



Evaluation of the effect of GHRH(1-44)NH₂ on the secretion of interleukin-2 (IL-2) and soluble IL-2 receptor α (sIL-2R α) from human peripheral blood mononuclear cells in vitro

lek. med. Agnieszka Siejka, dr n. med. Tomasz Stępień, dr n. med. Hanna Ławnicka,
dr n. med. Roman Krupiński, prof. dr med. Jan Komorowski, prof. dr hab. med. Henryk Stępień

Department of Endocrinology, Medical University of Łódź

Summary

Objective: The bidirectional communication between the neuroendocrine and the immune systems is now a subject of an intensive investigation. Somatoliberin (GHRH) is a hypothalamic hormone that enhances the synthesis and the release of growth hormone (GH) from the anterior pituitary cells. Few recent reports demonstrate also role of the neuropeptide in the regulation of the immune system function.

Aim: The aim of the study was to examine the influence of GHRH on IL-2 as well as sIL-2R α secretion from mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells.

Material and method: Mononuclear cells (PBMC) were isolated from the peripheral blood of healthy adults according to the technique described by Böyum. Cells, cultured 24 hours at 37^o C in humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂, were stimulated with phytohemagglutinin (PHA; 10 μ g/ml), and then GHRH(1-44)NH₂ at the final concentrations 10⁻¹², 10⁻¹⁰, 10⁻⁸ and 10⁻⁶ M was added to appropriate wells. ELISA kits were used to measure IL-2 and sIL-2R α concentrations in the supernatants of cultured cells. Comparisons between tested groups were made by U Mann-Whitney test. The differences were considered significant if $p < 0.05$.

Results: GHRH stimulated the secretion of IL-2 into the supernatants acting significantly at the concentration of 10⁻¹²M ($p < 0.001$). Moreover, GHRH at concentrations 10⁻¹⁰M and 10⁻⁸M significantly increased the secretion of sIL-2R α as well ($p < 0.001$). Strong positive correlation between tested GHRH concentrations and sIL-2R α levels in the supernatants was demonstrated ($r = 0.8664$; $p < 0.001$).

Conclusions: The results demonstrate the potential involvement of GHRH in the regulation of T lymphocytes secretory function.

(*Pol J Endocrinol* 2005; 5(56): 773-778)

Key words: interleukin-2, interleukin-2 receptor, somatoliberin, neuroimmunomodulation



Prof. Henryk Stępień, M.D., Ph.D.;
Immunoendocrinology Department, Chair of
Endocrinology, Medical University of Lodz,
91-425 Lodz, Sterling 3,
Tel/Fax: +48 42 632 48 54,
e-mail: hstep@tlen.pl

The study was supported by grants of the Medical University of Lodz No 502-11-724/92 and 502-11-187.



Ocena wpływu GHRH(1-44)NH₂ na wydzielanie interleukiny-2 (IL-2) oraz rozpuszczalnego receptora α dla IL-2 (sIL-2R α) przez komórki krwi obwodowej człowieka w warunkach in vitro

lek. med. Agnieszka Siejka, dr n. med. Tomasz Stępień, dr n. med. Hanna Ławnicka,
dr n. med. Roman Krupiński, prof. dr med. Jan Komorowski, prof. dr hab. med. Henryk Stępień

Katedra Endokrynologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie

Założenia: Wzajemne powiązania zachodzące pomiędzy układami neuroendokrynnym i immunologicznym są obecnie przedmiotem intensywnych badań. Somatoliberyna (GHRH) jest hormonem podwzgórzowym nasilającym uwalnianie i syntezę hormonu wzrostu (GH) z komórek przedniego płata przysadki. Nieliczne doniesienia z ostatnich lat wskazują ponadto na udział tego neurohormonu w regulacji czynności układu immunologicznego.

Cel pracy: Celem pracy było zbadanie wpływu GHRH na wydzielanie IL-2 oraz sIL-2R α z pobudzonych mitogenem jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka.

Materiał i metody: Badania przeprowadzono na jednojądrzastych komórkach wyizolowanych z krwi obwodowej człowieka (PBMC) zgodnie z metodą opisaną przez Böyuma. Komórki, hodowane przez 24 godziny w 37° C w atmosferze zawierającej 95% powietrza i 5% CO₂, poddano stymulacji fitohemaglutyniną (PHA; 10 µg/ml) oraz GHRH(1-44)NH₂ w stężeniach 10⁻¹², 10⁻¹⁰, 10⁻⁸ i 10⁻⁶ M. Pomiaru poziomów badanych cytokin dokonano w oparciu o metodę immunoenzymatyczną (ELISA). Analizy statystycznej dokonano przy użyciu testu U Mann-Whitney'a. Za poziom istotności statystycznej przyjęto p<0,05.

Wyniki: Zaobserwowano, że GHRH zwiększa sekrecję IL-2 działając znamienne w stężeniu 10⁻¹²M (p<0,001). Ponadto w stężeniach 10⁻¹⁰M oraz 10⁻⁸M GHRH istotnie statystycznie nasila wydzielanie sIL-2R α (p<0,001). Stwierdzono także silną dodatnią korelację pomiędzy wartościami stężeń sIL-2R α w medium inkubacyjnym a testowanymi stężeniami GHRH(1-44) (r=0,8664; p<0,001).

Wnioski: Przedstawione wyniki wskazują na potencjalny udział GHRH w regulacji czynności sekrecyjnej limfocytów T.

(Endokrymol Pol 2005; 5(56): 773-778)

Słowa kluczowe: interleukina-2, receptor interleukiny-2, somatoliberyna, neuroimmunomodulacja



Prof. dr hab. med. Henryk Stępień; Zakład
Immunoendokrynologii, Katedra Endokrynologii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,
91-425 Łódź, ul. Sterlinga 3,
Tel/Fax: 42 632 48 54,
e-mail: hstep@tlen.pl

Praca finansowana z grantów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
No 502-11-724/92 i 502-11-187.

Wstęp

Badania ostatnich lat wskazują na istnienie ścisłych wielokierunkowych powiązań czynnościowych zachodzących pomiędzy układami: nerwowym, endokrynnym i odpornościowym [1, 2, 3]. Dowiedziono, że niektóre hormony, neuropeptydy i czynniki wzrostowe wytwarzane są w obrębie nie tylko neurosekrecyjnych komórek podwzgórz, ale także przez komórki układu odpornościowego [4, 5]. Fakty powyższe, w powiązaniu ze znalezieniem swoistych receptorów dla niektórych hormonów i neuropeptydów na limfocytach, monocytach i innych komórkach układu immunologicznego, wskazują na możliwość miejscowego, autokrynnego i/lub parakrynnego działania neuropeptydów na immunocyty [6, 7, 8, 9, 10]. Z drugiej strony stwierdzono, że niektóre cytokiny wytwa-

rzane być mogą przez komórki gruczołów wydzielania wewnętrznego (np. przez komórki przedniego płata przysadki, tyreocyty) wpływając tym samym na ich funkcję [11, 12, 13, 14].

Hormon uwalniający hormon wzrostu (GHRH; growth hormone-releasing hormone), zwany także somatoliberyną, jest wyizolowanym w 1982 roku [15, 16], 44-aminokwasowym neuropeptydem, który silnie pobudza syntezę i uwalnianie hormonu wzrostu (GH) z komórek somatotropowych przysadki [17]. Hormon ten nasila także proliferację i różnicowanie tych komórek [18, 19]. Podobną aktywność biologiczną u człowieka wykazuje peptyd zbudowany z 40 aminokwasów (GHRH(1-40)) [20]. Obecność GHRH stwierdzono nie tylko w podwzgórz, lecz także w neuroendokrynnych komórkach należących do układu APUD. Wykazano jednocześnie autokrynnne i/lub

parakrynnie działające miejscowo wytwarzanego GHRH [21, 22, 23] zachodzące za pośrednictwem wiązania ze swoistym receptorem [24]. Obecność biologicznie czynnego GHRH oraz ekspresję mRNA dla GHRH wykazano także w obrębie komórek układu immunologicznego [25, 26, 27, 28] oraz zidentyfikowano specyficzne miejsca wiążące GHRH na powierzchni tymocytów i splenocytów [29]. Ponadto ostatnie doniesienia sugerują udział GHRH w regulacji niektórych funkcji układu immunologicznego oraz wydzielania cytokin [30, 31, 32, 33].

Interleukina-2 (IL-2) została po raz pierwszy opisana przez Morgana i wsp. w 1976 roku jako czynnik wzrostowy limfocytów T (T-cell growth factor, TCGF) [34]. Zbudowana ze 133 aminokwasów o masie cząsteczkowej 15 kDa [35, 36] cytokina ta wytwarzana jest przez subpopulację aktywowanych (m.in. przez fitohemaglutyninę, IL-1, IL-6), pomocniczych limfocytów T (Th1) [36, 37]. IL-2 jest najważniejszym czynnikiem wzrostowym limfocytów T, ma także podstawowe znaczenie w powstawaniu pierwotnej odpowiedzi immunologicznej limfocytów B i zwiększa wytwarzanie immunoglobulin. Ponadto pobudza wytwarzanie innych cytokin, takich jak IL-4, IL-5 czy IFN- γ [35].

IL-2 wykazuje silne właściwości przeciwnowotworowe poprzez aktywację naturalnych komórek cytotoksycznych, nasilenie sekrecji innych cytokin, hamowanie angiogenezy [38]. IL-2 indukuje powstawanie komórek LAK (lymphokine activated killer cells) i TIL (tumour infiltrated lymphocytes). Znajduje zastosowanie w leczeniu raka nerki (często łącznie z IFN- α) [39, 40], czerniaka [41, 42], niektórych typów chłoniaków i białaczek – łącznie z IL-12 [35, 43] oraz innych nowotworów [44].

Receptor dla IL-2 (IL-2R) składa się z 3 łańcuchów: α , β i γ , z których każdy ma fragment zewnątrzkomórkowy złożony z 215 aminokwasów. W skład receptorów o dużym powinowactwie wchodzi 3 wyżej wymienione łańcuchy. Związanie się IL-2 z receptorami o dużym powinowactwie na aktywowanych limfocytach T jest niezbędnym elementem zapoczątkowującym proliferację tych komórek [37].

Spoczynkowe limfocyty T wykazują ekspresję jedynie IL-2R β i IL-2R γ . Z chwilą aktywacji limfocytów T przez IL-2, zaczynają one syntetyzować IL-2R α . IL-2R α (zwany także antygenem Tac oraz CD25) jest 351-aminokwasową przezbłonową glikoproteiną o masie cząsteczkowej 55 kDa, której fragment cytoplazmatyczny składa się jedynie z 13 aminokwasów [37, 45, 46]. Rozpuszczalna forma IL-2R α (sIL-2R) pojawia się w surowicy zależnie od zwiększonej ekspresji receptora na komórkach [47, 48, 49].

Rola biologiczna sIL-2R α nie jest do końca znana, tym bardziej, że forma ta ma niskie powinowactwo do IL-2. Podwyższone stężenia sIL-2R obserwowano

w stwardnieniu rozsianym, przy czym podawanie glikokortykosteroidów prowadziło do obniżenia stężeń sIL-2R [50]. U osób z nowotworami szyjki macicy, jelita grubego, przelyku i trzustki, stężenia sIL-2R korelowały ze stopniem zaawansowania choroby [47, 51, 52, 53].

Celem obecnej pracy było zbadanie wpływu GHRH na sekrecję IL-2 oraz sIL-2R α z komórek krwi obwodowej człowieka w warunkach *in vitro*.

Materiał i metody

Krew w ilości 40 ml pobrano od krwiodawców, mężczyzn w wieku 25-30 lat (n=8), będących na czczo, w godz. 8.00-9.00 rano, do jałowych próbek zawierających heparynę.

Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) zostały wyizolowane ze świeżo pobranej heparynizowanej krwi przez wirowanie w gradiencie gęstości przy użyciu preparatu Lymphoprep (Nyegaard & Co. / S, Oslo, Norway), według techniki opisanej przez Böyum [54]. Komórki zostały następnie dwukrotnie przepłukane pełnym medium (RPMI-1640, Sigma, z surowicą cielęcą /FCS, Hungarpol/ w ilości 10% końcowej objętości medium, i gentamycyną /Krka, SLO/ w końcowym stężeniu 1 μ g/ml). Żywotność komórek (>90%) została określona przy użyciu błękitu trypanu. Następnie komórki zostały zawieszony ponownie w pełnym medium hodowlanym i przeniesione do 24-studzienkowych płytek hodowlanych (Nunc Multidish 24 wells, NUNC, Denmark) w końcowej ilości $1,4 \div 1,7 \times 10^6$ komórek/ml. Płytki hodowlane inkubowano następnie przez 2 godziny w cieplarni (37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności) w obecności suboptymalnej dawki (10 μ g/ml) fitohemaglutyniny (PHA, Murex, UK), po czym do odpowiednich studzienek dodano GHRH(1-44)NH₂ (Sigma, USA) w końcowych stężeniach 10⁻¹², 10⁻¹⁰, 10⁻⁸ i 10⁻⁶ M. Wszystkie hodowle komórkowe inkubowano następnie w cieplarni (37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności). Po 24 godzinach od momentu rozpoczęcia inkubacji ze wszystkich studzienek zbierano supernatant. Odwirowane próbki nadsącza (1400 obr./min. przez 10 minut) zostały przeniesione do próbek 1ml i zamrożone w temperaturze -80°C do czasu oznaczeń stężeń IL-2 i sIL-2R α .

Pomiaru stężeń badanych cytokin w próbkach dokonano zestawami immunoenzymatycznymi specyficznymi dla każdej z cytokin, zgodnie z instrukcjami dołączonymi do zestawów. Użyto zestawów: Quantikine human IL-2 (R&D Systems, USA): czułość <7 pg/ml; precyzja wewnętrzseryjna (CV) = 4,3% oraz Quantikine human IL-2 sR α (R&D Systems, USA) : czułość <10 pg/ml; precyzja wewnętrzseryjna (CV) = 6,1%.

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu U Mann-Whitney'a dla poziomu istotności statystycznej p<0,05.

W celu określenia zależności pomiędzy stosowanymi stężeniami GHRH(1-44)NH₂ a otrzymanymi wartościami stężeń sIL-2R α zastosowano analizę regresji i wyliczono współczynniki korelacji *r* Pearson'a.

Wyniki

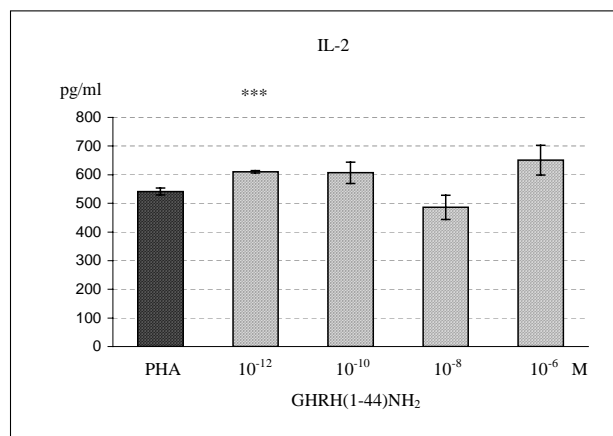
Zgodnie z oczekiwaniami PHA istotnie statystycznie zwiększyła sekrecję zarówno IL-2 jak i sIL-2R α z komórek krwi obwodowej ($p < 0,001$).

Dodanie GHRH(1-44)NH₂ w stężeniu 10⁻¹²M do hodowli PBMC aktywowanych PHA znamienne zwiększyło wydzielanie IL-2 z tych komórek ($p < 0,05$). (Ryc. 1).

Po 24 godzinach inkubacji GHRH(1-44)NH₂ pobudził także wydzielanie sIL-2R α działając znamienne w stężeniach 10⁻¹⁰M oraz 10⁻⁸M ($p < 0,001$). (Ryc. 2). Analizując zależność pomiędzy otrzymanymi wartościami stężeń sIL-2R α w płynach inkubacyjnych a zastosowanymi stężeniami GHRH(1-44)NH₂ stwierdzono silną dodatnią ($p < 0,001$) korelację tych zmiennych. Wyznaczono współczynnik korelacji *r*, który wynosił 0,8664 (Ryc. 3).

Dyskusja

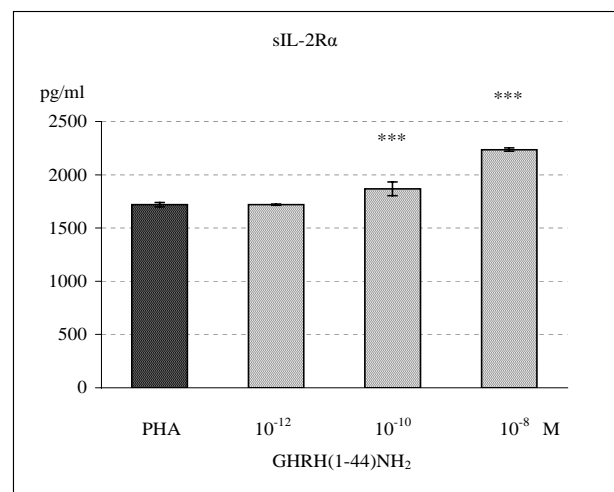
W badaniach prezentowanych w pracy wykazaliśmy po raz pierwszy pobudzający wpływ GHRH na sekrecję IL-2 i sIL-2R α przez hodowane w warunkach *in vitro* limfocyty krwi obwodowej człowieka.



Ryc. 1 Wpływ GHRH(1-44)NH₂ na wydzielanie IL-2 przez PBMC w hodowli *in vitro* (dane pochodzące z 4 oddzielnych hodowli komórkowych; $n=8$ dla każdego eksperymentu). $\bar{x} \pm \text{SEM}$; PHA – fitohemaglutynina; *** $p < 0,001$ vs PHA.

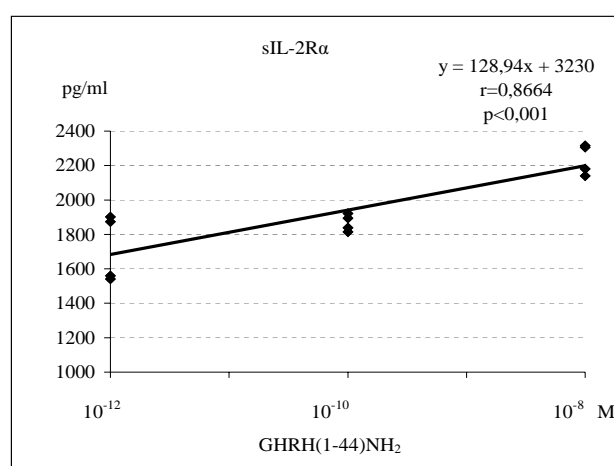
Fig. 1 Effect of human GHRH(1-44)NH₂ at 10⁻¹² to 10⁻⁶ M concentrations on IL-2 levels in supernatants of PBMC cultured *in vitro* (mean \pm SEM; PHA – phytohemagglutinin; *** $p < 0,001$ vs PHA). The results present the pooled data from four separate cell cultures (8 wells for each concentration in a single experiment).

W dostępnym piśmiennictwie istnieje kilka prac wskazujących na immunomodulacyjne działanie GHRH. Valtorta i wsp. [55], badając wpływ GHRH w stężeniach od 0,006 do 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ na limfocyty T aktywowane PHA stwierdzili, że w niskich stężeniach GHRH(1-29) nasila, a w wyższych stężeniach hamuje proliferację tych komórek. Z kolei GHRH



Ryc. 2 Wpływ GHRH(1-44)NH₂ na wydzielanie sIL-2R α z przez PBMC w hodowli *in vitro* (dane pochodzące z 4 oddzielnych hodowli komórkowych; $n=8$ dla każdego eksperymentu). $\bar{x} \pm \text{SEM}$; PHA – fitohemaglutynina; *** $p < 0,001$ vs PHA.

Fig. 2 Effect of human GHRH(1-44)NH₂ at 10⁻¹² to 10⁻⁸ M concentrations on sIL-2R α levels in supernatants of PBMC cultured *in vitro* (mean \pm SEM; PHA – phytohemagglutinin; *** $p < 0,001$ vs PHA). The results present the pooled data from four separate cell cultures (8 wells for each concentration in a single experiment).



Ryc. 3 Korelacja dawek GHRH(1-44)NH₂ i poziomów sIL-2R α w supernatantach pochodzących z hodowli komórkowych ($r=0,8664$; $p < 0,001$).

Fig. 3 Correlation between GHRH(1-44)NH₂ concentrations and sIL-2R α levels measured in the supernatants of cultured cells ($r=0,8664$; $p < 0,001$).

(1-44) nie zmieniał istotnie proliferacji limfocytów w badanym zakresie stężeń [55]. Pawlikowski i wsp. [33] obserwowali, że GHRH w stężeniach od 10^{-6} M do 10^{-10} M zmienia aktywność komórek NK. Hamujący wpływ GHRH na aktywność komórek NK wykazali Sirianni i wsp., przy czym antagonistą receptora dla wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP) był w stanie częściowo odwrócić ten efekt [56]. Zelazowski i wsp. [57] wykazali znamienne hamowanie chemotaksji leukocytów krwi obwodowej człowieka pod wpływem GHRH w stężeniach 10^{-6} M oraz 10^{-8} M.

Badania dotyczące wpływu GHRH na aktywność limfocytów T i wydzielanie przez nie cytokin mają charakter kontrowersyjny. Wyniki obecnej pracy wskazujące na stymulujący wpływ GHRH na sekrecję IL-2 są zbieżne z danymi opublikowanymi przez Khorram i wsp., którzy w warunkach *in vivo* u ludzi obserwowali wzrost poziomu IL-2 o 50% ($p < 0,05$) pod wpływem podawanego GHRH (10 μ g/kg m.c. przez 16 tygodni) [30]. Z drugiej strony jednak Valtorta i wsp. [55] *in vitro* nie obserwowali zmian wydzielania IL-2 z pobudzonych mitogenem PBMC pod wpływem GHRH (1-44). W tych samych badaniach wysokie stężenia syntetycznego fragmentu GHRH(1-29) hamowały sekrecję IL-2 z aktywowanych PHA limfocytów T.

Wykazane przez nas pobudzenie sekrecji sIL-2R α pod wpływem GHRH pozostaje w zgodności z wynikami badań *in vivo* [30], w których to podawany podskórnie GHRH istotnie zwiększał ekspresję mRNA dla IL-2R w limfocytach ($p < 0,001$) oraz stężenie rozpuszczalnej formy IL-2R ($p < 0,05$) począwszy od czwartego tygodnia od momentu podania. Valtorta i wsp. [55] *in vitro* nie obserwowali zmian ekspresji IL-2R na pobudzonych mitogenem PBMC pod wpływem GHRH(1-44) stwierdzili natomiast, że wysokie stężenia GHRH(1-29) zmniejszały ekspresję IL-2R na aktywowanych PHA limfocytach T.

Obserwowany modulujący wpływ GHRH na wydzielanie cytokin z jednojądrzastych komórek krwi obwodowej wynikać może z bezpośredniego oddziaływania tego neurohormonu z receptorami obecnymi w błonie komórek docelowych. Dotychczas nie badano występowania receptorów dla GHRH na immunocytach u ludzi. Wyniki uzyskane z badań na gryzoniach pozwalają jednakże wysunąć takie przypuszczenie [29]. Nie można jednak wykluczyć pośredniego wpływu GHRH zachodzącego poprzez pobudzenie sekrecji GH i/lub IGF-I z leukocytów. W dotychczasowych badaniach stwierdzono, że immunocyty wytwarzają GH i IGF-I oraz posiadają receptory dla tych hormonów [58, 59]. Jednakże doniesienia dotyczące wpływu GHRH na sekrecję GH z komórek układu immunologicznego nie są jednoznaczne. Guarcello i wsp. wykazali, że pobudzenie jednojądrzastych leukocytów szczurzych *in vitro* przy udziale GHRH

prowadzi do wzrostu w nich ekspresji mRNA dla GH [29]. Z kolei Hattori i wsp. nie obserwowali żadnych zmian w zakresie sekrecji GH z ludzkich PBMC pod wpływem GHRH i somatostatyny [60]. Za bezpośrednim wpływem GHRH na wydzielanie IL-2 oraz sIL-2R α przemawiają jednak obserwacje dotyczące oddziaływania GH na sekrecję badanych cytokin. GH powodował zwiększenie wydzielania IL-2 tylko z leukocytów nie pobudzanych mitogenem, nie obserwowano natomiast takich zmian w przypadku leukocytów aktywowanych PHA [61]. Ponadto Bozzola i wsp. nie stwierdzili istotnych zmian wydzielania IL-2 z PBMC stymulowanych PHA pod wpływem GH *in vitro* [62].

Podsumowując, w obecnej pracy po raz pierwszy wykazano pobudzające działanie GHRH(1-44)NH₂ na sekrecję IL-2 i sIL-2R α z limfocytów T krwi obwodowej. Uzyskane wyniki pozwalają uznać GHRH za czynnik immunomodulujący. Mechanizmy działania GHRH w regulacji wydzielania badanych cytokin winny zostać dokładniej wyjaśnione w toku dalszych badań.

Piśmiennictwo

1. Basedovsky HO, del Rey A. Immune-neuroendocrine circuits: integrative role of cytokines. *Front Neuroendocrinol.* 1992; 12: 61-94
2. Blalock JE. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunology Today* 1994; 15: 504-511
3. Petrovsky N. Towards a unified model of neuroendocrine-immune interaction. *Immunol Cell Biol* 2001; 79: 350-357
4. Komorowski J, Stępień H, Pawlikowski M. The evidence of thyroliberin/triiodothyronine control of TSH secretory response from human peripheral blood monocytes cultured *in vitro*. *Neuropeptides* 1993; 25: 31-34
5. Reichlin S. Neuroendocrine-immune interactions. *New Engl J Med* 1993; 329: 1246-1253
6. Homo-Delarche F, Dardenne M. The neuroendocrine-immune axis and their receptors in the immune system. *Adv Neuroimmunol* 1991; 1: 204-213
7. Komorowski J, Jankiewicz J, Stępień H. Effects of thyrotropin, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone on sIL-2R *in vitro* secretion from human peripheral blood mononuclear cells. *Cytobios* 1998; 93: 43-48
8. Stępień H. Neuroendokrynną regulacją czynności układu immunologicznego. *Pol Tyg Lek* 1987; 42: 211-214
9. Imura H, Fukata J, Mori T. Cytokines and endocrine function: an interaction between the immune and neuroendocrine systems. *Clin Endocrinol* 1991; 35: 107-115
10. Levite M. Neuropeptides, by direct interaction with T cells, induce cytokine secretion and break the commitment to a distinct T helper phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 12544-12549
11. Kurotani R, Yasuda M, Oyama K, et al. Expression of interleukin-6, interleukin-6 receptor (gp80), and receptor's signal-transducing subunit (gp130) in human normal pituitary glands and pituitary adenomas. *Mod Pathol* 2001; 14: 791-797
12. Komorowski J, Stępień H. *Immunoendokrynologia. W: Immunologia kliniczna.* M.L. Kowalski red., Mediton, Łódź. 2000; 393-404
13. Komorowski J, Stępień H. Wpływ immunoregulatorów na czynność układu hormonalnego. *Pol Tyg Lek* 1992; 47: 991-993
14. Spangelo BL, Gorospe WC. Role of the cytokines in the neuroendocrine-immune system axis. *Front Neuroendocrinol* 1995; 16: 1-22
15. Guillemin R, Brazeau P, Böhlen P, et al. Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science* 1982; 218: 585-587

16. Rivier J, Spiess J, Thorner M, Vale W. Characterisation of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour. *Nature* 1982; 300: 276-278
17. Thorner MO. The discovery of growth hormone-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4671-4676
18. Mayo KE, Hammer RE, Swanson LW, et al. Dramatic pituitary hyperplasia in transgenic mice expressing a human growth hormone-releasing factor gene. *Mol Endocrinol* 1988; 2: 606-612
19. Lloyd RV, Jin L, Chang A, et al. Morphologic effects of hGRH gene expression on the pituitary, liver, and pancreas of MT-hGRH transgenic mice. An in situ hybridization analysis. *Am J Pathol* 1992; 141: 895-906
20. Vance ML. Growth-hormone-releasing-hormone. *Clin Chem* 1990; 36: 415-420
21. Kineman RD. Antitumorigenic actions of growth hormone-releasing hormone antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 532-534
22. Kahan Z, Arencibia JM, Csernus VJ, et al. Expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) messenger ribonucleic acid and the presence of biologically active GHRH in human breast, endometrial, and ovarian cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 582-589
23. Schally AV, Comaru-Schally AM, Nagy A, et al. Hypothalamic hormones and cancer. *Front Neuroendocrinol* 2001; 22: 248-291
24. Gaylinn BD. Growth hormone releasing hormone receptor. *Receptors Channels* 2002; 8: 155-162
25. Stephanou A, Knight RA, Lightman SL. Production of growth hormone-releasing hormone-like peptide and its mRNA by human lymphocytes. *Neuroendocrinology* 1991; 53: 628-633
26. Weigent DA, Blalock JE. Immunoreactive growth hormone-releasing hormone in rat leukocytes. *J Neuroimmunol* 1990; 29: 1-13
27. Khorram O, Garthwaite M, Golos T. The influence of aging and sex hormones on expression of growth hormone-releasing hormone in the human immune system-1. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3157-3161
28. Weigent DA, Riley JE, Galin FS, et al. Detection of growth hormone and growth hormone-releasing hormone-related messenger RNA in rat leukocytes by the polymerase chain reaction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 198: 643-648
29. Guarcello V, Weigent DA, Blalock JE. Growth hormone releasing hormone receptors on thymocytes and splenocytes from rats. *Cell Immunol* 1991; 136: 291-302
30. Khorram O, Yeung M, Vu L, Yen SS. Effects of [norleucine²⁷]growth hormone-releasing hormone (GHRH) (1-29)-NH₂ administration on the immune system of aging men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3590-3596
31. Marshall L, Perras B, Fehm HL, Born J. Changes in immune cell counts and interleukin (IL)-1beta production in humans after a somnogenically active growth hormone-releasing hormone (GHRH) administration. *Brain Behav Immun* 2001; 15: 227-234
32. Dialynas E, Brown-Borg H, Bartke A. Immune function in transgenic mice overexpressing growth hormone (GH) releasing hormone, GH or GH antagonist. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 221: 178-183
33. Pawlikowski M, Zelazowski P, Döhler K, Stepień H. Effects of two neuropeptides, somatoliberin (GRF) and corticoliberin (CRF), on human lymphocyte natural killer activity. *Brain Behav Immun* 1988; 2: 50-56
34. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo RC. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 1976; 193: 1007-1008
35. Robak T. *Biologia i farmakologia cytokin*. PWN, Warszawa 1995
36. Gupta S. Interleukins. Molecular and biological properties. W: *Immunopharmacology in Autoimmune Diseases and Transplantation*, Hans Erik Rugstad et al. Red., Plenum Press, New York, 1992; 71-91
37. Jakóbsiak M. *Immunologia*. PWN, Warszawa 1995
38. Sakkoula E, Pipili-Synetos E, Maragoudakis ME. Involvement of nitric oxide in the inhibition of angiogenesis by interleukin-2. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 793-795
39. Coppin C, Porzolt F, Awa A, et al. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; 25: CD001425
40. Amato RJ. Renal cell carcinoma: review of novel single-agent therapeutics and combination regimens. *Ann Oncol* 2005; 16: 7-15
41. Soni S, Lee DS, DiVito J Jr, et al. Treatment of pediatric ocular melanoma with high-dose interleukin-2 and thalidomide. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002; 24: 488-491
42. Pavlick AC, Adams S, Fink MA, Bailes A. Novel therapeutic agents under investigation for malignant melanoma. *Expert Opin Investig Drugs* 2003; 12: 1545-1558
43. Masztalerz A, Van Luyn M, Werner N, et al. Treatment with IL-2 and IL-12 inhibits tumour cell division in SL2 lymphoma. *Anticancer Res* 2004; 24: 2633-2642
44. Krastev Z, Koltchakov V, Tomov B, Koten JW. Non-melanoma and non-renal cell carcinoma malignancies treated with interleukin-2. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1006-1016
45. Leonard WJ, Depper JM, Crabtree GR, et al. Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor. *Nature* 1984; 311: 626-631
46. Nikaido T, Shimizu A, Ishida N, et al. Molecular cloning of cDNA encoding human interleukin-2 receptor. *Nature* 1984; 311: 631-635
47. Wang LS, Chow KC, Li WY, et al. Clinical significance of serum soluble interleukin 2 receptor- in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1445-1451
48. Waldmann TA. The IL-2/IL-2 receptor system: a target for rational immune intervention. *Immunol Today* 1993; 14: 264-270
49. Fernandez-Botran R. Soluble cytokine receptors: their role in immunoregulation. *FASEB J* 1991; 5: 2567-2574
50. Bansil S, Troiano R, Cook SD, Rohowsky-Kochan C. Serum soluble interleukin-2 receptor levels in chronic progressive, stable and steroid-treated multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1991; 84: 282-285
51. Berghella AM, Pellegrini P, Del Beato T, et al. The significance of an increase in soluble interleukin-2 receptor level in colorectal cancer and its biological regulating role in the physiological switching of the immune response cytokine network from TH1 to TH2 and back. *Cancer Immunol Immunother* 1998; 45: 241-249
52. Hildesheim A, Schiffman MH, Tsukui T, et al. Immune activation in cervical neoplasia: cross-sectional association between plasma soluble interleukin 2 receptor levels and disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 807-813
53. Gansauge F, Steinbach G, Gansauge S, et al. Postic significance of soluble interleukin-2 receptor-alpha in adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Lett* 1998; 134: 193-199
54. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21 (suppl 97): 77-89
55. Valtorta A, Moretta A, Maccario R, et al. Influence of growth hormone-releasing hormone (GHRH) on phytohemagglutinin-induced lymphocyte activation: comparison of two synthetic forms. GHRH and PHA-induced lymphocyte activation. *Thymus* 1991; 18: 51-59
56. Sirianni MC, Annibale B, Tagliaferri F, et al. Modulation of human natural killer activity by vasoactive intestinal peptide (VIP) family. VIP, glucagon and GHRF specifically inhibit NK activity. *Regul Pept* 1992; 38: 79-87
57. Zelazowski P, Döhler KD, Stepień H, Pawlikowski M. Effect of growth hormone-releasing hormone on human peripheral blood leukocyte chemotaxis and migration in normal subjects. *Neuroendocrinology* 1989; 50: 236-239
58. Baxter JB, Blalock JE, Weigent DA. Characterisation of immunoreactive insulin-like growth factor-I from leukocytes and its regulation by growth hormone. *Endocrinology* 1991; 129: 1727-1734
59. Auernhammer CJ, Strasburger CJ. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on the immune system. *Eur J Endocrinol* 1995; 133: 635-645
60. Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, et al. Spontaneous growth hormone (GH) secretion by unstimulated human lymphocytes and the effects of GH-releasing hormone and somatostatin. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1678-1680
61. Schimpff RM, Repellin AM. Production of interleukin-1 alpha and interleukin-2 by mononuclear cells in healthy adults in relation to different experimental conditions and to the presence of growth hormone. *Horm Res* 1990; 33: 171-176
62. Bozzola M, Valtorta A, Moretta A, et al. Modulating effect of growth hormone (GH) on PHA-induced lymphocyte proliferation. *Thymus* 1988; 12: 157-165