

Verminderter Sauerstoffverbrauch und reduzierte Atemfrequenz verursacht durch „Schweres Wasser“ (D₂O) bei Fischen

Reduced Oxygen Consumption and Reduced Opercular Movements in Fishes by Heavy Water (D₂O)

Pedro E. Haeser* und Gottfried Werner

Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Arbeitsgruppe Neurochemie, Deutschordenstraße 46, D-6000 Frankfurt/Main 71

Z. Naturforsch. **35 c**, 665–668 (1980); eingegangen am 24. Februar/10. April 1980

Opercular Movements in Fishes, Oxygen Consumption, Heavy Water (D₂O)

Fishes (*Scardinius erythrophthalmus*) have a almost 40% reduced oxygen consumption and a 18% reduced opercular movements in normal water containing 20% "heavy water" (D₂O).

Einleitung

In früheren Untersuchungen konnten wir nachweisen, daß Fische in Wasser, das 25% D₂O enthält, bessere Gedächtnisleistungen vollbringen als Kontrolltiere in normalem Brunnenwasser [1, 2]. Als Nebenfund hatten wir beobachtet, daß jene Fische, die sich in D₂O-haltigem Wasser befanden, eine verminderte Nahrungsaufnahme und einen Sedationseffekt zeigten. Es war anzunehmen, daß diese offensichtliche Reduzierung des Stoffumsatzes in einer von anderen Autoren [1, 3–5] beschriebenen Verminderung von Enzymaktivitäten begründet ist, die sich vermutlich durch die größere Stabilität der Deuterium-Bindungen im Vergleich zu den Wasserstoffbindungen in biologischen Systemen ergibt. Da nämlich bei vielen Enzymreaktionen Wasser nicht nur als Lösungsmittel, sondern auch als Reaktionspartner beteiligt ist, sollten dadurch enzymatische metabolische Vorgänge verlangsamt ablaufen.

Im Folgenden berichten wir über den schon früher beschriebenen in D₂O-haltigem Wasser reduzierten Sauerstoffverbrauch als Indikator für den Stoffwechselumsatz [6], sowie über den Einfluß von D₂O auf die Frequenz der Kiemendeckel-Atembewegung bei Rotfedern.

Material und Methoden

Für die Untersuchungen der *Atemfrequenz* verwendeten wir Rotfedern (*Scardinius erythrophthalmus*).

* Heimatanschrift: Prof. Dr. P. E. Haeser, SJ, Unisinos-Univers. do Vale do Rio dos Sinos, 93000 S. Leopoldo, R. S. Brasil.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. G. Werner.
0341-0382/80/0700-0665 \$ 01.00/0

mus) beiderlei Geschlechts mit ausgesucht annähernd gleichem Gewicht:

D₂O-Gruppe I:

17 Fische mit 1,63 g (± 0,5 g).

H₂O-Kontrollgruppe II:

18 Fische mit 1,56 g (± 0,5 g).

Das Einbringen der Fische Gruppe I in Wasser mit ca. 20% (± 3%) D₂O-Zusatz erfolgte im Durchschnitt 134 h (± 20 h) vor Versuchsbeginn. Das Normalwasser wurde aus destilliertem H₂O mit einem Salzzusatz [1] hergestellt. Die Fische erhielten ihr letztes Futter (Tetraphyl) ca. 22 h vor Beginn der Experimente. Die Versuche erfolgten wegen möglicher jahreszeitlicher Schwankungen innerhalb einer möglichst kurzen Zeitspanne: Gruppe I: 21. Januar bis 2. Februar, Gruppe II: 8. bis 18. Februar jeweils zwischen 8 und 12 Uhr. Der Fisch befand sich in einer lichtdurchlässigen Röhre aus Plexiglas (Länge 10 cm, Innendurchmesser 3,4 cm), die gleichmäßig mit ca. 16 ml Wasser/min durchströmt wurde, das vorher und während des Versuches bei 20 °C (± 0,1 °C) kontinuierlich in einem Vorratsgefäß belüftet wurde. Die Registrierung der Kiemendebewegungen erfolgte visuell unter Benützung einer Massey-Dickinson Apparatur. Sobald gelegentliche Unruhe des Fisches ein sicheres Erkennen der Kiemendeckelbewegungen verhinderte, bewirkte ein Tastendruck das Ausdrucken der zuvor registrierten Anzahl der Kiemendeckelbewegungen und der zugehörigen Beobachtungszeit, ohne daß die Beobachtung des Fisches unterbrochen werden mußte.

Für die Untersuchungen zum *Sauerstoffverbrauch* verwendeten wir ebenfalls Rotfedern:

D₂O-Gruppe III: 8 Fische mit 2,7 g (± 0,1 g)

H₂O-Gruppe IV: 10 Fische mit 2,6 g (± 0,1 g).



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Das Einbringen der Fischgruppe III in Wasser mit ca. 20% D₂O-Gehalt erfolgte ca. 20 h vor Versuchsbeginn. Das Normalwasser wurde aus destilliertem H₂O mit einem Salzzusatz [1] hergestellt. Letzte Fütterung mit Tetraphyl 16,5 h vor Versuchsbeginn. Die Experimente erfolgten für die Gruppe III vom 15. bis 22. Oktober, für die Gruppe IV vom 30. September bis 13. Oktober jeweils zwischen 8 und 12 Uhr. Die Fische befanden sich während der Experimente in einer Plexiglasröhre (Länge 13,2 cm, Innendurchmesser 3,4 cm), die durch Bekleben mit schwarzem Tesa-Band lichtundurchlässig war. Diese Meßkammer war durch ein Netz in den 10 cm langen Raum für den Fisch und in die 3 cm lange Sensorkammer unterteilt. Beide Kammern wurden gleichmäßig pro min mit 1,2 ml Wasser durchströmt (Temp. 20 °C ($\pm 0,1$ °C)). Mehrere Stunden lang vor dem Versuch und während des Versuches wurde das Wasser konstant belüftet. Nach 20–30 min Auf-

enthalt eines Fisches in dieser 120 ml fassenden Meßkammer zeigte das abfließende Wasser eine gegenüber dem zufließenden fast gleichbleibende Sauerstoffdifferenz. Die Messung erfolgte mit einem Beckmann-Fieldlab-Oxygen-Analysator, Mod. 1008. Es wurde jede Minute abgelesen und der Mittelwert während 10 min errechnet. Für jeden Fisch wurden nacheinander 6 Mittelwerte bestimmt.

Ergebnisse

In Abb. 1a sind die Mittelwerte des Sauerstoffverbrauches von Fischen in Normalwasser [1] und von Fischen in Wasser mit 20% D₂O während 6 jeweils 10 min dauernden Messungen aufgetragen. Aus diesen Meßwerten ist weiter zu ersehen, daß die Fische, im Gegensatz zu ihrer Bewegungsaktivität unmittelbar nach dem Einbringen in die Meßkammer, sich nun soweit angepaßt hatten, daß größere erregungs-

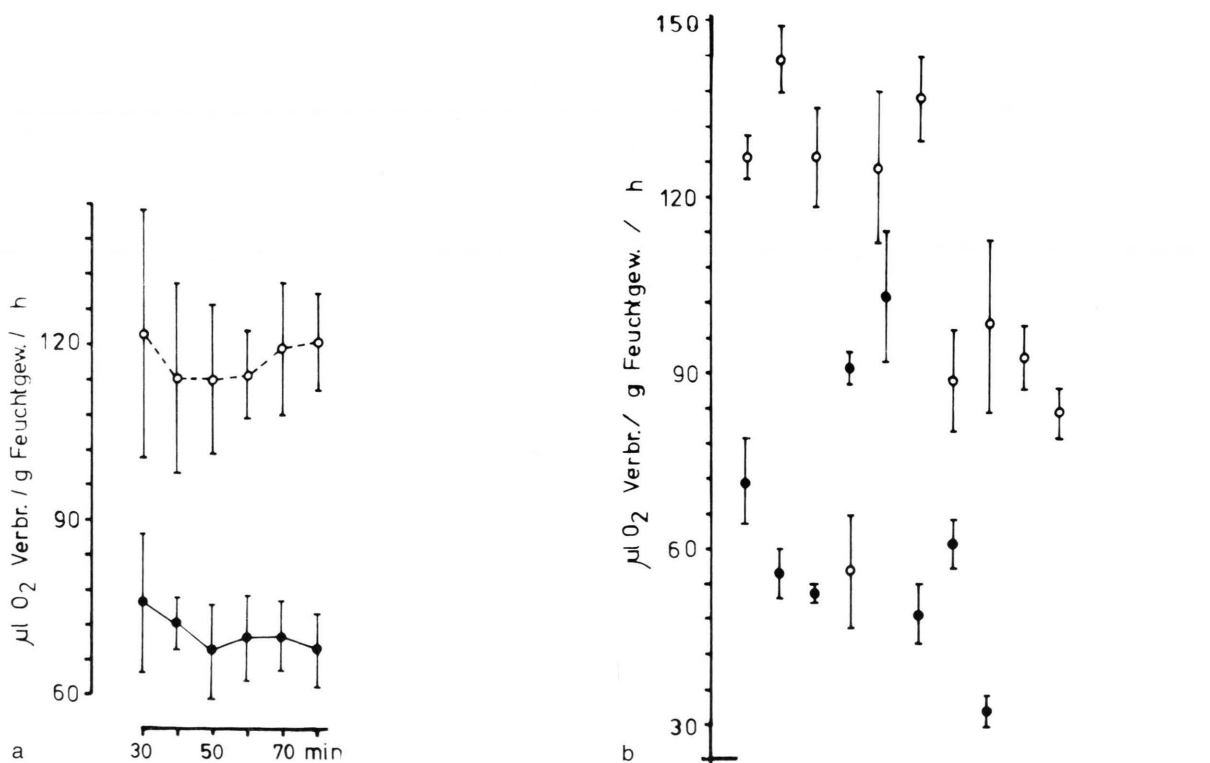


Abb. 1a, b. Sauerstoffverbrauch von Rotfedern in Normalwasser und in Wasser mit 20% D₂O-Gehalt. a) --○--: Mittelwerte (\bar{x}) von 10 Fischen in Normalwasser. —●—: Mittelwerte (\bar{x}) von 8 Fischen in Wasser mit 20% D₂O-Zusatz. Ordinate: Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen ($S\bar{x}$) des Sauerstoffverbrauches. Abszisse: Zeit nach Einsetzen der Fische in die Meßkammer. b) Mittelwerte des Sauerstoffverbrauches der einzelnen Fische in Normalwasser (—○—) und in Wasser mit 20% D₂O-Gehalt (—●—). Jeder Meßpunkt bezieht sich auf einen der 18 Fische, während einer Meßzeit von der 20. min bis zur 80. min nach dem Einsetzen in die Kammer. Ordinate: Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen ($S\bar{x}$) des Sauerstoffverbrauches. Abszisse: 18 Fische.

bedingte Schwankungen im Sauerstoffverbrauch nicht mehr auftraten. Aus den gemessenen Werten ist zu erkennen, daß die in D_2O -haltigem Wasser befindlichen Fische ($-\bullet-$) signifikant ($p \leq 0,001$) 38,7% weniger Sauerstoff verbrauchten ($69,2 \mu l (\pm 6,6) O_2/g$ Lebendgewicht/h) als jene Fische, die sich in Normalwasser ($-O-$) befanden ($117,4 \mu l (\pm 6,7) O_2/g$ Lebendgewicht/h). Weiter ist zu be-

merken, daß die Abweichungen des Sauerstoffverbrauches vom Mittelwert bei den „ D_2O -Fischen“ deutlich geringer sind als bei den „ H_2O -Fischen“. Abb. 1b zeigt die Mittelwerte des Sauerstoffverbrauchs jedes einzelnen dieser Fische. Es ist ersichtlich, daß nur zwei Fische in D_2O -haltigem Wasser einen signifikant höheren Sauerstoffverbrauch hatten als einer der Fische, der sich in Normalwasser befand.

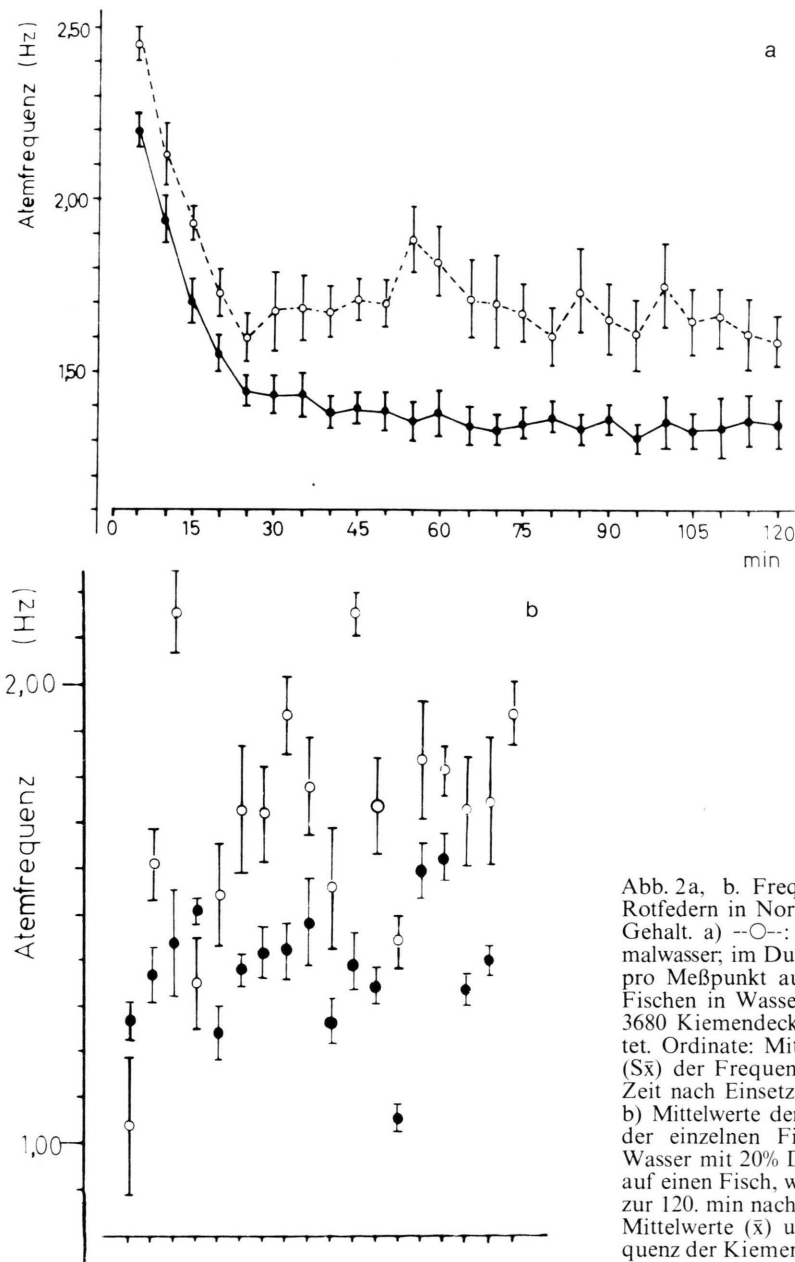


Abb. 2a, b. Frequenz der Kiemendeckelbewegung bei Rotfedern in Normalwasser und in Wasser mit 20% D_2O -Gehalt. a) $-\circ-$: Mittelwerte (\bar{x}) von 18 Fischen in Normalwasser; im Durchschnitt 4050 Kiemendeckelbewegungen pro Meßpunkt ausgewertet. $-\bullet-$: Mittelwert (\bar{x}) von 17 Fischen in Wasser mit 20% D_2O -Zusatz; im Durchschnitt 3680 Kiemendeckelbewegungen pro Meßpunkt ausgewertet. Ordinate: Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen ($S\bar{x}$) der Frequenz der Kiemendeckelbewegung. Abszisse: Zeit nach Einsetzen der Fische in die Meßkammer (min). b) Mittelwerte der Frequenz der Kiemendeckelbewegungen der einzelnen Fische in Normalwasser ($-\circ-$) und in Wasser mit 20% D_2O ($-\bullet-$). Jeder Meßpunkt bezieht sich auf einen Fisch, während einer Meßzeit von der 20. min bis zur 120. min nach dem Einsetzen in die Kammer. Ordinate: Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen ($S\bar{x}$) der Frequenz der Kiemendeckelbewegung. Abszisse: 35 Fische.

In Abb. 2a sind die Mittelwerte der Frequenz der Kiemendeckelbewegung von 18 Fischen in Normalwasser (—○—) und von 17 Fischen in D₂O-haltigem Wasser (—●—) graphisch dargestellt. Sofort nach dem Einsetzen der Fische in die Meßkammer ist diese Frequenz ca. 40% höher ($p \ll 0,0001$) als die nach ca. einer halben Stunde, wenn sich die Atmung stabilisiert hat. Dies ist sicherlich mit dem Erregungszustand durch das Umsetzen der Fische in die Meßkammer erklärlich. Die mittlere Frequenz der Kiemendeckel-Atembewegung (1,69 Hz ($\pm 0,02$)) aller jener Tiere, die sich in D₂O-haltigem Wasser befanden, blieb aber insgesamt deutlich um 18,3% unter jener mittleren Frequenz (1,38 Hz ($\pm 0,01$)) von Fischen, die in Normalwasser sich befanden; auch während der anfänglichen Erregungsphase war dies der Fall. Auffällig ist auch hier wieder, wie beim Sauerstoffverbrauch, die geringere Abweichung vom Mittelwert der Meßwerte der „D₂O-Fische“ ab der 20. min.

In Abb. 2b sind die Einzelwerte der Atemfrequenz von 18 Fischen in Normalwasser (—○—) und Wasser mit 20% D₂O (—●—) graphisch dargestellt. Die Abweichung vom Mittelwert der „H₂O-Fische“ ist wieder deutlich größer als jener Fische in Wasser mit D₂O-Zusatz.

Diskussion

Nach Zugabe von D₂O zum Aquarienwasser oder nach Gabe des Fischnarkotikums *m*-Amino-benzoesäure-äthylester-CH₃SO₃H wird der Sauerstoffverbrauch der Fische stark herabgesetzt und auch eine geringe Verminderung der Frequenz der Kiemendeckelbewegungen beobachtet. Bei geringeren Konzentrationen des Narkotikums ist die Flossenmobilität herabgesetzt, bei höheren Dosen wird diese aber

unter dem Einfluß des Narkotikums völlig paralytisiert, so daß der Fisch immobil wird und in Seitenlage zu Boden sinkt [7].

In unseren Versuchen sind die Fische sowohl in Normalwasser als auch in dem D₂O-haltigen Wasser in ihren Schwimmbewegungen durch die enge Meßkammer nahezu völlig eingeschränkt. Die Reduzierung des Sauerstoffverbrauchs kann also nicht durch eine Hypokinese bedingt sein, wenn man von der reduzierten Muskelbetätigung der Kiemendeckel absieht. Es ist daher anzunehmen, daß der D₂O-bedingte reduzierte Sauerstoffverbrauch zum größten Teil auf verminderten Stoffwechselleistungen beruht. Diese könnten verursacht sein durch die von mehreren Autoren nachgewiesene Herabsetzung der Aktivitäten verschiedener Fermente, so auch jener der Atemkette [5] unter der Einwirkung von D₂O.

Margolis *et al.* [8] haben berichtet, daß bestimmte Prozesse im mitochondrialen Energietransport durch D₂O gehemmt werden. Eine reduzierte Atmung konnte auch bei isolierten Hirnschnitten [9] und bei Pflanzen [10] gemessen werden. Mehrfach wurde berichtet, daß unter dem Einfluß von D₂O periodische Lebensvorgänge wie Herzfrequenz oder circadiane Rhythmik [11, 12] sich verlangsamen. Unter der Annahme, daß die Fische unter dem D₂O-Einfluß ihr Atemvolumen nicht reduzieren, kann man schließen, daß die Fische die durch D₂O verursachte geringere O₂-Aufnahme mit einer reduzierten Atemfrequenz auszugleichen suchen.

Der unter Einwirkung von „Schwerem Wasser“ reduzierte Sauerstoffbedarf muß sich nicht zwangsläufig schädigend auswirken, denn die Fische vermochten die hier angewandten D₂O-Konzentrationen wochenlang ohne Schaden zu überleben. Wie Wenzel *et al.* [13, 14] zeigen konnten, können Organe und Blutkonserven unter dem Einfluß von D₂O länger funktionsfähig bleiben als in H₂O.

- [1] E. Lehr, M. Wenzel u. G. Werner, *Naturwissenschaften* **57**, 521–524 (1970).
- [2] E. Lehr, M. Wenzel u. G. Werner, *Naturwissenschaften* **61**, 399–401 (1974).
- [3] J. F. Thomson, *Biological Effects of Deuterium*, Pergamon Press, 1. Aufl., Oxford, London, New York, Paris 1963.
- [4] M. K. Bhandarkar, S. Bhattacharya u. B. K. Gaur, *Z. Naturforsch.* **25 b**, 1066–1067 (1970).
- [5] H. Laser u. E. C. Slater, *Nature (London)* **187**, 1115–1117 (1960).
- [6] P. E. Haeser, E. Lehr u. G. Werner, *Naturwissenschaften* **59**, 123 (1972).
- [7] M. Wenzel, F. Meyer, E. Lehr u. G. Werner, *Naturwissenschaften* **59**, 316–317 (1972).
- [8] S. A. Margolis, H. Baum u. G. Lenaz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **25**, 133–141 (1966).
- [9] B. S. Ebstein u. D. Samuel, *J. Neurochem.* **18**, 1597–1598 (1971).
- [10] F. A. Crane, M. E. Blake, R. A. Uphaus u. J. J. Katz, *J. Pharm. Sci.* **53**, 612–616 (1964).
- [11] J. T. Enright, *Z. vergl. Physiol.* **72**, 1–16 (1971).
- [12] R. B. Suter u. K. S. Rawson, *Science* **160**, 1011–1014 (1968).
- [13] M. Wenzel, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **14**, 185–188 (1976).
- [14] M. Wenzel, B. Hölscher, T. Günther u. H. J. Merker, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **17**, 123–128 (1979).