

Akvariefisk med stort potentiale i kræftforskning

Ny forskning baseret på zebrafisk og glasmaller øger forståelsen af, hvordan blod- og kræftceller kan sprede sig fra blod til lymfekar.

Det er vigtigt for at forstå den proces, hvor kræft danner metastaser.

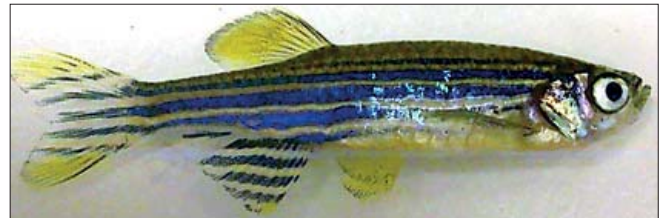
Af Lasse Dahl Ejby Jensen og John Fleng Steffensen

■ Umiddelbart vil de færreste nok tænke på almindelige akvariefisk som zebrafisk og glasmaller i forbindelse med forskning i blodkar og kræft. Disse og andre fisk har dog været brugt i biologisk og medicinsk forskning længe (se boks). For nyligt har sygdomsmodeller baseret på disse små akvariefisk vist deres store potentiale i forhold til kræftforskning. En afgørende del af sygdomsudviklingen for en kræftsygdom bliver indledt, når der lokalt i og omkring en tumor opstår iltmangel på grund af tumorcellernes store energi- og derfor iltforbrug. Det er kendt, at et sådant lokalt miljø med iltmangel er en drivende kraft bag ved tumorcellernes evne til at invadere de kar, der findes inde i selve tumoren, og derved bevæge sig bort fra den primære tumor, ud i cirkulationen og give ophav til nye tumorer andre steder i organis-

Fisk i medicinsk forskning

Inden for udviklingsbiologisk forskning og kræftforskning har specielt Medaka (*Oryzias latipes*) og Zebrafisk (*Danio rerio*) været vigtige studieobjekter for forskerne. Fisk lægger deres æg i vandet, hvor fiske-embryonet udvikler sig. Dette gør dem meget mere tilgængelige for observationer under udviklingen i forhold til pattedyr, som udvikles inde i moderens livmoder. Endvidere er fiskeæg gennemsigtige, og det er derfor muligt at følge udviklingen af samtlige væv og organer i hele fisken på en gang – fra det befrugtede æg på en-celle stadiet, til den fuldt udviklede fisk – og desuden i real-tid.

Samtidig er det enkelt at komme til fiskeembryonet/larven f.eks. i forbindelse med genetiske manipulationer, eller hvis man vil undersøge effekten af forskellige stoffer uden at påvirke



Figur 1. Voksen eksemplar af zebrafisk (*Danio rerio*) af normal "vildtype" (såkaldt AB genotype). Dette eksemplar er en (lidt mager) hun, hvilket kan ses på kropsformen, den gule rygfinne og farveløse bugfinne.

moderen. De fleste fisk danner dog farvepigmenter i løbet af deres udvikling og mister derved deres måske vigtigste fordel i forhold til mus og andre forsøgsdyr. Glasmallen (*Kryptopterus bicirrhis*) er en undtagelse, idet store dele af denne fisk forbliver gennemsigtig hele livet. Dette gør det naturligvis betragteligt lettere at udføre undersøgelser i voksne fisk – specielt undersøgelser

af dynamiske processer som transport af celler i blodet eller lymfen. Voksne zebrafisk er som de fleste andre fisk pigmenterede på størstedelen af deres krop, men deres finner forbliver relativt gennemsigtige, og disse fisk er derfor et vigtigt supplement til glasmallerne i forhold til at undersøge samspillet mellem blod- og lymfelignende kar i voksne dyremodeller.

men – den proces, der kaldes metastase.

Grunden til, at fisk er interessante i denne forbindelse er, at de i kraft af det noget lavere ilt-

niveau i vand i forhold til i luften har udviklet et mere effektivt ilt-optagningssystem end luftåndere. Dette system er også bedre gearet til at modstå situa-

tioner, hvor ilt-niveauer i kortere eller længere tid er lavere end normalt (såkaldt hypoxi).

Disse egenskaber gør, at man med sygdomsmodeller baseret



Foto: Holger Knudsen

på fisk meget mere effektivt kan studere effekterne af iltmangel på både celle, organ og individniveau.

↑ *Figur 2. Voksen glasmalle (Kryptopterus bicirrhus), formodentlig vildt-fanget i Asien og derfor af ukendt alder og køn. Bemærk at fisken er så gennemsigtig, at man tydeligt kan se bladet bag fisken.*

Iltmangel i fisk og mennesker

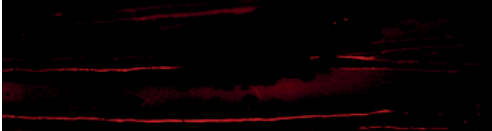
Iltmangel giver i stor udstrækning ophav til de samme biologiske reaktioner i fisk som i mennesker, både når iltmanglen er begrænset til visse dele af kroppen eller væv og når hele individet er udsat for iltmangel. Når f.eks. en del af vævet oplever lokal iltmangel sker der en umiddelbar udvidelse af blodkarrene, sådan at mere blod, og dermed mere ilt, kan ledes ind i det iltfattige område. Hvis det ikke er nok sendes der signaler til knoglemarven om at øge produktion af røde blodlegemer. Det giver blodet højere kapacitet til at transportere ilt, og desuden øges produktionen af visse vækstfaktorer, som stimulerer væksten af nye blodkar i det udsatte væv. Sidstnævnte er specielt vigtigt i forhold til at komme sig over en blodprop i hjertet eller hjernen, hvor der

Normale iltforhold

2 minutter efter injektion



4 minutter efter injektion

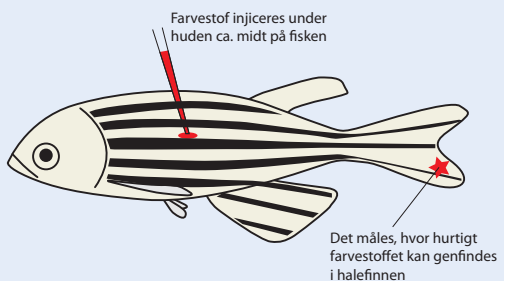
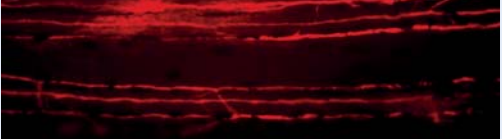


6 minutter efter injektion

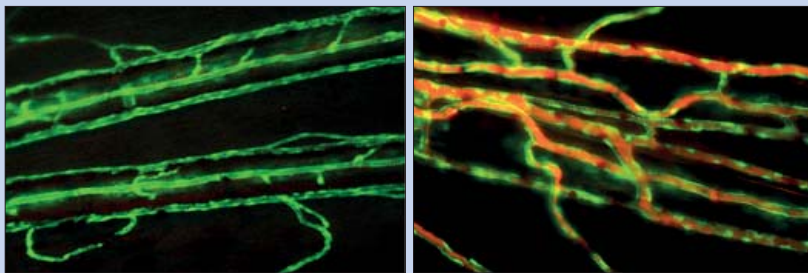


Ved iltmangel

2 minutter efter injektion



Figur 3. Lymfedræning i fisk studeres ved, at en lille mængde farve injiceres med en tynd nål under huden ca. midt på kroppen. Farven opsamles af lymfesystemet og føres først ud i halefinnen og derefter gennem caudalhjertet tilbage til blod-cirkulationen. Lymfefunktionen kan derfor måles ved at se hvor hurtigt farven kan genfindes i kar i halefinnen. Billederne viser, at der under normale iltforhold kun findes meget lidt farve i halefinnen efter 2 minutter. Efter 6 minutter er de fleste kar fyldte. Ved iltmangel går det meget hurtigere, idet alle kar er fyldte allerede efter 2 minutter.



Normale iltforhold

Et fluorescens-billede af grønne lymfelignende kar i en speciel type zebrafisk. To minutter efter injektionen i hjertet har disse kar stadig ikke optaget rød farve.

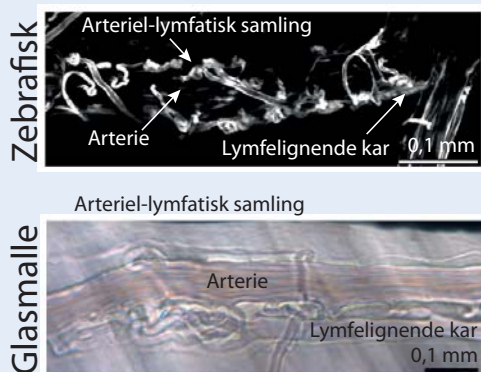
Iltmangel

Et tilsvarende billede for zebrafisk udsat for iltmangel. Man ser, at den injicerede røde farve nu er strømmet ind i alle karrene allerede to minutter efter injektionen i hjertet.

Figur 4. Blodgennemstrømning

Gennemstrømningen i lymfelignende kar kan studeres ved brug af en metode, som meget ligner den for studiet af lymfedræning (se figur 3).

I stedet for at injicere farve under huden, injicerer man i stedet direkte ind i hjertet på fisken, hvorved farven (næsten) umiddelbart fordeler sig til alle blodkar. Under normale omstrændigheder tager det lang tid for farven at passere via vævet og arterielle-lymfatiske samlinger over i lymfekarene, men dette går meget hurtigere under iltmangel. Ved forsøget her er der brugt rød farve.



Figur 5. Øverst ses et billede taget under et fluorescens-mikroskop af arterielle-lymfatiske samlinger i zebrafisk. Bemærk at de arterielle-lymfatiske samlinger har et meget snørklet, proptrækkeragtigt udseende. Nederst ses et billede af arterielle-lymfatiske samlinger i en glasmalle taget under et almindeligt mikroskop.

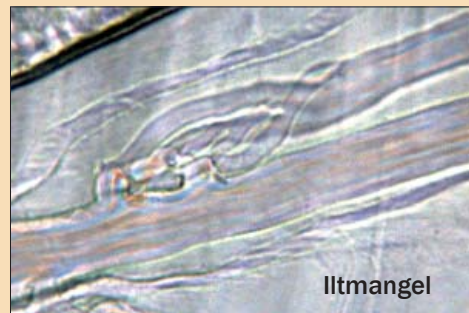
Figur 6.

Mikroskopbilleder af en arteriel-lymfatisk samling i en glasmalle under hhv. normale iltforhold og ved iltmangel. Under normale forhold er karrene proptrækkerlignende og ganske tynde.



Normale iltforhold

Ved iltmangel er karrene udvidet og har rettet sig ud. Under mikroskopet og i video-sekvenser kan man se, hvordan dette medfører kraftigt øget gennemstrømning af blod via de lymfelignende kar.



Iltmangel

akut er brug for nye blodkar i det område, hvor blodet ikke længere når hen pga. blodprop-pen.

De afgørende lymfekar

Et stort problem i forhold til at bruge fisk som sygdomsmodeller for kræft, har dog hidtil været, at man har ment, at fisk ikke har noget lymfekarsystem. Når kræft danner metastaser spiller lymfekar-systemet ofte en vigtig rolle som spredningsvej. Hvis fisk ikke har et lymfekarsystem er de derfor ikke egnede til at studere de forløb, hvor kræft danner metastaser, man normalt ser hos patienter.

Vi har dog for nylig identifi-

ceret et karsystem i fisk, som har meget store ligheder med lymfesystemet i pattedyr (se også fakta box 2). Vi har f.eks. fundet, at disse kar – præcis som det er tilfældet i mennesker – ikke under normale omstændigheder transporterer røde blodlegemer og derfor ikke ilt. Dog fandt vi, at de lymfelignende kar i fisk har direkte forbindelse til blodkar, og at der under sygdomslignende eller stressende omstændigheder så som iltmangel, begynder at flyde blod ind i de lymfelignende kar (se figur 3 og 4).

Denne proces styres af en struktur kaldet arterielle-lymfatiske-samlinger. Normalt er

disse strukturer meget tynde og kringledede og for små til at tillade passage af celler (se figur 5). Derfor er der ingen, eller kun meget få celler i de lymfelignende kar i fisk normalt – præcis som i menneskelige lymfekar. Under iltmangel udvider disse arterielle-lymfatiske-samlinger sig og retter sig ud, således at der pludselig bliver plads til, at blod let kan flyde igennem og ind i de lymfelignende kar (se figur 6). Denne proces bliver styret af et velkendt system til at regulere blodkardiameter – nemlig via nitrogenoxid (NO), som virker afslappende på glatte muskelceller i karvæggen og bevirker, at karret udvi-

des. Specifikt har vi fundet, at iltmangel medfører, at et enzym i endotelcellerne (endotel nitrogenoxid syntase) begynder at producere NO, som herefter diffunderer ud til de nærliggende glatte muskelceller. Her aktiverer NO et receptor-system, der får musklerne til at slappe af, så karret udvides (se figur 7). Denne process er meget hurtig og sker umiddelbart efter, at fisken er blevet udsat for det iltfattige miljø.

Fra blod til lymfekar

At iltmangel kan føre til, at blod bliver ledt ind i lymfesystemet, kan have stor betydning for spredning af kræftceller og dan-

nelse af metastaser. Oftest dannes metastaser først i de lokale lymfeknuder og senere i organer som lunger, lever eller knoglemarv. Da de fleste tumorer ikke har nogen lymfekar – men dog masser af blodkar – har man tidligere haft svært ved at forklare, hvorfor og hvordan tumorceller primært spreder sig til lymfeknuderne og ikke i første omgang til blodfyldte organer.

Traditionelt har man antaget, at lymfekar og blodkar ikke har nogen direkte forbindelse til hinanden. De er blevet anset for at være to adskilte kar-systemer, der kun samles det ene sted, hvor lymfen flyder tilbage til blodcirkulationen – et område, som i både pattedyr og fisk er kendt som *cuviers* passage.

De gængse kræftmodeller er baseret på mus, men her har man ikke nogen kontrol over den iltmangel-proces, som opstår i forbindelse med tumorer, og derfor har man ikke kunnet studere disse mekanismer i detaljer. Men det kan man nu i de nyligt etablerede fiske-modeller.

På baggrund af vores resultater kan man let forestille sig, at tumorceller først invaderer blodkar inde i kræftknuden og derefter spreder sig til nærliggende lymfekar gennem forbindelser mellem blod og lymfekar, som dem vi har fundet i fisk. Tilsvarende kan man tænke sig, at man ved at neutralisere NO kan blokere denne udvidelse af de arterielle-lymfatiske-samlinger og dermed forhindre, at tumorcellerne bevæger sig fra blodet over i lymfen.

Tumorceller i blodbanen er meget sårbare, og dør hurtigt, mens de omvendt klarer sig og begynder at vokse, hvis de befinder sig i lymfeknuderne, hvorfra de kan sprede sig yderligere på et senere tidspunkt. Derfor er det meget vigtigt at forhindre, at tumorcellerne spredes via lymfekarsystemet.

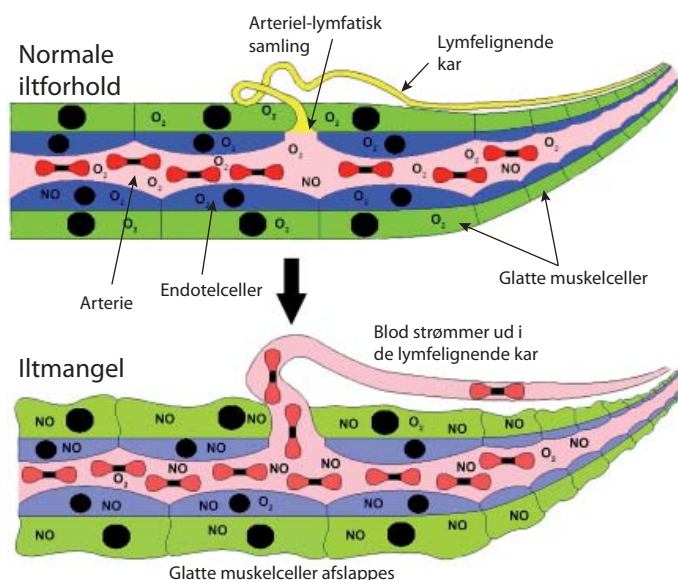
Fisk viser vejen

For nylig har flere forskningsgrupper fundet direkte forbindelser mellem blod og lymfe/lymfelignende kar i rotter. Man

Lymfekar eller ej

Boks 2. Alle landlevende hvirveldyr har et lymfesystem. Funktionen af lymfesystemet er at fjerne overflødig væske, som er trængt ud af cirkulationssystemet, samt affaldsprodukter fra vævet. Væske og affaldsstoffer ledes igennem lymfeknuderne, hvor de screenes for fremmede elementer som bakterier, og derefter pumpes væsken og affaldsstofferne tilbage til blodet.

Indtil for godt og vel 25 år siden mente man, at fisk havde et tilsvarende lymfesystem. Det er imidlertid svært entydigt at identificere lymfekar i fisk, da de metoder, man anvender til at identificere lymfekar i f.eks. mus og mennesker, i de fleste tilfælde ikke direkte kan overføres på fisk. På grund af disse problemer har man de senere år ment, at der simpelthen ikke findes et lymfesystem i fisk, men i stedet et såkaldt sekundært cirkulationssystem, og forskernes interesse for at bruge fisk i studiet af lymfekarrens fysiologi har derfor været yderst begrænset. Vi og andre har fornylig vakt nyt liv til debatten om lymfesystemet i fisk ved at bruge moderne metoder, der meget ligner dem man benytter i mus og mennesker. Vi har således identificeret en gruppe af kar som lymfe- eller i hvert fald lymfelignende kar. Disse kar er både udseende- og funktionsmæssigt lig lymfekar i mennesker.



Figur 7. Princippet i mekanismen, hvorved arterielle-lymfatiske samlinger udvider sig og tillader, at blod strømmer gennem lymfelignende kar i fisk. Når iltniveauet falder aktiveres enzymet endothel nitrogen-oxid syntase. Herved dannes nitrogenoxid (NO), som aktiverer nærliggende receptorer, som får de glatte muskelceller til at slappe af.

mener endvidere, at der under vækst af lymfe og blodkar, f.eks. i forbindelse med tumorvækst, bliver dannet og nedbrudt mange midlertidige forbindelser mellem blod og lymfekar. Det kan have betydning for vekselvirkninger imellem de to systemer, inklusive strømmen af blod ind i lymfen. Hvordan denne proces kan kontrolleres i pattedyr, og hvordan iltmangel

spiller ind, har man dog meget begrænset viden om i dag. Vores resultater i zebrafisk og glasmaller kan give en forklaring på, hvordan et sådant flow af blod ind i lymfe kan ske under iltfattige forhold.

Mere generelt viser vores resultater, at fisk er udmærkede dyremodeller til at studere kritiske elementer i sygdomme hos mennesket. ■

Om forfatterne



Lasse Dahl Ejby Jensen er post doc. i prof. Yibai Cao's gruppe ved afdelingen for Mikrobiologi, Tumor og Cellebiologi (MTC), Karolinska Institutet, Stockholm.
Tlf.: +46 8254 86299
lasse.jensen@ki.se



John Fleng Steffensen er professor mso ved Marinbiologisk Sektion, Biologisk Institut, Københavns Universitet.
Tlf.: 35321986
jfsteffensen@bio.ku.dk

Videre læsning

Jensen L. D. E. et al. (2009). Nitric oxide permits hypoxia-induced lymphatic perfusion by controlling arterial-lymphatic conduits in zebrafish and glass catfish. *Proc. Nat. Acad. Sciences U.S.A.* Volume: 106 Issue: 43 Pages: 18408-18413.

Lomholt, J. P og Steffensen, J. F. (1992) Har fisk et lymfekarsystem? *Naturens Verden*, nr. 1.

Rouhi, P, Jensen et al. (2010). Hypoxia-induced metastasis model in embryonic zebrafish. *Nature Protocols* 5 (12); 1911 - 1918.

Skov, P. V. og Steffensen, J. F. (2001). Fiskenes sekundære cirkulationssystem. *Naturens Verden*, nr 10.

Steffensen, J. F., Lomholt, J. P. and Vogel, W. (1986). *In vivo* observations on a specialized microvasculature, the primary and secondary vessels in fishes. *Acta Zoologica*. 67; 193-200.

Artiklerne kan downloades fra www.mbl.ku.dk/JFSteffensen/ *AktuelNaturvidenskab2011*