced anaerobiosis in two populations of the polychaete worm *Arenicola marina* (L.). *J Comp Physiol B*, **167**:25-35.
- Southward, A J** (1958). Note on the temperature tolerances of some intertidal animals in relation to environmental temperatures and geographical distribution. *J Mar Biol Ass UK*, **37**:49-66.
- Southward, A J; Hawkins, S J und Burrows, M T** (1995). Seventy years' observation of changes in distribution and abundance of zooplankton and intertidal organisms in the Western English Channel in relation to rising sea temperature. *J Therm Biol*, **20**(1/2):127-155.

- Storelli, C; Acierno, R und Maffia, M** (1998). Membrane lipids and protein adaptations in Antarctic fish. *in: Cold Ocean Physiology; eds.: H O Pörtner & R C Playle; Cambridge University Press*, S. 166-189.
- Stryer, L** (1996). Biochemie. 4. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Urban, H J** (1998). Upper temperature tolerance of two Antarctic molluscs (*Laternula elliptica* and *Nacella concinna*) from Potter Cove, King George Island, Antarctic Peninsula. *Ber Polarforsch*, **299**:230-236.
- Van Dijk, P L M; Hardewig, I und Pörtner, H O** (1997). Temperature-dependent shift of pHi in fish white muscle: Contributions of passive and active processes. *Am J Physiol*, **272**:R84-R89.
- Van Dijk, P L M; Tesch, C; Hardewig, I und Pörtner, H O** (1999). Physiological disturbances at critically high temperatures: A comparison between stenothermal antarctic and eurythermal temperate eelpouts (Zoarcidae). *J Exp Biol*, **202**:3611-3621.
- Walsh, P J & Moon, T W** (1982). The influence of temperature on extracellular and intracellular pH in the American Eel, *Anguilla rostrata*. *Respir Physiol*, **50**:129-140.
- Walsh, P J & Moon, T W** (1983). Intracellular pH-temperature interactions of hepatocytes from American eels. *Am J Physiol*, **245**:R32-R37.
- Weatherley, A H** (1970). Effects of superabundant oxygen on thermal tolerance of goldfish. *Biol Bull*, **139**:229-238.
- Weatherley, A H** (1973). Effects of constant illumination and hyperoxia on thermal tolerance of goldfish. *Comp Biochem Physiol*, **45 A**:891-894.
- Wells, R M G** (1986). Cutaneous oxygen uptake in the Antarctic icequab, *Rhigophila dearborni* (Pisces: Zoarcidae). *Polar Biol*, **5**:175-179.
- Wells, R M G** (1987). Respiration of Antarctic fish from McMurdo Sound. *Comp Biochem Physiol*, **88 A**(3):417-424.
- Wells, R M G & Jokumsen, A** (1982). Oxygen binding of hemoglobins from Antarctic fishes. *Comp Biochem Physiol*, **71B**(3):469-473.
- Wilkes, P R H; Walker, R L; McDonald, D G und Wood, C M** (1981). Respiratory ventilatory, acid-base and ionoregulatory physiology of the white sucker *Catostomus commersoni*: The influence of hyperoxia. *J Exp Biol*, **91**:239-254.
- Wohlschlag, D E** (1960). Metabolism of an Antarctic fish and the phenomenon of cold adaptation. *Ecology*, **41** (2):287-292.
- Wohlschlag, D E** (1963). An Antarctic fish with unusually low metabolism. *Ecology*, **44**(3):557-564.
- Wood, C M & Jackson, E B** (1980). Blood acid-base regulation during environmental hyperoxia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Respir Physiol*, **42**:351-372.

- Zielinski, S; Sartoris, F J und Pörtner, H O** (2001). Temperature effects on hemocyanin oxygen binding in an Antarctic cephalopod. *Biol Bull*, (*im Druck*).
- Zielinski, S & Pörtner, H O** (1996). Energy metabolism and free-energy change of the intertidal worm *Sipunculus nudus* below a critical temperature. *J Comp Physiol B*, **166**:492-500.

## 7 Anhang

### 7.1 Parameter für die NMR Messungen:

**Tabelle 8.1:** in den Protokollen der NMR-Messungen eingestellte Parameter

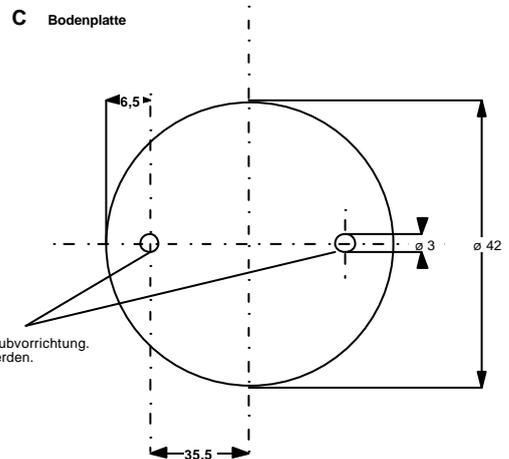
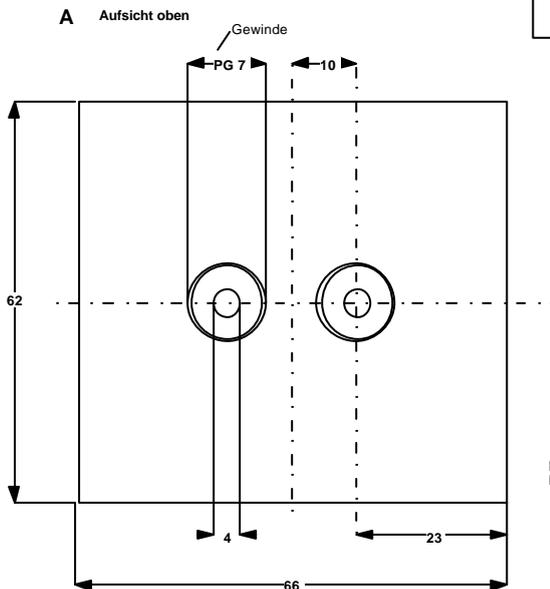
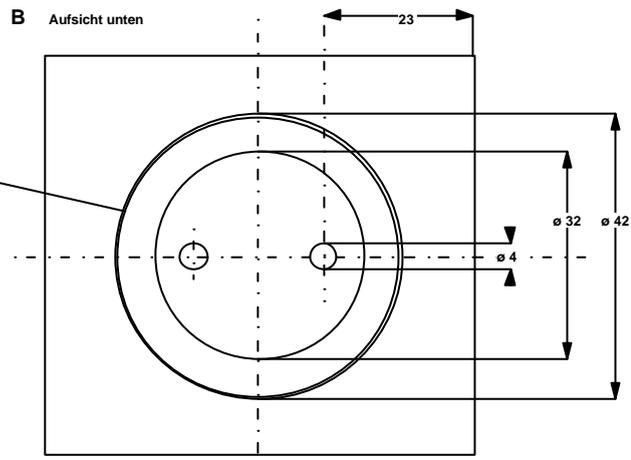
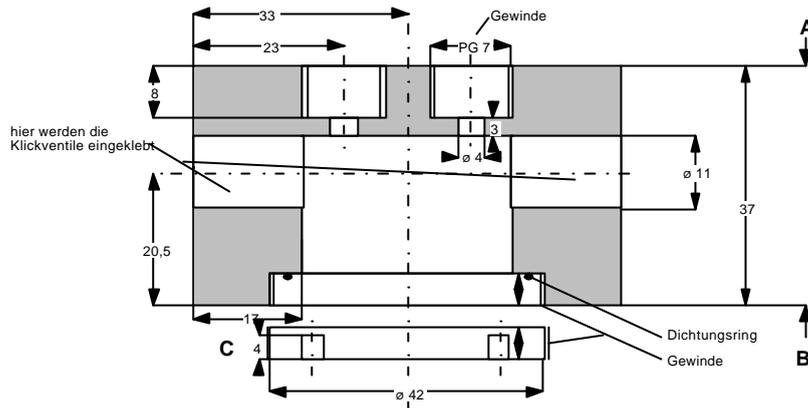
Methode	<sup>31</sup> P	Sat Trans	Angio	T <sub>2</sub> *
Kern	<sup>31</sup> P	<sup>31</sup> P	<sup>1</sup> H	<sup>1</sup> H
Pulsprogramm	31P	31P_Sat	GEFC	GEFI
protocol	31P_felix	31P_Sat	GEFC_Angio_eel1	GEFI_t2*_tr
O1	420 Hz	420 Hz	0 Hz	0 Hz
receiver gain	50 000	50 000	<i>variabel</i>	<i>variabel</i>
no. of averages	600	240	2	2
no. of repetitions	-	-	1	4
no. of echoes	-	-	1	1
dummy scans	0	2; 4; 8; 16; 24; 32	10	15
Sweep width	5000 Hz	6000 Hz	50000 Hz	50000 Hz
T <sub>R</sub>	1,0 s	16s; 8s; 4s; 2s; 1s; 0,5s	100 ms	100 ms
T <sub>E</sub>	-	-	10 ms	40 ms
excitation pulse	bp32 (-2,5 dB)	bp32 (-2,9 dB)	hermite (3,8 dB)	sinc3 (15dB)
excitation pulse length	100µs	200µs	2000µs	2000µs
Pulswinkel	90°	90°	45°	11°
Matrix	-	-	128 * 128	128 * 128
MTC scheme	-	Dante Off Res (21,4 dB)	-	-
MTC irradiation offset	-	<i>Position g-ATP</i>	-	-
MTC power	-	0,5 µT	-	-
no. of MTC pulses	-	32	-	-
Dauer	10 min	4 - 67 min	1 min	4 min

Kursiv gedruckte Parameter variieren und müssen jeweils vor Beginn des Experiments ermittelt werden.

## 7.2 Optodencontainer

**Optodenkammer**  
 für Optoden und Temperatursensoren  
 Material: Plexiglas  
 Maßangaben in mm  
**Außere Ecken stark abrunden**

**Veränderungen:**  
 - Klickventile mit PG7-Gewinde  
 - Ventilbohrungen weiter oben, damit Blasen abfließen können, evtl. Übergang entgraten  
 - Optodenhalterungen in Fließrichtung schräg einsetzen, damit weniger hängenbleiben kann.



### 7.3 $T_I$ -Werte

**Tabelle 8.3:**  $T_I$ -Werte, die für die Sättigungstranfermessungen bestimmt wurden

Temperatur [°C]	P <sub>i</sub>		PCr		a-ATP		b-ATP		g-ATP	
	MW $T_1$ [s]	StAbw [s]	MW $T_1$ [s]	StAbw [s]	MW $T_1$ [s]	StAbw [s]	MW $T_1$ [s]	StAbw [s]	MW $T_1$ [s]	StAbw [s]
0 – 1	3,20	0,46	1,80	0,40	1,02	0,53	1,10	0,21	1,31	0,38
2 – 3	2,76	1,41	2,36	1,39	1,12	0,80	0,98	0,27	0,77	
4 – 5	3,09	0,61	2,16	0,26	0,93	0,24	1,45	0,23	1,44	0,11
6 – 7	3,21	1,22	2,03	0,29	0,97	0,24	1,16	0,10	1,50	0,33
8 – 9	3,88	1,70	3,53	1,63	0,97		1,48	0,75	1,29	
10 – 11	3,07	1,46	2,24	0,55	1,07	0,30	1,06	0,27	1,30	0,42
12 – 13	2,60	0,99	3,10	1,37	1,16	0,36	1,38	0,82	1,48	0,61

Zwischen Hyperoxie und Normoxie waren keine Unterschiede in den  $T_I$ -Werten zu erkennen, die hier ermittelten Werte sind länger als bei marinen Algen (Bock, 1995; Kugel, 1988), aber kürzer als beim Menschen (Mansfield & Morris, 1982), was auf eine höhere Ionenkonzentration oder eine höhere Viskosität im Gewebe mariner Vertebraten gegenüber dem humanen Gewebe zurückzuführen ist.

## Danksagung

Herrn **Prof. Dr. Hans-Otto Pörtner** danke ich für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit am Alfred-Wegener-Institut durchzuführen, für sein stets offenes Ohr bei Fragen und Problemen und die viele Zeit, die er für deren Diskussion aufbrachte.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Ökophysiologie, die mir alle bei Fragen und Problemen immer hilfreich zur Seite standen, möchte ich ebenfalls danken, insbesondere

**Dr. Christian Bock** für seine stete kompetente Hilfsbereitschaft und die Geduld und Unermüdlichkeit, die es erforderte, einen Biologen in die physikalische Welt der Kernspinresonanz einzuführen. Für seine musikalischen Darbietungen im Labor, die Rolf Wittig und mich den Lärm des NMR-Gerätes schätzen lernen ließen, möchte ich ihm ebenfalls danken.

**Rolf Wittig**, der die Daten prozessierte und die Auswerteroutinen in *ParaVision* sowie das Macro *MergeMacLab&NMR* programmiert hat, ohne die die Auswertung einer so großen Datenmenge nicht möglich gewesen wäre. Sein Wirken als Computerbeauftragter hat mich außerdem vor dem obligaten Absturz meines Computers während der Schreibphase bewahrt.

**Dr. Angela Sommer** für den Crash-Kurs in Statistik.

**Dr. Franz-Josef Sartoris** für seine stete Diskussionsbereitschaft und seine kriminalistischen Fähigkeiten beim Aufspüren von verschollenen Literaturzitate.

Des weiteren möchte ich Herrn **Prof. Dr. Paul** an der Universität Münster danken, der mir das Anfertigen dieser externen Diplomarbeit erst möglich gemacht hat.

Den Mitgliedern der **Bogenstraßen-WG** möchte ich danken, die mir in der Zeit der Datenauswertung und des Schreibens ein Zuhause boten, in dem mir nicht die Decke auf den Kopf fiel und die mich abends durch ihre kulinarische Experimentierfreudigkeit häufig ins 'wirkliche Leben' zurückholen konnten.

Ein besonderer Dank gilt meiner **Familie**, die mich durch mein ganzes Studium hinweg moralisch und finanziell unterstützt hat.

Und zu guter Letzt geht das größte 'Danke' natürlich an **Christiane**, die viel Verständnis für meine Arbeit zeigte und geduldig so manches Wochenende mit mir im Labor verbracht hat.

**Danke!**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen Mittel und Quellen als die hier angegebenen verwendet habe.

Münster, im März 2001

---