

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., Шхинек 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 $\rho = 0.9809$ and regression equation is $y = 0.64x + 5.087$, and for RIA- T_4 -ST $\rho = 0.9802$ 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.

При исследовании концентрации гормонов в крови животных часто возникают методические проблемы использования радиоиммунологических наборов (обычно предназначенных для работы с кровью людей), которые обусловлены видовой специфичностью антигенов. Если гормоны не обладают видовой специфичностью, то коммерческие наборы, например для определения уровня тироксина (T_4), широко используют при работе с образцами крови животных, в том числе крыс [1, 2, 5–8]. При этом предполагается, что возможные неопределенности радиоиммунологического анализа, возникающие из-за различий состава стандартных и определяемых проб, так называемого "матрикс-эффекта", невелики [9]. Это предположение, однако, является в значительной мере интуитивным. Дело в том, что литература, относящаяся к вопросу влияния "матрикс-эффекта" на определение концентрации T_4 , крайне скудна, и за последние 20 лет была опубликована только одна работа [10].

В связи со сказанным целью настоящего исследования явилось изучение влияния "матрикс-эффекта" на определение уровня T_4 в крови крыс и установление возможности использования коммерческих наборов для определения концентрации гормона в крови человека для работы с образцами крови крыс.

Материалы и методы

Животные. В работе использовали самцов белых беспородных крыс стадного разведения. Животных содержали по 5–8 голов в клетках, расположенных на стеллажах, в отопляемых вентилируемых помещениях. Корм, состоящий из комбикормов, зерна, овощей, творога, зелени, витаминных и минеральных добавок, они получали 1 раз в день до 11 ч по установленным нормам. Воду давали без ограничений.

Наборы и их модификация. Для определения уровня T_4 применяли наборы производства ХОП ИБОХ НАН Республики Беларусь (Минск): РИО- T_4 -ПГ и РИА- T_4 -СТ. В первом наборе для разделения свободной и связанной с антителами форм лиганда используется раствор полиэтиленгликоля, а во втором — иммобилизованные на стенках пробирки антитела к T_4 . Использовали исходные (в обычной комплектации) и модифицированные наборы. Модифицированные наборы содержали все компоненты исходных наборов, за исключением калибровочных проб, которые заменяли стандартными разведениями (0, 25, 50, 100, 200, 400 нмоль \cdot л $^{-1}$) T_4 ("Sigma", США) в лишенной T_4 "нулевой" сыворотке крови крыс.

Для удаления эндогенного T_4 из сыворотки ее обрабатывали активированным углем Norit A ("Serva", Германия) (конечная концентрация угля 3%) в течение 3 ч при 37°C и постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Затем, чтобы отделить сыворотку крови от активированного угля, ее центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин. Всю процедуру повторяли 2 раза. Для полного удаления самых мелких частиц активированного угля сыворотку центрифугировали еще 2 раза по 20 мин при 14 000 g. Степень очистки сыворотки от T_4 контролировали

с помощью добавленного ^{125}I - T_4 . В результате описанной процедуры сыворотка освобождается от T_4 более чем на 99%. В качестве консерванта к ней добавляли NaN_3 до конечной концентрации 0,1%. Аликвоты приготовленных таким образом калибровочных проб хранили до использования при $-20^\circ C$.

Результаты определения концентрации T_4 исходными и модифицированными наборами РИО- T_4 -ПГ и РИА- T_4 -СТ в одних и тех же пробах сыворотки крови крыс подвергали математическому анализу, используя компьютерную программу "Stadia".

Результаты и их обсуждение

Для изучения влияния "матрикс-эффекта" на определение уровня T_4 в крови крыс с помощью наборов для его определения в крови людей было предпринято сравнительное исследование концентрации гормона в крови 59 крыс. Концентрацию T_4 в каждой из 59 проб измеряли 4 раза: первый раз — исходным, второй — модифицированным набором с ПГ-системой разделения, третий и четвертый — соответственно исходным и модифицированным наборами с СТ-системой разделения.

На рис. 1 представлены результаты математической обработки данных определения концентрации T_4 исходным и модифицированным наборами РИО- T_4 -ПГ. На нем изображена система прямоугольных координат, по осям которой отложены значения (в нмоль \cdot л $^{-1}$) концентрации T_4 в сыворотке крови крыс: по оси абсцисс — результаты измерений с помощью модифицированного, а по оси ординат — исходного набора. Прямая 1 — теоретическая. Она получалась бы в том случае, если бы концентрации T_4 в каждой пробе, определяемые исходным и модифицированным наборами, полностью совпадали, т. е. $y = x$. Следовательно, урав-

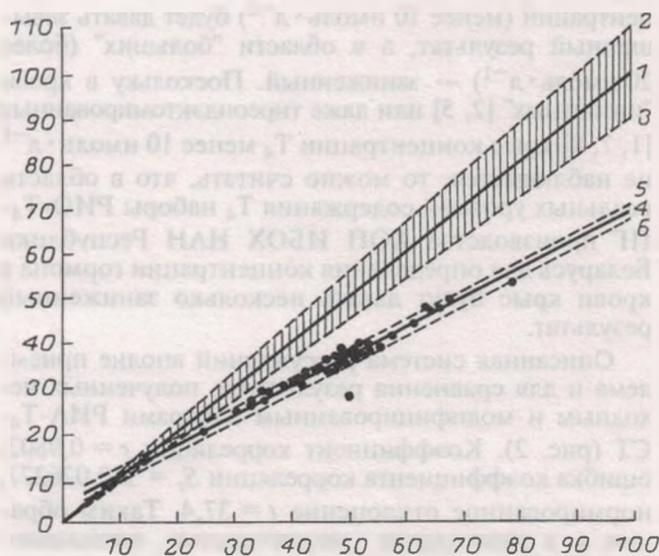


Рис. 1. Сравнение результатов определения концентрации T_4 (в нмоль \cdot л $^{-1}$) в крови крыс модифицированными (по оси абсцисс) и исходными (по оси ординат) наборами РИО- T_4 -ПГ.

Здесь и на рис. 2: 1 — теоретическая прямая; 2, 3 — прямые, ограничивающие область 90–110% "открытия", добавленного в аналитическую систему T_4 ; 4 — линия регрессии; 5, 6 — доверительные границы линии регрессии.

нение этой прямой имеет вид $y = 1x + 0$. Заштрихованное пространство, ограниченное прямыми 2 и 3, представляет собой область значений 90—110% "открытия" добавленного в аналитическую систему T_4 . По существу — это область $\pm 10\%$ ошибки метода. Такая ошибка считается приемлемой для медико-биологических методов исследований [3]. Точки, изображенные на рис. 1, получены пересечением значений концентрации T_4 каждой пробы, определенных исходным и модифицированным наборами. Они не составляют прямой линии, а рассеяны на плоскости. Это указывает на наличие между величинами не функциональной, а статистической или корреляционной связи. Эта связь, однако, довольно тесная, о чем свидетельствует большой коэффициент корреляции (r), равный 0,9809. Для малых выборок, очень больших или очень малых значений r [4] ошибка коэффициента

корреляции S_r определяется по формуле $S_r = \frac{\sqrt{1-r^2}}{\sqrt{n-2}}$ и в настоящем случае составляет $\pm 0,0256619$, а нормированное отклонение $t = \frac{r}{\sqrt{1-r^2}} \sqrt{n-2} = 38,1$.

Учитывая эти данные, есть основание с вероятностью более 99,9% утверждать, что между величинами концентрации T_4 в крови крыс, определяемыми с помощью исходных и модифицированных наборов РИО- T_4 -ПГ, существует прямая корреляционная зависимость. Имеется прямая (4 на рис. 1) — геометрическое место точек — сумма квадратов отклонений которых от эмпирически найденных будет наименьшей. Эта прямая — линия регрессии. Ее коэффициенты: $A = 5,085 \pm 0,547$ и $B = 0,640 \pm 0,0098$, а уравнение $y = 0,640x + 5,087$. Гиперболы 5 и 6 представляют собой границы доверительного интервала линии регрессии.

Из приведенных данных следует, что определение концентрации T_4 в крови крыс с помощью исходных наборов РИО- T_4 -ПГ в области "малых" концентраций (менее $10 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$) будет давать завышенный результат, а в области "больших" (более $20 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$) — заниженный. Поскольку в крови "интактных" [2, 5] или даже тиреоидэктомированных [1, 7, 8] крыс концентрации T_4 менее $10 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ не наблюдается, то можно считать, что в области реальных уровней содержания T_4 наборы РИО- T_4 -ПГ производства ХОП ИБОХ НАН Республики Беларусь для определения концентрации гормона в крови крыс будут давать несколько заниженный результат.

Описанная система рассуждений вполне приемлема и для сравнения результатов, полученных исходным и модифицированным наборами РИА- T_4 -СТ (рис. 2). Коэффициент корреляции $r = 0,9802$, ошибка коэффициента корреляции $S_r = \pm 0,026277$, нормированное отклонение $t = 37,4$. Таким образом, и в этом случае с вероятностью, превышающей 99,9%, можно утверждать, что связь между величинами концентрации T_4 в крови крыс, определенными исходным и модифицированным наборами РИА- T_4 -СТ, не случайна. Математическая обработка результатов дала возможность определить коэффициенты линии регрессии: $A = 1,712 \pm 1,056$ и

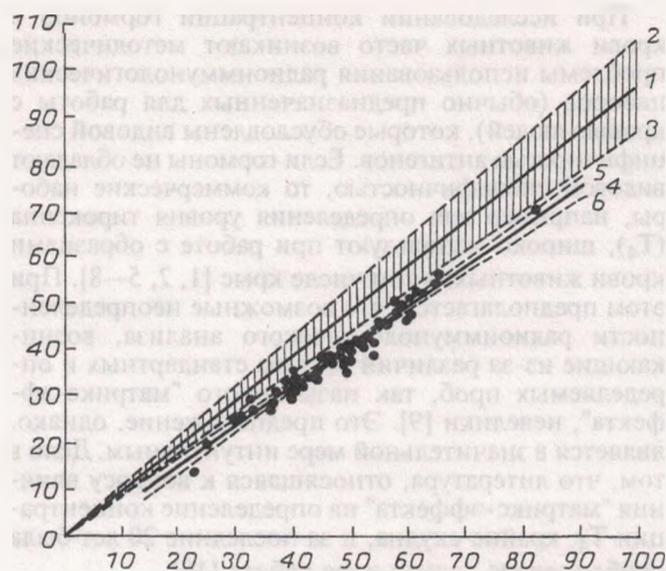


Рис. 2. Сравнение результатов определения концентрации T_4 (в $\text{нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$) в крови крыс модифицированными (по оси абсцисс) и исходными (по оси ординат) наборами РИА- T_4 -СТ.

$B = 0,875 \pm 0,023$. Исходя из этого, линия регрессии описывается следующим уравнением прямой: $y = 0,875x - 1,712$.

Следовательно, в области концентраций T_4 , обычных для сыворотки крови крыс, исходные наборы РИО- T_4 -ПГ и РИА- T_4 -СТ должны давать заниженные по сравнению с "истинными", определенными с помощью "крысиных" стандартов, результаты. Действительно, среднее значение концентрации гормона в крови 20 интактных крыс, определенное модифицированным набором РИО- T_4 -ПГ, составило $41,82 \pm 6,06 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$, эта же величина, полученная для исходного набора, равна $34,54 \pm 4,28 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$. Для наборов РИА- T_4 -СТ эти величины составили $47,69 \pm 4,56$ и $36,14 \pm 4,34 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ соответственно. Как и ожидалось, определяемые с помощью исходных ПГ-наборов уровни T_4 оказались заниженными на 17%, а для СТ-наборов — на 24%, однако это занижение оказалось статистически недостоверным ($p > 0,05$).

Таким образом, линейный характер регрессии между величинами концентрации T_4 в крови крыс, а также отсутствие статистически значимой разницы в уровнях гормона у одних и тех же групп животных, определяемых исходными и модифицированными наборами, свидетельствуют в пользу того, что наборы РИО- T_4 -ПГ и РИА- T_4 -СТ можно применять для измерения уровней T_4 в крови крыс. В пользу этого положения свидетельствуют и сведения о колебаниях концентрации T_4 в крови интактных животных. Содержание T_4 в сыворотке крови 9 групп самцов белых крыс, близких по возрасту, содержащихся практически в одинаковых условиях, кровь у которых брали в одно время суток (до полудня) и года (в весенне-летний период), составило (в $\text{нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$): $64,5 \pm 4,5$ ($n = 6$); $47,2 \pm 6,1$ ($n = 6$); $29,0 \pm 3,7$ ($n = 7$); $22,5 \pm 5,8$ ($n = 8$); $36,7 \pm 3,0$ ($n = 6$); $36,8 \pm 1,4$ ($n = 8$); $35,3 \pm 3,8$ ($n = 7$); $54,1 \pm 3,7$ ($n = 7$); $27,4 \pm 1,5$ ($n = 6$). Из этих данных видно,

что размах колебаний этого показателя (отношения максимального значения к минимальному) равен 2,86, что существенно превосходит ошибки метода определения T_4 у крыс, свойственные исходным наборам, причем разница между минимальной и максимальной величинами статистически высоко достоверна ($p < 0,01$). Все это подтверждает ранее высказанное мнение о том, что при проведении экспериментальных исследований, касающихся определения концентрации T_4 в крови крыс, следует одновременно использовать и группы контрольных животных [7, 8]. При этом в случае относительного (в процентах) сравнения результатов неопределенности метода нивелируются.

Выводы

1. Между величинами концентрации T_4 в крови одних и тех же крыс, определяемыми исходными (с "человеческими" стандартами) и модифицированными (с "крысиными" стандартами) наборами РИО- T_4 -ПГ и РИА- T_4 -СТ, существует прямая корреляционная зависимость с коэффициентом корреляции, близким к 1 (0,9809 и 0,9802 соответственно).

2. Установлено, что в области реальных концентраций определение уровня T_4 в крови крыс коммерческими наборами (РИО- T_4 -ПГ и РИА- T_4 -СТ) дает несколько заниженные результаты.

3. При проведении исследований, касающихся определения концентрации T_4 в крови крыс с помощью коммерческих наборов, необходимо наличие одновременных контролей. При этом в случае относительного сравнения результатов неопределенности радиоиммунологического анализа, обусловленные "матрикс-эффектом", нивелируются.

ЛИТЕРАТУРА

1. Косовский М. И., Каткова С. П., Мирахмедов М. И., Рахмиджанов Р. Т. // Пробл. эндокринологии. — 1989. — № 3. — С. 50—54.
2. Красноперов Р. А., Глумова В. А., Трусов В. В. и др. // Там же. — 1992. — № 3. — С. 38—41.
3. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В. В. Меньшикова. — М., 1987.
4. Рокитский П. Ф. Биологическая статистика. — Минск, 1973.
5. Рязицкий С. Н., Глумова В. А. // Бюл. экспер. биол. — 1988. — Т. 107, № 3. — С. 353—356.
6. Туракулов Я. Х., Ташиходжаева Т. П., Артыкбаева Г. М. // Пробл. эндокринологии. — 1991. — № 4. — С. 44—46.
7. Шкуматов Л. М., Крылова И. И., Маркова А. Г., Багель И. М. // Радион. биол. радиоэкол. — 1994. — № 3. — С. 386—390.
8. Шкуматов Л. М., Крылова И. И., Маркова А. Г., Багель И. М. // Вопр. мед. химии. — 1996. — № 2. — С. 111—114.
9. Jordan D., Rousset B., Perrin F. et al. // Endocrinology. — 1980. — Vol. 107. — P. 1245—1248.
10. Stringer V. J. H., Wynford-Thomas D. // Hormone Res. — 1982. — Vol. 16. — P. 392—397.

Поступила 25.05.99

◆ ОБЗОР

© В. В. ФАДЕЕВ, Г. А. МЕЛЬНИЧЕНКО, 2000

УДК 615.357.03:616.45-008.64-036.12(048.8)

В. В. Фадеев, Г. А. Мельниченко

ЗАМЕСТИТЕЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ ПЕРВИЧНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ НАДПОЧЕЧНИКОВОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Кафедра эндокринологии (зав. — акад. РАМН И. И. Дедов) ММА им. И. М. Сеченова

Надпочечниковая недостаточность — клинический синдром, обусловленный недостаточной секрецией гормонов корой надпочечников, являющийся результатом нарушения функционирования одного или нескольких звеньев гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [2]. Первичная хроническая надпочечниковая недостаточность (1-ХНН) развивается в результате разрушения более 90% коры обоих надпочечников патологическим процессом. Основными причинами 1-ХНН в настоящее время являются аутоиммунная (80—85%) и туберкулезная (5—10%) деструкция коры надпочечников [2, 3]. 1-ХНН указанной этиологии более известна под названием "болезнь Аддисона". 1-ХНН является относительно редким заболеванием (40—110 новых случаев на 1 млн населения в год) [2, 3], однако имеет немалое значение в практике эндокринологии. Все без исключения пациенты с установленным диагнозом 1-ХНН нуждаются в пожизненной заместительной терапии препаратами кортикостероидов (КС), о которой и пойдет речь в этой работе.

История вопроса

После классического описания 1-ХНН Томасом Аддисоном в 1855 г. эффективная заместительная терапия заболевания оказалась возможной только в 30-х годах XX века. Первая попытка лечения больных экстрактом целых надпочечников, который назначали внутрь, была предпринята Stockman в 1867 г. и оказалась неудачной. Экстракт надпочечников, приготовленный в 1894 г. Oliver и Schäfer, давал четкий вазоконстрикторный эффект. В дальнейшем авторами из него был выделен адреналин, и безрезультатные попытки использования последнего для лечения болезни Аддисона привели к исчезновению интереса к исследованию других гормонов коры надпочечников вплоть до конца 20-х годов XX века.

В 1927 г. Rogoff и Stewart впервые показали эффективность введения липидного экстракта надпочечников адреналэктомизированным собакам, а F. Hartmann показал, что эффективность такого экстракта не зависит от содержания в нем адрена-