

UTICAJ GLIKOKORTIKOSTEROIDA NA NIVO KOMPLEMENTA

Zoran PAVLOVIĆ i Voja PAVLOVIĆ

Klinika za hematologiju i kliničku imunologiju Kliničkog centra u Nišu

Proučava se uticaj visokih doza kortizola na nivo ukupne hemolitičke aktivnosti komplementa i pojedinih komponenti komplementa. Za oglede se koriste zamorci muškog pola, telesne mase od 300 do 400 g, koji do tada nisu ničim tretirani. Za oglede se koriste ampule hidrokortizona (Hemofarm DD). Ukupna aktivnost komplementa određivana je testiranjem sposobnosti niza različitih razblaženja seruma zamoraca da liziraju ovčje eritrocite, koji su senzibilisani zečjim anti-eritrocitnim antitelima. Određivanje C1, C2, C3 i C4 komponente komplementa vrši se metodom kvantitativne difuzije radi jalnog tipa, koristeći partigen ploče Behringwerke AG. Serija broji 25 zamoraca muškog pola. Niske vrednosti kortizola rapidno povećavaju ukupnu hemolitičku aktivnost komplementa i koncentraciju C1 esteraze. S porastom doze kortizola progresivno opada ukupna hemolitička aktivnost komplementa, kao i C1, C2, C3 i C4 komponente komplementa.

Ključne reči: glikokortikosteroidi, ukupna aktivnost komplementa, C1, C2, C3 i C4 komponente komplementa

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 (*Ashwell et al., 2000*).

Još su *Hench i Kendall* (1949) 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 (*Gruher et al., 1994*).

Mada su poznati mnogi tkivni, celularni i subcelularni efekti glikokortikoida, njihov precizni mehanizam antiinflamatornog i imunosupresivnog efekta ni do danas nije potpuno razjašnjen (*Plotz, 1975*).

Cilj istraživanja

Imajući u vidu rezultate dosadašnjih istraživanja uticaja glik kortikoida na redistribuciju cirkulišućih limfocita, i selektivnu eliminaciju subpopulacije limfocita, koje pokazuju povećanu senzitivnost na litič 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 organizmu pokušali smo da proučimo uticaj visokih doza kortizola na ni¹ ukupne hemolitičke aktivnosti komplementa i pojedinih komponenti komplementa.

Materijal i metod rada

Životinje

Za oglede smo koristili zamorce muškog pola, telesne mase od 300 - 400 g, koji ranije nisu bili ničim tretirani, a koji su bili na uobičajenoj ishrani živeli pod normalnim laboratorijskim uslovima.

Uzimanje krvi

Kardijalnom punkcijom na početku ogleada, kao i u toku i na kraju eksperimenta, dobijali smo uzorke krvi od zamoraca. U sterilne špricewe zahvatali smo po 5,0 ml krvi. Nakon koagulacije krvi i refrakcije koagulum krv je centrifugirana na 3.000 obrtaja, u toku 15 minuta. Posle centrifugiranja dekantirali smo serum u suve, sterilne epruvete, koje su potom korišćene za laboratorijsku ekspertizu.

Aplikacija kortizola

Za oglede smo koristili ampule Hidrokortizon-Hemofarm DD (Hydn cortison a 500 mg/4 ml). Kortizol je aplikovan supkutanom inokulacijom zadnji predeo vrata.

Određivanje ukupne aktivnosti komplementa

Ukupnu aktivnost komplementa određivali smo testiranjem sposobnosti, niza različitih razblaženja seruma zamoraca, da liziraju ovčje eritrociti koji su senzibilisani zečjim anti-eritrocitnim antitelima. Jednu hemolitičku jedinicu sadrži zapremina najvećeg razblaženja komplementa, koja lizii 50% ili 100% standardizovanog broja eritrocita, u serumu zamoraca. Titar komplementa određivan je kao CH₅₀ jedinica po ml.

Određivanje C1, C2, C3 i C4 komponente komplementa

Određivanje aktivnosti ovih komponenti komplementa vršili smo metodom kvantitativne difuzije radialnog tipa, koristeći partigen ploče proizvodnje Behringwerke AG, iz Marburga, u Nemačkoj.

Naši rezultati

Kod 25 zamoraca muškog pola, telesne mase od 300 do 400 g, ranije ničim tretiranih, koji su bili na normalnoj ishrani i živeli pod uobičajenim laboratorijskim uslovima, ispitivali smo nivo ukupne hemolitičke aktivnosti komplementa, kao i nivo C1, C2, C3 i C4 komponente komplementa, nakon šestodnevne supkutane aplikacije kortizola. Sve životinje bile su podeljene u pet grupa (K, A, B, C, D). U svakoj grupi bilo je po pet zamoraca. Zamorci grupe A primali su supkutano (s.c.) po 5 mg/kg kortizola (Hidrocortison, arnp. a 500 mg/4 ml), zamorci grupe B po 20 mg/kg, zamorci grupe C po 40 mg/kg, a zamorci grupe D po 80 mg/kg kortizola. Zamorci kontrolne grupe (K) primali su po 1 ml fiziološkog rastvora dnevno.

Dve nedelje nakon šestodnevnog tretiranja životinja različitim dozama kortizola, životinje su žrtvovane, a iz dobijene krvi dekantiran je serum. U svakom uzorku seruma određivali smo nivo ukupne hemolitičke aktivnosti komplementa i nivo pojedinih njegovih komponenti. Dobijene vrednosti ukupne hemolitičke aktivnosti komplementa, kao srednje vrednosti za svaku grupu životinja, prikazane su na tabeli 1.

Tabela 1. Hemolitička aktivnost posle dve nedelje od aplikacije kortizola

Kortizol (mg/dan)	broj životinja	CH ₅₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
0	5	201.3	55.854	6.677	15.283	92.147
5	5	237.9	83.732	6.685	15.746	85.523
20	5	153.9	74.864	5.465	10.239	50.684
40	5	124.8	64.158	5.110	8.219	48.437
80	5	115.3	61.054	5.065	7.840	54.320

Rezultati, prikazani na gornjoj tabeli, pokazuju da su vrednosti CH₅₀ i vrednosti koncentracije C1 komponente komplementa, kod životinja koje su dobijale po 5 mg kortizola/kg/dan, značajno veće u odnosu na vrednosti dobijenih kod životinja kontrolne grupe. Povećanje vrednosti CH₅₀ je za 20%, a za C1 povećanje iznosa 51 %, u odnosu na ove vrednosti, verifikovane kod životinja kontrolne grupe. Vrednosti koncentracije C2 i C3 komponente komplementa nešto su veće nego što su vrednosti kod zamoraca kontrolne grupe, ali te razlike nisu statistički značajne.

U grupi zamoraca koji su dobijali po 20 mg kortizola/kg/dan vrednosti CH₅₀ bile su statistički značajno niže od vrednosti životinja kontrolne grupe

(p manje od 0,02). Koncentracije C1 komponente komplementa, kod ove grupe životinja, bile su veće, i te razlike su statistički značajne. Vrednosti ostalih komponenti komplementa bile su niže od vrednosti ovih komponenta kod životinja kontrolne grupe. Međutim, te razlike su statistički značajne ko komponenti C3 i C.4, ali nisu statistički značajne kod vrednosti C2 komponente komplementa.

S porastom aplikovane doze kortizola (40 i 80 mg) verifikovan je progresivni pad ukupne hemolitičke aktivnosti komplementa, C1, C2, C3 i C4 komponente. Najviše vrednosti dobijene su primenom doze od 5 m kortizola/dan, a najniže dobijene su primenom doze od 80 mg kortizola/dan. Ovaj progresivni pad stabilizira se posle 14 dana, kada dostiže najnižu vrednosti, a potom se postepeno vraća na normalne vrednosti.

Diskusija

Interesantni su rezultati proučavanja delovanja različitih doza kortizol na ukupnu hemolitičku aktivnost komplementa i pojedinih njegovih komponenti. Najveći porast ukupne hemolitičke aktivnosti komplementa i C1 komponente komplementa zapažaju se kod zamoraca koji su primali po pet mg kortizola na kilogram telesne težine dnevno. S porastom doze datog kortizola progresivno opada vrednost ukupne hemolitičke aktivnosti komplementa, kao i vrednosti ispitivanih komponenti (*Thompson et al.*, 1974).

Rezultati naših istraživanja u skladu su sa rezultatima *Cciren-a* i *Rosenberg-A* (1996), koji su ukazali na činjenicu da supkutana aplikacija 10 m; hidrokoitizona kod miševa dovodi do pada vrednosti CH_{50} , aproksimativne oko 20% od normalnih vrednosti. Ovi autori, takođe, su pokazali d; povećanje doze hidrokortizona dovodi do smrti životinja. Međutim, ako životinje prežive, vrednost CH_{50} vraća se na normalu posle sedam do devet nedelja. *Baltch et al.* (1996) pokazali su da kod psa, koji je primio 12 mg/kg/dan kortizon acetata, dolazi do pada vrednosti CH_{50} , za jednu trećinu. Poznato je da kortizon-senzitivne životinjske vrste, kao što su miševi, pacovi i zečevi, nisu pogodne za ovakvu vrstu ispitivanja. Pod dejstvom kortizona oni gube na težini, razvija se atrofija slezine, nastaje negativni azotni bilans s opadanjem nivoa gama-globulina i signifikantno je visok mortalitet (*She well et al.*, 1956). Za razliku od ovih životinja, zamorci su pogodni za ovakve eksperimente, jer su oni steroid-rezistentni i tolerišu 50 mg/kg/dan kortizona. Nisu zapažene značajne promene u težini crevnog trakta, slezine, zatim promene u ukupnim proteinima, kod zamoraca koji su dve nedelje tretiran s 100 mg/kg/dan, u odnosu na vrednosti dobijene kod životinja, tretirani fiziološkim rastvorom. Zato su oni pogodni za ovaj tip eksperimenta.

Ovi rezultati pokazuju da male doze kortizona izazivaju povećanje CH_{50} i C1 hemolizni titar, što bi, zajedno s porastom nivoa serumskog kortizona u toku akutnih inflamatornih procesa, mogao biti stimulus koji

DD). L'activite totale du complement est determinee par le test de la capacite d'une serie de divers dissolvants du serum du cobaye pour diviser les érythrocytes des moutons qui sont sensibilises par les anticorps d'erythrocytes du lapin. La determination C1, C2, C3 et C4 des composants du complement est faite par la methode de diffusion quantitative du type radial en utilisant des plaques partigen de Behringwerke AG. La serie compte 25 cobayes du sexe masculin. Les bas valeurs du cortisol augmentent rapidement l'activite totale hemolytique du complement et de la concentration C1 de l'esterase. Avec l'accroissement de la dose du cortisol baisse progressivement l'activite totale hemolytique des complements, ainsi que C1, C2, C3 et C4 composants du complement.

Les mots clés: Glycocorticosteroides, activite totale du complement, C1, C2, C3 et C4 composants du complement

GLUCOCORTICOSTEROIDS' EFFECT UPON THE COMPLEMENT LEVEL

Zoran PAVLOVIĆ and Voja PAVLOVIĆ

Clinic for Hematology and Clinic Immunology of the Clinic Center, Nis

The effect of high doses of cortisol upon the level of the overall complements' hemolytic activity and particular complements' components is studied. The experiments involved guinea pigs of male sex of the body mass from 300 to 400 g, namely those that have not been treated by anything so far. The doses of hydrocortisone (Hemofarm DD) were also used for the experiment. The overall complements' activity was determined by testing the capabilities of a series of various solutions of the guinea pigs' serum to separate sheep erythrocytes that were made sensitive by rabbit anti-erythrocyte antibodies. The determination of the C1, C2, C3 and C4 complements' components was done by the method of the quantitative diffusion of the radial type by using the Partigen blocks Behringwerke AG. The series comprised 25 guinea pigs of male sex. The low cortisol level rapidly increases the overall hemolytic activity of the complements of the C1 esterase concentration. Along with the cortisol dose increase the overall hemolytic complements' activity is dropping as well as that of the C1, C2, C3 and C4 complements' components.

Key words: Glycocorticosteroids, overall complements' components, C1, C2, C3 and C4 complements' components

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

(Rad je Uredništvo primilo 12. februara 2001. godine)