

МЯЧИНА ЮЛИЯ ЛЕОНИДОВНА

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

1.5.11. Микробиология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (ОФИЦ УрО РАН), в обособленном структурном подразделении Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (ИКВС УрО РАН)

Научный руководитель:

Сгибнев Андрей Викторович – доктор биологических наук, доцент (03.02.03 - Микробиология).

Официальные оппоненты:

Ворошилина Екатерина Сергеевна - доктор медицинских наук (03.02.03. – Микробиология), профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Николенко Марина Викторовна - доктор биологических наук (03.02.03. – Микробиология), доцент, заведующий лабораторией микробиома, регенеративной медицины и клеточных технологий ФГБОУ ВО Тюменский ГМУ Минздрава России.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

Защита диссертации состоится «__» _____ в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.445.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук по адресу 460026, г. Оренбург, ул. Пионерская, д. 11

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИКВС УрО РАН – обособленном структурном подразделении ОИЦ УрО РАН (г. Оренбург, ул. Пионерская, д. 11, каб. 311) и на сайте ОФИЦ УрО РАН <https://orennc.ru/> (в разделе «Диссовет»)

Автореферат разослан: «__» _____ 20__ году

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук,
доцент

Перунова Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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, продуцирующие молочную кислоту, бактериоцины, сурфактанты, антимикробные пептиды, пероксид водорода, обладают антимикробной активностью и играют важную роль в защите влагалища от патогенов (Valenti et al., 2018). Вагинальная экосистема включает различные типы клеток хозяина, такие как эпителиоциты (как нормальные, так и инфицированные вирусом папилломы человека (ВПЧ) или трансформированные при карциноме), нейтрофилы и другие иммунокомпетентные клетки.

Клетки хозяина также подвержены влиянию комменсальной микробиоты. Так, например, вагинальные лактобациллы могут повышать выживаемость клеток вагинального эпителия в условиях окислительного стресса (Кремлева и др., 2019) или стимулировать выработку эпителиоцитами антимикробных субстанций (Mastromarino, 2013; Witkin et al., 2013). 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 *Atopobium vaginae* и *Gardnerella vaginalis*, можно наблюдать значительное количество слущенных, незрелых эпителиоцитов, с низким содержанием гликогена (Кира, 2012). 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 (Андреева и др., 2020; Lampropoulou et al., 2016).

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 (Beloborodova, 2019). 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 исследования – 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 работы

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 работы

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.).

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

Достоверность результатов, полученных в ходе исследования, подтверждается набором экспериментов, выполненных в трех повторностях и в трехкратном воспроизведении. 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.

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).

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии во 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.

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).

Связь работы с научными программами

Диссертационное исследование выполнено в рамках темы НИР ОФИЦ УрО РАН «Исследование симбиотических систем про- и эукариот в биологии и медицине» (2022–2026 г., FUUG-2022–0007, № гос. регистрации 122020100106–5).

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.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю д.б.н. А.В. Сгибневу за неоценимую помощь в проведении исследований на всех этапах работы, ценные советы и рекомендации. Автор выражает искреннюю благодарность к.м.н. Ю.И. Черкасовой, д.м.н. Е.А. Кремлевой, к.м.н. Ю.С. Щетининой за помощь в организации и реализации отдельных этапов исследования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследовании были использованы 130 штаммов *Lactobacillus* spp., 10 штаммов *Gardnerella vaginalis*, 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 ВПЧ-положительных женщин. Штамм *Escherichia coli* К 12– музейный штамм коллекции культур ИКВС УрО РАН.

Выделение и идентификацию микроорганизмов производили общепринятыми методами на основании морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств (Берджи, 1997).

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

Для определения содержания молочной кислоты в полученных внеклеточных метаболитах проводили титрование стандарт-титром 0,1н. карбонатом натрия (Уралхиминвест), количество молочной кислоты выражали в мМ (Feng, S., 2020).

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

Для оценки способности бактерий продуцировать H_2O_2 использовали фотометрический метод (Sgibnev A.V., 2015).

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. Отмытые 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 (Гаврилова Е. Д., 2023).

В работе были использованы линии клеток карциномы шейки матки 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 % CO_2 при 37 °C (Freshney, R. I., 2016).

Первичную культуру многослойного плоского эпителия влагалища получали путем соскоба клеток с влагалищной части шейки матки после удаления отслоившихся клеток стерильным физиологическим раствором. Культуры

транспортировали в термостатируемых контейнерах в 1 мл сбалансированного солевого раствора Хэнкса. Для снижения количества бактерий и удаления разрушенных клеток образцы промывали один раз десятикратным объемом забуференного физиологического раствора с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 200 g. Количество эпителиальных клеток нормировали до 10^6 на миллилитр с помощью гемоцитометра (Sgibnev A.V., 2015).

Для оценки метаболической активности клеток первичных эпителиоцитов использовали МТТ-тест (van Meerloo, J., 2011).

Для оценки влияния микробных метаболитов на устойчивость эпителиальных клеток к окислительному стрессу эпителиальные клетки подвергали окислительному стрессу, затем клетки окрашивали согласно инструкции к набору для определения апоптотических клеток с помощью Аннексин V-AF488 с дальнейшей люминесцентной микроскопией. Параллельно для определения доли выживших клетки окрашивали 0,4 %-ным раствором трипанового синего в соотношении 1:1 с последующей световой микроскопией.

Для оценки влияния биогенных аминов и метаболитов *Lactobacillus spp.* и их отдельных компонентов (лактата и пероксида водорода) на изменение активности 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 оценки метаболической активности клеток HeLa использовали МТТ-тест (van Meerloo, J., 2011). 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 оценки влияния микробных метаболитов на устойчивость клеток HeLa к действию окислительного стресса обработанные клетки подвергали окислительному стрессу, затем клетки окрашивали согласно инструкции к набору для определения апоптотических клеток с помощью Аннексин V-AF488 с дальнейшей люминесцентной микроскопией. Параллельно для определения доли выживших клетки окрашивали 0,4 %-ным раствором трипанового синего в соотношении 1:1 с последующей световой микроскопией.

Для оценки влияния биогенных аминов и метаболитов *Lactobacillus spp.* и их отдельных компонентов (лактата и пероксида водорода) на активность 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 (van Meerloo, J., 2011). Для определения изменения митохондриального потенциала нейтрофилов проводили окраску катионным красителем LumiTrackerMito Red CMXRos.

Для измерения киллинговой активности нейтрофилов в отношении *E. coli* к взвеси обработанных путресцином или пероксидом водорода или молочной кислотой или внеклеточными метаболитами нейтрофилов добавляли опсонизированную культуру *E. coli* (Saitoh, T., 2012), 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.

Результаты исследований

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, соответствующих критериям включения (здоровые женщины с нормоценозом или с дефицитом лактобацилл).

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 (H_2O_2^+) лактобациллы. С другой стороны, хотя при низких значениях численности лактобацилл наблюдались более высокие значения дегидрогеназной активности, при наличии пероксидпродуцирующих лактобацилл показатель метаболической активности эпителиоцитов был ниже, чем в присутствии пероксиднепродуцирующих (H_2O_2^-).

В то же время следует отметить, что дегидрогеназная активность эпителиоцитов, полученных от женщин с субнормальным количеством H_2O_2^+ лактобацилл ($<10^5$ КОЕ/мл), практически не отличалась от таковой у эпителиоцитов, полученных от женщин с нормальным уровнем ($>10^5$ КОЕ/мл) H_2O_2^- лактобацилл (рис.1).

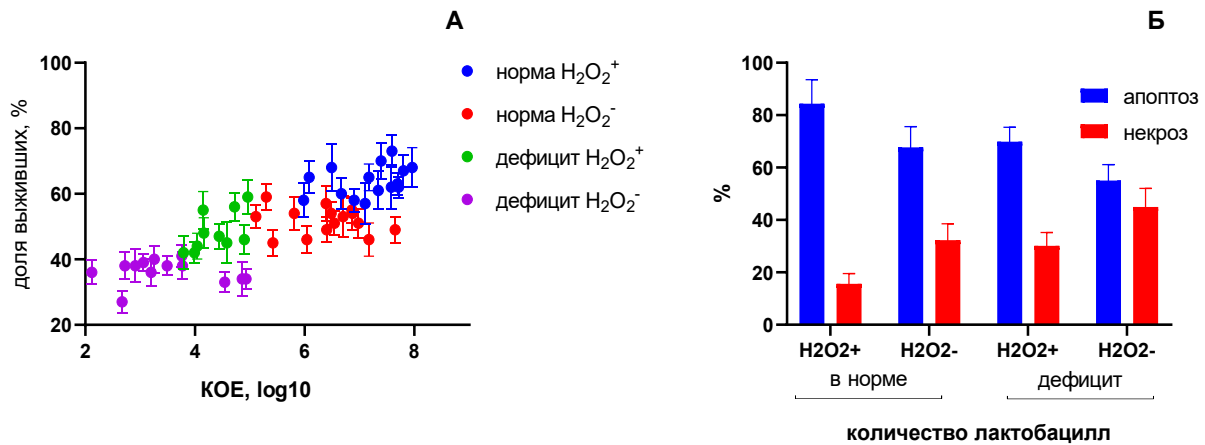


Рисунок 1 – Изменение устойчивости к окислительному стрессу (А) и распределение типов клеточной гибели (Б) первичных эпителиоцитов в зависимости от численности лактобацилл и их способности продуцировать пероксид водорода.

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 $H_2O_2^-$ лактобацилл мы наблюдали наименьшую (~40 %) выживаемость первичных эпителиоцитов, подвергнутых окислительному стрессу; при этом при субнормальном уровне $H_2O_2^+$ лактобацилл выживаемость первичных эпителиоцитов была примерно в полтора раза выше. Подобная закономерность была получена и для лактобацилл, содержание которых в вагинальном биотопе было в норме: наличие $H_2O_2^+$ лактобацилл в большей степени способствовало выживаемости первичных эпителиоцитов, подвергнутых окислительному стрессу, по сравнению с $H_2O_2^-$ лактобациллами (соответственно, 70 % и 55 % выживших, рис. 1а). Одновременно с этим следует отметить, что во всех случаях доля первичных эпителиоцитов, погибших в результате окислительного стресса апоптотическим путем, в присутствии $H_2O_2^+$ лактобацилл была значительно выше по сравнению с $H_2O_2^-$ (рис. 1б).

Влияние типа микроокружения на метаболическую активность и устойчивость к окислительному стрессу первичных эпителиоцитов, полученных от ВПЧ-положительных женщин. 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.

Нами установлено, что хотя эффект лактобацилл на метаболическую активность вагинальных эпителиоцитов, полученных от ВПЧ-положительных женщин, был более выраженной, чем эффект на эпителиоциты от здоровых женщин, он так же зависит и от количества лактобацилл и от их способности продуцировать пероксид водорода. Так же, как и в случае с эпителиоцитами полученными от здоровых женщин, при высокой численности лактобацилл мы наблюдали самые низкие значения дегидрогеназной активности эпителиоцитов, и наименьшее ее значение было в присутствии $H_2O_2^+$ лактобацилл. Одновременно с этим мы наблюдали высокие значения дегидрогеназной активности эпителиоцитов при низких значениях численности лактобацилл, при этом в присутствии $H_2O_2^+$ лактобацилл метаболическая активность эпителиоцитов была ниже.

Установлено, что, как и в случае с эпителиоцитами от здоровых женщин, уровень лактобацилл во влагалище и их способность продуцировать пероксид водорода, определяли устойчивость к окислительному стрессу и тип клеточной гибели первичных эпителиоцитов, полученных от ВПЧ-положительных женщин, однако эти эффекты были противоположны. Так, при субнормальном уровне $H_2O_2^+$ - лактобацилл мы наблюдали наибольшую (~80 %) выживаемость эпителиоцитов, подвергнутых окислительному стрессу; при этом при субнормальном уровне $H_2O_2^+$ лактобацилл выживаемость первичных эпителиоцитов была существенно ниже (рис. 2а).

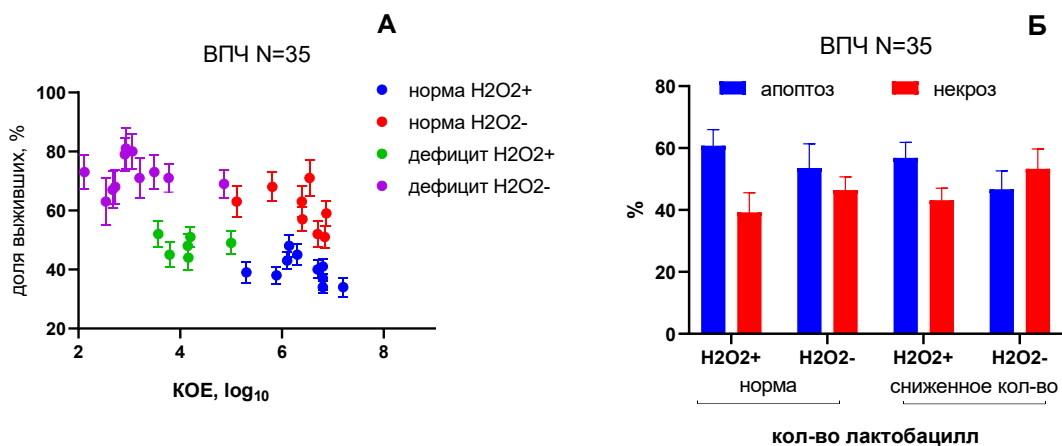


Рисунок 2 – Изменение устойчивости к окислительному стрессу (А) и распределение типов клеточной гибели (Б) первичных эпителиоцитов, полученных от ВПЧ-положительных женщин, в зависимости от численности лактобацилл и их способности продуцировать пероксид водорода.

Подобная закономерность была получена и для лактобацилл, содержание которых в вагинальном биотопе было в норме: наличие H_2O_2^+ лактобацилл в большей степени способствовало гибели первичных эпителиоцитов, подвергнутых окислительному стрессу, по сравнению с H_2O_2^- лактобациллами (соответственно, 50 и 70 % выживших, рис. 2а). Во всех случаях доля первичных эпителиоцитов, погибших в результате окислительного стресса апоптотическим путем, в присутствии H_2O_2^+ лактобацилл была выше по сравнению с H_2O_2^- , однако следует отметить, что в каждом случае значение доли апоптотически погибших клеток было близко к доле некротических.

Влияние бактериального вагиноза на метаболическую активность и устойчивость к окислительному стрессу первичных эпителиоцитов, полученных от ВПЧ-положительных и отрицательных женщин. В исследование по изучению влияния бактериального вагиноза на метаболическую и функциональную активность первичных эпителиоцитов нами были включены 14 ВПЧ-положительных и 9 ВПЧ-отрицательных женщин с БВ.

По мере увеличения численности *G. vaginalis* в вагинальном биотопе отмечалось незначительное снижение метаболической активности клеток, полученных от ВПЧ – отрицательных женщин. С другой стороны, по мере увеличения численности *G. vaginalis* вагинальном биотопе, отмечалось заметное возрастание метаболической активности у эпителиоцитов, полученных от ВПЧ-положительных женщин. 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).

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.

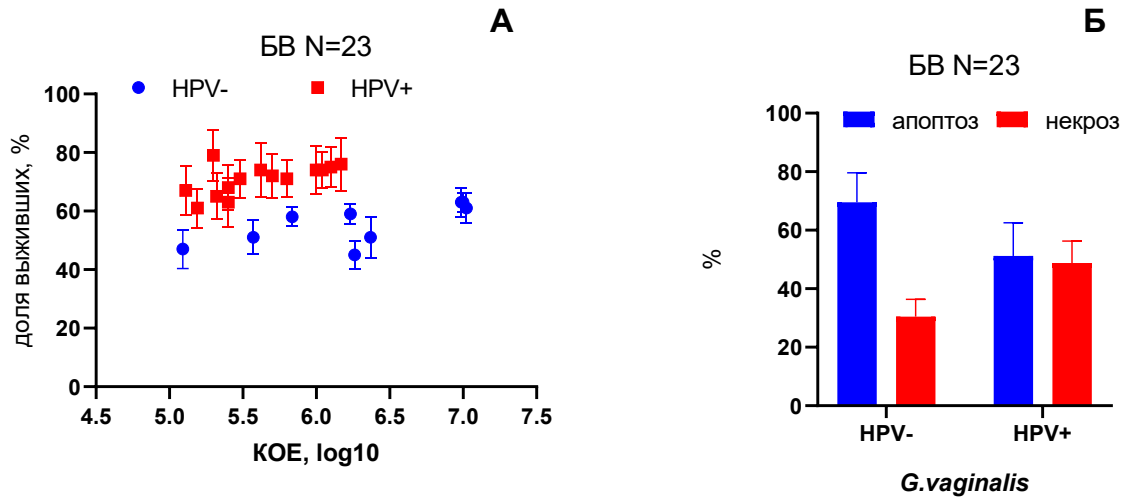


Рисунок 3 – Изменение устойчивости к окислительному стрессу (А) и распределение типов клеточной гибели (Б) первичных эпителиоцитов, полученных от ВПЧ-положительных и отрицательных женщин с БВ.

Влияние пероксида водорода на метаболическую и киллинговую активность нейтрофилов периферической крови. Обработка нейтрофилов различными концентрациями пероксида водорода, обнаруживаемыми в вагинальной среде при физиологическом количестве лактобацилл, характерном для нормоценоза и при сниженном количестве лактобацилл, характерном для БВ, показала различное влияние на их метаболическую активность. 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.

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, которые также увеличивали и дегидрогеназную активность.

Влияние молочной кислоты на метаболическую и киллинговую активность 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) (Amabebe, E., 2018; Linhares, I. M., 2022), снижалась на 6 и 25 %, соответственно.

Одновременно с этим наблюдалось значительное уменьшение доли клеток с высоким митохондриальным потенциалом среди нейтрофилов, обработанных такими же концентрациями молочной кислоты. Напротив, обработка нейтрофилов молочной кислотой в концентрации характерной для бактериального вагиноза (БВ), при сниженном или полном отсутствии лактобацилл (5,6 мМ) (O'Neill, L. A., 2016), приводила к увеличению дегидрогеназной активности, при этом количество клеток с высоким митохондриальным потенциалом практически не изменялось.

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 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 17,5 % под влиянием молочной кислоты в концентрациях 5,6 мМ соответственно, 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*.

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

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.

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*.

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.

Влияние биогенных аминов на метаболическую и киллинговую активность нейтрофилов периферической крови. 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. Изменения в метаболической активности нейтрофилов под влиянием путресцина сопровождалась 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.

Влияние пероксида водорода на метаболическую активность клеток HeLa. После обработки пероксидом водорода в концентрациях 0,59 мМ, 1,18 мМ, 2,36 мМ через 1 час инкубации дегидрогеназная активность клеток HeLa уменьшалась на 16, 45 и 43 %, соответственно. Одновременно с этим наблюдали значительное уменьшение доли клеток с высоким митохондриальным потенциалом среди клеток HeLa, обработанных такими же концентрациями пероксида водорода. После обработки пероксидом водорода в концентрациях 0,59 мМ, 1,18 мМ, 2,36 мМ через 24 часа инкубации дегидрогеназная активность клеток HeLa уменьшалась на 71, 79 и 73 %, соответственно.

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. Одновременно с этим наблюдали значительное уменьшение доли клеток с высоким митохондриальным потенциалом среди клеток HeLa, обработанных такими же концентрациями молочной кислоты.

После обработки молочной кислотой в концентрации, характерной для БВ, при сниженном или полном отсутствии лактобацилл (5,6 мМ) (Олейник, В. В., 2021), через 1 час инкубации дегидрогеназная активность клеток HeLa почти не изменялась и оставалась на уровне контроля, при этом количество клеток с высоким митохондриальным потенциалом снижалось незначительно.

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.

Влияние нативных бесклеточных метаболитов лактобацилл, стандартизованных по молочной кислоте, на метаболическую активность и устойчивость клеток HeLa к действию окислительного стресса. На следующем этапе оценивали влияние комплекса метаболитов, продуцируемых вагинальными лактобациллами, на метаболическую активность клеток HeLa. Нативные бесклеточные метаболиты были стандартизированы по молочной кислоте (концентрация соответствовала примерным концентрациям, обнаруживаемым при БВ и нормоценозе).

Обработка клеток HeLa внеклеточными метаболитами, стандартизированными 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. 4). 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. 4). 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 %.

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, 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.

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.

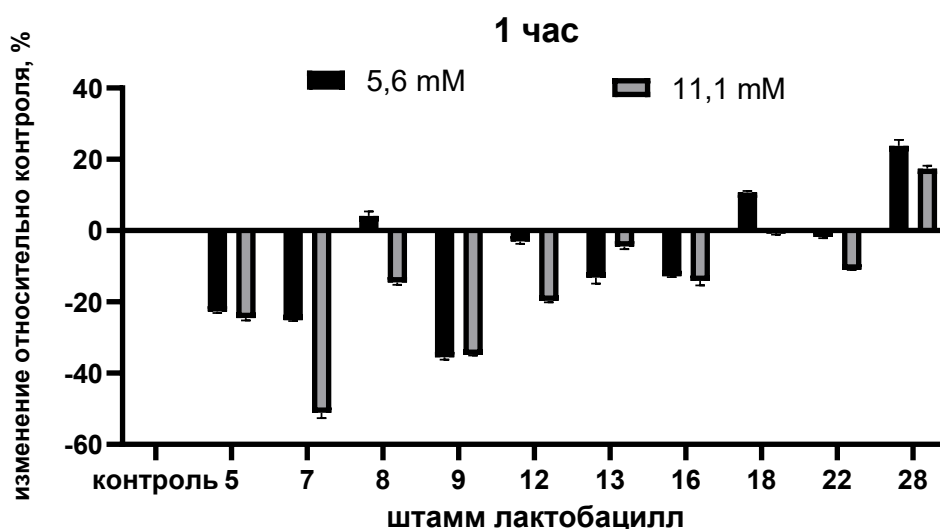


Рисунок 4 – Влияние внеклеточных метаболитов лактобацилл, стандартизированных по молочной кислоте на: А – дегидрогеназную активность через 1 час инкубации. *Различия между эффектами внеклеточных метаболитов с разной концентрацией молочной кислоты достоверны.

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.

Метаболиты разных штаммов лактобацилл оказывают различное влияние на метаболизм клеток карциномы шейки матки, что подчеркивает необходимость индивидуального подбора пробиотических штаммов для терапевтических целей.

Заключение

В результате одного из этапов нашего исследования было 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.

Также нами 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 активности клеток врожденного иммунитета и поддержании колонизационной резистентности влагалища.

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. 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.

4. 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.

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

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

7. 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 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]

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БВ – бактериальный вагиноз

ВПЧ – вирус папилломы человека

$H_2O_2^+$ - пероксидпродуцирующие лактобациллы

$H_2O_2^-$ - пероксиднепродуцирующие лактобациллы

Мячина, Ю.Л. Влияние метаболитов вагинальной микробиоты на функциональное состояние клеток: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 1.5.11. Микробиология / Мячина Юлия Леонидовна. – Оренбург, 2026. – 24 с.

Подписано в печать 18.06 2026 г. Формат бумаги 60X84/16

Бумага офсетная. 1.0 усл. печ. л. Тираж 100 экз.

Печать цифровая, Заказ № _____

Отпечатано с готового оригинала-макета в печатном салоне «АртПринт»

ИП Назаров В.Н. ИНН561208114836

460014, г. Оренбург, ул. Пушкинская, д.47

Тел: +7(903)66-99-28

e.mail: art-print56@mail.ru