

Asphyxie-Schutz durch Schweres Wasser (D_2O)*

Deuterium-oxide protection in asphyxia

J. H. Fischer, Christina Asmuth and M. Wenzel

Institut für Experimentelle Medizin, Universität Köln, Robert Koch-Strasse 10, D-5000 Köln 41 (BRD), und Biol.-Chem. Abteilung des Pharmazeutischen Institutes der Freien Universität Berlin, D-1000 Berlin, 12. Mai 1980

Summary. In rats a 25% D_2O content of total body water was found to prolong survival time and the period of revivability in asphyxia by a better maintenance of cardiovascular function and gasp activity.

Alle biologischen Prozesse laufen in wässrigem Milieu ab. Nach der Entdeckung des schweren Wasserstoff-Isotops Deuterium und seit der Verfügbarkeit des daraus abgeleiteten Schweren Wassers (D_2O) sind viele Untersuchungen darüber vorgenommen worden, wie sich ein teilweiser Austausch des Lösungsmittels Wasser gegen D_2O auf biologische Prozesse auswirkt (vgl. Übersichten von Blake¹ und Thomson²). Hohe Konzentrationen an D_2O werden von den meisten Lebewesen nur sehr kurze Zeit toleriert, Konzentrationen bis zu 25% im Körperwasser sind jedoch auch über längere Zeit mit dem Leben vereinbar^{1,2}.

Neben zahlreichen Untersuchungen, die sich mit dem Einfluss von D_2O auf die normalen Lebensvorgänge befassten, wurde erst in jüngster Zeit der Frage nachgegangen, ob die durch D_2O hervorgerufenen Veränderungen im lebenden Organismus einen Schutz gegenüber anderen normalerweise schädlichen Einflüssen bewirken. Der Nachweis solcher Schutzeffekte gelang in verschiedenen Bereichen: sowohl gegenüber thermischer bzw. osmotischer Schädigung von Erythrocyten als auch für Herz und Leber in Ischämie³⁻⁵. Auch in unseren Untersuchungen zur hypothermen Konservierung von Leber und Niere der Ratte zeigte D_2O eine deutliche Schutzwirkung, insbesondere in Form einer Reduktion der Ödembildung im konservierten Organ⁶. In der vorliegenden Arbeit wird an Ratten untersucht, in wieweit der teilweise Austausch des Körperwassers gegen D_2O zu veränderten Überlebenschancen bei Sauerstoffmangel durch Unterbindung der äusseren Atmung (Asphyxie) führt.

Methodik. Die Untersuchungen wurden an 30 männlichen Wistar-Ratten (SPF 67 Han) durchgeführt. In Gruppe I (Körpergewicht 247 ± 35 g) wurde 10 Tieren über die Schwanzvene Ringerlösung infundiert, in Gruppe II (KG 248 ± 42 g, $n=10$) Ringerlösung mit 99% D_2O als Lösungsmittel. Das Infusionsvolumen betrug 26% des Körpergewichtes entsprechend circa 30% der Summe aus Gesamtkörperwasser (60% des KG) und Infusionsvolumen.

Die Tiere befanden sich für die Dauer der Infusion in einem durchsichtigen Kunststoffrohr von 6 cm innerem Durchmesser und auf 17 cm begrenztem Bewegungsspielraum. Direkt nach Kanülierung einer Schwanzvene mit einem Butterfly-25 Infusionsbesteck (Abbott, Sligo Irland) wurden 0,05 mg Droperidol (Dehydrobenzperidol®, Janssen Düsseldorf) appliziert. Die Dauerinfusion wurde mit einer Geschwindigkeit von 6 ml/h durchgeführt (Perfusor, Braun Melsungen), die mittlere Infusionsdauer betrug 11 h. Es wurden immer Tiere der Gruppen I und II gleichzeitig infundiert.

Einen Tag nach der Infusion wurden die Tiere der Gruppen I und II sowie einer Kontrollgruppe (III) ohne vorherige Infusion durch Applikation von Urethan (1,5 g/kg) narkotisiert. Die Tiere wurden in Rückenlage tracheotomiert und die rechte a. carotis mit einem feinen Polyäthylenkatheter kanüliert. Sie lagen während des gesamten Versuches auf einem thermostatisierten Operationstisch (37 °C), die Körpertemperatur wurde mit einer rektal eingebrachten Thermosonde (Ellab, Kopenhagen) kontrolliert. Der arterielle Blutdruck wurde über den in die a. carotis eingeleg-

ten Katheter mit einem Statham-Druckaufnehmer (P 23 Db) und eine Messbrücke (Hellige, Freiburg i. Br.), die Herzfrequenz über peripher eingestochene EKG-Elektroden und einen EKA-Puls (Sachs, Freiburg i. Br.) registriert und die Werte fortlaufend mit Kompensationsschreibern (Kipp & Zonen BD 8) aufgezeichnet.

Nach einer 5-min Kontrollperiode im Anschluss an das operative Vorgehen wurde eine Asphyxie durch Verschluss der Trachealkanüle herbeigeführt. Hierbei wurde die Kanüle über einen Kunststoffkatheter mit einem Statham-Druckaufnehmer verbunden, so dass die Aktivität der Atemmuskulatur an Hand des in den Atemwegen entstehenden Unterdrucks gemessen und auf einem Kompensationsschreiber kontinuierlich aufgezeichnet werden konnte.

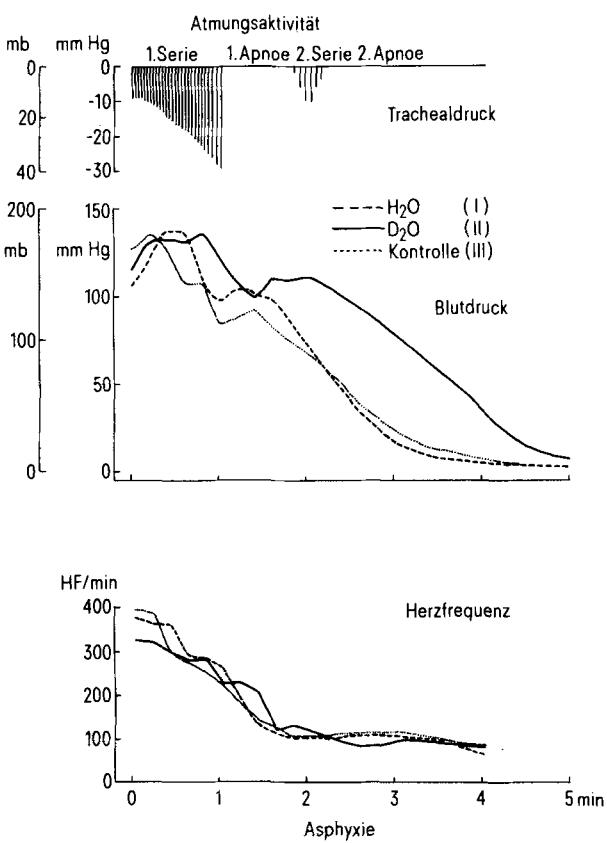


Abb. 1. Trachealdruck, Blutdruck und Herzfrequenz bei Ratten während einer Asphyxie (Körpertemperatur 36–37 °C). Blutdruck und Herzfrequenzveränderungen sind in Form der Mittelwertskurven der Gruppen I, II und III wiedergegeben, die typischen Veränderungen des Trachealdrucks sind an einem Beispiel demonstriert, das dem Mittelwert der Gruppe III entspricht (vgl. Text).

Nach Beendigung der Versuche wurde den Tieren der Gruppe II je eine Gewebeprobe aus Leber und Skelettmuskulatur mit der Frierstopmethode⁷ – d.h. Einfrieren in flüssigem Sauerstoff zwischen vorgekühlten Metallplatten – entnommen und der D₂O-Gehalt durch Gefrierdestillation und NMR-Messung bestimmt.

Alle Werte werden als Mittelwerte \pm SD der Einzelwerte angegeben. Die Signifikanzberechnungen wurden mit dem Student-Test durchgeführt (zweiseitig, ungepaart). Unterschiede zwischen den Messwerten der 3 Versuchsgruppen wurden bei einem $p < 0,05$ als signifikant betrachtet.

Ergebnisse. Der D₂O-Gehalt in dem Gewebswasser der Tiere der Versuchsgruppe II betrug zur Zeit der Asphyxie 24,1 \pm 2,9%. Die Anreicherung des Körperwassers mit D₂O wurde dank ausgiebiger Diurese der Versuchstiere unter der Dauerinfusion ohne starke Flüssigkeitseinlagerung ins Gewebe der Ratten erreicht. So betrug der Körperfrequenzanstieg zwischen Beginn und Ende der Dauerinfusion 0,8 \pm 3,6% in Gruppe I (H₂O-Ringer Infusion) und 2,9 \pm 2,6% in Gruppe II (D₂O-Ringer Infusion) bei Infusion einer Flüssigkeitsmenge von 26% des Körperfrequenzes.

Abbildung 1 zeigt den typischen zeitlichen Verlauf der registrierten Parameter Trachealdruck, Blutdruck und Herzfrequenz. Die Körpertemperatur während der Asphyxie betrug in allen 3 Gruppen 36–37°C.

Die Veränderungen in der Herzfrequenz waren in den 3 Versuchsgruppen nahezu identisch nach Ausgangswerten von 380 \pm 71 (Gruppe I), 329 \pm 69 (II) bzw. 398 \pm 83 (III). Die Darstellung in Abbildung 1 schliesst bereits mit der 4. Minute ab, da in der 5. Minute der Asphyxie in allen Gruppen vereinzelt Arrhythmien auftraten.

Der Blutdruck stieg zu Beginn der Asphyxie in allen 3 Gruppen leicht an (Ausgangswerte in mb: 137 \pm 20 (I), 149 \pm 9 (II), 166 \pm 24 (III)), fiel dann bei noch erhaltener Aktivität der Atemmuskulatur langsam ab, stabilisierte sich zu Beginn der 1. Apnoe kurzfristig, um dann im weiteren Verlauf kontinuierlich abzusinken (vgl. Abbildung 1).

Während in den Gruppen I und III die Blutdruckveränderungen weitgehend identisch verliefen, fand der Blutdruckabfall in Gruppe II (D₂O) langsamer statt (vgl. Abbildung 2) mit signifikant höheren Blutdruckwerten von der 2. bis zur 5. Minute der Asphyxie. Während ein Blutdruckwert von 20% des Ausgangsblutdruckes in Gruppe I im Mittel nach 183 sec und in Gruppe III nach 176 sec erreicht wurde, sank in der D₂O-Gruppe der Druck im Mittel erst nach 256 sec auf diesen Wert ab ($p < 0,001$).

Die Veränderungen des Trachealdruckes sind in Abbildung 1 an einem typischen Beispiel aus Gruppe III demonstriert. Die erste Serie von Atmungsbewegungen war in allen 3 Gruppen annähernd gleich.

In den meisten Fällen kam es nach dem 1. Atmungsstillstand zu einer 2. Aktivitäts-Phase der Atmungsmuskulatur mit einer 2. Serie von «Atmungsbewegungen». Die – am Absinken des Trachealdrucks ablesbare – Stärke dieser Atmungsbewegungen war ebenso wie ihre Dauer in den 3 Versuchsgruppen unterschiedlich. Der letzte spontane Atemzug trat in der D₂O-Gruppe nach 177 \pm 18 sec auf, in Gruppe I nur geringfügig früher nach 161 \pm 19 sec, während er in Gruppe III bereits nach 128 \pm 14 sec verzeichnet wurde.

Eine Addition aller während der 2. Serie gemessenen Trachealdrücke – als Mass für die Intensität der Atmungsaktivität während dieser 2. Phase – ergab jedoch für die D₂O-Gruppe mit 204 \pm 180 mb einen signifikant ($p < 0,01$) höheren Wert als in Gruppe I (21 \pm 17 mb). Der für die Kontrollgruppe III ermittelte Wert von 69 \pm 59 mb lag ebenfalls signifikant ($p < 0,05$) unter dem der D₂O-Gruppe.

Diskussion. Eine Asphyxie, d.h. eine Verlegung der Atemwege führt beim erwachsenen Säugetier mit normaler Körpertemperatur innerhalb weniger Minuten zum Atmungs- und Kreislaufstillstand infolge Sauerstoffmangel und Anhäufung von CO₂. Eine Wiederbelebung ist durch einfaches Entfernen des Atmungshindernisses nur möglich, so lange die Atmungsaktivität erhalten ist, d.h. bis zum letzten spontanen Atemzug, dessen Stärke zur Belüftung der Lunge ausreichend ist. Bei unreifen Neugeborenen, die einer Asphyxie gegenüber besonders resistent sind, ist die 2. Phase der Atmungsaktivität dementsprechend sehr stark ausgeprägt^{8–10}. Eine Wiederbelebung nach dem letzten spontanen Atemzug setzt eine künstliche Beatmung voraus, die so lange durchgeführt werden muss, bis eine ausreichende Atmungsaktivität wiederhergestellt ist. Eine solche Wiederbelebung durch künstliche Beatmung ist aber wiederum nur in der Toleranzzeit des Herzens möglich, d.h. solange das Herz in der Lage ist, in der Erholungszeit rechtzeitig eine ausreichende Kreislauffunktion zu gewährleisten, welche das Überleben der übrigen Organe ermöglicht^{11,12}. Zwar sind die übrigen Organe des Körpers auch nach Überschreiten der Toleranzzeit des Herzens noch alle defektfrei wiederbelebbar^{11,12}, ein Überleben des Gesamtorganismus ist aber zu diesem Zeitpunkt nur noch möglich, wenn für die Erholungszeit des Herzens der Gesamtkörper und das Herz selbst über einen künstlichen Kreislauf mit oxygeniertem Blut versorgt werden.

Als besten Indikator für das Ende der Toleranzzeit des Herzens fanden verschiedene Untersucher^{9,13–16} das Unterschreiten eines kritischen Blutdruckwertes, der für die in unseren Untersuchungen benutzte Spezies Ratte bei ca. 20% des Ausgangsblutdruckes liegt (eigene Befunde). Die

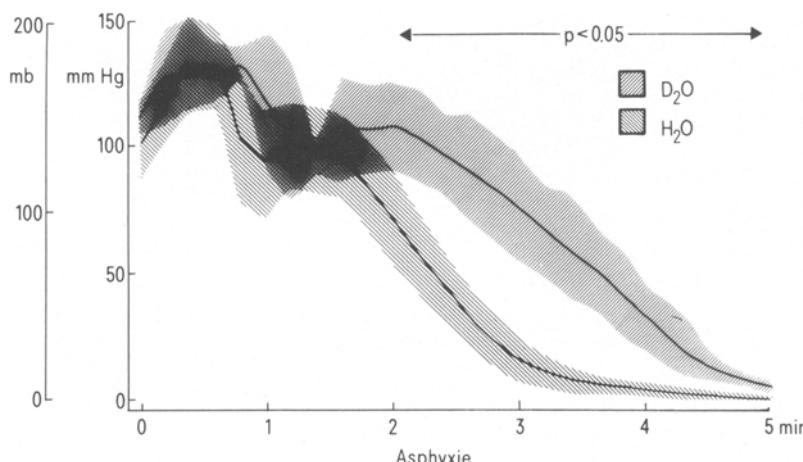


Abb. 2. Blutdruckveränderungen (Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Einzelwerte) bei Ratten der Gruppe I (H₂O, $n = 10$) und II (D₂O, $n = 10$) während Asphyxie. Die Körpertemperatur betrug 36–37°C.

Herzfrequenz oder die Erhaltung der Atmungsaktivität haben keine Beziehung zur Toleranzzeit des Herzens^{8,13,16}.

Die von uns bei Tieren mit etwa 25%igem D₂O-Gehalt des Körperwassers gefundenen Veränderungen im Blutdruck- und Atmungsverhalten in Asphyxie bedeuten somit 1. eine gegenüber den beiden Kontrollgruppen im Mittel 40-46%ige signifikante Verlängerung der Toleranzzeit des Herzens, 2. trotz nur geringfügiger zeitlicher Verschiebung des letzten spontanen Atemzugs bis zuletzt bessere Voraussetzungen für eine spontane Wiederbelebung durch signifikante Verstärkung der Atmungsaktivität.

Diese Effekte beruhen mit Sicherheit nicht auf einer erniedrigten Körpertemperatur (sie wurde konstant gehalten) oder Senkung der Herzarbeit. Es müssen andere durch das

D₂O ausgelöste Effekte eine Rolle spielen. Ob es sich bei der Verbesserung der myokardialen Toleranz um eine Verbesserung der anaeroben Energiebereitstellung des Herzens handelt oder um eine Verringerung des Energiebedarfs infolge einer Verringerung des Energieverbrauchs, lässt sich zur Zeit noch nicht beurteilen. Neben der D₂O-bedingten Veränderung der Wasserstoffionen-Aktivität und veränderten Enzymaktivitäten dürfte auch die Stabilisierung zellulärer Strukturen von Bedeutung sein, wie sie bei Herzen in normothermer Ischämie beschrieben wurde⁵. Ein Schutz cerebraler Strukturen vor anoxischen Schädigungen durch D₂O lässt sich zwar für das Atemzentrum an Hand der Erhaltung einer stärkeren Atmungsaktivität in der 2. Phase vermuten, für andere cerebrale Strukturen ist jedoch hierüber noch keine Aussage möglich.

* Herrn Prof. Dr. W. Isselhard zum 50. Geburtstag gewidmet.

- 1 M. Blake, H. Crespi und J. Katz, *J. pharmac. Sci.* 64, 367 (1975).
- 2 J.F. Thomson, *Biological effects of Deuterium*. Pergamon Press, Oxford 1963.
- 3 M. Wenzel, *J. clin. Chem. clin. Biochem.* 14, 185 (1976).
- 4 M. Wenzel, *Naturwissenschaften* 64, 441 (1977).
- 5 M. Wenzel, B. Hölscher, T. Günther und H.J. Merker, *J. clin. Chem. clin. Biochem.* 17, 123 (1979).
- 6 J.H. Fischer, M. Fuhs, M. Miyata, M. Wenzel und W. Isselhard, *Langenbecks Arch. Chir.*, Suppl. Chir. Forum, 129 (1980).
- 7 A. Wollenberger, O. Ristau und G. Schoffa: *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 270, 399 (1960).
- 8 J.H. Fischer, *Fortschr. Med.* 95, 1833 (1977).
- 9 S. Godfrey, *Q. Jl. exp. Physiol.* 53, 97 (1968).
- 10 W.A. Selle, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 48, 417 (1941).
- 11 J.H. Fischer und W. Isselhard, in: *Kongressband der Deutschen Gesellschaft für Anästhesie und Wiederbelebung*, p. 82. Perimed Verlag, Erlangen 1975.
- 12 M. Schneider, *Thoraxchirurgie* 6, 95 (1958).
- 13 C.R. Allen, R.S. Echols, E.A. Hoefflich, K.C. O'Neal und H.C. Slocum, *Anesthesiology* 8, 601 (1947).
- 14 W. Isselhard, *Acta anaesth. scand.*, Suppl. 24, 203 (1968).
- 15 H.G. Swann und M. Brucer, *Texas Rep. Biol. Med.* 7, 593 (1949).
- 16 H.G. Swann und M. Brucer, *Texas Rep. Biol. Med.* 9, 180 (1951).

Amino acid absorption in jejunum and ileum in vivo – a kinetic comparison of function on surface area and regional bases

M.A. Mitchell¹ and R.J. Levin

Department of Physiology, University of Sheffield, Sheffield S10 2TN (England), 22 July 1980

Summary. Maximum absorptive capacities (V_{max}) for the jejunum and ileum corrected for the presence of an unstirred layer of water have been calculated for glycine, valine and methionine *in vivo* in fowls per unit surface area and per region. V_{max} per cm² showed that ileal enterocytes had a greater absorbing capacity than jejunum for glycine and valine but not for methionine. V_{max} for glycine and valine, calculated for the whole jejunum and ileum, however, were not different but for methionine the jejunal value was 1.9 times greater than the ileal.

Materials and methods. Female chickens (450–550 g) were anaesthetized with halothane. A 20-cm segment of either jejunum or ileum was exteriorized and perfused with a solution containing ¹⁴C-labelled glycine, valine or methionine over a range of concentrations. The absorption of the amino acids was measured as luminal loss per 15 min and was corrected for a linear non-saturating component and calculated per 10-cm length of intestine and per cm² of surface area. The latter was assessed from measurements of the dimensions of villi obtained from upper and lower small intestine. The absorption data were then subjected to kinetic analysis to estimate the 'apparent' maximum absorptive capacities (V_{max}).

The total surface area available for absorption in either the whole jejunum or the whole ileum was assessed by measuring the length of the 2 intestinal regions using recognized anatomical markers and multiplying by values previously obtained for the area of 10-cm segments of the 2 regions. The absorption expressed on the different bases was corrected further for the presence of the effective unstirred layer at the surface of the absorbing epithelium by a

computer programme. This programme gives the best estimates of the kinetic parameter 'real V_{max}'². These values calculated from absorptions assessed on the different bases, were compared in upper and lower small intestine.

Results. The V_{max}'s for the 3 amino acids indicate that there are regional differences in absorptive functions but that the nature of the difference is dependent upon the structural basis used for calculation. The V_{max} for glycine, measured per cm² surface area, is significantly higher in the ileum than in the jejunum by 51% (p < 0.05) (table). Similarly, the V_{max} for valine is significantly higher in the ileum by 11% (p < 0.01). On this basis the V_{max}'s for methionine are the same in both upper and lower small intestine. The maximum absorption per sec. for the whole of the jejunum or ileum is also shown in the table. The values in the 2 regions for glycine and valine do not differ significantly whereas the value for methionine in the jejunum is almost double that in the ileum (p < 0.001).

Discussion. The difficulties in quantifying intestinal transport *in vivo* have been discussed extensively³. It is clear from the present study that interpretation of such absorp-