

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ОРЕНБУРГСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ КЛЕТОЧНОГО И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СИМБИОЗА
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Мячина Юлия Леонидовна

**ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ВАГИНАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ НА
ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК ХОЗЯИНА**

1.5.11. Микробиология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Сгибнев Андрей Викторович
доктор биологических наук

Оренбург – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СТРУКТУРА И СОСТАВ БИОЦЕНОЗА У ЖЕНЩИН С НОРМОЦЕНОЗОМ И БАКТЕРИАЛЬНЫМ ВАГИНОЗОМ	15
Цервикагинальная микробиота и ее связь с ВПЧ	18
Перспективы использования лактобацилл	24
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	27
2.1 Общие данные	27
2.2 Критерии включения и исключения женщин из исследования	27
2.3 Характеристика штаммов микроорганизмов	28
2.3.1 Методы выделения микроорганизмов	29
2.3.2 Методы идентификации выделенных штаммов микроорганизмов	29
2.3.3 Метод получения нативных внеклеточных метаболитов лактобацилл ...	30
2.3.4 Метод определения продукции бактериями пероксида водорода.....	31
2.4 Метод выделения нейтрофилов из гепаринизированной венозной крови	31
2.5 Метод поддержания жизнеспособных культур клеток HeLa.....	32
2.5.1 Заморозка и разморозка клеток	32
2.6 Взятие образцов вагинальных эпителиальных клеток.....	32
2.7 Изучение биологических свойств вагинальных микроорганизмов.....	33
2.7.1 Метод оценки влияния различных биоценозов на метаболическую активность клеток первичных эпителиоцитов.....	33
2.7.2 Метод оценки влияния биогенных аминов и метаболитов <i>Lactobacillus spp.</i> и их отдельных компонентов (лактата и пероксида водорода) на изменение дегидрогеназной активности культур клеток HeLa	33

2.7.3 Метод оценки влияния биогенных аминов и метаболитов <i>Lactobacillus spp.</i> и их отдельных компонентов (лактата и пероксида водорода) на изменение дегидрогеназной активности нейтрофилов.....	34
2.7.4 Метод оценки влияния биогенных аминов и метаболитов <i>Lactobacillus spp.</i> и их отдельных компонентов (лактата и пероксида водорода) на изменение митохондриального потенциала нейтрофилов	35
2.7.5 Метод оценки влияния биогенных аминов и метаболитов <i>Lactobacillus spp.</i> и их отдельных компонентов (лактата и пероксида водорода) на изменение митохондриального потенциала культур клеток HeLa.....	35
2.7.6 Метод оценки влияния микробных метаболитов на устойчивость клеток HeLa к действию окислительного стресса	36
2.7.7 Метод оценки влияния микробных метаболитов на устойчивость эпителиальных клеток к окислительному стрессу	37
2.7.8 Метод определения бактерицидности различных концентраций биогенных аминов и метаболитов <i>Lactobacillus spp.</i> и их отдельных компонентов (лактата и пероксида водорода) в отношении <i>E.coli</i>	38
2.7.9 Метод оценки влияния биогенных аминов и метаболитов <i>Lactobacillus spp.</i> и их отдельных компонентов (лактата и пероксида водорода) на изменение киллинговой активности нейтрофилов в отношении <i>E.coli</i>	38
2.8 Статистическая обработка результатов	39
ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ВАГИНАЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА МЕТАБОЛИЗМ И УСТОЙЧИВОСТЬ К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ КЛЕТОК ПЕРВИЧНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ	40
3.1 Влияние типа микроокружения на метаболическую активность и устойчивость к окислительному стрессу первичных эпителиоцитов	41

3.2 Влияние типа микроокружения на метаболическую активность и устойчивость к окислительному стрессу первичных эпителиоцитов, полученных от женщин, инфицированных ВПЧ.....	46
3.3 Влияние бактериального вагиноза на метаболическую активность и устойчивость к окислительному стрессу первичных эпителиоцитов, полученных от женщин, инфицированных и неинфицированных ВПЧ.....	51
3.4 Обсуждение полученных результатов	55
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ВАГИНАЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА МЕТАБОЛИЗМ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ	59
4.1 Оценка влияния микробных метаболитов на метаболическую активности нейтрофилов периферической крови	61
4.1.1 Влияние пероксида водорода на метаболическую активность нейтрофилов периферической крови.....	61
4.1.2 Влияние молочной кислоты на метаболическую активности нейтрофилов периферической крови	63
4.1.3 Влияние нативных бесклеточных метаболитов лактобацилл, стандартизованных по молочной кислоте на метаболическую активность нейтрофилов периферической крови.....	64
4.1.4 Влияние биогенных аминов на метаболическую активность нейтрофилов периферической крови	65
4.2 Оценка влияния микробных метаболитов на способность нейтрофилов к киллингу	66
4.2.1 Оценка влияния пероксида водорода на способность нейтрофилов к киллингу.....	67
4.2.2 Оценка влияния молочной кислоты на способность нейтрофилов к киллингу.....	68

4.2.3 Оценка влияния нативных бесклеточных метаболитов лактобацилл, стандартизованных по молочной кислоте на способность нейтрофилов к киллингу.....	69
4.2.4 Оценка влияния биогенных аминов на способность нейтрофилов к киллингу.....	71
4.3 Обсуждение полученных результатов	72
ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ВАГИНАЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА МЕТАБОЛИЗМ И УСТОЙЧИВОСТЬ К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ШЕЙКИ МАТКИ ...	76
5.1 Оценка влияния микробных метаболитов на метаболическую активности клеток HeLa.....	78
5.1.1 Влияние пероксида водорода на метаболическую активность клеток HeLa.....	79
5.1.2 Влияние молочной кислоты на метаболическую активность клеток HeLa	80
5.1.3 Влияние нативных бесклеточных метаболитов лактобацилл, стандартизованных по молочной кислоте на метаболическую активность клеток HeLa	81
5.1.4 Влияние биогенных аминов на метаболическую активность клеток HeLa	84
5.2 Оценка влияния микробных метаболитов на устойчивость клеток HeLa к окислительному стрессу.....	85
5.2.1 Оценка влияния пероксида водорода на устойчивость клеток HeLa к действию окислительного стресса	86
5.2.2 Оценка влияния молочной кислоты на устойчивость клеток HeLa к действию окислительного стресса	87

5.2.3 Оценка влияния бесклеточных метаболитов лактобацилл, стандартизованных по молочной кислоте на устойчивость клеток HeLa к действию окислительного стресса	89
5.2.4 Оценка влияния биогенных аминов на устойчивость клеток HeLa к действию окислительного стресса	91
5.3 Обсуждение полученных результатов	93
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	96
ВЫВОДЫ	99
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	99
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	102
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	129

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Комменсальная микробиота, заселяющая отдельные биотопы тела человека и приспособленная к их морфофункциональным особенностям, является важным компонентом защиты слизистой оболочки организма хозяина от колонизации чужеродными микроорганизмами. Например, *Lactobacillus* spp., являющиеся представителями нормобиоты влагалища у большинства женщин репродуктивного возраста, могут продуцировать молочную кислоту, бактериоцины, сурфактанты, антимикробные пептиды, пероксид водорода, которые могут обладать антимикробной активностью и играют важную роль в защите влагалища от патогенов [122]. В состав микробиоценоза влагалища входят разные популяции клеток: эпителиальные клетки (здоровые, поражённые вирусом папилломы человека или малигнизированные при раке), нейтрофильные гранулоциты, а также прочие клетки, отвечающие за иммунный ответ [44,68,69].

Клетки хозяина также подвержены влиянию комменсальной микробиоты. Так, например, вагинальные лактобациллы могут повышать выживаемость клеток вагинального эпителия в условиях окислительного стресса [11] или стимулировать выработку эпителиоцитами антимикробных субстанций [78, 130]. Микроорганизмы могут влиять и на морфофункциональное состояние клеток хозяина, так, например, при нормоценозе у здоровых женщин в мазках обнаруживаются в основном зрелые формы эпителиоцитов, тогда как при бактериальном вагинозе, который характеризуется преобладанием *A. vaginae* и *G. vaginalis*, можно наблюдать значительное количество слущенных, незрелых эпителиоцитов, с низким содержанием гликогена [8].

Опубликованы данные о том, что метаболиты бактерий способны менять метаболическую активность эукариотических клеток. Например, в макрофагах под влиянием бактериального липополисахарида увеличивается образование итаконовой кислоты, которую можно рассматривать в качестве основного

физиологического регулятора метаболической перестройки и эффекторных функций макрофагов [1,70].

Бактериальные метаболиты из группы производных индола и фенола ингибируют митохондриальные дегидрогеназы, регулируют продукцию активных форм кислорода, изменяют проницаемость клеточных и митохондриальных мембран, а также могут подавлять фагоцитарную активность нейтрофилов [28].

Описанные выше факты свидетельствуют о способности микроорганизмов модулировать метаболическую и, соответственно, функциональную активность клеток хозяина. Однако, на сегодняшний день недостаточно данных о механизмах влияния метаболитов нормальной и условно-патогенной микробиоты на метаболизм и функционирование клеток, находящихся в различных физиологических и патологических состояниях.

Это, в свою очередь, препятствует формированию целостного представления о взаимоотношениях между представителями вагинальной микробиоты, клетками эпителия и иммунной системы в вагинальном биотопе.

Решение этих вопросов позволит в перспективе определить роль нормальной микробиоты в поддержании гомеостаза симбиотической системы, включающей клетки хозяина и его микробиом.

Цель работы – оценить влияние метаболитов вагинальной микробиоты на функциональное состояние клеток хозяина.

Задачи исследования

1. Исследовать связь видового состава и экологических характеристик доминирующих представителей вагинальной микробиоты с функциональным состоянием (метаболической активностью, выживаемостью и типом клеточной гибели при окислительном стрессе) первичной культуры вагинальных эпителиоцитов.

2. Охарактеризовать влияние внеклеточных метаболитов доминирующих представителей вагинальной микробиоты и отдельных компонентов, входящих в

их состав (лактат, пероксид водорода, путресцин), на метаболизм и киллинговую активность нейтрофилов периферической крови.

3. Оценить влияние метаболитов доминирующих представителей вагинальной микробиоты на функциональное состояние (метаболическую активность, выживаемость и тип клеточной гибели при окислительном стрессе) клеток карциномы шейки матки на модели клеток линии HeLa.

4. Изучить возможность использования внеклеточных метаболитов вагинальных лактобацилл, различающихся по уровню продукции лактата и пероксида водорода, для снижения жизнеспособности клеток карциномы шейки матки.

Научная новизна исследования

В результате проведенных исследований впервые расшифрован один из возможных механизмов поддержания гомеостаза в вагинальном биотопе, основанный на способности доминирующих представителей вагинальной микробиоты модулировать функциональное состояние клеток хозяина.

Впервые установлено, что регуляция колонизационной резистентности вагинального биотопа может осуществляться через дифференцированное воздействие метаболитов нормобиоты на функциональное состояние клеток хозяина (эпителиоцитов, включая ВПЧ-инфицированные, и нейтрофилов), путем изменения их метаболической активности, включая активность митохондрий. Показано, что способность лактобацилл продуцировать пероксид водорода является определяющим фактором в модуляции дегидрогеназной активности и устойчивости эпителиальных клеток к окислительному стрессу, при этом направленность этого эффекта противоположна для здоровых и ВПЧ-инфицированных клеток.

Впервые выявлено, что внеклеточные метаболиты лактобацилл оказывают дозозависимое и штамм-специфичное влияние на киллинговую активность нейтрофилов, которое коррелирует с изменением их митохондриального потенциала и дегидрогеназной активности. Продемонстрировано, что биогенные

амины, продуцируемые при бактериальном вагинозе, способны стимулировать метаболическую активность нейтрофилов и клеток карциномы шейки матки, что раскрывает новые механизмы влияния дисбиотической микробиоты на локальный иммунитет и развитие ВПЧ-ассоциированных заболеваний.

Впервые на модели клеток HeLa показано, что комплекс нативных метаболитов лактобацилл, в отличие от индивидуальных метаболитов (лактат, пероксид водорода), индуцирует апоптотический тип гибели опухолевых клеток при окислительном стрессе, что указывает на наличие синергических эффектов компонентов метаболома вагинальных лактобацилл и позволяет по-новому интерпретировать механизмы противоопухолевого потенциала вагинальной нормобиоты.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Результаты исследования вносят вклад в развитие фундаментальных представлений о межклеточных взаимодействиях в системе «микробиота - клетки хозяина» на уровне вагинального биотопа. Расширено понимание механизмов, посредством которых метаболиты комменсальной и условно-патогенной микробиоты модулируют энергетический метаболизм и митохондриальную функцию эпителиальных и иммунных клеток. Сформулировано представление, согласно которому поддержание колонизационной резистентности определяется не только количественным, но и качественным (функциональным) составом микробиоты, в частности способностью лактобацилл продуцировать пероксид водорода.

Разработано новое теоретическое положение о том, что направленность метаболических эффектов микробных метаболитов (стимуляция или ингибирование, апоптоз или некроз) зависит от исходного статуса клеток-мишеней (здоровые, ВПЧ-инфицированные, трансформированные), что позволяет рассматривать вагинальную микробиоту как тканеспецифичный регулятор клеточного гомеостаза и локального воспаления.

Полученные данные обосновывают целесообразность разработки постбиотических препаратов на основе стандартизированных по содержанию лактата и пероксида водорода нативных метаболитов лактобацилл. Показанная в работе специфичность влияния штаммов на метаболическую активность клеток карциномы шейки матки и нейтрофилов создает предпосылки для направленного отбора пробиотических штаммов с заданными иммуномодулирующими и противоопухолевыми свойствами, что может быть использовано при создании персонализированных схем терапии ВПЧ-ассоциированных заболеваний и бактериального вагиноза.

Выявленная способность биогенных аминов повышать метаболическую активность и выживаемость ВПЧ-инфицированных эпителиоцитов при окислительном стрессе указывает на возможность использования уровня биогенных аминов в качестве дополнительного диагностического маркера риска персистенции ВПЧ и прогрессирования цервикальной интраэпителиальной неоплазии. Полученные результаты могут служить экспериментальным обоснованием для включения в клиническую практику методов оценки функционального состояния микробиоты (пероксидпродуцирующая активность лактобацилл, уровень биогенных аминов) как предикторов эффективности терапии и риска развития онкопатологии.

Методология и методы исследования

Методология работы спланирована соответственно поставленной цели и задачам исследования. В работе были использованы современные бактериологические, биохимические, молекулярно-генетические методы исследования, математические и статистические методы обработки данных. Настоящее исследование было проведено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской декларации с одобрения Комитета по этике исследований с

участием человека при локальном комитете по биоэтике ИКВС УрО РАН. (протокол № 3 от 10.06 2022 г.).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Доминирующие представители вагинальной микробиоты способны разнонаправленно изменять функциональное состояние клеток хозяина различных типов путем регуляции их метаболической активности.

2. Модуляция вагинальными лактобациллами метаболической и киллинговой активности нейтрофилов, наряду с их собственной антимикробной активностью, - один из возможных механизмов поддержания колонизационной резистентности вагинального биотопа, за счет которого реализуется препятствие колонизации биотопа аллохтонными микроорганизмами и сохранение численности нормобиоты.

3. Выявленная способность внеклеточных метаболитов отдельных штаммов вагинальных лактобацилл снижать жизнеспособность клеток карциномы шейки матки и эпителиоцитов, инфицированных ВПЧ, за счет уменьшения их метаболической активности и повышения чувствительности к окислительному стрессу, – это биологическая основа для создания постбиотических препаратов для комплексного лечения и профилактики ВПЧ и карциномы шейки матки.

Степень достоверности результатов

Количество материала и его обработка адекватны поставленной цели исследования. Достоверность результатов, полученных в ходе исследования, подтверждается серией экспериментов, выполненных в трех повторностях.

Исследования проведены с помощью современных микробиологических, цитологических и биохимических методов, включая культивирование микроорганизмов и клеточных линий, выделение нейтрофилов, оценку бактерицидной и метаболической активности, детекцию апоптоза и некроза,

митохондриального потенциала, а также параметрические и непараметрические методы статистического анализа.

Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (доля выживших, апоптотических и неапоптотических погибших эпителиальных клеток и изменение их доли относительно исходной доли), а также соотношения долей типов гибели клеток. Нормальность распределения данных проверялась с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Для оценки значимости межгрупповых различий в доле апоптотических, выживших и неапоптотических погибших клеток использовался точный критерий Фишера; значимость межгрупповых различий в изменении их доли после лечения относительно исходного состояния – с помощью критерия Манна–Уитни. Оценка достоверности различий между средними значениями в группах проводилась путем расчета стандартной ошибки, а уровень значимости определялся с использованием t-критерия Стьюдента. Для оценки достоверности различий в эффектах внеклеточных метаболитов лактобацилл, стандартизованных по лактату, использовали двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA). Порог статистической значимости был установлен как двустороннее значение p , равное 0,05.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Основная идея, формулировка цели и задач, определение методологии, планирование всей научной работы, математическая и статистическая обработка первичных данных проводилась совместно с научным руководителем д.б.н., доцентом А.В. Сгибневым. Получение и интерпретация данных научного исследования, анализ полученных результатов осуществлялся соискателем лично. Забор материала для клинических изолятов осуществлялся врачами акушерами-гинекологами Клиники адаптационной терапии ФГБОУ ВО «ОрГМУ» МЗ РФ. Диссертантом в соавторстве подготовлены к печати публикации по теме работы.

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы были представлены и обсуждены на X-й Российской научной конференции с международным участием «Персистенция и симбиоз микроорганизмов» (г. Оренбург, 20-22 сентября 2023 г.) (содокладчик и стендовый доклад); VIII-ом Международном молодежном научно-практическом форуме «Медицина будущего: от разработки до внедрения» (г. Оренбург, 25 апреля 2024 г.); Пятой всероссийской молодежной научной школе-конференции с международным участием «Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах» (г. Оренбург, 6-10 октября 2025 г.). Апробация работы состоялась на заседании Ученого совета ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (протокол № 2 от 13.02.2026).

Публикации

Основные положения диссертационного исследования полностью отражены в 4 печатных работах, опубликованных соискателем ученой степени по теме диссертации. Из них – 2 статьи в научных изданиях, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus, входящих в перечень рецензируемых научных изданий в соответствии с рекомендациями ВАК, 1 статья РИНЦ и 1 патент на изобретение РФ (Патент № 2856925).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Работы изложена на 129 страницах машинописного текста, включает 3 таблицы и 22 рисунка. Список литературы содержит 139 источников.

ГЛАВА 1 Обзор литературы. Структура и состав биоценоза у женщин с нормоценозом и бактериальным вагинозом

Вагинальный микробиоценоз представляет собой сложную, динамическую систему, которая играет ключевую роль в поддержании гомеостаза репродуктивного тракта. Его состав и структура оказывают непосредственное влияние на восприимчивость к инфекциям, исходы беременности и качество жизни. Знание особенностей вагинального микробиома необходимо для эффективной профилактики, диагностики и лечения заболеваний, связанных с его дисбалансом.

Микробиота, населяющая цервиковагинальный тракт, отличается высокой чувствительностью к гормональным изменениям, которые наблюдаются на протяжении всего репродуктивного периода женщины, а также при использовании оральных контрацептивов, во время половой активности, после спринцеваний, при лактации, у пациенток с сахарным диабетом и в состоянии хронического стресса. С началом полового созревания уровень эстрогенов повышается, что стимулирует процессы созревания, деления и отложения гликогена в эпителиальных клетках влагалища [17, 22, 40, 80].

Современные исследования с применением высокопроизводительного секвенирования (по 16S рРНК) и метагеномного анализа позволили выявить существенные различия в структуре микробных сообществ. Согласно классификации Ravel et.al. (2011), основанной на метагеномных данных, выделяют пять основных типов вагинальных микробных сообществ (CST) [101].

Определение принадлежности вагинальной микробиоты к тому или иному типу (CST) осуществляется в соответствии с тем, какие микробные популяции являются доминирующими. Такая систематизация позволила выделить пять основных категорий (с I по V). Доминирующее положение в сообществах CST I, II, III и V занимают лактобактерии: в первом типе это *L. crispatus*, во втором – *L. gasseri*, в третьем – *L. iners*, а в пятом – *L. jensenii*. Главная отличительная черта CST IV – в данном варианте микробиоты лактобактерии не занимают явно

господствующего положения. Этому типу свойственна значительная микробная гетерогенность, при этом в значительном проценте случаев в нём обнаруживаются анаэробные бактерии, среди которых представители таких родов, как *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Atopobium* и *Prevotella* [50, 101,123].

У здоровых женщин репродуктивного возраста вагинальный микробиом характеризуется доминированием бактерий рода *Lactobacillus*, которые составляют от 70 до 98 % от общего количества микроорганизмов. Лактобациллы обеспечивают защиту, поддерживая низкий pH (3,5-4,2) за счет продукции молочной кислоты, конкурируя с другими микроорганизмами за питательные вещества и адгезию к эпителию влагалища, а также продуцируя бактериоцины и биосурфактанты [20,22].

Российские исследователи под руководством профессора Е.Ф. Киры (2018) в серии работ продемонстрировали, что разные виды лактобацилл обладают неодинаковым защитным потенциалом. В частности, *L. crispatus* проявляет наибольшую антагонистическую активность в отношении *Gardnerella vaginalis* и других ассоциированных с бактериальным вагинозом микроорганизмов. Также *Lactobacillus*, такие как *L. crispatus*, *L. gasseri* и *L. jensenii*, способны подавлять рост других бактерий и вирусов [115].

В то же время *Lactobacillus iners*, нередко колонизирующий микробиоту в периоды ее нестабильности, демонстрирует существенно более низкую антагонистическую активность [95]. Важной особенностью описываемого вида лактобактерий является уменьшенный объём генома в сравнении с иными представителями рода *Lactobacillus*, а также неспособность продуцировать D-молочную кислоту и пероксид водорода [22,95]. Весь спектр метаболической активности *L. iners* сводится к синтезу одного лишь L-изомера молочной кислоты, причём в научных работах была зафиксирована взаимосвязь между присутствием этого изомера и развитием инфекционных процессов вирусного генеза. Дополнительно следует упомянуть, что *L. iners* синтезирует холестерин-зависимый цитолизин – инеролизин [100]. Указанный токсин действует

аналогично вагинолизину *Gardnerella*: он вызывает образование пор в клеточных мембранах вагинального эпителия, вследствие чего нарушается барьерная функция тканей, и это обстоятельство облегчает вирусную инвазию [40,76,100].

Эти данные согласуются с результатами международного исследования, в котором было установлено, что у женщин с преобладанием *L.iners* риск развития бактериального вагиноза (БВ) в 3,2 раза выше по сравнению с теми, у кого преобладает *L.crispatus* [95].

Несбалансированный состав цервикавагинальной микробиоты, характеризующийся высоким разнообразием и низким содержанием лактобактерий, как при CST IV, называется бактериальным вагинозом [74,128].

При БВ нарушается выработка молочной кислоты, что приводит к повышению pH влагалища (выше 4,2), создавая благоприятные условия для роста анаэробных бактерий и формирования биопленок на эпителии влагалища, хотя механизм формирования БВ до конца не изучен.

Согласно современным данным, начальным звеном развития БВ является нарушение колонизационной резистентности влагалища, которое связано со снижением количества лактобацилл. Происходить это может под влиянием различных факторов: гормональные колебания (особенно изменение уровня эстрогенов), применение антибиотиков, использование внутриматочных контрацептивов и спермицидов. Хотя у некоторых женщин проявляются симптомы, у большинства из них заболевание протекает бессимптомно [40,50].

На молекулярном уровне ключевую роль в развитии дисбиоза играют несколько взаимосвязанных механизмов. Во-первых, это способность БВ-ассоциированных микроорганизмов продуцировать сиалидазу и другие гликозидазы, которые разрушают гликопротеины слизистой оболочки влагалища. В исследованиях С.А. Muzny et.al (2019) было продемонстрировано, что активность сиалидазы коррелирует с тяжестью клинических проявлений БВ и является прогностическим маркером развития осложнений. Во-вторых, важное значение имеет способность условно-патогенных микроорганизмов (УПМ)

формировать полимикробные биопленки, что было убедительно показано в работах российских ученых из НИИ акушерства и гинекологии им Д.О. Отта.

Цервикагинальная микробиота и ее связь с ВПЧ

Окислительный стресс, возникающий на фоне нарушения равновесия между окислителями и антиоксидантами, приводит к чрезмерному образованию свободных радикалов, в частности активных форм кислорода (АФК), что вызывает накопление окислительных повреждений ДНК, РНК и белков [36, 42, 97].

Под воздействием ВПЧ в среде цервикагинального биотопа инициируется синтез провоспалительных медиаторов и активных форм кислорода. Предполагается, что индуцируемый таким образом окислительный стресс играет определяющую роль в аккумуляции генетических повреждений, что, в свою очередь, запускает процессы злокачественной трансформации клеток [26, 54, 63].

С другой стороны, хронический окислительный стресс может усиливать интеграцию ВПЧ в эпителиоциты шейки матки [47, 131].

Таким образом, окислительный стресс и ВПЧ-инфекция способны, по-видимому, взаимно усиливать друг друга и являются характерными признаками прогрессирования ВПЧ до карциномы [47,131].

Предполагается, что повреждение клеток и ДНК, вызванной вагинальным микробным сообществом, происходит за счет секреции бактериальных генотоксинов, что вызывает хроническое воспаление и создает благоприятную среду для возникновения и развития ВПЧ [66]. Отдельные представители бактериальной флоры синтезируют токсины, оказывающие прямое повреждающее действие на ДНК эпителиоцитов и влияющие на их неопластическую трансформацию, что служит дополнительным фактором онкогенеза [69].

Высокоонкогенные типы ВПЧ в первую очередь нарушают контрольные точки нормального клеточного цикла и способствуют неконтролируемой пролиферации клеток и подавлению апоптоза за счет активности онкопротеинов

Е6 и Е7. В процессе канцерогенеза геном ВПЧ часто интегрируется в геном клетки-хозяина, происходит вирусная трансформация. Таким образом, нарушается работа гена Е2, что приводит к избыточной экспрессии онкогенных белков и клеточной трансформации [134].

Лактобактерии способны косвенно или напрямую предотвращать канцерогенез шейки матки за счет подавления экспрессии онкогенов ВПЧ. С другой стороны, лактобациллы способны напрямую препятствовать возникновению, прогрессированию и метастазированию рака шейки матки посредством индукции апоптоза опухолевых клеток, подавления их пролиферации и модуляции экспрессии генов, ассоциированных с метастазированием [60].

Дисбиоз вагинальной микробиоты, напротив, повышает уязвимость эпителия к патогенам, снижает эффективность элиминации вируса (вследствие угнетения противовирусной активности клеток хозяина) и увеличивает риск малигнизации и прогрессирования карциномы [33, 35, 88, 111, 121].

Одновременно с этим, все больше исследований показывают, что люди с дисбактериозом более склонны к персистирующим инфекциям HR-HPV (high-risk human papillomavirus), часто сопровождающимся хроническим неэффективным воспалением шейки матки, которое может прогрессировать до атипичной гиперплазии шейки матки, в итоге, приводящей к карциноме [46, 88, 133].

Многочисленными исследованиями доказано наличие прямой зависимости между представителями микробиоты, типичными для состояния бактериального вагиноза (БВ), и трансформацией цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN) в инвазивный рак шейки матки. В спектр таких микроорганизмов включены *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella* spp., *Sneathia amnii*, *Porphyromonas* spp., а также *Peptostreptococcus* spp. [46, 73, 90, 104, 109, 121, 132].

Повышенный уровень *Atopobium vaginae* и *Sneathia amnii*, связанный с инфекцией ВПЧ высокого риска, обладает провоспалительным потенциалом, индуцируя воспалительные цитокины, синтазу оксида азота и соединения, вызывающие окислительный стресс [67].

Данные свидетельствуют о том, что микроорганизмы, ассоциированные с ВЗК (воспалительные заболевания кишечника), могут влиять на метаболические процессы в микроокружении, проявляющиеся в накоплении 2-гидроксимасляной кислоты и провоспалительных липидов, окислительном стрессе и выработке сероводорода [75]. Эти изменения потенциально способствуют локальному воспалению и генной токсичности, объясняя эпидемиологическую корреляцию между ВЗК и возникновением СС [33].

Помимо лактобактерий и микробов, связанных с бактерией рода *Bacteroides*, относительное количество некоторых других бактерий менялось во время развития CIN/СС, связанного с ВПЧ. Любопытно, что *Sneathia spp.* оказалась единственным таксоном, значительно преобладающим у ВПЧ-положительных пациентов с поражениями без признаков злокачественности или предраковыми поражениями/СС, что указывает на его потенциал в качестве геномного маркера прогрессирования CIN [67]. В совокупности эти данные указывают на тесную связь между специфическими микробами, ассоциированными с ВПЧ, и переходом от ВПЧ к СС.

Из изложенного выше следует, что характер микробиоты влагалища обнаруживает тесную связь с папилломавирусной инфекцией, благодаря чему может выступать в роли потенциально ценного биомаркера, предсказывающего риск инфицирования ВПЧ. Таким образом, хотя наличие ВПЧ-инфекции рассматривается как обязательное условие для развития рака шейки матки, одного этого фактора для запуска канцерогенеза недостаточно [40].

Приведённые факты позволяют выдвинуть предположение, согласно которому характер микробиоты влагалища может не только влиять на степень уязвимости к инфекциям вирусной природы, но и обнаруживать корреляционную связь с развитием диспластических процессов и клеточными аномалиями со стороны шейки матки. В ряде исследований действительно зафиксирована перестройка цервикагинального микробиоценоза, проявляющаяся в повышении численности бактерий родов *Gardnerella*, *Prevotella*, *Atopobium* на фоне снижения

доли лактобацилл при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях (CIN) и инвазивном раке. Тем не менее, вопрос о прямом причинно-следственном характере этих взаимосвязей остается открытым и требует дальнейшего изучения [40, 82].

Сравнительный анализ микробиоты при различных состояниях эпителия шейки матки выявил отчетливые различия между нормой, предраковыми изменениями и карциномой. Так, если у ВПЧ-негативных и ВПЧ-позитивных женщин без цитологической патологии доминировали *L. crispatus* и *L. iners* соответственно, то при плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях (SIL) и раке шейки матки преобладающее положение занимали *Sneathia* spp. и *Fusobacterium* spp. [27, 40, 82].

Кроме того, прослеживается четкая зависимость между типом микробного сообщества и степенью тяжести цервикальных аномалий. Установлено, что частота встречаемости CST IV (полимикробного сообщества с низким содержанием лактобацилл) возрастает по мере прогрессирования патологии, достигая максимума при LSIL, HSIL и инвазивном раке. При этом микробный профиль HSIL отличался от такового при LSIL более высоким содержанием *Sneathia sanguinegens*, *Anaerococcus tetradius* и *Peptostreptococcus anaerobius*, что свидетельствует о качественных изменениях биоценоза, сопряженных с тяжестью заболевания [40, 81, 82]. Параллельно с усугублением дисплазии наблюдалось снижение доминирования лактобацилл и увеличение численности *Sneathia* spp. на всех стадиях – от предраковых поражений до инвазивной карциномы [68].

Резюмируя вышесказанное, можно утверждать, что каждому этапу диспластических изменений соответствует уникальный бактериальный пейзаж. Если доминирование *Lactobacillus* spp. характерно для здорового эпителия и ВПЧ-негативного статуса, то присутствие *Sneathia* spp. регистрируется на всех этапах неопластической трансформации. Это дает основание рассматривать данный

микроорганизм, в дополнение к другим перечисленным таксонам, как перспективный биомаркер вагинальных нарушений [40, 82].

Несмотря на накопленный объем данных о составе цервиковагинальной микробиоты и ее ассоциации с вирусными инфекциями, механизмы участия микробных сообществ в канцерогенезе, а также факторы, определяющие элиминацию либо персистенцию ВПЧ, остаются малоизученными. В последнее время была предложена комплексная модель взаимодействия (вирус – бактерии – макроорганизм), акцентирующая внимание на роли микробиоты в прогрессии вирус-ассоциированных неоплазий [40, 127].

В рамках данной модели рассматриваются два основных механизма. Первый предполагает прямое влияние бактериальных метаболитов на вирулентность патогена, что модулирует характер взаимодействия вируса с клетками хозяина. Второй механизм опосредован реакциями между микробиотой и организмом хозяина, которые способны изменять экспрессию генов последнего. Такая модуляция генной активности, в свою очередь, сказывается на репликации вируса и может создавать предпосылки для онкогенеза. Принципиально важно, что микробиота способна выполнять и протективную функцию, однако эффективность защиты напрямую зависит от ее таксономического состава, о чем свидетельствуют данные, изложенные ранее [40, 82].

Установлено, что присутствие в цервиковагинальном биотопе сообщества CST IV ассоциировано с повышенной вероятностью формирования персистирующей ВПЧ-инфекции и, как следствие, развития цервикальных интраэпителиальных поражений [65, 82].

Одним из ключевых патогенетических факторов выступает *Gardnerella vaginalis* – типичный представитель CST IV. Данный микроорганизм продуцирует сиалидазу – фермент, расщепляющий гликопротеиновые компоненты вагинальной слизи, в частности муцин [22, 40, 126]. Поскольку слизистый слой выполняет функцию физического барьера, препятствующего адгезии бактерий к эпителию

[22, 40, 82], его деградация ведет к ослаблению защитных свойств слизистой оболочки и создает условия для колонизации патогенами.

В противоположность этому, метаболиты лактобацилл, прежде всего молочная кислота, демонстрируют протективный потенциал. Экспериментально подтверждено, что молочная кислота способна влиять на иммунный ответ в эпителии цервиковагинального тракта. В условиях *in vitro* было показано, что она стимулирует секрецию противовоспалительного цитокина IL-1Ra и одновременно подавляет продукцию провоспалительных медиаторов. Данный эффект воспроизведен на трех различных моделях: клеточных линиях эпителия шейки матки и влагалища, первичных культурах вагинальных эпителиоцитов, а также в трехмерной органотипической модели (эпивагинальная ткань) [40, 59].

В современной литературе основное внимание уделяется взаимодействию между окислительным стрессом и микробиомом кишечника, вместе с тем не изучается сложная динамика между окислительным стрессом и вагинальным микробным сообществом. Например, было показано, что истощение микробиома кишечника снижает реакцию на окислительный стресс в микроглии головного мозга стареющих мышей [83, 139]. Это истощение характеризуется снижением внутриклеточной агрегации N⁶-карбоксиметиллизина, соединения, которое, как известно, способствует значительному образованию АФК [30]. Следовательно, это снижение уменьшает митохондриальную дисфункцию, сохраняя запасы аденозинтрифосфата (АТФ) в клетках микроглии [85].

Иммуноблоттинговые анализы, оценивающие маркеры окислительного стресса, такие как SOD1, SOD2, малоновый диальдегид (MDA), 3'-нитротирозин (3'-NT) и конечные продукты расширенного гликирования (AGEs) как в кишечнике, так и в яичниках, продемонстрировали значительное снижение окислительного стресса в кишечнике, хотя разница в окислительно-восстановительном состоянии в яичниках минимальна. Это позволило предположить, что ослабление окислительного стресса в кишечнике может улучшить здоровье организма человека [69, 91, 136].

Несмотря на прогресс в изучении вагинального биотопа, многие аспекты его функционирования остаются недостаточно исследованными. В частности, необходимы дальнейшие исследования, чтобы выявить взаимосвязь между окислительным стрессом и цервикальным микробиомом.

Перспективы использования лактобацилл

В последние десятилетия сформировалось понимание критической роли микробиома в поддержании гомеостаза слизистых оболочек женского репродуктивного тракта [37].

Интерес к исследованию вагинальной микробиоты вызван её предположительной способностью влиять на устойчивость персистенции папилломавирусной инфекции, при том, что именно ВПЧ считается главным причинным фактором возникновения злокачественных новообразований шейки матки [13, 65, 107].

Многочисленные исследования демонстрируют, что дисбиотические состояния, характеризующиеся снижением доминирования лактобацилл и увеличением видового разнообразия условно-патогенных микроорганизмов, создают благоприятные условия для персистенции ВПЧ высокого онкогенного риска и прогрессирования цервикальной интраэпителиальной неоплазии [40].

В этом контексте особую актуальность приобретают стратегии направленной модуляции микробиома, среди которых наиболее изученными являются применение пробиотиков и пребиотиков. Клинические исследования последних лет демонстрируют, что определенные штаммы лактобацилл, такие как *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri* и *L. jensenii*, способны не только восстанавливать нормальный микробиоценоз влагалища, но и оказывать опосредованное противовирусное действие [92].

Данный эффект реализуется посредством комплекса взаимосвязанных механизмов. К их числу относятся: подавление роста патогенных микроорганизмов за счет конкурентного антагонизма, опосредованного синтезом

бактериоцинов и молочной кислоты; иммуномодулирующее действие, выражающееся в активации Th1-клеточного звена и стимуляции продукции цитокинов с противовоспалительной активностью; а также усиление барьерной функции эпителиального пласта [61].

Результаты клинического применения пробиотиков характеризуются определенной вариабельностью, что, по-видимому, обусловлено гетерогенностью используемых штаммов, разнообразием схем введения и длительности терапевтических курсов. В качестве примера можно привести рандомизированное исследование под руководством Palma и соавторов, которое продемонстрировало, что дополнение стандартной антибактериальной схемы интравагинальным введением штамма *L. rhamnosus* BMX 54 повышает вероятность элиминации ВПЧ на 23 % по сравнению с группой, получавшей только антибиотикотерапию [93].

Особого внимания заслуживают инновационные подходы к коррекции вагинального микробиома, такие как трансплантация вагинальной микробиоты (VMT). Этот метод, заимствованный из практики лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта, представляет собой перспективное направление в терапии рецидивирующих вагинальных дисбиозов. Пилотные исследования демонстрируют, что VMT может обеспечивать устойчивую реколонизацию лактобациллами у 80 % пациенток с рецидивирующим бактериальным вагинозом, хотя в большинстве случаев требуется проведение нескольких процедур трансплантации. Важнейшими аспектами, требующими решения перед широким внедрением VMT в клиническую практику, являются разработка строгих критериев отбора доноров, стандартизация методов забора, хранения и введения микробиоты, а также оценка отдаленных результатов такого лечения [43].

Перспективными направлениями дальнейших исследований представляются разработка штамм-специфичных пробиотических препаратов на основе наиболее эффективных изолятов лактобацилл, создание комбинированных средств, сочетающих пробиотики с пребиотическими компонентами, а также

совершенствование протоколов VMT с использованием криоконсервированных стандартизированных биоматериалов.

Особый интерес представляет изучение взаимосвязи между определенными метаболитами вагинальной микробиоты и их способностью модулировать процессы канцерогенеза в эпителии шейки матки [22, 43, 107, 108].

Несмотря на значительный прогресс в понимании роли микробиома в патогенезе заболеваний шейки матки, многие вопросы остаются нерешенными.

Таким образом, наличие ряда нерешенных вопросов о механизмах взаимодействия между вагинальной микробиотой и клетками хозяина, а также недостаточная изученность влияния микробных метаболитов на функциональную активность первичных эпителиоцитов (нормальных и инфицированных ВПЧ), нейтрофилов и клеток карциномы шейки матки и определило цель нашего исследования: оценить влияние метаболитов вагинальной микробиоты на функциональное состояние клеток хозяина.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Общие данные

Экспериментальная часть работы была выполнена в Институте клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук. Забор биологического материала был проведен на базе Клиники адаптационной терапии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Исследование было одобрено ЛЭК по биоэтике ИКВС УрО РАН протокол № 3 от 10 июня 2022 г. Исследование выполнялось в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинской декларации [56].

2.2 Критерии включения и исключения женщин из исследования

Критерии включения:

1. Женщины репродуктивного возраста от 18 до 45 лет, добровольно подписавшие информационное согласие на участие в исследовании
2. Наличие одной из клинико-микробиологических характеристик:
 - ВПЧ-инфекция, вызванная высокоонкогенными типами вируса папилломы человека (подтвержденная методом ПЦР) на фоне бактериального вагиноза
 - ВПЧ-инфекция, вызванная высокоонкогенными типами вируса папилломы человека (подтвержденная методом ПЦР) на фоне нормоценоза
 - бактериальный вагиноз без ВПЧ-инфекций
 - нормоценоз без ВПЧ-инфекций

Критерии исключения:

1. наличие инфекций, передающихся половым путем, кроме ВПЧ

2. беременность и период лактации
3. менструальное кровотечение в период забора материала
4. прием лекарственных препаратов (антимикробные препараты или спермициды в период до 30 дней до исследования, иммуномодулирующие средства в период до 3 месяцев до исследования)

Диагностические критерии:

1. Бактериальный вагиноз диагностировался при наличии ≥ 3 критериев Амсела [12]:
 - гомогенные сероватые выделения
 - pH влагалища $>4,5$ (определялся с помощью тест-полосок (Merck, Дармштадт, Германия))
 - положительный амино-тест (появление рыбного запаха при добавлении 10 % КОН)
 - наличие «ключевых клеток» при микроскопии мазков, окрашенных по Граму
2. Нормоценоз устанавливался при:
 - отсутствии признаков воспаления при микроскопии
 - pH влагалища 3,8-4,5
 - доминирование лактобацилл (>80 % микробного пейзажа)
 - отсутствие патогенной микрофлоры
 - количество УПМ в пределах референсных значений
3. ВПЧ-инфекция подтверждалась:
 - методом ПЦР

2.3 Характеристика штаммов микроорганизмов

В исследовании были использованы 130 штаммов *Lactobacillus spp.*, 10 *Gardnerella vaginalis* штамма выделенных из нижних отделов репродуктивного тракта 111 женщин, проходивших обследование в Клинике адаптационной

терапии ФГБОУ ВО «ОрГМУ» МЗ РФ, из них 53 женщины с нормоценозом, 23 – с бактериальным вагинозом, 35 женщин с ВПЧ. Штамм *Escherichia coli* K 12– музейный штамм коллекции культур ИКВС УрО РАН.

2.3.1 Методы выделения микроорганизмов

В рамках исследования проведено выделение штаммов лактобацилл и *Gardnerella vaginalis* из образцов цервикагинальной жидкости, полученных от женщин из группы включения. Для селективного выделения лактобацилл использовали плотную питательную среду MRS-агар, инкубировали в микроаэрофильных условиях (5 % CO₂) при 37 °С в течение 48 ч. После инкубации проводили морфологическую оценку колоний и подвергали дальнейшей микроскопии и биохимической идентификации [5]. Всего выделено 130 штаммов лактобацилл.

Для выделения *Gardnerella vaginalis* использовали колумбийский агар (Columbia Blood Agar Base, HiMedia) с добавлением 5 % стерильных эритроцитов. Инкубацию проводили при 37 °С в анаэробных условиях в течение 72 часов [18].

2.3.2 Методы идентификации выделенных штаммов микроорганизмов

Принадлежность микроорганизмов к роду *Lactobacillus* подтверждали на основании комплекса морфологических, культуральных, биохимических (тест-набор API 50 CH, согласно инструкции производителя) свойств, видовую принадлежность подтверждали методом ПЦР («ЛАКТОПОЛ» ООО «Литех», Россия). К лактобациллам относили грамположительные, неподвижные, неспорообразующие, каталазонегативные палочки длиной от 0,5-1,2х1,0-10,0 мкм [5].

Пробу на каталазу проводили следующим способом: на предметное стекло наносили две капли 3 %-ного пероксида водорода. Далее в одной из капель суспендировали отобранную пластиковой палочкой со среды колонию. В это же время, не позднее одной минуты фиксировали наличие или отсутствие пузырьков

кислорода либо визуально, либо при помощи микроскопа при малом увеличении. При неоднозначных результатах обе капли покрывали покровным стеклом и после сравнивали наличие пузырьков воздуха в обеих каплях [16].

Принадлежность микроорганизмов к *Gardnerella vaginalis* подтверждали на основании комплекса морфологических, культуральных и биохимических свойств. *Gardnerella vaginalis* – грамтрицательные или грамвариабельные мелкие палочки или коккобациллы (0,3-0,6x1,0-2,0 мкм) [77]. На колумбийском агаре с 5% эритроцитами через 48-72 часа инкубации в анаэробных условиях формировали мелкие (0,3-0,5 мм) серовато-белые колонии и образовывали зону слабого β -гемолиза вокруг колоний [18]. Каталазный тест – отрицательный (проводили по методике, описанной выше), оксидазный тест – отрицательный.

Дополнительно проводили определяли количество колониеобразующих единиц *Lactobacillus spp* и *Gardnerella vaginalis* методом ПЦР в реальном времени с использованием коммерческих наборов реактивов и специфических праймеров [19]. 1 копия ДНК приравнивалась к 1 КОЕ для каждого микроорганизма.

2.3.3 Метод получения нативных внеклеточных метаболитов лактобацилл

В исследовании были использованы нативные внеклеточные метаболиты лактобацилл, которые в тексте работы называли метаболитами.

Для выделения нативных внеклеточных метаболитов культивирование лактобацилл проводили в течение 72 ч в анаэробных условиях при 37 °С. В качестве питательной среды использовали коммерческий бульон *Lactobacillus* MRS Broth (HiMedia, Индия). Исходная концентрация микроорганизмов составляла 10^7 КОЕ/мл. Клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 минут, после чего дважды отмывали 0,9-% раствором NaCl. Далее осаждённые бактерии ресуспендировали в стерильной минеральной среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 2,5; $\text{MnSO}_4+4\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; $\text{MgSO}_4+7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; глюкоза – 20 [16,108]. Полученную суспензию инкубировали при 37 °С на орбитальном шейкере в течение 6 ч. Затем

клетки повторно осаждали центрифугированием (3000 g, 15 мин), а надосадочную жидкость фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore) [16].

Для определения содержания молочной кислоты в полученных внеклеточных метаболитах проводили титрование стандарт-титром 0,1н. карбонатом натрия (Уралхиминвест), количество молочной кислоты выражали в мМ [49].

2.3.4 Метод определения продукции бактериями пероксида водорода

Для определения продукции перекиси водорода исследуемыми бактериями в лунки 96-луночного планшета из полистирола вносили по 50 мкл бесклеточных супернатантов. Туда же добавляли 50 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мМ тетраметилбензидин и пероксидазу (0,5 ед./мл, КФ 1.11.1.7, Sigma-Aldrich), растворённые в цитратно-фосфатном буфере (рН 4,5). В качестве отрицательного контроля и для построения калибровочной кривой использовали образцы с концентрацией пероксида водорода от 0 до 2 мМ, приготовленные на той же минеральной среде. Реакцию останавливали через 5 минут инкубации при комнатной температуре путём внесения 50 мкл 5%-ной серной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм [11].

2.4 Метод выделения нейтрофилов из гепаринизированной венозной крови

Нейтрофилы выделяли из гепаринизированной венозной крови 12 добровольцев. Выделение проводили центрифугированием в двойном градиенте плотности фиколла (1,119 и 1,077 г/мл.) при 3000 об/м в течение 45 минут. Полученное кольцо нейтрофилов располагалось между двумя плотностями, его отбирали и отмывали центрифугированием физиологическим раствором в течение 10 минут при 1500 об/м. Затем отмывтые нейтрофилы ресуспендировали в среде DMEM в конечной концентрации 10^5 клеток/мл. Оценивали количество

жизнеспособных нейтрофилов с помощью окраски трипановым синим с последующим подсчетом в камере Горяева [6].

2.5 Метод поддержания жизнеспособных культур клеток HeLa

В работе были использованы линии клеток карциномы человека HeLa. Культуры клеток выращивали в полной ростовой среде, состоящей из среды DMEM с высоким содержанием глюкозы (25 мМ), без пирувата, с добавлением гентамицина сульфата (50 мкг/мл), а также 10-%-ной эмбриональной телячьей сыворотки, при 5 % CO₂ при 37 °C [51].

2.5.1 Заморозка и разморозка клеток

Культуру клеток снимали с поверхности культурального флакона смесью трипсина с версеном, после открепления клеток во флакон добавляли полную ростовую среду, центрифугировали 5 минут при 1500 об/м, полученный осадок ресуспендировали в среде для заморозки, состоящей из 90 % эмбриональной телячьей сыворотки, 10 % ДМСО, переносили в пробирки для замораживания. После этого пробирки помещали в жидкий азот.

При размораживании суспензию клеток помещали в культуральный флакон со средой DMEM с 10 %-ным содержанием эмбриональной телячьей сыворотки. После прикрепления клеток ко дну, среду меняли на новую [114].

2.6 Взятие образцов вагинальных эпителиальных клеток

Первичную культуру многослойного плоского эпителия влагалища получали путем соскоба клеток с влагалищной части шейки матки после удаления отслоившихся клеток стерильным физиологическим раствором. Полученные клеточные культуры транспортировали в термостатируемых контейнерах, используя в качестве транспортной среды 1 мл сбалансированного солевого раствора Хэнкса [13]. Для уменьшения бактериальной обсеменённости и удаления разрушенных клеток, пробы однократно промывали десятикратным объёмом

забуференного физиологического раствора, после чего центрифугировали в течение 5 минут при ускорении 200 g. Количество эпителиальных клеток нормировали до 10^6 на миллилитр с помощью гемоцитометра [13].

2.7 Изучение биологических свойств вагинальных микроорганизмов

2.7.1 Метод оценки влияния различных биоценозов на метаболическую активность клеток первичных эпителиоцитов

Для оценки метаболической активности клеток первичных эпителиоцитов использовали МТТ-тест. МТТ-тест измеряет функциональную активность ключевых клеточных ферментов – митохондриальных дегидрогеназ, что является показателем жизнеспособности и метаболического состояния клетки. Для этого к необходимому объему взвеси клеток добавляли тетразолия бромид и инкубировали 4 часа при температуре 37 °С в присутствии кислорода. Затем, после осаждения клеток центрифугированием при 3000 об/мин., отбирали надосадок, а к осадку добавляли диметилсульфоксид (ДМСО) до полного растворения формазана. Измерение оптической плотности проводили на фотометре при длине волны 520 нм [124].

2.7.2 Метод оценки влияния биогенных аминов и метаболитов *Lactobacillus spp.* и их отдельных компонентов (лактата и пероксида водорода) на изменение дегидрогеназной активности культур клеток HeLa

К клеткам, ресуспендированным в среде DMEM (10^5 кл/мл), добавляли путресцин (в конечной концентрации 0,15 и 0,45 mM) или пероксид водорода (в конечной концентрации 0,59; 1,17; 2,36 mM) или молочную кислоту (в конечной концентрации 5,6; 11,1; 22,2 mM) или нативные внеклеточные метаболиты лактобацилл, стандартизованные по содержанию молочной кислотой (в конечной концентрации 5,6 и 11,1 mM). Инкубировали 30 минут при 37 °С.

Для оценки метаболической активности клеток HeLa использовали МТТ-тест. Для этого к необходимому объему взвеси клеток HeLa добавляли тетразолия бромид и инкубировали 4 часа при температуре 37 °С в присутствии кислорода. Затем, после осаждения клеток центрифугированием при 3000 об/мин., отбирали надосадок, а к осадку добавляли диметилсульфоксид (ДМСО) до полного растворения формазана. Измерение оптической плотности проводили на фотометре при длине волны 520 нм [124].

2.7.3 Метод оценки влияния биогенных аминов и метаболитов *Lactobacillus spp.* и их отдельных компонентов (лактата и пероксида водорода) на изменение дегидрогеназной активности нейтрофилов

К выделенным нейтрофилам, ресуспендированным в среде DMEM (10^6 кл/мл), добавляли путресцин (в конечной концентрации 0,15 и 0,45 мМ) или пероксид водорода (в конечной концентрации 0,59; 1,17; 2,36 мМ) или молочную кислоту (в конечной концентрации 5,6; 11,1; 22,2 мМ) или нативные внеклеточные метаболиты лактобацилл, стандартизованные по содержанию молочной кислотой (в конечной концентрации 5,6 и 11,1 мМ). Инкубировали 30 минут при 37 °С.

Для оценки метаболической активности нейтрофилов использовали МТТ-тест, основанный на способности тетразолия восстанавливаться до окрашенного формазана благодаря митохондриальным ферментам. Для этого к необходимому объему взвеси нейтрофилов добавляли тетразолия бромид и инкубировали 4 часа при температуре 37 °С в присутствии кислорода. Затем, после осаждения клеток центрифугированием при 3000 об/мин., отбирали надосадок, а к осадку добавляли диметилсульфоксид (ДМСО) до полного растворения формазана. Измерение оптической плотности проводили на фотометре при длине волны 520 нм [94].

2.7.4 Метод оценки влияния биогенных аминов и метаболитов *Lactobacillus spp.* и их отдельных компонентов (лактата и пероксида водорода) на изменение митохондриального потенциала нейтрофилов

К выделенным нейтрофилам, ресуспендированным в среде DMEM (10^6 кл/мл), добавляли путресцин (в конечной концентрации 0,15 и 0,45 мМ) или пероксид водорода (в конечной концентрации 0,59; 1,17; 2,36 мМ) или молочную кислоту (в конечной концентрации 5,6; 11,1; 22,2 мМ) или нативные внеклеточные метаболиты лактобацилл, стандартизованные по содержанию молочной кислотой (в конечной концентрации 5,6 и 11,1 мМ). Инкубировали 30 минут при 37 °С.

Для определения изменения митохондриального потенциала нейтрофилов под действием путресцина, нативных внеклеточных метаболитов, молочной кислоты и пероксида водорода проводили окраску катионным красителем LumiTracker MitoRed CMXRos. Катионный краситель способен накапливаться только в метаболически активных митохондриях. Степень его накопления в клетке говорит о степени активности митохондрий клеток, их целостности.

Для этого суспензию клеток после инкубации с соответствующими концентрациями путресцина, пероксида водорода и лактата, центрифугировали при 1500 об/м 10 минут, отбирали надосадок и к осадку добавляли краситель с рабочей концентрацией 200 нМ. Инкубировали 30 минут при 37 °С, затем снова центрифугировали при 1500 об/м 10 минут и заменяли краситель на среду DMEM. Затем 20 мкл наносили на обезжиренное стекло в 20 мкл глутарового альдегида для фиксации, высушивали на воздухе и микроскопировали в люминесцентном микроскопе.

2.7.5 Метод оценки влияния биогенных аминов и метаболитов *Lactobacillus spp.* и их отдельных компонентов (лактата и пероксида водорода) на изменение митохондриального потенциала культур клеток HeLa

К клеткам, ресуспендированным в среде DMEM (10^5 кл/мл), добавляли путресцин (в конечной концентрации 0,15 и 0,45 мМ) или пероксид водорода (в конечной концентрации 0,59; 1,17; 2,36 мМ) или молочную кислоту (в конечной концентрации 5,6; 11,1; 22,2 мМ) или нативные внеклеточные метаболиты лактобацилл, стандартизованные по содержанию молочной кислотой (в конечной концентрации 5,6 и 11,1 мМ). Инкубировали 30 минут при 37 °С.

Для определения изменения митохондриального потенциала клеток HeLa под действием путресцина, нативных метаболитов, пероксида водорода и молочной кислоты проводили окраску катионным красителем LumiTrackerMito Red CMXRos. Для этого суспензию клеток после инкубации с соответствующими концентрациями путресцина, нативных препаратов, пероксида водорода, молочной кислоты, центрифугировали при 1500 об/м 10 минут, отбирали надосадок и к осадку добавляли краситель с рабочей концентрацией 200 нМ. Инкубировали 30 минут при 37 °С, затем снова центрифугировали при 1500 об/м 10 минут и заменяли краситель на среду DMEM. Затем 20 мкл наносили на обезжиренное стекло в 20 мкл глутарового альдегида для фиксации, высушивали на воздухе и микроскопировали в люминесцентном микроскопе.

2.7.6 Метод оценки влияния микробных метаболитов на устойчивость клеток HeLa к действию окислительного стресса

К клеткам, ресуспендированным в среде DMEM (10^5 кл/мл), добавляли или путресцин (в конечной концентрации 0,15 и 0,45 мМ) или пероксид водорода (в конечной концентрации 0,59; 1,17; 2,36 мМ) или молочную кислоту (в конечной концентрации 5,6; 11,1; 22,2 мМ) или нативные внеклеточные метаболиты лактобацилл, стандартизованные по содержанию молочной кислотой (в конечной концентрации 5,6 и 11,1 мМ). Инкубировали 30 минут при 37 °С.

Затем добавляли 200 мкМ пероксид водорода и инкубировали 24 часа при 5 % CO₂, 37 °С.

После инкубации клетки окрашивали согласно инструкции к набору для определения апоптотических клеток с помощью Аннексин V-AF488.

Параллельно для определения доли выживших, клетки окрашивали 0,4 % раствором трипанового синего в соотношении 1:1 с последующей световой микроскопией. Живые клетки оставались бесцветными, а мертвые клетки окрашивались в синий цвет.

В процессе апоптоза фосфотидилсерин из внутренней поверхности плазматической мембраны (где располагается его основное количество) переходит во внешнюю, где и может связаться с аннексином V. Некрозные клетки окрашиваются и аннексином V и пропидием йодидом, из-за нарушения целостности и проницаемости плазматической мембраны.

Дальнейшее исследование клеток под флуоресцентным микроскопом осуществляли, с использованием двойного набора фильтров.

2.7.7 Метод оценки влияния микробных метаболитов на устойчивость эпителиальных клеток к окислительному стрессу

В качестве стресс-индуцирующего фактора использовали перекись водорода, как описано ранее [38]. Для этого к 500 мкл суспензии эпителиальных клеток (10^6 клеток/мл) в растворе Хенкса трижды с интервалом в 1 ч добавляли 30 мкл 3 % раствора H_2O_2 ; в контроле вместо перекиси водорода добавляли стерильный физиологический раствор. Через час после последнего добавления измеряли соотношение выживших, апоптотических и мертвых неапоптотических клеток методом флуоресцентной микроскопии с использованием набора, содержащего аннексин V-флуоресцеин в сочетании с пропидиум йодидом (BioVision, США) [13]. Устойчивость клеток к повреждению оценивали по изменению соотношения выживших, апоптотических и мертвых неапоптотических клеток под действием перекиси водорода по сравнению с контролем. Устойчивость эпителиальных клеток к повреждению измеряли в трех параллельных сериях.

2.7.8 Метод определения бактерицидности различных концентраций биогенных аминов и метаболитов *Lactobacillus spp.* и их отдельных компонентов (лактата и пероксида водорода) в отношении *E.coli*

Оценку бактерицидности лактата и пероксида водорода в отношении кишечной палочки осуществляли по отсутствию роста тест-штамма на агаризованной среде Эндо.

Для этого к суспензии *E.coli* K12 (10^7 КОЕ/мл), добавляли или путресцин (в конечной концентрации 0,15 и 0,45 мМ) или пероксид водорода (в конечной концентрации 0,59; 1,17; 2,36 мМ) или молочную кислоту (в конечной концентрации 5,6; 11,1; 22,2 мМ) или нативные внеклеточные метаболиты лактобацилл, стандартизованные по содержанию молочной кислотой (в конечной концентрации 5,6 и 11,1 мМ). После 30 минутной инкубации взвесь (20 мкл) раскапывали на агаризованную среду Эндо. Культивировали 24 часа при 37 °С, по истечении времени проводили подсчет КОЕ.

2.7.9 Метод оценки влияния биогенных аминов и метаболитов *Lactobacillus spp.* и их отдельных компонентов (лактата и пероксида водорода) на изменение киллинговой активности нейтрофилов в отношении *E.coli*

К выделенным нейтрофилам, ресуспендированным в среде DMEM (10^6 кл/мл), добавляли путресцин (в конечной концентрации 0,15 и 0,45 мМ) или пероксид водорода (в конечной концентрации 0,59; 1,17; 2,36 мМ) или молочную кислоту (в конечной концентрации 5,6; 11,1; 22,2 мМ) или нативные внеклеточные метаболиты лактобацилл, стандартизованные по содержанию молочной кислотой (в конечной концентрации 5,6 и 11,1 мМ). Инкубировали 30 минут при 37 °С.

Для изучения влияния путресцина, нативных внеклеточных метаболитов, молочной кислоты и пероксида водорода на способность нейтрофилов к киллингу определяли по накоплению биомассы бактерий, определяемой с использованием *E.coli* [105]. Для этого к взвеси обработанных путресцином или пероксидом

водорода или молочной кислотой или внеклеточными метаболитами нейтрофилов добавляли опсонизированную *E. coli* [106], инкубировали 1 час при температуре 37 °С. После инкубации добавляли сапонин для лизиса нейтрофилов, затем высевали 20 мкл взвеси на чашки Петри с агаризованной средой Эндо, инкубировали 24 часа при 37 °С и вели подсчет колониеобразующих единиц. В качестве контроля использовали количество бактерий, выживших после совместной инкубации необработанных нейтрофилов и бактерий.

2.8 Статистическая обработка результатов

Исследования были проведены как минимум в трех повторностях.

Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (доля выживших, апоптотических и неапоптотических погибших эпителиальных клеток и изменение их доли относительно исходной доли), а также соотношения долей типов гибели клеток.

Нормальность распределения данных проверялась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова.

Для оценки значимости межгрупповых различий в доле апоптотических, выживших и неапоптотических погибших клеток использовался точный критерий Фишера; значимость межгрупповых различий в изменении их доли после лечения относительно исходного состояния – с помощью критерия Манна–Уитни.

Оценка достоверности различий между средними значениями в группах проводилась путем расчета стандартной ошибки, а уровень значимости определялся с использованием t-критерия Стьюдента.

Для оценки достоверности различий в эффектах внеклеточных метаболитов лактобацилл, стандартизованных по лактату, использовали двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA). Порог статистической значимости был установлен как двустороннее значение p , равное 0,05.

ГЛАВА 3. Влияние метаболитов вагинальных микроорганизмов на метаболизм и устойчивость к окислительному стрессу клеток первичных эпителиоцитов

Вагинальный нормоценоз представляет собой сбалансированное состояние микробиоценоза, характеризующееся сложными взаимосвязями между микроорганизмами и клетками хозяина, что обеспечивает поддержание гомеостаза эпителиальных тканей. Это динамическое равновесие определяется количественным и качественным составом микробиоты, а также ее взаимодействием с эпителиоцитами, что в значительной степени влияет на их функциональное состояние. Поддержание нормоценоза играет ключевую роль в сохранении здоровья слизистых оболочек, предотвращении колонизации патогенными микроорганизмами и развитии воспалительных процессов [29]. Дисбиоз ассоциирован с повышенным риском инфекционных, воспалительных и онкологических заболеваний, что подчеркивает важность изучения механизмов регуляции микробиоценоза [62].

Вирус папилломы человека (ВПЧ) представляет собой уникальную модель для изучения того, как инфекционные агенты взаимодействуют с микробиотой и эпителиальными клетками. ВПЧ является одним из наиболее распространенных ДНК-содержащих онкогенных вирусов, способных персистировать в базальном слое эпителия и модулировать клеточные процессы. Показано, что ВПЧ-инфицированные клетки характеризуются измененным метаболическим профилем, включая усиление гликолиза и глютаминолиза, что обеспечивает их повышенную пролиферативную активность и устойчивость к апоптозу [40,84,138].

Онкопротеины Е6 и Е7 вируса ингибируют ключевые регуляторы клеточного цикла, такие как p53 и pRb, а также активируют теломеразу, способствуя клеточному бессмертию [86]. Эти изменения создают благоприятные условия для развития ВПЧ-ассоциированных поражений, включая предраковые состояния и карциномы.

Важным фактором, влияющим на функциональное состояние эпителиоцитов, является окислительный стресс. Повышенный уровень активных форм кислорода (АФК) может вызывать повреждение ДНК, липидов и белков, что способствует геномной нестабильности и прогрессированию неопластических изменений [119].

В то же время окислительный стресс играет двойственную роль в контексте ВПЧ-инфекции: с одной стороны, он может способствовать элиминации вируса за счет активации противовирусных механизмов, с другой – хроническое воздействие РФК может усиливать онкогенные эффекты ВПЧ [129]. Взаимодействие между микробиотой, окислительным стрессом и ВПЧ-инфекцией остается недостаточно изученным, несмотря на его потенциальное значение для понимания механизмов канцерогенеза.

Таким образом, данное исследование направлено на изучение влияния типа микробиоты на функциональное состояние эпителиоцитов в условиях окислительного стресса.

3.1 Влияние типа микроокружения на метаболическую активность и устойчивость к окислительному стрессу первичных эпителиоцитов

В исследование по изучению влияния типа микробиоценоза на метаболическую и функциональную активность первичных эпителиоцитов нами были включены 53 женщины, репродуктивного возраста (средний возраст $28,5 \pm 4,2$ года), соответствующих критериям включения (здоровые женщины с нормоценозом или с дефицитом лактобацилл).

На основании качественного и количественного анализа микробиоты все участницы были разделены на 4 группы:

1. женщины с нормальным ($>10^5$ КОЕ/мл) количеством пероксидпродуцирующих лактобацилл (n=15, 28,3%).
2. женщины с нормальным ($>10^5$ КОЕ/мл) количеством пероксиднепродуцирующих лактобацилл (n=15, 28,3%).

3. женщины с субнормальным ($<10^5$ КОЕ/мл) количеством пероксидпродуцирующих лактобацилл ($n=10$, 18,9 %).

4. женщины с субнормальным ($<10^5$ КОЕ/мл) количеством пероксиднепродуцирующих лактобацилл ($n=13$, 24,5 %) (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика численности лактобацилл у женщин с разным типом биоценоза

Группа	Количество женщин (n)	Доля (%)	КОЕ ($\log_{10}$) среднее
Нормальное количество лактобацилл	30	56,6	
-пероксидпродуцирующие лактобациллы (норма)	15	28,3	7,16
-пероксиднепродуцирующие лактобациллы (норма)	15	28,3	6,38
Сниженное количество лактобацилл	23	43,4	
-пероксидпродуцирующие лактобациллы(дефицит)	10	18,9	4,37
-пероксиднепродуцирующие лактобациллы (дефицит)	13	24,5	3,48
Всего участниц исследования	53	100	

В образцах первичных культур эпителиоцитов полученных от женщин 1 группы (среднее количество пероксидпродуцирующих лактобацилл $7,16 \pm 0,62 \log_{10}$ КОЕ/мл) уровень дегидрогеназной активности был самым низким и составлял от 0,9 до 2,3 у.е. при среднем значении $1,43 \pm 0,46$ (Рис 3.1).

Во второй группе (количество пероксиднепродуцирующих лактобацилл в среднем $6,38 \pm 0,72 \log_{10}$ КОЕ/мл) уровень дегидрогеназной активности был несколько выше, чем у эпителиоцитов, полученных от женщин первой группы, и составлял от 1,3 до 3,3 у.е. при среднем значении $2,2 \pm 0,62$.

В третьей группе (среднее количество пероксидпродуцирующих лактобацилл $4,37 \pm 0,41 \log_{10}$ КОЕ/мл) уровень дегидрогеназной активности был выше, чем у эпителиоцитов, полученных от женщин первой и второй группы, и составлял от 2 до 3,3 у.е. при среднем значении $2,46 \pm 0,47$.

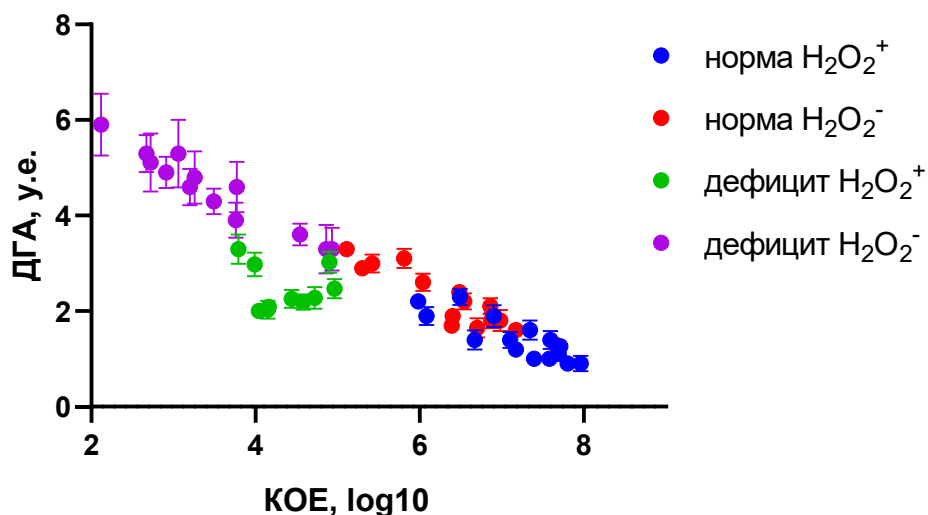


Рисунок 3.1 – Изменение дегидрогеназной активности первичных эпителиоцитов в зависимости от численности лактобацилл и их способности продуцировать пероксид водорода

В четвертой группе (среднее количество пероксиднепродуцирующих лактобацилл $3,48 \pm 0,87 \log_{10}$ КОЕ/мл) уровень дегидрогеназной активности был выше, чем у эпителиоцитов, полученных от женщин первой, второй и третьей группы, и составлял от 3,3 до 5,9 у.е. при среднем значении $4,53 \pm 0,81$ (Рис.3.1).

Таким образом, нами установлено, что метаболическая активность эпителиоцитов зависит и от количества лактобацилл и от их экологической характеристики (то есть их способности продуцировать пероксид водорода). Так, при высокой численности лактобацилл мы наблюдали самые низкие значения дегидрогеназной активности эпителиоцитов, при этом следует отметить, что наибольшим эффектом обладали пероксидпродуцирующие лактобациллы. С другой стороны, хотя при низких значениях численности лактобацилл наблюдались высокие значения дегидрогеназной активности, при наличии пероксидпродуцирующих лактобацилл метаболическая активность эпителиоцитов была ниже, чем в присутствии пероксиднепродуцирующих (Рис. 3.1). В то же время следует отметить, что дегидрогеназная активность эпителиоцитов, полученных от женщин с субнормальным количеством пероксидпродуцирующих

лактобацилл ($<10^5$ КОЕ/мл) практически не отличалась от таковой у эпителиоцитов, полученных от женщин с нормальным уровнем ($>10^5$ КОЕ/мл) пероксиднепродуцирующих лактобацилл.

Полученные данные подтверждают ключевую роль пероксидпродуцирующих лактобацилл в регуляции метаболической активности вагинального эпителия. Статистически значимые отличия между группами позволяют рассматривать уровень дегидрогеназной активности первичных эпителиоцитов, как перспективный биомаркер для оценки состояния вагинального микробиоценоза.

В образцах первичных культур эпителиоцитов полученных от женщин первой группы (с нормальным количеством пероксидпродуцирующих лактобацилл) уровень выживаемости при окислительном стрессе составлял от 57 % до 73 % при среднем значении $63,8 \pm 4,74$.

Во второй группе (с нормальным количеством пероксиднепродуцирующих лактобацилл) уровень выживаемости при окислительном стрессе составлял от 45 % до 59 % при среднем значении $51,73 \pm 4,11$.

В третьей группе (с субнормальным количеством пероксидпродуцирующих лактобацилл) уровень выживаемости при окислительном стрессе составлял от 42 % до 59 % при среднем значении $48,4 \pm 6,1$.

В четвертой группе (с субнормальным количеством пероксиднепродуцирующих лактобацилл) уровень выживаемости при окислительном стрессе составлял от 27 % до 41 % при среднем значении $36,31 \pm 3,68$ (Рис. 3.2).

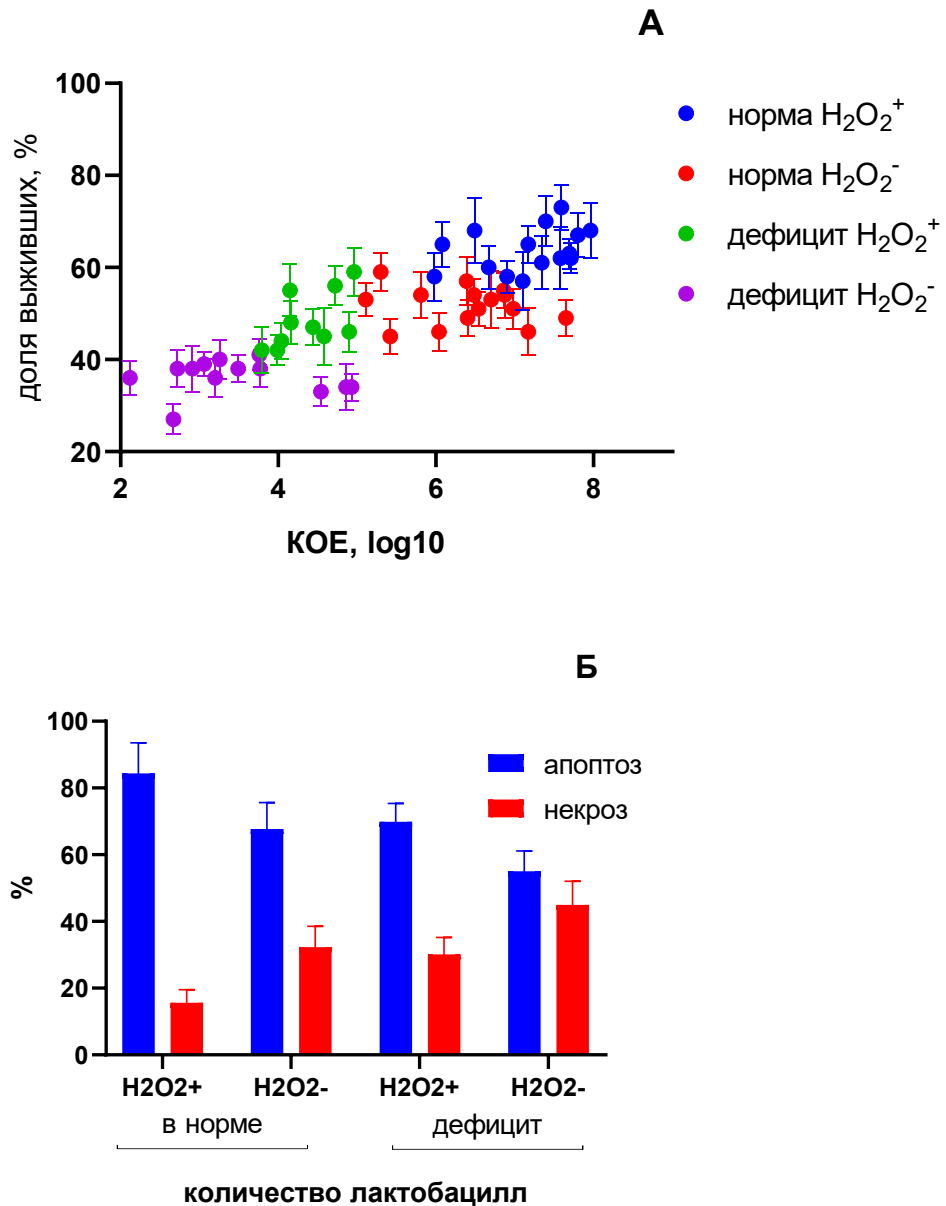


Рисунок 3.2 – Изменение устойчивости к окислительному стрессу (А) и распределение типов клеточной гибели (Б) первичных эпителиоцитов в зависимости от численности лактобацилл и их способности продуцировать пероксид водорода

Таким образом, общей закономерностью, полученной при выполнении этого этапа исследований, было то, что уровень лактобацилл во влагалище и их способность продуцировать пероксид водорода определяли, во-первых,

устойчивость к окислительному стрессу, а во-вторых, определяли тип клеточной гибели первичных эпителиоцитов. Так, при субнормальном уровне пероксиднепродуцирующих лактобацилл мы наблюдали наименьшую (~40 %) выживаемость первичных эпителиоцитов, подвергнутых окислительному стрессу; при этом при субнормальном уровне пероксидпродуцирующих лактобацилл выживаемость первичных эпителиоцитов была примерно в полтора раза выше (рис. 3.2а). Подобная закономерность была получена и для лактобацилл, содержание которых в вагинальном биотопе было в норме: наличие пероксидпродуцирующих лактобацилл в большей степени способствовало выживаемости первичных эпителиоцитов, подвергнутых окислительному стрессу, по сравнению с пероксиднепродуцирующими лактобациллами (соответственно, 70 % и 55 % выживших, рис. 3.2а). Одновременно с этим следует отметить, что во всех случаях доля первичных эпителиоцитов, погибших в результате окислительного стресса апоптотическим путем, в присутствии пероксидпродуцирующих лактобацилл была значительно выше по сравнению с пероксиднепродуцирующими (рис. 3.2б). Так же, как и в случае с дегидрогеназной активностью, изучаемые параметры эпителиоцитов (устойчивость к окислительному стрессу и распределение типов клеточной гибели), полученных от женщин с субнормальным количеством пероксидпродуцирующих лактобацилл практически не отличались от таковы у эпителиоцитов, полученных от женщин с нормальным уровнем пероксиднепродуцирующих лактобацилл.

3.2 Влияние типа микроокружения на метаболическую активность и устойчивость к окислительному стрессу первичных эпителиоцитов, полученных от женщин, инфицированных ВПЧ

В исследование по изучению влияния качественного и количественного состава микробиоты влагалища на метаболическую и функциональную активность первичных эпителиоцитов нами были включены 35 ВПЧ-положительных женщин (средний возраст $28,5 \pm 4,2$ года).

Таблица 2 – Характеристика численности лактобацилл у женщин с ВПЧ при разных типах биоценоза

Группа	Количество женщин (n)	Доля (%)	КОЕ (log ₁₀) среднее
Нормальное количество лактобацилл	18	51,4	
-пероксидпродуцирующие лактобациллы (норма)	10	28,6	6,4
-пероксиднепродуцирующие лактобациллы (норма)	8	22,9	6,33
Сниженное количество лактобацилл	17	48,6	
-пероксидпродуцирующие лактобациллы(дефицит)	6	17,1	4,15
-пероксиднепродуцирующие лактобациллы (дефицит)	11	31,4	3,12
Всего участниц исследования	35	100	

На основании качественного и количественного анализа микробиоты все участницы были разделены на 4 группы:

1. женщины с нормальным ($>10^5$ КОЕ/мл) количеством пероксидпродуцирующих лактобацилл (n=10, 28,6 %).

2. женщины с нормальным ($>10^5$ КОЕ/мл) количеством пероксиднепродуцирующих лактобацилл (n=8, 22,9 %).

3. женщины с субнормальным ($<10^5$ КОЕ/мл) количеством пероксидпродуцирующих лактобацилл (n=6, 17,1 %).

4. женщины с субнормальным ($<10^5$ КОЕ/мл) количеством пероксиднепродуцирующих лактобацилл (n=11, 31,4 %) (таблица 2).

В образцах первичных культур эпителиоцитов полученных от женщин 1 группы (среднее количество пероксидпродуцирующих лактобацилл $6,4 \pm 0,56 \log_{10}$ КОЕ/мл) уровень дегидрогеназной активности был самым низким (Рис. 3.3) и составлял от 1,06 до 4,21 у.е. при среднем значении $2,12 \pm 1,03$.

Во второй группе (среднее количество пероксиднепродуцирующих лактобацилл $6,3 \pm 0,6 \log_{10}$ КОЕ/мл) уровень дегидрогеназной активности эпителиоцитов составлял от 2,31 до 5,36 у.е. при среднем значении $3,65 \pm 1,15$.

В третьей группе (среднее количество пероксидпродуцирующих лактобацилл $4,15 \pm 0,49 \log_{10}$ КОЕ/мл) уровень дегидрогеназной активности эпителиоцитов составлял от 4,8 до 6,9 у.е. при среднем значении $5,75 \pm 0,81$.

В четвертой группе (среднее количество пероксиднепродуцирующих лактобацилл $3,12 \pm 0,73 \log_{10}$ КОЕ/мл) уровень дегидрогеназной активности эпителиоцитов составлял от 5,8 до 8,3 у.е. при среднем значении $7,06 \pm 0,84$ (Рис. 3.3).

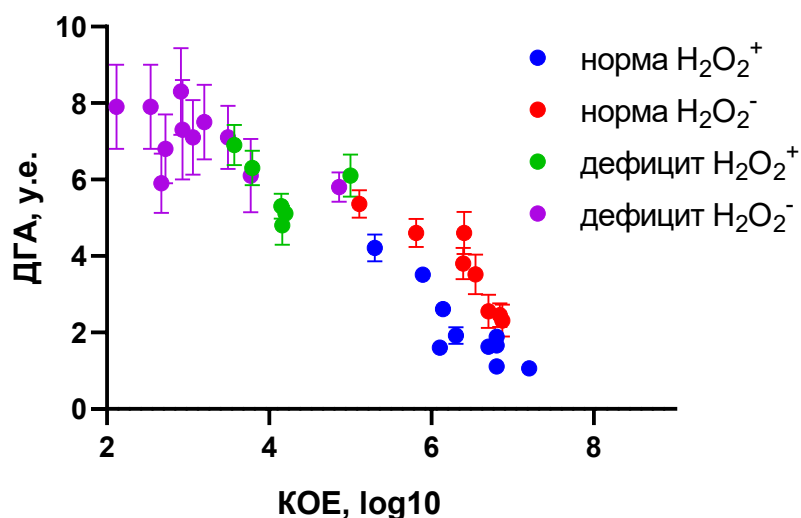


Рисунок 3.3 – Изменение дегидрогеназной активности первичных эпителиоцитов, полученных от женщин инфицированных ВПЧ, в зависимости от численности лактобацилл и их способности продуцировать пероксид водорода

Нами продемонстрировано, что представители рода *Lactobacillus* более эффективно воздействуют на метаболизм эпителиоцитов, заражённых вирусом папилломы человека. При этом сила такого воздействия прямо пропорциональна двум факторам: количеству бактерий и их способности продуцировать пероксид водорода. Так же, как и в случае с эпителиоцитами от здоровых, при высокой

численности лактобацилл мы наблюдали самые низкие значения дегидрогеназной активности эпителиоцитов, и наименьшее ее значение было в присутствии пероксидпродуцирующих лактобацилл. Одновременно с этим, мы наблюдали высокие значения дегидрогеназной активности эпителиоцитов при низких значениях численности лактобацилл, при этом в присутствии пероксидпродуцирующих лактобацилл метаболическая активность эпителиоцитов была ниже.

Установлено, что достаточное количество пероксидпродуцирующих лактобацилл, при увеличении их количества в среде приводит к снижению дегидрогеназной активности инфицированных ВПЧ эпителиоцитов. Дефицит пероксидпродуцирующих лактобацилл при увеличении их количества в среде также снижают дегидрогеназную активность инфицированных ВПЧ эпителиоцитов. При дефиците пероксиднепродуцирующих лактобацилл в среде отмечается самое высокое значение дегидрогеназной активности эпителиоцитов, которое начинает снижаться по мере роста числа лактобацилл в среде.

В образцах первичных культур эпителиоцитов полученных от женщин 1 группы (с нормальным количеством пероксидпродуцирующих лактобацилл) уровень выживших при окислительном стрессе составлял от 34 до 48 % при среднем значении $39,9 \pm 4,53$.

Во второй группе (с нормальным количеством пероксиднепродуцирующих лактобацилл) уровень выживших при окислительном стрессе составлял от 51 до 71 % при среднем значении $60,5 \pm 7,13$.

В третьей группе (с субнормальным количеством пероксидпродуцирующих лактобацилл) уровень выживших при окислительном стрессе составлял от 44 до 52 % при среднем значении $48,17 \pm 3,19$.

В четвертой группе (с субнормальным количеством пероксиднепродуцирующих лактобацилл) уровень выживших при окислительном стрессе составлял от 63 до 81 % при среднем значении $72,27 \pm 5,73$ (Рис. 3.4А).

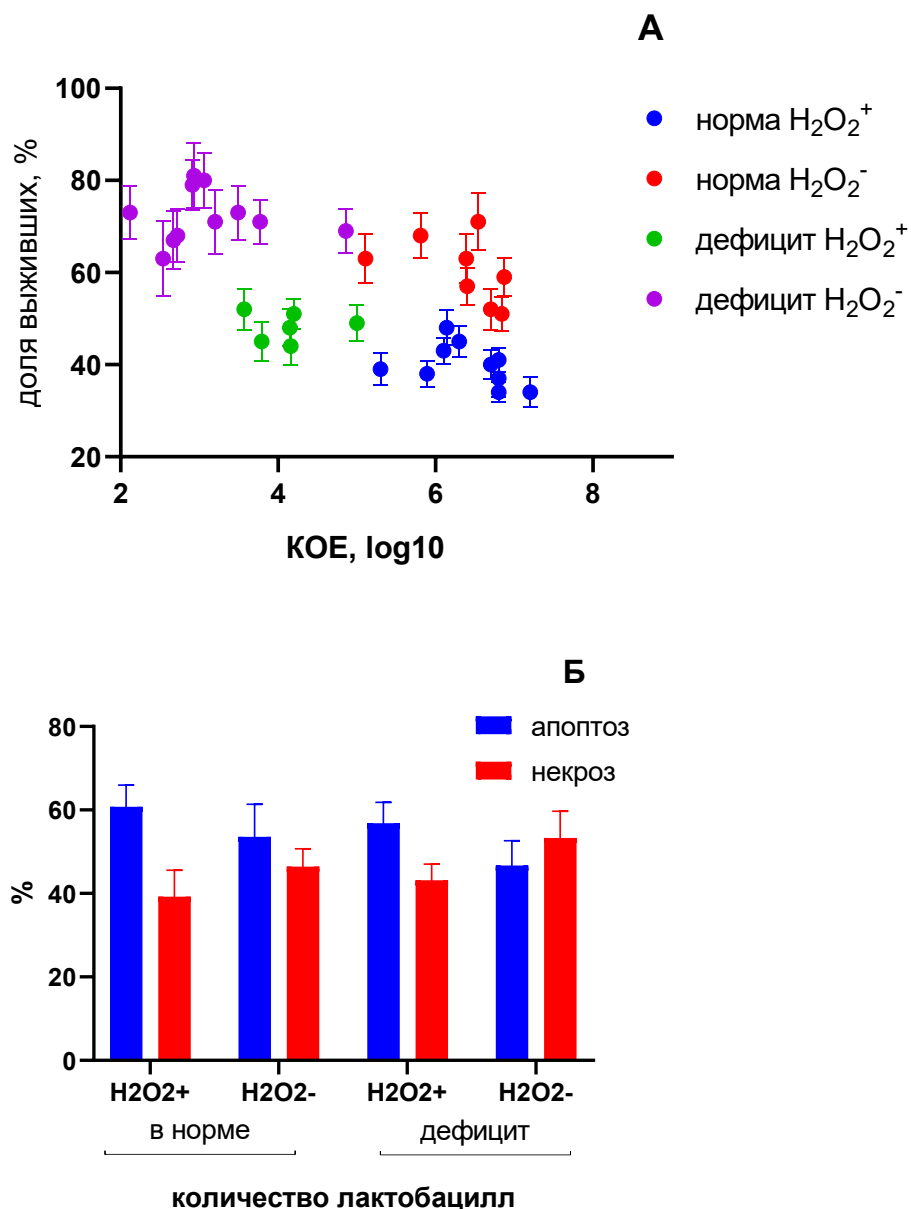


Рисунок 3.4 – Изменение устойчивости к окислительному стрессу (А) и распределение типов клеточной гибели (Б) первичных эпителиоцитов, полученных от женщин, инфицированных ВПЧ, в зависимости от численности лактобацилл и их способности продуцировать пероксид водорода

Следовательно, было выявлено, что, подобно ситуации с эпителиальными клетками здоровых женщин, концентрация лактобацилл во влагалищной среде и их способность синтезировать пероксид водорода обуславливали устойчивость к окислительному стрессу, а также характер гибели клеток в первичных культурах

эпителиоцитов, взятых у ВПЧ-инфицированных женщин. При этом направленность указанных эффектов оказалась противоположной. Так, при субнормальном уровне пероксиднепродуцирующих лактобацилл мы наблюдали наибольшую (~80 %) выживаемость эпителиоцитов, подвергнутых окислительному стрессу; при этом при субнормальном уровне пероксидпродуцирующих лактобацилл выживаемость первичных эпителиоцитов была существенно ниже (рис. 3.4а). Подобная закономерность была получена и для лактобацилл, содержание которых в вагинальном биотопе было в норме: наличие пероксидпродуцирующих лактобацилл в большей степени способствовало гибели первичных эпителиоцитов, подвергнутых окислительному стрессу, по сравнению с пероксиднепродуцирующими лактобациллами (соответственно, 50 и 70 % выживших, рис. 3.4а). Во всех случаях доля первичных эпителиоцитов, погибших в результате окислительного стресса апоптотическим путем, в присутствии пероксидпродуцирующих лактобацилл была выше по сравнению с пероксиднепродуцирующими, однако следует отметить, что в каждом случае значение доли апоптотически погибших клеток было близко к доле некротических.

3.3 Влияние бактериального вагиноза на метаболическую активность и устойчивость к окислительному стрессу первичных эпителиоцитов, полученных от женщин, инфицированных и неинфицированных ВПЧ

В исследование по изучению влияния бактериального вагиноза на метаболическую и функциональную активность первичных эпителиоцитов нами были включены 35 женщин, репродуктивного возраста (средний возраст $26,5 \pm 3,2$ года), с подтвержденным или с отсутствующим диагнозом ВПЧ и с биоценозом, соответствующим критериям бактериального вагиноза.

На основании качественного и количественного анализа микробиоты все участницы были разделены на 2 группы:

1. ВПЧ-положительные женщины с бактериальным вагинозом (n=14, 60,9 %).
2. ВПЧ-негативные женщины с бактериальным вагинозом (n=9, 39,1 %) (таблица 3).

Таблица 3 – Характеристика численности *G. vaginalis* у женщин инфицированных и неинфицированных ВПЧ

Группа	Количество женщин (n)	Доля (%)	КОЕ (log ₁₀) среднее
БВ+ВПЧ	14	60,9	6,25
БВ без ВПЧ	9	39,1	5,61
Всего участниц исследования	23	100	

Результаты исследования демонстрируют существенные различия в реакции эпителиальных клеток на присутствие *G.vaginalis* в зависимости от их ВПЧ-статуса.

В образцах первичных культур эпителиоцитов полученных от женщин 1 группы (среднее количество БВ-ассоциированных микроорганизмов $6,25 \pm 0,68 \log_{10}$ КОЕ/мл) уровень дегидрогеназной активности составлял от 11 до 18,3 у.е при среднем значении $14,66 \pm 2,33$.

Во второй группе (среднее количество БВ-ассоциированных микроорганизмов $5,61 \pm 0,36 \log_{10}$ КОЕ/мл) уровень дегидрогеназной активности составлял от 7,9 до 18,1 у.е при среднем значении $11,58 \pm 4,03$ (Рис. 3.5).

В неинфицированных ВПЧ клетках отмечалось незначительное снижение метаболической активности по мере увеличения количества *G.vaginalis* в среде. В то же время в инфицированных ВПЧ клетках наблюдалась противоположная динамика, так их метаболическая активность заметно возрастала при увеличении концентрации *G.vaginalis*.

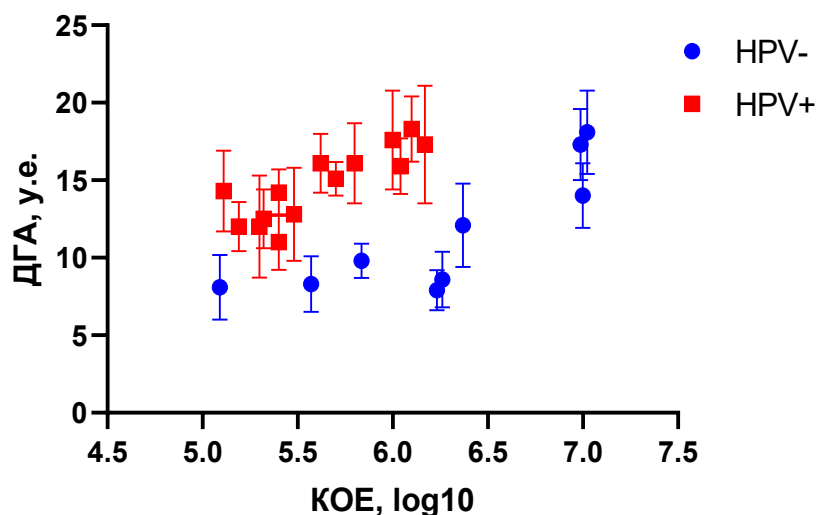


Рисунок 3.5 – Изменение дегидрогеназной активности первичных эпителиоцитов, полученных от женщин инфицированных и неинфицированных ВПЧ в зависимости от численности *G. vaginalis*

В образцах первичных культур эпителиоцитов полученных от женщин 1 группы (среднее количество БВ-ассоциированных микроорганизмов $6,25 \pm 0,68 \log_{10}$ КОЕ/мл) уровень выживших при окислительном стрессе составлял от 61 до 79 % при среднем значении $70,71 \pm 1,4$.

Во второй группе (среднее количество БВ-ассоциированных микроорганизмов $5,61 \pm 0,36 \log_{10}$ КОЕ/мл) уровень выживших при окислительном стрессе составлял от 45 до 63 % при среднем значении $55,33 \pm 2,31$ (Рис. 3.6а).

Выживаемость клеток при окислительном стрессе также существенно различалась в зависимости от их ВПЧ-статуса. Неинфицированные клетки демонстрировали низкую устойчивость к окислительному стрессу независимо от *G. vaginalis*. В то время как инфицированные ВПЧ клетки сохраняли стабильно высокую жизнеспособность при любом количестве *G.vaginalis*.

Особый интерес представляют различия в распределении типов клеточной гибели. В неинфицированных клетках преобладал апоптоз, что является типичной реакцией на окислительный стресс (Рис. 3.6б). Однако в инфицированных ВПЧ клетках картина была иной, здесь наблюдалось значительное увеличение доли

некротических клеток. Это позволяет предположить, что ВПЧ инфекция в условиях БВ способствует переключению механизма клеточной гибели с апоптоза на некроз.

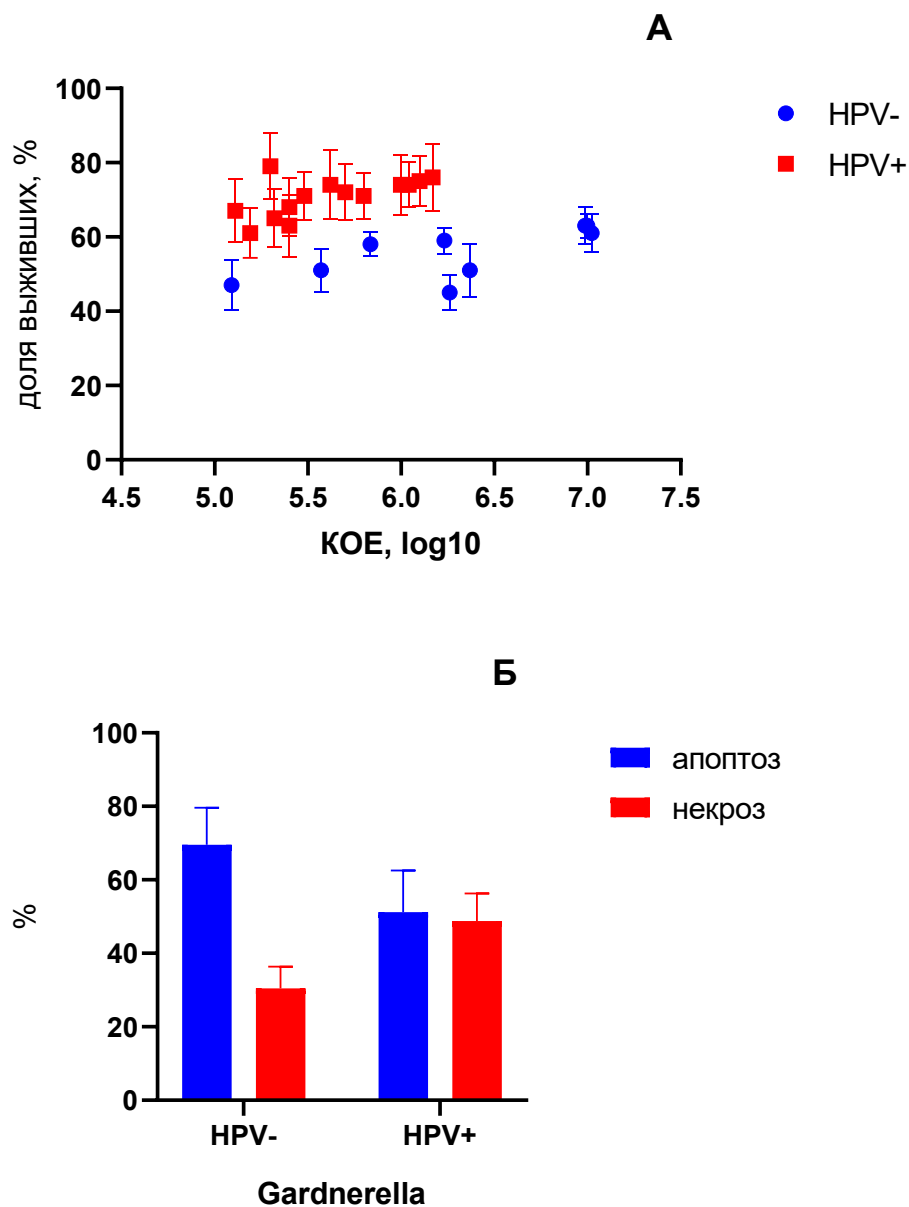


Рисунок 3.6 – Изменение устойчивости к окислительному стрессу (А) и распределение типов клеточной гибели (Б) первичных эпителиоцитов, полученных от ВПЧ-инфицированных и неинфицированных женщин с бактериальным вагинозом

Возможно, повышенная выживаемость инфицированных клеток при окислительном стрессе может быть связана с несколькими факторами. Во-первых,

ВПЧ может, по-видимому, изменять активность антиоксидантной системы клетки, повышая ее устойчивость к окислительному стрессу. Во-вторых, метаболиты *G.vaginalis*, такие как биогенные амины, могут выступать в роли антиоксидантов [57], дополнительно защищая инфицированные клетки. Эти механизмы могут работать совместно, обеспечивая преимущество ВПЧ-инфицированным клеткам в условиях БВ.

3.4 Обсуждение полученных результатов

Для поддержания колонизационной резистентности вагинальной среды важен не просто баланс микробиоты, но и определенное «качество» этой микробиоты, в частности ее способность продуцировать пероксид водорода. Поддержание достаточного количества пероксидпродуцирующих лактобацилл может быть важно для защиты клеток эпителия от окислительного стресса. Наши данные демонстрируют, что присутствие пероксидпродуцирующих штаммов лактобацилл способствует защите эпителиоцитов от окислительного стресса, поддерживает их метаболическую активность на низком уровне и снижает уровень некротической гибели.

Однако, чрезмерное количество лактобацилл, особенно тех, которые не способны продуцировать пероксид водорода, может, наоборот, негативно влиять на метаболическую активность клеток. Также пероксиднепродуцирующие лактобациллы влияют на выбор типа гибели эпителиоцитов в условиях окислительного стресса, мы наблюдали рост числа некротически погибших клеток, что может вести к усилению воспаления в вагинальной среде и снижению количества выживших клеток здорового эпителия в условиях окислительного стресса. Это согласуется с исследованиями, которые показывают, что состояние, характеризующееся доминированием пероксиднепродуцирующих лактобацилл, могут способствовать неэффективному и хроническому воспалению за счет усиления некротической гибели клеток [25].

G.vaginalis оказывает дифференцированное влияние на эпителиальные клетки в зависимости от наличия ВПЧ-инфекции. В здоровых клетках мы наблюдаем небольшое снижение метаболической активности в ответ на *G.vaginalis* в среде по сравнению с инфицированными эпителиоцитами. Однако, с ростом численности бактерий, дегидрогеназная активность эпителиоцитов увеличивается.

Также в условиях окислительного стресса и наличия *G.vaginalis* в среде снижалось и количество выживших здоровых клеток. Однако, при тех же условиях ВПЧ инфицированные клетки показывали совершенно иной клеточный ответ, так метаболическая активность была несколько выше, чем у неинфицированных, а также количество выживших клеток в ответ на окислительный стресс увеличивалось. Здесь важно, отметить, что в условиях окислительного стресса росло число некротически погибших ВПЧ инфицированных клеток, что скорее всего несет иной биологический смысл.

Полученные результаты позволяют предположить, что бактериальный вагиноз (БВ), который сопровождается избыточным размножением ассоциированных с ним микроорганизмов (особенно *Gardnerella vaginalis*), способен ускорять прогрессирование папилломавирусной инфекции и повышать вероятность возникновения диспластических процессов, то есть предраковых состояний шейки матки. В ВПЧ-инфицированных клетках на фоне роста числа лактобацилл происходит снижение метаболической активности. На фоне же дефицита лактобацилл не продуцирующих пероксид водорода, выживаемость клеток относительно выше, чем при достаточном их количестве. Выживаемость ВПЧ-инфицированных клеток в значительной степени зависит от недостатка выработки пероксида водорода лактобациллами.

Таким образом, в двух группах исследования (здоровые и ВПЧ-инфицированные клетки) в той или иной степени прослеживалась тенденция к снижению метаболической активности с увеличением числа лактобацилл.

Результаты указывают на то, что способность лактобацилл продуцировать пероксид водорода играет важную роль в поддержании устойчивости клеток к окислительному стрессу, а также их метаболической активности. Дефицит пероксида водорода усугубляет негативные эффекты от повышения количества лактобацилл, снижая выживаемость и дегидрогеназную активность.

В присутствии *G.vaginalis* картина меняется. В ВПЧ-инфицированных клетках увеличение количества гарднерелл повышает метаболическую активность и выживаемость клеток эпителия в условиях окислительного стресса. Основным механизмом гибели ВПЧ-инфицированных клеток остается апоптоз, как и у здоровых клеток. Увеличение количества лактобацилл значимо не влияет на соотношение апоптоза и некроза.

Во время ВПЧ-инфекции АФК могут вырабатываться активированными нейтрофилами и макрофагами, связанными с локальным иммунитетом. Изменения в метаболизме и неэффективный хронический воспалительный ответ могут способствовать трансформации клеток. НР-ВПЧ способен модулировать несколько механизмов антиоксидантной защиты, противодействуя влиянию повышенного уровня АФК на жизнеспособность инфицированных клеток, что позволяет им размножаться даже при наличии повреждения ДНК [34].

Полученные данные демонстрируют, что поддержание колонизационной резистентности вагинальной среды зависит не только от количества лактобацилл, но и от их функционального статуса, в частности способности продуцировать пероксид водорода. Пероксидпродуцирующие штаммы защищают эпителиоциты от окислительного стресса, снижая их метаболическую активность и снижая некротическую гибель, тогда как доминирование пероксиднепродуцирующих лактобацилл усугубляет окислительное повреждение. При этом *G. vaginalis* оказывает противоположное влияние на здоровые и ВПЧ-инфицированные клетки: в последних она повышает выживаемость и метаболическую активность, потенциально способствуя персистенции вируса. Эти результаты подчеркивают

ключевую роль «качества» вагинальной микробиоты в предотвращении персистенции ВПЧ, где необходимо не только присутствие лактобацилл, но и их способность продуцировать пероксид водорода.

Публикации: Мячина Ю.Л., Сгибнев А.В. Влияние численности лактобацилл и их способности продуцировать пероксид водорода на метаболизм вагинальных эпителиоцитов // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. – 2026. – № 1. – 9 с.

ГЛАВА 4. Влияние метаболитов вагинальных микроорганизмов на метаболизм и функциональную активность нейтрофилов периферической крови

Колонизационная резистентность слизистых оболочек, являясь ключевым элементом защиты организма от патогенных микроорганизмов, представляет собой сложную динамическую систему взаимодействия между микробиотой и клеточными элементами хозяина [7, 101]. Колонизационная резистентность вагинального биотопа напрямую зависит от количественного и качественного состава микробиоты [96]. Дисбаланс микробиоценоза, наблюдаемый, в частности, при бактериальном вагинозе, сопровождается не только трансформацией микробного пейзажа, но и коррелирует с широким спектром клинически значимых нарушений. В их число входят повышенная восприимчивость к инфекциям урогенитального тракта, акушерские осложнения и патология органов малого таза воспалительного генеза [45, 87].

В системе локальной иммунной защиты вагинального биотопа центральное место занимают нейтрофилы, они наиболее многочисленная популяция гранулоцитов, которые обладают широким спектром эффекторных функций [32]. Мигрируя на слизистую оболочку влагалища нейтрофилы подвергаются целому комплексу разнообразных микробных метаболитов, что может модулировать их функциональную активность [9, 22].

При физиологическом состоянии вагинального биотопа, который характеризуется доминированием лактобацилл (*Lactobacillus spp.*) создаются особые физико-химические условия микросреды с выраженной кислотностью (pH 3,5-4,2), что обуславливается в основном продукцией молочной кислоты [89]. Помимо этого, лактобациллы продуцируют широкий спектр биологически активных соединений, включая пероксид водорода, бактериоцины и поверхностно-активные вещества, которые в совокупности формируют антимикробный барьер [31, 116].

В условиях бактериального вагиноза наблюдается принципиально иная ситуация. Снижение численности лактобацилл сопровождается увеличением доли анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, таких как *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella spp.* и других представителей БВ-ассоциированных микроорганизмов [58]. Это приводит к значительным изменениям метаболического профиля вагинальной среды: повышению pH (выше 4,5), накоплению летучих аминов (путресцин, кадаверин и др.), короткоцепочечных жирных кислот (пропионовая, масляная) [113]. Из литературы известно, что подобные изменения создают благоприятные условия для персистенции условно-патогенных микроорганизмов, повышая восприимчивость к инфекциям, передаваемым половым путем [39].

Несмотря на достаточно большое количество исследований, посвященных изучению влияния вагинальной микробиоты на эпителиальные клетки [3, 10, 25], данные о воздействии микробных метаболитов на функциональное состояние нейтрофилов остаются крайне ограниченными и фрагментарными. Особый научный интерес представляет изучение влияния среднепопуляционных концентраций микробных метаболитов на ключевые аспекты нейтрофильной активности, такие как метаболическая активность, митохондриальная функция и способность к выполнению эффекторных функций.

В последние годы в научной литературе все больше внимания уделяется управлению метаболической активностью иммунных клеток как важного механизма регуляции их функциональной активности [91]. Так, показано, что переход нейтрофилов на различные метаболические пути (гликолиз, окислительное фосфорилирование) может сильно влиять на их способность к фагоцитозу, формированию нейтрофильных внеклеточных ловушек (NETs) и продукции активных форм кислорода [103]. Однако вопрос о том, как различные метаболиты вагинальной микробиоты могут модулировать эти процессы остается практически неизученным. Также важно провести сравнительную оценку эффектов, которые могут оказывать микробные метаболиты, продуцируемые как

представителями нормобиоты, так и БВ-ассоциированными микроорганизмами, на метаболическую и функциональную активность нейтрофилов.

Эти данные могут лечь в основу объяснения механизмов, лежащих в основе нарушений локального иммунитета при вагинальных дисбиозах.

Таким образом целью настоящего этапа исследования стало изучение влияния метаболитов лактобацилл и БВ-ассоциированных микроорганизмов в концентрациях, обнаруживаемых в вагинальной среде, на метаболизм и активность митохондрий и киллинговую активность нейтрофилов.

4.1 Оценка влияния микробных метаболитов на метаболическую активности нейтрофилов периферической крови

Для изучения влияния метаболитов лактобацилл на функциональную активность нейтрофилов были использованы 14 штаммов *Lactobacillus spp.*, выделенных из женского репродуктивного тракта у женщин с условным нормоценозом, соответствующих критериям включения, которые культивировали в среде MRS при 37 °C в анаэробных условиях в течение 24 ч с последующим получением бесклеточного супернатанта путем центрифугирования и фильтрации. Параллельно были использованы индивидуальные метаболиты – пероксид водорода и молочная кислота в физиологических для вагинального биотопа концентрациях. В качестве представителя биогенных аминов БВ-ассоциированных микроорганизмов использовался 1,4-диаминобутан (путресцин, Sigma-Aldrich). Нейтрофилы были выделены из периферической крови 5 добровольцев доноров, соответствующих критериям включения, с последующим выделением методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла.

4.1.1 Влияние пероксида водорода на метаболическую активность нейтрофилов периферической крови

Было изучено, как перекись водорода в концентрациях, типичных для двух состояний вагинальной среды – нормоценоза (где количество лактобацилл

находится в физиологических пределах) и бактериального вагиноза (где их число снижено) – влияет на метаболизм нейтрофилов. Установлено, что эти концентрации воздействуют на клетки по-разному. Так, дегидрогеназная активность нейтрофилов при обработке пероксидом водорода в концентрации 0,59 мМ и 2,36 мМ увеличивалась на 4,5 и 2,5 %, соответственно (Рис.4.1а).

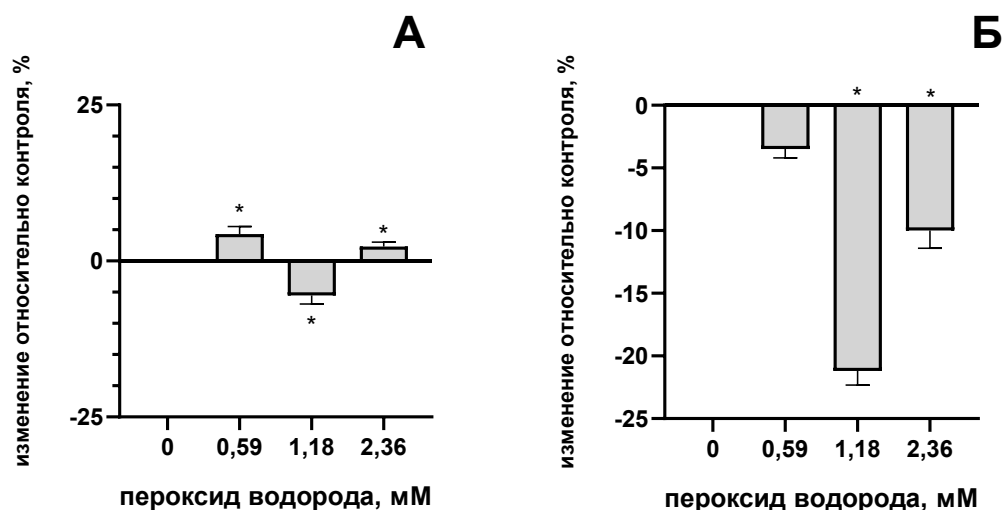


Рисунок 4.1 –Влияние пероксида водорода на: А – дегидрогеназную активность, Б – митохондриальный потенциал нейтрофилов; * - $p \leq 0.05$. В графике указаны средние значения и стандартные отклонения, для оценки достоверности различий использовался критерий Манна-Уитни

Одновременно с этим наблюдали незначительное уменьшение доли клеток с высоким митохондриальным потенциалом среди нейтрофилов, обработанных такими же концентрациями пероксида водорода (Рис. 4.1б). Напротив, обработка нейтрофилов пероксидом водорода в концентрации 1,17 мМ приводила к снижению и дегидрогеназной активности и к статистически значимому снижению доли клеток с высоким митохондриальным потенциалом (Рис.4.1а и Рис. 4.1б, соответственно).

4.1.2 Влияние молочной кислоты на метаболическую активности нейтрофилов периферической крови

Оценивали влияние молочной кислоты, продуцируемой лактобациллами при нормоценозе и БВ, на метаболическую активность нейтрофилов. Так, дегидрогеназная активность нейтрофилов при обработке молочной кислотой в физиологических концентрациях, характерных для нормоценоза (11,1 и 22,2 мМ) [22, 71], снижалась на 6 и 25 %, соответственно (Рис.4.2а).

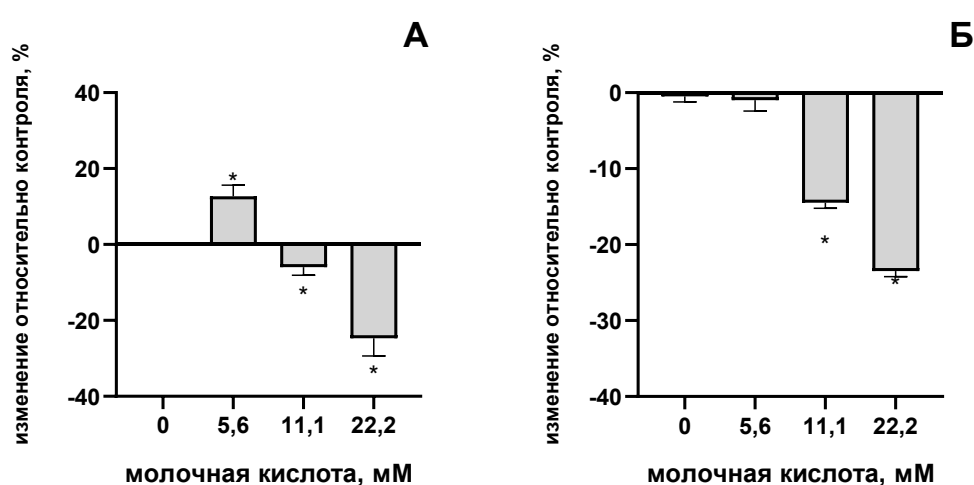


Рисунок 4.2 – Влияние молочной кислоты на: А – дегидрогеназную активность, Б – митохондриальный потенциал нейтрофилов. *- $p \leq 0.05$. В графике указаны средние значения и стандартные отклонения, для оценки достоверности различий использовался критерий Манна-Уитни

Одновременно с этим наблюдалось значительное уменьшение доли клеток с высоким митохондриальным потенциалом среди нейтрофилов, обработанных такими же концентрациями молочной кислоты (Рис.4.1б). Напротив, обработка нейтрофилов молочной кислотой в концентрации характерной для бактериального вагиноза (БВ), при сниженном или полном отсутствии лактобацилл (5,6 мМ) [91], приводила к увеличению дегидрогеназной активности (Рис.4.2а), при этом

количество клеток с высоким митохондриальным потенциалом практически не изменялось (Рис. 4.2б).

4.1.3 Влияние нативных бесклеточных метаболитов лактобацилл, стандартизованных по молочной кислоте, на метаболическую активность нейтрофилов периферической крови

На следующем этапе оценивали возможность влияния нативных бесклеточных метаболитов лактобацилл, стандартизированных по молочной кислоте. Были смоделированы состояния нормоценоза (достаточное количество лактобацилл) и БВ (сниженное количество лактобацилл и молочной кислоты). Наблюдались похожие закономерности и в экспериментах с внеклеточными метаболитами лактобацилл, стандартизированными по молочной кислоте, тем не менее, следует отметить, что несмотря на стандартизацию по молочной кислоте, разные штаммы лактобацилл с разной интенсивностью влияли на активность нейтрофилов (Рис.4.3).

Дегидрогеназная активность при обработке метаболитами, стандартизированными по молочной кислоте до концентрации 11,1 мМ, так же, как и в случае использования чистой молочной кислоты в той же концентрации, снижалась (Рис.4.3а). Также, как и в случаях экспериментов с молочной кислотой, обработка нейтрофилов внеклеточными метаболитами, стандартизированными по молочной кислоте до концентрации 5,6 мМ, приводила к увеличению и дегидрогеназной активности нейтрофилов.

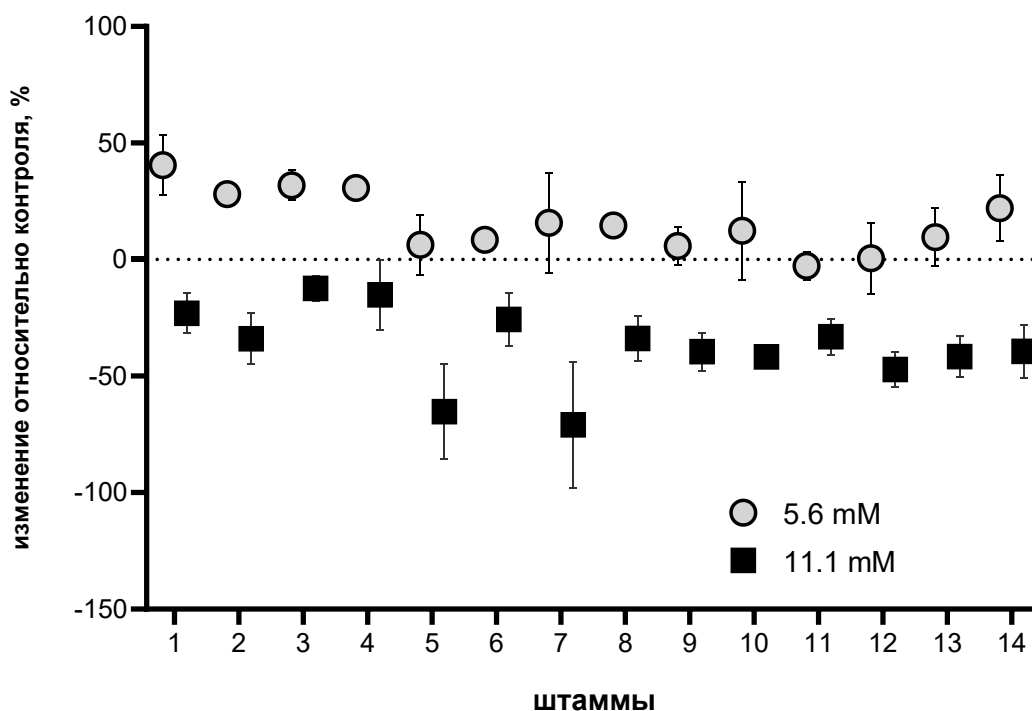


Рисунок 4.3 – Влияние внеклеточных метаболитов лактобацилл, стандартизированных по молочной кислоте, на дегидрогеназную активность; *Различия между эффектами внеклеточных метаболитов с разной концентрацией молочной кислоты достоверны, для оценки достоверности различий использовался критерий Манна-Уитни. В графике указаны средние значения и стандартные отклонения.

Следует отметить широкую амплитуду изменения и дегидрогеназной активности при обработке внеклеточными метаболитами лактобацилл несмотря на стандартизацию супернатантов по содержанию в них молочной кислоты, что может косвенно свидетельствовать о том, что в изменения функциональной активности нейтрофилов кроме лактата могут вносить вклад другие вещества, которые могут продуцировать лактобациллы.

4.1.4 Влияние биогенных аминов на метаболическую активность нейтрофилов периферической крови

Была проведена оценка влияния биогенных аминов, продуцируемых БВ-ассоциированными микроорганизмами на метаболическую активность

нейтрофилов. Контролем считали значения дегидрогеназной активности необработанных нейтрофилов.

Установлено, что путресцин увеличивает метаболическую активность нейтрофилов. При добавлении путресцина в концентрациях 0,15 мМ и 0,45 мМ метаболическая активность повышалась на 18 % и 15 %, соответственно, по сравнению с контролем, что свидетельствует об активации клеточного метаболизма. Однако, несмотря на повышение метаболической активности, доля клеток с высоким митохондриальным потенциалом незначительно снижалась на 2,5 и 3,5 % при использовании концентраций 0,15 и 0,45 мМ, соответственно (Рис.4.4).

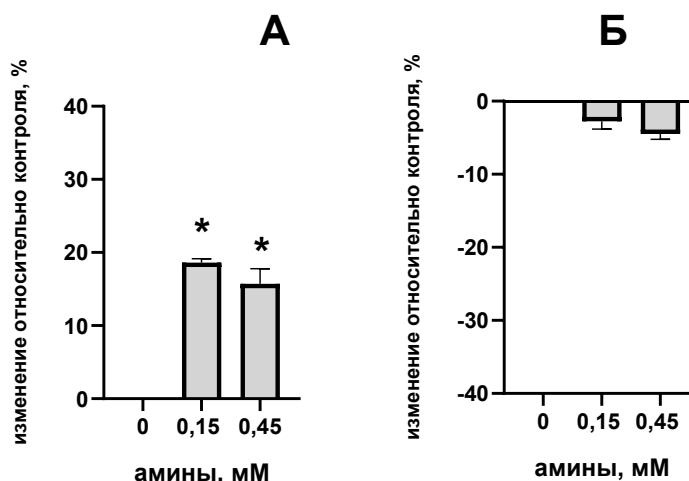


Рисунок 4.4 – Влияние биогенных аминов (путресцина) на: А – дегидрогеназную активность, Б – митохондриальный потенциал нейтрофилов. * - $p \leq 0.05$. В графике указаны средние значения и стандартные отклонения, для оценки достоверности различий использовался критерий Манна-Уитни

4.2 Оценка влияния микробных метаболитов на способность нейтрофилов к киллингу

4.2.1 Оценка влияния пероксида водорода на способность нейтрофилов к киллингу

На предыдущем этапе была оценена возможность влияния пероксида водорода на метаболическую активность нейтрофилов, а также на их митохондриальный потенциал. Полученные данные натолкнули на мысль, что влияние на метаболическую активность связано и с функциональным статусом клеток. Для того, чтобы проверить как пероксид водорода способен влиять на киллинговую активность нейтрофилов к предварительно обработанным пероксидом водорода нейтрофилам добавили опсонизированную кишечную палочку, после инкубации провели высев и оценили количество колониеобразующих единиц.

Изменения в метаболической активности нейтрофилов под влиянием пероксида водорода сопровождались похожими изменениями в их киллинговой активности. Так, киллинговая активность нейтрофилов снижалась на 5,5 % под влиянием пероксида водорода в концентрации 1,18 мМ, то есть той концентрации, что приводила к снижению дегидрогеназной активности и уменьшению доли клеток с высоким митохондриальным потенциалом. И наоборот киллинговая активность нейтрофилов увеличивалась на 20 и 11 % под влиянием пероксида водорода в концентрациях 0,59 и 2,36 мМ (рис.4.5), которые также увеличивали и дегидрогеназную активность.

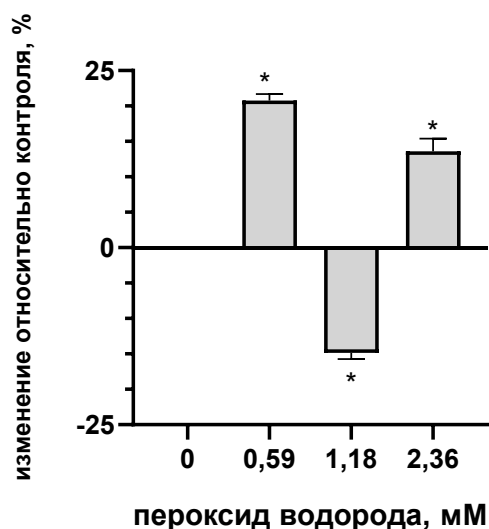


Рисунок 4.5 – Влияние пероксида водорода на киллинговую активность нейтрофилов. *- $p \leq 0.05$. В графике указаны средние значения и стандартные отклонения, для оценки достоверности различий использовался критерий Манна-Уитни

4.2.2 Оценка влияния молочной кислоты на способность нейтрофилов к киллингу

Для того, чтобы проверить как молочная кислота способна влиять на киллинговую активность нейтрофилов к предварительно обработанным молочной кислотой нейтрофилам добавили опсонизированную кишечную палочку, после инкубации провели высев и оценили количество колониеобразующих единиц.

Было установлено, что молочная кислота в зависимости от ее концентрации в растворе разнонаправленно влияла на метаболическую активность клеток.

Изменения в метаболической активности нейтрофилов под влиянием молочной кислоты сопровождались похожими изменениями в их киллинговой активности. Так, киллинговая активность нейтрофилов снижалась на 20 % под влиянием молочной кислоты в концентрации 11,1 mM (Рис.4.6), то есть той концентрации, что приводила к снижению дегидрогеназной активности и уменьшению доли клеток с высоким митохондриальным потенциалом. И наоборот киллинговая активность нейтрофилов увеличивалась на 17,5 % под

влиянием молочной кислоты в концентрациях 5,6 мМ соответственно (рис.4.6), что приводило к увеличению дегидрогеназной активности. Исследование киллинговой активности нейтрофилов при обработке молочной кислотой в концентрации 22,2 мМ не проводилось, так как эта концентрация являлась бактерицидной для *E.coli*.

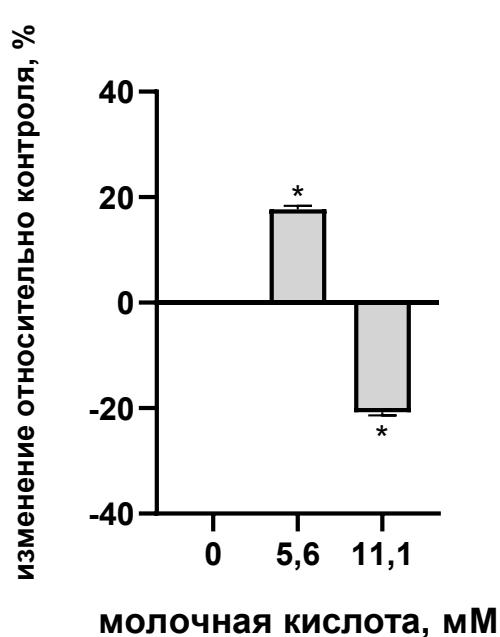


Рисунок 4.6 – Влияние молочной кислоты на киллинговую активность нейтрофилов. *- $p \leq 0.05$. В графике указаны средние значения и стандартные отклонения, для оценки достоверности различий использовался критерий Манна-Уитни

4.2.3 Оценка влияния нативных бесклеточных метаболитов лактобацилл, стандартизованных по молочной кислоте на способность нейтрофилов к киллингу

На следующем этапе оценивали влияние комплекса внеклеточных метаболитов лактобацилл, стандартизированных по лактату на функциональный статус нейтрофилов. Для этого к предварительно обработанным метаболитами нейтрофилам добавили опсонизированную кишечную палочку, после инкубации провели высев и оценили количество колониеобразующих единиц.

Обнаружены похожие закономерности и в экспериментах с внеклеточными метаболитами лактобацилл, стандартизированными по молочной кислоте, тем не менее, следует отметить, что несмотря на стандартизацию по молочной кислоте, разные штаммы лактобацилл с разной интенсивностью влияли на киллинговую активность нейтрофилов (Рис.4.7).

Дегидрогеназная активность при обработке метаболитами, стандартизированными по молочной кислоте до концентрации 11,1 мМ, так же, как и в случае использования чистой молочной кислоты в той же концентрации, снижалась, это сопровождалось и снижением киллинговой активности практически во всех случаях (Рис.4.7). Также, как и в случаях экспериментов с молочной кислотой, обработка нейтрофилов внеклеточными метаболитами, стандартизированными по молочной кислоте до концентрации 5,6 мМ, приводила к увеличению и дегидрогеназной и киллинговой активности нейтрофилов. Следует отметить широкую амплитуду изменения и дегидрогеназной и киллинговой активности при обработке внеклеточными метаболитами лактобацилл, что может косвенно свидетельствовать о том, что в изменения функциональной активности нейтрофилов могут вносить вклад другие вещества, которые могут продуцировать лактобациллы. Исследование киллинговой активности нейтрофилов при обработке метаболитами, стандартизированными по молочной кислоте в концентрации 22,2 мМ не проводилось, так как эта концентрация являлась бактерицидной для *E.coli*.

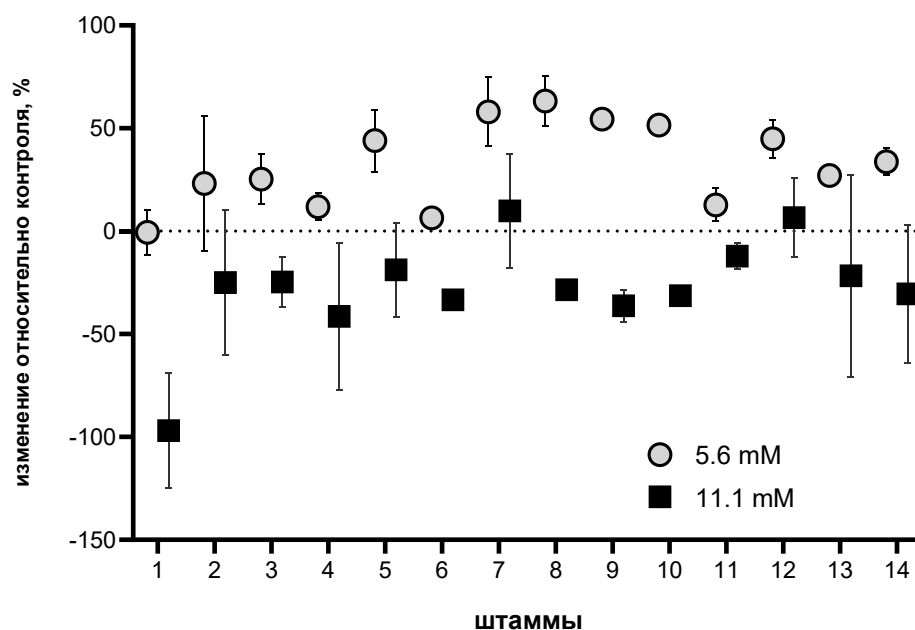


Рисунок 4.7 – Влияние внеклеточных метаболитов лактобацилл, стандартизированных по молочной кислоте на киллинговую активность нейтрофилов. Влияние молочной кислоты на киллинговую активность нейтрофилов. В графике указаны средние значения и стандартные отклонения, для оценки достоверности различий использовался критерий Манна-Уитни. *Различия между эффектами внеклеточных метаболитов с разной концентрацией молочной кислоты достоверны.

4.2.4 Оценка влияния биогенных аминов на способность нейтрофилов к киллингу

Для оценки возможности биогенных амины, продуцируемых БВ-ассоциированными микроорганизмами, влиять на киллинговую активность нейтрофилов к предварительно обработанным путресцином нейтрофилам добавили опсонизированную кишечную палочку, после инкубации провели высев и оценили количество колониеобразующих единиц.

Было установлено, что путресцин в зависимости от ее концентрации в растворе разнонаправленно влияла на метаболическую активность клеток.

Изменения в метаболической активности нейтрофилов под влиянием путресцина сопровождались похожими изменениями в их киллинговой активности. Так, киллинговая активность нейтрофилов увеличивалась на 33 % под влиянием путресцина в концентрации 0,15 мМ, то есть той концентрации, что приводила к повышению дегидрогеназной активности и повышению доли клеток с высоким митохондриальным потенциалом. Аналогично, киллинговая активность нейтрофилов увеличивалась на 10 % под влиянием путресцина в концентрациях 0,45 мМ соответственно, что приводило к увеличению дегидрогеназной активности (Рис. 4.8).

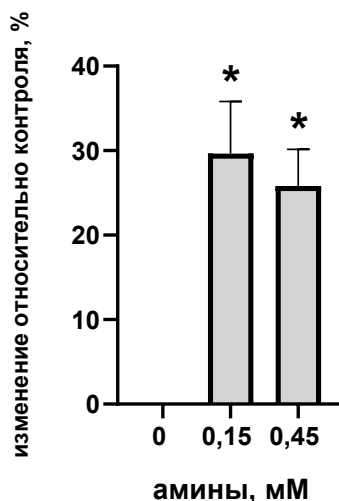


Рисунок 4.8 – Влияние биогенных аминов (путресцина) на киллинговую активность. *- $p \leq 0.05$;

4.3 Обсуждение полученных результатов

В нашем исследовании показано, что метаболиты вагинальной микробиоты способны модулировать функциональное состояние нейтрофилов. Из литературы известно, что бактериальные метаболиты могут регулировать функциональное состояние клеток хозяина, так, например, производные индола и фенола бактериального происхождения могут ингибировать митохондриальные дегидрогеназы, регулировать продукцию активных форм кислорода (пероксида

водорода), изменять проницаемость клеточных и митохондриальных мембран, а также могут подавлять фагоцитарную активность нейтрофилов [52, 117, 135].

Наши исследования выявили сложные взаимоотношения между микробными метаболитами и клеточным метаболизмом нейтрофилов, которые могут иметь важное значение для поддержания колонизационной резистентности влагалища.

Пероксид водорода, продуцируемый вагинальными лактобациллами, оказывает дозозависимое влияние на нейтрофилы. Концентрации 0,59 и 2,36 мМ вызывали увеличение дегидрогеназной и киллинговой активности, что говорит об активации метаболических путей. Однако, при этом наблюдалось снижение митохондриального потенциала, которое указывает на вероятное переключение энергетического метаболизма. Интересно, что промежуточная концентрация 1,18 мМ приводила к снижению как дегидрогеназной активности и митохондриального потенциала, так и киллинговой активности, что может быть связано с развитием окислительного стресса и повреждением клеточных структур.

Снижение митохондриального потенциала может свидетельствовать о гипоэнергетическом состоянии нейтрофилов, вызванное предположительно способностью биогенных аминов быть разобщителями окислительного фосфорилирования [21]. Это может приводить к прекращению окисления пирувата в митохондриях, накоплению и восстановлению его в цитоплазме до лактата. Усиление же дегидрогеназной активности может быть компенсаторной реакцией нейтрофилов на гипоэнергетическое состояние, направленной на получение энергии с помощью анаэробного гликолиза, что сопровождается повышенным потреблением глюкозы. Это, в свою очередь, может уменьшать количество глюкозы, окисляемое в пентозофосфатном пути и, соответственно, уменьшать количество образующегося НАДФН, необходимого для генерации активных форм кислорода, с помощью которых нейтрофилы могут реализовывать киллинговый потенциал.

Особый интерес представляют результаты полученные в ходе изучения влияния нативных внеклеточных метаболитов лактобацилл. Обнаружено, что разные штаммы вызывают неодинаковые эффекты у нейтрофилов, что указывает на наличие дополнительных, пока не идентифицированных факторов в составе метаболитов.

Установлено, что бесклеточные метаболиты лактобацилл, содержащие лактат в концентрации $\sim 5,6$ мМ, что наблюдается при дефиците лактобацилл во влагалище фертильных женщин, вызывали увеличение дегидрогеназной и киллинговой активностей нейтрофилов. Напротив, дегидрогеназная и киллинговая активности нейтрофилов снижались после обработки метаболитами лактобацилл с содержанием лактата в диапазоне концентраций от 11,1 мМ и более, то есть в концентрациях, которые обнаруживаются при нормальном или повышенном содержании лактобацилл во влагалище. Во всех случаях обработка нейтрофилов метаболитами лактобацилл вызывала дозозависимое уменьшение трансмембранного потенциала митохондрий нейтрофилов. Предположительно, этот эффект может объяснить выживание лактобацилл в нейтрофильном марше смерти [44], а также имеет важное значение для поддержания гомеостаза вагинальной среды.

Предполагается, что обнаруженная способность вагинальных лактобацилл разнонаправленно изменять активность нейтрофилов имеет важное значение для реализации механизмов колонизационной резистентности влагалища и может препятствовать интродукции во влагалище патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Биогенные амины, характерные для БВ, продемонстрировали способность повышать метаболическую активность нейтрофилов при одновременном снижении митохондриального потенциала. Это может быть связано с быстрым клеточным ответом на кратковременную экспозицию (1 час), либо с прямым воздействием на электрон-транспортную цепь митохондрий нейтрофилов. При концентрации 0,15 мМ, вызывавшей увеличение дегидрогеназной активности,

увеличивалась и киллинговая активность нейтрофилов примерно на 33 %. Аналогично, при 0,45 мМ путресцина, когда наблюдалось повышение метаболической активности, киллинговая активность возрастала на 10 %. Это позволяет предположить, что биогенные амины, характерные для БВ, могут модулировать как энергетический метаболизм, так и эффекторные функции нейтрофилов.

Выявлена способность вагинальных лактобацилл модулировать не только метаболическую, но и киллинговую активность нейтрофилов. Установлено, что метаболиты с содержанием лактата 5,6 мМ (характерные для дефицита лактобацилл) увеличивали как дегидрогеназную, так и киллинговую активность нейтрофилов. Напротив, высокие концентрации лактата (11,1 мМ и выше) приводили к снижению этих показателей.

Таким образом, обнаруженная способность вагинальных лактобацилл разнонаправленно регулировать активность нейтрофилов может играть ключевую роль в поддержании колонизационной резистентности влагалища и предотвращении инвазии патогенов.

Полученные данные демонстрируют четкую связь между изменением метаболических функций, митохондриального потенциала и антимикробной функцией нейтрофилов, под действием внеклеточных метаболитов лактобацилл и их компонентов (молочной кислоты и пероксида водорода), а также биогенных аминов, продуцируемых БВ-ассоциированными микроорганизмами. Все это подчеркивает роль микробных метаболитов в модуляции части иммунного ответа и поддержании колонизационной резистентности влагалища.

Публикации: Мячина Ю.Л., Сгибнев А.В., Черкасова Ю.И. Влияние метаболитов вагинальных лактобацилл на функционирование нейтрофилов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2024. – Т. 178. – № 12. – 730-735с.

ГЛАВА 5. Влияние метаболитов вагинальных микроорганизмов на метаболизм и устойчивость к окислительному стрессу клеток карциномы шейки матки

Микробное окружение цервиковагинального биотопа участвует в реализации колонизационной резистентности, в частности, вагинальные лактобациллы, продуцируя молочную кислоту и пероксид водорода, способны существенно изменять показатели окружающей среды и активность эпителиоцитов [15,71].

Например, из литературных данных известно, что вагинальные лактобациллы могут повышать выживаемость клеток вагинального эпителия в условиях окислительного стресса [11]. Лактобациллы цервиковагинального биотопа могут оказывать влияние и на морфологические особенности клеток хозяина, например, в присутствии лактобацилл у здоровых женщин в мазках обнаруживаются в основном зрелые формы эпителиоцитов. Это связано с тем, что лактобациллы поддерживают кислую среду в вагинальной среде, способствующую созреванию эпителиальных клеток, которое, в свою очередь, контролируется эстрогенами. Эстрогены стимулируют накопление эпителиоцитами гликогена, который используется лактобациллами как источник питания [17,80].

В норме доминирование лактобацилл обеспечивает поддержание кислой среды (рН 3,8–4,2) за счет расщепления гликогена, накопленного зрелыми эпителиоцитами, до молочной кислоты [71,89].

Пероксид водорода, продуцируемый лактобациллами, помимо антимикробной активности, может оказывать разнонаправленное влияние на эукариотические клетки (клетки хозяина) в зависимости от концентрации. В частности, низкие концентрации перекиси могут оказывать стимулирующее влияние на здоровые клетки эпителиоцитов, например, активировать антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутазу и каталазу), которые защищают клетки от окислительного стресса [47]. Более высокие концентрации

могут вызвать окислительный стресс у эпителиоцитов, это сопровождается повреждением клеточных структур (ДНК, белки и липиды), что, в итоге, может привести к гибели клеток в результате апоптоза или некроза и развитию воспалительных процессов [34].

Высокие концентрации пероксида водорода способны приводить к гибели трансформированных раковых клеток через индукцию апоптоза. Однако, недавно было сообщено, что окислительный стресс, является фактором, способствующим развитию некоторых видов рака, и может быть связан с устойчивостью к химиотерапии и лучевой терапии [64, 72].

Таким образом, влияние пероксида водорода на раковые клетки может быть двусторонним в зависимости от концентраций и продолжительности воздействия.

Кроме того, в вагинальном биотопе кроме пероксидпродуцирующих лактобацилл, еще одним источником пероксида водорода могут являться нейтрофилы, численность которых периодически резко возрастает. В нормальных условиях активация нейтрофилов и продукция ими большого количества активных форм кислорода способствует уничтожению патогенов [137]. Однако, если активация нейтрофилов становится чрезмерной и/или длительной, это приводит к повреждению здоровых клеток и тканей, способствуя развитию хронического воспаления и даже предраковых состояний. Нейтрофилы оказывают двойственное влияние на трансформированные раковые клетки. С одной стороны, они могут атаковать и уничтожать раковые клетки, выделяя свободные радикалы и провоспалительные цитокины. С другой стороны, нейтрофилы могут стимулировать пролиферацию раковых клеток через выделение факторов роста и ангиогенных молекул, которые способствуют росту опухоли [53,110].

Напротив, при бактериальном вагинозе можно наблюдать значительное количество слущенных, незрелых, с низким содержанием гликогена клеток эпителия (Е. Ф. Кира, 2012). Снижение уровня эстрогенов также приводит к уменьшению зрелости эпителия влагалища и снижению содержания в них гликогена, что влечет за собой изменение видового состава вагинальной

микробиоты. В случае развития бактериального вагиноза физико-химические свойства цервикагинальной среды значительно меняются и характеризуются смещением рН в щелочную сторону в основном за счет накопления аминов, что сопровождается снижением колонизационной резистентности биотопа. Несмотря на существующие данные о влиянии метаболитов представителей цервикагинального биотопа на функциональное состояние здоровых эпителиоцитов, невозможно прогнозировать эффекты, реализующиеся в раковых клетках, метаболизм которых отличен от нормальных клеток [55]. Мы полагаем, что метаболиты лактобацилл и БВ-ассоциированных микроорганизмов могут приводить к функциональным изменениям клеток карциномы шейки матки (HeLa).

Таким образом, целью данного этапа исследования стало изучение влияния метаболитов, продуцируемых лактобациллами (молочная кислота, пероксид водорода и комплекс внеклеточных метаболитов) и БВ-ассоциированными микроорганизмами (биогенные амины), на метаболическую активность, митохондриальный потенциал и функциональную активность (ответ клетки на окислительный стресс) клеток карциномы шейки матки.

5.1 Оценка влияния микробных метаболитов на метаболическую активность клеток HeLa

Для изучения влияния метаболитов лактобацилл на функциональную активность клеток HeLa были использованы метаболиты 10 штаммов *Lactobacillus spp.*, выделенных из женского репродуктивного тракта у женщин с условным нормоценозом. Параллельно были использованы индивидуальные метаболиты – пероксид водорода и молочная кислота, в физиологических для вагинального биотопа концентрациях. В качестве представителя биогенных аминов БВ-ассоциированных микроорганизмов использовался 1,4-диаминобутан (путресцин, Sigma-Aldrich).

5.1.1 Влияние пероксида водорода на метаболическую активность клеток HeLa

После обработки пероксидом водорода в концентрациях 0,59 мМ, 1,18 мМ, 2,36мМ через 1 час инкубации дегидрогеназная активность клеток HeLa уменьшалась на 16, 45 и 43 %, соответственно (Рис.5.1а). Одновременно с этим наблюдали значительное уменьшение доли клеток с высоким митохондриальным потенциалом среди клеток HeLa, обработанных такими же концентрациями пероксида водорода (Рис.5.1б).

После обработки пероксидом водорода в концентрациях 0,59 мМ, 1,18 мМ, 2,36мМ через 24 часа инкубации дегидрогеназная активность клеток HeLa уменьшалась на 71, 79 и 73 %, соответственно (Рис.5.1а).

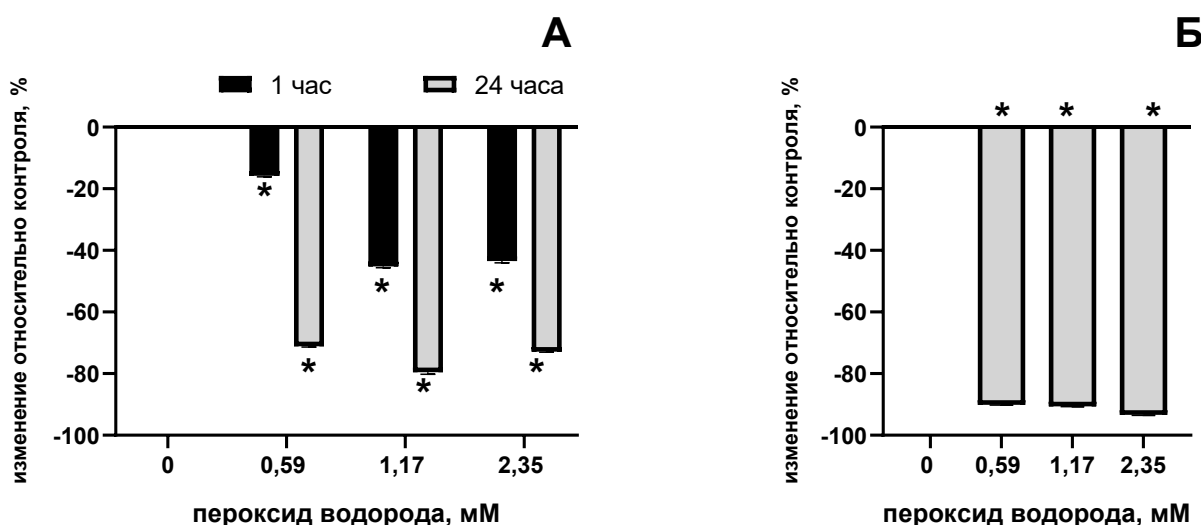


Рисунок 5.1 – Влияние пероксида водорода на: А – дегидрогеназную активность, Б – митохондриальный потенциал клеток HeLa. * $p \leq 0.05$. В графике указаны средние значения и стандартные отклонения, для оценки достоверности различий использовался критерий Манна-Уитни

Таким образом, основываясь на полученных результатах, можно предположить, что наличие достаточного количества пероксидпродуцирующих

лактобацилл может являться одним из факторов сдерживающим рост и пролиферацию карциномы шейки матки.

5.1.2 Влияние молочной кислоты на метаболическую активность клеток HeLa

После обработки молочной кислотой в физиологических концентрациях, характерных для нормоценоза (11,1 и 22,2 мМ), через 1 час инкубации дегидрогеназная активность клеток HeLa снижалась на 50 и 70 %, соответственно (Рис. 5.2а). Одновременно с этим наблюдали значительное уменьшение доли клеток с высоким митохондриальным потенциалом среди клеток HeLa, обработанных такими же концентрациями молочной кислоты (Рис. 5.2б).

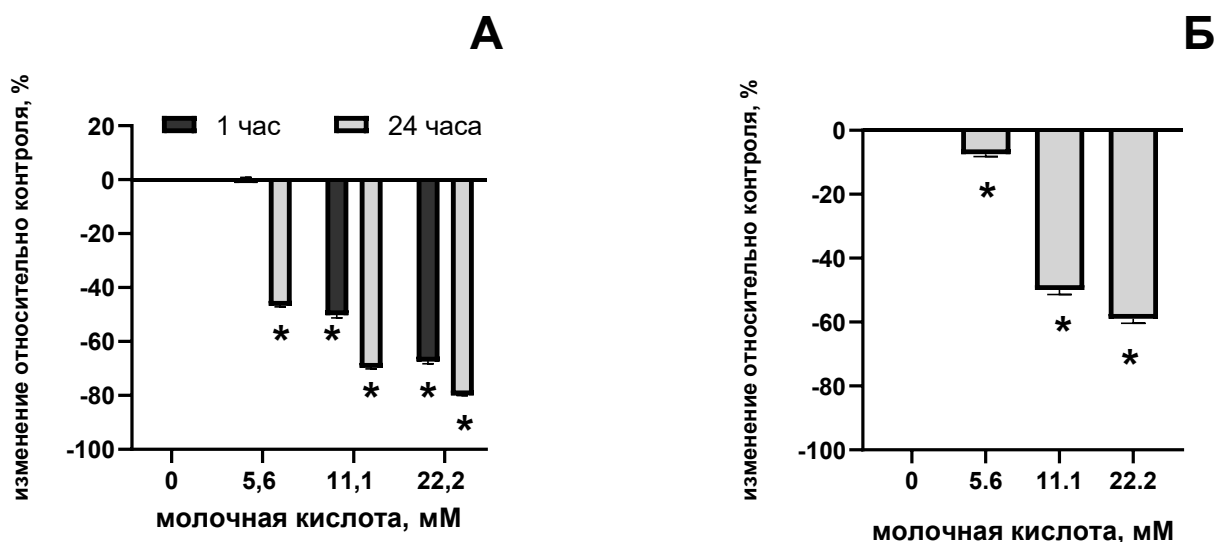


Рисунок 5.2 – Влияние молочной кислоты на: А – дегидрогеназную активность, Б – митохондриальный потенциал клеток HeLa. * $p \leq 0.05$. В графике указаны средние значения и стандартные отклонения, для оценки достоверности различий использовался критерий Манна-Уитни

После обработки молочной кислотой в концентрации, характерной для бактериального вагиноза (БВ), при сниженном или полном отсутствии лактобацилл (5,6 мМ) [13], через 1 час инкубации дегидрогеназная активность

клеток HeLa почти не изменялась и оставалась на уровне контроля (Рис. 5.2а), при этом количество клеток с высоким митохондриальным потенциалом снижалось незначительно (Рис. 5.2б).

Увеличение длительности культивирования клеток HeLa в условиях содержания молочной кислоты в используемых концентрациях, через 24 приводило к более выраженному снижению метаболической активности клеток, и составляло 47, 70 и 80 % при использовании 5,6, 11,1 и 22,2 мМ молочной кислоты, соответственно.

Можно предположить, что снижение численности лактобацилл, ведущее к снижению концентрации лактата в вагинальной среде, может быть причиной повышенного уровня метаболической активности клеток карциномы шейки матки, это в свою очередь объясняет высокие риски возникновения и прогрессирования карциномы.

5.1.3 Влияние нативных бесклеточных метаболитов лактобацилл, стандартизованных по молочной кислоте на метаболическую активность клеток HeLa

На следующем этапе оценивали влияние комплекса метаболитов, продуцируемых вагинальными лактобациллами на метаболическую активность клеток HeLa. Нативные бесклеточные метаболиты были стандартизованы по молочной кислоте (концентрация соответствовала примерным концентрациям, обнаруживаемым при БВ и нормоценозе).

Обработка клеток HeLa внеклеточными метаболитами, стандартизованными по молочной кислоте до концентрации 5,6 мМ, приводила к разнонаправленному ответу клеток HeLa. При кратковременном воздействии 5 штаммов значительно снижали метаболическую активность в диапазоне от 12 до 35 %, 3 штамма повышали в диапазоне от 3 до 22 % и 2 штамма почти не оказывали никакого эффекта (Рис. 5.3а). Доля клеток с высоким митохондриальным потенциалом при тех же условиях культивирования тоже

менялась. Так, 7 штаммов его снижали в диапазоне от 3 до 35 %, 2 штамма увеличивали в диапазон от 4 до 23 % и 1 штамм не оказывал никакого эффекта.

Дегидрогеназная активность при обработке метаболитами, стандартизированными по молочной кислоте до концентрации 11,1 мМ через 1 час инкубации, так же, как и в случае использования чистой молочной кислоты в той же концентрации, снижалась (Рис. 5.3а). Эффект варьируется в зависимости от штамма, 7 штаммов лактобацилл вызывают значительное снижение активности в диапазон от 3 до 52 %, 1 штамм – повышение на 17 %, и 1 штамм практически не оказывает никакого эффекта. Доля клеток с высоким митохондриальным потенциалом при тех же условиях культивирования тоже менялась. Так, 7 штаммов лактобацилл ее снижали в диапазоне от 11 до 52 %, 1 штамм на 17 % и 2 штамма не оказывала никакого эффекта.

Картина немного менялась при длительной инкубации, так практически все штаммы с различной интенсивностью либо снижали дегидрогеназную активность, либо не оказывали никакого эффекта, но были и исключения. Так, при обработке метаболитами, стандартизированными по молочной кислоте до концентрации 5,6 мМ штаммы № 5, 12 и 13, значительно повышали метаболическую активность на 15, 3 и 9 %, соответственно, что может быть связано с адаптацией клеток или наличием каких-то стимулирующих факторов в составе метаболитов, которые не были нами учтены.

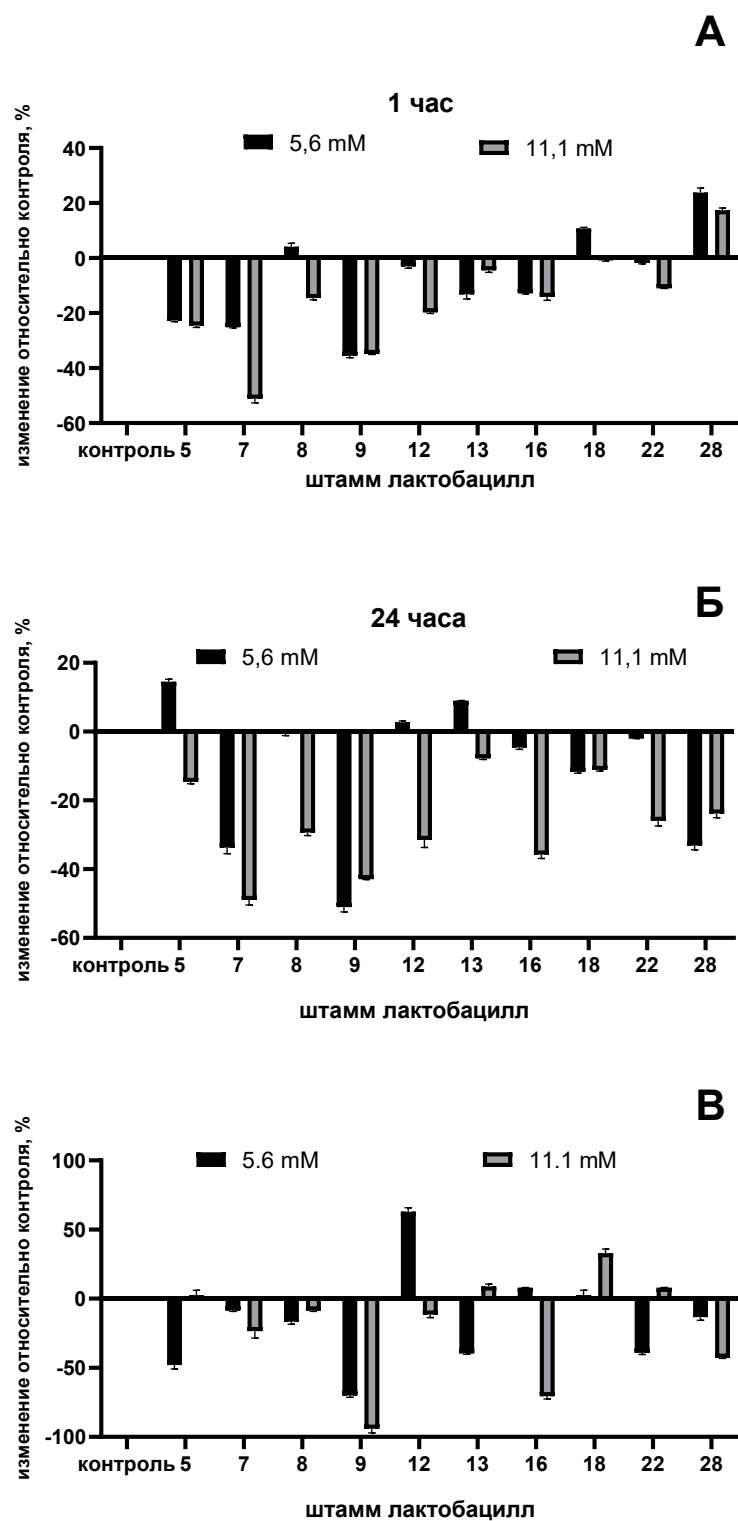


Рисунок 5.3 – Влияние внеклеточных метаболитов лактобацилл, стандартизированных по молочной кислоте на: А – дегидрогеназную активность через 1 час инкубации; Б – дегидрогеназная активность через 24 часа инкубации;

В – митохондриальный потенциал. *Различия между эффектами внеклеточных метаболитов с разной концентрацией молочной кислоты достоверны.

Следует отметить, что несмотря на стандартизацию по лактату, мы наблюдали широкую амплитуду изменения дегидрогеназной активности при обработке внеклеточными метаболитами лактобацилл. Это свидетельствует в пользу того, что описываемый нами эффект определяется не только наличием лактата и его концентрацией. Возможно такие колебания дегидрогеназной активности под влиянием внеклеточных метаболитов лактобацилл связаны с продукцией других веществ, неучтенных в этом исследовании.

5.1.4 Влияние биогенных аминов на метаболическую активность клеток HeLa

Была проведена оценка влияния биогенных аминов, продуцируемых БВ-ассоциированными микроорганизмами на метаболическую активность клеток карциномы шейки матки. Контролем считали значения дегидрогеназной активности необработанных клеток HeLa.

Установлено, что путресцин увеличивает метаболическую активность клеток HeLa. При кратковременной инкубации клеток с путресцином в концентрациях 0,15 мМ и 0,45 мМ метаболическая активность повышалась на 20 % и 25 %, соответственно, по сравнению с контролем (Рис. 5.4). Что свидетельствует об активации клеточного метаболизма. Через 24 часа активность снижается примерно на 5–10 % от контроля при тех же концентрациях.

Однако, несмотря на повышение метаболической активности, доля клеток с высоким митохондриальным потенциалом незначительно снижалась на 3,5 и 5,5 % при использовании концентраций 0,15 и 0,45 мМ, соответственно.

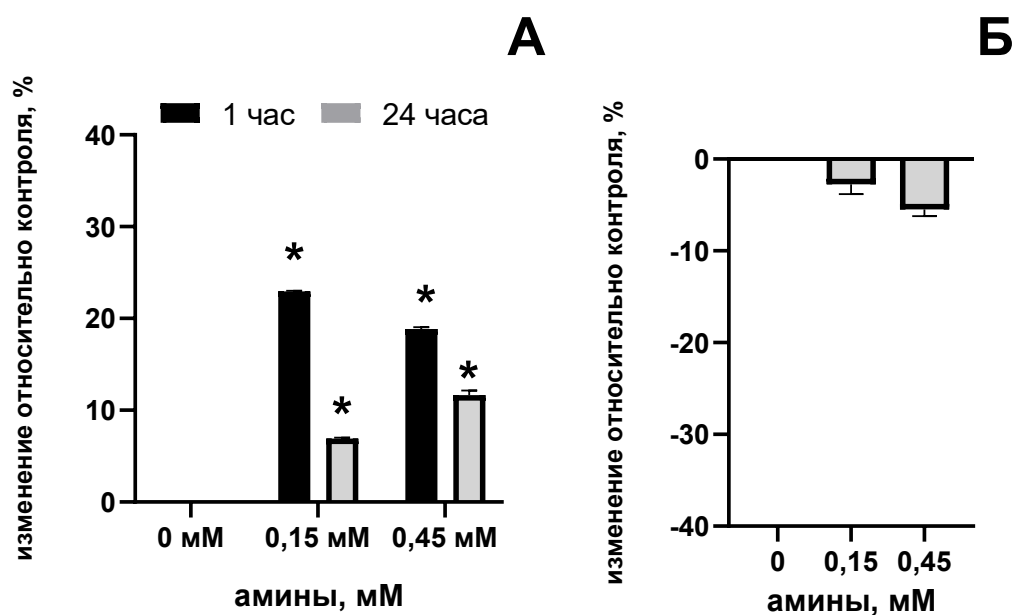


Рисунок 5.4 – Влияние биогенных аминов на: А – дегидрогеназную активность, Б – митохондриальный потенциал клеток HeLa. * - $p \leq 0.05$. В графике указаны средние значения и стандартные отклонения, для оценки достоверности различий использовался критерий Манна-Уитни

Увеличение метаболической активности и незначительное снижение доли клеток с высоким митохондриальным потенциалом в ответ на воздействие биогенных аминов, возможно, объясняет один из механизмов, лежащих в основе усиления пролиферации и роста опухолевых клеток при БВ в условиях *in vivo*.

5.2 Оценка влияния микробных метаболитов на устойчивость клеток HeLa к окислительному стрессу

Для оценки микробных метаболитов на выбор типа гибели клеток, клетки HeLa обрабатывали такими концентрациями микробных метаболитов, которые обнаруживаются при нормоценозе и БВ, а затем подвергали окислительному стрессу, который вызывает в клетках HeLa апоптоз.

5.2.1 Оценка влияния пероксида водорода на устойчивость клеток HeLa к действию окислительного стресса

Дегидрогеназная активность клеток HeLa значительно снижалась при обработке пероксидом водорода в концентрациях 0,59, 1,18 и 2,36 мМ. Одновременно с этим наблюдалось значительное снижение доли клеток с высоким митохондриальным потенциалом среди клеток, обработанных теми же концентрациями пероксида водорода. Изменения в метаболической активности клеток HeLa под влиянием пероксида водорода, описанные выше, сопровождались похожими изменениями в соотношении типов гибели клеток под влиянием окислительного стресса (Рис. 5.5а).

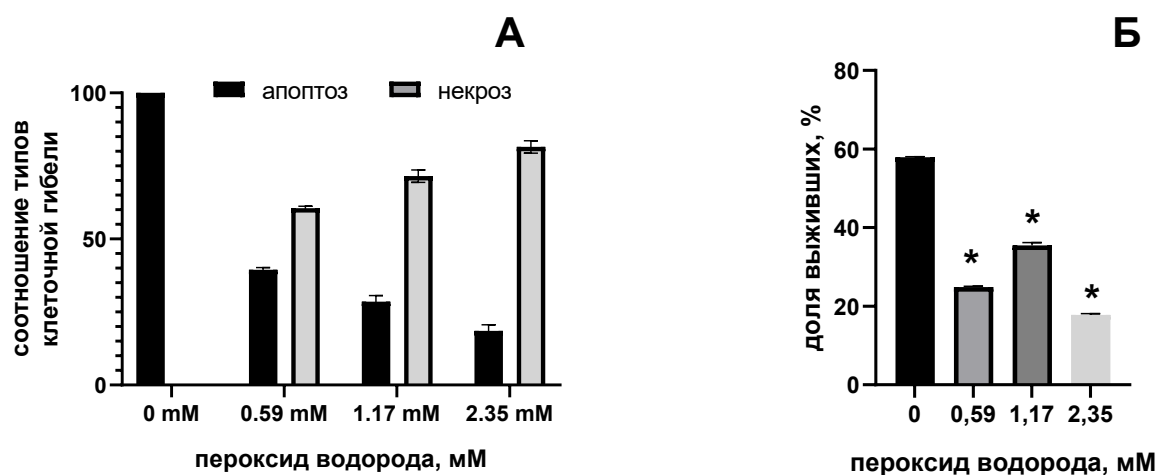


Рисунок 5.5 – Влияние пероксида водорода на: А – соотношение типов гибели; Б – доли выживших клеток HeLa. * - $p \leq 0.05$. В графике указаны средние значения и стандартные отклонения, для оценки достоверности различий использовался критерий Манна-Уитни

Результаты проведённого исследования показывают, что под действием пероксида водорода во всех протестированных концентрациях доля жизнеспособных клеток уменьшалась на 57, 38 и 69% соответственно в сравнении с контролем (Рис. 5.5б).

Также с возрастанием концентрации пероксида водорода в среде соотношение типов гибели клеток смещалось в сторону некроза – неконтролируемой клеточной гибели, которая характеризуется повреждением клеточной стенки и высвобождением внутриклеточного содержимого, что может вызвать воспалительную реакцию в организме. Причем, при обработке концентрациями, характерными для нормального количества пероксидпродуцирующих лактобацилл в среде, процентное содержание клеток, погибших в результате некроза, достигает 80 % (Рис. 5.5а).

Такая избирательная индукция некроза, возможно, лежит в основе одного из механизмов, сдерживающих рост опухоли в вагинальной среде при нормоценозе.

5.2.2 Оценка влияния молочной кислоты на устойчивость клеток HeLa к действию окислительного стресса

Экспериментальные исследования проводились на клеточной линии HeLa с целью изучения воздействия молочной кислоты в физиологических концентрациях, соответствующих нормоценозу (11,1 и 22,2 мМ) и БВ (5,6 мМ) на выбор типа гибели клеток в результате окислительного стресса

Изменения в метаболической активности клеток HeLa под влиянием молочной кислоты сопровождались похожими изменениями в соотношении типов гибели клеток под действием окислительного стресса (Рис. 5.6в). При обработке клеток HeLa концентрациями молочной кислоты, характерными для нормоценоза (11,1 и 22,2 мМ), наблюдалось статистически значимое снижение дегидрогеназной активности на 50 и 70 %, соответственно, что свидетельствует о выраженном угнетении метаболических процессов в клетках. В то же время, воздействие молочной кислотой в концентрации, соответствующей БВ (5,6 мМ), приводило к незначительному увеличению дегидрогеназной активности, что может указывать на стимуляцию метаболических реакций в условиях сниженного содержания лактобацилл в среде. Анализ изменений митохондриального потенциала выявил значительное уменьшение доли клеток с высоким митохондриальным потенциалом

при обработке концентрациями 11,1 и 22,2 мМ. В случае применения молочной кислоты в концентрации 5,6 мМ существенных изменений в митохондриальном потенциале не наблюдалось, что коррелирует с отсутствием ингибирования дегидрогеназной активности.

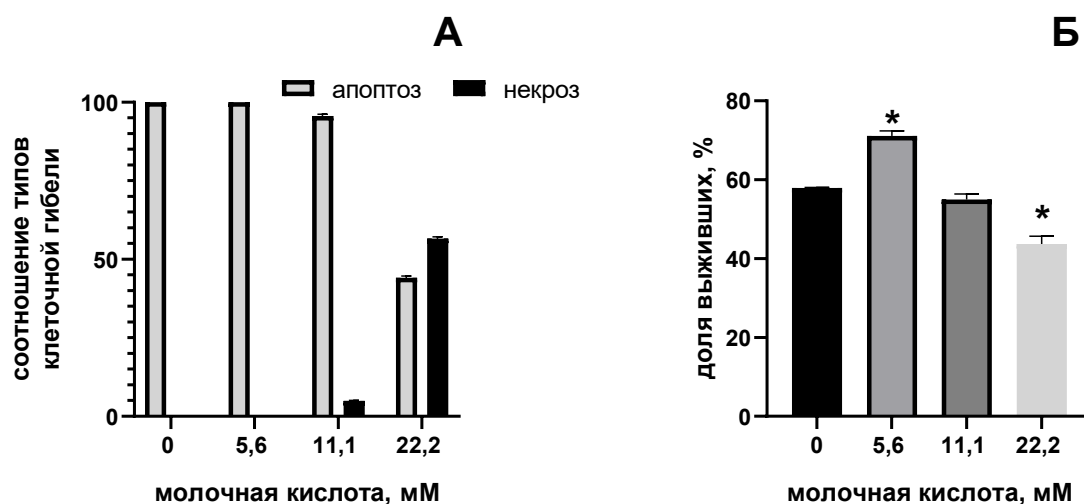


Рисунок 5.6 – Влияние молочной кислоты на: А – соотношение типов гибели; Б – долю выживших клеток HeLa. *- $p \leq 0.05$. В графике указаны средние значения и стандартные отклонения, для оценки достоверности различий использовался критерий Манна-Уитни

Полученные данные демонстрируют, что при воздействии молочной кислотой в концентрациях, характерных для нормоценоза (11,1 и 22,2 мМ) мы наблюдали снижение доли выживших клеток на 7 и 25 % соответственно по сравнению с контролем. В данных условиях наблюдалось смещение баланса в сторону некроза, что согласуется с подавлением метаболической активности и снижением митохондриального потенциала у клеток HeLa (Рис. 5.6).

Тогда как в условиях, имитирующих дефицит лактобацилл (5,6 мМ молочной кислоты), мы наблюдали увеличение доли выживших клеток на 23 % по сравнению с контролем, и в это же время преобладал апоптотический тип гибели клеток, что может быть связано с сохранением митохондриальных функций (Рис. 5.6).

Полученные результаты могут свидетельствовать о дозозависимом характере действия молочной кислоты на клеточную линию HeLa. Концентрации, соответствующие нормоценозу, подавляют метаболическую активность, уменьшают митохондриальный потенциал, стимулируют некротическую гибель клеток и ведут к сокращению доли жизнеспособных клеток. Напротив, низкие концентрации молочной кислоты, наблюдаемые при бактериальном вагинозе, не вызывают выраженного угнетающего воздействия на метаболизм и могут даже активировать пролиферацию клеток рака шейки матки, увеличивая количество выживших клеток. Не исключено, что пониженные концентрации молочной кислоты в микроокружении способны оказывать цитопротекторное действие в отношении клеток карциномы шейки матки.

5.2.3 Оценка влияния бесклеточных метаболитов лактобацилл, стандартизованных по молочной кислоте на устойчивость клеток HeLa к действию окислительного стресса

На следующем этапе оценивали влияние комплекса бесклеточных метаболитов, продуцируемых лактобациллами на тип гибели клеток HeLa в результате воздействия окислительного стресса. Была проведена стандартизация нативных бесклеточных метаболитов лактобацилл по молочной кислоте (концентрация соответствовала примерным концентрациям, обнаруживаемым при БВ и нормоценозе).

При кратковременной обработке метаболитами, стандартизированными до 11,1 мМ молочной кислоты, наблюдалось снижение дегидрогеназной активности, аналогичное эффекту чистой молочной кислоты. Однако степень ингибирования варьировала в зависимости от штамма лактобацилл. В случае использования концентрации 5,6 мМ ответ клеток был разнонаправленным, что находило свое отражение и в неодинаковом изменении митохондриального потенциала клеток HeLa в ответ на метаболиты разных штаммов. При длительном воздействии метаболитами, стандартизированными до 11,1 мМ молочной кислоты,

практически все штаммы вызывали снижение дегидрогеназной активности до 5,6 мМ, большинство штаммов также подавляли активность (Рис. 5.7).

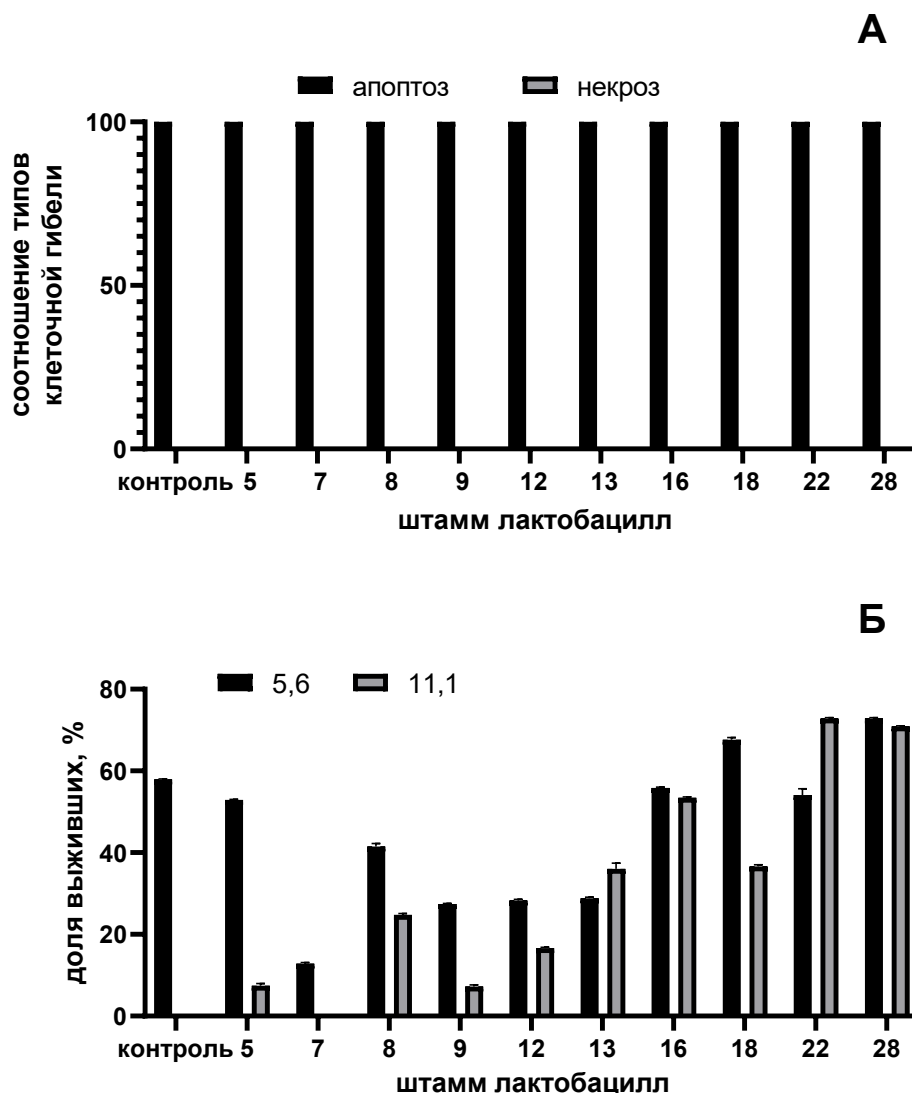


Рисунок 5.7 – Влияние внеклеточных метаболитов лактобацилл, стандартизованных по молочной кислоте на: А – соотношение типов гибели; Б – доли выживших клеток карциномы шейки матки. *- $p < 0.05$

В графике указаны средние значения и стандартные отклонения, для оценки достоверности различий использовался критерий Манна-Уитни

В отличие от экспериментов с чистой молочной кислотой, где высокие концентрации (11,1 и 22,2 мМ) индуцировали в клетках некроз, предварительная обработка метаболитами лактобацилл (даже при стандартизации по молочной

кислоте) приводила исключительно к апоптотической гибели после окислительного стресса. Однако доля выживших клеток в условиях окислительного стресса зависела от штамма лактобацилл. Некоторые метаболиты лактобацилл усиливали цитотоксическое воздействие окислительного стресса, и мы наблюдали снижение доли выживших клеток в диапазоне от 5 до 100 % по сравнению с контролем. Другие метаболиты лактобацилл, напротив, оказывали цитопротекторное действие и доля выживших клеток возрастала в диапазоне от 17 до 25 % по сравнению с контролем (Рис. 5.7).

Есть несколько возможных механизмов, объясняющих этот феномен. Во-первых, это может говорить о том, что в смеси метаболитов лактобацилл есть вещества, которые способны нивелировать некоторые эффекты молочной кислоты. Во-вторых, возможно, метаболиты, входящие в состав комплекса внеклеточных метаболитов, продуцируемые лактобациллами, проявляют синергический эффект, который приводит к тому, что клетки карциномы шейки матки погибают апоптотически.

Метаболиты разных штаммов лактобацилл оказывают различное влияние на метаболизм клеток карциномы шейки матки, что подчеркивает необходимость индивидуального подбора пробиотических штаммов для терапевтических целей. Комплексное действие метаболитов предотвращает некроз, способствуя апоптозу, что может иметь значение для снижения воспалительной реакции *in vivo*.

5.2.4 Оценка влияния биогенных аминов на устойчивость клеток HeLa к действию окислительного стресса

Биогенные амины, в частности путресцин (1,4-диаминобутан), являются важными метаболитами, продуцируемыми БВ-ассоциированными микроорганизмами. В настоящем исследовании мы изучили влияние путресцина в физиологических концентрациях на устойчивость клеток HeLa к действию окислительного стресса. В качестве комплекса биогенных аминов, обнаруживаемых в вагинальной среде при БВ, был использован коммерческий

реактив 1,4-диаминобутан (путресцин). Концентрации были подобраны с учетом суммарного количества обнаруживаемых биогенных аминов в вагинальной среде (0,15 и 0,45 мМ) [21,57,137].

Концентрации путресцина 0,45 мМ, используемая нами в данном исследовании, по-видимому, обладает некоторой цитопротекторной способностью, так при обработке клеток этой концентрацией мы наблюдали увеличение доли выживших клеток на 10 % по сравнению с контролем. При обработке клеток концентрацией 0,15 % доля выживших клеток оставалась на уровне контроля (Рис. 5.8б).

При оценке клеточной гибели при окислительном стрессе было установлено, что все погибшие клетки подвергались апоптозу (Рис. 5.8а).

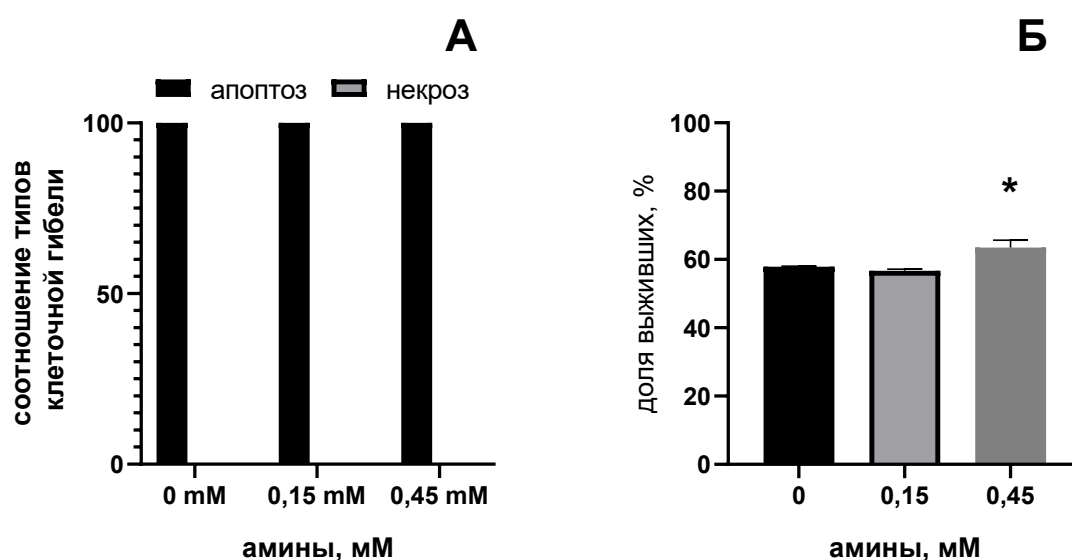


Рисунок 5.8 – Влияние путресцина на: А – соотношение типов клеточной гибели; Б – долю выживших клеток HeLa. * - $p \leq 0.05$. В графике указаны средние значения и стандартные отклонения, для оценки достоверности различий использовался критерий Манна-Уитни

Таким образом, путресцин, в концентрациях, соответствующих БВ, оказывает стимулирующее действие на метаболическую активность клеток HeLa, индуцируя апоптотический тип гибели в условиях окислительного стресса.

5.3 Обсуждение полученных результатов

Дополнительная обработка пероксидом водорода в концентрациях, обнаруживаемых в вагинальном биотопе (1,17 и 2,36 мМ) [47, 89, 116], вероятно, усиливает окислительный стресс и приводит к гибели клеток в результате некроза из-за вероятного превышения антиоксидантных возможностей клетки. Это также можно объяснить повреждением митохондрий, основанным на утрате ими мембранного потенциала, что свидетельствует о снижении дегидрогеназной активности и, вероятно, недостатке энергии для контролируемой клеточной гибели [48].

Из литературы, известно, что в клетках HeLa в ответ на повышенный уровень пероксида водорода повышается экспрессия антиоксидантных генов через путь Nrf2 (это ключевой транскрипционный фактор, регулирующий экспрессию антиоксидантных и детоксицирующих генов в ответ на окислительный стресс), что помогает временно защитить клетку от окислительного стресса [98]. В раковых клетках (включая HeLa) путь Nrf2 часто гиперактивирован, что делает их устойчивыми к терапии [118].

Другим объяснением может являться то, что экзогенный пероксид водорода, в используемых концентрациях, приводил к нарушению продукции и уменьшению внутриклеточных запасов АТФ, что и приводило к смещению соотношения типов гибели клетки в сторону некроза [120]. Это подтверждается снижением и дегидрогеназной активности и уменьшении митохондриального потенциала, что в конечном счете показывает на несостоятельность митохондрий и, следовательно, неспособности клеток погибать посредством митохондриально-опосредованного апоптоза.

Полученные нами данные позволяют предположить, что высокие концентрации лактата (11,1 и 22,2 мМ) вызывают дисфункцию митохондрий и деполяризацию мембран, что, в свою очередь, может снижать метаболизм клеток HeLa, а также регулировать тип гибели клеток.

Согласно полученным данным, путресцин способен усиливать метаболизм и поддерживать митохондриальный потенциал клеток HeLa, что находит отражение в выборе способа гибели клеток под действием окислительного стресса, это позволяет предположить его антиоксидантные свойства. Однако, необходимы дальнейшие исследования для подтверждения антиоксидантной активности путресцина, а также выяснение механизма его действия на клетки карциномы шейки матки.

Существуют данные, подтверждающие способность некоторых лактобацилл оказывать цитопротекторное действие в отношении здоровых эпителиоцитов в условии проведения химиотерапии [41].

Полученные данные подтверждают, что для снижения пролиферации клеток карциномы шейки матки, поддержания «здоровья» вагинальных эпителиоцитов правильнее использовать комплекс внеклеточных метаболитов или пробиотики, содержащие такие лактобациллы, которые вызывают снижение дегидрогеназной активности, а следовательно, и снижение количества жизнеспособных клеток карциномы шейки матки и приводят к апоптозу, но не некрозу в результате окислительного стресса.

Однако, в комплексе внеклеточных метаболитов, продуцируемых лактобациллами, содержатся неизученные нами вещества, способные отменять действие высоких концентраций молочной кислоты, и в результате клетки погибали исключительно апоптотически. Апоптоз, в отличие от некроза, представляет собой регулируемый процесс гибели клеток, который, как правило, не сопровождается выраженной воспалительной реакцией.

Данные, полученные в ходе этого исследования, показывают зависимость между изменением метаболических функций, митохондриального потенциала и устойчивость клетки к окислительному стрессу под действием внеклеточных метаболитов лактобацилл и их компонентов (молочной кислоты и пероксида водорода), а также биогенных аминов, продуцируемых БВ-ассоциированными микроорганизмами. Поддержание нормального количества пероксидпродуцирующих лактобацилл, способных в условиях окислительного стресса индуцировать апоптотический тип гибели клеток карциномы шейки матки, не вызывая дополнительного воспаления во влагалище, возможно, лежит в основе одного из механизмов поддержания гомеостаза вагинальной среды.

Результаты, полученные при изучении влияния комплекса микробных метаболитов на метаболизм карциномы шейки матки легли в основу патента на изобретение (Получено решение о выдаче патента РФ на изобретение (номер заявки 2025103399)).).

Публикации: Myachina, Y., Sgibnev A. The Effect of Cell-Free Metabolites of Vaginal Lactobacilli on HeLa Cells Is Independent of Lactic Acid Concentration // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – V. 26, №. 24. – P. 11929.

Патент № 2856925 Российская Федерация, МПК C12Q 1/02, C12N 1/20, C12R 1/225. Способ отбора лактобацилл для создания пробиотиков, способных снижать количество жизнеспособных клеток карциномы шейки матки : № 2025103399/10 (008990) : заявл. 17.02.2025 : дата гос. регистрации 25.02.2026 / Мячина Ю.Л., Сгибнев А.В. ; заявитель и патентообладатель ОФИЦ УрО РАН. – Москва : Роспатент, 2026. – 6 с. : ил. – Текст : непосредственный.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основной целью нашего исследования было оценить влияние метаболитов вагинальной микробиоты на функциональное состояние клеток хозяина. Для этого была исследована связь видового состава и экологических характеристик доминирующих представителей вагинальной микробиоты с функциональным состоянием (метаболической активностью, выживаемостью и типом клеточной гибели при окислительном стрессе) первичной культуры вагинальных эпителиоцитов; охарактеризовано влияние внеклеточных метаболитов доминирующих представителей вагинальной микробиоты и отдельных компонентов, входящих в их состав (лактат, пероксид водорода, путресцин), на метаболизм и киллинговую активность нейтрофилов периферической крови; оценено влияние метаболитов доминирующих представителей вагинальной микробиоты на функциональное состояние (метаболическую активность, выживаемость и тип клеточной гибели при окислительном стрессе) клеток карциномы шейки матки на модели клеток линии HeLa; изучена возможность использования внеклеточных метаболитов вагинальных лактобацилл, различающихся по уровню продукции лактата и пероксида водорода, для снижения жизнеспособности клеток карциномы шейки матки.

Согласно литературе, одним из основных факторов, влияющим на функциональную активность эпителиоцитов является окислительный стресс, который в контексте ВПЧ-ассоциированных заболеваний играет двойственную роль. Так, он может способствовать элиминации вируса по средствам активации противовирусных механизмов организма. Однако, хроническое воздействие АФК может вызывать повреждение ДНК, липидов и белков, что приводит к нестабильности генома и прогрессированию неопластических изменений клеток человека; а также усиливать онкогенные эффекты ВПЧ [119,129]. Поэтому на первом этапе нашего исследования мы изучили влияние типа вагинальной микробиоты на функциональное состояние эпителиоцитов в условиях окислительного стресса.

Установлено, что поддержание колонизационной резистентности вагинальной среды зависит не только от количественного баланса лактобацилл, но и от их функционального статуса, в частности способности продуцировать пероксид водорода. Пероксидпродуцирующие штаммы защищают эпителиоциты от окислительного стресса, поддерживая их метаболическую активность и снижая некротическую гибель, тогда как доминирование пероксиднепродуцирующих лактобацилл усугубляет окислительное повреждение. При этом *G. vaginalis* оказывает противоположное влияние на здоровые и ВПЧ-инфицированные клетки: в последних она повышает выживаемость и метаболическую активность, потенциально способствуя персистенции вируса. Эти результаты подчеркивают ключевую роль «качества» вагинальной микробиоты в предотвращении персистенции ВПЧ, где необходимо не только присутствие лактобацилл, но и их способность продуцировать пероксид водорода.

В последние годы в научной литературе большое внимание уделяется управлению метаболической активностью иммунных клеток как важного механизма регуляции их функциональной активности [91]. В системе локальной иммунной защиты вагинального биотопа центральное место занимают нейтрофилы, как наиболее многочисленная популяция гранулоцитов, обладающая широким спектром эффекторных функций. Однако вопрос о том, как различные метаболиты вагинальной микробиоты могут модулировать активность нейтрофилов, остается недостаточно изученным.

В связи с этим, нами были получены данные, которые демонстрируют четкую связь между изменением метаболических функций, митохондриального потенциала и антимикробной функцией нейтрофилов, под действием внеклеточных метаболитов лактобацилл и их компонентов (молочной кислоты и пероксида водорода), а также биогенных аминов, продуцируемых БВ-ассоциированными микроорганизмами. Все это подчеркивает роль микробных метаболитов в модуляции части иммунного ответа и поддержании колонизационной резистентности влагалища.

Несмотря на существующие данные о влиянии метаболитов представителей цервиковагинального биотопа на функциональное состояние здоровых эпителиоцитов, невозможно предсказать эффекты, реализующиеся в раковых клетках, имеющих измененный метаболизм [55]. Данные, полученные в ходе этого исследования, показывают зависимость между изменением метаболических функций, митохондриального потенциала и устойчивость клетки к окислительному стрессу под действием внеклеточных метаболитов лактобацилл и их компонентов (молочной кислоты и пероксида водорода), а также биогенных аминов, продуцируемых БВ-ассоциированными микроорганизмами. Поддержание нормального количества пероксидпродуцирующих лактобацилл, способных в условиях окислительного стресса индуцировать апоптотический тип гибели клеток карциномы шейки матки, не вызывая дополнительного воспаления во влагалище, возможно, лежит в основе одного из механизмов поддержания гомеостаза вагинальной среды.

Полученные в работе данные расширяют современные представления о межклеточных взаимодействиях в вагинальном биотопе. Выявлена ключевая роль лактобацилл в поддержании колонизационной резистентности через модуляцию устойчивости к окислительному стрессу клеток хозяина. Установлена значимая корреляция между количеством лактобацилл, их способностью продуцировать пероксид водорода и эффективностью защитного действия.

Практическая ценность заключается в возможности использования полученных данных для создания постбиотических препаратов, предназначенных для коррекции вагинального дисбиоза и повышению эффективности терапии ВПЧ ассоциированных заболеваний, а также отбора пробиотических штаммов, способных снижать метаболическую активность клеток карциномы шейки матки.

ВЫВОДЫ

1. В условиях окислительного стресса внеклеточные метаболиты вагинальных лактобацилл индуцируют апоптоз клеток HeLa. Отдельные компоненты метаболитов лактобацилл (пероксид водорода и молочная кислота) в физиологических концентрациях, характерных для нормоценоза, в условиях окислительного стресса индуцируют в клетках HeLa некроз.

2. Метаболиты представителей цервиковагинального биотопа способны модулировать метаболическую активность нейтрофилов, что приводит к изменениям их эффекторных свойств и может определять эффективность реализации колонизационной резистентности влагалища.

3. Количество лактобацилл и их способность продуцировать пероксид водорода являются ключевыми факторами, лежащими в основе регуляции метаболической активности и устойчивости клеток хозяина к окислительному стрессу, включая ВПЧ-инфицированные клетки.

4. Лактобациллы модулируют метаболическую активность и устойчивость клеток хозяина к окислительному стрессу, включая ВПЧ-инфицированные клетки, и ключевыми факторами при этом являются количество лактобацилл и их способности продуцировать пероксид водорода.

5. Наличие в вагинальном биотопе пероксидпродуцирующих штаммов лактобацилл, снижающих уровень метаболизма неинфицированных эпителиоцитов, влечет за собой повышение устойчивости эпителиоцитов к окислительному стрессу и уменьшает долю клеток, погибших некротически.

6. Пероксиднепродуцирующие лактобациллы повышают уровень метаболизма неинфицированных эпителиоцитов, уменьшает долю выживших клеток в условиях окислительного стресса, способствуя некротической гибели эпителиоцитов.

7. В присутствии *G.vaginalis* в вагинальной среде метаболическая активность неинфицированных эпителиоцитов снижается, что приводит к снижению числа выживших клеток при окислительном стрессе.

8. В присутствии *G.vaginalis* в вагинальной среде ВПЧ-инфицированные клетки демонстрируют повышенную метаболическую активность, что приводит к увеличению выживаемости в условиях окислительного стресса, однако при этом наблюдается рост числа некротически погибших клеток.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АТФ –аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

БВ – бактериальный вагиноз

ВЗК– воспалительные заболевания кишечника

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВПЧ – вирус папилломы человека

ПЦР – полимеразная цепная реакция

УПМ – условно-патогенные микроорганизмы

СС (Cell Carcinoma) – клеточная карцинома

CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasia) – цервикальная интраэпителиальная неоплазия

CST (Com Munity State Type) – типы состояния сообщества

LSIL (Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion) –плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкой степени

HR-HPV (high-risk human papillomavirus) – высокоонкогенные типы вируса папилломы человека

HSIL (High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion) –интраэпителиальных поражений высокой степени

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреев, А. Ю. От метаболизма к иммунитету: АФК и другие сигналы / А. Ю. Андреев, В. П. Скулачев, Д. Б. Зоров [и др.] // Биохимия. - 2020. - Т. 85, № 12. - С. 1939-1960. - DOI: 10.1134/S000629792012001X. - URL: <https://link.springer.com/article/10.1134/S000629792012001X> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.
2. Андрюков, Б. Г. Молекулярные механизмы персистенции бактерий / Б. Г. Андрюков, И. Н. Ляпун. - Текст : электронный // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2020. - № 3. - URL: <https://microbiol.crie.ru/jour/article/view/832/497> (дата обращения: 15.04.2025).
3. Бухарин, О. В. Роль доминантной микрофлоры в механизмах защиты вагинального биотопа женщин / О. В. Бухарин, Е. А. Кремлева, А. В. Сгибнев, С. В. Черкасов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2013. - № 6. - С. 42-47. - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/rol-dominantnoy-mikroflory-v-mehanizmah-zaschity-vaginalnogo-biotopa-zhenschin> (дата обращения: 16.06.2025). - Текст : электронный.
4. Вольский, Н. Н. Особенности изменения уровня внеклеточной ДНК, показателей нетоза и воспаления в периферической крови у пациентов с бронхиальной астмой / Н. Н. Вольский [и др.] // Российский иммунологический журнал. - 2023. - Т. 26, № 4. - С. 533-540. - DOI: 10.46235/1028-7221-13925-ССО. - Текст: электронный. - URL: <https://rusimMun.ru/jour/article/view/13925> (дата обращения: 15.04.2025).
5. Видовая идентификация влагалищных лактобацилл, выделенных у женщин репродуктивного возраста / А. С. Исаева, А. В. Летаров, Е. Н. Ильина [и др.] - Текст : электронный // Акушерство и гинекология. - 2012. - № 3. - С. 60-64. - URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_18113138_98210275.pdf (дата обращения: 15.04.2021).

6. Гаврилова, Е. Д. Особенности изменения уровня внеклеточной ДНК, показателей нетоза и воспаления в периферической крови у пациентов с бронхиальной астмой / Е. Д. Гаврилова [и др.] // Российский иммунологический журнал. - 2023. - Т. 26, № 4. - С. 533-540. - DOI: 10.46235/1028-7221-13925-ССО. - Текст: электронный. - URL: <https://rusimMun.ru/jour/article/view/13925> (дата обращения: 15.04.2025).

7. Караулов, А. В. Микрофлора, колонизационная резистентность слизистых и мукозальный иммунитет / А. В. Караулов, С. С. Афанасьев, В. А. Алешкин [и др.] // Иммунология. - 2015. - № 5. - С. 45-50. - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mikroflora-kolonizatsionnaya-rezistentnost-slizistyh-i-mukozalnyy-imMunitet> (дата обращения: 16.06.2025). - Текст : электронный.

8. Кира, Е. Ф. Бактериальный вагиноз / Е. Ф. Кира. - Москва: Медицинское информационное агентство, 2012. - 472 с. - ISBN 978-5-8948-1864-3. - Текст: непосредственный.

9. Козлов, В. А. Регуляция функциональной активности нейтрофилов микробными метаболитами слизистых оболочек [Текст] / В. А. Козлов, И. Н. Сапронова // Иммунология. - 2020. - Т. 41, № 5. - С. 302-310. - DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-5-302-310. - URL: <https://www.imMunology.ru/jour/article/view/1055> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

10. Кремлева, Е. А. Влияние микросимбионтов на способность вагинальных эпителиоцитов модифицировать биологические свойства бактерий / Е. А. Кремлева, А. В. Сгибнев, С. В. Черкасов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2015. - Т. 92, № 4. - С. 75-79. - URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=24345678> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

11. Кремлева, Е. А. Изучение влияния комбинации антимикробных препаратов и преднизолона в форме преднизалона натрия фосфата на

микроэкологическое состояние нижних отделов женских половых органов / Е. А. Кремлева, А. В. Сгибнев, Ю. С. Щетинина // Акушерство и гинекология. - 2019. - № 11. - С. 209-215. - DOI: 10.18565/aig.2019.11.209-215. - Текст: электронный. - URL: <https://aig-journal.ru/articles/Izuchenie-vliyaniya-kombinacii-antimikrobnih-preparatov-i-prednizolona-v-forme-prednizolona-natriya-fosfata-na-mikroekologicheskoe.html> (дата обращения: 15.04.2025).

12. Кудрявцева, Л. В. Нормоценоз. Бактериальный вагиноз. Комплексная лабораторная диагностика бактериального вагиноза: современное состояние проблемы / Л. В. Кудрявцева, А. Е. Гушин // Лабораторная служба. - 2013. - № 1. - С. 3-24. - Текст: электронный. - URL: <https://www.mediasphera.ru/issues/laboratornaya-sluzhba/2013/1/downloads/ru/032305-2198201311> (дата обращения: 15.04.2025).

13. Олейник, В. В. Влияние интравагинальной пробиотической терапии на течение папилломавирусной инфекции / В. В. Олейник, Е. А. Кремлева, А. В. Сгибнев // Бюллетень сибирской медицины. - 2021. - Т. 20, № 4. - С. 11-17. - DOI: 10.20538/1682-0363-2021-4-11-17. - URL: <https://bulletin.tomsk.ru/jour/article/view/3615> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

14. [Особенности изменения уровня внеклеточной ДНК, показателей нетоза и воспаления в периферической крови у пациентов с бронхиальной астмой] / Гаврилова Е.Д., Гойман Е.В., Демченко Е.Н., [и др.] - Текст : электронный // Российский иммунологический журнал. - 2023. - Т. 26. - №4. - С. 533-540. URL: <https://medj.rucml.ru/journal/45562d525553494d4d554e2d41525449434c452d3133393235> (дата обращения: 12.05.2024).

15. Прилепская, В. Н. Вагинальный микробиоценоз: современные представления о механизмах колонизационной резистентности [Текст] / В. Н. Прилепская, А. Б. Муравьева // Акушерство и гинекология. - 2021. - № 5. - С. 22-28. - DOI: 10.18565/aig.2021.5.22-28. - URL: <https://aig-journal.ru/articles/Vaginaalniy-mikrobiotsenoz-sovremennyye-predstavleniya-o-mekhanizmax-kolonizatsionnoy-rezistentnosti>

journal.ru/ru/jarticles_aig/591.html (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

16. Савичева, А.М. Исследование *in vitro* роста, размножения, антибиотикорезистентности, конкурентных взаимоотношений штамма *Lactobacillus casei rhamnosus* / А.М. Савичева, Е.В. Рыбина. - Текст : электронный // Акушерство и гинекология. - 2014. - № 7. - С. 79-83. - URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_21801009_71508004.pdf (дата обращения: 15.04.2025).].

17. Савичева, А. М. Роль гликогена в поддержании вагинального гомеостаза [Текст] / А. М. Савичева, Т. А. Соколовская // Журнал акушерства и женских болезней. - 2020. - Т. 69, № 4. - С. 45-56. - DOI: 10.17816/JOWD69445-56. - URL: <https://jowd.elpub.ru/jour/article/view/326> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

18. Утробин, М. В. Оптимизация диагностики причин потери и осложнений беременности у женщин с формированием ретрохориальной гематомы. : специальность 14.01.01 “ Акушерство и гинекология ” : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Утробин Максим Владимирович ; Сибирский государственный медицинский университет. – Томск, 2019. - 144 с. - Текст : электронный. - URL:http://elar.ssmu.ru/bitstream/20.500.12701/1043/1/diss_ssmu-2019-2.pdf (дата обращения: 15.04.2021).].

19. Aldunate, M. Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis / M. Aldunate [et al.] // Frontiers in physiology. – 2015. – Vol. 6. – P. 164. – Текст : электронный. – URL: <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00164> (дата обращения: 15.04.2025).

20. Aldunate, M. Vaginal concentrations of lactic acid potentially inactivate HIV / M. Aldunate [et al.] // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. - 2013. - Vol. 68, № 8.

- P. 2015-2025. - DOI: 10.1093/jac/dkt156. - Текст: электронный. - URL: <https://academic.oup.com/jac/article/68/8/2015/727284> (дата обращения: 15.04.2025).

21. Alvarez, C. L. Biogenic amines as mitochondrial uncouplers in human neutrophils [Text] / C. L. Alvarez, M. Corradi, A. Trostchansky // *Redox Biology*. - 2022. - Vol. 56. - Art. 102439. - DOI: 10.1016/j.redox.2022.102439. - URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231722002397> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

22. Amabebe, E. The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli / E. Amabebe, D.O.C. Anumba // *Frontiers in Medicine*. - 2018. - Vol. 5. - Art. 181. - DOI: 10.3389/fmed.2018.00181. - URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2018.00181/full> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

23. Amsalem, H. Identification of a novel neutrophil population: proangiogenic granulocytes in second-trimester human decidua / H. Amsalem, M. Kwan, A. Hazan [et al.] // *Journal of Immunology*. - 2014. - Vol. 193, № 6. - P. 3070-3079. - DOI: 10.4049/jimmunol.1303117. - URL: <https://www.jimmunol.org/content/193/6/3070> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

24. Anahtar, M. N. Cervicovaginal microbiota and local immune response correlate with HIV susceptibility in African women / M. N. Anahtar, E. H. Byrne, K. E. Doherty [et al.] // *Immunity*. - 2015. - Vol. 42, № 5. - P. 965-976. - DOI: 10.1016/j.immuni.2015.04.019. - URL: [https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613\(15\)00207-8](https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(15)00207-8) (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

25. Anahtar, M. N. Cervicovaginal microbiota and reproductive health: the virtue of simplicity / M. N. Anahtar, E. H. Byrne, K. E. Doherty [et al.] // *Cell Host & Microbe*. - 2015. - Vol. 17, № 2. - P. 156-165. - DOI: 10.1016/j.chom.2015.01.004. - URL: [https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128\(15\)00020-5](https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128(15)00020-5) (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

26. Ashique, S. It is all about probiotics to control cervical cancer / S. Ashique, F. Khan, M. M. Nizami [et al.] // Probiotics and Antimicrobial Proteins. - 2024. - Vol. 16, № 3. - P. 979-992. - DOI: 10.1007/s12602-023-10165-4. - URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-023-10165-4> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

27. Audirac-Chalifour, A. Cervical microbiome and cytokine profile at various stages of cervical cancer: a pilot study / A. Audirac-Chalifour, K. Torres-Poveda, M. Bahena-Román [et al.] // PLoS One. - 2016. - Vol. 11, № 4. - Art. e0153274. - DOI: 10.1371/journal.pone.0153274. - URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0153274> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

28. Beloborodova, N. Serum levels of mitochondrial and microbial metabolites reflect mitochondrial dysfunction in different stages of sepsis / N. Beloborodova, A. Pautova, A. Sergeev [et al.] // Metabolites. - 2019. - Vol. 9, № 10. - Art. 196. - DOI: 10.3390/metabo9100196. - URL: <https://www.mdpi.com/2218-1989/9/10/196> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

29. Belkaid, Y. Role of the microbiota in imMunity and inflamMation / Y. Belkaid, T. W. Hand // Cell. - 2014. - Vol. 157, № 1. - P. 121-141. - DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.011. - URL: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(14\)00303-4](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(14)00303-4) (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

30. Boehme, M. The gut microbiota is an emerging target for improving brain health during ageing / M. Boehme, L. M. Guzzetta, T. G. Dinan [et al.] // Gut Microbiome. - 2023. - Vol. 4. - Art. e2. - DOI: 10.1017/gmb.2022.11. - URL: <https://www.cambridge.org/core/journals/gut-microbiome/article/gut-microbiota-is-an-emerging-target-for-improving-brain-health-during-ageing/> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

31. Borges, S. The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health / S. Borges, J. Silva, P. Teixeira // Archives of Gynecology and Obstetrics. - 2014. - Vol. 289, № 3. - P. 479-489. - DOI: 10.1007/s00404-013-3064-9. -

URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00404-013-3064-9> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

32. Brinkmann, V. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann [et al.] // *Science*. - 2004. - Vol. 303, № 5663. - P. 1532-1535. - DOI: 10.1126/science.1092385. - URL: <https://science.sciencemag.org/content/303/5663/1532> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

33. Brusselaers, N. Vaginal dysbiosis and the risk of human papillomavirus and cervical cancer: systematic review and meta-analysis / N. Brusselaers, A. Shrestha, R. van de Wijgert [et al.] // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. - 2019. - Vol. 221, № 1. - P. 9-18.e8. - DOI: 10.1016/j.ajog.2018.12.011. - URL: [https://www.ajog.org/article/S0002-9378\(18\)31303-5/fulltext](https://www.ajog.org/article/S0002-9378(18)31303-5/fulltext) (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

34. Calaf, G. M. Oxidative stress in female cancers / G. M. Calaf, U. Urzua, L. Termini, F. Aguayo // *Oncotarget*. - 2018. - Vol. 9, № 34. - P. 23824-23842. - DOI: 10.18632/oncotarget.25323. - URL: <https://www.oncotarget.com/article/25323/text/> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

35. Cazzaniga, M. Ovarian microbiota, ovarian cancer and the underestimated role of HPV / M. Cazzaniga, F. Gheit, C. Casadio [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2022. - Vol. 23, № 24. - Art. 16019. - DOI: 10.3390/ijms232416019. - URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/24/16019> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

36. Chaudhary, P. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases / P. Chaudhary, R. Janmeda, A. Docea [et al.] // *Frontiers in Chemistry*. - 2023. - Vol. 11. - Art. 1158198. - DOI: 10.3389/fchem.2023.1158198. - URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2023.1158198/full> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

37. Chen, X. The female vaginal microbiome in health and bacterial vaginosis / X. Chen, Y. Lu, T. Chen [et al.] // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. - 2021. - Vol. 11. - Art. 631972. - DOI: 10.3389/fcimb.2021.631972. - URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.631972/full> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

38. Chen, Q. M. Hydrogen peroxide inhibits apoptosis induced by serum deprivation in PC12 cells through the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway / Q. M. Chen, J. C. Bartholomew, J. Campisi [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. - 2003. - Vol. 35, № 10. - P. 1315-1325. - DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.07.004. - Текст: электронный. - URL: <https://www.nature.com/articles/labinvest201036> (дата обращения: 15.04.2025).

39. Cohen, C. R. Bacterial vaginosis associated with increased risk of female-to-male HIV-1 transmission: a prospective cohort analysis among African couples / C. R. Cohen, J. R. Lingappa, J. M. Baeten [et al.] // *PLoS Medicine*. - 2012. - Vol. 9, № 6. - Art. e1001251. - DOI: 10.1371/journal.pmed.1001251. - URL: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1001251> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

40. Curty, G. The role of the cervicovaginal microbiome on the genesis and as a biomarker of premalignant cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer / G. Curty, P. S. de Carvalho, M. A. Soares // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2019. - Vol. 21, № 1. - Art. 222. - DOI: 10.3390/ijms21010222. - URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/1/222> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

41. Danis, R. Orally administered probiotics in the prevention of chemotherapy ($\pm$ radiotherapy)-induced gastrointestinal toxicity: a systematic review with meta-analysis of randomized trials / R. Danis, M. Mego, M. Antonova [et al.] // *Integrative Cancer Therapy*. - 2022. - Vol. 21. - Art. 15347354221144308. - DOI: 10.1177/15347354221144309. -

URL: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/15347354221144309> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

42. de Araújo, R.F.F. Oxidative stress and disease / R.F.F. de Araújo, D.B.G. Martins, M.A.C.S.M. Borba // A master regulator of oxidative stress-the transcription factor nrf2 / ed. by A. Salazar. - London : IntechOpen, 2016. - P. 3-22. - DOI: 10.5772/64513. - URL: <https://www.intechopen.com/chapters/51110> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

43. DeLong, K. Vaginal microbiota transplantation: the next frontier / K. DeLong, M. Bensussen, S. L. Bordenstein [et al.] // The Journal of Law, Medicine & Ethics. - 2019. - Vol. 47, № 4. - P. 555-567. - DOI: 10.1177/1073110519897731. - URL: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1073110519897731> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

44. Dolgushin, I. I. Neutrophil extracellular traps formation and microbiota interactions in vaginal ecosystem [Text] / I. I. Dolgushin, E. V. Silachev, L. V. Krechetova // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. - 2023. - Vol. 13. - Art. 1121234. - DOI: 10.3389/fcimb.2023.1121234. - URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2023.1121234/full> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

45. Donders, G. G. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy / G. G. Donders, C. K. Van, G. Bellen [et al.] // BJOG. - 2009. - Vol. 116, № 10. - P. 1315-1324. - DOI: 10.1111/j.1471-0528.2009.02237.x. - URL: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-0528.2009.02237.x> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

46. Dong, B. Prevotella as the hub of the cervicovaginal microbiota affects the occurrence of persistent human papillomavirus infection and cervical lesions in women of childbearing age via host NF- κ B/C-myc / B. Dong, L. Huang, Q. Zhou [et al.] // Journal of Medical Virology. - 2022. - Vol. 94, № 11. - P. 5519-5534. - DOI: 10.1002/jmv.28025. -

URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.28025> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

47. Ebrahimi, S. Oxidative stress in cervical cancer pathogenesis and resistance to therapy / S. Ebrahimi, A. Soltani, S. I. Hashemy // *Journal of Cellular Biochemistry*. - 2019. - Vol. 120, № 5. - P. 6868-6877. - DOI: 10.1002/jcb.28007. - URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.28007> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

48. Eguchi, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis / Y. Eguchi, S. Shimizu, Y. Tsujimoto // *Cancer Research*. - 1997. - Vol. 57, № 10. - P. 1835-1840. - DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-97-3304. - URL: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/57/10/1835/505467/Intracellular-ATP-Levels-Determine-Cell-Death> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

49. Feng, S. Quantitative analysis of total acidity in aqueous lactic acid solutions by direct potentiometric titration / S. Feng, Y. Li, X. Wang [et al.] // *Microchemical Journal*. - 2020. - Vol. 157. - Art. 105049. - DOI: 10.1016/j.microc.2020.105049. - Текст: электронный. - URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X2030922X> (дата обращения: 15.07.2024).

50. Fettweis, J. M. Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry / J. M. Fettweis, J. P. Brooks, M. G. Serrano [et al.] // *Microbiology*. - 2014. - Vol. 160, Pt 10. - P. 2272-2282. - DOI: 10.1099/mic.0.081034-0. - URL: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.081034-0> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

51. Freshney, R. I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications / R. I. Freshney. - 7th ed. - Hoboken: Wiley-Blackwell, 2016. - 774 p. - ISBN 978-1-119-35538-2. - Текст: непосредственный.

52. Gao, J. Microbial regulation of host mitochondrial function via indole-3-propionic acid [Text] / J. Gao, K. Xu, H. Liu [et al.] // *Cell Metabolism*. - 2023. - Vol.

35, № 2. - P. 256-270. - DOI: 10.1016/j.cmet.2022.12.014. - URL: [https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131\(22\)00525-5](https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131(22)00525-5) (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

53. Galdiero, M. R. Roles of neutrophils in cancer growth and progression / M. R. Galdiero, G. Garlanda, S. Jaillon [et al.] // *Journal of Leukocyte Biology*. - 2018. - Vol. 103, № 3. - P. 457-464. - DOI: 10.1002/JLB.3MR0717-292R. - URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/JLB.3MR0717-292R> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

54. García-Quiroz, J. The interaction of human papillomavirus infection and prostaglandin E2 signaling in carcinogenesis: A focus on cervical cancer therapeutics / J. García-Quiroz, R. García-Becerra, L. Díaz [et al.] // *Cells*. - 2022. - Vol. 11, № 16. - Art. 2528. - DOI: 10.3390/cells11162528. - URL: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/16/2528> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

55. Giurini, E. F. Redefining bioactive small molecules from microbial metabolites as revolutionary anticancer agents / E. F. Giurini, A. Godla, K. H. Gupta // *Cancer Gene Therapy*. - 2024. - Vol. 31. - P. 187-206. - DOI: 10.1038/s41417-023-00715-x. - URL: <https://www.nature.com/articles/s41417-023-00715-x> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

56. Guideline ICHHT. Guideline for good clinical practice // *Journal of Postgraduate Medicine*. - 2001. - Vol. 47, № 3. - P. 199-203. - URL: <https://www.jpjgmonline.com/article.asp?issn=0022-3859;year=2001;volume=47;issue=3;spage=199;epage=203;aulast=Guideline> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

57. Hardy, L. *Gardnerella vaginalis* alters vaginal metabolites through antioxidant properties of its biogenic amines [Text] / L. Hardy, M. Jespers, A. Dahchour [et al.] // *Scientific Reports*. - 2020. - Vol. 10. - Art. 7107. - DOI: 10.1038/s41598-020-64090-5. - URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-64090-5> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

58. Hardy, L. Unravelling the Bacterial Vaginosis-Associated Biofilm: A Multiplex *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* Fluorescence In Situ Hybridization Assay Using Peptide Nucleic Acid Probes / L. Hardy, V. Jespers, N. Dahchour [et al.] // PLoS One. - 2015. - Vol. 10, № 8. - Art. e0136658. - DOI: 10.1371/journal.pone.0136658. -

URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0136658> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

59. Hearps, A. C. Vaginal lactic acid elicits an anti-inflammatory response from human cervicovaginal epithelial cells and inhibits production of pro-inflammatory mediators associated with HIV acquisition / A. C. Hearps, T. A. Angelovich, A. L. Jaworowski [et al.] // Mucosal Immunology. - 2017. - Vol. 10, № 6. - P. 1480-1490. - DOI: 10.1038/mi.2017.27. - URL: <https://www.nature.com/articles/mi201727> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

60. Huang, R. Cervicovaginal microbiome, high-risk HPV infection and cervical cancer: Mechanisms and therapeutic potential / R. Huang, X. Liu, H. Li [et al.] // Microbiological Research. - 2024. - Vol. 287. - Art. 127857. - DOI: 10.1016/j.micres.2024.127857. -

URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501324000012> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

61. Huang, X. *Lactobacillus crispatus* CCFM1339 inhibits vaginal epithelial barrier injury induced by *Gardnerella vaginalis* in mice / X. Huang, Y. Wang, X. Chen [et al.] // Biomolecules. - 2024. - Vol. 14, № 2. - Art. 240. - DOI: 10.3390/biom14020240. - URL: <https://www.mdpi.com/2218-273X/14/2/240> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

62. Huttenhower, C. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome / C. Huttenhower, D. Gevers, R. Knight [et al.] // Nature. - 2012. - Vol. 486, № 7402. - P. 207-214. - DOI: 10.1038/nature11234. - URL: <https://www.nature.com/articles/nature11234> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

63. Inácio, Â. Genetic modulation of HPV infection and cervical lesions: role of oxidative stress-related genes / Â. Inácio, M. F. Silva, M. Medeiros [et al.] // *Antioxidants*. - 2023. - Vol. 12, № 10. - Art. 1806. - DOI: 10.3390/antiox12101806. - URL: <https://www.mdpi.com/2076-3921/12/10/1806> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

64. Kruk, J. Reactive oxygen and nitrogen species in carcinogenesis: implications of oxidative stress on the progression and development of several cancer types / J. Kruk, H. Y. Aboul-Enein // *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. - 2017. - Vol. 17, № 11. - P. 904-919. - DOI: 10.2174/1389557517666170228115324. - URL: <https://www.eurekaselect.com/article/82005> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

65. Kyrgiou, M. Does the vaginal microbiota play a role in the development of cervical cancer? / M. Kyrgiou, A. Mitra, A. B. Moscicki // *Translational Research*. - 2017. - Vol. 179. - P. 168-182. - DOI: 10.1016/j.trsl.2016.07.004. - URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1931524416301225> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

66. Kyrgiou, M. Vaginal microbiome and cervical cancer / M. Kyrgiou, A. B. Moscicki // *Seminars in Cancer Biology*. - 2022. - Vol. 86. - P. 189-198. - DOI: 10.1016/j.semcancer.2022.01.019. - URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1044579X2200010X> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

67. Łaniewski, P. Bacterial vaginosis and health-associated bacteria modulate the immunometabolic landscape in 3D model of human cervix / P. Łaniewski, M. M. Herbst-Kralovetz // *npj Biofilms and Microbiomes*. - 2021. - Vol. 7, № 1. - Art. 88. - DOI: 10.1038/s41522-021-00259-8. - URL: <https://www.nature.com/articles/s41522-021-00259-8> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

68. Łaniewski, P. Linking cervicovaginal immune signatures, HPV and microbiota composition in cervical carcinogenesis in non-Hispanic and Hispanic women / P. Łaniewski, D. Barnes, A. Goulder [et al.] // *Scientific Reports*. - 2018. -

Vol. 8, № 1. - Art. 7593. - DOI: 10.1038/s41598-018-25879-7. - URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-25879-7> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

69. Łaniewski, P. The microbiome and gynaecological cancer development, prevention and therapy / P. Łaniewski, Z. E. Ilhan, M. M. Herbst-Kralovetz // *Nature Reviews Urology*. - 2020. - Vol. 17, № 4. - P. 232-250. - DOI: 10.1038/s41585-020-0286-z. - URL: <https://www.nature.com/articles/s41585-020-0286-z> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

70. Lampropoulou, V. Itaconate links inhibition of succinate dehydrogenase with macrophage metabolic remodeling and regulation of inflammation / V. Lampropoulou, A. Sergushichev, M. Bambouskova [et al.] // *Cell Metabolism*. - 2016. - Vol. 24, № 1. - P. 158-166. - DOI: 10.1016/j.cmet.2016.06.004. - URL: [https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131\(16\)30341-4](https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131(16)30341-4) (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

71. Linhares, I. M. Contemporary perspectives on vaginal pH and lactobacilli [Text] / I. M. Linhares, P. R. Summers, B. Larsen // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. - 2022. - Vol. 226, № 5. - P. 647-659. - DOI: 10.1016/j.ajog.2021.12.268. - URL: [https://www.ajog.org/article/S0002-9378\(21\)01296-7/fulltext](https://www.ajog.org/article/S0002-9378(21)01296-7/fulltext) (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

72. Liu, L. Quantitative Estimation of Oxidative Stress in Cancer Tissue Cells Through Gene Expression Data Analyses / L. Liu, H. Cui, Y. Xu // *Frontiers in Genetics*. - 2020. - Vol. 11. - Art. 494. - DOI: 10.3389/fgene.2020.00494. - URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2020.00494/full> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

73. López-Fillo, M. Altered vaginal microbiota composition correlates with human papillomavirus and mucosal immune responses in women with symptomatic cervical ectopy / M. López-Fillo, L. Cortés, A. Rodríguez-Cerdeira [et al.] // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. - 2022. - Vol. 12. - Art. 884272. - DOI: 10.3389/fcimb.2022.884272. -

URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.884272/full> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

74. Ma, B. Vaginal microbiome: Rethinking health and disease / B. Ma, L. J. Forney, J. Ravel // *Annual Review of Microbiology*. - 2012. - Vol. 66. - P. 371-389. - DOI: 10.1146/annurev-micro-092611-150157. - URL: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-092611-150157> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

75. Maarsingh, J. D. ImMunometabolic and potential tumor-promoting changes in 3D cervical cell models infected with bacterial vaginosis-associated bacteria / J. D. Maarsingh, P. Łaniewski, M. M. Herbst-Kralovetz // *Communications Biology*. - 2022. - Vol. 5, № 1. - Art. 725. - DOI: 10.1038/s42003-022-03684-3. - URL: <https://www.nature.com/articles/s42003-022-03684-3> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

76. Macklaim, J.M. At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of *Lactobacillus iners* AB-1 / J.M. Macklaim, G.B. Gloor, K.C. Anukam [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2011. - Vol. 108, Suppl. 1. - P. 4688-4695. - DOI: 10.1073/pnas.1000086108. - URL: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1000086108> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

77. Mahon, C. R. Textbook of Diagnostic Microbiology / C. R. Mahon, D. C. Lehman. - 6th ed. - St. Louis : Elsevier Health Sciences, 2018. - 352 p. - ISBN 978-0-323-48212-7. - URL: <https://www.sciencedirect.com/book/9780323482127/textbook-of-diagnostic-microbiology> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

78. Mastromarino, P. Bacterial vaginosis: a review on clinical trials with probiotics / P. Mastromarino, B. Vitali, S. Mosca // *New Microbiologica*. - 2013. - Vol. 36, № 3. - P. 229-238. - URL: https://www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati_pdf/2013/3/229.pdf (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

79. Martin, D. H. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease / D. H. Martin // American Journal of Medical Sciences. - 2012. - Vol. 343, № 1. - P. 2-9. - DOI: 10.1097/MAJ.0b013e31823ea228. - URL: [https://www.amjmedsci.org/article/S0002-9629\(15\)30003-7/fulltext](https://www.amjmedsci.org/article/S0002-9629(15)30003-7/fulltext) (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

80. Mirmonsef, P. Estrogen-dependent regulation of vaginal glycogen and its impact on the vaginal microbiota [Text] / P. Mirmonsef, D. N. Frank, C. Spear // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. - 2022. - Vol. 12. - Art. 789295. - DOI: 10.3389/fcimb.2022.789295. - URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.789295/full> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

81. Mitra, A. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity / A. Mitra, D. A. MacIntyre, Y. S. Lee [et al.] // Scientific Reports. - 2015. - Vol. 5. - Art. 16865. - DOI: 10.1038/srep16865. - URL: <https://www.nature.com/articles/srep16865> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

82. Mitra, A. The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next? / A. Mitra, D. A. MacIntyre, J. R. Marchesi [et al.] // Microbiome. - 2016. - Vol. 4, № 1. - Art. 58. - DOI: 10.1186/s40168-016-0203-0. - URL: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-016-0203-0> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

83. Mitra, S. Brain modulation by the gut microbiota: From disease to therapy / S. Mitra, A. K. P. R. Anbarasu, S. S. Ray [et al.] // Journal of Advanced Research. - 2023. - Vol. 53. - P. 153-173. - DOI: 10.1016/j.jare.2022.12.012. - URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123222001932> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

84. Moody, C. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation / C. A. Moody, L. A. Laimins // Nature Reviews Cancer. - 2010. - Vol.

10, № 8. - P. 550-560. - DOI: 10.1038/nrc2886. - URL: <https://www.nature.com/articles/nrc2886> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

85. Mossad, O. Gut microbiota drives age-related oxidative stress and mitochondrial damage in microglia via the metabolite N6-carboxymethyllysine / O. Mossad, B. Batut, M. Yilmaz [et al.] // *Nature Neuroscience*. - 2022. - Vol. 25, № 3. - P. 295-305. - DOI: 10.1038/s41593-022-01027-3. - URL: <https://www.nature.com/articles/s41593-022-01027-3> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

86. Münger, K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis / K. Münger, P. M. Howley // *Journal of Virology*. - 2004. - Vol. 78, № 21. - P. 11451-11460. - DOI: 10.1128/JVI.78.21.11451-11460.2004. - URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.78.21.11451-11460.2004> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

87. Muzny, C. A. Pathogenesis of Bacterial Vaginosis: Discussion of Current Hypotheses / C. A. Muzny, J. R. Schwebke // *Journal of Infectious Diseases*. - 2016. - Vol. 214, Suppl. 1. - P. S1-S5. - DOI: 10.1093/infdis/jiw121. - URL: https://academic.oup.com/jid/article/214/suppl_1/S1/2469333 (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

88. Norenhag, J. The vaginal microbiota, human papillomavirus and cervical dysplasia: a systematic review and network meta-analysis / J. Norenhag, J. Du, M. Olovsson [et al.] // *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. - 2020. - Vol. 127, № 2. - P. 171-180. - DOI: 10.1111/1471-0528.15854. - URL: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1471-0528.15854> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

89. O'Hanlon, D. E. Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota / D. E. O'Hanlon, T. R. Moench, R. A. Cone // *PLoS One*. - 2013. - Vol. 8, № 11. - Art. e80074. - DOI: 10.1371/journal.pone.0080074. -

URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0080074> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

90. Oh, H. Y. The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in Korea / H. Y. Oh, D. Kim, I. Seo [et al.] // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2015. - Vol. 21, № 7. - P. 674.e1-674.e9. - DOI: 10.1016/j.cmi.2015.02.026. -

URL: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(15\)00156-7/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(15)00156-7/fulltext) (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

91. O'Neill, L. A. A guide to imMunometabolism for imMunologists / L. A. O'Neill, R. J. Kishton, J. Rathmell // *Nature Reviews ImMunology*. - 2016. - Vol. 16, № 9. - P. 553-565. - DOI: 10.1038/nri.2016.70. - URL: <https://www.nature.com/articles/nri.2016.70> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

92. Ou, Y. C. The influence of probiotics on genital high-risk human papilloma virus clearance and quality of cervical smear: a randomized placebo-controlled trial / Y. C. Ou, H. C. Fu, C. W. Tseng [et al.] // *BMC Women's Health*. - 2019. - Vol. 19. - Art. 103. - DOI: 10.1186/s12905-019-0798-y. - URL: <https://bmcmwomenshealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12905-019-0798-y> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

93. Palma, E. Long-term *Lactobacillus rhamnosus* BMX 54 application to restore a balanced vaginal ecosystem: a promising solution against HPV-infection / E. Palma, N. Recine, L. Domenici [et al.] // *BMC Infectious Diseases*. - 2018. - Vol. 18, № 1. - Art. 13. - DOI: 10.1186/s12879-017-2938-z. - URL: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2938-z> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

94. Pedrosa, A. M. Effects of hydroxyurea on cytotoxicity, inflamMation and oxidative stress markers in neutrophils of patients with sickle cell anemia: dose-effect relationship / A. M. Pedrosa [et al.] // *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*. - 2021. - Vol. 43, No. 4. - P. 468-475. - DOI: 10.1016/j.htct.2020.07.011. - Текст:

электронный. - URL: <https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.07.011> (дата обращения: 18.07.2024).

95. Petrova, M.I. *Lactobacillus iners*: Friend or Foe? / M.I. Petrova, G. Reid, M. Vaneechoutte, S. Lebeer // *Trends in Microbiology*. - 2017. - Vol. 25, № 3. - P. 182-191. - DOI: 10.1016/j.tim.2016.11.007. - URL: [https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(16\)30146-2](https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(16)30146-2) (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

96. Petrova, M. I. *Lactobacillus* species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health / M. I. Petrova, E. Lievens, S. Malik [et al.] // *Frontiers in Physiology*. - 2015. - Vol. 6. - Art. 81. - DOI: 10.3389/fphys.2015.00081. - URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2015.00081/full> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

97. Pizzino, G. Oxidative stress: harms and benefits for human health / G. Pizzino, N. Irrera, M. Cucinotta [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. - 2017. - Vol. 2017. - Art. 8416763. - DOI: 10.1155/2017/8416763. - URL: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/8416763/> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

98. Popoola, T. D. Potent Nrf2-inducing, antioxidant, and anti-inflammatory effects and identification of constituents validate the anti-cancer use of *Uvaria chamae* and *Olex subscorpioidea* / T. D. Popoola, S. T. Guetchueng, K. J. Ritchie [et al.] // *BMC Complementary Medicine and Therapies*. - 2021. - Vol. 21. - Art. 234. - DOI: 10.1186/s12906-021-03404-0. - URL: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-021-03404-0> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

99. Preci, D. P. Oxidative damage and antioxidants in cervical cancer / D. P. Preci, M. L. Núñez, C. L. Céspedes [et al.] // *International Journal of Gynecological Cancer*. - 2021. - Vol. 31, № 2. - P. 265-271. - DOI: 10.1136/ijgc-2020-001585. - URL: <https://ijgc.bmj.com/content/31/2/265> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

100. Rampersaud, R. Inerolysin, a cholesterol-dependent cytolysin produced by *Lactobacillus iners* / R. Rampersaud, P. J. Planet, T. M. Randis [et al.] // *Journal of Bacteriology*. - 2011. - Vol. 193, № 5. - P. 1034-1041. - DOI: 10.1128/JB.01343-10. - URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.01343-10> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

101. Ravel, J. Vaginal microbiome of reproductive-age women / J. Ravel, P. Gajer, Z. Abdo [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2011. - Vol. 108, Suppl. 1. - P. 4680-4687. - DOI: 10.1073/pnas.1002611107. - URL: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1002611107> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

102. Riaz, A. H. Human platelets efficiently kill IgG-opsonized *E. coli* / A. H. Riaz [et al.] // *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. - 2012. - Vol. 65, No. 1. - P. 78-83. - DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.00945.x. - Текст: электронный. - URL: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00945.x> (дата обращения: 18.07.2024).

103. Riffelmacher, T. Autophagy dictates metabolism and differentiation of inflammatory immune cells / T. Riffelmacher, F. C. Richter, A. K. Simon // *Autophagy*. - 2018. - Vol. 14, № 2. - P. 199-206. - DOI: 10.1080/15548627.2017.1362525. - URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15548627.2017.1362525> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

104. Ritu, W. Evaluation of the associations between cervical microbiota and HPV infection, clearance, and persistence in cytologically normal women / W. Ritu, A. R. Pavlova, M. M. Herbst-Kralovetz [et al.] // *Cancer Prevention Research*. - 2019. - Vol. 12, № 1. - P. 43-56. - DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-18-0233. - URL: <https://aacrjournals.org/cancerpreventionresearch/article/12/1/43/71241/Evaluation-of-the-Associations-Between-Cervical> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

105. Rubey, K. M. Nanoparticle-induced augmentation of neutrophils' phagocytosis of bacteria / K. M. Rubey [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. - 2022. -

Vol. 13. - Art. 923814. - DOI: 10.3389/fphar.2022.923814. - Текст: электронный. - URL: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.923814> (дата обращения: 18.07.2024).

106. Saitoh, T. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1 / T. Saitoh, J. Komano, Y. Saitoh [et al.] // *Cell Host & Microbe*. - 2012. - Vol. 12, № 1. - P. 109-116. - DOI: 10.1016/j.chom.2012.05.015. - URL: [https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128\(12\)00216-8](https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128(12)00216-8) (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

107. Sgibnev, A. Lactobacilli Have an Opposite Effect on the Resistance to Oxidative Damage of HPV-Infected Compared with Uninfected Vaginal Epithelial Cells / A. Sgibnev, E. Kremleva // *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. - 2024. - DOI: 10.1007/s12602-024-10241-3. - URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-024-10241-3> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

108. Sgibnev, A. V. Vaginal protection by H₂O₂-producing lactobacilli / A. V. Sgibnev, E. A. Kremleva // *Jundishapur Journal of Microbiology*. - 2015. - Vol. 8, № 10. - P. e22913. - DOI: 10.5812/jjm.22913. - Текст: электронный. - URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4644264> (дата обращения: 18.03.2023).

109. Santella, B. Microbiota and HPV: The role of viral infection on vaginal microbiota / B. Santella, M. G. Schettino, V. Franci [et al.] // *Journal of Medical Virology*. - 2022. - Vol. 94, № 9. - P. 4478-4484. - DOI: 10.1002/jmv.27852. - URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.27852> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

110. Shaul, M. E. Tumor-associated neutrophils stimulate tumor metastasis via NETosis-mediated activation of cancer cell motility [Text] / M. E. Shaul, Z. G. Fridlender // *Cancer Research*. - 2023. - Vol. 83, № 5. - P. 759-772. - DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-22-1912. - URL: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/83/5/759/719442/Tumor-Associated-Neutrophils-Stimulate-Tumor> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

111. Sims, T. T. Tumor microbial diversity and compositional differences among women in Botswana with high-grade cervical dysplasia and cervical cancer / T.

T. Sims, J. Colbert, J. M. Ravel [et al.] // International Journal of Gynecological Cancer. - 2020. - Vol. 30, № 8. - P. 1151-1156. - DOI: 10.1136/ijgc-2020-001312. - URL: <https://ijgc.bmj.com/content/30/8/1151> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

112. Smith, S. B. Polyamine-induced mitochondrial uncoupling mediates inflammatory responses / S. B. Smith, M. A. Kennedy, D. E. Gerner [et al.] // Nature Communications. - 2020. - Vol. 11, № 1. - Art. 5225. - DOI: 10.1038/s41467-020-18998-1. - URL: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-18998-1> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

113. Srinivasan, S. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria / S. Srinivasan, N. G. Hoffman, M. T. Morgan [et al.] // PLoS One. - 2012. - Vol. 7, № 6. - Art. e37818. - DOI: 10.1371/journal.pone.0037818. - URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0037818> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

114. Standard Operating Procedures for Freezing and Recovery of Cell Lines / Ed. by W. Lee, H. Zhang // International Journal of Cryobiology. - 2020. - Vol. 56. - P. 112-125. - DOI: 10.1016/j.cryobiol.2020.05.003. - Текст: электронный. - URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0011224020300653> (дата обращения: 15.07.2024).

115. Tachedjian, G. The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health / G. Tachedjian, M. Aldunate, C. S. Bradshaw, R. A. Cone // Research in Microbiology. - 2017. - Vol. 168, № 9-10. - P. 782-792. - DOI: 10.1016/j.resmic.2017.04.001. - URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092325081730033X> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

116. Tecchio, C. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression / C. Tecchio, A. Micheletti, M. A. Cassatella // Frontiers in Immunology. - 2014. - Vol. 5. - Art. 508. - DOI: 10.3389/fimmu.2014.00508. -

URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimMu.2014.00508/full> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

117. Tiku, V. Host immunity and cellular responses to bacterial outer membrane vesicles [Text] / V. Tiku, M. Y. Tan, A. Y. Dikic // Trends in Immunology. - 2021. - Vol. 42, № 11. - P. 1024-1036. - DOI: 10.1016/j.it.2021.09.006. - URL: [https://www.cell.com/trends/immunology/fulltext/S1471-4906\(21\)00176-3](https://www.cell.com/trends/immunology/fulltext/S1471-4906(21)00176-3) (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

118. Tonelli, C. Transcriptional Regulation by Nrf2 / C. Tonelli, I. I. C. Chio, D. A. Tuveson // Antioxidants & Redox Signaling. - 2018. - Vol. 29, № 17. - P. 1727-1745. - DOI: 10.1089/ars.2017.7342. - URL: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2017.7342> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

119. Trachootham, D. Redox regulation of cell survival / D. Trachootham, Y. Zhou, H. Zhang [et al.] // Antioxidants & Redox Signaling. - 2008. - Vol. 10, № 8. - P. 1343-1374. - DOI: 10.1089/ars.2007.1957. - URL: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2007.1957> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

120. Troyano, A. The selection between apoptosis and necrosis is differentially regulated in hydrogen peroxide-treated and glutathione-depleted human promonocytic cells / A. Troyano, C. Sancho, E. Fernández // Cell Death & Differentiation. - 2003. - Vol. 10, № 8. - P. 889-898. - DOI: 10.1038/sj.cdd.4401249. - URL: <https://www.nature.com/articles/4401249> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

121. Usyk, M. Cervicovaginal microbiome and natural history of HPV in a longitudinal study / M. Usyk, C. P. Zolnik, H. A. Castillo [et al.] // PLoS Pathogens. - 2020. - Vol. 16, № 3. - Art. e1008376. - DOI: 10.1371/journal.ppat.1008376. - URL: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1008376> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

122. Valenti, P. Role of lactobacilli and lactoferrin in the mucosal cervicovaginal defense / P. Valenti, R. Rosa, A. Capobianco [et al.] // *Frontiers in Immunology*. - 2018. - Vol. 9. - Art. 376. - DOI: 10.3389/fimmu.2018.00376. - URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00376/full> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

123. Van de Wijgert, J. H. H. M. The global health impact of vaginal dysbiosis / J. H. H. M. Van de Wijgert, V. Jespers // *Research in Microbiology*. - 2017. - Vol. 168, № 9-10. - P. 859-864. - DOI: 10.1016/j.resmic.2017.02.003. - URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0923250817300286> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

124. van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., Cloos, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay // *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* / Ed. by I. Cree. – 2nd ed. – New York: Humana Press, 2011. – (Methods in Molecular Biology; Vol. 731). – P. 237–245. – DOI: 10.1007/978-1-61779-080-5_20. – ISBN 978-1-61779-079-9. – Текст: электронный. – URL: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-080-5_20 (дата обращения: 18.07.2024).

125. van Raam, B. J. Mitochondrial membrane potential in human neutrophils is maintained by complex III activity in the absence of supercomplex organisation / B. J. van Raam, W. Sluiter, E. de Wit [et al.] // *PLoS One*. - 2008. - Vol. 3, № 4. - Art. e2013. - DOI: 10.1371/journal.pone.0002013. - URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0002013> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

126. Von Nicolai, H. A newly discovered sialidase from *Gardnerella vaginalis* / H. Von Nicolai, F. Zilliken, G. W. Wutzler [et al.] // *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*. - 1984. - Vol. 258, № 1. - P. 20-26. - DOI: 10.1016/S0174-3031(84)80005-2. - URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0174303184800052> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

127. Vyshenska, D. Interplay between viruses and bacterial microbiota in cancer development / D. Vyshenska, S. Lampe, M. Watson [et al.] // *Seminars in Immunology*. - 2017. - Vol. 32. - P. 14-24. - DOI: 10.1016/j.smim.2017.04.001. - URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1044532317300356> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

128. White, B. A. The vaginal microbiome in health and disease / B. A. White, D. J. Creedon, K. E. Nelson, B. A. Wilson // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. - 2011. - Vol. 22, № 10. - P. 389-393. - DOI: 10.1016/j.tem.2011.06.007. - URL: [https://www.cell.com/trends/endocrinology-metabolism/fulltext/S1043-2760\(11\)00097-0](https://www.cell.com/trends/endocrinology-metabolism/fulltext/S1043-2760(11)00097-0) (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

129. Williams, V. M. Human papillomavirus type 16 E6* induces oxidative stress and DNA damage / V. M. Williams, T. S. Filippova, V. Filippov [et al.] // *Journal of Virology*. - 2015. - Vol. 89, № 5. - P. 2489-2501. - DOI: 10.1128/JVI.02590-14. - URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.02590-14> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

130. Witkin, S. S. Influence of vaginal bacteria and D-and L-lactic acid isomers on vaginal extracellular matrix metalloproteinase inducer: implications for protection against upper genital tract infections / S. S. Witkin, I. M. Linhares, W. J. Ledger // *mBio*. - 2013. - Vol. 4, № 4. - Art. e00460-13. - DOI: 10.1128/mBio.00460-13. - URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.00460-13> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

131. Wongworawat, Y. C. Chronic oxidative stress increases the integration frequency of foreign DNA and human papillomavirus 16 in human keratinocytes / Y. C. Wongworawat, M. Filippova, P. J. Duerksen-Hughes // *American Journal of Cancer Research*. - 2016. - Vol. 6, № 4. - P. 764-780. - URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4859584/> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

132. Wu, S. The feature of cervical microbiota associated with the progression of cervical cancer among reproductive females / S. Wu, X. Ding, Y. Dong [et al.] //

Gynecologic Oncology. - 2021. - Vol. 163, № 2. - P. 348-357. - DOI: 10.1016/j.ygyno.2021.08.016. -

URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0090825821006655> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

133. Xu, X. HPV-related cervical diseases: Alteration of vaginal microbiotas and promising potential for diagnosis / X. Xu, H. Zhang, Q. Zhou [et al.] // Journal of Medical Virology. - 2023. - Vol. 95, № 1. - Art. e28351. - DOI: 10.1002/jmv.28351. - URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.28351> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

134. Yeo-Teh, N. S. L. High-risk human papillomaviral oncogenes E6 and E7 target key cellular pathways to achieve oncogenesis / N. S. L. Yeo-Teh, Y. Ito, S. Jha // International Journal of Molecular Sciences. - 2018. - Vol. 19, № 6. - Art. 1706. - DOI: 10.3390/ijms19061706. - URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/6/1706> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

135. Zelante, T. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22 [Text] / T. Zelante, R. G. Iannitti, C. Cunha [et al.] // ImMunity. - 2013. - Vol. 39, № 2. - P. 372-385. - DOI: 10.1016/j.imMuni.2013.08.003. - URL: [https://www.cell.com/imMunity/fulltext/S1074-7613\(13\)00349-6](https://www.cell.com/imMunity/fulltext/S1074-7613(13)00349-6) (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

136. Zhang, X. Mitochondrial dysfunction induced by biogenic amines: mechanisms and potential therapeutic targets / X. Zhang, Y. Li, P. Wang [et al.] // Frontiers in Cell and Developmental Biology. - 2021. - Vol. 9. - Art. 654785. - DOI: 10.3389/fcell.2021.654785. - URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.654785/full> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

137. Zhang, X. Neutrophils in cancer development and progression: roles, mechanisms, and implications / X. Zhang, Q. Shi, H. Wang [et al.] // International Journal of Oncology. - 2016. - Vol. 49, № 3. - P. 857-867. - DOI:

10.3892/ijo.2016.3616. - URL: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2016.3616> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

138. Zheng, Z. M. Viral oncogenes, noncoding RNAs, and RNA splicing in human tumor viruses / Z. M. Zheng // International Journal of Biological Sciences. - 2016. - Vol. 12, № 6. - P. 710-727. - DOI: 10.7150/ijbs.13450. - URL: <https://www.ijbs.com/v12p0710.htm> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

139. Zhu, S. The progress of gut microbiome research related to brain disorders / S. Zhu, Y. Jiang, K. Xu [et al.] // Journal of Neuroinflammation. - 2020. - Vol. 17, № 1. - Art. 25. - DOI: 10.1186/s12974-020-1705-z. - URL: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-020-1705-z> (дата обращения: 18.07.2024). - Текст : электронный.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Мячина Ю.Л., Сгибнев А.В., Черкасова Ю.И. Влияние метаболитов вагинальных лактобацилл на функционирование нейтрофилов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2024. – Т. 178. – № 12. – 730-735с. [Web of Science Q4, Scopus Q3]
2. Myachina, Y., Sgibnev A. The Effect of Cell-Free Metabolites of Vaginal Lactobacilli on HeLa Cells Is Independent of Lactic Acid Concentration // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – V. 26, №. 24. – P. 11929. [Web of Science Q1, Scopus Q1, РИНЦ]
3. Патент № 2856925 Российская Федерация, МПК C12Q 1/02, C12N 1/20, C12R 1/225. Способ отбора лактобацилл для создания пробиотиков, способных снижать количество жизнеспособных клеток карциномы шейки матки : № 2025103399/10 (008990) : заявл. 17.02.2025 : дата гос. регистрации 25.02.2026 / Мячина Ю.Л., Сгибнев А.В. ; заявитель и патентообладатель ОФИЦ УрО РАН. – Москва : Роспатент, 2026. – 6 с. : ил. – Текст : непосредственный.
4. Мячина Ю.Л., Сгибнев А.В. Влияние численности лактобацилл и их способности продуцировать пероксид водорода на метаболизм вагинальных эпителиоцитов // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. – 2026. – № 1. – 9 с. [РИНЦ, БС 4 уровень]