

РОЛЬ ПРОБИОТИКОВ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, ПОДДЕРЖИВАЮЩИХ АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС И ФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ СЕМЕННИКОВ МЫШЕЙ, ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССАХ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДАМИ

П.И. Бабенкова¹, Е.А. Чиркин¹, М.Ю. Сыромятников^{1,2},
О.В. Зверева², А.А. Толкачева², О.С. Корнеева², А.П. Гуреев^{1,2*}

¹Воронежский государственный университет,
394018, Воронеж, Университетская пл., 1; *эл. почта: gureev@bio.vsu.ru

²Воронежский государственный университет инженерных технологий,
394036, Воронеж, ул. Сакко и Ванцетти, 72

Известно, что системное индуцированное липополисахаридами (ЛПС) воспаление затрагивает целый ряд органов, в том числе и мужскую репродуктивную систему. В данном исследовании мы продемонстрировали, что индуцированное инъекциями ЛПС воспаление вызывает окислительный стресс в семенниках мышей, снижает экспрессию генов, кодирующих каталитическую субъединицу глутамат-цистеинлигазы (*Gclc*) и супероксиддисмутазы 2 (*Sod2*). Воспаление подавляло транскрипцию генов, участвующих в дифференциации и метаболической регуляции клеток семенников и созревании сперматозоидов — в группе ЛПС экспрессия генов *Amh*, *Lepr*, *Eif2b4* была примерно в 3 раза ниже по сравнению с контрольной группой. Приём пробиотических микроорганизмов вызывал снижение интенсивности перекисного окисления липидов, что проявлялось в снижении уровня диеновых конъюгатов (ДК) по сравнению с группой ЛПС, способствовал поддержанию уровня экспрессии генов, поддерживающих антиоксидантный статус, а также генов, поддерживающих функциональность семенников мышей. Полученные данные позволяют рассматривать пробиотики в качестве потенциального средства для поддержания репродуктивной функции мужчин на фоне воспалительных процессов.

Ключевые слова: пробиотики; сперматогенез; липополисахариды; воспаление; окислительный стресс; перекисное окисление липидов

DOI: 10.18097/PBMCR1490

ВВЕДЕНИЕ

За период с 2000 по 2018 гг. в России общее число мужчин с бесплодием увеличилось с 22348 до 47886 человек, то есть более, чем в два раза. На 82% возросло количество больных с первично установленным мужским бесплодием [1]. Воспаление оказывает значительное влияние на мужскую репродуктивную систему, вызывая серьёзные нарушения функциональности семенников. Воспаление может возникать как из-за бактериальных и вирусных патогенов, так и из-за аутоиммунных процессов. Экспериментально воспаление обычно вызывают инъекциями липополисахаридов (ЛПС), являющихся компонентами клеточной стенки грамотрицательных бактерий, обитающих в микрофлоре кишечника. В норме системы организма способны нейтрализовать поступающие в кровяное русло молекулы ЛПС, однако если нарушается барьерная функция кишечника или происходит массовое разрушение бактериальных клеток, системный уровень ЛПС повышается, что ведёт к интоксикации организма [2].

При развитии системного воспаления в семенниках, а именно в клетках Сертоли, активируется множество провоспалительных генов, которые также осуществляют межклеточную коммуникацию. К их числу относятся гены, кодирующие интерлейкин 1-альфа (*Il1α*), интерлейкин 6 (*Il6*) [3, 4].

Регуляция процессов сперматогенеза, активности клеток Сертоли и их клеточной организации также происходит при участии интерлейкинов. При попадании медиаторов воспаления из крови в семенники наблюдается нарушение работы сперматогенных клеток, что ведёт к торможению сперматогенеза [5]. Клетки врождённой иммунной системы вырабатывают активные формы кислорода (АФК), такие как супероксид и пероксид водорода, которые направлены на уничтожение патогенов. Длительный воспалительный процесс увеличивает выработку АФК, вызывая развитие окислительного стресса (ОС) [6]. АФК являются одним из значимых факторов патологий мужской репродуктивной системы; по разным оценкам они способны вызывать до 80% структурных повреждений сперматозоидов [7].

В настоящий момент для снижения ОС в семенниках мужчин используют соединения, обладающие антиоксидантной активностью, такие как фолиевая кислота, L-карнитин, L-аргинин, N-ацетилцистеин, цинк, селен, витамин Е, производные инозитола и др [8]. Пробиотические смеси обладают значительным антиоксидантным потенциалом, так как обладают собственными антиоксидантными системами, а также производят соответствующие метаболиты, повышающие защиту организма от АФК [9]. Пробиотики — это живые непатогенные микроорганизмы, используемые



для улучшения микробного баланса, зачастую в желудочно-кишечном тракте, благодаря их свойству имитировать гомеостатические эффекты интактной микробиоты [10]. Значительная часть полученных данных свидетельствует о противовоспалительном действии пробиотиков, которые, в свою очередь, отражают иммунную толерантность, существующую между хозяином и его микробиотой [11, 12]. Многие исследования, посвящённые оси “кишечник-мозг”, подтвердили влияние микробиоты кишечника на функции и активность мозга [13–15], а гипоталамо-гипофизарно-тестикулярная (ГПТ) ось рассматривается как классический нейронный регуляторный путь в процессе стероидогенеза [16, 17]. В связи с этим мы предполагаем, что ось “кишечник-микробиота-семенники” может быть важным путём регуляции работы мужских половых органов, а пробиотики в свою очередь можно использовать в качестве терапевтической стратегии для снижения воспаления и ОС в тканях, ответственных за сперматогенез.

Целью нашей работы было изучение влияния различных пробиотических организмов на уровень экспрессии маркеров воспаления и ОС в семенниках, а также их воздействие на гормональную регуляцию сперматогенеза на фоне ЛПС-индуцированного воспаления.

МЕТОДИКА

Животные

В эксперименте использовали двухмесячных самцов мышей линии C57Bl/6, полученных из филиала Научного центра биомедицинских технологий питомника “Столбовая” (Москва, Россия). Животных содержали в стандартных условиях вивария при 25°C, относительной влажности воздуха не менее 40% и 12-часовом цикле свет/темнота, доступ к пище и воде был свободным.

План эксперимента

В начале эксперимента 40 самцов мышей случайным образом разделили на семь групп. Животные первой группы (Контроль) (n=6) получали стандартную лабораторную диету в течение 3 недель. На 4-й неделе контрольным мышам в течение 7 дней внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (“Гротекс”, Россия) объёмом 0,2 мл. Животные второй группы (ЛПС) мышей (n=6) получали стандартную лабораторную диету. На 4-й неделе эксперимента мышам внутрибрюшинно вводили липополисахариды (ЛПС) (препарат Пирогенал, НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Россия) в дозе 375 мкг/кг/день объёмом 0,2 мл. Животные третьей (n=6), четвёртой (n=5), пятой (n=6), шестой (n=5) и седьмой (n=6) групп получали лабораторный рацион, смешанный с пробиотическими молочнокислыми бактериями: *Weissella confusa*, *Weizmannia coagulans*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius* и коммерческий пробиотический продукт (КПП), соответственно, в соотношении 1×10^8 КОЕ/грамм рациона.

КПП — кисломолочный продукт, в состав которого входят *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* и *Limosilactobacillus fermentum*. Среднесуточное потребление корма мышами составляло $5,1 \pm 0,08$ г, что соответствовало потреблению каждой мышью в среднем $5,1 \times 10^8$ бактерий в день. 3-я-7-я группы мышей также получали инъекции ЛПС на 4 неделе эксперимента в течение 7 дней в дозе 375 мкг/кг/день.

Измерение концентрации продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ)

Концентрацию диеновых конъюгатов (ДК) [18] и малонового диальдегида (МДА) [19] измеряли спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра Hitachi U-2900 (“Hitachi High-Technologies”, Япония). Исследуемый материал предварительно взвешивали и гомогенизировали в автоматическом гомогенизаторе Biorpgr-6 (“Allsheng”, Китай) в 1 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,4. Для измерения ДК к 0,125 мл гомогената добавляли 0,125 мл физиологического раствора (“МОСФАРМ”, Россия), 1,5 мл гептана и 1,5 мл изопропилового спирта (“РФК”, Россия). Полученную смесь центрифугировали 10 мин при 3000 g и температуре 4°C. Затем к супернатанту приливали дистиллированную воду в соотношении 2:1, перемешивали и далее дожидались расслаивания фаз. Верхнюю гептановую фазу переносили в чистую пробирку и добавляли 0,5 мл этилового спирта в соотношении 1:2. Контролем служил 96% этиловый спирт. Измерение уровня ДК проводили на спектрофотометре при длине волны 233 нм.

Для измерения концентрации МДА в пробирки отбирали 0,4 мл предварительно подготовленного супернатанта и добавляли 0,6 мл 20% трихлоруксусной кислоты. Пробы инкубировали на холоде в течение 30 мин при перемешивании каждые 10 мин. Далее центрифугировали пробы 10 мин при 10000 g и температуре 4°C. Отбирали 300 мкл супернатанта в новые пробирки, добавляли 3 мл трихлоруксусной кислоты и 1 мл 0,8% тиобарбитуровой кислоты. Содержимое перемешивали и помещали пробирки на водяную баню при 100°C на 40 мин и затем охлаждали. Измерение уровня МДА проводили на спектрофотометре при длине волны 530 нм и 580 нм.

Измерение экспрессии генов

Выделение суммарной РНК осуществлялось из ткани семенников при помощи коммерческого набора РНК ExtractRNA (“Евроген”, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Обратную транскрипцию проводили при помощи комплекта реагентов для получения кДНК на матрице РНК РЕВЕРТА-L (“AmpliSens”, Россия) в соответствии с прилагаемым протоколом.

Оценку уровня экспрессии генов проводили при помощи количественного ПЦР-анализа. В состав реакционной смеси (объём 20 мкл) входили: 4 мкл qPCRmix-HS sybr, 1 мкл смесь прямого и обратного праймера, 1 мкл кДНК, 14 мкл mQ.

Условия реакции: общая денатурация 95°C 3 мин; денатурация в начале цикла при 95°C 30 с; отжиг праймеров 59°C в течение 30 с; элонгация 72°C в течение 30 с. Количество циклов составляло 45. Праймеры были подобраны к генам, которые отвечают на регуляцию антиоксидантной защиты организма, участвуют в регуляции сперматогенеза или являются маркерами воспалительных процессов в семенниках. Последовательности праймеров представлены в таблице 1. Праймеры разработаны в программе Primer-BLAST.

Полученные результаты нормировали по экспрессии гена *Gapdh*.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 12. Результаты выражали как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Данные анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Для определения уровня значимости использовали тест Бонферрони. В данной работе обсуждаются статистически значимые различия ($p < 0,05$).

Таблица 1. Последовательности праймеров, используемых для оценки экспрессии

№	Название гена	Последовательность праймеров
1	<i>Gapdh</i>	F: 5'-CATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3'; R: 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTTCAG-3'
2	<i>Eif2b4</i>	F: 5'-GCTTGCAACAGGTAGCTTGT-3'; R: 5'-CCCCTCACTCACCTTGACAT-3'
3	<i>Crisp4</i>	F: 5'-ATGGATGTGGGTATGGCAGT-3'; R: 5'-GCAGCTGAACCTCAACTCAC-3'
4	<i>Lepr</i>	F: 5'-CTTCTCTGTGGACAGAACCAGC-3'; R: 5'-AGCACTGAGTGACTCCACAGCA-3'
5	<i>Amh</i>	F: 5'-CCGCTATTTGGTGCTAACCGTG-3'; R: 5'-AAGGCTTGCAGCTGATCGATGC-3'
6	<i>Gclc</i>	F: 5'-GGGGTGACGAGGTGGAGTA-3'; R: 5'-GTTGGGGTTTGTCTCTCCC-3'
7	<i>Sod2</i>	F: 5'-CAGACCTGCCTTACGACTATGG-3'; R: 5'-CTCGGTGGCGTTGAGATTGTT-3'
8	<i>Prdx3</i>	F: 5'-GTGGTTTGGGCCACATGAAC-3'; R: 5'-TGGCTTGATCGTAGGGGACT-3'
9	<i>Nfe2l2</i>	F: 5'-CTCTCTGAACCTCCTGGACGG-3'; R: 5'-GGGTCTCCGTAAATGGAAG-3'
10	<i>Il1b</i>	F: 5'-TTGACGGACCCAAAAGATG-3'; R: 5'-AGAAGGTGCTCATGT CCTCA-3'
11	<i>Il6</i>	F: 5'-CGGAGAGGAGACTTCACAGAG-3'; R: 5'-CATTTCCACGATTCCCAAGA-3'
12	<i>Tnf</i>	F: 5'-TATGGCTCAGGGTCCAATC-3'; R: 5'-GGAAAGCCCATTTGAGTCCT-3'
13	<i>Gfap</i>	F: 5'-CCACGTTAAGCTAGCCCTGGACAT-3'; R: 5'-CTCACCATCCCGCATCTCCACAGT-3'
14	<i>Ptgs2</i>	F: 5'-AGTCCGGGTACAGTCACACTT-3'; R: 5'-TTCCAATCCATGTCAAAACCGT-3'

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние пробиотиков на экспрессию генов, отвечающих за гормональную регуляцию сперматогенеза

В группе мышей, получавших инъекции ЛПС, экспрессия генов *Amh*, *Lepr*, *Eif2b4* была примерно в три раза ниже по сравнению с контрольной группой (все $p < 0,05$) (табл. 2). Ген *Amh* кодирует белок АМН, который, связываясь с рецептором антимюллерова гормона типа 2, вызывает регрессию мюллеровых протоков у эмбриона мужского пола; этот белок также играет роль в дифференцировке и функционировании клеток Лейдига [20]. Ген *Lepr* кодирует рецептор лептина — гормона жировой ткани, который регулирует энергетические и нейроэндокринные процессы метаболизма. *LepR* обнаружен во всех тканях мужской половой системы, что указывает на его ключевую роль в поддержании репродуктивной функции [21]. Белок, кодируемый геном *Eif2b4*, представляет собой дельта-субъединицу белка фактора инициации транскрипции эукариот 2В, соответственно, нормальный уровень экспрессии данного гена необходим для протекания сперматогенеза [22]. Ранее сообщалось о нарушении сперматогенеза и снижении уровня тестостерона при развитии системного воспаления [4, 23].

ЛПС вызывает развитие разнообразных структурных изменений в ткани семенников, так в семенниках резко возрастает количество извитых семенных канальцев с деструктивными изменениями, наблюдается снижение количества сперматогоний и сперматоцитов [23]. Все эти структурные изменения в семенниках сопровождались нарушениями метаболизма в клетках сперматогенного эпителия [23]. Наличие патогенных молекул, проникающих из кровотока при системном воспалении, может нарушать нормальную функцию клеток Сертоли и сперматогенных клеток, что приводит к нарушениям процесса сперматогенеза в целом [4]. При этом мы не обнаружили значимых различий в подвижности сперматозоидов между животными контрольной группы и животными, получавшими инъекции ЛПС [24]. Однако полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что индуцированное воспаление в семенниках вызывает угнетение сперматогенеза на уровне регуляции транскрипции, что потенциально может являться причиной снижения репродуктивной функции.

Изучение биологически активных веществ эндокринной системы организма показало, что определённые гормоны, участвующие в стероидогенезе, активно синтезируются в толстой кишке под влиянием микробиоты кишечника [25, 26]. Она также напрямую вырабатывает андрогены, поэтому изменения в составе микроорганизмов могут модулировать метаболизм мужских гормонов. Кишечный глюкуронидированный тестостерон и дигидротестостерон, экскретируемые печенью, могут быть эффективно восстановлены в активную форму микробиотой кишечника, поскольку эта форма не используется для выведения из организма;

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКОВ НА СЕМЕННИКИ МЫШЕЙ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

Таблица 2. Уровень относительной экспрессии генов \pm SEM

Контроль	ЛПС	ЛПС + <i>L. plantarum</i>	ЛПС + <i>L. salivarius</i>	ЛПС + <i>W. confusa</i>	ЛПС + <i>W. coagulans</i>	ЛПС + КПП
<i>Eif2b4</i>						
1,99 \pm 0,57	0,66 \pm 0,24*	0,56 \pm 0,43	0,48 \pm 0,13	0,57 \pm 0,54	0,22 \pm 0,25	3,39 \pm 2,65
<i>Crisp4</i>						
0,69 \pm 0,35	0,78 \pm 0,43	0,53 \pm 0,42	2,87 \pm 0,82*	0,41 \pm 0,31	5,45 \pm 2,53	1,69 \pm 1,60
<i>Lepr</i>						
2,75 \pm 0,89	1,00 \pm 0,29*	1,94 \pm 0,95	2,10 \pm 0,67	1,42 \pm 0,43	1,11 \pm 0,92	1,36 \pm 0,47
<i>Amh</i>						
1,99 \pm 0,47	0,69 \pm 0,30*	0,90 \pm 0,54	1,79 \pm 0,52	0,55 \pm 0,44	0,52 \pm 0,60	3,39 \pm 2,66
<i>Gclc</i>						
4,29 \pm 1,16	0,95 \pm 0,41**	1,67 \pm 1,01*	2,93 \pm 0,72	1,24 \pm 0,74	1,36 \pm 1,07	1,63 \pm 0,68*
<i>Sod2</i>						
2,74 \pm 0,61	1,00 \pm 0,33**	1,59 \pm 0,93	2,37 \pm 0,60	1,05 \pm 0,62*	1,52 \pm 0,86	2,25 \pm 0,46
<i>Prdx3</i>						
2,35 \pm 0,68	1,00 \pm 0,47	1,89 \pm 1,17	1,21 \pm 0,29	0,78 \pm 0,39	0,75 \pm 0,47	1,37 \pm 0,52
<i>Nfe2l2</i>						
3,46 \pm 1,46	1,00 \pm 0,53	1,49 \pm 0,99	1,95 \pm 0,61	1,13 \pm 0,57	0,89 \pm 0,59	1,89 \pm 0,63
<i>Il1b</i>						
0,37 \pm 0,13	0,48 \pm 0,28	2,13 \pm 1,19***	0,23 \pm 0,07	1,38 \pm 0,81*	0,23 \pm 0,11	0,57 \pm 0,35
<i>Il6</i>						
0,63 \pm 0,31	0,73 \pm 0,4	0,43 \pm 0,38	1,00 \pm 0,59	0,78 \pm 0,36	0,99 \pm 0,28	0,41 \pm 0,24
<i>Tnf</i>						
0,67 \pm 0,22	1,18 \pm 0,76	1,29 \pm 0,86	0,91 \pm 0,36	1,02 \pm 0,38	1,13 \pm 0,24	0,79 \pm 0,47
<i>Gfap</i>						
1,27 \pm 0,53	1,18 \pm 0,55	1,38 \pm 0,77	0,71 \pm 0,23	0,99 \pm 0,63	0,38 \pm 0,22	1,06 \pm 0,57
<i>Ptgs2</i>						
0,24 \pm 0,09	0,63 \pm 0,37	0,39 \pm 0,22	1,00 \pm 0,35	0,65 \pm 0,32	0,91 \pm 0,29	0,63 \pm 0,41

Примечание. * p <0,05, ** p <0,01 – различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой, *** p <0,05 – различия статистически значимы по сравнению с группой, получавшей инъекции ЛПС. Результаты выражены в виде средних \pm SEM.

большинство андрогенов присутствует в дистальном отделе кишечника [27]. Помимо деглюкуронидазной активности, некоторые таксоны способны экспрессировать ферменты для метаболизма стероидных гормонов. Среди представителей микробиоты кишечника такие бактерии, как *Butyricicoccus desmolans*, *Clostridium cadaveris*, *Propionimicrobium lymphophilum*, *Clostridium scindens* и *Clostridium innocuum* экспрессируют стероид-17,20-десмолазу, 20 β -HSDH, 20 α -HSDH, 3 α -HSDH или 5 β -редуктазы [28]. Таким образом, микробиота кишечника вовлекается в метаболизм андрогенов, и её специфическая роль нуждается в более детальном изучении.

Мы обнаружили признаки положительного влияния пробиотиков на гормональную регуляцию сперматогенеза. Экспрессия гена *Crisp4* была статистически значимо увеличена в группе

мышей, получавших *L. salivarius* (p <0,05), у животных, получавших *W. coagulans*, это увеличение было на уровне статистической тенденции (p =0,09). Данный богатый цистеином секреторный белок 4 (*Crisp4*) связан с процессом созревания сперматозоидов и играет важную роль в оплодотворении [29]. Все изучаемые пробиотики препятствовали ЛПС-индуцированному снижению экспрессии *Amh* и *Lepr*. *W. confusa*, *L. plantarum* и КПП препятствовали ЛПС-зависимому снижению экспрессии *Eif2b4* (табл. 2).

Описанные выше и полученные нами данные говорят о влиянии пробиотических микроорганизмов на гормональную регуляцию сперматогенеза. Однако необходимы дальнейшие исследования путей регуляции процессов, обеспечивающих мужскую фертильность, в частности, с помощью добавления в рацион пробиотиков.

Антиоксидантные эффекты пробиотиков при ЛПС-индуцированном системном воспалении

Серьёзным последствием развивающегося системного воспаления является развитие ОС, что проявляется в активизации процессов ПОЛ. В семенниках мышей, получавших инъекции ЛПС, наблюдалась тенденция к увеличению уровня продуктов ПОЛ, таких как ДК (на 11%) и МДА (на 34%) ($p>0,05$). ДК являются токсическими метаболитами, способными вызывать повреждение ряда биологически активных молекул, таких как липопротеины, белки, ферменты, а также нуклеиновые кислоты, в ходе ПОЛ они образуются как первичный продукт [30]. Приём КПП, *W. coagulans*, *L. plantarum* вызывал значительное снижение уровня ДК по сравнению с группой ЛПС ($p<0,05$). В целом, снижение уровня ДК наблюдалось в семенниках всех групп мышей, получавших пробиотики (рис. 1А). Похожую тенденцию наблюдали и при измерении уровня МДА (рис. 1Б), который является также распространённым маркером интенсивности свободно-радикального окисления липидов. Однако по нашим данным анализ концентрации ДК являлся более информативным, чем концентрации МДА. Последний является нестабильным соединением и достаточно реакционноспособным, что, как оказалось, затрудняет оценку его концентрации в чистом виде [30].

Вероятной причиной снижения интенсивности ПОЛ в семенниках мышей являлись антиоксидантные эффекты пробиотиков. Пробиотические микроорганизмы имеют свои собственные антиоксидантные ферментативные системы, которые могут вносить свой вклад в антиоксидантную защиту клеток организма-хозяина [31]. Более того,

ранее было показано, что пробиотики также эффективно повышают активность антиоксидантных ферментов [32] и регулируют их экспрессию. Известно, что ряд пробиотиков, в том числе лактобактерии, могут стимулировать Nrf2/ARE сигнальный путь — один из основных регуляторов экспрессии генов, участвующих в антиоксидантной защите [33].

Инъекции ЛПС заметно снижали в семенниках мышей экспрессию генов, кодирующих каталитическую субъединицу глутамат-цистеинлигазы (*Gclc*), а также супероксиддисмутазы 2 (*Sod2*) (оба $p<0,01$). Наблюдалась тенденция к ЛПС-индуцированному снижению экспрессии гена пероксиредоксина 3 (*Prdx3*), а также гена *Nfe2l2*, кодирующего транскрипционный фактор Nrf2 (табл. 2). У мышей, получавших пробиотики, в большинстве групп не наблюдалось статистически значимого снижения экспрессии исследуемых генов, что свидетельствует о том, что они могут препятствовать ЛПС-индуцированному подавлению антиоксидантной защиты на уровне регуляции транскрипции (табл. 2).

Влияние пробиотиков на экспрессию маркеров воспаления

Известно, что индуцированное инъекциями ЛПС хроническое воспаление способно приводить к увеличению экспрессии ряда маркеров воспаления [34]. Тем не менее, мы показали, что недельный курс инъекций ЛПС не вызывал значительного увеличения экспрессии данных генов в семенниках мышей, хотя и была обнаружена тенденция к увеличению экспрессии *Tnf* и *Ptgs2* (табл. 2). Приём пробиотиков зачастую не влиял на уровень экспрессии генов провоспалительных

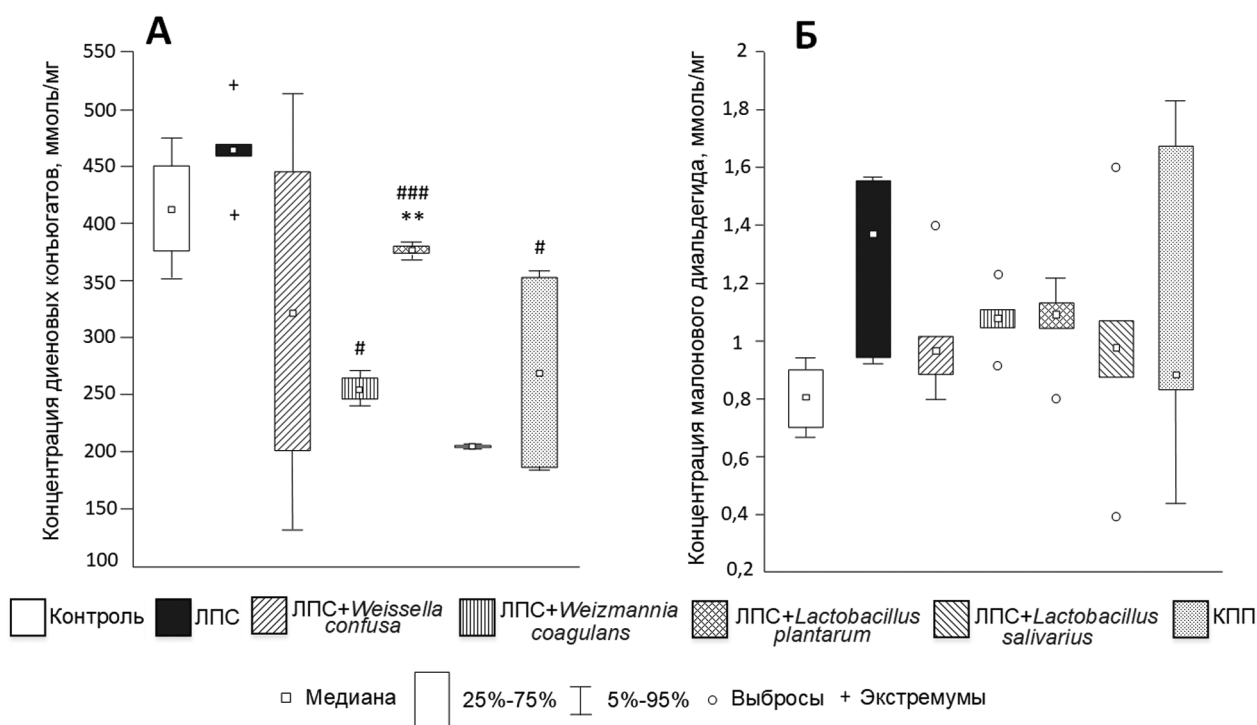


Рисунок 1. Концентрация ДК (А) и МДА (Б) в тканях семенников. ** $p<0,01$ – различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой, # $p<0,05$, *** $p<0,001$ – различия статистически значимы по сравнению с группой, получавшей инъекции ЛПС.

маркеров на фоне ЛПС-индуцированного воспаления. Была выявлена тенденция к снижению экспрессии гена глиального фибриллярного белка (*Gfap*) в группе животных, получавших *W. coagulans* ($p=0,072$). GFAP и его модифицированные формы являются биомаркером нейротравм и нарушений нервной ткани [35]. Клетки Лейдига семенников в свою очередь обладают нейроэндокринными свойствами, продуцируя различные нейроэндокринные маркеры, включая GFAP [36]. Известно, что штамм *Weizmannia coagulans* способен уменьшать воспаление путём ингибирования секреции провоспалительных цитокинов и увеличения секреции противовоспалительных цитокинов [37], в том числе и в семенниках, что находит подтверждение в нашем исследовании (табл. 2). При этом в семенниках мышей, которые помимо инъекций ЛПС получали *W. confusa*, а также *L. plantarum*, напротив обнаружено увеличение экспрессии *Il1b* (табл. 2), что свидетельствует скорее о стимуляции воспалительных процессов, и не позволяет говорить об однозначных противовоспалительных эффектах данных штаммов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ЛПС-индуцированные воспалительные процессы вызывают значительный ОС в семенниках и снижают экспрессию генов, связанных с гормональной регуляцией сперматогенеза, *Ath*, *Lepr*, *Eif2b4* в 2,9, 2,8, 3,0 раза соответственно. Пробиотические микроорганизмы, в свою очередь, способны уменьшать ОС в репродуктивных органах самцов мышей за счёт нормализации экспрессии антиоксидантных генов, а также уменьшения количества продуктов ПОЛ. Приём КПП, *Weizmannia coagulans*, *Lactobacillus plantarum* снизили уровень ДК в 1,8, 1,7, 2,3 раза соответственно. Кроме того, они способствовали увеличению экспрессии группы генов, ответственных за нормальное функционирование клеток Лейдига, кодирующих рецепторы лептина и факторы, отвечающие за созревание сперматозоидов. Из этого следует, что изучаемые пробиотики потенциально можно использовать для предотвращения дисфункции семенников и профилактики мужского бесплодия, вызванных системными воспалительными процессами, за счёт модуляции оси “кишечник-микробиота-семенники”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках госзадания Министерства науки и Высшего образования Российской Федерации (проект № FZGW-2024-0003).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Выращивание, содержание и умерщвление животных осуществляли согласно правилам, одобренным этическим комитетом по экспертизе биомедицинских исследований в ФГБОУ ВО “ВГУ”

(протокол № 42-03 от 8.10.2020), правила соответствуют директиве, установленной Европейским Союзом 2010/63/EU в отношении экспериментов с использованием животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лебедев Г.С., Голубев Н.А., Шадеркин И.А., Шадеркина В.А., Аполихин О.И., Сивков А.В., Комарова В.А. (2019) Мужское бесплодие в Российской Федерации: статистические данные за 2000–2018 годы. Экспериментальная и клиническая урология, 4, 4–12. [Lebedev G.S., Golubev N.A., Shaderkin I.A., Shaderkina V.A., Apolikhin O.I., Sivkov A.V., Komarova V.A. (2019) Male infertility in the Russian Federation: statistical data for 2000–2018. Experimental and Clinical Urology, 4, 4–12.] DOI: 10.29188/2222-8543-2019-11-4-4-12
2. Backhed F., Normark S., Schweda E.K.H., Oscarson S., Richter-Dahlfors A. (2003) Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. Microbes. Infect., 5(12), 1057–1063. DOI: 10.1016/s1286-4579(03)00207-7
3. Zhang X., Wang T., Deng T., Xiong W., Lui P., Li N., Chen Y., Han D. (2013) Damaged spermatogenic cells induce inflammatory gene expression in mouse Sertoli cells through the activation of Toll-like receptors 2 and 4. Mol. Cell. Endocrinol., 365(2), 162–173. DOI: 10.1016/j.mce.2012.10.016
4. Hedger M.P. (2011) Toll-like receptors and signalling in spermatogenesis and testicular responses to inflammation — a perspective. J. Reprod. Immunol., 88(2), 130–141. DOI: 10.1016/j.jri.2011.01.010
5. Hedger M.P. (2011) Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. J. Androl., 32(6), 625–640. DOI: 10.2164/jandrol.111.012989
6. Agita A., Alsagaff M.T. (2017) Inflammation, immunity, and hypertension. Acta. Med. Indones., 49(2), 158–165.
7. Wang Y., Xie Z. (2022) Exploring the role of gut microbiome in male reproduction. Andrology, 10(3), 441–450. DOI: 10.1111/andr.13143
8. Овчинников Р.И. (2022) Мужское бесплодие, связанное с окислительным стрессом сперматозоидов: патогенез и терапевтический подход. Медицинский совет, 5, 46–53. [Ovchinnikov R.I. (2022) Male infertility associated with oxidative stress of spermatozoa: pathogenesis and therapeutic approach. Medical Council, 5, 46–53.] DOI: 10.21518/2079-701X-2022-16-5-46-53
9. Wang Y., Wu Y., Wang Y., Xu H., Mei X., Yu D., Wang Y., Li W. (2017) Antioxidant properties of probiotic bacteria. Nutrients, 9(5), 521. DOI: 10.3390/nu9050521
10. Williams N.T. (2010) Probiotics. Am. J. Health. Syst. Pharm., 67(6), 449–458. DOI: 10.2146/ajhp090168
11. McCarthy J., O'Mahony L., O'Callaghan L., Sheil B., Vaughan E.E., Fitzsimons N., Fitzgibbon J., O'Sullivan G.C., Kiely B., Collins J.K., Shanahan F. (2003) Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. Gut, 52(7), 975–980. DOI: 10.1136/gut.52.7.975

12. Konieczna P, Akdis C.A., Quigley E.M.M., Shanahan F., O'Mahony L. (2012) Portrait of an immunoregulatory *Bifidobacterium*. Gut Microbes, **3**(3), 261–266. DOI: 10.4161/gmic.20358
13. Caldarelli M., Rio P., Marrone A., Ocarino F., Chiantore M., Candelli M., Gasbarrini A., Gambassi G., Cianci R. (2024) Gut-brain axis: focus on sex differences in neuroinflammation. Int. J. Mol. Sci., **25**(10), 5377. DOI: 10.3390/ijms25105377
14. Mayer E.A., Nance K., Chen S. (2022) The gut-brain axis. Annu. Rev. Med., **73**, 439–453. DOI: 10.1146/annurev-med-042320-014032
15. Agirman G., Yu K.B., Hsiao E.Y. (2021) Signaling inflammation across the gut-brain axis. Science, **374**(6571), 1087–1092. DOI: 10.1126/science.abi6087
16. Thomas R.L., Crawford N.M., Grafer C.M., Halvorson L.M. (2013) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: a review of the literature. Reprod. Sci., **20**(8), 857–871. DOI: 10.1177/1933719112466310
17. Mohammadzadeh P., Amberg G.C. (2023) AXL/Gas6 signaling mechanisms in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Front. Endocrinol., **14**, 1212104. DOI: 10.3389/fendo.2023.1212104
18. Костюк В.А., Потапович А.И., Лунец Е.Ф. (1984) Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов. Вопросы медицинской химии, **30**(4), 125–127. [Kostiuk V.A., Potapovich A.I., Lunets E.F. (1984) Spectrophotometric evaluation of diene conjugates. Voprosy Meditsinskoi Khimii, **30**(4), 125–127.]
19. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem., **95**(2), 351–358. DOI: 10.1016/0003-2697(79)90738-3
20. Sansone A., Kliesch S., Isidori A.M., Schlatt S. (2019) AMH and INSL3 in testicular and extragonadal pathophysiology: what do we know? Andrology, **7**(2), 131–138. DOI: 10.1111/andr.12597
21. Liu X., Liu S., Xu C. (2020) Effects of leptin on HPG axis and reproductive function in male rat in simulated altitude of 5500 m hypoxia environment. Biochem. Biophys. Res. Commun., **529**(1), 104–111. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.05.194
22. Ohlenbusch A., Henneke M., Brockmann K., Goerg M., Hanefeld F., Kohlschütter A., Gärtner J. (2005) Identification of ten novel mutations in patients with eIF2B-related disorders. Hum. Mutat., **25**(4), 411. DOI: 10.1002/humu.9325
23. Резниченко А.Г. (2007) Влияние химио- и радиотерапии на сперматогенез у онкологических больных. Проблемы репродукции, **13**(4), 70–75. [Reznichenko A.G. (2007) Effect of chemo- and radiotherapy on spermatogenesis in cancer patients. Problems of Reproduction, **13**(4), 70–75.]
24. Gureev A.P., Babenkova P.I., Nesterova V.V., Tsvetkova A.D., Gryaznova M.V., Shaforostova E.A. (2023) Protection of testis against lipopolysaccharide-induced toxicity: mildronate-induced L-carnitine depletion as a modulator of gut microbiome composition and gastrointestinal inflammation. Gastrointest. Disord., **5**(4), 536–548. DOI: 10.3390/gidisord5040044
25. Ly L.K., Rowles J.L. 3rd., Paul H.M., Alves J.M.P., Yemm C., Wolf P.M., Devendran S., Hudson M.E., Morris D.J., Erdman J.W. Jr., Ridlon J.M. (2020) Bacterial steroid-17,20-desmolase is a taxonomically rare enzymatic pathway that converts prednisone to 1,4-androstenediene-3,11,17-trione, a metabolite that causes proliferation of prostate cancer cells. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol., **199**, 105567. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.105567
26. Diviccaro S., Giatti S., Borgo F., Barcella M., Borghi E., Trejo J.L., Garcia-Segura L.M., Melcangi R.C. (2019) Treatment of male rats with finasteride, an inhibitor of 5alpha-reductase enzyme, induces long-lasting effects on depressive-like behavior, hippocampal neurogenesis, neuroinflammation and gut microbiota composition. Psychoneuroendocrinology, **99**, 206–215. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2018.09.021
27. Colldén H., Landin A., Wallenius V., Elebring E., Fändriks L., Nilsson M.E., Ryberg H., Poutanen M., Sjögren K., Vandenput L., Ohlsson C. (2019) The gut microbiota is a major regulator of androgen metabolism in intestinal contents. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., **317**(6), E1182–E1192. DOI: 10.1152/ajpendo.00338.2019
28. Devendran S., Méndez-García C., Ridlon J.M. (2017) Identification and characterization of a 20β-HSDH from the anaerobic gut bacterium *Butyrivibrio desmolans* ATCC 43058. J. Lipid. Res., **58**(5), 916–925. DOI: 10.1194/jlr.M074914
29. Carvajal G., Brukman N.G., Weigel Muñoz M., Battistone M.A., Guazzone V.A., Ikawa M., Haruhiko M., Lustig L., Breton S., Cuasnicu P.S. (2018) Impaired male fertility and abnormal epididymal epithelium differentiation in mice lacking CRISP1 and CRISP4. Sci. Rep., **8**(1), 17531. DOI: 10.1038/s41598-018-35719-3
30. Некрасов Э.В. (2012) Методы анализа перекисного окисления липидов в медико-биологических исследованиях. Бюллетень физиологии и патологии дыхания, **46**, 98–108. [Nekrasov E.V. (2012) Methods for lipid peroxidation analysis in medical and biological research. Bulletin Physiology and Pathology of Respiration, **46**, 98–108.]
31. Mishra V., Shah C., Mokashe N., Chavan R., Yadav H., Prajapati J. (2015) Probiotics as potential antioxidants: a systematic review. J. Agric. Food Chem., **63**(14), 3615–3626. DOI: 10.1021/jf506326t
32. Wang A.N., Yi X.W., Yu H.F., Dong B., Qiao S.Y. (2009) Free radical scavenging activity of *Lactobacillus fermentum* in vitro and its antioxidative effect on growing-finishing pigs. J. Appl. Microbiol., **107**(4), 1140–1148. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04294.x
33. You T., Zhao Y., Liu S., Xu H. (2023) *Lactiplantibacillus plantarum* P101 attenuated cyclophosphamide-induced liver injury in mice by regulating the Nrf2/ARE signaling pathway. Int. J. Mol. Sci., **24**(17), 13424. DOI: 10.3390/ijms241713424
34. Mohammad S., Thiemermann C. (2021) Role of metabolic endotoxemia in systemic inflammation and potential interventions. Front. Immunol., **11**, 594150. DOI: 10.3389/fimmu.2020.594150
35. Yang Z., Wang K.K.W. (2015) Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. Trends Neurosci., **38**(6), 364–374. DOI: 10.1016/j.tins.2015.04.003
36. Davidoff M.S., Middendorff R., Köfincü E., Müller D., Jezek D., Holstein A.F. (2002) Leydig cells of the human testis possess astrocyte and oligodendrocyte marker molecules. Acta Histochem., **104**(1), 39–49. DOI: 10.1078/0065-1281-00630
37. Chen J., Cai J., Lin J., Cheng Z., Long M. (2023) Inhibitory effects of *Bacillus coagulans* TL3 on the ileal oxidative stress and inflammation induced by lipopolysaccharide in rats. Curr. Microbiol., **80**(2), 84. DOI: 10.1007/s00284-022-03171-2

Поступила в редакцию: 21. 06. 2024.
После доработки: 16. 10. 2024.
Принята к печати: 17. 10. 2024.

THE ROLE OF PROBIOTICS IN THE REGULATION OF EXPRESSION OF GENES
SUPPORTING ANTIOXIDANT STATUS AND FUNCTIONALITY OF MOUSE TESTES
IN LPS-INDUCED INFLAMMATORY PROCESSES

*P.I. Babenkova¹, E.A. Chirkin¹, M.Yu. Syromyatnikov^{1,2},
O.V. Zvereva², A.A. Tolkacheva², O.S. Korneeva², A.P. Gureev^{1,2*}*

¹Voronezh State University,
1 Universitetskaya sq., Voronezh, 394018 Russia; *e-mail: gureev@bio.vsu.ru
²Voronezh State University of Engineering Technologies,
72 Sakko and Vanzetti str., Voronezh, 394036 Russia

Systemic lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation has a significant impact on various organs, including the male reproductive system. In this study, we have demonstrated that LPS-induced inflammation causes oxidative stress in mouse testes, reduces expression of genes encoding the catalytic subunit of glutamate-cysteine ligase (*Gclc*) and superoxide dismutase 2 (*Sod2*). Inflammation suppressed transcription of genes involved in differentiation and metabolic regulation of testicular cells and sperm maturation: in the LPS group, the expression of the *Amh*, *Lepr*, *Eif2b4* genes was approximately 3 times lower compared to the control group. The intake of probiotic microorganisms caused a decrease in the intensity of lipid peroxidation, which was manifested in a decrease in the level of conjugated dienes (CD) compared to the LPS group, contributed to maintaining the level of expression of genes supporting the antioxidant status, as well as genes supporting the functionality of the mouse testes. The data obtained suggest that probiotics may be considered as potential tools for maintaining male reproductive function under conditions of inflammatory processes.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Keywords: probiotics; spermatogenesis; lipopolysaccharides; inflammation; oxidative stress; lipid peroxidation

Funding. The study was carried out within the framework of the State Assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project No. FZGW-2024-0003).

Received: 21.06.2024; revised: 16.10.2024; accepted: 17.10.2024.