



Povezanost kortizola i drugih krvnih parametara kod miševa u akutnom stresu

Nemanja Obradović^a, Branislava Belić^b, Marko R. Cincović^{b*}, Mira Majkić^b

^aPasterov zavod Novi Sad, Hajduk Veljkova 1, 21000 Novi Sad, Srbija

^bUniverzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Laboratorija za patološku fiziologiju, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Srbija

*Autor za kontakt: mcincovic@gmail.com

SAŽETAK

Stres je zbir uticaja različitih spoljašnjih i unutrašnjih faktora, koji oštećuju ili mogu naneti štetu organizmu, a imaju moć da pokrenu hipotalamo-hipofizo-nadbubrežnu osu, što dovodi do povećanog lučenja kortizola, sa posledičnim promenama u metabolizmu energije, organskih i neorganskih materija u organizmu, kao i u imunološkom sistemu u cilju održavanja homeostaze organizma i savladavanja negativnih efekata. Cilj ovog rada je da se utvrdi povezanost krvnih parametara sa vrednostima kortizola kod miševa izloženih akutnom imunološkom stresu posle aplikacije virusa besnila standardnog soja (CVS27) tokom testa potencije vakcine. Veliki broj ispitivanih krvnih parametara pokazuje veoma značajnu linearnu povezanost sa vrednostima kortizola ($p < 0,01$) i to su: glukoza, holesterol, laktat dehidrogenaza (LDH), aspartat aminotransferaza (AST), kreatin kinaza (CK), urea, kreatinin, laktat, neesterifikovane masne kiseline (NEFA), betahidroksibutirat (BHB), albumin, lipaza, granulociti, eritrociti, hemoglobin, insulin, homeostatski model insulinske rezistencije (HOMAIR) i kvantitativni indeks insulinske senzitivnosti (QUICKI). Parametri kao što su hematokrit i srednja zapremina trombocita (MPV) su značajno povezani ($p < 0,05$). Parametri kao što su Mg i limfociti ne pokazuju statistički značajnu linearnu povezanost sa koncentracijom kortizola ($p > 0,05$). Akutni stres dovodi do ubrzanja metaboličkog odgovora, katabolizma, insulinske rezistencije i povećanje aktivnosti enzima u krvi. Iako je kortikosteron smatran glavnim glukokortikoidom koji odgovara na stres kod glodara, povezanost kortizola sa metaboličkim parametrima u akutnom stresu ukazuje da je ovaj glukokortikoid neizostavan u proceni stresnog odgovora kod ovih vrsta laboratorijskih životinja.

KLJUČNE REČI: stres, krvni parametri, miševi, kortizol

Uvod

Stres je zbir uticaja različitih spoljašnjih i unutrašnjih faktora, koji oštećuju ili mogu naneti štetu organizmu, a imaju moć da pokrenu lučenje adenokortikotropnog hormona (ACTH), koji će dovesti do aktiviranja nadbubrega i lučenja kortizola, a sve zajedno će dovesti do značajnih promena u metabolizmu energije, organskih i neorganskih materija u organizmu, kao i u imunološkom sistemu u cilju održavanja homeostaze organizma. Nadbubrežna žlezda predstavlja centralni organ adaptacije na stres životinja (Hristov i Bešlin, 1991, Tan i Yip, 2018).

Schutsky i sar. (2014) su prikazali sistemski efekat virusa besnila u vidu povećane koncentracije kortikosterona u krvi, koji je zabeležen pre ispoljavanja opštih simptoma i gubitka telesne težine. U stresnom odgovoru kod glodara dugo se smatralo da je kortikosteron glavni glukokortikoid u stresnom odgovoru (Gong i sar., 2015). Povećana koncentracija kortikosterona može imati imunosupresivno dejstvo, a isti autori sugerišu da blokiranje hipotalamo-hipofizo-nadbubrežne osovine može uticati povoljno na patogenezu besnila. Kortikosteron se smatra glavnim glukokortikoidom, koji odgovara na stres kod glodara. Međutim, rezultati istraživanja su nedvosmisleno potvrdili da i kortizol ima sličnu reaktivnost, ali i neke specifičnosti u odnosu na kortikosteron. Efekti nekih stresora kao što su estrusne faze ciklusa, cirkadijskog ritma i akutnih i hroničnih (ponovljenih ili nepredvidivih) stresora različite težine na dinamiku i korelaciju serumskog kortizola i kortikosterona kod miševa. Nađena je značajna i snažna korelacija između serumskog kortizola i kortikosterona u toku celog estrusnog ciklusa, tokom celog dana, i tokom akutnih ili ponovljenih stresora, hroničnog nepredvidivog stresa i akutnog prisilnog plivanja ili toplotnog stresa. Oba hormona su se povećala na najviši nivo 1. dana ponovljenog uzdržavanja ili nepredvidivog stresa, ali nakon toga, iako se koncentracija kortizola nije menjala, koncentracija kortikosterona pokazala je drugačiju dinamiku. Naime, kortikosteron je značajno opadao tokom ponovljenih ograničenja, ostao je na visokom nivou tokom nepredvidivog stresa. Na osnovu svih dobijenih rezultata zaključeno je da su kortizol i kortikosteron u značajnoj vezi prilikom formiranja stresnog odgovora, ali bi se kortikosteron više mogao vezati za proces adaptacije na stres, a kortizol je brže reagovao od kortikosterona tokom jakog akutnog stresa.

Virus besnila može izazvati imunološki odgovor, koji može pokrenuti stresnu osovinu, pa zbog toga virus besnila predstavlja dobar model za izučavanje imunološkog stresa. Inflamacija predstavlja najznačajniji most koji spaja stresni odgovor i različite stresom indukovane bolesti (Liu i sar., 2017; Hicks i sar., 2012). Vakcine protiv besnila se daju bilo pre, bilo posle ekspozicije virusu besnila u cilju zaštite od letalnog ishoda. Vakcine izazivaju celularni i humoralni imunološki odgovor. Da bi jedna vakcina mogla da bude korišćena potrebno je prema trenutnim standardima da prođe test potencije vakcine poznatiji kao NIH test. Ovaj test se izvodi tako što se aplikuje standardna vakcina i vakcina proizvođača u različitim koncentracijama posle čega se laboratorijski miševi izlažu standardnim sojevima virusa besnila i ispituje se procenat uginulih miševa da bi se odredila adekvatna doza vakcine (Servat i sar., 2012; Toinon i sar., 2019). Danas se razvijaju i novi in vitro testovi kojim bi se smanjio broj životinja, a u duhu očuvanja dobrobiti životinja (Stankov i sar., 2020).

Cilj ovog rada je da se utvrdi povezanost krvnih parametara sa vrednostima kortizola kod miševa izloženih akutnom imunološkom stresu posle aplikacije virusa besnila standardnog soja CVS27 tokom testa potencije vakcine.

Materijal i metode

Miševi i izazivanje imunološkog stresa – Akutni stres je izazvan aplikacijom virusa besnila tokom NIH testa potencije vaccine, koji je vršen u Pasterovom zavodu u Novom Sadu. Testom se određuje nivo zaštite, koju pruža (indukuje) inaktivisana vakcina protiv besnila. Test se izvodi vakcinacijom dve grupe miševa, u razmaku od 7 (sedam) dana, sa različitim razređenjima standard vakcine i vakcine čija se potentnost ispituje. Sedam dana nakon poslednje vakcinacije imunizovanim životinjama i kontrolnoj grupi miševa se inokuliše (inficiraju se) test virusom (Challenge Virus Standard, soj CVS27). U ogled je uključeno 60 jedinki.

Određivanje hematoloških parametara – Iz uzoraka krvi određena je kompletna krvna slika, koja uključuje broj belih krvnih zrnaca (WBC) uz diferencijalnu leukocitarnu formulu (Ly- limfociti, Gr- granulociti, Mo- monociti, Eo- eozinofili), crvenih krvnih zrnaca (RBC), hematokrit (HCT), koncentraciju hemoglobina (HGB), srednju zapreminu eritrocita (MCV), srednju koncentraciju hemoglobina po eritrocitu (MCH), srednju koncentraciju hemoglobina u jedinici zapremine (MCHC) i broj trombocita (PLT). Analiza je urađena najkasnije u roku od jednog sata nakon uzorkovanja krvi. Analize su urađene na hematološkom brojaču Nihon Kohden Celltac MEK-6550 (Japan).

Određivanje biohemijskih parametara – Biohemijski parametri su određivani nakon centrifugiranja uzoraka iz druge erpruvete, koja je sadržala klot aktivator najviše sat vremena nakon venepunkcije. Uzorak je prvo centrifugiran na 6000 obrtaja u trajanju od 6 minuta u centrifugi Hettich zentrifugen EBA 200. Nakon centrifugiranja, odvojen je serum i analiziran na spektrofotometrijskom automatskom biohemijskom analizatoru marke Rayto Chemray 120Vet (Kina). Reagensi koji su upotrebljavani pri svakoj analizi su pripadali proizvođaču Biosystems (Španija). Određeni su sledeći parametri: glukoza (Glu), kreatinin (Creat), urea, aspartat aminotransferaza (AST), alanil aminotransferaza (ALT), alkalna fosfataza (AP), gama glutamil transferaza (GGT), albumin (Alb), ukupni proteini (TP), globulini (Glob), ukupni bilirubin (Tbil), kalcijum (Ca), magnezijum (Mg), fosfor (P), trigliceridi (TGC), lipaza, alfa amilaza, laktat i pCO₂, NEFA i BHB izraženi u standardnim jedinicama.

Određivanje endokrinoloških parametara – Koncentracija hormona insulina i kortizola određena je iz seruma. Za određivanje koncentracije navedenih parametara upotrebljen je aparat TOSOH AIA-360 (Japan).

Statistička analiza – Ispitivanje povezanost kortizola sa drugim krvnim parametrima ispitano je određivanjem Pirsonovog koeficijenta korelacije i linearnom regresionom analizom. Korišćen je statistički paket SPSS (IBM, USA).

Rezultati i diskusija

Koncentracija kortizola je bila značajno viša kod laboratorijskih miševa posle izazivanja akutnog stresa aplikacijom virusa besnila u odnosu na negativnu kontrolu. Veliki broj ispitivanih krvnih parametara pokazuje veoma značajnu linearnu povezanost sa vrednostima kortizola ($p < 0,01$) i to su: glukoza, hoelsterol, LDH, AST, CK, urea, kreatinin, laktat, NEFA, BHB, albumin, lipaza, granulociti, eritrociti, hemoglonin, insulin, HOMAIR i QUICKI. Parametri kao što su hematokrit i MPV su značajno povezani ($p < 0,05$). Parametri kao što su Mg i limfociti ne pokazuju statistički značajnu linearnu povezanost sa koncentracijom kortizola ($p > 0,05$).

Kortizol kao hormon stresa samostalno ili u sadejstvu sa drugim hormonima stresa značajno utiče i na biohemijske parametre krvi (Hermansen i Hyttel, 1971; Eigler i sar., 1979; Pierzchala i sar, 1985;

Niezgoda i sar., 1987; Yamada i sar., 1993; Marquez i sar., 2004; Harizi i sar., 2007). Smatra se da glikemija nije najupečatljiviji pokazatelj prisustva, jačine i trajanja stresne reakcije. Razlog je taj što se koncentracija glukoze brzo menja sa uticajem stresa, kada posle brzog porasta postoji i vraćanje glikemije na početnu koncentraciju, a ako je stres povezan sa nekim metaboličkim komplikacijama ili gladovanjem, glikemija može pasti i ispod referentnih vrednosti. Iako su glukokortikoidi glavni medijatori stresa, dugotrajniji uticaj stresa na glikemiju postiže se zajedničkim delovanjem sa kateholaminima, insulinom, glukagonom i drugim hormonima. Epinefrin povećava glikemiju povećavajući glukoneogenezu u jetri, kao i glikogenolizu. Porast glikemije se odvija i kroz mobilizaciju aminokiselina pod dejstvom glukokortikoida, koji dalje stimulišu njgovu upotrebu za konverziju u glukozu uz razvoj insulinske rezistencije. Stres stimuliše lučenje glukagona, koji je glavni kontraregulatorni hormone insulinu. Glukagon pretvara glikogen iz hepatocita u glukozu, koja potom odlazi u krvotok. Da bi došlo do značajnog porasta glukoze, potrebno je da dođe do povećanja više od jednog hormona, koji je u vezi sa stresnim odgovorom. U jednom ogledu je vršena aplikacija epinefrina, glukagona ili kortizola odvojeno i dobijena su minimalna i prolazna odstupanja u vrednosti glikemije. Međutim, prilikom njihove zajedničke aplikacije dovodi do značajnog i kontinuiranog povećanja glikemije. Glukoza ne pokazuje isti stepen navikavanja na ponovljene stresore kao što se dešava u slučaju hormona, koji pokazuju navikavanje. Porast glikemije usled stresa biće minimalan ukoliko je životinja bila u gladovanju, a značajniji porast se vidi kod glodara, koji su predhodno hranjeni. Ukoliko su životinje hranjene porast glikemije prati i porast insulinemije, što je u velikoj meri regulisano stanjem nadbubrežne žlezde. Interesantno je da efekti stresa na glikemiju zavise i od soja miševa, odnosno njihove selekcije za određene istraživačke namene.

Određeni stresogeni imaju sposobnost da povećaju vrednost enzima u krvi (Highman i sar., 1965; Garbus i sar., 1967; Apple i sar., 1993; Arakawa i sar. 1997; Sanchez i sar., 2002; Center, 2007; Sepesy i sar., 2006; Ohta i sar., 2009). Davanje epinefrina ili norpeinefrina egzogeno različitim vrstama kao što su miševi, pacovi, morska prasada, zečevi ili psi dovodi do povećanja serumskih enzima, uključujući alanin aminotransferazu (ALT), aspartat aminotransferazu (AST), laktat dehidrogenazu (LDH) i aldolazu. Davanje β -adrenergičkih blokatora umanjuje ove promene. Glukokortikoidi mogu povećati vrednost steroidima indukovane alkaline fosfaze (ALP), koji nije senzitivan niti specifičan biohemijski marker koji ukazuje na stepen aktivacije hipotalamo-hipofizo-adrenalne osovine. Mnoge vrste stresora povećavaju aktivnosti enzima u serumu/plazmi, pa tako se više od šest puta mogu povećati aktivnost ALT, AST, CK, LDH uz promenu koncentracije ostalih parametara seruma kao što su glukoza, urea, holesterol, što je nađeno kod ljudi, pacova, miševa, pasa i ovaca. Objašnjenje za povećanje navedenih enzima i metabolita u krvi je povećanje simpatikusne aktivnosti, koja se manifestuje oslobađanjem kateholamina, što se reguliše α - i β -adrenergičkim putevima. U jednom ogledu laboratorijski pacovi su potapani u vodu na 23°C, posle čega je detektovan porast aktivnosti/koncentracije kreatin-fosfokinaze (CPK), laktat-dehidrogenaze (LDH), glutamat-oksalacetat transaminaza (GOT), glutamat-piruvat transaminaza (GPT), amilaze, lipaze, uree, kreatinina i glukoze. Najjače promene su uočene u periodu 6 časova posle izlaganja stresu. Jedan od razloga za povećanje je što stres dovodi do oštećenja ćelija tokom stresa, delujući na propustljivost membrane citoplazme, pa enzimi napuštaju intraćelijski prostor i odlaze u krvotok. U pomenutom istraživanju je vršena aplikacija antagonist i agonista α i β receptora. Pretretman (pre potapanja u vodu) sa 6-hidroksi-dopaminom (β -adrenergični antagonist, 6-OHDA) dovodi do smanjenog porasta koncentracije enzima u perifernoj cirkulaciji (umanjeno oštećenje ćelija). Alfa-adrenergični antagonisti i antiholinergici ne daju ovakav, protektivan efekat. Beta-adrenergički agonisti dovode do dodatnog povećanja koncentracije enzima u perifernoj krvi kod laboratorijskih pacova i pasa. Zaključeno je da povećanje enzima i celularno oštećenje nastaju kao posledica aktivacije β -adrenoceptora. Smatra se da se laboratorijski miševi odnosno njihov organizam navikava na delovanje stresa u roku od nekoliko dana.

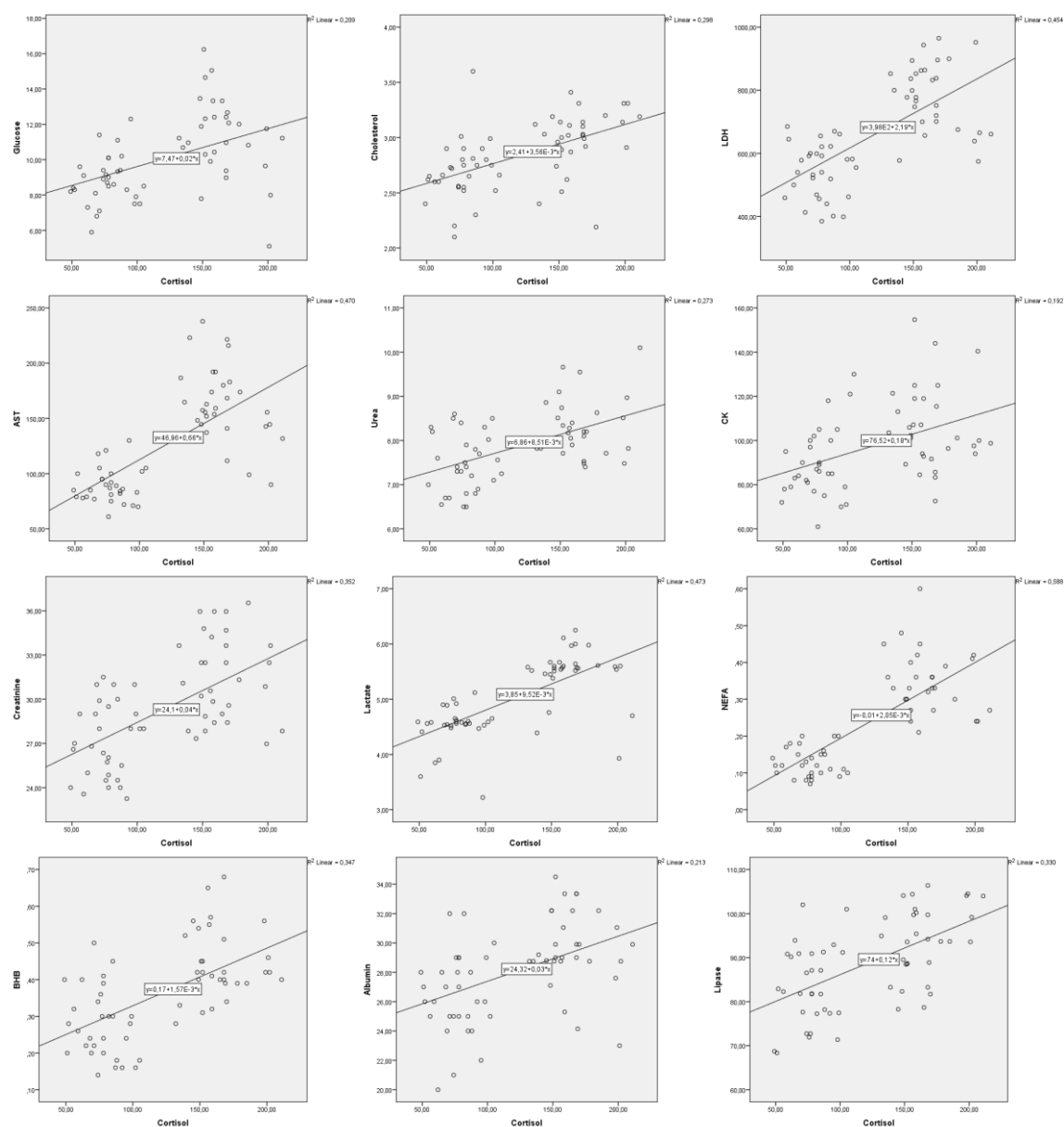
Smatra se da je broj leukocita u cirkulaciji jedan od najosetljivijih pokazatelja stresne reakcije (Bishop i sar., 1968; Brown i sar., 1977; Levin i sar., 1993; Meagher i sar., 1996; Malacrida i sar., 1997; Afan i sar., 1997; Bauer i sar., 1999; Laakko i sar., 2002; Ellis i sar., 2005; Leberbauer i sar., 2005; Trottier i sar., 2008; Hutler i sar., 2009). Nekoliko sekundi do nekoliko minuta nakon izlaganja stresu dolazi do direktnog delovanja epinefrina, koji dovodi do porasta broja leukocita, kako njegovog ukupnog broja, tako i u oblasti diferencijalne bele loze. Posle nekoliko minuta do nekoliko časova delovanja stresogena dolazi do porasta broja neutrofila uz opadanje broja limfocita i eozinofila, a što je posledica direktnog delovanja glukokortikoida. Ukoliko se radi o stresogenima manjeg intenziteta najčešće se uočava jedna od ovih promena. Prilikom interpretacije stresnog leukograma kod laboratorijskih glodara u obzir se moraju uzeti neki faktori vrste. Kod glodara usled zapaljenskog procesa raste broj neutrofila i limfocita kod inflamacije, pa se promene u broju leukocita moraju razmatrati i sa aspekta eventualnog prisustva inflamatornog odgovora. Smanjen kvalitativni i

kvantitativni unos hrane dovodi do promena u hematopoeznim procesima, tako da se javljaju znaci neregenerativne anemije uz smanjen broj retikulocita. Aktivacija simpatikusa dovodi do zadržavanja ćelija u koštanoj srži, dok je za kateholamine pokazano da mogu vršiti direktnu stimulaciju eritropoeze preko aktivacije β 2-adrenergičkih receptora u in vitro uslovima, ali ovaj mehanizam nije sasvim potvrđen u in vivo uslovima. Glukokortikoidi su mnogo potentniji u svojoj aktivnosti kada su u pitanju ćelije kostne srži, pa je pokazan značajan uticaj in vivo, ali primena egzogenih glukokortikoida daje kontradiktorne rezultate kada je u pitanju eritropoetska loza. Sa druge strane, glukokortikoidi su uključeni u proces ekspanzije razvoja mijeloidnih ćelija u kostnoj srži, što dovodi do povećanja broja neutrofila u slobodnom krvotoku. Noviji rezultati su pokazali da davanje kortikosteroida putem injekcije u dozi, koja je slična akutnom stresu dovodi do promena u vidu smanjenja limfoidnih ćelija uz povećanje granulocitnih prekursora, a nije pokazan uticaj na eritroidnu i monocitnu lozu, kao i ukupnu celularnost. Postojanje toplotnog stesa dovodi do povećanja broja neutrofila preko faktora stimulacije kolonije granulocita (G-CSF). Glukokortikoidi povećavaju vijabilnost neutrofila, a indukuju apoptozu eozinofila u slobodnom krvotoku. Vrlo intenzivni stresovi kod laboratorijskih pacova dovode do srednjeg ili jakog opadanja nivoa hematopoeze, koji se odnosi na sva tri elementa krvne loze uz smanjenu celularnost koštane srži. Kao posledica dolazi do opadanja broja cirkulišućih ćelija uz opadanje broja retikulocita, što se smatra najznačajnijim promenama kod umerenog do jakog stresa kod glodara. Ovo je posebno ispitano u ogledima sa gladovanjem laboratorijskih pacova, ali se sličan nalaz nalazi i u gladovanju kod ljudi. Stres takođe smanjuje broj jedinica formiranja kolonija - granulocita / makrofaga (CFU-GM) u koštanoj srži pacova.

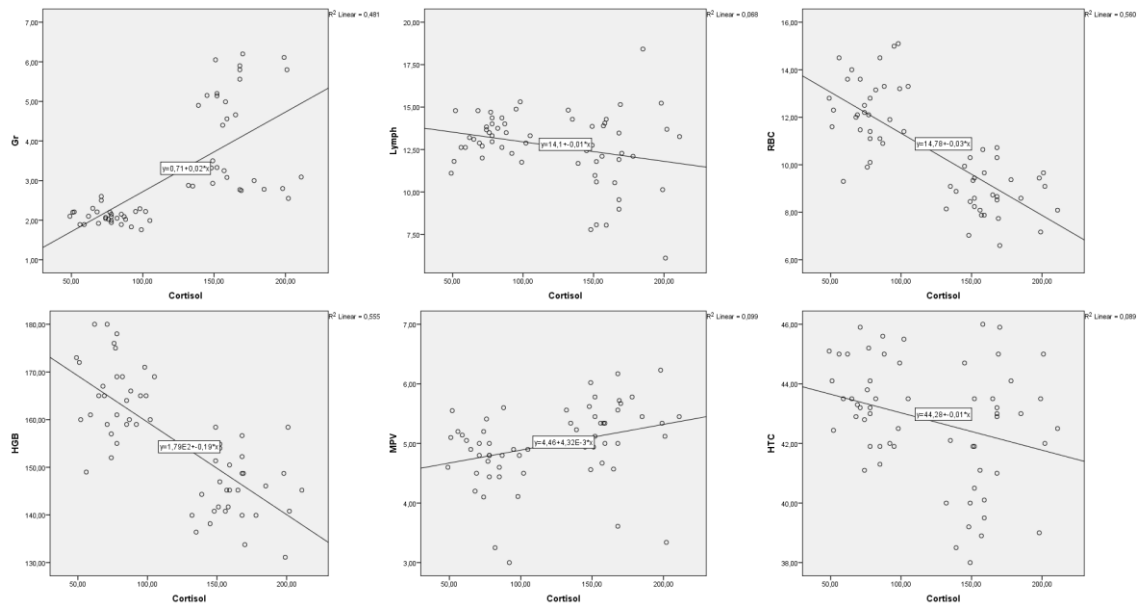
Hormon stresa na različite načine utiče na leukocitnu lozu (Thompson i sar., 1993; Abo i sar., 1981; Altemus i sar., 2001; Bowers i sar., 2008; Calvano i sar., 1987; Cox, 1995; Dhabhar i sar., 1996; ELsas i sar., 2004; Garvy i sar., 1993; McNulty i sar., 1990; Mischler i sar., 2005; Pelegri i sar., 2003; Sabag i sar., 1978; Schedlowski i sar., 1996; Stevenson i Taylor, 1988; Stojic-Vukanic i sar., 2009; Toft i sar., 1992; Tonnessen i sar., 1987; Trottier i sar., 2008; Ulich i delCastillo, 1991; Valenzona i sar., 1998; Wallen i sar., 1991). Kod bele krvne loze kratkotrajni stres dovodi do povećanja elemenata bele loze, dok dugotrajniji stres u trajanju od nekoliko sati odnosno više dana dovodi do povećanja broja neutrofila i smanjenja broja limfocita i eozinofila. Uticaj kratkotrajnog stresa može se pripisati delovanju epinefrina, dok kod dugotrajnijeg stresa postoji dominantan uticaj glukokortikoida. Kod laboratorijskih pacova stres izazvan ograničavanjem pokreta može da smanji broj cirkulišućih limfocita za polovinu, ali će se taj broj vraća u normalu u roku od jednog dana. Kod glodara postoji pretežno limfocitna krvna slika, pa je smanjenje broja limfocita izraženije od povećanja broja neutrofila kao posledica delovanja glukokortikoida. Smatra se da suefekti glukokortikoida kod odgovora leukocita kod glodara dominantni u odnosu na efekte epinefrina. Glukokortikoidi takođe imaju dominantnu ulogu odgovora leukocita kod glodara u odnosu na mineralokortikoide. Odklanjanje nadbubrežne žlezde uz naknadno izlaganje životinja stresu dovodi do smanjenja limfocita, jer i drugi medijatori stresa imaju efekat sličan glukokortikoidima. Glukokortikoidi u organizmu životinja imaju veze sa dnevnim ritmom broja leukocita. Povećanje broja neutrofila izazvano glukokortikoidima prouzrokovano je produženjem poluveka neutrofila (verovatno usled smanjene apoptoze), povećanim oslobađanjem neutrofila iz koštane srži i širenjem svih stadijuma razvoja mijeloidnih ćelija koštane srži. Smanjenje broja limfocita izazvano glukokortikoidima rezultat je preraspodele limfocita iz krvi, slezine i koštane srži u druge limfoidne organe, kao i stimulacije apoptotičnih puteva u osetljivim limfocitima. Veličina smanjenja može biti prilično značajna, ali promene su reverzibilne, pa se 70% smanjenja nadoknadi u okviru nekoliko sati. Zbog ove brze nadoknade ćelija smatra se da su ove promene nastale pre svega zbog preraspodele limfocita, a ne zbog ćelijske smrti. Mehanizam smanjenja eozinofila povezanih sa glukokortikoidima može da uključuje smanjenu mobilizaciju iz koštane srži, smanjenu adheziju na vaskularne zidove, povećanu sekvestraciju pretežno u slezinu i smanjeno preživljavanje. Ukoliko se izvrši splenektomija kod pacova, eozinopenija će izuzetno brzo nestati po aplikaciji glukokortikoida. Cirkadijski ritam broja monocita kod pacova je direktno povezan sa ritmom kortikosterona. U odnosu na navedeno, broj monocita je najmanji na početku svetlosnog perioda (kada je kortikosteron najniži), a najviši nekoliko sati posle mračnog perioda. Nasuprot tome, broj monocita se smanjuje tokom infuzije kortizola kod ljudi, obrazac smanjenja paralelan je sa limfocitima. Smanjen broj monocita može biti uzrokovan smanjenom proizvodnjom, jer trajna izloženost glukokortikoidima dovodi do smanjenog stvaranja i oslobađanja monocita iz koštane srži kod miševa. Trombociti nisu osetljiv pokazatelj stresa, iako neka istraživanja sugerišu da se mogu povećati kao odgovor na stresor. Stres izazvan inflamacijom prilikom aplikovanja IL-6 kod pacova povećava broj trombocita. Dejstvo epinefrina može povećati broj trombocita zbog kontrakcije slezine.

Poznata je i veza stresnog odgovora i crvene loze (Geiger i sar., 1976; Hannon i sar., 1985; Pauluhn, 2004; Stockham i Scott, 2012). U crvenoj krvnoj lozi akutni stresori uzrokuju efekte povezane sa epinefrinom rezultiraju povećanom masom eritrocita i povećanim cirkulišućim retikulocitima usled

oslobađanja zrelih i nezrelih crvenih krvnih zrnaca iz slezine i koštane srži. Direktna simpatička stimulacija ili injekcija epinefrina ili norepinefrina uzrokuje povećanu masu crvenih krvnih zrnaca, pre svega zbog kontrakcije slezine. Suprotno tome, hronični stres povezan je sa smanjenom masom crvenih krvnih zrnaca i smanjenim ili nepromenjenim brojem retikulocita. Inflamacija kao stresogen može dovesti do porasta, što je dokazano prilikom akutne aplikacije IL-6. Psihološki stres može imati različite efekte na eritropoezu. Smanjenje sna smanjuje eritropoezu kod miševa (Jongen-Lavrencic i sar. 1996; Wessely i sar., 1997; Skurikhin i sar, 2005).

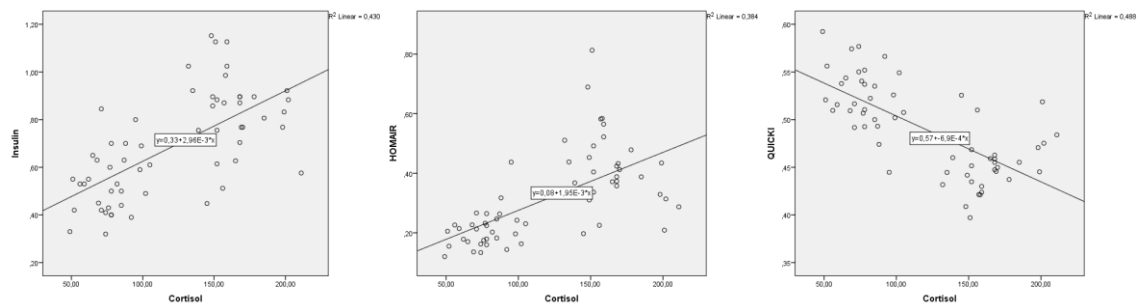


Grafikon 1-12. Linearna regresija i korelacija između kortizola i biohemijskih parametara krvi kod miševa u akutnom stresu
Figure 1-12. Linear regression and correlation between cortisol and blood biochemistry parameters in mice during acute stress



Grafikon 13-18. Linearna regresija i korelacija između kortizola i hematoloških parametara kod miševa u akutnom stresu

Figure 13-18. Linear regression and correlation between cortisol and hematology parameters in mice during acute stress



Grafikon 19-21. Linearna regresija i korelacija između kortizola i insulinske rezistencije kod miševa u akutnom stresu

Figure 19-21. Linear regression and correlation between cortisol and insulin resistance in mice during acute stress

Zaključci

Akutni stres izazvan aplikacijom standardnog soja virusa besnila kod miševa dovodi do promena u krvi koje su u statistički značajnoj korelaciji sa koncentracijom kortizola. Kortizol kod laboratorijskih miševa je značajan pokazatelj adaptiranosti na akutni stres.

Literatura

- Abo T., Kawate T., Itoh K., Kumagai K. Studies on the bioperiodicity of the immune response. I. 1981. Circadian rhythms of human T, B, and K cell traffic in the peripheral blood. *J Immunol*, 126, 1360–1363.
- Afan A.M., Broome C.S., Nicholls S.E., Whetton A.D., Miyan J.A. 1997. Bone marrow innervation regulates cellular retention in the murine haemopoietic system. *Br J Haematol*, 98, 569–77.
- Altemus M., Rao B., Dhabhar F.S., Ding W., Granstein R.D. 2001. Stress-induced changes in skin barrier function in healthy women. *J Invest Dermatol*, 117, 309–17.
- Apple J.K., Minton J.E., Parsons K.M., Unruh J.A. 1993. Influence of repeated restraint and isolation stress and electrolyte administration on pituitary-adrenal secretions, electrolytes, and other blood constituents of sheep. *J Anim Sci*, 71, 71–77.
- Arakawa H., Kodama H., Matsuoka N., Yamaguchi I. 1997. Stress increases plasma enzyme activity in rats: Differential effects of adrenergic and cholinergic blockades. *J Pharmacol Exp Ther*, 280, 1296–1303.
- Bauer A., Tronche F., Wessely O., Kellendonk C., Reichardt H.M., Steinlein P., Schutz G., Beug H. 1999. The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes Dev*, 13, 2996–3002.

- Bishop C.R., Athens J.W., Boggs D.R., Warner H.R., Cartwright G.E., Wintrobe M.M. 1968. Leukokinetic studies. 13. A non-steady-state kinetic evaluation of the mechanism of cortisone-induced granulocytosis. *J Clin Invest*, 47, 249–60.
- Bowers S.L., Bilbo S.D., Dhabhar F.S., Nelson R.J. 2008. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. *Brain Behav Immun*, 22, 105–13.
- Brown J.E., Adamson J.W. Modulation of in vitro erythropoiesis. 1977. The influence of beta-adrenergic agonists on erythroid colony formation. *J Clin Invest*, 60, 70–77.
- Calvano S.E., Albert J.D., Legaspi A., Organ B.C., Tracey K.J., Lowry S.F., Shires G.T., Antonacci A.C. 1987. Comparison of numerical and phenotypic leukocyte changes during constant hydrocortisone infusion in normal humans with those in thermally injured patients. *Surg Gynecol Obstet*, 164, 509–520.
- Center S.A. 2007. Interpretation of liver enzymes. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2007, 37, 297–333.
- Cox G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. 1995. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol*, 154, 4719–25.
- Dhabhar F.S., Miller A.H., McEwen B.S., Spencer R.L. 1996. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *J Immunol*, 157, 1638–44.
- Eigler N., Sacca L., Sherwin R.S. 1979. Synergistic interactions of physiologic increments of glucagon, epinephrine, and cortisol in the dog: A model for stress-induced hyperglycemia. *J Clin Invest*, 63, 114–123.
- Ellis G.S., Carlson D.E., Hester L., He J.R., Bagby G.J., Singh I.S., Hasday J.D. 2005. G-CSF, but not corticosterone, mediates circulating neutrophilia induced by febrile-range hyperthermia. *J Appl Physiol*, 98, 1799–804.
- Elsas P.X., Neto H.A., Cheraim A.B., Magalhaes E.S., Accioly M.T., Carvalho V.F., Silva P.M., Vargaftig B.B., Cunha F.Q., Gaspar Elsas M.I. 2004. Induction of bone-marrow eosinophilia in mice submitted to surgery is dependent on stress-induced secretion of glucocorticoids. *Br J Pharmacol*, 143, 541–48.
- Garbus J., Highman B., Altland P.D. 1967. Alterations in serum enzymes and isoenzymes in various species induced by epinephrine. *Comp Biochem Physiol*, 22, 507–516.
- Garvy B.A., Telford W.G., King L.E., Fraker P.J. 1993. Glucocorticoids and irradiation-induced apoptosis in normal murine bone marrow B-lineage lymphocytes as determined by flow cytometry. *Immunology*, 79, 270–277.
- Geiger H.B., Song S.H., Groom A.C. 1976. Release of red cells from the slowly-exchanging splenic pool after noradrenaline administration. *Can J Physiol Pharmacol*, 54, 477–84.
- Gong S., Miao Y.L., Jiao G.Z., Sun M.J., Li H., et al. 2015. Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. *PloS one*, 10(2), e0117503.
- Hannon J. P., Bossone C.A., Rodkey W.G. 1985. Splenic red cell sequestration and blood volume measurements in conscious pigs. *Am J Physiol*, 248, R293–301.
- Harizi H., Homo-Delarche F., Amrani A., Coulaud J., Mormede P. 2007. Marked genetic differences in the regulation of blood glucose under immune and restraint stress in mice reveals a wide range of corticosteroid sensitivity. *J Neuroimmunol*, 189, 59–68.
- Hermansen K., Hyttel I. 1971. The hyperglycaemic activity of some catecholamines and the effect of alpha- and beta-adrenergic blocking compounds in the mouse. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 29, 87–94.
- Hicks D.J., Fooks A.R., Johnson N. 2012. *Developments in rabies vaccines. Clinical & Experimental Immunology*, 169(3), 199-204.
- Highman B., Altland P.D., Garbus J. 1965. Pathological and serum-enzyme changes after epinephrine in oil and adrenergic blocking agent. *Arch Pathol*, 80, 332–344.
- Hristov S., Bešlin R. 1991. Stres domaćih životinja. Monografija. Poljoprivredni fakultet Beograd.
- Hutter G., Ganepola S., Hofmann W.K. 2009. The hematology of anorexia nervosa. *Int J Eat Disord*, 42, 293–300.
- Jongen-Lavrencic M., Peeters H.R., Rozemuller H., Rombouts W.J., Martens A.C., Vreugdenhil G., Pillay M., Cox P.H., Bijser M., Brutel G., Breedveld F.C., Swaak A.J. 1996. IL-6-induced anaemia in rats: Possible pathogenetic implications for anemia observed in chronic inflammations. *Clin Exp Immunol*, 103, 328–34.
- Laakko T., Fraker P. 2002. Rapid changes in the lymphopoietic and granulopoietic compartments of the marrow caused by stress levels of corticosterone. *Immunology*, 105, 111–19.
- Leberbauer C., Boulme F., Unfried G., Huber J., Beug H., Mullner E.W. 2005. Different steroids co-regulate long-term expansion versus terminal differentiation in primary human erythroid progenitors. *Blood*, 105, 85–94.
- Levin S., Semler D., Ruben Z. 1993. Effects of two weeks of feed restriction on some common toxicologic parameters in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol*, 21, 1–14.
- Liu Y.Z., Wang Y.X., Jiang C.L. 2017. *Inflammation: the common pathway of stress-related diseases. Frontiers in human neuroscience*, 11, 316.
- Malacrida S.A., Teixeira N.A., Queiroz M.L. 1997. Hematopoietic changes in rats after inescapable and escapable shocks. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 19, 523–533.
- Marquez C., Nadal R., Armario A. 2004. The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilisation stress in rats: Individual differences. *Neuroscience*, 123, 601–612.
- McNulty J.A., Relfson M., Fox L.M., Fox L.M., Kus L., Handa R.J., Schneider G.B. 1990. Circadian analysis of mononuclear cells in the rat following pinealectomy and superior cervical ganglionectomy. *Brain Behav Immun*, 4, 292–307.
- Meagher L.C., Cousin J.M., Seckl J.R., Haslett C. 1996. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J Immunol*, 156, 4422–4428.
- Mischler K., Fischer J.E., Zraggen L., et al. 2005. The effect of repeated acute mental stress on habituation and recovery responses in hemoconcentration and blood cells in healthy men. *Life Sci*, 77, 1166–79.

- Niezgoda J., Wronska D., Pierzchala K., Bobek S., Kahl S. 1987. Lack of adaptation to repeated emotional stress evoked by isolation of sheep from the flock. *Zentralbl Veterinarmed A*, 134, 734–739.
- Ohta Y., Kaida S., Chiba S., Tada M., Teruya A., Imai Y., Kawanishi M. 2009. Involvement of oxidative stress in increases in the serum levels of various enzymes and components in rats with water-immersion restraint stress. *J Clin Biochem Nutr*, 45, 347–354.
- Pauluhn J. 2004. Subacute inhalation toxicity of aniline in rats: Analysis of time-dependence and concentration-dependence of hematotoxic and splenic effects. *Toxicol Sci*, 81, 198–215.
- Pelegri C., Vilaplana J., Castellote C., Rabanal M., Franch A., Castell M. 2003. Circadian rhythms in surface molecules of rat blood lymphocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284, C67–76.
- Pierzchala K., Niezgoda J., Bobek S. 1985. The effect of isolation on plasma cortisol, glucose and free fatty acids in sheep. *Zentralbl Veterinarmed A*, 32, 140–145.
- Sabag N., Castrillon M.A., Tchernitchin A. 1978. Cortisol-induced migration of eosinophil leukocytes to lymphoid organs. *Experientia*, 34, 666–67.
- Sanchez O., Arnau A., Pareja M., Poch E., Ramirez I., Soley M. 2002. Acute stress-induced tissue injury in mice: Differences between emotional and social stress. *Cell Stress Chaperones*, 7, 36–46.
- Schedlowski M., Hosch W., Oberbeck R., Benschop R.J., Jacobs R., Raab H.R., Schmidt R.E. 1996. Catecholamines modulate human NK cell circulation and function via spleen-independent beta 2-adrenergic mechanisms. *J Immunol*, 156, 93–99.
- Schutsky K., Portocarrero C., Hooper D.C., Dietzschold B., Faber M. 2014. Limited brain metabolism changes differentiate between the progression and clearance of rabies virus. *PloS one*, 9(4), e87180.
- Sepesy L.M., Center S.A., Randolph J.F., Warner K.L., Erb H.N. 2006. Vacuolar hepatopathy in dogs: 336 cases (1993-2005). *J Am Vet Med Assoc*, 229, 246–52.
- Servat A., Cliquet F. 2015. *Mouse Potency Testing of Rabies Vaccines. Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention*, 2, 269–279.
- Skurikhin E.G., Provalova N. V., Pershina O.V., Minakova M.Y. 2005. Pharmacological regulation of erythropoietic precursor pool in experimental neuroses. *Bull Exp Biol Med*, 140, 621–626.
- Stankov, S., Obradović, N., Vujin, D., & Vranješ, N. 2020. *Possibility of Immediate Introduction of a Single-Dose Antibody Induction Test as a Refinement of the NIH Test for Inactivated Rabies Vaccine Potency Determination. Viral immunology*, 33(5), 367-377.
- Stevenson J.R., Taylor R. 1988. Effects of glucocorticoid and antiglucocorticoid hormones on leukocyte numbers and function. *Int J Immunopharmacol*, 10, 1–6.
- Stockham S.L., Scott M.A. 2012. Erythrocytes. In *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*, pp. 85–154. Iowa State Press, Ames, IA.
- Stojic-Vukanic Z., Rauski A., Kosec D., Radojevic K., Pilipovic I., Lepasovic G. 2009. Dysregulation of T-cell development in adrenal glucocorticoid-deprived rats. *Exp Biol Med (Maywood)*, 234, 1067–1074.
- Tan S.Y., Yip A. 2018. Hans Selye (1907–1982): Founder of the stress theory. *Singapore medical journal*, 59(4), 170.
- Thompson J., van Furth R. 1973. The effect of glucocorticosteroids on the proliferation and kinetics of promonocytes and monocytes of the bone marrow. *J Exp Med*, 137, 10–21.
- Toft P., Tonnesen E., Svendsen P., Rasmussen J.W. 1992. Redistribution of lymphocytes after cortisol administration. *APMIS*, 100, 154–58.
- Toinon A., Moreno N., Chausse H., Mas E., Nicolai M.C., et al. 2019. *Potency test to discriminate between differentially over-inactivated rabies vaccines: Agreement between the NIH assay and a G-protein based ELISA. Biologicals*, 60, 49-54.
- Tonnesen E., Christensen N.J., Brinklov M.M. 1987. Natural killer cell activity during cortisol and adrenaline infusion in healthy volunteers. *Eur J Clin Invest*, 17, 497–503.
- Trottier M.D., Newsted M.M., King L.E., Fraker P.J. 2008. Natural glucocorticoids induce expansion of all developmental stages of murine bone marrow granulocytes without inhibiting function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 2028–2033.
- Ulich T.R., del Castillo J. 1991. The hematopoietic and mature blood cells of the rat: Their morphology and the kinetics of circulating leukocytes in control rats. *Exp Hematol*, 19, 639–648.
- Valenzona H.O., Dhanoa S., Finkelman F.D., Osmond D.G. 1998. Exogenous interleukin 7 as a proliferative stimulant of early precursor B cells in mouse bone marrow: Efficacy of IL-7 injection, IL-7 infusion and IL-7-anti-IL-7 antibody complexes. *Cytokine*, 10, 404–412.
- Wallen N., Kita H., Weiler D., Gleich G.J. 1991. Glucocorticoids inhibit cytokine-mediated eosinophil survival. *J Immunol*, 147, 3490–3495.
- Wessely O., Deiner E.M., Beug H., von L.M. 1997. The glucocorticoid receptor is a key regulator of the decision between self-renewal and differentiation in erythroid progenitors. *EMBO J*, 16, 267–80
- Yamada F., Inoue S., Saitoh T., Tanaka K., Satoh S., Takamura Y. 1993. Glucoregulatory hormones in the immobilization stress-induced increase of plasma glucose in fasted and fed rats. *Endocrinology*, 132, 2199–2205.

Relationship between cortisol and other blood parameters in mice in acute stress

Nemanja Obradović^a, Branislava Belić^{b*}, Marko R. Cincović^{b*}, Mira Majkić^b

^aPasteur institute Novi Sad, Hajduk Veljkova 1, 21000 Novi Sad, Serbia

^bUniversity of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of veterinary medicine, Laboratory of pathophysiology, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Serbia

*Corresponding: mcincovic@gmail.com

ABSTRACT

Stress is the sum of the influence of various external and internal factors, which damage or can damage the body, and have the power to trigger the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, which leads to increased cortisol secretion, with consequent changes in energy metabolism, organic and inorganic substances in the body, as well as in the immune system in order to maintain homeostasis of the organism and overcome the negative effects. The aim of this study was to determine the association of blood parameters with cortisol values in mice exposed to acute immune stress after administration of standard strain virus (CVS27) during the vaccine potency test. A large number of examined blood parameters show a very significant linear relationship with the values of cortisol ($p < 0.01$) and they are: glucose, cholesterol, lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK), urea, creatinine, lactate, non-esterified fatty acids (NEFA), betahydroxybutyrate (BHB), albumin, lipase, granulocytes, erythrocytes, hemoglobin, insulin, homeostatic model of insulin resistance (HOMAIR) and quantitative index of insulin sensitivity (QUICKI). Parameters such as hematocrit and mean platelet volume (MPV) are significantly related ($p < 0.05$). Parameters such as Mg and lymphocytes do not show a statistically significant linear relationship with cortisol concentration ($p > 0.05$). Acute stress leads to an acceleration of the metabolic response, catabolism, insulin resistance and an increase in the activity of enzymes in the blood. Although corticosterone has been considered a major stress-responding glucocorticoid in rodents, the association of cortisol with metabolic parameters in acute stress indicates that this glucocorticoid is indispensable in assessing the stress response in these species of laboratory animals.

KEY WORDS: stress, blood parameters, mice, cortisol.

PRIMLJEN: 25.04.2021.

PRIHVAĆEN: 21.07.2021.