

UTJECAJ KOBALTA NA OTPORNOST PREMA HIPOKSIJI

INES WESLEY

Institut za medicinska istraživanja Jugoslavenske akademije znanosti i umjetnosti, Zagreb

(Primljeno 20. IX. 1955.)

Istražen je utjecaj kobalta na otpornost štakora prema hipoksiji izazvanoj smanjenjem parcijalnog pritiska kisika.

Da bi se izbjegao utjecaj policitemije, koju izaziva kobalt, davan je kobalt u pojedinačnim dozama netaknutim životinjama, koje su upotrebljene samo jednom u pokusu dekompresije. Doza kobalta iznosila je 0,5 mg / 100 g težine tijela, a davana je intraperitonealno 3 min. prije prividnog »penjanja«.

Životinje, koje su dobile kobalt, živjele su na istoj visini (10.400 m) duže od kontrolnih, a isto tako su izdržale veću visinu prilikom dekompresije.

Na taj je način pokazano, da kobalt povećava otpornost prema hipoksiji pod uvjetima opisanih eksperimenata

Mnogi su autori dokazali, da kobalt izaziva izrazitu pravu policitemiju, kad se daje različitim pokusnim životinjama (1,2). Da i kod čovjeka kobalt stimulira eritropoezu, opaža se po porastu broja retikulo-cita u odnosu na zrele eritrocite u perifernoj krvi. Pored toga, kod čovjeka isto tako dolazi do trajnog, iako manjeg povećanja broja eritrocita, a srž kosti pokazuje znakove pojačane eritropoetske aktivnosti (3).

Kako slična stimulacija eritropoeze s popratnom policitemijom nastaje uvijek, kad postoji nedostatak kisika u organizmu (hipoksija), to su neki autori pokušali da usporede djelovanje hipoksije i kobalta, te mogućnosti njihova aditivnog efekta. Goodman (4) je držao kuniće 10 tjedana u atmosferi sa smanjenim parcijalnim tlakom kisika. Taj autor nije opazio, da davanje kobalta u isto vrijeme pojačava policitemiju na prividnoj visini, koja već sama po sebi stimulira stvaranje eritrocita. Čini se, da je u ovim pokusima već hipoksija izazvala maksimalnu reakciju eritropoeze, tako da je efekt kobalta ostao nezapažen. Cohn i D'Amour (5) držali su štakore na visinama od 5.300 stopa, 10.700 stopa i 14.500 stopa po 10 tjedana. Opazili su, da se kobaltom postiže jači stupanj policite-

mije, i znatnije povećanje količine hemoglobina u krvi, nego djelovanjem samo smanjenog barometarskog pritiska. Oni zaključuju, da dekompresija i kobalt aditivno stimuliraju eritropoezu. Dorrance i suradnici (6) mjerili su izdržljivost štakora za mišićni rad u atmosferi sa 6,8% kisika, pošto im je kobaltom izazvana policitemija. Ovi policitemični štakori bili su izdržljiviji od kontrolnih životinja. Van Liere i suradnici (7) ispitivali su otpornost prema hipoksiji štakora, koji su imali policitemiju izazvanu kobaltom već prije izlaganja djelovanju hipoksije. Utvrđeno je, da su policitemični štakori otporniji na 6.000 m, dok razlike u rezistenciji nema na većim visinama.

Kako su autori prije vršili pokuse sa životinjama, koje su već imale policitemiju, bilo zbog djelovanja kobalta ili hipoksije, to su uvijek ta dva faktora – kobalt i policitemija – utjecali na rezultate radova. Da bi se to izbjeglo i da bi se postigli što jednostavniji eksperimentalni uvjeti, kobalt je ovdje upotrebljen u pojedinačnim dozama i svaki put je davan netaknutim životinjama.

EKSPERIMENTALNI DIO

Kao pokusne životinje upotrebljeni su mladi bijeli štakori, oba spola, težine od 70 do 90 grama. Gladovali su 20 sati, a vagani su neposredno prije pokusa. One grupe, koje su dobile kobalt, uvijek su primale intraperitonealnom injekcijom 0,5 mg kobalta na 100 grama težine tijela, u obliku vodene otopine, koja je imala u 1 ml 2 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Kontrolne životinje dobivale su istu količinu izotonične otopine NaCl. Točno 3 minute nakon injekcije započinjalo je prividno »penjanje«. Po jedan štakor, naizmjence iz bilo koje grupe, kontrolne ili pokusne, stavljen je u komoru za dekompresiju. Ta se komora sastojala od desikatora, zapremnine 3,5 l, koji je evakuiran pomoću vakuumpumpe (Speedivac High Vacuum Pump). Desikator je bio vezan sa živinim manometrom za očitavanje dekompresije. Komora je bila stalno ventilirana, tako da je kod tlaka od 150 mm Hg u komori i temperature od 19°C–21°C, kroz komoru protjecalo 2,7 l/min. zraka. Brzina »penjanja« bila je konstantna i iznosila je 100 mm Hg u 1 min. Svi su pokusi izvršeni između 9 i 11 sati ujutro.

Otpornost štakora prema hipoksiji bila je određena pomoću dva kriterija: prestanak disanja u primarnoj apnoi i u sekundarnoj apnoi. Ova druga apnoa smatrana je krajem života. Obično su dva promatrača, posebno svaki svojim kronometrom, mjerili trajanje disanja do prve apnoe kao i trajanje života.

Pokusi su podijeljeni u dvije grupe. U prvoj je mjerena visina, na kojoj počinje primarna apnoa, a zatim je »penjanje« nastavljeno do smrtonosne visine (»ceiling« u američkoj literaturi), na kojoj životinje odmah ugibaju. U drugom pokusu mjereno je vrijeme do prestanka disanja, koje je nazvano trajanjem života na određenoj visini, odnosno u atmosferi s određenim parcijalnim tlakom kisika.

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati prve pokusne grupe prikazani su na *Tablici 1*. Statističkom obradom utvrđeno je, da su razlike aritmetičkih sredina visina, gdje dolazi do apnoe ili smrti, za kontrolnu i pokusnu grupu životinja signifikantne ($P < 0,001$).

Na *Tablici 2* prikazani su rezultati drugog pokusa. Razlike u srednjem trajanju života između grupe, koja je primila kobalt, i kontrolne grupe statistički su signifikantne ($P < 0,01$), ali je teško rastumačiti velike razlike u varijanci između dvije grupe. Da bi se izbjegao subjektivni utjecaj promatrača pri određivanju trenutka prestanka disanja, navedeni pokus izveden je i na drugi način. Upotrebljen je veći broj štakora i svaki od njih držan je određeno vrijeme (11 min.) na prividnoj visini od 10.400 m (*Tablica 3*). Izbrojano je zatim, koliko ima preživjelih životinja, koje su dobile kobalt, a koliko među kontrolnim životinjama. Razlika je bila statistički signifikantna (χ^2 test; razina signifikantnosti $\alpha = 0,05$).

Ovdje je, dakle, pokazano, da kobalt, u dozi od 0,5 mg na 100 grama težine tijela i pri davanju neposredno prije dekompresije, produžuje trajanje života u atmosferi siromašnoj kisikom. To bi značilo, da kobalt povećava rezistenciju životinja prema hipoksiji. Takav rezultat nije očekivan na osnovu postavljene hipoteze o inhibitornom djelovanju kobalta na disanje tkiva, u prilog kojoj govore rezultati mnogih istraživača (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19). Ako kobalt već sam po sebi iziziva hipoksiju u tkivima, onda smanjena količina kisika u atmosferi samo još pogoršava to stanje, jer manje kisika stoji na raspoloženju stanicama za njihove metaboličke potrebe. Pod takvim okolnostima morali bismo očekivati, da do smrti dolazi brže, ako je životinjama prije hipoksije dan kobalt. U ovdje prikazanim pokusima to se ne događa, već je naprotiv kobalt uvijek povećavao otpornost prema hipoksiji: životinje su dulje živjele i dostizale su veću smrtonosnu visinu.

Na osnovu danas poznatih rezultata općenito se drži, da je otpornost prema smanjenom naponu kisika u atmosferi povećana u svim onim slučajevima, kad je potrošnja kisika manja (20, 21, 22). Tako sredstva, koja djeluju umirujuće i sedativno, produžuju život u hipoksiji. Isto tako djeluju svi zahvati kao i primjena spojeva, koji smanjuju djelovanje hormona tireoideje (23), snizujući bazalnu potrošnju kisika. Razumljivo je, da takva životinja može dulje živjeti s manje kisika, nego ona, kojoj ga treba više za osnovne metaboličke procese života. Slične su prilike u ohlađenom organizmu, koji troši znatno manje kisika. Madden i suradnici (24) upoređivali su tjelesnu temperaturu i trajanje života miševa prilikom smrti utapljanjem i pokazali, da s opadanjem tjelesne temperature raste izdržljivost.

Drugi put, kojim bi se mogla povećati otpornost prema hipoksiji, sastojao bi se u omogućavanju što boljeg korišćenja kisika, koji stoji na raspoloženju organizmu. Ovdje igra ulogu adaptacija disanja i krvnog optoka, zatim povećanje kapaciteta krvi za prenošenje kisika i, najzad, oslobađanje kisika iz krvi i prijelaz u tkiva. Maksimalna adaptacija disanja i cirkulacije kao i reaktivna poliglobulija postižu se redovno kad u krvi još ima dovoljno kisika (25, 26), ali životinja ipak ugiba, jer oslobađanje kisika iz krvi ne zadovoljava potrebe organizma.

Tablica 1.
Izdružljivost šlakora u atmosferi sa smanjenim barometarskim tlakom

	Grupa I Kobalt			Grupa II NaCl			Razlika pritiska mm Hg	t	P
	Broj životinja	Visina m	Pritisak mm Hg	Broj životinja	Visina m	Pritisak mm Hg			
Prva apnoa	30	12.300	136,9 ± 2,23*	25	11.200	163,8 ± 3,64	26,9	6,30	< 0,001
Druga apnoa	30	13.500	113,7 ± 1,97	25	12.500	133,5 ± 2,74	19,8	5,86	< 0,001

* standardna pogreška

Tablica 2.
Trajanje života šlakora na visini od 11.000 m (170 mm Hg)

	Kobalt			Na Cl			Razlika	S. P.	t	P
	Broj životinja	\bar{x}	S. P.	Broj životinja	\bar{x}	S. P.				
Trajanje života	11	592,7	42,1	10	443,6	6,4	149,1	42,6	3,50	< 0,01

\bar{x} = aritmetička sredina (sec)
S. P. = standardna pogreška

Tablica 3.

Broj preživjelih štakora na visini od 10.400 m (180 mm Hg) nakon 11 min. boravka

	Kobalt	NaCl	Ukupno
Uginuli	9	17	26
Živi	20	12	32
Ukupno	29	29	58

$$\chi^2 = 4,46; P < 0,05$$

Prijelaz kisika iz krvi u stanice ovisi o razlici parcijalnog pritiska kisika u ove dvije sredine. Prenosenje kisika vrši se preko sistema respiratornih enzima. Pri adaptaciji na kroničnu dugotrajnu hipoksiju dolazi nakon određenog vremena do povećanja aktivnosti ove grupe enzima (27, 28). Nije, međutim, još ispitano, koliko promjene respiratornih enzima mogu utjecati na izdržljivost netaknute životinje prilikom prvog kratkotrajnog djelovanja hipoksije, kao što je provedeno ovdje.

Ako u svijetlu ovih činjenica promatramo utjecaj kobalta na povećanje otpornosti prema hipoksiji u opisanim pokusima, mogli bismo pretpostaviti, da kobalt djeluje na jedan od navedena tri načina. Kobalt bi mogao da smanjuje energetske potrebe kisika poput sedativa ili anti-tireoidnih spojeva. Zatim, možda, izaziva hipotermiju, a tako ohlađeni organizam trošio bi manje kisika i postajao izdržljiviji u hipoksiji. Najzad, kobalt bi djelovanjem na respiratorne enzimske sisteme omogućio bolje korišćenje kisika pod uvjetima hipoksije.

Za uređaj za dekompresiju kao i za statističku ocjenu rezultata zahvaljujem Ljerki Purec.

Literatura

1. *Caujolle, F. u. Polonovski, M.*: Exposé annuels Biochim. méd., 7 (1947) 199.
2. *Grant, W. C. and Root, W. S.*: Physiol. Rev., 32 (1952) 449.
3. *Weissbecker, L.*: Kobalt als Spurenelement und Pharmakon, Stuttgart 1950.
4. *Goodman, J.*: Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 64 (1947) 336.
5. *Cohn, E. W. and D'Amour, F. E.*: Am. J. Physiol., 166 (1951) 394.
6. *Dorrance, S. S., Thorn, G. W. et al.*: ib. 139 (1942-43) 399.
7. *Van Liere, E. J. et al.*: ib. 178 (1954) 503.
8. *Barron, A. G. and Barron, E. S. G.*: Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 35 (1936) 407.
9. *Levey, S.*: Am. J. Physiol., 158 (1949) 158.
10. *Göbell, O. und Lang, H.*: Arch. exper. Path. u. Pharmakol., 198 (1941) 70.
11. *Wesley, I.*: Arch. internat. physiol., 58 (1951) 412.
12. *Orten, J. M. and Bucchiero, M. C.*: J. Biol. Chem., 176 (1948) 961.

13. Wesley, I.: Vojno-Sanitet. Pregled (Beograd), 8 (1951) 9.
14. Levy, H., Levison, U. and Schade, A. L.: Arch. Biochem., 27 (1950) 34.
15. Euler, U. v. und Glaser, A.: Deutsche med. Wochenschr., 75 (1950) 631.
16. Wesley, I.: Arch. internat. physiol., 60 (1952) 1.
17. Burk, D., Schade, A. L. et al.: Fed. Proc., 5 (1946) 126.
18. Hearon, J., Schade, A. L. et al.: Cancer Res., 7 (1947) 713.
19. Dickens, F.: Biochem. J., 40 (1946) 145.
20. Hiestand, W. A. and Miller, H. R.: Am. J. Physiol., 142 (1944) 310.
21. Stemler, F. W., Wiebers, J. E. and Hiestand, W. A.: ib. 163 (1950) 400.
22. Binet, L., Strumza, M. U. et Wesley, I.: C. r. Acad. Sciences, 237 (1953) 859.
23. Zarrow, M. X., Hiestand, W. A. et al.: Am. J. Physiol., 167 (1951) 171.
24. Madden, R. F., Stemler, F. W. and Hiestand, W. A.: ib. 180 (1955) 121.
25. Binet, L. et Strumza, M. U.: C. R. Soc. Biol., 144 (1950) 109.
26. Van Liere, E. J.: Anoxia: its effects on the body, Chicago 1942.
27. Uanotti, A.: Schweiz. med. Wochenschr., 37/38 (1946) 899.
28. Criscuolo, D., Clark, R. T. Jr. and Mefferd, R. B., Jr.: Am. J. Physiol. 180 (1955) 215.

Summary

EFFECT OF COBALT ON RESISTANCE TO HYPOXIA IN RATS

Cobalt is known to produce true polycythemia in all species of animals thus far tested. It seemed therefore of interest to study the effect of cobalt on the resistance of animals exposed to low oxygen tension. In order to avoid the influence of the increased number of erythrocytes on the hypoxia resistance, single doses of cobalt were given to intact rats.

Cobalt was administered intraperitoneally 3 min. before exposure to decompression which was performed at a rate of 100 mm Hg in 1 min. The ambient temperature was 19°C to 21°C. The dose consisted of 0.5 mg of cobalt per 100 g of body weight, given in the form of a solution containing 2 mg of $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 1 ml.

The ceiling altitude as well as the survival at a simulated altitude of 10,400 m were measured for animals treated with cobalt and for control animals.

It has been demonstrated that cobalt increases significantly the resistance to hypoxia in both ways.

The possible mechanism of this effect is briefly discussed.

*Institute of Industrial Hygiene,
Zagreb*

*Received for publication
20. 9. 1955.*