Уровень цитокинов в разные фазы менструального цикла в вагинальных секретах здоровых и ВПГ-инфицированных женщин

Л.Г. ЗАЙЦЕВА[1], Н.С. СЕРГЕЕВА[2], А.Л. ТИЩЕНКО[2], Г.М. ШАПОШНИКОВА[1], И.В. КИРЕЕВА[1], И.И. САМОЙЛЕНКО[1], Е.Н. СЕМЕНОВА[1], Е.В. НАГУРСКАЯ[1]

[1]ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития России; [2]Российский университет дружбы народов, Москва

Cytokine levels in the vaginal secretions of healthy and herpes simplex virus-infected women in different phases of menstrual cycle

L.G. ZAITSEVA, N.S. SERGEYEVA, A.L. TISHCHENKO, G.M. SHAPOSHNIKOVA, I.V. KIREYEVA, I.I. SAMOILENKO, E.N. SEMENOVA, E.V. NAGURSKAYA

N.F. Gamaleya Research Institute of Experimental Medicine, Ministry of Health and Social Development of Russia; Peoples' Friendship University of Russia

Роль эстрогенов в регуляции Т-клеточного звена иммунного ответа и изменении цитокинового профиля в биологических жидкостях хорошо известна. Авторами проведен мониторинг активности цитокинов и интерферонов в вагинальных смывах клинически здоровых и ВПГ-инфицированных женщин в разные фазы менструального цикла. Выявлены различия в концентрации цитокинов в овуляторной и прогестероновой фазах цикла. Так, у ВПГ-инфицированных женщин наблюдалось нарушение баланса цитокинов в сторону повышения активности провоспалительных интерлейкинов в фазе овуляции и антивоспалительных интерлейкинов в прогестероновой фазе цикла. Это приводит к снижению уровня протективного Т-клеточного иммунного ответа у вирус-инфицированных женщин и поддержанию хронической вирусной инфекции.

Ключевые слова: цитокины, интерфероны, менструальный цикл, инфекции, передаваемые половым путем, вирус простого герпеса.

The role of estrogens in regulating the T-cell immune response and in changing the cytokine profile in biological fluids is well known. The authors monitored the activity of cytokines and interferons in the vaginal swabs of clinically healthy and herpes simplex virus (HSV)-infected women in different phases of the menstrual cycle. Differences were found in cytokine concentrations in the ovulatory and progesterone phases of the cycle. Thus, the HSV-infected women had impaired cytokine balance towards the enhanced activity of proinflammatory interleukins in the ovulatory phase of the cycle and that of anti-inflammatory interleukins in its progesterone phase. This tends to reduce a protective T-cell immune response in the virus-infected women and to maintain chronic virus infection.

Key words: cytokines, interferons, menstrual cycle, sexually transmitted infections, herpes simplex virus.

Мукозная иммунная система нижнего отдела репродуктивного тракта женщины уникальным образом приспособлена для оптимального баланса между бактериями-комменсалами и патогенными микроорганизмами, в том числе вирусами и бактериями, вызываемыми инфекциями, передаваемыми половым путем (ИППП). Эпителиальные клетки вагины обеспечивают первую линию обороны при ИППП, в том числе и при генитальном герпесе. Эти клетки являются не только неотъемлемым компонентом в поддержании естественной резистентности, но также и в индукции адаптивного иммунного ответа, участвуя в презентации антигенов патогенных микроорганизмов. Развитие иммунного ответа на слизистых оболочках репродуктивного тракта находится под строгим гормональным контролем. Для лечения ИППП, в том числе и методом мукозной интравагинальной иммунизации, необходимо учитывать особенности иммунного ответа в разные фазы менструального цикла. Таким образом, изучение ключевых параметров (маркеров), отражающих функциональный потенциал пула клеток вагинального смыва здоровых и больных ИППП женщин в зависимости от гормонального фона, является важной задачей.

Ранее нами было показано, что важным маркером функциональной активности вагинальных клеток является уровень лизосомного протеолитического фермента катепсина Д [1], относящегося к

© Коллектив авторов, 2012

[1]Тел.: +7 (499) 193-5508
[2]e-mail: MED772@rambler.ru

природным факторам естественного иммунитета. В клетках вагинальных смывов здоровых женщин на разных стадиях менструального цикла уровень активности катепсина Д четко коррелировал с динамикой изменения эстрогена/прогестерона в крови, а при некоторых заболеваниях женского репродуктивного тракта, в том числе инфицировании вирусом простого герпеса (ВПГ), являлся маркером патологического процесса в вагине.

Хорошо известна роль эстрогенов в регуляции Т-клеточного звена иммунного ответа [2]. При этом наблюдается изменение цитокинового профиля (соотношение провоспалительных и антивоспалительных цитокинов) в биологических жидкостях [3]. Зависимость продукции цитокинов клетками вагинальных смывов женщин от гормонального статуса не охарактеризована. Такие исследования важны для понимания особенностей развития локального иммунного ответа на слизистой оболочке генитального тракта в месте внедрения патогенов.

Цель настоящей работы — проведение мониторинга активности провоспалительных и антивоспалительных цитокинов, а также интерферонов (ИФН-α, ИФН-γ) в вагинальных смывах здоровых и ВПГ-инфицированных женщин в разные фазы менструального цикла.

Материал и методы

От 120 здоровых и 55 ВПГ-инфицированных женщин с 6-го по 28-й день цикла получали вагинальные смывы путем промывания 20 мл стерильного 0,9% раствора NaCl. Клеточный осадок отделяли центрифугированием при 1200 об/мин в течение 10 мин. В полученном вагинальном секрете определяли концентрацию провоспалительных цитокинов (ПВЦ) – ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8 и антивоспалительных цитокинов (АВЦ) – ИЛ-10, ИЛ-6, а также ИФН-α и ИФН-γ. Количественное определение цитокинов проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител на тест-системах ЗАО «Вектор-Бест». Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты

Менструальный цикл принято разделять на несколько фаз, каждая из которых сопровождается нарастанием концентрации соответствующего гормона в крови женщины [4]. Так, фолликулярная фаза характеризуется увеличением концентрации эстрогена с максимумом на 10–11-й день, овуляторная — увеличением секреции гонадотропных гормонов — лютеинизирующего и фолликулостимулирующего (13–15-й день) и лютеальная — нарастанием концентрации прогестерона с максимумом на 19–21-й день. Защитный потенциал мукозной иммунной системы женского генитального тракта в разные фазы менструального цикла может характеризовать соотношение ПВЦ и АВЦ в вагинальном секрете. Для проведения мониторинга мы исследовали 7 временных интервалов (фаз) менструального цикла **(см. таблицу)**: 1) постменструальную фазу (6—8-й день); 2) фазу пика концентрации эстрогенов (9—12-й день); 3) фазу пика гонадотропных гормонов (13—15-й день); 4) раннюю лютеальную фазу, характеризующуюся нарастанием уровня прогестерона (16—18-й день); 5) фазу пика концентрации прогестерона (19—22-й день); 6) позднюю лютеальную фазу (23—25-й день); 7) предменструальную (ишемическую) фазу (26—28-й день). В **таблице** представлены абсолютные значения концентрации цитокинов (в пг/мл), на **рисунке** — относительные показатели уровня цитокинов (в %) от их максимального значения в какой-либо из фаз менструального цикла.

На **рисунке** представлена динамика уровня цитокинов в вагинальных смывах здоровых женщин. Отмечено резкое снижение уровня ПВЦ (ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8) в овуляторной фазе менструального цикла, на пике активности гонадотропных гормонов (13—15-й день; **рисунок, *а***). Концентрация АВЦ (ИЛ-10, ИЛ-4) была наиболее высокой в овуляторной фазе (13–15-й день; **рисунок, *б***). Резкое падение уровня ИЛ-10 наблюдалось в начале прогестероновой фазы (16—18-й день), оставаясь на низком уровне и в дальнейшем. Наблюдаемое снижение показателей концентрации ИЛ-4 в прогестероновой фазе было транзиторным. На **рисунке (фрагмент *в*)** представлены изменения концентрации ИФН-α и ИФН-γ. Повышение концентрации обоих ИФН наблюдалось только на стадии овуляции (13—15-й день), как и в случае с ИЛ-10.

Анализ полученных данных свидетельствует о наличии баланса между АВЦ и ПВЦ в разные фазы менструального цикла у здоровых женщин.

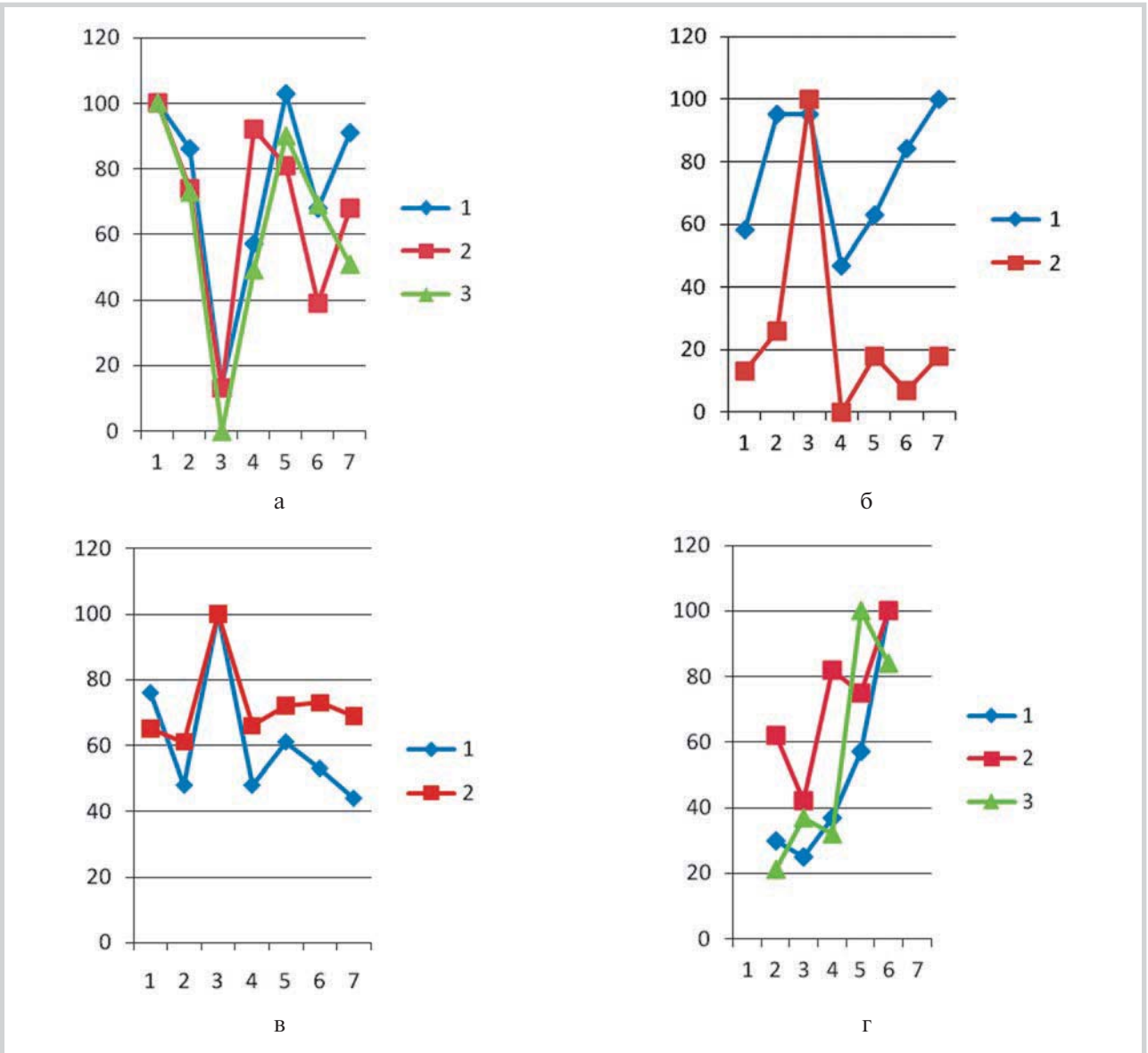
Представлена динамика показателей уровня цитокинов у ВПГ-инфицированных женщин как в стадии ремиссии, так и в стадии обострения **(рисунок, *г–е*)**. При этом не выявлено резкого снижения уровня ПВЦ в овуляторной фазе **(рисунок, *г*)**. При обострении заболевания индивидуальные показатели ВПГ-инфицированных женщин достигали для ИЛ-1β — 190 пг/мл при норме 28 пг/мл, ИЛ-8 — более 250 пг/мл при норме 135 пг/мл, ИЛ-6 — 120 пг/мл при норме 5 пг/мл. Уровень ИЛ-4 **(рисунок, *д*)** в овуляторной фазе был минимальным, а ИЛ-10 достоверно не изменялся. В прогестероновой фазе отмечался высокий уровень АВЦ, сохранявшийся до конца цикла. При обострении заболевания индивидуальные показатели достигали для ИЛ-10 19,9 пг/мл (норма 0,9 пг/мл), для ИЛ-4 — 7,3 пг/мл (норма 1,2 пг/мл). У инфицированных женщин концентрация ИФН-α и ИФН-γ в фазе овуляции (13—15-й

день) была снижена **(рисунок, *е*)**. На фоне обострения заболевания в отдельных случаях ИФН-γ в этот период не обнаружен.

Важной особенностью выявленного нами дисбаланса цитокинов у ВПГ-инфицированных женщин являлись повышенная активность провоспалительных цитокинов и низкий уровень ИФН в фазе овуляции, а также нарастание концентрации антивоспалительных цитокинов в прогестероновой фазе.

Обсуждение

Мукозальная поверхность репродуктивного тракта выполняет двойную задачу, обеспечивая условия для оплодотворения с одной стороны, и защиту против потенциальных патогенов — с другой стороны [5]. Низкий уровень провоспалительных и высокий уровень антивоспалительных цитокинов и ИФН-α, ИФН-γ у здоровых женщин, регистрируемые нами в овуляторной фазе, физиологически



Изменение концентрации цитокинов в вагинальных смывах здоровых и ВПГ-инфицированных женщин в течение менструального цикла.

По оси абсцисс — концентрация каждого цитокина (% от выявленного максимального значения). По оси ординат — фаза менструального цикла.
а, б, в — здоровые женщины; *г, д, е* — ВПГ-инфицированные женщины.
а — динамика изменения концентрации провоспалительных цитокинов: *1* — ИЛ-1β, *2* — ИЛ-8, *3* — ИЛ-6; *б* — динамика изменения концентрации антивоспалительных цитокинов: *1* — ИЛ-4, *2* — ИЛ-10; *в* — динамика изменения концентрации ИФН: *1* — ИФН-γ, *2* — ИФН-α; *г* — динамика изменения концентрации провоспалительных цитокинов: *1* — ИЛ-1β, *2* — ИЛ-8, *3* – ИЛ-6; *д* – динамика изменения концентрации антивоспалительных цитокинов: *1* – ИЛ-4, *2* — ИЛ-10; *е* — динамика изменения концентрации ИФН: *1* — ИФН-γ, *2* — ИФН-α.

См. продолжение рисунка на след. стр.

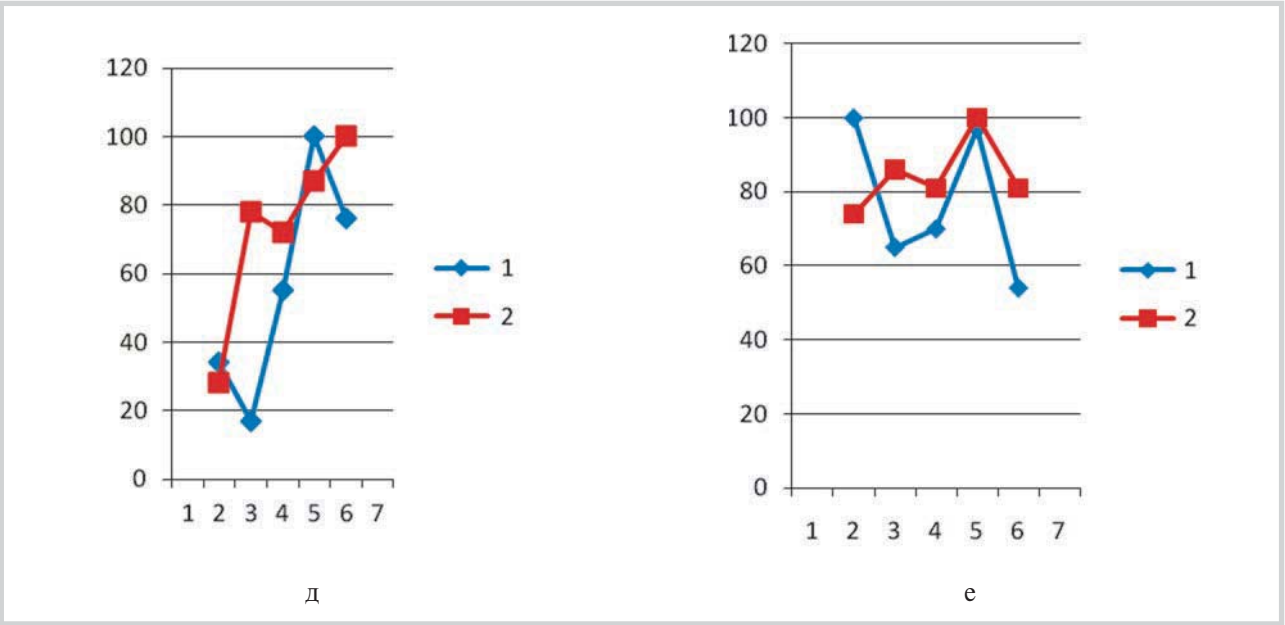


Рисунок (продолжение).

Уровень цитокинов в вагинальных смывах здоровых и ВПГ-инфицированных женщин в разные фазы менструального цикла

Фазы, день	Пациенты	ИЛ, пг/мл					ИФН, пг/мл	
		ИЛ-1β	ИЛ-8	ИЛ-6	ИЛ-10	ИЛ-4	ИФН-α	ИФН-γ
1-я (6—8-й)	Здоровые	27,0±9,4 (*n*=4) *p=0,05	167±45 (*n*=5) *p<0,05	5,5±2,6 (*n*=6)	0,6±06 (*n*=7)	1,1±0,5 (*n*=6)	25,0±5,5 (*n*=6)	11,6±2,7 (*n*=6)
	ВПГ	-	-	-	-	-	23	-
2-я (9—12-й)	Здоровые	23,1±6,3 (*n*=26) *p<0,05	123±20 (*n*=26) *p<0,01	4,0±1,2 (*n*=25) *p<0,05	1,3±0,6 (*n*=26)	1,8±0,3 (*n*=28) *p<0,05	23,4±3,4 (*n*=17)	7,4±1,3 (*n*=25)
	ВПГ	20,9±4 (*n*=7)	104±36 (*n*=7)	2,8±1,6 (*n*=7)	1,5±1,2 (*n*=7)	1,0±0,7 (*n*=7)	21,2±1,2 (*n*=9)	9,3±3,1 (*n*=9)
3-я (13—15-й)	Здоровые	2,4±1,1 (*n*=10)	21,4±8,1 (*n*=8)	0 (*n*=8)	4,9±2,3 (*n*=9) *p=0,05	1,8±0,7 (*n*=8)	38,3±6,0 (*n*=6) *p<0,05	15,3±1,5 (*n*=11) *p<0,01
	ВПГ	17,5±6,3 (*n*=3)	69,8±13 (*n*=3) **p<0,02	5,0±3,5 (*n*=2)	4,2±0,0 (*n*=5)	0,5±0,4 (*n*=4)	24,9±2,2 (*n*=8) **p=0,05	6,0±2,4 (*n*=5) **p<0,05
4-я (16—18-й)	Здоровые	15,3±7,6 (*n*=8)	154±36 (*n*=10) *p<0,05	2,7±1,0 (*n*=7) *p<0,05	0 (*n*=9)	0,9±0,3 (*n*=8)	25,1±3,7 (*n*=6)	7,4±2,2 (*n*=10)
	ВПГ	25,8±7,5 (*n*=14)	137±28 (*n*=13)	4,3±1,3 (*n*=12)	3,9±1,8 (*n*=11) **p<0,05	1,6±0,5 (*n*=9)	23,4±1,8 (*n*=16)	6,5±1,7 (*n*=13)
5-я (19—22-й)	Здоровые	27,8±9,3 (*n*=20) *p<0,05	135±22 (*n*=20) *p<0,05	5,0±2,9 (*n*=19)	0,9±0,4 (*n*=22)	1,2±0,3 (*n*=22)	27,4±3,6 (*n*=19)	9,3±1,5 (*n*=20)
	ВПГ	40,2±10 (*n*=23)	125,6±27,0 (*n*=21)	13,5±7,1 (*n*=25)	4,7±2,3 (*n*=21)	2,9±0,6 (*n*=22) **p<0,02	28,8±2,2 (*n*=27)	9,0±1,3 (*n*=20)
6-я (23—25-й)	Здоровые	18,4±7 (*n*=13) *p<0,05	64,8±22,0 (*n*=15)	3,8±1,7 (*n*=12) *p=0,05	0,4±0,3 (*n*=12)	1,6±0,5 (*n*=13)	28,0±3,0 (*n*=10)	8,0±1,0 (*n*=14)
	ВПГ	70,5±36,0 (*n*=6)	167,5±46,0 (*n*=5)	11,3±6,7 (*n*=5)	5,4±3,5 (*n*=4)	2,2±0,3 (*n*=5)	23,4±5,6 (*n*=6)	5,0±2,9 (*n*=5)
7-я (26—28-й)	Здоровые	24,5±11,0 (*n*=13) *p<0,05	113±28 (*n*=12) *p<0,05	2,8±1,1 (*n*=15) *p<0,05	0,9±0,5 (*n*=15)	1,9±0,3 (*n*=15)	26,6±3,8 (*n*=14)	6,8±1,5 (*n*=14)
	ВПГ	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. *— По сравнению с минимальным значением у здоровых; **— по сравнению со здоровыми.

оправданы. Такой баланс цитокинов препятствует развитию неконтролируемого воспалительного ответа и повреждению зародышевых клеток, создавая необходимые условия для наступления беременности. Их совместное действие обеспечивает надежный контроль репликации вируса [6], а продукция ИФН-γ необходима также для успешной имплантации яйцеклетки [7]. Ранее в экспериментах *in vitro* показано, что высокие дозы эстрадиола стимулировали продукцию ИЛ-10 и ИЛ-4, а низкие снижали ее [8, 9]. Подобная закономерность наблюдалась нами у женщин: наиболее высокая концентрация этих ИЛ была выявлена в пролиферативной (эстрогеновой), а наиболее низкая — в секреторной (прогестероновой) фазе цикла.

Регуляция презентации антигена, являющаяся ключевым звеном в индукции или супрессии адаптивного иммунного ответа, осуществляется эстрадиолом. Эффективность презентации антигена находится в обратной зависимости от уровня эстрадиола в крови [10]. Кроме того, выявлено ингибирующее влияние ИЛ-10 и ИЛ-4 на презентацию антигена [11, 12]. Низкие показатели этих ИЛ, наблюдаемые нами в секреторной фазе цикла у женщин, важны для успешной презентации антигена вагинальными клетками и последующей индукции адаптивного иммунного ответа, необходимого для контроля ИППП.

Хорошо известна также ведущая роль эстрогена в регуляции иммунного ответа в течение менструального цикла. Низкие дозы эстрогена, характерные для прогестероновой фазы, способствуют усилению Th1-ответа и стимулируют ПВЦ, тогда как высокие приводят к усиленному Th2-ответу и стимуляции АВЦ [9, 13]. Следовательно, наблюдаемая Th1/Th2-поляризация иммунного ответа зависит от фазы менструального цикла. Можно предположить, что в эстрогеновую фазу, когда концентрация ИЛ-4 и ИЛ-10 у здоровых женщин наиболее высокая, происходит поляризация в сторону Th2-ответа. Как было показано нами ранее, важное значение для защиты от вирусной инфекции в этот период приобретают факторы естественной резистентности [1]. Прогестероновая фаза, в которой низка концентрация ИЛ-4 и ИЛ-10 и высока концентрация ПВЦ, характеризуется поляризацией иммунного ответа в сторону Th1, что создает условия для защиты от вирусной инфекции.

При ВПГ-инфицировании наблюдался выраженный дисбаланс АВЦ. У здоровых женщин наивысшая концентрация ИЛ-4 и ИЛ-10 обнаружена в эстрогеновой, а у инфицированных — в прогестероновой фазе, причем при обострении ВПГ-инфекции концентрация АВЦ в прогестероновой фазе особенно высока. Известно, что успешной стратегией выживания внутриклеточных паразитов, к которым относится ВПГ, является их способность супрессировать иммунный ответ хозяина путем стимуляции синтеза ИЛ-10 [6, 14]. Обнаруженная нами высокая активность ИЛ-10 в прогестероновой фазе у ВПГ-инфицированных женщин может способствовать поддержанию хронической вирусной инфекции.

Выводы

У здоровых женщин в овуляторную фазу менструального цикла концентрация ПВЦ в вагине достигала своего минимального значения при одновременном высоком уровне АВЦ и ИФН.

При ВПГ-инфицировании повышена активность ПВЦ и снижена активность ИФН в фазе овуляции, при этом уровень АВЦ в прогестероновой фазе резко увеличивается.

Выявленный дисбаланс цитокинов у ВПГ-инфицированных женщин свидетельствует о снижении протективного иммунного ответа.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Сергеева Н.С., Самойленко И.И., Зайцева Л.Г. и др.* Гормональная регуляция продукции катепсина Д и уровня фагоцитоза в клетках вагинального смыва женщин. Клин дерматовенерол 2010; 6: 16—20.
2. *Maret A., Coudert J.D., Garidou L. et.al.* Estradiol enhances primary antigen-specificCD-4 Tcell responses and Th-1 development in vivo. Europian J Immunol 2003; 33: 512—521.
3. *Kassi E., Moutsatsou P.* Estrogen Receptor Signaling and Its Relationship to Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus. J Biomed Biotech 2010; 2010: Article ID317452:14.
4. *Sivridis E., Giatromanolaki A.* New insights into the normal menstrual cycle-regulatory molecules. Histol Histopatol 2004; 19: 511—516.
5. *Gillgrass A.E., Fernandez Sh.A., Rosenthal K.L., Kaushic Ch.* Estradiol Regulates Susceptibility following Primary Exposure to Genital Herpes Simplex Virus Type 2, while Progesterone Induce Inflammation. J Virol 2005; 79: 5: 3107—3116.
6. *Ellermann-Eriksen S.* Macrophages and cytokines in the early defense against herpes simplex virus. Virol J 2005; 2: 59.
7. *Beagly K.W., Gockel Ch.M.* Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. FEMS Immunol Med Microbiol 2003; 38: 1: 13—22.
8. *Xia X., Zhang S., Yu Y. et al.* Effect of estrogen replacement therapy on estrogen receptor expression and immunoregulatory cytokine secretion in surgically induced menopausal women. J Reprod Immunol 2009; 81: 89—96.
9. *Straub R.H.* The complex role of estrogenes in inflammation. Endocr Rev 2007; 28: 5: 521—574.
10. *Wira Ch.R., Rossoll R.M., Kaushic Ch.* Antigen-Presenting Cells in the Female Reproductive Tract: Influence of Estradiol on Antigen Presentation by Vaginal Cells. Endocrinology 2000; 141: 8: 2877—2885.
11. *Mosser D.M.* The many faces of macrophage activation. J Leuk Biol 2003; 73: 209—212.
12. *Couper K.N., Blount D.G., Riley E.M.* Il-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. J Immunol 2008; 180: 5771—5777.
13. *Steinman L.* A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. Nat Med 2007; 13: 2: 139—145.
14. *Sloan D.D., Jerome K.R.* Herpes simplex virus remodels T-cell receptor signaling, resulting in p38-dependent selective synthesis of interleukin-10. J Virol 2007; 81: 22: 12504—12514.