

## **UTICAJ VISOKIH DOZA KORTIZOLA NA SINTEZU ANTITELA**

Zoran PAVLOVIĆ i Voja PAVLOVIĆ

*Klinika za hematologiju i kliničku imunologiju Kliničkog centra u Nišu*

Proučava se uticaj visokih doza kortizola na sintezu antitela. Za eksperimente se koristi 36 zamoraca muškog pola, telesne mase između 300 i 400 g, koji nisu bili ničim tretirani, a živeli su pod uobičajenim laboratorijskim uslovima i bili na normalnoj ishrani. Zamorci su podeljeni u dve grupe: kontrolna (18) i eksperimentalna (18). Sve životinje su senzibilisane BSA-albuminom. Zaključuje se da primena visokih doza kortizola kod zamoraca muškog pola izaziva supresiju sinteze antitela kako u toku primarnog tako i u toku sekundarnog humoralnog imunog odgovora.

*Cljučne reči:* visoke doze kortizola, sinteza antitela, muški zamorci

### **Uvod**

Rezultati dosadašnjih istraživanja glikokortikoida doprineli su da se razjasne mnogobrojne enigme njihove sinteze, distribucije, deponovanja i fizioloških svojstava u organizmu. Zahvaljujući ovim nalazima otkrivene su njihove uloge u metabolizmu proteina, masti, ugljenih hidrata, vode i elektrolita, a posebno u regulaciji homeostaze organizma, koja je neophodna za pravilno funkcionisanje svih procesa u organizmu.

Još su *Bench* i *Kendall* zapazili da kortikosteroidi poseduju antiinflamatorno dejstvo i da primena nefizioloških doza kortikosteroida potiskuje zapaljenjsku reakciju u tkivima izazvanu bakterijama, ili nebakterijskim agensima. Antiinflamatorno dejstvo potpomognuto je i antialergijskim i antianafilaktičkim dejstvom.

Mada su poznati mnogi tkivni, celularni i subcelularni efekti glikokortikoida, njihov precizni mehanizam antinflatarnog i imunosupresivnog efekta ni do danas nije potpuno razjašnjen.

### **Cilj istraživanja**

Imajući u vidu rezultate dosadašnjih istraživanja uticaja glikokortikoida na redistribuciju cirkulišućih limfocita, i selektivnu eliminaciju subpopulacije limfocita, koje pokazuju povećanu senzitivnost na litičke uticaje

kortikosteroida nakon njihove aktivacije, kao i uticaj na funkciju makrofaga i inhibiciju sinteze interleukina 1, nameće se činjenica da kortikosteroidi utiču na modulaciju rane faze imunog odgovora.

U želji da doprinesemo razjašnjenju delovanja egzogenog kortizola u organizmu pokušali smo da proučimo uticaj visokih doza kortizola na sintezu antitela.

### **Materijal i metod rada**

Za eksperimente smo koristili 36 zamoraca muškog pola, telesne mase između 300 i 400 g, koji nisu bili ničim tretirani, živeli pod uobičajenim laboratorijskim uslovima i bili na normalnoj isitrani. Životinje su bile podeljene u dve grupe: kontrolna grupa (18 zamoraca) i eksperimentalna grupa (18 zamoraca).

Sve životinje, obeju grupa, na početku eksperimenta, izmerene su i senzibilisane su BSA-albuminom.

#### *Imunizacija*

Imunizaciju zamoraca vršili smo BSA (bovin serum albuminom), emulgiranim tako, da se 1 mg proteina nađe u 1,0 ml rastvora. Ova doza antigena mešana je s adekvatnom količinom Freund-ovog rastvora. Od ovakve mešavine antigena i adjuvansa, po 0,05 ml, inokulisano je intradermalno (i.d.) u svaku šapu životinje ( $4 \times 0,05 = 0,2$  ml), a drugih 0,2 ml iste mešavine inokulisano je intrakutano (i.e.) i supkutano (s.c.) u dvama mestima na ušnim školjkama. Na taj način je svaka životinja, tokom primarne imunizacije dobila po 200 mikrograma BSA.

Posle 14 dana od primarne imunizacije, kod svih životinja obe grupe, vršili smo sekundarnu aplikaciju antigena, na isti način, i sa istom dozom istog antigena.

Zamorci kontrolne grupe tretirani su šest dana, 1,0 ml 1% fiziološkim rastvorom, a zamorci eksperimentalne grupe svakog dana primali su po 80 mg kortizola/kg/dan (Hidrokortizon-Hemofarm DD, 500 mg/4 ml).

Svake nedelje po tri životinje kontrolne i tri životinje eksperimentalne grupe koriscene su za dobijanje uzoraka krvi.

#### *Uzimanje krvi*

Kardijalnom punkcijom na početku oglada, kao i na kraju eksperimenta, dobijali smo uzorke krvi od zamoraca. U sterilne špricave zahvatali smo po 5,0 ml krvi. Od ove krvi uzimanje uzorak za hematološke pretrage, a ostatak krvi smo, nakon koagulacije krvi i retrakcije koaguluma, centrifugirali na 3.000 obrtaja, u toku 15 minuta. Posle centrifugiranja dekantirali smo

serum u suve, sterilne epruvete, koje su potom korišćene za laboratorijsku ekspertizu.

Iz svakog uzorka seruma određivana je koncentracija anti-BSA antitela. Iz svakog uzorka seruma radene su po tri analize. Dobijene vrednosti koncentracije antitela, za svaku grupu, i svaku nedelju eksperimentalnog perioda, prikazane su kao srednje vrednosti.

### Naši rezultati

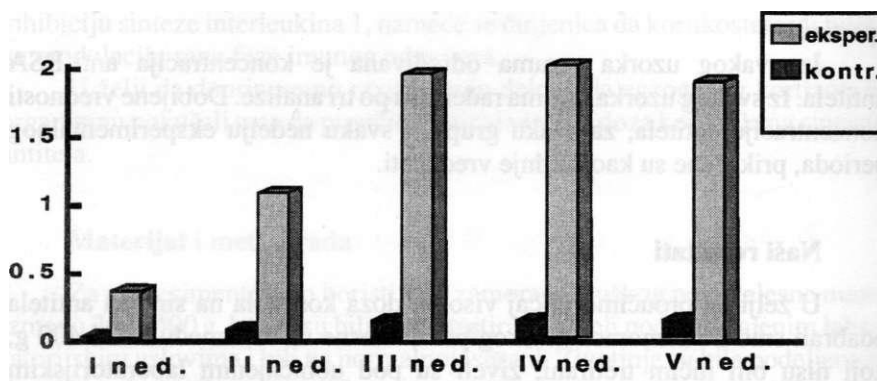
U želji da proučimo uticaj visokih doza kortizola na sintezu antitela odabrali smo 36 zamoraca muškog pola, telesne mase između 300 i 400 g, koji nisu bili ničim tretirani, živeli su pod uobičajenim laboratorijskim uslovima i bili na normalnoj ishrani. Životinje su bile podeljene u dve grupe: kontrolna grupa (18 zamoraca) i eksperimentalna grupa (18 zamoraca).

Životinje obeju grupa, na početku eksperimenta, kao i posle 14 dana, senzibilisane su BSA. Zamorci kontrolne grupe tretirani su šest dana, 1,0 ml 1% fiziološkim rastvorom, a zamorci eksperimentalne grupe svakog dana su primali po 80 mg kortizola/kg/dan. Svake nedelje po tri životinje eksperimentalne grupe i tri zamorca kontrolne grupe korišćeni su za dobijanje uzoraka krvi. Iz svakog uzorka krvi dobijan je serum u kome je određivana koncentracija anti-ovoalbuminskih antitela. Dobijene vrednosti antitela, za svaku grupu i svaku nedelju eksperimentalnog perioda, uzete su kao srednje vrednosti. Prikazali smo to na tabeli 1 i grafikonu 1.

*Tabela 1.* Efekat kortizola na sintezu anti-BSA (mg/ml)

Nedelje	Koncentracija antitela	
	Kontrolna grupa	Eksperimentalna grupa
I	0,34(±0,06)	0,022(10,03)
II	1,08(10,17)	0,074(10,02)
III	1,94(10,40)	0,130(10,04)
IV	2,0(10,20)	0,137(10,04)
V	1,88(10,01)	0,120(10,03)
VI	1,31(10,06)	0,085(10,02)

Rezultati prikazani na gornjoj tabeli i grafikonu jasno pokazuju da kod grupe životinja koje nisu svakodnevno tretirane kortizolom, koncentracija anti-BSA antitela progresivno raste posle primarne inokulacije antigena, a posebno promptno raste posle sekundarne inokulacije antigena. Najviše vrednosti zabeležene su na kraju četvrte nedelje od početka eksperimenta. Posle četvrte nedelje koncentracija antitela postepeno opada, do šeste nedelje eksperimentalnog perioda.



Grafikon 1. Efekat kortizola na sintezu anti-BSA (mg/ml)

Međutim, kod životinja eksperimentalne grupe, nivo antitela daleko je niži u toku celog perioda eksperimenta. Blag je porast koncentracije antitela posle primarne i sekundarne inokulacije antigena. Najviše vrednosti koncentracije antitela zabeležene su na kraju četvrte nedelje eksperimenta. Upoređivanjem dobijenih rezultata kontrolne grupe s rezultatima dobijenim kod životinja eksperimentalne grupe, jasno se zapaža da postoji statistički visoko značajna razlika ( $p$  manje od 0,001).

Ovi rezultati pokazuju da kontinuirana primena visokih doza kortizola izaziva supresiju sinteze antitela u toku primarnog i sekundarnog imunog odgovora.

### Diskusija

Započinjući ove oglede pošli smo od davno uočene činjenice, da postoji razlika u osetljivosti na delovanje kortikosteroida kod različitih životinjskih vrsta. Naime, za oglede smo koristili zamorce jer oni, kao i čovek i majmun, spadaju u grupu steroid-rezistentnih životinja. Zamorci su pogodniji za eksperimentalna istraživanja efekata kortikosteroida. Naša istraživanja su pokazala da nakon supkutane aplikacije kortizola dolazi do njegove brze apsorpcije i promptnog porasta nivoa serumskog kortizola. Najviše vrednosti serumskog kortizola verifikovane su u vremenskom intervalu od 12 časova od aplikacije, a potom njegova koncentracija u serumu postepeno opada do 24 časa nakon inokulacije. Međutim, i posle 24 časa, nivo serumskog kortizola viši je nego pre inokulacije, kao i da je nivo serumskog kortizola doza zavisian (*Pavlović et al., 2001*).

Nasi rezultati pokazuju da inokulacija kortizola, tri dana pre i šest dana posle primarne inokulacije antigena, izaziva supresiju sinteze anti-BSA antitela kod zamoraca. Ovi rezultati u skladu su s nalazima drugih autora. U

prilog našim nalazima idu i rezultati *Hirahare* i sar. (1994), koji su pokazali da visoke doze cirkulišućih kortikoida izazivaju involuciju timusa i redukuju njegovu težinu za 90%, kod miševa, a za 37%, kod zamoraca. Slažu se takođe i s nalazima *Gatti-a.* i sar. (1987), koji su ukazali na činjenicu da kortikoidi suprimiraju aktivnost NK ćelija, kao i s nalazima *Baybutt-a.* i *Holsboet-a* (1990), koji su ukazali na to da kortikoidi vrše supresiju proliferacije makrofaga. Prema mišljenju ovih autora, glikokortikoidi ostvaruju svoj imunosupresivni efekat preko apoptoze limfoidnih ćelija, ili oštećenjem ćelija pri njihovom prolasku kroz slezinu ili limfni čvor (*Dunn*, 1990). Međutim, ne treba izgubiti iz vida ni činjenicu da kortikosteroidi suprimiraju produkciju antitela poremećajem neke od faza u mehanizmu humoralnog imunog odgovora. Kao što je poznato, odgovor na delovanje antigena zahteva normalnu aktivnost makrofaga u fagocitozi, obradi i prezentaciji antigena imunokompetentnim B-limfocitima, a u slučajevima mnogih antigena i kolaboraciju s antigen specifičnim T-limfocitima (*Grabtree* et al., 1980).

Na koji način kortikosteroidi deluju na imunski odgovor za sada nije dovoljno razjašnjeno. Veoma je važna uloga kortikosteroida da inhibiraju produkciju velikog broja citokina, uključujući IL-1, IL-2, IL-32, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, TNFalfa i gama-interferon (*Almawi* et al., 1996; *Kunicka* et al., 1993; *Fushimi* et al., 1998). S druge strane, imunosupresivni efekat glikokortikoida uključuje involuciju timusa (*Hirahara* et al., 1994), redukciju proliferativnog odgovora T i B limfocita na delovanje mitogena (*Calvano* et al., 1982), supresiju diferencijacije i aktivnost makrofaga (*Baybautt* et al., 1990), kao i delovanje glikokortikoida na Th2 limfocite i sekreciju IL-4. Glikokortikoidi moduliraju aktivnost klase II MHC zavisnu od prisustva T helper (Th1/Th2) citokina, koji povratno mogu da deluju na glikokortikoide, kao što je IL-4, koji je glavni switching B ćelija. Glikokortikoidi uključuju sintezu IL-1, IL-6, tumor nekrosis faktor i duge kostimulatore za target ćelije i njihove aktivnosti su modifikovane pomoću glikokortikoida. TNF je inhibiran, a IL-6 je stimuliran (*Cupps* et al., 1982; *Marcel* et al., 1984; *Munck* et al., 1994; *Crousos*, 1995; *Wilckenes* et al., 1997). Ovi rezultati pokazuju da glikokortikoidi ne samo da suprimiraju produkciju citokina, već takođe indukuju produkciju citokina i povećanje njihove funkcije. Ne treba izgubiti iz vida ni delovanje glikokortikoida na produkciju transformirajućeg faktora rasta beta (TGF-beta), za koji je poznato da može biti potentan inhibitor T ćelijskih funkcija (*Batuman* et al., 1995; *Wilckensetal*, 1997).

Rezultati dosadašnjih eksperimentalnih i kliničkih studija jasno pokazuju da kortikosteroidi imaju inhibitorni efekat na humoralnu i celularnu imunost i ne inhibiraju sve imune odgovore podjednako. Ostaje evidentno da kratkotrajna aplikacija kortizola izaziva opadanje koncentracije serumskih imunoglobulina, a da periodična aplikacija visokih doza kortizola redukuje

produkciju imunoglobulina. Kontinuirana primena kortikoida redukuje nespecifičnu otpornost organizma i druge vitalne metaboličke procese, dok u isto vreme izaziva redistribuciju mononuklearnih ćelija i suprimira humoralnu i celularnu imunost.

Međutim, uprkos svakodnevnoj kliničkoj primeni kortikosteroida, i intenzivnim višegodišnjim studijama iz oblasti ove problematike, mehanizam očigledne imune supresije ostaje zasad nedovoljno razjašnjen. Smatra se da kortikoidi imaju snažnije delovanje na aktivnost prekursora ćelija, nego na plazma ćelije koje su aktivirane delovanjem antigena. Međutim, ne zna se da li ovo svojstvo poseduju svi oblici kortikoida, ili je ovaj efekat selektivan (*Levy and Waldmann, 1970*). Zbog nerazjašnjenog mehanizma supresivnog efekta kortikoida, ostaju mnoga nerešena pitanja. Naime, nejasno je kakav je efekat kortizola na primarni, a kakav na sekundarni humoralni imuni odgovor? Takođe, ostaje nejasno kakav je efekat doza odgovora, kakva je uloga vremena aplikacije kortizola i regulacije tih procesa?

Za razjašnjenje ovih imunoloških enigmi potrebna su suptilna i dugotrajna istraživanja.

## Zaključak

Primena visokih doza kortizola, kod zamoraca muškog pola, izaziva supresiju sinteze antitela kako u toku primarnog, tako i u toku sekundarnog humoralnog imunog odgovora.

## Literatura

*Baybutt, H. N. and Holsboer, F. (1990).* Inhibition of macrophage differentiation and function by Cortisol. *Endocrinology, 127*,476-480.

*Dunn, A. J. (1990).* Interleukin-1 as a stimulator of hormone secretion. *Prog. Neuroendocrin Immunol., 26*, 26-34.

*Gatti, G., Cavallo, R., Sartori, M. I., Del Ponte, D., Masera, R., Salvadori, A., Carignola, A. and Angeli, A. (1987).* Inhibition by Cortisol of human natural killer (NK) cell activity. *J. Steroid Biochem., 26*,49-48.

*Hirahara, H., Ogawa, M., Kimura, M., Liali, T., Tsuchida, M., Hanawa, H., Watanabe, H. and Abo, T. (1994).* Glucocorticoid independence of acute thymic involution induced by lymphotoxin and estrogen. *Cell Immunol., 153*, 401-411.

*Pavlović, Z. i Pavlović, V. (2001).* Uticaj kortizola na nivo serumskih imunoglobulina (u štampi).

*Segal, S., Cohen, I. R. and Feldman, M. (1972).* Thymus-derived lymphocytes: humoral and cellular reactions distinguished by hydrocortisones. *Science, 175*, 1126-1135.

*Ashwell, J. D., Frank, WMLu. and Vacchio, M. (2000).* Glucocorticoids in T cell Development and Function. *Ann. Rev. Immunol., 18*, 309-345.

*Grabtree, G. D., Munck, A. and Smith, K. A. (1980). Glucocorticoids and lymphocytes. I. Increased glucocorticoid receptor levels in antigen-stimulated lymphocytes. J. Immunol., 124, 2430-2435.*

*Almawi, W. Y., Beyhum, H. N., Rahme, A. A. and Rieder, M. J. (1996). Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. J. Leucoc. Biol., 60, 563-572.*

*Kunicka, J. E., Talle, M. A., Denhardt, G. H., Brown, M., Prince, L. A. and Goldstein, G. (1993). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of production of multiple lymphokines by in vivo administration of dexamethasone. Cell Immunol., 149, 39-49.*

*Fushimi, T., Shimura, S., Sitoh, H., Okayama, H. and Shirato, K. (1998). Suppression of gene expression and production of interleukin 13 by dexamethasone in human peripheral blood mononuclear cells. Tohoku J. Exp. Med., 98, 1577-1560.*

## INFLUENCE DE HAUTES DOSES DU CORTISOL SUR LA SYNTHÈSE DES ANTICORPS

Zoran PAVLOVIĆ et Voja PAVLOVIĆ

*Clinique pour la hematologie et l'immunologie du Centre clinique de Niš*

Les auteurs étudient l'influence de hautes doses du **Cortisol** sur la synthèse des anticorps. Pour les expériences on utilise 36 cobayes du sexe masculin, de la masse corporelle de 300 et 400 g et qui n'étaient pas traités et vivaient dans les conditions de laboratoire habituelles et dont l'alimentation était normale. Les cobayes étaient divisés en deux groupes: de contrôle (18) et expérimental (18). Tous les animaux sont sensibilisés par BSA - albumin. On conclut que l'application de hautes doses du **Cortisol** chez les cobayes du sexe masculin provoque la suppression de la synthèse des anticorps que pendant la réponse primaire aussi pendant la réponse humorale immunitaire.

*Les mots clés:* Hautes doses du **Cortisol**, synthèse des anticorps, cobayes du sexe masculin

## EFFECT OF HIGH CORTISOL DOSES UPON THE ANTIBODIES' SYNTHESIS

Zoran PAVLOVIĆ and Voja PAVLOVIĆ

*Clinic for Hematology and Clinic Immunology of the Clinic Center, Niš*

The effect of high Cortisol doses upon the antibodies' synthesis is being studied. The experiment makes use of 36 guinea-pigs of male gender, of bodily mass between 300 and 400g; they were not treated with anything; they lived under the usual laboratory conditions and were normally fed. The guinea-pigs are divided into two

groups, namely, the control (18) and the experimental (18) ones. All the animals are sensibilized with the BSA albumin. It is concluded that the high Cortisol doses application in the male guinea-pigs causes suppression of the antibodies' synthesis during both the primary and the secondary humoral immune response.

*Key words:* High Cortisol doses, antibodies' synthesis, male guinea-pigs

Autor: Mr sci Zoran Pavlović, lekar, Klinika za hematologiju i kliničku imunologiju Kliničkog centra u Nišu; kućna adresa: Niš, Georgi Dimitrova 67.

(Rad je Uredništvo primilo 17. septembra 2001. godine)