

© Б. А. БАХМЕТЬЕВ, Н. С. ЛИХАЧЕВА, 2000

УДК 612.018.2:577.175.322].083

Б. А. Бахметьев, Н. С. Лихачева

ВЛИЯНИЕ СОМАТОТРОПНОГО ГОРМОНА НА ФУНКЦИЮ ФАГОЦИТИРУЮЩИХ КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Лаборатория экологической иммунологии (зав. — проф. Н. Н. Кеворков) Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Пермь

Целью настоящего исследования явился анализ влияния различных концентраций соматотропного гормона *in vitro* на фагоцитарную активность разных популяций человеческих лейкоцитов и продукцию супероксид-аниона. Клетки крови инкубировали в среде 199 с добавлением разных концентраций гормона роста в течение 1 ч при 37°C. Кроме традиционных общих показателей фагоцитоза, были отдельно учтены число эозинофилов, нейтрофилов, моноцитов (фагоцитирующих и нефагоцитирующих), формализованные эритроциты барана (ФЭБ), а также процентное распределение (роль) каждого типа фагоцитирующих клеток в зависимости от их активности (число захваченных ФЭБ) среди общего пула фагоцитов (сумма всех фагоцитирующих клеток разной активности в 1 мм³ крови). Параллельно в тесте восстановления нитросинего тетразолия были оценены спонтанный и стимулированный зимозаном уровни супероксид-аниона. Установлено, что добавление соматотропного гормона не только стимулирует общую фагоцитарную активность лейкоцитов человека за счет активации всех типов фагоцитов, но при этом действие гормона не одинаково сказывается на разных типах клеток. Наибольшее стимулирующее влияние гормон роста оказывает на моноциты, увеличивая их роль в общем фагоцитозе в 3–5 раз по сравнению с контролем. Добавление гормона роста увеличивало также стимулированный зимозаном уровень продукции супероксид-аниона, не изменяя его спонтанный уровень. Полученные результаты свидетельствуют о возможности и демонстрируют направленность непосредственного влияния гормона роста на функции отдельных популяций лейкоцитов периферической крови человека.

Effects of somatotrophic hormone in different concentrations on the phagocytic activity of various populations of human lymphocytes and production of superoxide anion were analyzed in vitro. Blood cells were incubated in medium 199 with various hormone concentrations for 1 h at 37°C. Besides the traditional general parameters of phagocytosis, the counts of eosinophils, neutrophils, monocytes phagocytizing and not phagocytizing sheep red cells (SRC) were evaluated with regard to their activity (number of phagocytosed SRC) in the total pool of phagocytes (sum of all phagocytizing cells of different activity per mm³ blood). The spontaneous and zymosan-stimulated levels of superoxide anion were evaluated in the nitroblue tetrasolium reduction test. Addition of somatotrophic hormone stimulated the total phagocytic activity of human leukocytes by activating all types of phagocytes, but the hormone effect was different for different cells. Growth hormone exerted the greatest stimulating effect on monocytes, increasing 3–5-fold their role in total phagocytosis, in comparison with the control. Addition of growth hormone increased zymosan-stimulated production of superoxide anion but did not change its spontaneous level. The results indicate the probability and demonstrate the direction of the immediate effect of growth hormone on the functions of some populations of human peripheral blood leukocytes.

В настоящее время известно, что соматотропный гормон принимает активное участие в развитии и функционировании иммунной системы организма [3]. Стимулирующее влияние гормона сказывается на тимусе, селезенке, Т- и В-лимфоцитах [6], а экспрессия высокоаффинных рецепторов для гормона роста отмечена на клетках костного мозга, тимуса, спленоцитах, периферических лимфоцитах и макрофагах [4]. В последнее время появились данные, свидетельствующие о том, что гормон роста участвует в модуляции фагоцитарного звена иммунитета, которое является важным участком неспецифической резистентности и ранних процессов клеточного специфического иммунного ответа [8]. Целью настоящего исследования является изучение эффектов воздействия гормона роста *in vitro* на фагоцитарную и бактерицидную активность разных типов клеток периферической крови человека.

Материалы и методы

В работе использовали соматотропный гормон (Somatotropin Human Pituitaries 4 I. U., "Sigma") в конечных концентрациях 1, 10 и 100 нг/мл в соответствии с физиологическими колебаниями уровня

гормона в плазме крови человека. Венозную кровь 10 здоровых мужчин в возрасте от 20 до 50 лет оценивали одновременно в тесте, основанном на регистрации поглощения объектов фагоцитоза и в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест). Инкубацию проб с гормоном проводили в течение 60 мин. Фагоцитарную активность клеток периферической крови определяли модифицированным методом В. Н. Каплина и соавт. [2]. Особенности разработанной нами модификации метода оценки фагоцитарной активности лейкоцитов являлись учет фагоцитарной активности для суммы всех типов фагоцитирующих клеток (нейтрофилы, эозинофилы, моноциты) и использование в качестве объектов фагоцитоза тщательно отмытых несенсибилизированных формализованных эритроцитов барана (ФЭБ). Реакцию проводили при оптимальной концентрации ФЭБ (10⁸ клеток/мл) в условиях выхода интенсивности реакции на плато (20 мин, 37°C). Приготовленные мазки для подсчета фагоцитоза фиксировали метанолом и окрашивали по методу Романовского—Гимзы. Подсчет вели среди 300 клеток, потенциально способных к фагоцитозу, отдельно для нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов. Показатели нейтрофильного, моно-

Параметры оценки фагоцитарной активности клеток

Название	Значение
Процент фагоцитоза	Количество "истинных" фагоцитов (клетки, захватившие объекты фагоцитоза) из 100 подсчитанных фагоцитов
Фагоцитарное число	Количество объектов фагоцитоза, которое в среднем приходится на 1 из 100 подсчитанных фагоцитов
Фагоцитарный индекс	Количество объектов фагоцитоза, которое приходится на 1 "истинный" фагоцит
Абсолютный фагоцитоз	Число фагоцитирующих клеток в 1 мм ³ крови
Роль нейтрофилов (моноцитов, эозинофилов) в фагоцитозе	Процентное число фагоцитирующих клеток от общего абсолютного количества фагоцитов
Индекс стимуляции	Отношение роли в общем фагоцитозе отдельных типов фагоцитирующих клеток в пробе с гормоном к их роли в контрольной пробе
Процент фагоцитоза нейтрофилов (моноцитов, эозинофилов)	Количество "истинных" фагоцитов из 100 подсчитанных клеток данной популяции
Фагоцитарное число нейтрофилов (моноцитов, эозинофилов)	Количество объектов фагоцитоза, которое в среднем приходится на 1 из 100 подсчитанных клеток данной популяции
Фагоцитарный индекс нейтрофилов (моноцитов, эозинофилов)	Количество объектов фагоцитоза, которое приходится на 1 "истинный" фагоцит данной популяции
Абсолютный фагоцитоз нейтрофилов (моноцитов, эозинофилов)	Число фагоцитирующих клеток данной популяции в 1 мм ³ крови
Роль в общем фагоцитозе нейтрофилов (моноцитов, эозинофилов), поглотивших 1 (2, 3, 4, 5) объект	Процентное число клеток данной популяции, поглотивших 1 (2, 3, 4, 5) объект фагоцитоза от общего абсолютного количества фагоцитов
Абсолютное число нейтрофилов (моноцитов, эозинофилов), поглотивших 1 (2, 3, 4, 5) объект фагоцитоза	Число фагоцитирующих клеток данной популяции, поглотивших 1 (2, 3, 4, 5) объект фагоцитоза в 1 мм ³ крови

цитарного и эозинофильного фагоцитоза рассчитывали по отношению ко всем фагоцитирующим клеткам (табл. 1).

Для оценки функционально-метаболической активности лейкоцитов крови в работе использовали спектрофотометрический вариант НСТ-теста [1]. Для более полной характеристики бактерицидной активности клеток тест проводили в двух вариантах — спонтанном и стимулированном опсонизированными частицами зимозана. Это позволило одновременно выявить фоновую и резервную способность лейкоцитов к продукции синглетных форм кислорода. Результаты вычисляли по формуле $A/B \cdot 10^6$ (где A — экстинкция пробы против контроля при длине волны спектрофотометра 710 нм, B — абсолютное содержание потенциальных фагоцитов в 1 мкл крови) и выражали в условных единицах.

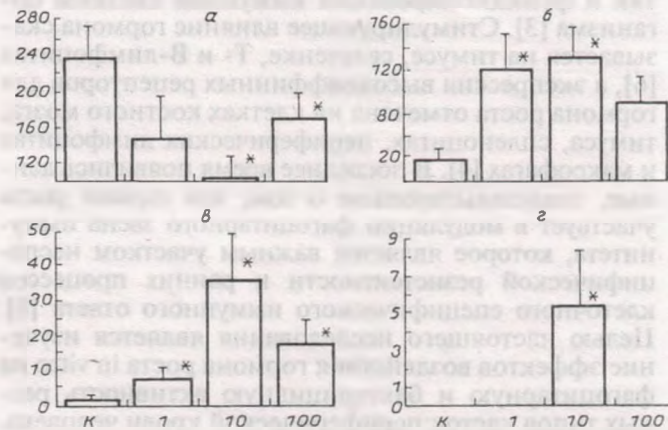
Полученные результаты обрабатывали с помощью компьютерных пакетов программ "Excel" и "Statistica". Достоверность вычисляли по критерию Стьюдента при $p < 0,05$. Все данные представлены в виде $M \pm m$.

Результаты и их обсуждение

Недавние исследования влияния соматотропного гормона на фагоцитарную активность клеток крови рыб показали его стимулирующий эффект [8]. Однако эти исследования не ставили задачей изучения влияния гормона роста на отдельные популяции клеток и их роль в общем фагоцитозе. Наше исследование показало, что соматотропный гормон не только дозозависимо стимулирует общую фагоцитарную активность лейкоцитов *in vitro*, достоверно увеличивая процент фагоцитоза, фагоцитарное число и фагоцитарный индекс лейкоцитов, что согласуется с данными литературы по клиническим исследованиям влияния гормона *in vivo* [7], но при этом действие гормона неодинаково оказы-

вается на разных типах клеток периферической крови человека (табл. 2).

Наибольшее стимулирующее действие гормон роста оказывает на моноциты, увеличивая их участие в общем фагоцитозе в 3—5 раз по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Количество моноцитов, поглотивших 1, 2 или 3 объекта фагоцитоза, увеличивается с ростом концентрации гормона, при этом индексы стимуляции для клеток, поглотивших 1 объект, составляют 3 (при концентрации гормона 1 нг/мл), 4 (при концентрации гормона 10 нг/мл) и 2 (при концентрации гормона 100 нг/мл), для поглотивших 2 объекта — 4, 23 и 10 соответственно; моноциты, фагоцитирующие по 3 объекта, появляются при концентрации соматотропного гормона 10 нг/мл (см. рисунок).



Влияние соматотропного гормона на абсолютное число фагоцитирующих моноцитов. Данные представлены в виде $M \pm m$. К — контроль; 1, 10, 100 — концентрации гормона (в нг/мл). * — достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$). а — нефагоцитирующие моноциты; б — поглотившие 1 объект; в — поглотившие 2 объекта; г — поглотившие 3 объекта.

По осям ординат — абсолютное число (клетки/мм³).

Процент фагоцитоза, фагоцитарный индекс и фагоцитарное число отдельных популяций лейкоцитов в пробах с различными концентрациями соматотропного гормона

Показатель	Концентрация гормона, нг/мл	Число измерений	Нейтрофилы	Эозинофилы	Моноциты
Процент фагоцитоза	контроль	10	52,6 ± 5,9	8,63 ± 1,71	5,33 ± 0,71
	1	10	86,46 ± 3,2*	37,92 ± 6,96*	51,09 ± 8,76*
	10	10	81,24 ± 4,7*	62,54 ± 4,03*	65,86 ± 8,17*
	100	10	52,4 ± 6,3	14,15 ± 1,9*	37,92 ± 6,96*
Фагоцитарный индекс	контроль	10	1,29 ± 0,1	1,04 ± 0,04	1,0 ± 0,0
	1	10	1,69 ± 0,14*	1,14 ± 0,06*	1,24 ± 0,07*
	10	10	1,75 ± 0,08*	1,27 ± 0,07*	1,30 ± 0,07*
	100	10	1,227 ± 0,03	1,04 ± 0,07	1,14 ± 0,06
Фагоцитарное число	контроль	10	0,71 ± 0,10	0,096 ± 0,025	0,053 ± 0,01
	1	10	1,48 ± 0,16*	0,45 ± 0,01*	0,68 ± 0,15*
	10	10	1,443 ± 0,12*	0,81 ± 0,08*	0,85 ± 0,11*
	100	10	0,647 ± 0,08	0,14 ± 0,02*	0,16 ± 0,03*

Примечание. Здесь и в табл. 3: звездочка — достоверность различий с контролем при $p < 0,05$.

Второй по значимости мишенью действия гормона, вероятно, являются эозинофилы. Индексы их стимуляции составляют от 2 до 4 по сравнению с контролем. При этом абсолютное число клеток, поглотивших 1 объект фагоцитоза, в присутствии соматотропного гормона достоверно не изменяется, однако появляются эозинофилы, поглощающие по 2 или 3 объекта, и их число дозозависимо растет (эозинофилы, поглотившие 2 объекта, — 13 ± 6 , 37 ± 10 , 36 ± 13 клеток в 1 мм^3 ; эозинофилы, поглотившие 3 объекта, — $0,5 \pm 0,4$, 5 ± 4 , $2 \pm 1,5$ клетки в 1 мм^3 при концентрациях гормона 1, 10, 100 нг/мл соответственно).

Наименьшее действие, по-видимому, соматотропный гормон оказывает на нейтрофилы, их участие в общем фагоцитозе по сравнению с контролем увеличивается всего в 1,5 раза при всех концентрациях гормона. Достоверно снижаются абсолютные числа нефагоцитирующих (868 ± 201 и 540 ± 98 клеток в 1 мм^3) и поглотивших 1 объект фагоцитоза (1537 ± 206 и 1589 ± 256 клеток в 1 мм^3) нейтрофилов при концентрациях гормона 10 и 100 нг/мл соответственно по сравнению с показателями в контроле (2102 ± 298 и 1988 ± 343 клеток в 1 мм^3 для нефагоцитирующих и поглотивших 1 объект нейтрофилов соответственно). Одновременно происходит рост числа нейтрофилов, поглотивших 2 (633 ± 209 клеток на 1 мм^3 крови в контроле, 1704 ± 332 и 1884 ± 368 клеток на 1 мм^3 при концентрациях гормона 10 и 100 нг/мл соответственно) и 3 объекта фагоцитоза (164 ± 67 клеток на 1 мм^3 крови в контроле, 552 ± 106 и 687 ± 204 клетки на 1 мм^3 при концентрациях гормона 10 и 100 нг/мл соответственно). Абсолютные числа нейтрофилов, поглотивших 4 или 5 объектов, достоверно увеличиваются только при концентрации гормона роста 10 нг/мл и составляют 58 ± 20 и 9 ± 4 клетки в 1 мм^3 по сравнению с показателями в контроле — 1 и 0 клеток в 1 мм^3 для нейтрофилов, поглощающих 4 и 5 объектов, соответственно. Индексы стимуляции при этом составляют для нейтрофилов, поглотивших 2 объекта, 1, 2, 2, для поглотивших 3 объекта — 1, 3, 3, для поглотивших 4 объекта — 0,7, 3, 1, при концентрациях сомато-

тропного гормона 1, 10 и 100 нг/мл соответственно. При концентрации гормона 10 нг/мл появляются нейтрофилы, поглощающие по 5 объектов.

Следует предположить, что избирательное действие соматотропного гормона на популяции лейкоцитов периферической крови является следствием различной экспрессии и (или) аффинности рецепторов для гормона на клетках разных популяций. Если это допущение справедливо, то максимальная экспрессия и (или) аффинность рецепторов характерны для моноцитов, которые, как известно, принимают участие в синтезе регуляторных агентов, например различного рода колониестимулирующих факторов для остальных типов клеток. Влияние гормона на эозинофилы также может быть косвенным свидетельством существования рецепторов для гормона роста и на этом типе клеток или возможности опосредованного действия на них соматотропина посредством синтеза активирующих агентов другим типом клеток. Менее выраженное влияние гормона на фагоцитарную активность нейтрофилов компенсируется их преобладающим количеством в крови. Кроме того, нельзя исключить и возможность опосредованного действия соматотропного гормона через рецепторы к пролактину на нейтрофилах [5].

Стимулирующее действие соматотропного гормона на лейкоциты при концентрации 1 нг/мл проявляется в увеличении числа клеток, участвующих в фагоцитозе. Концентрация гормона 10 нг/мл дает еще и увеличение интенсивности поглощения объектов фагоцитоза каждой клеткой. При концентрации гормона 100 нг/мл число фагоцитирующих клеток снижается, а количество объектов на каждую фагоцитирующую клетку по сравнению с предшествующей концентрацией не изменяется.

Исследование показало, что соматотропный гормон увеличивает стимулированную зимозаном продукцию активных форм кислорода лейкоцитами, не изменяя ее спонтанный уровень (табл. 3), что может свидетельствовать о недостаточности одного лишь гормонального сигнала соматотропина для запуска внутриклеточных механизмов бактерицидности. Максимальная стимуляция активности наблюдается при концентрации гормона 10 нг/мл. При 100 нг/мл наблюдается тенденция к уменьше-

Таблица 3

Спонтанный и стимулированные уровни НСТ-теста (в усл. ед.) в пробах с различными концентрациями соматотропного гормона

Концентрация гормона, нг/мл	Число измерений	Спонтанный уровень	Стимулированный уровень
Контроль	10	55,4 ± 8,0	94,5 ± 16,7*
1	10	53,600 ± 7,8	112,3 ± 22,5*
10	10	58,300 ± 7,2	119,2 ± 17,9*
100	10	58,5 ± 10,0	82,6 ± 15,9*

нию активности по сравнению с предшествующей концентрацией. Корреляционный анализ показал, что увеличение бактерицидной активности коррелирует с процентом фагоцитоза ($r = 0,82$; $p < 0,05$), фагоцитарным числом ($r = 0,60$; $p < 0,05$) и фагоцитарным индексом ($r = 0,46$; $p < 0,05$), вычисленными для суммы фагоцитирующих клеток разного типа. Таким образом, гормон стимулирует не только механизмы захвата объектов фагоцитоза, но и интенсивность переваривания клеткой уже поглощенных объектов.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности и демонстрируют направленность непосредственного влияния гормона роста на функции отдельных популяций лейкоцитов периферической крови человека.

Выводы

1. Соматотропный гормон дозозависимо стимулирует общую фагоцитарную активность лейкоци-

тов in vitro. Максимальной стимулирующей активностью обладает концентрация гормона 10 нг/мл.

2. Наибольшее действие соматотропный гормон оказывает на моноцитарный фагоцитоз.

3. Соматотропный гормон увеличивает стимулированную зимозаном бактерицидную активность лейкоцитов, не изменяя ее спонтанного уровня. Максимальное увеличение активности наблюдается при концентрации гормона 10 нг/мл. Стимуляция бактерицидной активности клеток крови положительно коррелирует с увеличением их фагоцитарной активности и количеством поглощаемых объектов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гордиенко С. М. // Лаб. дело. — 1983. — № 2. — С. 21—24.
2. Каплин В. Н., Кузнецов В. Ф., Обернебесова Т. П. // I съезд иммунологов России, 1-й: Тезисы докладов, 23—25 июня 1992 г. — Новосибирск, 1992. — С. 200—201.
3. Корнева Е. А., Шхинец Э. К. Гормоны и иммунная система. — Л., 1988.
4. Badolato R., Bond H. M., Valerio G. et al. // J. clin. Endocrinol. — 1994. — Vol. 79. — P. 984—990.
5. Fu Y. K., Arkins S., Fuh G. et al. // J. clin. Invest. — 1992. — Vol. 89. — P. 451—457.
6. Gala prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system // Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.). — 1991. — Vol. 198. — P. 513—527.
7. Kelley K. W. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1990. — Vol. 594. — P. 95—103.
8. Sakai M., Kajita Y., Kobayashi M. et al. // Vet. Immunol. Immunopathol. — 1997. — Vol. 57. — P. 147—152.

Поступила 17.02.99

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2000

УДК 616.154:577.171-078.33

К. А. Прядко, Л. М. Шкуматов, Г. А. Горох, И. М. Багель

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ТИРОКСИНА В КРОВИ КРЫС С ПОМОЩЬЮ РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАБОРОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ГОРМОНА В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Лаборатория эндокринологии (зав. — канд. мед. наук И. М. Багель) Института радиобиологии НАН Республики Беларусь

Изучено влияние "матрикс-эффекта" на определение концентрации общего T_4 в крови крыс радиоиммунологическими наборами. Для этого у 59 крыс уровень T_4 определяли 4 раза: исходными и модифицированными наборами РИО- T_4 -ПГ и РИА- T_4 -СТ производства ХОП ИБОХ НАН Республики Беларусь (Минск). Модификация состояла в том, что стандартные растворы готовили на освобожденной от T_4 сыворотке крыс. Между уровнями T_4 , определенными у крыс с помощью исходных и модифицированных наборов, существует корреляционная зависимость. В случае РИО- T_4 -ПГ коэффициент корреляции (r) равен 0,9809, а уравнение регрессии имеет вид $y = 0,64x + 5,087$, а в случае РИА- T_4 -СТ $r = 0,9802$ и $y = 0,875x - 1,712$. Следовательно, в области реальных концентраций определение уровня T_4 обоими исходными наборами приводит к занижению результатов. Однако колебания концентрации T_4 в крови контрольных крыс существенно превышают это занижение. Делается вывод о том, что при наличии одновременных контрольных групп коммерческие наборы для определения уровня T_4 производства ХОП ИБОХ НАН Республики Беларусь можно использовать для определения концентрации гормона в крови крыс.

The relationship between the matrix effect and radioimmunoassayed concentrations of total T_4 in the blood of rats was studied. T_4 was measured 4 times in 59 rats: by the initial and modified RIO- T_4 -PG and RIA- T_4 -ST kits (Minsk). The modification consisted in the following: standard solutions were prepared on rat serum free from T_4 . The levels of T_4 measured by the original and modified kits correlated. For RIO- T_4 -PG the correlation coefficient $r = 0.9809$ and regression equation is $y = 0.64x + 5.087$, and for RIA- T_4 -ST $r = 0.9802$ and $y = 0.875x - 1.712$. Hence, for real concentrations, measurements of T_4 by both original kits give underrated values, but the fluctuations of T_4 in the control rats appreciably surpassed this underrating. We conclude that the above mentioned commercial kits for measuring T_4 can be used for measuring the hormone concentration in the rat blood, provided the appropriate reference groups are available.