

*На правах рукописи*

**ФИЛИМОНОВА МАРИАННА СЕРГЕЕВНА**

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ  
ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ  
ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНОМ  
ПОРАЖЕНИИ ШЕЙКИ МАТКИ НИЗКОЙ СТЕПЕНИ И  
РАЗНЫХ УРОВНЯХ ЖЕНСКИХ ПОЛОВЫХ СТЕРОИДНЫХ  
ГОРМОНОВ**

3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

Доктор медицинских наук, профессор,  
член-корреспондент РАН

Шимановский Николай Львович

**Официальные оппоненты:**

Доктор медицинских наук, профессор

Якушева Елена Николаевна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии, заведующий кафедрой

Доктор медицинских наук, профессор

Громова Ольга Алексеевна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ивановский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии, профессор кафедры

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «    » \_\_\_\_\_ 2025 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного совета 21.2.058.01 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова» Минздрава России (Пироговский Университет) по адресу: 117513, г. Москва, ул. Островитянова, д.1, стр. 6

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России (Пироговский Университет) по адресу: 117513, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1, стр. 6 и на сайте [www.rsmu.ru](http://www.rsmu.ru)

Автореферат диссертации разослан «    » \_\_\_\_\_ 2025 года

Ученый секретарь Диссертационного совета  
доктор медицинских наук, профессор



Духанин Александр Сергеевич

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Длительная персистенция папилломавирусной инфекции (ПВИ) является ключевым фактором развития рака шейки матки (РШМ), который занимает второе место в структуре смертности от злокачественных новообразований у женщин репродуктивного возраста [Siegel R. et al., 2023].

Наиболее уязвимой областью шейки матки, где под действием онкобелков ВПЧ происходит нарушение процессов пролиферации клеток с последующим развитием интраэпителиальных поражений вплоть до РШМ, является стык многослойного плоского и цилиндрического эпителия. Эндогенные и экзогенные гормональные факторы могут оказывать влияние на прогрессирование интраэпителиальных поражений – риск РШМ возрастал при раннем наступлении первой беременности, у женщин с 4 и более родами в анамнезе, при приеме некоторых препаратов половых стероидных гормонов (диэтилстилбестрол) [Roura E. et al., 2016]. С другой стороны, прием менопаузальной гормональной терапии ассоциировался со снижением риска инвазивного РШМ [Okunade K. et al., 2020; Левшин В.Ф. и соавт., 2017]. Эти данные указывают на целесообразность изучения влияния уровня половых стероидных гормонов на эффективность лечения ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки.

Для профилактики прогрессирования ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки может использоваться препарат глицирризиновой кислоты (ГК), которая проявляет широкий спектр биологических и фармакологических эффектов, включая противоопухолевое, противовоспалительное, антиоксидантное, противовирусное действия [Hosseinzadeh H. et al., 2015]. Антипролиферативное действие ГК связано с индукцией апоптоза и остановкой клеточного цикла за счет повышения экспрессии генов белков p21, p53, подавления экспрессии генов белков клеточного деления [Saeed M. et al., 2020; Farooqui A. et al., 2018].

У пациентов с плоскоклеточным интраэпителиальным поражением низкой степени применение препарата ГК вызывало изменения на уровне липидома,

протеома, оксидативного статуса цервикальной зоны [Франкевич В. Е. и соавт., 2022; Стародубцева Н. Л. и соавт., 2022; Боровиков И. О. и соавт., 2019]. Зависимость эффектов препарата ГК от уровня гормонов и ее влияние на уровень экспрессии онкобелков у данной когорты пациенток не изучались.

Таким образом, актуальна оценка антипролиферативного действия препарата ГК в присутствии половых стероидных гормонов, клиническая оценка влияния препарата ГК на уровень экспрессии онкобелков при ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки.

### **Степень разработанности темы исследования**

Антипролиферативное действие ГК изучалось на различных клеточных линиях [Huang R. et al., 2014; Wang D. et al., 2014; Cai S. et al., 2020; Saeed M. et al., 2020]. Продемонстрировано отсутствие значимого цитотоксического действия ГК на нормально делящиеся клетки в концентрации 20 – 160 мкМ, при тех же концентрациях отмечено ингибирование пролиферации клеток аденокарциномы шейки матки линии Hela [Faroqui A. et al., 2018].

Половые стероидные гормоны оказывают влияние на различные факторы прогрессирования ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки – пролиферацию, состояние локального иммунитета, антиоксидантного статуса цервикальной зоны, уровень экспрессии онкобелков ВПЧ [Ruutu M. et al., 2006; Matsumoto T. et al., 2023; Sokolov M.N. et al., 2024; James C.D. et al., 2020; Lasche M. et al., 2022; Fedotcheva, T.A. et al., 2022].

Представляет интерес влияние половых стероидных гормонов на антипролиферативную активность и клиническую эффективность препарата ГК при ВПЧ-ассоциированных поражениях шейки матки.

### **Цели исследования**

1. Оценить антипролиферативное действие препарата ГК *in vitro* на культуре клеток аденокарциномы шейки матки линии HeLa, оценить изменение антипролиферативного действия ГК при одновременном присутствии половых стероидных гормонов.

2. Оценить эффективность препарата ГК *in vivo* у пациенток с ВПЧ-

ассоциированными поражениями шейки матки с учетом уровня половых стероидных и гонадотропных пептидных гормонов.

3. Оценить безопасность и переносимость препарата ГК.

### **Задачи исследования**

1. Оценить влияние препарата ГК на жизнеспособность клеток аденокарциномы шейки матки линии HeLa и нормальных дермальных фибробластов человека.

2. Оценить влияние препарата ГК на жизнеспособность клеток аденокарциномы шейки матки линии HeLa при разных концентрациях половых стероидных гормонов.

3. Оценить уровень половых стероидных и гонадотропных пептидных гормонов у пациенток с ВПЧ-ассоциированными поражениями шейки матки, оценить изменение кольпоскопической картины, вирусной нагрузки ВПЧ-ВР, результатов цитологического заключения, коэкспрессии онкобелков p16/Ki67 на фоне применения препарата ГК у пациенток с ВПЧ-ассоциированными поражениями шейки матки, плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями шейки матки.

4. Оценить безопасность и переносимость препарата ГК у пациенток с ВПЧ-ассоциированными поражениями шейки матки путем сбора жалоб, объективных данных, частоты возникновения и характера нежелательных явлений, возникших в ходе применения препарата.

### **Научная новизна**

Впервые проведена сравнительная оценка влияния субстанции ГК и препарата ГК на жизнеспособность клеток аденокарциномы шейки матки линии HeLa, оценка влияния препарата ГК на жизнеспособность клеток аденокарциномы шейки матки линии HeLa при разных концентрациях половых стероидных гормонов.

Впервые продемонстрировано, что тестостерон и прогестерон в концентрациях 10 мкМ и 1 мкМ ослабляют, а низкие концентрации эстрадиола (1 мкМ) усиливают антипролиферативное действие ГК.

Впервые продемонстрировано, что уровень эстрадиола у пациенток с HSIL (плоскоклеточное интраэпителиальное поражение высокой степени) ниже по сравнению с пациентками с ASCUS (атипические клетки плоского эпителия неясного значения) и LSIL (плоскоклеточное интраэпителиальное поражение низкой степени).

Впервые проведена оценка влияния препарата ГК на уровень коэкспрессии онкобелков p16/Ki67 у пациенток с ВПЧ-ассоциированными поражениями шейки матки.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Результаты работы позволили установить зависимое от концентрации и от типа гормона влияние половых стероидных гормонов на эффективность препарата ГК.

Выявлены различия в уровне эстрадиола у пациенток с ВПЧ-ассоциированными поражениями шейки матки разной степени указывают на необходимость персонализированного подхода и коррекции алгоритмов ведения пациенток с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями разной степени с учетом уровня эстрадиола в сыворотке крови.

Полученные результаты позволили выделить группы пациентов, у которых можно ожидать наиболее выраженный эффект от применения препарата ГК для профилактики прогрессирования ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки – пациентки репродуктивного возраста при нормальных уровнях половых стероидных гормонов, пациентки в период пери- и постменопаузы, получающих менопаузальную гормональную терапию в форме комбинированной эстроген-гестагенной терапии, монотерапии эстрогенами в низких и ультранизких дозах.

### **Методология и методы исследования**

Исследование включало экспериментальную и клиническую часть. В ходе экспериментальной части использованы следующие методы исследования: определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста, хемилюминесцентный метод определения антиоксидантной активности, спектрофотометрическое исследование.

В ходе клинической части выполнялись общий и гинекологический осмотр пациентов, кольпоскопия, микроскопическое исследование вагинального отделяемого, цитологическое исследование микропрепарата шейки матки, типирование и количественное определение 21 типа (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) ВПЧ методом ПЦР в реальном времени, жидкостная цитология, иммуноцитохимическое исследование коэкспрессии онкобелков p16/Ki67, уровень ЛГ, ФСГ, эстрадиола, прогестерона, тестостерона общего в сыворотке крови.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Препарат ГК в концентрации 40 мкМ, 80 мкМ и 160 мкМ не оказывает цитотоксического действия на нормально делящиеся клетки нормальные дермальные фибробласты человека.
2. Антипролиферативное действие препарата ГК в концентрации 40 мкМ, 80 мкМ и 160 мкМ *in vitro* в отношении клеток аденокарциномы шейки матки линии HeLa является концентрационнозависимым.
3. Антипролиферативное действие препарата ГК Эпиген Интим *in vitro* в отношении клеток аденокарциномы шейки матки линии HeLa сильнее на 5,1% по сравнению с субстанцией ГК.
4. Антипролиферативное действие ГК в отношении клеток аденокарциномы шейки матки линии HeLa может концентрационнозависимо усиливаться или ослабляться в присутствии половых стероидных гормонов: тестостерон и прогестерон в концентрации 10 мкМ и 1 мкМ ослабляют антипролиферативное действие ГК; низкие концентрации эстрадиола (1 мкМ) усиливают антипролиферативное действие ГК.
5. Уровень эстрадиола в подгруппе HSIL ниже по сравнению с подгруппами ASCUS и LSIL (коэффициент корреляции  $t = -0,757$ ), что может указывать на то, что более низкий уровень эстрадиола может коррелировать с тяжестью плоскоклеточного интраэпителиального поражения шейки матки.
6. Наибольшую эффективность препарата ГК при ВПЧ-ассоциированных поражениях шейки матки можно ожидать у пациенток

репродуктивного возраста без клинических и/или лабораторных признаков гиперандрогении.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных в ходе работы данных определяется изучением достаточного объема экспериментального и клинического материала; методы экспериментального и клинического исследования полностью соответствуют поставленным целям и задачам, для статистической обработки полученных данных использованы надлежащие методы. Получены статистически значимые результаты, которые позволили сформулировать научно обоснованные выводы и рекомендации.

Материалы доложены и обсуждены на VI Съезде фармакологов России, на совместных заседаниях кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика П.В. Сергеева и НИЛ молекулярной фармакологии Медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

### **Личный вклад автора**

Автором лично был разработан дизайн исследования, проведено культивирование клеток, МТТ-тест, хемилюминесцентное и спектрофотометрическое исследования, построение концентрационных кривых клеточной выживаемости, расчет  $IC_{50}$ , разработана и сформирована электронная база данных обследованных пациентов с ВПЧ-ассоциированными поражениями шейки матки, проведен статистический анализ экспериментальных и клинических данных, интерпретация полученных результатов. Автором лично подготовлены и опубликованы научные труды по теме диссертации.

### **Соответствие диссертации паспорту научной деятельности**

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология. Результаты диссертационного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1, 3, 5, 12 паспорта Фармакология, клиническая фармакология.

## **Реализация и внедрение полученных результатов в практику**

Результаты диссертационного исследования внедрены в работу гинекологического отделения ГKB № 1 им. Н. И. Пирогова Департамента здравоохранения города Москвы, женской консультации № 1 БУЗОО Клинический родильный дом №6 и могут быть использованы практическими врачами для оптимизации схем профилактики прогрессирования ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки при назначении препарата ГК.

Материалы диссертационного исследования используются в учебном процессе при подготовке студентов, ординаторов, аспирантов на кафедре молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика П.В. Сергеева Медико-биологического факультета ФGAOY BO PНИМУ им. Н.И. Пирогова.

### **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертации опубликовано 4 работы, из них 3 – в рецензируемых изданиях, рекомендуемых Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для публикации основных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, 1 в Сборнике тезисов VI Съезда фармакологов России, 2023 год.

### **Объём и структура диссертации**

Диссертация изложена на 124 страницах печатного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной материалам и методам исследования, главы, содержащей собственные результаты и их обсуждение, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 18 таблицами и 19 рисунками. Список литературы содержит 194 источников, из них отечественных – 21, зарубежных – 173.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

#### **Определение клеточной жизнеспособности.**

**Исследуемые вещества.** Выполнялась оценка влияния нижеперечисленных соединений на жизнеспособность клеточных культур аденокарциномы шейки матки линии HeLa и нормальных дермальных

фибробластов человека: аммония глицирризината (Jiangsu Tiansheng Pharmaceutical Co, Ltd., Китай, чистота 100%); препарат Эпиген Интим (B.Braun Medical S.A., Испания, действующее вещество – аммония глицирризинат 0,1 г на 100 мл, вспомогательные вещества – яблочная кислота (3,0 г), фумаровая кислота (2,0 г), аскорбиновая кислота (0,3 г), фолиевая кислота (0,08 г), пропиленгликоль (50,0 г), полисорбат-80 (0,9 г), вода очищенная до 100 мл); тестостерон (Sigma-Aldrich, США); эстрадиол (Sigma-Aldrich, США); прогестерон (Sigma-Aldrich, США); диметилсульфоксид (ООО «Тульская фармацевтическая фабрика», Россия, состав: диметилсульфоксид 99%, вода очищенная).

В ходе эксперимента были выбраны концентрации аммония глицирризината и препарата Эпиген Интим 40, 80 и 160 мкМ, оказывающие от умеренного до выраженного цитотоксического действия, позволяющие оценить его изменение при добавлении половых стероидных гормонов, рассчитать IC<sub>50</sub> ГК. Концентрации тестостерона, прогестерона и эстрадиола составили 1 мкМ и 10 мкМ, поскольку концентрации половых стероидных гормонов свыше 10 мкМ оказывают выраженное цитотоксическое действие. В качестве растворителя использовался диметилсульфоксид. В качестве контроля использовалась соответствующая культура клеток с добавлением в среду диметилсульфоксида в концентрации 0,5% на лунку, растворенного в воде очищенной.

**Клеточная культура и реагенты.** В эксперименте использовались культуры: клетки аденокарциномы шейки матки линии HeLa (Институт биологии гена РАН); нормальные дермальные фибробласты человека (УНУ «Коллекция клеточных культур» Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН).

Культивирование клеток осуществлялось в среде DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США). Среда для культивирования содержала эмбриональную телячью сыворотку (10%, Biosera, Франция), L-глутамин (2 мМ, ПанЭко, Россия) и пенициллин-стрептомицин (100 ед/мл, ПанЭко, Россия). Инкубация осуществлялась при 37°C в условиях 5% содержания CO<sub>2</sub>.

**Определение клеточной жизнеспособности.** Влияние исследуемых соединений на жизнеспособность клеточных культур оценивалось с помощью

МТТ-теста. Клетки помещали в лунки 96-луночного планшета (по 100 000 клеток в 1 мл питательной среды на лунку), инкубировали при 37°C в условиях 5% содержания CO<sub>2</sub> в течение 24 часов, после чего добавляли исследуемые вещества в различных концентрациях или растворитель (контроль). ГК (в виде аммония глицирризината) и препарат Эпиген Интим вносились в клеточную культуру в эквимольных концентрациях по отношению к ГК. Время инкубации с исследуемыми веществами составляло 48 часов, затем проводился МТТ-тест.

В каждую лунку добавляли реагент МТТ («ПанЭко», Россия) (концентрация МТТ в лунке составляла 0,5 мг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 3 ч. Затем в каждую лунку добавляли 0,5 мл ДМСО. Лунки осторожно перемешивали встряхиванием в течение 10 минут для растворения кристаллов формазана. Поглощение измеряли с помощью микропланшет-ридера (Thermo Scientific, США). Клеточную жизнеспособность рассчитывали по уравнению:

$$\text{Клеточная жизнеспособность (\%)} = \frac{\text{опыт}}{\text{контроль}} \times 100$$

Дополнительно для ГК (субстанции аммония глицирризината и препарата Эпиген Интим) рассчитывали концентрацию полумаксимального ингибирования (IC<sub>50</sub> – концентрация исследуемого соединения, которая ингибирует жизнеспособность культуры клеток на 50%) путем построения кривых концентрация-эффект.

#### **Хемилюминесцентное определение антиоксидантной активности глицирризиновой кислоты**

Хемилюминесцентное определение антиоксидантной активности ГК [Владимиров Ю. А. и соавт., 2009] выполнялось на Хемилюминометре Lum-1200 (ООО «ДИСофт»). Оценивалась кинетика хемилюминесценции (ХЛ) в реакционной среде, содержащей люминол 0,02 г/мл (Sigma-Aldrich, США), гемоглобин 0,4 мг/мл (Sigma-Aldrich, США) и перекись водорода 0,03% (ООО «ЮжФарм», Россия). В качестве растворителя использовался фосфатный буфер, рН 7,4 (НПП «ПанЭко», Россия). Исследуемые вещества (аммония глицирризинат 0,1%, препарата Эпиген Интим), люминол, гемоглобин и фосфатный буфер вносились в кювету объемом 2 мл, проводилось измерение

спонтанной ХЛ. Затем в кюветы добавлялся пероксид водорода в качестве активатора ХЛ. Измерение стимулированной ХЛ проводилось в течение 20 минут. Анализ и интерпретацию данных выполняли с использованием программного обеспечения «PowerGraph» (ООО «ДИСофт», Россия). Рассчитывались интенсивность стимулированной ХЛ как разница между максимальной и спонтанной ХЛ, а также относительная интенсивность ХЛ как отношение интенсивности стимулированной ХЛ в испытуемых образцах к интенсивности стимулированной ХЛ в контроле. По снижению относительной интенсивности ХЛ судили о связывании гидроксильных радикалов.

### **Методы обследования пациенток**

Дизайн исследования: проспективное одноцентровое наблюдательное исследование с участием 51 пациентки репродуктивного возраста с ВПЧ-ассоциированной патологией шейки матки. Исследование проводилось на базе гинекологического отделения ГKB № 1 имени Н.И. Пирогова.

Критерии включения: женщины от 18 до 45 лет включительно; наличие ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки согласно цитологическому заключению (ASCUS, LSIL, HSIL); отсутствие вакцинации против ВПЧ в анамнезе; желание пациентки участвовать в исследовании и наличие информированного письменного согласия.

Критерии невключения: известная непереносимость назначаемых в ходе исследования препаратов, тяжелые сопутствующие заболевания, делающие невозможным выполнение процедур протокола, злокачественные новообразования внутренних и наружных половых органов на момент исследования и в период 5 лет до начала исследования в анамнезе, участие в других клинических исследованиях в течение 3 месяцев до включения в исследование, неспособность следовать процедурам протокола исследования, а также любые другие сопутствующие медицинские или серьезные психические состояния, которые делают пациентку непригодной для участия в исследовании или ограничивают правомерность получения информированного согласия.

В ходе исследования выполнялся сбор анамнеза, гинекологический осмотр,

кольпоскопия, микроскопическое исследование вагинального отделяемого, цитологическое исследование эпителия шейки матки, ВПЧ-ПАП-тест жидкостный с определением коэкспрессии онкобелков p16/Ki67 эпителия шейки матки, оценка гормонального статуса (уровень ЛГ, ФСГ, эстрадиола, прогестерона, тестостерона общего в сыворотке крови) однократно на 2-4 день менструального цикла.

Все пациентки получали препарат ГК (Эпиген Интим спрей 0,1%) 3 раза в день в течение 30 дней с момента включения в исследование. При наличии показаний (HSIL / ЦИН III) выполнялась конизация шейки матки. Оценка эффективности лечения проводилась через  $90 \pm 7$  дней от начала терапии на основании динамики результатов исследования ВПЧ-ПАП-тест жидкостный с определением коэкспрессии онкобелков p16/Ki67, результатов кольпоскопии. Контроль безопасности и переносимости препарата проводился на протяжении всего периода использования препарата ГК.

### **Статистический анализ**

Накопление, корректировка, систематизация исходных данных выполнялись с использованием программы Microsoft Office Excel 2016. Концентрация полумаксимального ингибирования рассчитывалась с использованием программы Quest Graph™ (AAT Bioquest, Inc., США). Статистический анализ результатов выполнялся с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc, США) согласно общепринятым методам вариационной статистики. Статистически значимыми считались различия при  $p \leq 0,05$ .

### **Результаты исследований и их обсуждение**

#### **Результаты влияния исследуемых соединений на клеточную жизнеспособность**

Для оценки цитотоксического эффекта ГК в отношении нормально делящихся клеток оценивалась жизнеспособность нормальных дермальных фибробластов человека после обработки различными концентрациями ГК (субстанции аммония глицирризината и препарата Эпиген Интим). Результаты показали отсутствие значимого цитотоксического эффекта при концентрациях

ГК 40 мкМ, 80 мкМ, 160 мкМ в отношении нормальных дермальных фибробластов человека (Таблица 1).

**Таблица 1.** Влияние субстанции глицирризиновой кислоты и препарата Эпиген Интим на жизнеспособность нормальных дермальных фибробластов человека, (МТТ-тест, % клеточной жизнеспособности по отношению к контролю (100%), число экспериментов n=3).

| Соединение                 | Концентрация |          |          |
|----------------------------|--------------|----------|----------|
|                            | 40 мкМ       | 80 мкМ   | 160 мкМ  |
| ГК (субстанция)            | 99,4±0,1     | 98,9±0,6 | 96,7±1,2 |
| ГК (препарат Эпиген Интим) | 99,7±0,1     | 99,1±0,1 | 97,1±0,3 |

Отсутствовали статистически значимые различия от контроля.

Для оценки антипролиферативного действия ГК в отношении клеток РШМ оценивалась жизнеспособность клеток аденокарциномы шейки матки линии HeLa после обработки различными концентрациями ГК (субстанции аммония глицирризината и препарата Эпиген Интим). Результаты показали концентрационнозависимое антипролиферативное действие ГК. При этом препарат Эпиген Интим оказывал более выраженное подавляющее действие ( $p<0,05$ ) по сравнению с субстанцией аммония глицирризината (Таблица 2).

**Таблица 2.** Влияние субстанции глицирризиновой кислоты и препарата Эпиген Интим на жизнеспособность клеток аденокарциномы шейки матки линии HeLa, (МТТ-тест, % клеточной жизнеспособности по отношению к контролю (100%), число экспериментов n=3).

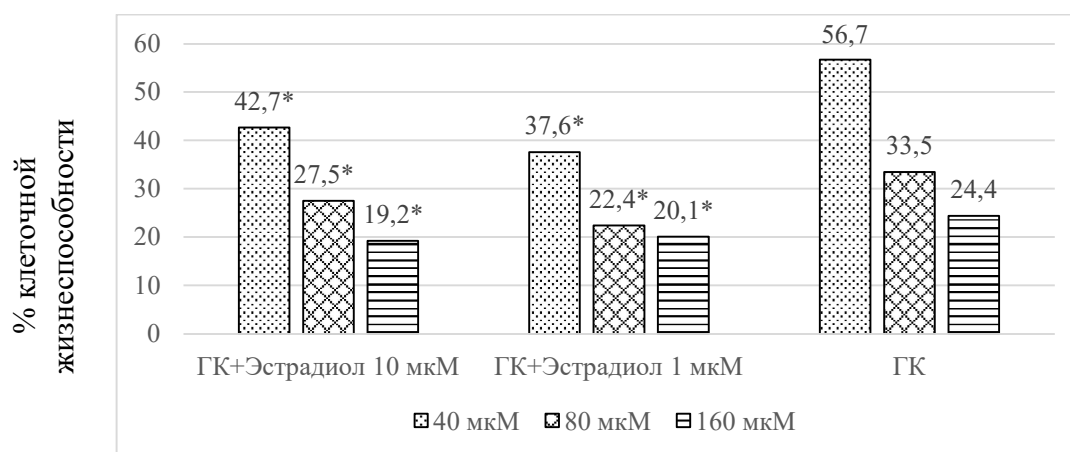
| Соединение                 | Концентрация |           |          | IC50      |
|----------------------------|--------------|-----------|----------|-----------|
|                            | 40 мкМ       | 80 мкМ    | 160 мкМ  |           |
| ГК (субстанция)            | 71,7±8,7     | 43,7±8,7  | 27,3±2,0 | 76,1±0,6  |
| ГК (препарат Эпиген Интим) | 56,7±8,5*    | 33,5±7,3* | 24,4±1,1 | 72,2±0,4* |

Примечание: \*статистически значимое отличие между соединениями,  $p<0,05$

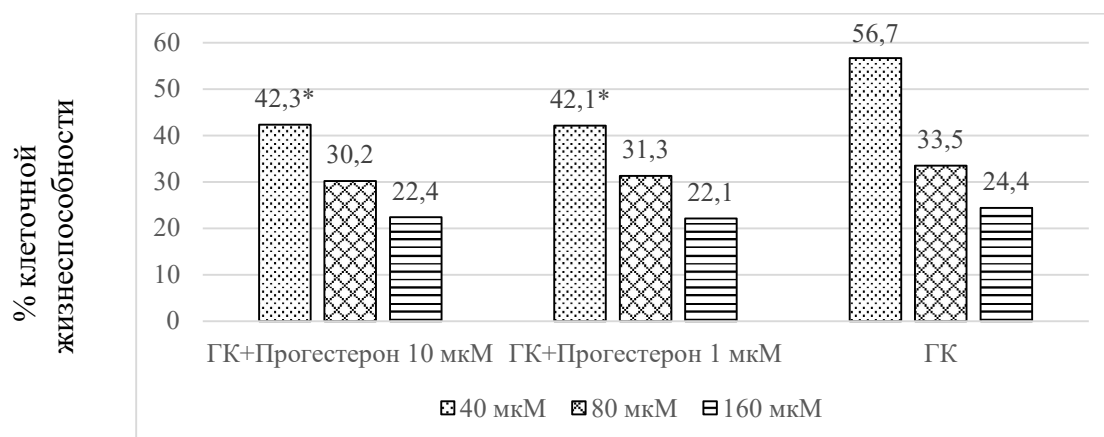
С целью изучения влияния половых стероидных гормонов на антипролиферативное действие ГК оценивалась жизнеспособность клеток

аденокарциномы шейки матки линии HeLa после обработки различными концентрациями препарата ГК (препарат Эпиген Интим, 40 мкМ, 80 мкМ, 160 мкМ) в присутствии эстрадиола, прогестерона и тестостерона (в концентрациях 1 мкМ, 10 мкМ). Согласно результатам, антипролиферативное действие ГК в отношении клеток аденокарциномы шейки матки линии HeLa может концентрационнозависимо усиливаться или ослабляться дополнительным введением половых стероидных гормонов (Рисунок 1 (А-В)).

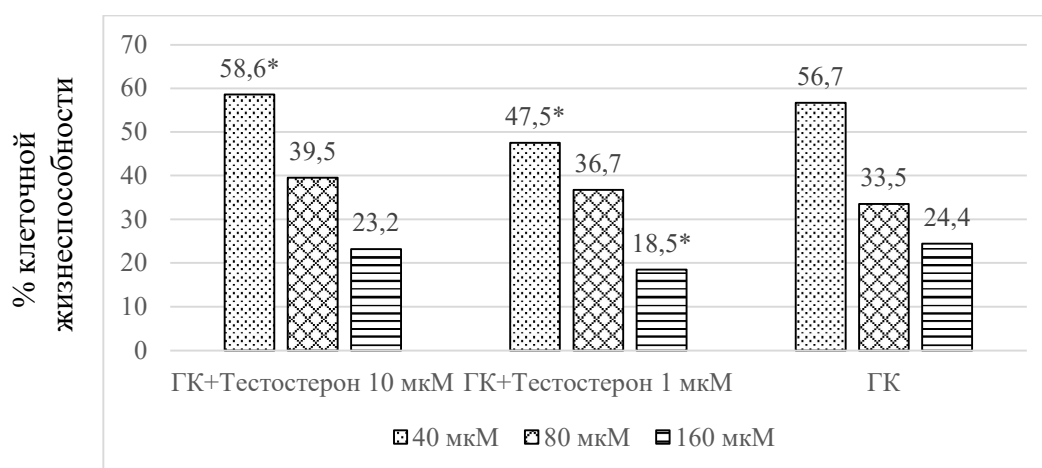
**Рисунок 1 (А-В).** Влияние половых стероидных гормонов на антипролиферативное действие глицирризиновой кислоты в отношении клеток аденокарциномы шейки матки линии HeLa.



**А)** Влияние эстрадиола (1 мкМ, 10 мкМ) на антипролиферативное действие глицирризиновой кислоты (\* $p < 0,05$ ); контроль 100%.



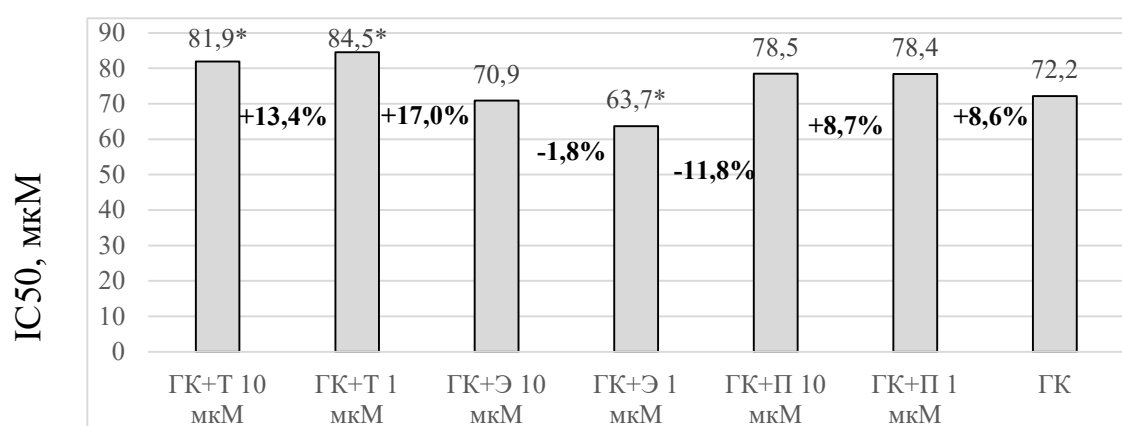
**Б)** Влияние прогестерона (1 мкМ, 10 мкМ) на антипролиферативное действие глицирризиновой кислоты (\* $p < 0,05$ ); контроль 100%.



**В) Влияние тестостерона (1 мкМ, 10 мкМ) на антипролиферативное действие глицирризиновой кислоты (\* $p < 0,05$ ); контроль 100%.**

В присутствии тестостерона в концентрации 10 мкМ и 1 мкМ IC<sub>50</sub> ГК увеличилась на 13,4% ( $p < 0,05$ ) и 17% ( $p < 0,05$ ) соответственно, в присутствии эстрадиола в концентрации 10 мкМ и 1 мкМ – уменьшилась на 1,8% и 11,8% ( $p < 0,05$ ) соответственно, в присутствии прогестерона в концентрации 10 мкМ и 1 мкМ – увеличилась на 8,7% и 8,6% соответственно (Рисунок 2).

**Рисунок 2.** Концентрации полумаксимального ингибирования глицирризиновой кислоты (препарата Эпиген Интим) в присутствии половых стероидных гормонов.



Примечание: ГК – глицирризиновая кислота, Т – тестостерон, Э – эстрадиол, П – прогестерон; \*статистически значимое влияние стероидных гормонов на эффект ГК,  $p < 0,05$ .

### **Результаты хемилюминесцентного определения антиоксидантной активности глицирризиновой кислоты**

Антиоксидантное действие ГК может дополнительно повышать ее

онкопротективный потенциал и усиливать антипролиферативное действие [Agarwal M. K. et al., 2005]. В связи с этим проведена оценка антиоксидантной активности аммония глицирризината и препарата глицирризиновой кислоты (препарат Эпиген Интим). Параметры стимулированной пероксидом водорода люминолзависимой ХЛ представлены в Таблице 3.

**Таблица 3.** Параметры стимулированной пероксидом водорода люминолзависимой ХЛ, число экспериментов n=3.

|                                        | Контроль    | Препарат<br>ГК 0,1% | Субстанция<br>ГК 0,1% | Препарат<br>ГК 80 мкМ | Субстанция<br>ГК 80 мкМ |
|----------------------------------------|-------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
| Спонтанная ХЛ                          | 0,027±0,001 | 0,029±0,001         | 0,025±0,001           | 0,029±0,001           | 0,021±0,001             |
| Стимулированная<br>максимальная ХЛ     | 8,679±0,03  | 0,779±0,01*         | 1,923±0,01*           | 2,304±0,02*           | 2,538±0,01*             |
| Интенсивность<br>стимулированной<br>ХЛ | 8,652±0,03  | 0,75±0,01*          | 1,898±0,01*           | 2,275±0,02*           | 2,517±0,01*             |
| Относительная<br>интенсивность ХЛ      | -           | 0,09±0,001**        | 0,22±0,001            | 0,26±0,001            | 0,29±0,001              |

Примечание: \*статистически значимое различие от контроля,  $p<0,05$ ;  
\*\*статистически значимое различие между соединениями,  $p<0,05$ .

Аммония глицирризинат и препарат Эпиген Интим обладают выраженным антиоксидантным действием, при этом препарат Эпиген Интим в концентрации 0,1% оказывает более выраженное антиоксидантное действие по сравнению с субстанцией аммония глицирризината в той же концентрации (относительная интенсивность ХЛ 0,09±0,001 против 0,22±0,001,  $p<0,05$ ). Это может быть обусловлено наличием таких вспомогательных веществ в составе препарата Эпиген Интим, как аскорбиновая, фумаровая и фолиевая кислота, известных своими антиоксидантными свойствами.

### **Результаты клинической оценки применения препарата ГК при ВПЧ-ассоциированных поражениях шейки матки**

В исследование включена 51 пациентка. Медиана возраста составила 36 (30; 39) лет. Менструальный цикл у большинства пациенток соответствовал норме, у 1 (2%) пациентки отмечались обильные болезненные менструации при регулярной менструальном цикле, еще у 1 (2%) пациентки – скудные. У 16

(31,4%) отсутствовали беременности в анамнезе, у 5 (9,8%) была 1 беременность, у 13 (25,5%) было 2 беременности, у 17 (66,7%) – 3 и более. Роды в анамнезе отсутствовали у 18 (35,3%) пациенток, у 10 (19,6%) пациенток были 1 роды в анамнезе, у 20 (39,2%) – 2 родов, у 3 (5,9) – 3 родов. Вмешательства на шейке матки в анамнезе отсутствовали у 41 (80,6%) пациенток, у 4 (7,9%) пациенток в анамнезе отмечена биопсия шейки матки, у 3 (5,9%) – диатермокоагуляция, у 2 (4,0%) – криодеструкция, у 1 (2,0%) – лазерная деструкция.

Гормональный статус на момент включения в исследование: медиана эстрадиола 38 (33; 44) пг/мл, ЛГ 4,6 (4,2; 4,8) мМЕ/мл, ФСГ 4,8 (4,6; 5,2) мМЕ/мл, тестостерона общего 0,8 (0,6; 0,8) нмоль/л, средний уровень прогестерона 1,3 ( $\pm 0,5$ ) нмоль/л, что соответствовало нормальным уровням половых стероидных гормонов у женщин с учетом возраста и фазы менструального цикла. Уровни половых стероидных и гонадотропных пептидных гормонов в подгруппах пациенток в зависимости от результатов цитологического заключения представлены в Таблице 4.

**Таблица 4.** Уровни половых стероидных и гонадотропных пептидных гормонов в подгруппах пациенток в зависимости от результатов цитологического заключения. Данные представлены в виде медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1 – Q3).

|       | Эстрадиол,<br>пг/мл  | Тестостерон<br>общий, нмоль/л | Прогестерон,<br>нмоль/л | ЛГ,<br>мМЕ/мл     | ФСГ,<br>мМЕ/мл    |
|-------|----------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|
| ASCUS | 40,0<br>(34,5; 45,5) | 0,8 (0,6; 0,9)                | 1,5 (0,5; 1,6)          | 4,6<br>(4,2; 5,2) | 5,2<br>(4,5; 6,0) |
| LSIL  | 40,0<br>(33,0; 44,0) | 0,8 (0,6; 0,9)                | 1,4 (1,1; 1,8)          | 4,6<br>(4,2; 4,8) | 4,8<br>(4,5; 5,2) |
| HSIL  | 32<br>(32,0; 36,0)   | 0,8 (0,8; 0,8)                | 1,1 (0,4; 1,2)          | 4,2<br>(4,2; 4,6) | 4,8<br>(4,8; 5,2) |

Уровень эстрадиола у пациенток с цитологическим заключением HSIL был ниже по сравнению с пациентками с ASCUS и LSIL (коэффициент корреляции  $t = -0,757$ ,  $p=0,453$ ).

По результатам цитологического исследования эпителия шейки матки у

12/51 (23,5%) пациенток получен ASCUS, у 32/51 (62,8%) – LSIL, у 7/51 (13,7%) – HSIL. Гистологическое подтверждение тяжелой дисплазии (CIN III) получено в 5 случаях из 7 (71,4%).

У 18/51 (35,3%) пациенток отмечена высокая/клинически значимая вирусная нагрузка ВПЧ-ВР. У 7/51 (13,7%) пациенток обнаружено 2 и более штамма ВПЧ. Наиболее часто выявлялся 16 тип ВПЧ (49,9% случаев), далее по частоте выявления 51 и 31 типы, которые выявлялись в 16,6% случаев. При оценке частоты выявления высокой/клинически значимой вирусной нагрузки ВПЧ-ВР в зависимости от результата цитологического заключения установлено, что в группе ASCUS доля таких пациенток составила 25%, в группе LSIL – 37,5%, в группе HSIL – 42,9%. Таким образом, при возрастании частоты выявления высокой/клинически значимой вирусной нагрузки ВПЧ-ВР наблюдается прогрессирование плоскоклеточного интраэпителиального поражения шейки матки (коэффициент корреляции  $t = 0,86$ ,  $p=0,03$ ).

Коэкспрессия онкобелков p16/Ki67 обнаружена у 7/51 (13,7%) пациенток. При анализе подгруппы пациенток с коэкспрессией онкобелков p16/Ki67 не выявлено значимых различий от основной когорты пациенток в отношении анамнестических данных, таких как, курение, количество беременностей (в среднем 2) и родов (в среднем 2), параметрам менструального цикла, вмешательств на шейке матки. У 5 (71,4%) этих пациенток выявлен 16 тип ВПЧ, у 3 (42,9%) пациенток – 2 штамма ВПЧ, вирусная нагрузка была высокой во всех случаях.

Уровни половых стероидных и гонадотропных пептидных гормонов в зависимости от наличия или отсутствия коэкспрессии онкобелков p16/Ki67 представлены в Таблице 5.

**Таблица 5.** Уровни половых стероидных и гонадотропных пептидных гормонов в подгруппах пациенток в зависимости от результатов коэкспрессии онкобелков p16/Ki67. Данные представлены в виде медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1 – Q3).

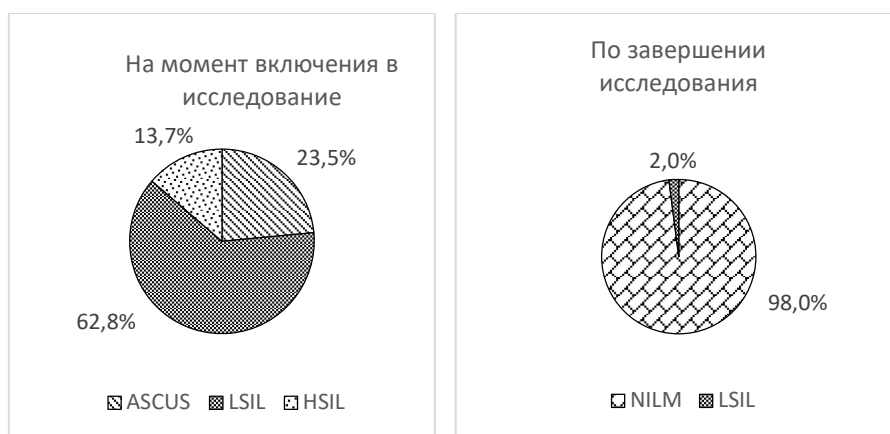
|                                             | Эстрадиол,<br>пг/мл  | Тестостерон<br>общий, нмоль/л | Прогестерон,<br>нмоль/л | ЛГ,<br>мМЕ/мл     | ФСГ,<br>мМЕ/мл    |
|---------------------------------------------|----------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|
| Козэкспрессия<br>онкобелков<br>p16/Ki67     | 34,0<br>(32,0; 46,0) | 0,6 (0,8; 0,8)                | 1,1 (0,7; 1,5)          | 4,2<br>(4,6; 4,8) | 4,8<br>(4,8; 5,2) |
| Нет козэкспрессии<br>онкобелков<br>p16/Ki67 | 38,0<br>(33,0; 44,0) | 0,7 (0,8; 0,8)                | 1,4 (1,0; 1,8)          | 4,2 (4,5;<br>4,9) | 4,5<br>(4,8; 5,2) |

Уровень эстрадиола в подгруппе пациенток с козэкспрессией онкобелков p16/Ki67 был ниже по сравнению с пациентками без козэкспрессии онкобелков p16/Ki67 ( $p=0,467$ ).

По результатам кольпоскопического заключения аногенитальные кондиломы выявлены у 18/51 (35,3%) пациенток, признаки хронического цервицита – у 30/51 (58,8%) пациенток.

Через 90 дней от начала наблюдения по результатам цитологического исследования эпителия шейки матки у 50/51 (98,0%) пациенток установлено цитологическое заключение NILM (отсутствие интраэпителиального поражения шейки матки) с отсутствием козэкспрессии онкобелков p16/Ki67 ( $p<0,001$ ). У 1/51 (2,0%) пациентки сохранялось LSIL (плоскоклеточное интраэпителиальное поражение низкой степени) с козэкспрессией онкобелков p16/Ki67 на фоне снижения вирусной нагрузки (Рисунок 3, 4). Данной пациентке рекомендована конизация шейки матки.

**Рисунок 3.** Динамика результатов цитологического исследования на фоне применения препарата глицирризиновой кислоты.



У 48/51 (94,1%) пациенток не выявлено ДНК ВПЧ-ВР, у 1/51 (2,0%)

сохранялась высокая вирусная нагрузка, у 2/51 (3,9%) пациенток сохранялась клинически значимая вирусная нагрузка ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 5).

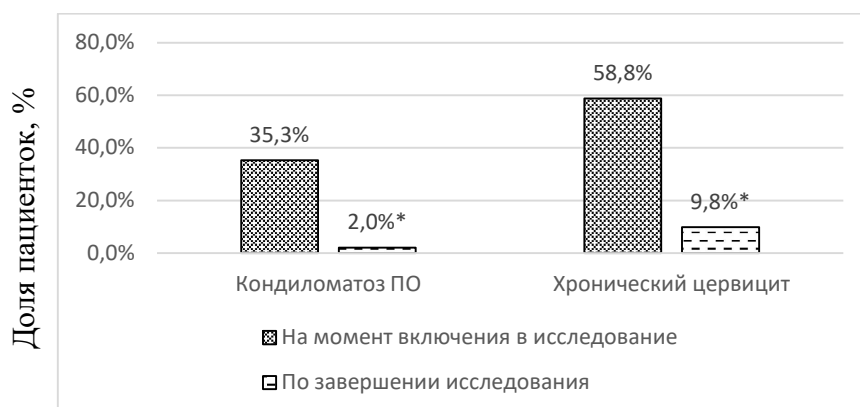
**Рисунок 4.** Динамика вирусной нагрузки ВПЧ-ВР и коэкспрессии онкобелков p16/Ki67 на фоне применения препарата глицирризиновой кислоты.



Примечание: \*статистически значимое снижение доли пациенток с высокой/клинически значимой вирусной нагрузкой ВПЧ-ВР,  $p < 0,001$ ; \*\* статистически значимое снижение доли пациенток с коэкспрессией онкобелков p16/Ki67,  $p = 0,009$

По результатам кольпоскопического заключения аногенитальные кондиломы обнаружены у 1/51 (2,0%) пациентки, признаки хронического цервицита – у 5/51 (9,8%) пациенток ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 7).

**Рисунок 7.** Динамика кольпоскопической картины на фоне применения препарата глицирризиновой кислоты.



Примечание: \*статистически значимое снижение доли пациенток с аногенитальными кондиломами и признаками хронического цервицита,  $p < 0,001$ .

За период применения препарата ГК отсутствовали случаи прекращения применения в связи с непереносимостью препарата, а также нежелательные явления, связанные с применением препарата.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

Перспективными направлениями дальнейшей разработки темы диссертационного исследования являются уточнение механизмов влияния уровня эстрогенов, тестостерона и прогестерона в сыворотке крови на течение плоскоклеточного интраэпителиального поражения шейки матки; уточнение механизмов влияния половых стероидных гормонов на эффективность препарата ГК; оценка влияния половых стероидных гормонов на эффективность других препаратов, назначаемых с целью лечения и профилактики прогрессирования ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки.

### **ВЫВОДЫ**

1. Препарат ГК в концентрации 40, 80, 160 мкМ не оказывает цитотоксического действия на нормально делящиеся клетки.
2. Антипролиферативное действие препарата ГК *in vitro* в отношении клеток аденокарциномы шейки матки линии HeLa является концентрационнозависимым, более выраженным по сравнению с субстанцией ГК и может усиливаться и ослабляться дополнительным введением половых стероидных гормонов: тестостерон и прогестерон в концентрации 10 и 1 мкМ ослабляют антипролиферативное действие ГК; низкие концентрации эстрадиола (1 мкМ) усиливают антипролиферативное действие ГК ( $p < 0,05$ )
3. Антиоксидантное действие препарата ГК является более выраженным по сравнению с субстанцией ГК ( $p < 0,05$ ).
4. По мере прогрессирования ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки повышается частота выявления высокой/клинически значимой вирусной нагрузки ВПЧ-ВР (коэффициент корреляции  $t=0,86$ ,  $p=0,03$ ). Вирусная нагрузка ВПЧ-ВР была высокой у всех пациенток с коэкспрессией онкобелков p16/Ki67.
5. Уровень эстрадиола у пациенток с цитологическим заключением HSIL ниже по сравнению с подгруппами ASCUS и LSIL, у пациенток с коэкспрессией

онкобелков p16/Ki67 ниже по сравнению с пациентками без коэкспрессии онкобелков p16/Ki67, что может указывать на взаимосвязь между уровнем эстрадиола и степенью тяжести плоскоклеточного интраэпителиального поражения шейки матки (коэффициент корреляции  $t = -0,757$ ,  $p = 0,000$ ,  $p = 0,453$ ).

7. Достигнуты высокие показатели эффективности применения препарата ГК у женщин репродуктивного возраста с ВПЧ-ассоциированными поражениями шейки матки: 98,0% по результатам цитологического исследования ( $p < 0,001$ ), 83,3% по снижению вирусной нагрузки ВПЧ-ВР ( $p < 0,001$ ), 85,7% по показателю коэкспрессии онкобелков p16/Ki67 ( $p = 0,009$ ).

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. У пациенток с ВПЧ-ассоциированными поражениями шейки матки определение уровня эстрадиола в сыворотке крови с последующей коррекцией при необходимости, вероятно, может привести к улучшению прогноза или повышению эффективности назначаемой терапии препаратом ГК.

2. Назначение препарата ГК пациенткам с LSIL патогенетически обосновано – антипролиферативное действие препарата ГК Эпиген Интим подтверждено экспериментально и клинически.

3. Наиболее выраженный эффект от применения препарата ГК при ВПЧ-ассоциированных поражениях шейки матки можно ожидать у пациенток репродуктивного возраста с нормальным уровнем половых стероидных гормонов, у пациенток получающих менопаузальную гормональную терапию в форме комбинированной эстроген-гестагенной терапии либо монотерапии эстрогенами в низких и ультранизких дозах.

4. Для контроля эффективности терапии ВПЧ-ассоциированных поражений шейки матки целесообразна динамическая оценка уровня вирусной нагрузки ВПЧ-ВР, результатов цитологического исследования микропрепарата шейки матки, наличия коэкспрессии онкобелков p16/Ki67.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Филимонова, М. С. Различные лекарственные формы глицирризиновой кислоты и возможности их применения при вирус-ассоциированных и воспалительных заболеваниях / М. С. Филимонова, Н. Л. Шимановский // Химико-фармацевтический журнал. – 2023. – № 57 (4). – С. 3-11.
2. Филимонова, М. С. Влияние глицирризиновой кислоты на жизнеспособность клеток аденокарциномы шейки матки линии Hela при разных концентрациях половых стероидных гормонов / М. С. Филимонова, Н. Л. Шимановский // Химико-фармацевтический журнал. – 2024. – № 58 (1). – С. 3-9.
3. Филимонова, М. С. Влияние глицирризиновой кислоты на жизнеспособность клеток аденокарциномы шейки матки линии Hela при разных концентрациях половых стероидных гормонов / М. С. Филимонова, Н. Л. Шимановский // Сборник тезисов VI Съезда фармакологов России. – 2023. – № 86 (приложение). – С. 151-152.
4. Филимонова, М. С. Оценка эффективности применения активированной глицирризиновой кислоты у пациенток с ВПЧ-ассоциированными поражениями шейки матки с учетом уровня половых стероидных и гонадотропных пептидных гормонов / Ж. А. Мандрыкина, Ю. Э. Доброхотова, Д. М. Ибрагимова, М. Д. Казиева, М. С. Филимонова, Н. Л. Шимановский, А. Р. Ахметгалиев // РМЖ. Мать и дитя. – 2024. № 7 (2). – С. 127-134.