

Влияние активированной глицирризиновой кислоты на липидом клеток эпителия при ВПЧ-ассоциированных поражениях шейки матки

А.О. Токарева^{✉1}, Л.К. Рамазанова¹, Э.Р. Довлетханова¹, Л.Э. Алиева², П.Л. Шешко¹, Е.Н. Кукаев^{1,3}, Н.М. Назарова¹, Н.Л. Стародубцева¹, В.В. Чаговец¹, В.Е. Франкевич¹, В.Н. Прилепская¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

³ФГБУН «Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова» РАН, Москва, Россия

Аннотация

Цель. Определить динамику уровней липидов в клетках эпителия шейки матки при лечении 0,1% активированной глицирризиновой кислотой хронического цервицита и внутриэпителиальных поражений низкой степени (LSIL).

Материалы и методы. В проспективное когортное исследование включили 40 пациенток с хроническим цервицитом и 40 пациенток с LSIL. Цитологическую оценку мазков с шейки матки осуществляли по системе Bethesda (2014 г.). Все пациентки получали Эпиген Интим спрей в течение 18 мес. Амплификацию типоспецифических фрагментов ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) и человеческой ДНК (контроль взятия материала – КВМ) проводили с помощью комплекта реагентов для выявления, типирования и количественного определения 21 типа ВПЧ методом ПЦР ВПЧ «Квант-21». Липидный экстракт соскоба эпителия шейки матки, взятого до начала терапии и после, анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Липиды идентифицировали с помощью R-скрипта Lipid Match и по характерным МС/МС. Корреляционный анализ липидома соскоба и КВМ проводили с использованием теста Спирмена, сравнение уровней липидов в двух временных точках – с помощью теста Манна-Уитни.

Результаты. При лечении хронического цервицита снижались уровни липидов CL 16:0_16:1_18:1_18:1, HexCer-NDS d20:0/26:0, PC 16:0_18:1 и 16:0_20:4; при лечении LSIL – уровни керамидов и глюкозилцерамидов. Для хронического цервицита характерна положительная корреляция КВМ мазка с кардиолипинами, глюкозилцерамидами и липидами с простой эфирной связью эпителия, для LSIL – отрицательная корреляция с фосфатидилхолинами и фосфатидилэтаноламинами с простой эфирной связью.

Заключение. В результате лечения активированной глицирризиновой кислотой статистически значимо изменялся липидный спектр клеток эпителия, причем характер изменений зависел от типа поражения. Необходимо также учитывать КВМ соскобов при дальнейших исследованиях липидома эпителиальных клеток, причем на поправку влияет тип ВПЧ-ассоциированных поражений.

Ключевые слова: неопластические поражения, липидом, активированная глицирризиновая кислота, хронический цервицит, LSIL, вирус папилломы человека, эпителий шейки матки

Для цитирования: Токарева А.О., Рамазанова Л.К., Токарева А.О., Довлетханова Э.Р., Алиева Л.Э., Шешко П.Л., Кукаев Е.Н., Назарова Н.М., Стародубцева Н.Л., Чаговец В.В., Франкевич В.Е., Прилепская В.Н. Влияние активированной глицирризиновой кислоты на липидом клеток эпителия при ВПЧ-ассоциированных поражениях шейки матки. Гинекология. 2023;25(2):164–169. DOI: 10.26442/20795696.2023.2.202252

© ООО «КОНСИЛИУМ МЕДИКУМ», 2023 г.

Информация об авторах / Information about the authors

[✉]**Токарева Алиса Олеговна** – канд. физ.-мат. наук, специалист лаб. клин. протеомики ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: alisa.tokareva@phystech.edu; ORCID: 0000-0001-5918-9045

Рамазанова Лейла Камилловна – аспирантка ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: ileyla0201@gmail.com

Довлетханова Эльмира Робертовна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. научно-поликлинического отд-ния ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: e_dovletkhanova@oparina4.ru; ORCID: 0000-0003-2835-6685

Алиева Лейла Эльдаровна – студентка 6 курса Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет). E-mail: leylaaliev@mail.ru

Шешко Полина Леонидовна – зав. по клинической работе отд-ния инновационной онкологии и гинекологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: Dr.sheshko@gmail.com

Кукаев Евгений Николаевич – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. лаб. клин. протеомики ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова», науч. сотр. Института энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе ФГБУН «ФИЦ ХФ им. Н.Н. Семенова». E-mail: e_kukaev@oparina4.ru; ORCID: 0000-0002-8397-3574

Назарова Нисо Мирзоевна – д-р мед. наук, вед. науч. сотр. ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: n_nazarova@oparina4.ru; ORCID: 0000-0001-9499-7654

[✉]**Alisa O. Tokareva** – Cand. Sci. (Phys.-Math.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: alisa.tokareva@phystech.edu; ORCID: 0000-0001-5918-9045

Leyla K. Ramazanova – Graduate Student, Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: ileyla0201@gmail.com

Elmira R. Dovletkhanova – Cand. Sci. (Med.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: e_dovletkhanova@oparina4.ru; ORCID: 0000-0003-2835-6685

Leyla E. Alieva – Student, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University). E-mail: leylaaliev@mail.ru

Polina L. Sheshko – Department Head, Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: Dr.sheshko@gmail.com

Evgenii N. Kukaev – Cand. Sci. (Phys.-Math.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Semenov Research Center of Chemical Physics. E-mail: e_kukaev@oparina4.ru; ORCID: 0000-0002-8397-3574

Niso M. Nazarova – D. Sci. (Med.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: n_nazarova@oparina4.ru; ORCID: 0000-0001-9499-7654

Effect of activated glycyrrhizic acid on epithelial cell lipidome in HPV-associated cervical lesions: A prospective cohort study

Alisa O. Tokareva^{✉1}, Leyla K. Ramazanova¹, Elmira R. Dovletkhanova¹, Leyla E. Alieva², Polina L. Sheshko¹, Evgenii N. Kukaev^{1,3}, Niso M. Nazarova¹, Natalia L. Starodubtseva¹, Vitaly V. Chagovets¹, Vladimir E. Frankevich¹, Vera N. Prilepskaya¹

¹Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia;

²Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

³Semenov Research Center of Chemical Physics, Moscow, Russia

Abstract

Aim. To determine the change of lipid levels in the cervical epithelial cells during the treatment of chronic cervicitis and low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) with 0.1% activated glycyrrhizic acid.

Materials and methods. The prospective cohort study included 40 patients with chronic cervicitis and 40 patients with LSIL. Cytological evaluation of cervical smears was performed according to the Bethesda system (2014). All patients received Epigen Intim Spray for 18 months. Amplification of type-specific DNA fragments of human papillomavirus (HPV) and human DNA (sampling control – SC) was done using a kit of reagents to detect, type, and quantitatively determine 21 HPV types by Quantum-21 HPV PCR. Lipid extract of a cervical epithelial scraping taken before and after therapy was analyzed by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Lipids were identified using the Lipid Match R-script and by characteristic MS/MS. Correlation analysis of the lipidome of cervicovaginal fluid and SC was performed using the Spearman test, and the Mann-Whitney test was used to compare lipid levels at the two time points.

Results. During the treatment of chronic cervicitis, the levels of CL lipids 16:0_16:1_18:1_18:1, HexCer-NDS d20:0/26:0, PC 16:0_18:1 and 16:0_20:4 were decreasing; during the treatment of LSIL, the levels of ceramides and glucosylceramides were decreasing. Chronic cervicitis is characterized by a positive correlation of SC smear with cardiolipins, glucosylceramides, and epithelial lipids with an ether bond; LSIL showed a negative correlation with phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines with an ether bond.

Conclusion. As a result of treatment with activated glycyrrhizic acid, the lipid spectrum of epithelial cells significantly changed, depending on the type of lesion. It is also necessary to consider SC scrapings in further studies of epithelial cell lipidome and the type of HPV-associated lesions that affects the adjustments.

Keywords: neoplastic lesions, lipidome, activated glycyrrhizic acid, chronic cervicitis, LSIL, human papilloma virus, cervical epithelium

For citation: Tokareva AO, Ramazanova LK, Dovletkhanova ER, Alieva LE, Sheshko PL, Kukaev EN, Nazarova NM, Starodubtseva NL, Chagovets VV, Frankevich VE, Prilepskaya VN. Effect of activated glycyrrhizic acid on epithelial cell lipidome in HPV-associated cervical lesions: A prospective cohort study. *Gynecology*. 2023;25(2):164–169. DOI: 10.26442/20795696.2023.2.202252

Вирус папилломы человека (ВПЧ) является наиболее широко распространенной инфекцией, передающейся половым путем, и играет ключевую роль в развитии рака шейки матки, которое происходит через стадии прогрессирования воспаления, предраковые поражения, инициированные ВПЧ [1]. Активированная глицирризиновая кислота (АГК) является биологически активным веществом, проявляющим антиоксидантные, противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства [2–4]. А. Fagooghi и соавт. установили, что воздействие АГК на линию раковых клеток шейки матки HeLa значительно снижало их жизнеспособность [5]. Установлена также эффективность АГК при терапии плоскоклеточных внутриэпителиальных поражений низкой степени (low-grade squamous intraepithelial lesion – LSIL) [6].

Соскоб эпителия шейки матки представляет собой малоинвазивный способ забора материала для определения типа ВПЧ и вирусной нагрузки, уровня экспрессии генов человека, для цитологического исследования. Липиды относятся к молекулам малой массы (до 2000 Да), участвующим во многих метаболических процессах, являющимся основными компонентами клеточных мембран [7, 8]. Липиды эпители-

альных клеток шейки матки являются маркерами ее поражений, вызванных ВПЧ-инфекцией [9, 10]. Анализ влияния на липидный состав эпителиальных клеток 0,1% АГК может быть информативен в отношении метаболических процессов, затрагиваемых при лечении ВПЧ-ассоциированных неопластических поражений.

Цель исследования – определение динамики уровней липидов в клетках эпителия шейки матки при лечении 0,1% АГК хронического цервицита и LSIL.

Материалы и методы

В проспективное когортное исследование включили 80 пациенток от 18 до 49 лет (средний возраст – 30±6 лет), обратившихся в научно-поликлиническое отделение ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова».

Критерии включения: возраст от 18 до 49 лет, ВПЧ высокого риска; интраэпителиальные поражения низкой степени тяжести (ВПЧ-ассоциированный хронический цервицит и LSIL), половая жизнь с презервативом в течение всего периода исследования, регулярный менструальный цикл, способность выполнять требования протокола, предостав-

Стародубцева Наталия Леонидовна – канд. биол. наук, доц., зав. лаб. клин. протеомики ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: n_starodubtseva@oparina4.ru; ORCID: 0000-0001-6650-5915

Чоговец Виталий Викторович – канд. физ.-мат. наук, зав. лаб. метабомики и биоинформатики ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: v_chagovets@oparina4.ru

Франкевич Владимир Евгеньевич – канд. физ.-мат. наук, рук. отд. системной биологии в репродукции ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: v_frankevich@oparina4.ru

Прилепская Вера Николаевна – д-р мед. наук, проф., зав. поликлиническим отд.-нием ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail v_prilepskaya@oparina4.ru; ORCID: 0000-0003-3993-7629

Natalia L. Starodubtseva – Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: n_starodubtseva@oparina4.ru; ORCID: 0000-0001-6650-5915

Vitaly V. Chagovets – Cand. Sci. (Phys.-Math.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: v_chagovets@oparina4.ru

Vladimir E. Frankevich – Cand. Sci. (Phys.-Math.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: v_frankevich@oparina4.ru

Vera N. Prilepskaya – D. Sci. (Med.), Prof., Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail v_prilepskaya@oparina4.ru; ORCID: 0000-0003-3993-7629

ление подписанного письменного информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии исключения: беременность, период лактации, прием гормональной терапии, острые воспалительные заболевания, нарушение функции почек, печени, легких в стадии декомпенсации, психоневрологические заболевания.

Участниц разделили на 2 группы в зависимости от цитологического заключения: 1-я группа (n=40) – хронический цервицит, ассоциированный с персистенцией ВПЧ; 2-я группа (n=40) – LSIL и положительный тест на ВПЧ. Все пациентки применяли спрей 0,1% АГК интравагинально 3 раза в день 14 дней ежемесячно на протяжении 3 мес, затем делали перерыв 3 мес, затем повторяли 0,1% АГК по той же схеме. Контрольные временные точки – до начала терапии и через 12 мес. Комплексное обследование женщин включало сбор клинично-анамнестических данных, определение гинекологического статуса, цитологическое исследование, ВПЧ-типирование, липидомный анализ соскобов эпителия шейки матки. Цитологическую оценку мазков с шейки матки осуществляли по системе Bethesda (2014 г.).

Взятие биологического материала (соскоб эпителиальных клеток из зоны трансформации шейки матки и эпителия анальной области) для ВПЧ-типирования осуществляли в пробирки с физиологическим раствором. При выделении ДНК вируса использовали наборы «Проба ГС» (ДНК-Технология, Россия). Метод основан на использовании для лизиса клеток сильного хаотропного агента, с последующей сорбцией нуклеиновых кислот на твердом носителе, последующими отмывками сорбента и элюции ДНК с сорбента. Объем образцов после выделения составил 100 мкл. Амплификацию типоспецифических фрагментов ДНК ВПЧ и человеческой ДНК (контроль взятия материала – КВМ) проводили с помощью комплекта реагентов для выявления, типирования и количественного определения 21 типа ВПЧ методом ПЦР ВПЧ «Квант-21» (ДНК-Технология, Россия). Амплификацию осуществляли в режиме «реального времени» на приборе «ДТ-964» (ДНК-Технология, Россия). Уровень флуоресценции измеряли на каждом цикле амплификации по каналам FAM, HEX, ROX и Cy5. Результаты обрабатывались автоматически посредством программного обеспечения.

Липиды экстрагировали модифицированным методом Фолча. Липидные экстракты анализировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) на жидкостном хроматографе Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Германия), соединенном с масс-анализатором Maxis Impact QTOF с электрораспылительным источником ионов (Bruker Daltonics, Германия). Образцы разделяли методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке Zorbax C18 (150×2,1 мм, 5 мкм, Agilent, США) с линейным градиентом от 30 до 90% элюента В (раствор ацетонитрил/изопропанол/вода, 90/8/2, о/о/о, с добавлением 0,1% муравьиной кислоты и 10 ммоль/л формиата аммония) за 20 мин. В качестве элюента А использовали раствор ацетонитрил/вода (60/40, о/о) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты и 10 ммоль/л формиата аммония.

Скорость потока элюирования была 40 мкл/мин, объем инжектируемого образца – 3 мкл. МС получали в режиме положительных и отрицательных ионов в диапазоне m/z 100–1700, со следующими установками: напряжение на капилляре – 4,1 кВ для режима положительных ионов и 3,5 кВ для отрицательных, давление распыляющего газа – 0,7 бар, скорость потока осушающего газа – 6 л/мин, температура осушающего газа – 200°C.

Таблица 1. Клинические параметры в случае хронического цервицита и LSIL для 1 и 2-й точек

Table 1. Clinical parameters in chronic cervicitis and low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) for time points 1 and 2

Параметры	Точка 1	Точка 2	p
Хронический цервицит, КВМ	5,30 (5,10; 5,60)	5,10 (4,90; 5,30)	0,12
LSIL, КВМ	4,95 (4,18; 5,85)	4,95 (4,65; 5,28)	0,82
Хронический цервицит, количество типов ВПЧ	1 (1; 2)	0 (0; 1)	0,02
LSIL, количество типов ВПЧ	2 (1; 2)	0 (0; 0)	0,007

Примечание. p – вероятность совпадения выборок.

Липиды идентифицировали с помощью R-скрипта Lipid Match [11] и по характерным МС/МС. Для статистической обработки результатов использовали скрипты, написанные на языке R. Уровень КВМ в формате «медиана» («1-й квартиль»; «3-й квартиль») в каждой из 4 групп: пациенты с цитологическим диагнозом цервицита, 1-я точка; пациенты с цитологическим диагнозом LSIL, 1-я точка; пациенты с цитологическим диагнозом цервицита, 2-я точка; пациенты с цитологическим диагнозом LSIL, 2-я точка. Посредством теста Манна–Уитни оценивали разницу уровней липидов, КВМ и количества типов вируса ВПЧ между 1 и 2-й точками каждой цитологической группы. С помощью теста Спирмена производили корреляционный анализ липидов и КВМ в объединенном пуле образцов и в каждой цитологической группе отдельно. Пороговым критерием значимости принималось 0,05. Для статистического анализа использовали скрипты на языке R 4.2.1 в среде RStudio.

Результаты

В режиме положительных ионов зарегистрировано 58 липидов, в основном относящихся к фосфатидилхолинам (16 соединений), триглицеридам (16 соединений) и церамидам (14 соединений). В режиме отрицательных ионов зарегистрировано 32 липида, в основном относящихся к фосфатидилхолинам (8), церамидам (11) и фосфатидилэтанолaminaм (7).

Количество типов ВПЧ статистически значимо снижалось после лечения 0,1% АГК как в группе с хроническим цервицитом, так и в группе LSIL, причем при оценке встречаемости ВПЧ через 18 мес отмечена его элиминация в 85,7% случаев. Уровни КВМ статистически незначимо падают от точки 1 к точке 2 в случае хронического цервицита и практически совпадают в случае LSIL относительно хронического цервицита (табл. 1).

При корреляционном анализе уровней липидов и КВМ в объединенных данных о липидном профиле пациенток с LSIL и пациенток с хроническим цервицитом статистически значимых корреляционных связей ($p < 0,05$) не выявлено. Во время сравнения липидных профилей эпителия шейки матки при хроническом цервиците до и после лечения обнаружены статистически значимые различия в уровнях четырех липидов (рис. 1).

Обнаружен средний уровень положительной корреляционной связи КВМ для кардиолипинов, глюкозилцерамидов, фосфатидилэтанолaminaминов с простой эфирной связью и фосфатидилхолина PC 18:1_18:1 при хроническом цервиците (рис. 2). Для уровней большинства указанных соединений характерна статистически значимая корреляция между собой (рис. 2).

Сравнение липидных профилей эпителиальных клеток при LSIL до и после лечения выявило статистически значимые различия в уровнях семи липидов, большая часть

Рис. 1. Диаграмма размаха уровней липидов, статистически значимо изменяющихся при лечении хронического цервицита АГК, и вероятность совпадения значений уровней p .

Fig. 1. Box plot of lipid levels statistically significantly changing during the treatment of chronic cervicitis with activated glycyrrhizic acid, and the probability of p -values' level match.

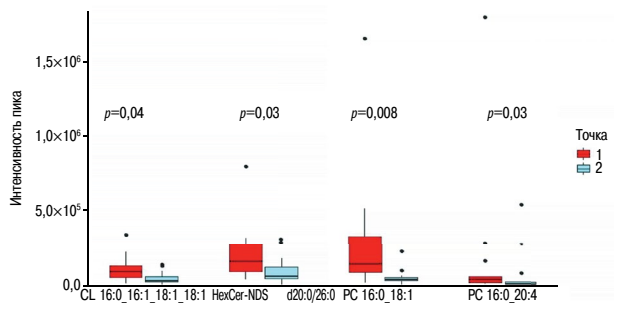


Рис. 2. Диаграмма корреляционных связей уровней липидов с KBM при хроническом цервиците.

Fig. 2. Diagram of correlation of lipid levels with sampling control (SC) in chronic cervicitis.

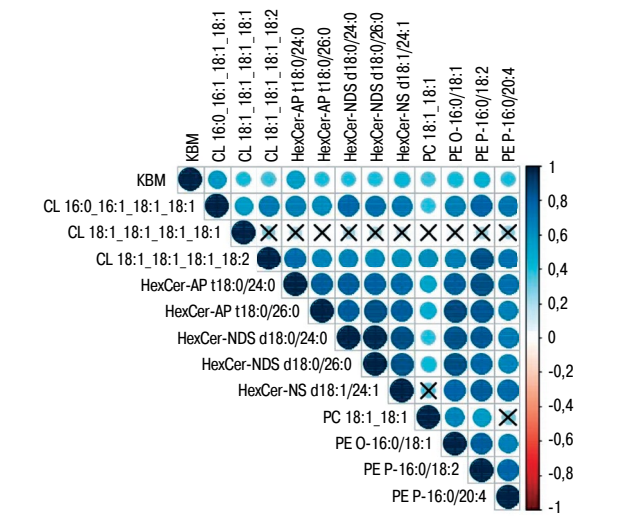


Рис. 3. Диаграмма размаха уровней липидов, статистически значимо изменяющихся при лечении LSIL, и вероятность совпадения значений уровня p .

Fig. 3. Box plot of lipid levels statistically significantly changing during the LSIL treatment, and the probability of p -values' level match.

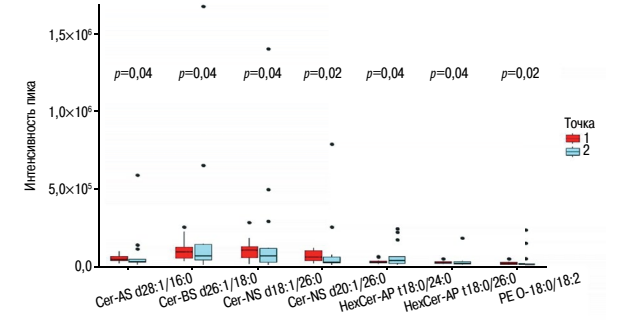
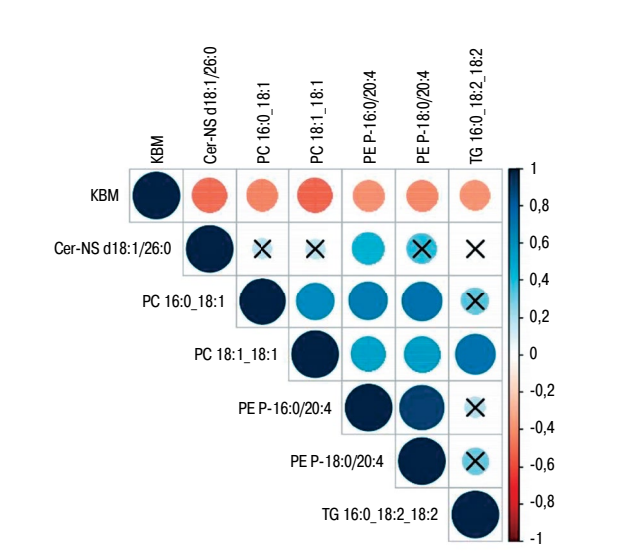


Рис. 4. Диаграмма корреляционных связей уровней липидов с KBM при LSIL.

Fig. 4. Diagram of correlation of lipid levels with SC in LSIL.



которых относится к церамидам и глюкозилцерамидам (рис. 3).

Обнаружена средняя отрицательная корреляционная связь с KBM для фосфатидилхолинов, фосфатидилэтаноламинов с простой эфирной связью, Cer-NS d18:1/26:0 и TG 16:0_18:2_18:2 при лечении LSIL (рис. 4). При этом PC 18:1_18:1 ассоциирован с KBM и в случае цервицита, и в случае LSIL, но характер связи противоположен.

Обсуждение

Церамиды являются так называемыми биологически активными липидами, играющими ключевую роль в процессах роста клеток, их дифференциации, цитокин-индуцированном воспалительном ответе, иммунной модуляции и апоптозе [12, 13]. В результате применения АГК при лечении LSIL в данной работе наблюдалось падение уровня церамидов. Аналогично показано, что применение АГК к макрофагам приводило к снижению синтеза церамидов [12]. Кроме того, и при лечении цервицита, и при лечении LSIL наблюдалось падение уровня глюкозилцерамидов, что может быть ассоциировано как с падением уровня церамидов, являющихся прекурсором глюкозил-

церамидов, так и с уменьшением синтеза глюкозилцерамидсинтазы.

S. Reza и соавт. отмечают связь глюкозилцерамидсинтазы с пролиферативными процессами, в то же время упоминают важную роль глюкозилцерамидов в формировании клеточных мембран и эпидермального барьера [14]. При использовании АГК в лечении цервицита наблюдалось падение уровня отдельных липидов, имеющих в своем составе пальмитиновую кислоту (FA 16:0). PC 16:0_20:4 входит в число липидов, для которых В. Peterson и соавт. зафиксировали рост уровня при повреждении клеток [15]. В то же время воздействие воспалительного фактора (кадмия) приводило к падению уровня пальмитиновой и олеиновой кислот и росту уровня арахидиновой кислоты в макрофагах ТНР-1. Можно предположить, что при лечении цервицита изменение жирнокислотного состава макрофагов сочетается с уменьшением их количества, что объясняет общее падение уровня липидов [16].

КBM рассчитывается как количество копий ДНК человека в соскобе эпителиальных клеток для контроля техники взятия биоматериала. Следует отметить и корреляционную связь с числом копий ДНК человека, которая наблюдалась для небольшой доли соединений липидов (4 и 2 из 58 – для

режима положительных ионов и 8 и 12 из 32 – для режима отрицательных ионов при хроническом цервиците и LSIL соответственно), и противоположный характер зависимости уровня липидов от KBM в случае цервицита и LSIL. PC 18:1_18:1 и PE 16:0/20:4 демонстрируют статистически значимую корреляционную связь и для хронического цервицита, и для LSIL, но при цервиците она положительная, а при LSIL отрицательная.

Для хронического цервицита характерны деструктивные изменения в ядрах, нарушение межклеточных взаимодействий, снижение эффективности барьерной функции эпителия. Это упрощает глубокое проникновение инфекционных агентов в ткани шейки матки, что приводит к активизации регенеративных процессов [17]. Глюкозилцерамиды ассоциированы с активизацией синтеза ДНК и митотическим делением клеток [17, 18], которые связаны с регенеративными процессами. В то же время кардиолипиды задействованы в активации процессов воспаления [19–21].

Можно предположить корреляционную связь между количеством копий ДНК, уровнем кардиолипидов и глюкозилцерамидов и иммунным ответом на инфекцию. После курса лечения АГК наблюдается падение уровня KBM, кардиолипидина 16:0_16:1_18:1_18:1 и глюкозилцерамида d20:0/26:0, что может свидетельствовать о снижении частоты делений клеток. В то же время при лечении LSIL падает уровень церамидов, которые относятся к длинноцепочечным, и уровень глюкозилальфагидроксицерамида t18:0/26:0. Это может быть связано с тем, что длинноцепочечные церамиды повышают устойчивость клеток к апоптозу [22], в то время как лечение приводит к исчезновению участков с неопластическим поражением и, как следствие, устойчивых к апоптозу клеток.

Плазмалогены включены в липидные мембраны макрофагов и влияют на передачу провоспалительных сигналов [23, 24]. Значительная часть жирных кислот плазмалогенов макрофагов представлена арахидоновой кислотой [22]. В то же время плазмалогены, имеющие в своем составе арахидоновую кислоту, при LSIL продемонстрировали отрицательную корреляционную связь с числом копий ДНК (рис. 4). Однако С. Muntinga и соавт. отмечают отсутствие изменений количества макрофагов 1-го типа и рост числа макрофагов 2-го типа в микроокружении участка с LSIL [25].

Для LSIL характерно наличие мультиядерных клеток, при этом нарушается структура хроматина [26], что позволяет предположить, что число копий ДНК растет быстрее числа макрофагов. Фосфатидилхолины являются как маркерами развивающегося неопластического процесса в тканях шейки матки, так и маркерами отличия неопластического поражения от хронического воспаления и хронического воспаления от здоровой ткани [9]. Так, уровень PC 16:0_18:1 повышался при прогрессировании LSIL, а уровень PC 16:0_18:1 в группе контроля был выше, чем при LSIL [9]. Липиды, содержащие в составе пальмитиновую и олеиновую кислоты относятся к наиболее распространенным липидам в клеточных мембранах [27], что позволяет предположить, что скорость синтеза ДНК превышает скорость синтеза фосфатидилхолинов при LSIL.

Заключение

Характер изменения липидного профиля эпителиальных клеток и количество копий ДНК в мазке под действием АГК зависит от характера поражений шейки матки до лечения. При этом в ходе лечения АГК достигается успешная элиминация ВПЧ. Тип поражения шейки матки влияет

на характер корреляционных связей липидного профиля с числом копий ДНК мазка. Результаты данного исследования свидетельствуют о разнонаправленном влиянии длительного местного применения АГК на липидный спектр клеток эпителия шейки матки при «малых» ее поражениях (хронический цервицит и LSIL), в особенности на липиды, связанные с провоспалительными процессами и апоптозом. Показана необходимость учета KBM при построении классифицирующих моделей на основе липидома клеток соскоба.

Раскрытие интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Disclosure of interest. The authors declare that they have no competing interests.

Вклад авторов. Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE. Все авторы в равной степени участвовали в подготовке публикации: разработка концепции статьи, получение и анализ фактических данных, написание и редактирование текста статьи, проверка и утверждение текста статьи. Н.М. Назарова – концепция и дизайн исследования, редактирование, Э.Р. Довлетханова – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала; П.Л. Шешко – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, редактирование; В.Е. Франкевич – концепция и дизайн исследования, редактирование; В.Н. Прилепская – концепция и дизайн исследования, редактирование; Л.К. Рамазанова – сбор и обработка материала, статистическая обработка данных, написание текста; Л.Э. Алиева – сбор и обработка материала, написание текста; Е.Н. Кукаев – сбор и обработка материала, статистическая обработка данных, написание текста; А.О. Токарева – сбор и обработка материала, статистическая обработка данных, написание текста; В.В. Чаговец – статистическая обработка данных, написание текста; Н.Л. Стародубцева – написание текста.

Authors' contribution. The authors declare the compliance of their authorship according to the international ICMJE criteria. All authors were equally involved in the preparation of the article: developing the conceptualizing the article, data collection and analysis, writing, editing, reviewing and approving the text of the article. NM Nazarova – study concept and design, editing; ER Dovletkhanova – study concept and design, data collection and processing; PL Sheshko – study concept and design, data collection and processing, editing; VE Frankevich – study concept and design, editing; VN Prilepskaya – study concept and design, editing; LK Ramazanova – data collection and processing, statistical processing, text writing; LE Alieva – data collection and processing, text writing; EN Kukaev – data collection and processing, text writing; AO Tokareva – data collection and processing, statistical processing, text writing; VV Chagovets – data statistical processing, text writing; NL Starodubtseva – text writing.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках экспериментального научного исследования «Разработка и внедрение протоколов с учетом новых технологий в ранней и дифференциальной диагностике, прогнозирования риска развития ВПЧ-ассоциированных предраковых и онкологических заболеваний у женщин репродуктивного возраста» 121040600125-0.

Funding source. The study was conducted as part of experimental research 121040600125-0, "Development and implementation of protocols based on new technologies in early and differential diagnosis, prediction of the risk of HPV-associated preneoplastic and neoplastic diseases in women of reproductive age".

Соответствие принципам этики. Исследование было одобрено Комиссией по этике ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (протокол №9 от 14.11.2019).

Ethics approval. The study was approved by the local ethics committee of Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (protocol №9, 14.11.2019). The approval and procedure for the protocol were obtained in accordance with the principles of the Helsinki Convention.

Информированное согласие на публикацию. Пациентки подписали форму добровольного информированного согласия на публикацию медицинской информации.

Consent for publication. Written consent was obtained from the patients for publication of relevant medical information and all of accompanying images within the manuscript.

Литература/Reference

1. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патологии шейки матки: В помощь практикующему врачу. Изд. 2-е, испр. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014 [Rogovskaya SI. Papillomavirusnaya infekciya u zhenshchin i patologiya shejki matki: V pomoshch' praktikuushchemu vrachu. Izd. 2-e, ispr. i dop. Moscow: GEOTAR-Media, 2014 (in Russian)].
2. Gong G, Xiang L, Yuan L, et al. Protective effect of glycyrrhizin, a direct HMGB1 inhibitor, on focal cerebral ischemia/reperfusion-induced inflammation, oxidative stress, and apoptosis in rats. *PLoS One*. 2014;9(3):e89450. DOI:10.1371/journal.pone.0089450
3. Gu XJ, Xu J, Ma BY, et al. Effect of glycyrrhizin on traumatic brain injury in rats and its mechanism. *Chinese J Traumatol*. 2014;17(1):1-7.
4. Hou S, Zheng F, Li Y, et al. The protective effect of glycyrrhizic acid on renal tubular epithelial cell injury induced by high glucose. *Int J Mol Sci*. 2014;15(9):15026-43. DOI:10.3390/ijms150915026
5. Farooqui A, Khan F, Khan I, Ansari IA. Glycyrrhizin induces reactive oxygen species-dependent apoptosis and cell cycle arrest at G0/G1 in HPV18+ human cervical cancer HeLa cell line. *Biomed Pharmacother*. 2018;97:752-64. DOI:10.1016/j.biopha.2017.10.147
6. Valencia MH, Pacheco AC, Quijano TH, et al. Clinical Response to Glycyrrhizic Acid in Genital Infection Due to Human Papillomavirus and Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion. *Clin Pract*. 2011;1(4):e93. DOI:10.4081/cp.2011.e93
7. Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res*. 2001;40(5):325-438. DOI:10.1016/s0163-7827(01)00013-3
8. Shevchenko A, Simons K. Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(8):593-8. DOI:10.1038/nrm2934
9. Tokareva A, Chagovets V, Attoeva D, et al. Non-Invasive Differential Diagnosis of Cervical Neoplastic Lesions by the Lipid Profile Analysis of Cervical Scrapings. *Metabolites*. 2022;12(9):883. DOI:10.3390/metabo12090883
10. Starodubtseva NL, Chagovets VV, Nekrasova ME, et al. Shotgun Lipidomics for Differential Diagnosis of HPV-Associated Cervix Transformation. *Metabolites*. 2022;12(6):503. DOI:10.3390/metabo12060503
11. Koelmel JP, Kroeger NM, Ulmer CZ, et al. LipidMatch: An automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics*. 2017;18(1):331. DOI:10.1186/s12859-017-1744-3
12. Roy N, Ghosh S, Juin SK, et al. Immunomodulator mediated changes in plasma membrane calcium ATPase in controlling visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2020;217:107948. DOI:10.1016/j.exppara.2020.107948
13. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(2):139-50. DOI:10.1038/nrm2329
14. Reza S, Ugorski M, Suchański J. Glucosylceramide and galactosylceramide, small glycosphingolipids with significant impact on health and disease. *Glycobiology*. 2021;31(11):1416-34. DOI:10.1093/glycob/cwab046
15. Peterson B, Stovall K, Monian P, et al. Alterations in phospholipid and fatty acid lipid profiles in primary neocortical cells during oxidant-induced cell injury. *Chem Biol Interact*. 2008;174(3):163-76. DOI:10.1016/j.cbi.2008.05.028
16. Olszowski T, Gutowska I, Baranowska-Bosiacka I, et al. Cadmium alters the concentration of fatty acids in THP-1 macrophages. *Biol Trace Elem Res*. 2018;182(1):29-36. DOI:10.1007/s12011-017-1071-6
17. Datta SC, Radin NS. Stimulation of liver growth and DNA synthesis by glucosylceramide. *Lipids*. 1988;23(5):508-10. DOI:10.1007/BF02535529
18. Marchell NL, Uchida Y, Brown BE, et al. Glucosylceramides stimulate mitogenesis in aged murine epidermis. *J Invest Dermatol*. 1998;110(4):383-7. DOI:10.1046/j.1523-1747.1998.00145.x
19. Iyer SS, He Q, Janczy JR, et al. Mitochondrial Cardiolipin Is Required for Nlrp3 Inflammasome Activation. *Immunity*. 2013;39(2):311-23. DOI:10.1016/j.immuni.2013.08.001
20. Elliott EI, Miller AN, Banoth B, et al. Cutting Edge: Mitochondrial assembly of the NLRP3 inflammasome complex is initiated at priming. *J Immunol*. 2018;200(9):3047-52. DOI:10.4049/jimmunol.1701723
21. Konjar Š, Frising UC, Ferreira C, et al. Mitochondria maintain controlled activation state of epithelial-resident T lymphocytes. *Sci Immunol*. 2018;3(24):eaan2543. DOI:10.1126/sciimmunol.aan2543
22. Sassa T, Suto S, Okayasu Y, Kihara A. A shift in sphingolipid composition from C24 to C16 increases susceptibility to apoptosis in HeLa cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821(7):1031-7. DOI:10.1016/j.bbali.2012.04.008
23. Wallner S, Schmitz G. Plasmalogens the neglected regulatory and scavenging lipid species. *Chem Phys Lipids*. 2011;164(6):573-89. DOI:10.1016/j.chemphyslip.2011.06.008
24. Bozelli JC Jr, Azher S, Epand RM. Plasmalogens and Chronic Inflammatory Diseases. *Front Physiol*. 2021;12:730829. DOI:10.3389/fphys.2021.730829
25. Muntinga CLP, de Vos van Steenwijk PJ, Bekkers RLM, van Esch EMG. Importance of the Immune Microenvironment in the Spontaneous Regression of Cervical Squamous Intraepithelial Lesions (cSIL) and Implications for Immunotherapy. *J Clin Med*. 2022;11(5):1432. DOI:10.3390/jcm11051432
26. Alrajjal A, Pansare V, Choudhury MSR, et al. Squamous intraepithelial lesions (SIL: LSIL, HSIL, ASCUS, ASC-H, LSIL-H) of Uterine Cervix and Bethesda System. *Cytojournal*. 2021;18:16. DOI:10.25259/Cytojournal_24_2021
27. Spector AA, Yorek MA. Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res*. 1985;26(9):1015-35.

Статья поступила в редакцию / The article received: 27.01.2023

Статья принята к печати / The article approved for publication: 16.05.2023