

Нарушения микробиома у отцов влияют на здоровье и физические данные потомства

Ayele Argaw-Denboba, Thomas S. B. Schmidt, Monica Di Giacomo, Bobby Ranjan, Saravanan Devendran, Eleonora Mastroiilli, Catrin T. Lloyd, Danilo Pugliese, Violetta Paribeni, Juliette Dabin, Alessandra Pisaniello, Sergio Espinola, Alvaro Crevenna, Subhanita Ghosh, Neil Humphreys, Olga Boruc, Peter Sarkies, Michael Zimmermann, Peer Bork & Jamie A. Hackett.

Обзор исследования и итоги

Зачем это исследование?

Микробиота кишечника действует на границе взаимодействия хозяина и окружающей среды, влияя на гомеостаз и метаболические сети человека. Факторы окружающей среды, которые нарушают баланс микробных экосистем кишечника, могут, таким образом, формировать физиологические и связанные с болезнями реакции в соматических тканях. Однако системное воздействие микробиома кишечника на плод, и, следовательно, на потомство в целом ранее не было изучено.

Цель исследования - определить регуляторную «ось кишечник-зародышевая линия» у мужчин, которая чувствительна к воздействию окружающей среды и программирует приспособленность потомства посредством воздействия на функцию плаценты.

Что происходит в этом проекте?

В возрасте 5 недель самцы мышей без специфических патогенов (SPF) были переведены в обычное колониальное учреждение. Самцов мышей разделили на отдельные клетки (по одной мыши на клетку) и случайным образом распределили на две группы:

(1) контрольная группа, которая получала обычную диету и стерильную фильтрованную (0,2 мкм) воду в течение шести последовательных недель (сокращенно мыши CON);

(2) обработанная группа, которая получала обычную диету и стерильную фильтрованную (0,2 мкм) воду с добавлением коктейля из различных антибиотиков (либо с искусственно созданным дисбиозом кишечника без использования антибиотиков) в течение 6 последующих недель. Бутылка с водой и коктейль заменялись свежими каждые 5 дней.

В конце 6 недель самцов мышей из обеих групп спаривали с необработанными 6-недельными самками мышей. После спаривания самцов мышей содержали в течение дополнительных 8 недель без антибиотиков (период восстановления), и они имели свободный доступ к обычной диете и стерильной фильтрованной (0,2 мкм) воде. В течение 8-недельного периода восстановления каждый самец спаривался в двух временных точках: через 4 недели после отмены антибиотиков и через 8 недель после отмены антибиотиков. Все самки мышей получали обычную диету и воду в течение всего периода беременности и лактации.

Результат

Потомство, полученное от отцов обработанной группы, имело значительно более низкий неонатальный вес при рождении, серьезную задержку роста, а также весьма значительное повышение уровня постнатальной смертности.

Сперма передает наследственную информацию следующему поколению в форме **генетического** (последовательность ДНК) и **эпигенетического** (не основанного на последовательности ДНК) материала. Данные по всем типам указывают на то, что **эпигенетический** компонент, включая состояния хроматина, малые РНК и

макромолекулы, имеет потенциал для изменения под воздействием среды до зачатия и влияния на фенотип потомства.

В результате исследования выявлено, что микробиота кишечника выступает в качестве ключевой взаимосвязи между состоянием отца до зачатия и состоянием здоровья у последующих поколений мышей. Нарушения микробиоты кишечника будущих отцов увеличивают вероятность того, что их потомство будет иметь низкую массу тела при рождении, серьезную задержку роста и преждевременную смертность. **Отцы-дисбиотики вызывают повышенный риск внутриутробной плацентарной недостаточности**, что свидетельствует о плацентарном происхождении эффектов, передающихся из поколения в поколение у млекопитающих.

Комментарий врача, акушера-гинеколога, репродуктолога Марии Владимировны Борец: «Очень интересное исследование. Последние 20 лет много внимания уделяется микробиоте, есть даже работы по пересадке микробиоты с целью улучшения здоровья, снижения уровня ожирения. И есть взаимосвязь между когнитивными функциями и микробиотой, то есть уже понятно, что это довольно значимый фактор, который определяет наше здоровье. И соответственно, вполне логичной является цепочка, которая прослеживается в этом исследовании. Здесь устанавливается взаимосвязь между микробиотой отца и риском развития плацентарной недостаточности, и здоровьем плода. Если мы посмотрим на это с медицинской стороны, то мы поймем, что, если есть нарушение микробиоты, следовательно, здоровье будущего отца несовершенно. И так как половые клетки продуцируются непрерывно в течение жизни мужчины, мы оцениваем эти половые клетки как зеркало состояния здоровья отца. И, соответственно, состояние здоровья отца оказывает влияние на качество половых клеток, которые, в свою очередь, оказывают влияние на то, каким будет потомство. И конечно здорово, что есть такие интересные исследования, которые позволяют посмотреть на эти взаимодействия под разными углами, и у нас складывается более цельная картина. Возможно, у наших читателей будет более четкое представление, которое даст понимание, что конкретно влияет на здоровье потомства, что и здоровье отца очень важно, возможно более важно, чем мы привыкли считать».

Источник: <https://www.nature.com/articles/s41586-024-07336-w#Sec8>

Полный перевод исследования и итогов

Нарушения микробиома у отцов влияют на приспособленность потомства.

Ayele Argaw-Denboba, Thomas S. B. Schmidt, Monica Di Giacomo, Bobby Ranjan, Saravanan Devendran, Eleonora Mastrorilli, Catrin T. Lloyd, Danilo Pugliese, Violetta Paribeni, Juliette Dabin, Alessandra Pisaniello, Sergio Espinola, Alvaro Crevenna, Subhanita Ghosh, Neil Humphreys, Olga Boruc, Peter Sarkies, Michael Zimmermann, Peer Bork & Jamie A. Hackett.

Краткий обзор

Микробиота кишечника действует на границе взаимодействия хозяина и окружающей среды, влияя на гомеостаз и метаболические сети человека 1 , 2 , 3 , 4 . Факторы окружающей среды, которые нарушают баланс микробных экосистем кишечника, могут, таким образом, формировать физиологические и связанные с болезнями реакции в соматических тканях 5 , 6 , 7 , 8 , 9 . Однако системное воздействие микробиома кишечника на зародышевую линию — и, следовательно, на потомство F1 , которое он дает, — не изучено 10 . Здесь мы показываем, что микробиота кишечника выступает в качестве ключевого интерфейса между отцовской средой до зачатия и межпоколенческим здоровьем у мышей. **Нарушения микробиоты кишечника будущих отцов увеличивают вероятность того, что их потомство будет иметь низкую массу тела при рождении, серьезную задержку роста и преждевременную смертность.** Передача риска заболевания происходит через зародышевые клетки и провоцируется всепроникающими нарушениями микробиома кишечника, включая не абсорбируемые антибиотики или осмотические слабительные, но спасается восстановлением отцовской микробиоты до зачатия. Этот эффект связан с динамической реакцией на вызванный дисбиоз в мужской репродуктивной системе, включая нарушение сигнализации лептина, измененные профили метаболитов яичек и перераспределение малых полезных РНК в сперме. **В результате отцы-дисбиотики вызывают повышенный риск внутриутробной плацентарной недостаточности, что раскрывает плацентарное происхождение межпоколенческих эффектов млекопитающих.** Наше исследование определяет регуляторную «ось кишечник-зародышевая линия» у мужчин, которая чувствительна к воздействию окружающей среды и программирует приспособленность потомства посредством воздействия на функцию плаценты.

Экспериментальная стратегия по индуцированию дисбактериоза у животных

В возрасте 5 недель самцы мышей C57BL/6J без специфических патогенов (SPF) были переведены в обычное колониальное учреждение. Самцов мышей разделили на отдельные клетки (по одной мыши на клетку) и случайным образом распределили на две группы: (1) контрольная группа, которая получала обычную диету и стерильную фильтрованную (0,2 мкм) воду в течение шести последовательных недель (сокращенно мыши CON); (2) обработанная группа, которая получала обычную диету и стерильную фильтрованную (0,2 мкм) воду с добавлением коктейля из одобренного FDA пABX (неомицин 2,5 мг мл⁻¹, бацитрацин 2,5 мг мл⁻¹ и пимарицин 1,25 мкг мл⁻¹; сокращенно пABX) в течение 6 последовательных недель. Бутылка с водой и коктейль пABX заменялись свежими каждые 5 дней. В конце 6 недель лечения самцов мышей из обеих групп спаривали с необработанными 6-недельными инбредными самками мышей C57BL/6J. После спаривания самцов мышей содержали в течение дополнительных 8 недель без пABX (период восстановления), и они имели свободный доступ к обычной диете и стерильной фильтрованной (0,2 мкм) воде. В течение 8-недельного периода восстановления каждый самец спаривался в двух временных точках: через 4 недели после отмены пABX и через 8 недель после отмены пABX (обозначаемых как 6 недель + 4гес и 6 недель + 8гес соответственно). Все самки мышей получали обычную диету и воду в течение всего периода беременности и лактации. Следует отметить, что дозировка каждого используемого антибиотика ниже стандартной эквивалентной дозы для человека и составляет половину стандартной дозы, вводимой мышам в предыдущих исследованиях,

и, следовательно, представляет собой относительно низкий режим дозировки, предназначенный для нарушения, а не уничтожения сообществ кишечной микробиоты [30,48,49](#).

Эквивалентная экспериментальная установка и 6-недельный курс времени использовались для альтернативных стратегий, чтобы вызвать острый дисбактериоз кишечника. Во-первых, введение *ad libitum* коктейля абсорбируемых антибиотиков (ампициллин $0,5 \text{ мг мл}^{-1}$, ванкомицин $0,25 \text{ мг мл}^{-1}$ и амфотерицин В $12,5 \text{ мкг мл}^{-1}$; сокращенно *avaABX*) в отфильтрованной ($0,2 \text{ мкм}$) воде. Во-вторых, посредством очищения кишечника с использованием 5% ПЭГ (ПЭГ 4000, EMD Millipore). При этом самцам-производителям давали *avaABX* или 5% ПЭГ в питьевой воде в течение 6 недель, чтобы спровоцировать острый дисбактериоз кишечной микробиоты, тогда как случайно назначенная контрольная группа получала только стерильную отфильтрованную ($0,2 \text{ мкм}$) воду. В конце 6 недель самцы мышей из каждой группы спаривались с нелечеными 6-недельными самками мышей C57BL/6J. Для каждого антибиотика вводимая доза была скорректирована до половины стандартной дозы антибиотика, которая использовалась в предыдущих исследованиях [50](#), [51](#), [52](#). Аналогично, концентрация ПЭГ была ниже стандартной дозы, используемой для очищения кишечника человека или для лечения запоров и в предыдущих исследованиях на мышах [31](#).

Параметры мужской фертильности

Для оценки влияния дисбиоза, вызванного *pABX*, на самцов-производителей соотношение массы яичек к массе тела и стандартные параметры фертильности самцов были охарактеризованы на основе количественного описательного анализа, который включает массу тела самца, массу яичек, количество сперматозоидов и потенциальную плодовитость:

1. Соотношение веса яичек к весу тела: для оценки эффекта лечения *pABX* измеряли вес тела самцов-производителей, получавших лечение в течение 6 недель, и сравнивали его с весом самцов-производителей CON того же возраста. Кроме того, для оценки воздействия на репродуктивные органы яички были тщательно собраны у мышей, получавших лечение CON и *pABX*, взвешены и рассчитана разница в соотношении веса яичек к весу тела между двумя группами.
2. Подсчет сперматозоидов: для подсчета сперматозоидов использовался метод, описанный в ссылке [53](#). Вкратце, суспензии сперматозоидов готовили путем измельчения хвоста в $1 \text{ мл } 1\times \text{ PBS (pH } 7,2)$. Суспензию пипетировали и фильтровали через нейлоновую сетку 80 мкм для удаления фрагментов тканей. Аликвоту ($0,05 \text{ мл}$) из суспензии сперматозоидов (1 мл) разбавляли $1:40 \text{ PBS (pH } 7,2)$ и тщательно перемешивали. Суспензию сперматозоидов подсчитывали с помощью камеры Бюркера после сброса нескольких капель суспензии. Чтобы определить количество сперматозоидов на миллилитр, количество сперматозоидов в каждом из четырех квадратов (1 мм^2) усредняли и умножали на коэффициент разбавления $\times 10^4$ для расчета общего количества сперматозоидов на мышь.
3. Потенциал плодовитости: 11-недельные самцы-производители (обработанные как CON, так и *pABX*) спаривались с необработанными 6-недельными самками C57BL/6J. Самок проверяли на наличие копулятивной пробки в течение первых 4 дней и переводили в клетку для содержания, как только пробка оказывалась положительной, затем снова проверяли через 3 недели на беременность и размер помета.

Основное

Сперма передает наследственную информацию следующему поколению в форме генетического (последовательность ДНК) и эпигенетического (не основанного на последовательности ДНК) материала [11](#), [12](#). Данные по всем типам указывают на то, что эпигенетический компонент, включая состояния хроматина, малые РНК и макромолекулы, имеет потенциал для изменения под воздействием среды до зачатия и влияния на фенотип потомства [13](#), [14](#), [15](#), [16](#), [17](#), [18](#), [19](#), [20](#), [21](#). Тем не менее, степень и основные

механизмы эпигенетических эффектов, унаследованных по отцовской линии, у млекопитающих остаются непрозрачными 22 , в то же время неясно, как факторы окружающей среды сходятся и сигнализируют зародышевым клеткам. Микробиота кишечника все больше признается как играющая главную роль в интеграции сигналов окружающей среды в реакции хозяина 1 , 9 . Действительно, жизненный цикл млекопитающих развивался в присутствии кишечных микробных сообществ, которые взяли на себя важную роль в метаболической, гормональной и иммунной функциях, подразумевая, что хозяева используют здоровый микробиом для максимизации приспособленности. Состав кишечных микробных экосистем, тем не менее, глубоко сформирован факторами окружающей среды, такими как диета и лекарства 23 , 24 , 25 , и, таким образом, потеря биоразнообразия кишечника, связанная с модернизацией, представляет риск для здоровья человека. Тем не менее, несмотря на накопление доказательств того, что дисбаланс (дисбиоз) микробиома запускает физиологические реакции в соматических тканях 5 , 6 , 7 , 8 , 26 , 27 , 28 , 29 , мало что известно о влиянии нарушений микробиома на зародышевую линию.

Для исследования этого вопроса мы создали искусственно вызванную модель дисбактериоза кишечной микробиоты у изогенных самцов мышей с использованием неабсорбируемых антибиотиков по желанию (nABX) (рис. 1a). Эти nABX не могут пересекать желудочно-кишечный эпителий, и, таким образом, любые репродуктивные реакции отражают острое нарушение микробных сообществ кишечника, а не системное воздействие препарата 30 . Применение секвенирования рибосомальной РНК 16S показало, что 6 недель лечения низкими дозами nABX (обозначается как 6 недель) привели к заметному снижению разнообразия, обилия и богатства кишечной микробиоты ($P = 0,000003$, сумма рангов Уилкоксона), что является обратимым и постепенно восстанавливается после 8 недель отмены nABX (рис. 1b и расширенные данные рис. 1a,b). Дисбиоз после 6 недель nABX не оказал существенного влияния на вес самцов, фертильность или выживаемость (Расширенные данные, рис. 1c–h). Более того, nABX не были обнаружены в циркулирующей сыворотке и яйцках с помощью масс-спектрометрии, что подтверждает их специфическое действие в кишечнике (Расширенные данные, рис. 1i–l).

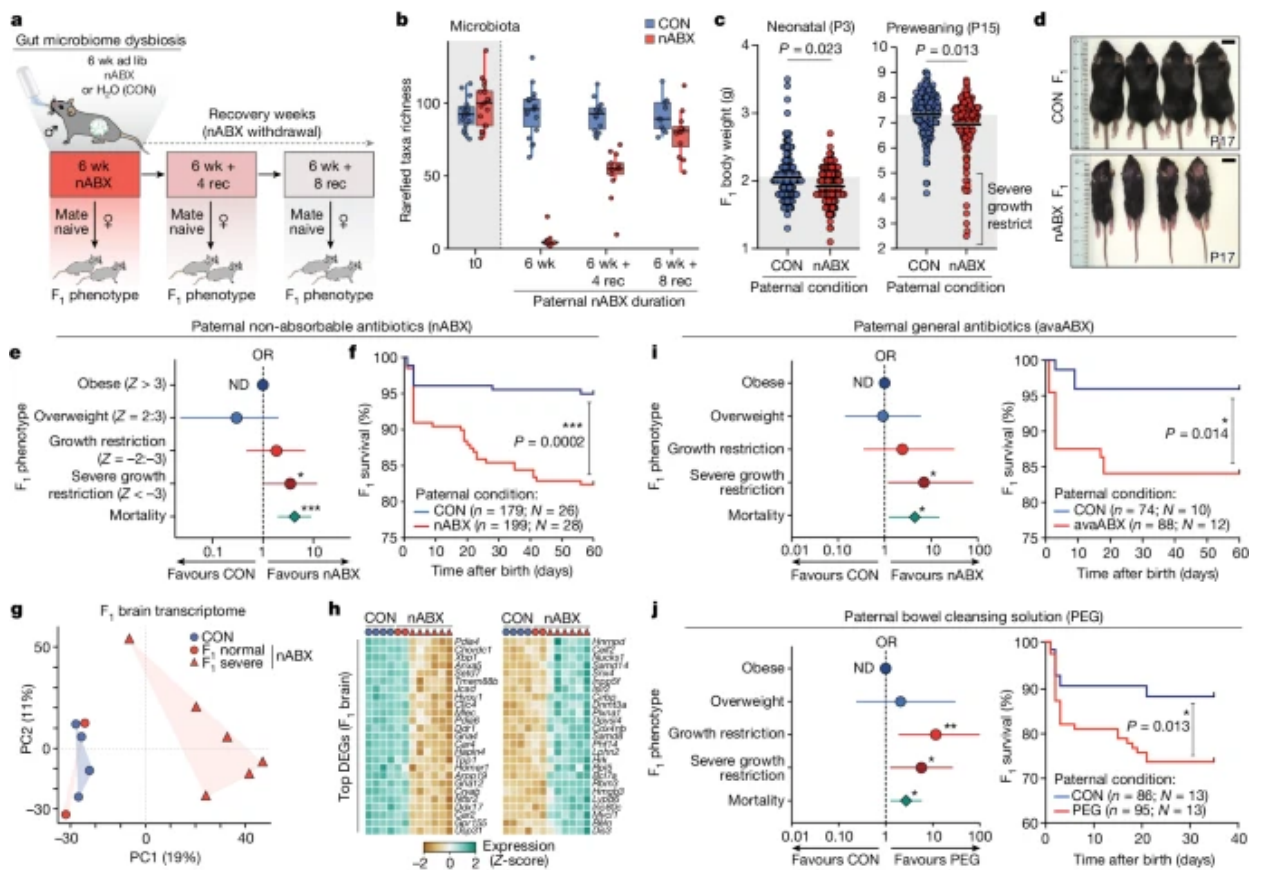


Рис. 1: Дисбактериоз кишечника у отца с большой долей вероятности вызывает основные фенотипы F1.

рисунк 1

а, Схема, показывающая стратегию индуцированного отцовского дисбиоза и восстановления с использованием nABX. **б**, Количественная оценка микробного таксономического богатства у самцов после 6 недель лечения nABX и в течение периода восстановления (rec) с помощью секвенирования 16S рНК (CON t0 = 18, 6 недель = 18, 6 недель + 4 rec = 14, 6 недель + 8 rec = 11; nABX t0 = 19, 6 недель = 12, 6 недель + 4 rec = 13, 6 недель + 8 rec = 12 особей на временную точку). Столбец представляет собой медиану, усы 1,5× межквартильный размах. **с**, Масса тела потомства F1 на постнатальные дни P3 и P15 в соответствии с отцовским лечением nABX. Значение P по двухстороннему вложенному (иерархическому) t-тесту (CON n = 172, вложен в N = 26 отцов; nABX n = 181, вложен в N = 28 отцов). Столбик обозначает среднее значение. **д**, Репрезентативные изображения фенотипа SGR у потомства F1 от отцов с дисбиотическими заболеваниями (обработанных nABX). **е**, Лесная диаграмма, показывающая логарифм OR риска аномальных классов массы тела у потомства, доживающего до P15. Нулевой эффект представлен вертикальной линией, для которой значение OR равно 1. Усы указывают 95% CI, значение P по двухстороннему критерию Хи-квадрат (смертность P = 0,0001; SGR P = 0,044). **ф**, График Каплана–Майера, показывающий постнатальную выживаемость потомства F1 в зависимости от отцовского режима обработки nABX (CON n = 179; nABX n = 199). Значение P по критерию Мантия–Кокса (логарифмический ранг). **г**, PCA транскриптомов из мозга F1, полученного от контрольных или nABX-производителей. Потомство nABX стратифицировано по нормальному или SGR-фенотипу. SGR не наблюдается у контрольного потомства. **х**, Тепловая карта, показывающая экспрессию основных генов с повышенной и пониженной регуляцией в мозге F1 SGR из независимых пометов, полученных от отцов, получавших nABX. **и**, Слева, OR восприимчивости F1 к аномальной массе тела и смертности при получении от отцов самцов с дисбактериозом, вызванным 6 неделями лечения общими антибиотиками (avaABX). Усы указывают на 95% ДИ, значение P по двустороннему критерию Хи-квадрат (смертность P = 0,014; SGR P =

0,038). Справа, график Каплана–Майера, показывающий постнатальную выживаемость потомства F1 от самцов, обработанных аваABX. j, слева, OR риска F1 для аномальной массы тела при рождении от самцов с дисбактериозом, вызванным 6 неделями очищения кишечника слабительным ПЭГ. Усы указывают на 95% ДИ, P-значение по двустороннему критерию Хи-квадрат (смертность $P = 0,013$; SGR $P = 0,014$). Справа, график Каплана–Майера, показывающий выживаемость потомства F1 от самцов, обработанных ПЭГ. n, потомство; N, пометы; ND, не обнаружено.

Потомство отцов-дисбиотов

Чтобы оценить влияние индуцированного дисбиоза микробиоты на потомство, мы скрестили самцов, обработанных nABX, с наивными (необработанными) самками и оценили фенотипы F1, применяя строгий гнездовой статистический анализ для межпоколенческой значимости. Мы обнаружили, что потомство, полученное от отцов nABX, имело значительно более низкий неонатальный вес при рождении (P3) по сравнению с потомством от контрольных отцов ($P = 0,023$, гнездовой непарный t-тест; контроль (CON) $n = 172$ (26 пометов), nABX $n = 181$ (28 пометов)) (рис. 1c). Были затронуты как самки ($P = 0,017$), так и самцы ($P = 0,029$) потомства, в то время как размер помета был постоянным (Расширенные данные, рис. 2a,b). Более того, средняя масса тела потомства F1, полученного от самцов nABX, оставалась значительно ниже на протяжении всего постнатального развития ($P = 0,013$ на P15 (до отъема); $P = 0,015$ на P21 (отъема), гнездовой непарный t-критерий) (рис. 1c и расширенные данные, рис. 2c,d).

Среди потомства, рожденного от дисбиотических самцов, мы также наблюдали основной, но частично проникающий постнатальный фенотип, который проявлялся как серьезная задержка роста (SGR; Z-оценка веса тела < -3), которая не наблюдалась среди контрольного потомства (рис. 1d и расширенные данные рис. 2e,f). Количественная оценка этого показала значительное увеличение отношения шансов (OR = 3,52; $P = 0,044$, хи-квадрат) SGR среди потомства, полученного от nABX (рис. 1e). Это далее отражалось в отрицательном перекосе и избыточном эксцессе веса тела потомства nABX (перекос $-1,98$; Rku 5,0). Однако наиболее поразительно, что потомство F1, полученное от самцов, обработанных nABX, было связано с весьма значительным повышением уровня постнатальной смертности ($P = 0,0002$, тест Мантеля–Кокса) по сравнению с потомством от контрольных самцов (рис. 1f). Это произошло преимущественно среди потомства SGR, что позволяет предположить, что повышенная смертность связана с повышенной восприимчивостью F1 к ограничению роста.

Транскриптомное профилирование потомства SGR, рожденного от независимых самцов nABX, показало, что они кластеризовались вместе с помощью анализа главных компонент (PCA) и отдельно от потомства контрольных самцов, что указывает на воспроизводимый молекулярный ответ F1 (рис. 1g). Действительно, 2973 и 1563 дифференциально экспрессируемых гена (DEG) обнаружены в мозге F1 и бурой жировой ткани (BAT) соответственно. DEG преимущественно обогащены для путей реактома, связанных с метаболическими процессами (главные термины: метаболизм $P = 2,51 \times 10^{-9}$; метаболизм липидов $P = 0,000018$) и являются устойчивыми между потомством SGR из независимых пометов (рис. 1h и расширенные данные рис. 2g,j). Эти данные подтверждают межпоколенческое влияние отцовского дисбиоза, опосредованного nABX, на рост потомства, метаболические сети и выживание. Важно отметить, что эти фенотипы возникают как вероятностные, а не детерминированные реакции на отцовский статус и, таким образом, проявляются как измененный риск.

Затем мы задались вопросом, вызывают ли ортологичные стратегии нарушения отцовской микробиоты также ответ F1. Во-первых, мы использовали альтернативную комбинацию антибиотиков (аваABX) и наблюдали, что отцовское введение аваABX по желанию воспроизводило повышенную восприимчивость потомства F1 к снижению массы тела (SGR OR = 7,0; $P = 0,038$, критерий Хи-квадрат) и повышению смертности ($P = 0,014$, тест Мантеля–Кокса) (рис. 1i). Во-вторых, мы нарушили отцовскую микробиоту

кишечника без какого-либо воздействия антимикробных препаратов, выполнив желудочно-кишечное очищение осмотическими слабительными (полиэтиленгликолем (ПЭГ)), что вызывает распространенный дисбактериоз 31, 32. Мы наблюдали, что потомство, рожденное от обработанных ПЭГ самцов, имело значительно более низкую массу тела F1 ($P = 0,021$, гнездовой непарный t -тест; CON $n = 76$ (13 пометов), nABX $n = 76$ (13 пометов)), с повышенной восприимчивостью SGR (OR = 5,8; $P = 0,0142$ Хи-квадрат) и преждевременной смертностью ($P = 0,013$, тест Мантеля–Кокса) (рис. 1j). Таким образом, множественные отдельные нарушения микробиоты кишечника у будущих отцов увеличивают риск того, что у потомства будут нарушения развития и преждевременная смертность, что подтверждает прямую связь между индуцированным отцовским дисбактериозом и приспособленностью потомства.

Обратимость отцовских эффектов

Далее мы исследовали, может ли отцовское восстановление от дисбактериоза кишечника спасти фенотипические эффекты F1. После 4 недель отмены nABX (6 недель + 4 недели восстановления (восстановление)), когда сохраняется значительное возмущение отцовского микробиома, потомство F1 снова показало значительно более низкий неонатальный вес ($P = 0,012$, вложенный непарный t -тест; CON $n = 160$ (24 помета), nABX $n = 146$ (22 помета)), повышенную восприимчивость к SGR (OR = 8,1; $P = 0,020$ Хи-квадрат) и нарушенную траекторию роста (рис. 2a и расширенные данные, рис. 3a,b). Однако при восстановлении отцовского микробиома через 8 недель отмены nABX (6 недель + 8 недель приема) (рис. 1b и расширенные данные, рис. 1a,b), мы наблюдали одновременное восстановление фенотипа веса новорожденных F1 ($P = 0,55$, вложенный непарный t -критерий; CON $n = 87$ (13 пометов), nABX $n = 89$ (13 пометов)) и нормальное развитие роста (SGR OR = 0,97; $P = 0,98$, хи-квадрат) (рис. 2b и расширенные данные, рис. 3a,b). Более того, потомство отцов с дисбиозом 6 недель + 4 гес nABX воспроизводило значительно повышенный уровень смертности F1 ($P = 0,0009$, тест Мантеля–Кокса) (рис. 2c), но потомство от тех же отцов после восстановления микробиоты в 6 недель + 8 гес не имело избыточной смертности ($P = 0,73$) (рис. 2d,e). Эти данные подразумевают, что повышенная вероятность эффектов F1 сохраняется в течение периода отцовского дисбиоза (6 недель, 6 недель + 4 гес), но является обратимой и возвращается к исходному одновременно с восстановлением кишечного микробиома отца (6 недель + 8 гес) и сперматогенного цикла (около 5 недель) (рис. 2e).

Рис. 2: Восстановление микробиоты кишечника отца устраняет восприимчивость к фенотипам F1.

рисунок 2 a, b, Кривые роста потомства F1, полученного от самцов во время периода отмены nABX, у которых все еще сохраняется дисбиоз кишечной микробиоты (6 недель + 4 недели) (a) и потомство тех же самцов после восстановления микробиоты (6 недель + 8 недель) (b), а также контрольные самцы того же возраста. Линия обозначает среднее значение, значение P по вложенному (иерархическому) двухстороннему t -тесту. c, d, График Каплана–Майера, показывающий постнатальную выживаемость потомства F1, полученного от дисбиотических (c) или выздоровевших самцов nABX (d). Значение P по критерию Мантеля–Кокса (логарифмический ранг). e, Лесные диаграммы, показывающие OR восприимчивости F1 к аномальной массе тела и преждевременной смертности при рождении от дисбиотических (6 недель, 6 недель + 4 рекомендаций) или выздоровевших самцов (6 недель + 8 рекомендаций). Нулевой эффект представлен вертикальной линией, для которой значение OR равно 1. Усы указывают 95% ДИ, значение P по двустороннему критерию Хи-квадрат (смертность: 6 недель $P = 0,0001$, 6 недель + 4 рекомендаций $P = 0,0014$, 6 недель + 8 рекомендаций $P = 0,76$; SGR: 6 недель $P = 0,044$, 6 недель + 4 рекомендаций $P = 0,020$, 6 недель + 8 рекомендаций $P = 0,99$). f, PCA транскриптомов из жировой ткани F1 SGR, полученных от 6 недель или 6 недель + 4 гес nABX или контрольных самцов, каждый из нескольких независимых пометов. g, Богатство микробиоты кишечника потомства (слева) не зависит от микробного статуса кишечника

отца и не коррелирует с фенотипом F 1. Богатство микробиоты отца (справа) коррелирует с фенотипом потомства F 1. Затененные области указывают на 95% ДИ. h , i , Слева, масса тела новорожденного F 1 после ЭКО изогенных ооцитов с использованием контрольных или обработанных pABX доноров спермы. Справа, распределение массы тела F 1 на P15 после ЭКО. Данные получены независимо от суррогатных матерей штамма CD1 (CON n = 66 потомков, вложенных в N = 12 отцов; pABX n = 75, вложенных в N = 12) (h) или суррогатных матерей штамма BL6 (CON n = 33 потомка, вложенных в N = 8 отцов; pABX n = 41, N = 7 отцов) (i). Значение P с помощью вложенного (иерархического) двухстороннего t- теста.

Примечательно, что транскриптомика показала, что потомство SGR, рожденное от отцов pABX в возрасте 6 недель, кластеризовалось с независимым потомством от отцов в возрасте 6 недель + 4 гес и демонстрировало очень схожие обогащения онтологии генов (рис. 2f и расширенные данные рис. 3c,d). Это говорит о том, что пораженное потомство, зачатое в период отцовского дисбиоза, переходит в последовательный молекулярный фенотип, что указывает на общую лежащую в основе этиологию. Более того, секвенирование генома de novo потомства SGR не показало повышенной мутационной нагрузки или объяснительных различий в структурных вариантах, однонуклеотидных полиморфизмах (SNP) или небольших вставках и делециях (INDEL) по сравнению с контрольной группой (расширенные данные рис. 4a,b). Мы также не смогли обнаружить переданные эффекты F 2 (расширенные данные рис. 4c–f). Эти данные свидетельствуют о том, что фенотипы F1 , возникающие у отцов-дисбиотиков, не обусловлены наследованием генетических различий и не распространяются за пределы первого поколения.

Способ наследования между поколениями

Чтобы изучить модальность межпоколенческого наследования, мы сначала задались вопросом, существует ли отцовская передача дисбиотического микробиома кишечника 33 . Мы обнаружили, что у матерей после родов не наблюдалось существенных изменений состава микробиома ($P = 0,77$, альфа-разнообразие Уилкоксона; отцовский CON n = 8, pABX n = 11) и не было кластеризации по отцовскому воздействию, судя по фекальному профилированию 16S (Расширенные данные, рис. 5a). Мы также не обнаружили существенных эффектов на материнский микробиом в дни после спаривания с самцами pABX, а также различий в потомстве или семенной микробиоте, что свидетельствует против передачи измененных отцовских микробиомов матери и/или потомству (Расширенные данные, рис. 5b–h). Действительно, фенотип потомства коррелировал с микробиомом его отца, а не с его собственной микробиотой (рис. 2g), при этом некоторые специфические таксоны демонстрировали предпочтительные ассоциации (Расширенные данные, рис. 5e). Мы также исследовали потенциальные копрофагические эффекты остаточного pABX во время родительского совместного содержания, отметив небольшую, но незначительную тенденцию, которая разрешилась через несколько дней (Расширенные данные, рис. 5f–h). Чтобы эмпирически проверить, влияют ли этот или другие косвенные (не зародышевые) отцовские факторы на фенотип потомства, мы провели серию экспериментов по совместному содержанию, в ходе которых самки содержались с контрольным или pABX-самцом в его среде, но затем спаривались с независимыми самцами, не проходившими лечение. Мы не обнаружили никакой разницы в весе при рождении ($P = 0,85$; вложенный t- тест), росте ($P = 0,98$) или выживании ($P = 0,35$, Mantel–Cox) потомства, независимо от предыдущего воздействия на мать дисбиотических самцов pABX (Расширенные данные, рис. 6a–d). Мы пришли к выводу, что ни отцовская передача измененной микробиоты, ни косвенные материнские реакции не лежат в основе эффектов F 1 .

Поэтому мы задались вопросом, передаются ли фенотипы F 1 именно через отцовские гаметы, при выполнении экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Здесь изогенные ооциты оплодотворяются спермой либо обработанных pABX, либо контрольных самцов, а затем имплантируются в высококачественных суррогатных

матерей CD1, исключая любой родительский контакт (Расширенные данные, рис. 6е). Мы обнаружили, что потомство ЭКО, полученное от доноров спермы с дисбиотическими свойствами, имело значительно сниженный вес новорожденных при рождении ($P = 0,034$, вложенный непарный t - тест; CON $n = 65$, pABX $n = 80$), нарушенный постнатальный рост ($P = 0,047$) и повышенную заболеваемость SGR по сравнению с контрольной группой (рис. 2h и Расширенные данные, рис. 6f). Независимое ЭКО с использованием реципиентных матерей BL6, которые являются относительно плохими суррогатами, воспроизвело эффекты веса при рождении F 1 от доноров спермы pABX с большей величиной эффекта (рис. 2i и расширенные данные рис. 6g) ($P = 0,050$, вложенный непарный t - тест; CON $n = 33$, pABX $n = 41$). Эти данные свидетельствуют о том, что отцовски индуцированные фенотипы F 1 возникают в независимых внутриутробных генетических фонах и передаются в основном через гаметы и соочистительные молекулы.

Ось кишечник-зародышевая линия

Передача через зародышевую линию побудила нас исследовать физиологические изменения в репродуктивной системе отца, вызванные острым дисбиозом микробиома кишечника. Сначала мы заметили, что у самцов-дисбиотов после 6 недель воздействия pABX были значительно меньшие по массе яички, чем у контрольной группы ($P = 0,001$, непарный t -тест; CON $n = 31$, pABX $n = 32$), что коррелировало с меньшим количеством сперматозоидов (рис. 3a и расширенные данные рис. 7a,b). Гистологический анализ показал архитектурные изменения в подмножестве семенных канальцев, включая вакуоли, образованные частичной потерей зародышевых клеток, чего не наблюдалось в контрольных яичках (рис. 3b и расширенные данные рис. 7a). Действительно, самцы pABX показали значительное увеличение числа аномальных семенных канальцев ($P = 0,032$, вложенный критерий Манна–Уитни; среднее значение CON 0,64%, pABX среднее значение 3,84%) и снижение толщины эпителия ($P = 0,016$; вложенный непарный t -критерий) (рис. 3c,d и расширенные данные рис. 7b–d). Эти данные указывают на то, что на физиологию яичек влияет нарушение микробиоты кишечника.

Рис. 3: Реакция яичек на дисбактериоз кишечной микробиоты указывает на регуляторную ось кишечник-зародышевая линия.

рисунок 3 а , Ящичковая диаграмма, показывающая соотношение массы яичек к массе тела после 6 недель лечения pABX у самцов. Столбик представляет собой медиану, а усы указывают на 5–95-й процентиль. Значение P по непарному двухстороннему t -критерию (CON $n = 31$; pABX $n = 32$). b , Репрезентативные окрашенные гематоксилином и эозином гистологические срезы яичек контрольных и pABX самцов. Семенные каналцы у дисбиотических самцов показывают частоту вакуолей, образованных потерей эпителия и отсутствием митотических (сперматогонияльных) компартментов. Звездочками обозначены аномальные каналцы. c , Количественная оценка аномальных каналцев яичек у контрольных и дисбиотических самцов. Значение P по вложенному тесту Манна–Уитни (CON $n = 54$ секции, вложенные в $N = 4$ самца; pABX $n = 72$, $N = 5$; $P = 0,032$). Столбец представляет собой медиану, а усы указывают на 5–95-й процентиль. d , Количественная оценка толщины эпителия семенных канальцев. Значение P по вложенному t -тесту (CON $n = 854$ каналца, $N = 4$ самца; pABX $n = 1061$, $N = 4$; $P = 0,016$). Столбец представляет собой медиану, а усы указывают на 5–95-й процентиль. e , РСА нецелевых метаболомных профилей из независимых яичек контрольных или дисбиотических самцов (6 недель, 6 недель + 4 приема) и после восстановления микробиома кишечника (6 недель + 8 прием). f , График «Вулкан», выделяющий дифференциально обильные метаболиты в яичках через 6 недель pABX и во время восстановления для восстановления микробиома кишечника. Значение P по двухстороннему t -тесту, скорректированному для множественного тестирования. g , МА ((М (логарифмическое отношение 2) и А (среднее среднее)), показывающий изменения экспрессии генов в яичках у независимых ($n = 5$) самцов pABX. h , Количественное определение уровня гормона лептина в яичках (слева) и циркулирующей плазме (справа)

самцов с дисбиотиком через 6 недель pABX с помощью ELISA. Полоса обозначает среднее значение с 95% ДИ усы. Значение P по непарному двухстороннему t-тесту (CON n = 9; pABX n = 9). i , Особенности яичек у самцов с дефицитом лептина (ob/ob) в течение 6 недель и контрольных животных дикого типа (WT n = 3; ob/ob n = 3). Слева, срезы канальцев, окрашенные гематоксилином и эозином; звездочки указывают на аномальную гистоархитектуру. Справа, вес яичек, Рзначение по непарному двухстороннему t-тесту, а черта указывает среднее с 95% ДИ. j , Транскриптомный PCA бластоцист, полученных от отцов с дефицитом лептина или контрольных отцов. Точки данных представляют собой отдельные эмбрионы из двух независимых экспериментов ЭКО, каждый с тремя независимыми отцами и отцами-однопометниками в качестве контроля. Масштабные линейки, 100 мкм (левая панель) или 50 мкм (правая панель) (b); 50 мкм (i). FC, кратное изменение.

Чтобы охарактеризовать реакцию репродуктивной системы на дисбиоз на молекулярном уровне, мы сначала провели нецелевое метаболомное профилирование яичек отца, аннотировав 3803 признака 34 . Глобальный PCA аннотированных метаболитов показал кластеризацию яичек в соответствии со статусом микробиоты кишечника, с четким разделением между pABX и контрольными самцами как на 6 неделе, так и на 6 неделе + 4 рекомендательных, что соответствует периоду переданных эффектов F 1 (рис. 3e). Напротив, метаболомные профили яичек на 6 неделе + 8 рекомендательных неразличимы, что указывает на то, что метаболиты динамически восстанавливаются одновременно с восстановлением микробиоты кишечника и с обратимостью переданных эффектов F 1 . Мы идентифицировали 68 значимых дифференциально обильных метаболитов в яичках мужчин с дисбиотиками, которые включали жирную кислоту анандамид, которая действует в эндоканнабиноидном пути, и сигнальный липид сфингозин-1-фосфат (S1P) (рис. 3f и расширенные данные рис. 8a). Дифференциально обильные метаболиты особенно обогащены сфинголипидами и глицерофосфолипидами, а также эндоканнабиноидами, которые все были вовлечены в функцию зародышевых клеток 35 (расширенные данные рис. 8b). Мы также исследовали транскриптомные профили в яичках мужчин с дисбиотиками, наблюдая ограниченные изменения экспрессии как на уровне массы, так и на уровне отдельных клеток (рис. 3g и расширенные данные рис. 8c–f и 9a–g). Обогащение набора генов показало, что гены, связанные с глицерофосфолипидами и стероидогенезом, были преимущественно дисрегулированы, что согласуется с измененными метаболитическими профилями (Расширенные данные, рис. 8e–g). Однако наиболее чувствительным геном был лептин (рис. 3g и Расширенные данные, рис. 9h), который кодирует гормон, вырабатываемый в основном адипоцитами, но также и зародышевыми клетками, с ключевыми ролями в энергетическом гомеостазе и воспроизводстве 36 , 37 .

Совокупные доказательства указывают на значительное изменение в среде яичек в ответ на пертурбацию кишечного микробиома, включая измененные профили метаболитов, физиологию и гормоны. Это предполагает существование оси кишечник-зародышевая линия у млекопитающих, которая несет важную гомеостатическую функцию, аналогичную недавним сообщениям о *Drosophila* 38 , 39 .

Среди отцовских реакций на pABX было сильное нарушение регуляции лептина (рис. 3g). Проверка с помощью ELISA показала, что дисбиоз, вызванный pABX, приводит к значительному снижению уровня гормона лептина, как системно в циркулирующей крови (P = 0,0001, непарный t-тест; CON n = 3; pABX n = 3), так и конкретно в яичках (P = 0,0003; CON n = 9; pABX n = 9) (рис. 3h). Чтобы исследовать последствия этого, мы использовали 6-недельных мышей ob/ob (Leptin -null), которые моделируют временной интервал дефицита лептина, вызванного 6 неделями воздействия pABX. Такие молодые самцы ob/ob имели сниженный вес яичек (P = 0,014) и аномалии канальцев, перемежающиеся с нормальной гистоархитектурой, подобно дисбиотическим самцам pABX в возрасте 6 недель (рис. 3i и расширенные данные, рис. 10a–c). Поэтому мы

оценили межпоколенческое влияние краткосрочного дефицита лептина. Хотя естественные спаривания не увенчались успехом, ЭКО с использованием 6-недельной спермы ob/ob оплодотворяло ооциты дикого типа так же эффективно, как и контрольная сперма, что подразумевает жизнеспособность зародышевых клеток (расширенные данные, рис. 10d). Транскриптомика отдельных эмбрионов полученных бластоцист показала, что потомство, рожденное от отцов с дефицитом лептина, сильно кластеризуется вдали от эмбрионов, рожденных от контрольных отцов (рис. 3j и расширенные данные, рис. 10e,f). Действительно, мы обнаружили более 500 F 1 высоконадежных DEG с преимущественно дерегулированными хроматиновыми путями (Расширенные данные, рис. 10g–i). Важно отметить, что сам лептин не экспрессируется во время раннего развития, что исключает гаплонедостаточный эффект гетерозиготности F 1 (Расширенные данные, рис. 10g). Взятые вместе, эти данные показывают, что лептин системно дисрегулируется индуцированным дисбиозом микробиома и что прямое нарушение отцовского лептина до зачатия имеет межпоколенческое наследие в программах экспрессии генов потомства, подразумевая лептин как важный сигнальный компонент в оси кишечник-зародышевая линия.

Затем мы попытались понять влияние оси кишечник-зародышевая линия на зрелые гаметы, выискивая молекулярные изменения в сперме. Сначала мы составили карту метилирования ДНК с разрешением оснований. Независимые метиломы ($n = 5$) очищенной спермы от самцов pABX были в высокой степени сопоставимы с контрольными образцами, без изменений в DNAm в глобальном масштабе или в геномных признаках (рис. 4a и расширенные данные, рис. 11a,b). Мы идентифицировали только 21 дифференциально метилированную область (DMR) по всему геному (логистическая регрессия P (скорректированная (adj)) $< 0,05$ и $> 20\%$ абсолютного изменения, 50 плиток CpG) (рис. 4a и расширенные данные, рис. 11c,d), которые обычно перекрывали эпивариабельные береговые области CpG, что подразумевает, что они могут отражать естественную изменчивость. Все геномные отпечатки были правильно установлены как в контрольной, так и в pABX сперме (расширенные данные, рис. 11e). Затем мы проанализировали малые РНК, переносимые спермой, с помощью высококачественных библиотек из независимых коллекций спермы ($n = 9$ самцов, объединенных в $N = 3$). Мы обнаружили значительные изменения в содержании нескольких микроРНК, включая miR-141 (P (adj) $= 1,15 \times 10^{-9}$) и miR-200a (P (adj) $= 0,008$), которые действуют вместе, регулируя эпителиально-мезенхимальный переход и развитие плаценты (рис. 4b и расширенные данные рис. 11f,g) 40 , 41 . Мы также наблюдали изменения в содержании фрагментов 5' транспортной РНК (tRF) и, в частности, повышение регуляции tRF-Gly-GCC у дисбиотических самцов (рис. 4b и расширенные данные рис. 11f–h), что было связано с межпоколенческими эффектами 42 , 43 . Количественные различия в содержании малых РНК были подтверждены в независимых образцах с помощью количественной ПЦР TaqMan (Расширенные данные, рис. 11i). В целом, хотя метилирование ДНК относительно стабильно, состав малых РНК в сперме изменяется в ответ на дисбиоз, опосредованный pABX. Учитывая измененные метаболитные и гормональные профили, это предполагает, что изменения состава макромолекул передаются потомству.

Рис. 4: Отцовский дисбактериоз вызывает плацентарную недостаточность F 1 .

рисунок 4 а , Слева, тепловая карта, показывающая уровни метилирования ДНК по геномным признакам в сперме контрольных или обработанных pABX самцов ($n = 5$ метиломов на условие) с помощью бисульфитного секвенирования всего генома. Справа, диаграмма рассеяния метилирования ДНК по всему геному (50 плиток CpG) с выделенными дифференциальными плитками. b , Тепловые карты, показывающие дифференциальное содержание выбранных фрагментов miRNA (слева) и tRNA (справа) в объединенной очищенной сперме независимых ($n = 9$) контрольных или pABX самцов. c , РСА транскриптомов из эмбрионального (E13.5) мозга и плаценты в соответствии с

отцовским воздействием. d , PCA транскриптомов плаценты на E18.5 из независимых пометов. e , График «Вулкан», показывающий DEG в плаценте E18.5, рожденной от 6-недельных обработанных nABX самцов. Значение P скорректировано для множественного тестирования. f , Экспрессия ключевых генов для развития плаценты в плаценте E18.5. Черта обозначает среднее значение, а усы — sd. Каждая точка данных представляет собой независимую плаценту (CON n = 5 плацента (3 помета); nABX n = 5 плацента (3 помета)). g , Отношение массы плода к массе плаценты в E18.5 в зависимости от состояния отца до зачатия. Черта обозначает среднее значение, значение P по непарному двухстороннему t- критерию (CON n = 82, nABX n = 53). h , Экспрессия биомаркеров преэклампсии (ПЭ) в плаценте E18.5, полученной от отцов nABX. Черта обозначает среднее значение, а усы — sd. Значение P по скорректированному на множественное тестирование DESeq2. CON n = 5 плацента (3 помета); nABX n = 5 плацента (3 помета). i , Представительная плацента, полученная от контрольных или дисбиотических самцов (nABX), окрашенная на DAPI (синий) и VE-кадгерин (красный) для разграничения лабиринтной зоны (LZ). Количественная оценка ниже показывает LZ как отношение к общей площади. Столбцы указывают среднее значение $\pm$ 95% ДИ. Каждая точка данных представляет собой независимый срез ткани плаценты (CON n = 4 плаценты (4 помета); nABX n = 6 плаценты (6 пометов)). JZ, соединительная зона. Значение P по непарному двухстороннему t -тесту. j , Уровни белка фактора роста плаценты (PLGF) (слева), маркера ПЭ и соотношение sFLT1/PLGF (справа) в плаценте F 1 в зависимости от отцовского режима. Значение P по двухстороннему t -тесту. Столбцы указывают медиану. Каждая точка данных представляет собой независимую плаценту (CON n = 12 плацент (7 пометов); nABX n = 12 плацент (6 пометов); avaABX n = 8 плацент (3 помета)). Звездочки указывают значения P 0,05 или менее* и 0,0001 или менее***. Масштабная линейка 100 мкм. Prom, промоутер.

Исходные данные

Полноразмерное изображение

Плацентарные реакции на дисбиотических отцов

Чтобы понять механизм, посредством которого сперма влияет на фенотип потомства, мы стремились определить первоначальный источник эмбриональных дефектов. На E13.5 (примерно в середине беременности) мы не обнаружили DEG у эмбрионов, полученных от самцов, обработанных nABX, по сравнению с контрольной группой, и эмбриональные транскрипты не могли быть различены с помощью PCA (рис. 4с). Напротив, транскрипты плаценты на E13.5 от независимых спариваний сильно кластеризовались в зависимости от отцовского режима nABX (рис. 4с), с 538 DEG, которые включали подавление нескольких генов пролактина (расширенные данные, рис. 12a,b). Чтобы изучить это более подробно, мы проанализировали зрелую плаценту на E18.5 и наблюдали, как их транскрипты кластеризовались в соответствии со статусом отцовского микробиома, с 348 высоконадежными DEG (рис. 4d и расширенные данные, рис. 12с). Активированные DEG обогащены для метаболизма стероидов ($P(\text{adj}) = 2,31 \times 10^{-7}$), тогда как деактивированные DEG связаны с гликолизом ($P(\text{adj}) = 0,00039$) (рис. 4е). Примечательно, что они также включают деактивацию нескольких факторов, важных для развития плаценты, таких как Hand1 и Syna , что указывает на нарушение плацентарного онтогенеза (рис. 4f). Для дальнейшего изучения этой возможности мы оценили соотношение массы плаценты по отношению к эмбриону на E18.5. Мы обнаружили значительное изменение в соотношении плода к плаценте F 1 при рождении от самцов nABX ($P = 0,0004$, непарный t -тест; CON n = 82 nABX n = 53), что обусловлено, в частности, снижением массы плаценты (рис. 4g). Это согласуется с дефектом плаценты, полученным от отцов-дисбиотов.

Чтобы расшифровать молекулярную этиологию, лежащую в основе этого, мы отметили, что в первую десятку DEG в плаценте, полученной от nABX, вошли несколько клинических маркеров нарушений плацентарной недостаточности человека, таких как

преэклампсия (рис. 4d и расширенные данные, рис. 12c). Например, Plgf был значительно снижен в зрелых плацентах, полученных от отцов-дисбиотов, тогда как повышенные маркеры преэклампсии включают соотношение Flt : Plgf , Clu и Afr (рис. 4h). Для дальнейшего изучения возможности отцов-дисбиотов вызывать плацентарную недостаточность мы изучили структуру плаценты. Здесь плацента, полученная от отцов pABX, была связана со значительно уменьшенной зоной лабиринта ($P = 0,0098$) (рис. 4i), что является частой основной причиной плацентарных расстройств 44 . Действительно, мы также обнаружили значительное нарушение васкуляризации ($P = 0,0076$) и увеличение инфаркта плаценты ($P = 0,0296$) (Расширенные данные, рис. 12d–g). Наконец, мы проанализировали уровень гормона плацентарного фактора роста (PLGF), который при низком уровне является основным диагностическим маркером преэклампсии у людей 45 . Мы обнаружили, что PLGF был значительно ниже в плаценте, когда потомство было получено от дисбиотических самцов, вызванных либо pABX ($P = 0,034$), либо avaABX ($P = 0,0006$), в то время как соотношение sFLT/PLGF было значительно повышено (рис. 4j).

Обсуждение

В совокупности совокупность доказательств свидетельствует о том, что экологические нарушения микробиоты кишечника вызывают значительную репродуктивную реакцию у потенциальных отцов. Это подтверждает регуляторную ось кишечник-зародышевая линия, которая при нарушении может распространяться, влияя на риск заболеваний потомства, по крайней мере частично, влияя на предстоящую функцию плаценты. Таким образом, микробиота кишечника может выступать в качестве основного интерфейса, в котором различные экологические воздействия, такие как режимы приема антибиотиков или диета, могут сходиться и передавать сигналы мужским зародышевым клеткам напрямую или косвенно, в конечном итоге оказывая влияние на потомство. Однако такие отцовские эффекты F 1 проявляются вероятно, при этом многофакторные молекулярные механизмы, действующие в/на сперме, вероятно, взаимодействуют, поддерживая передачу. Хотя мы и идентифицируем здесь измененные липидные метаболиты, гормоны, такие как лептин, и малые полезные нагрузки РНК, необходима будущая работа по деконволюции фенотипически значимых модальностей наследования и их применимости за пределами мышинных моделей. Однако наше наблюдение, что отцовское кондиционирование может влиять на плацентарный онтогенез, обеспечивает механистическое обоснование для межпоколенческих эффектов млекопитающих 46 . Более того, поскольку восстановление микробиоты кишечника отца до зачатия спасает возникающие фенотипы F 1 , эффект обратим и, таким образом, поддается коррекции. Учитывая распространенность образа жизни и практик применения антибиотиков, которые (пере)формируют микробные сообщества человека 23 , 24 , 25 , 47 , это может оказаться областью интереса для смягчения неблагоприятных исходов беременности. В более общем плане наши данные подчеркивают важность понимания того, как факторы окружающей среды могут изменять сложные биологические системы в разных масштабах: от прямых молекулярных реакций до восприимчивости к межпоколенческим заболеваниям.

Методы

Животноводство

Все эксперименты с участием мышей проводились в соответствии с утвержденным протоколом и руководящими принципами комитета по управлению лабораторными животными и этике Европейской лаборатории молекулярной биологии (EMBL) по лицензии № 20190708_JH и Министерства здравоохранения Италии по коду разрешения № 308/2021-PR. Инбредный штамм C57BL/6J использовался в качестве основной мышинной модели, тогда как самки CD1 IGS или C57BL/6J использовались в качестве суррогатных матерей для ЭКО. Мыши C57BL/6J с дефицитом лептина (мыши ob/ob) использовались для изучения межпоколенческих эффектов отцовского дефицита яичек

лептина. Мыши содержались в условиях 12-часового цикла свет/темнота (с 07:00 до 19:00) с неограниченным доступом к обычному рациону и воде. Стандартный корм содержит 18,5% белка, 5,3% жира, 4% клетчатки и другие пищевые добавки в форме гранул и подходит для длительного содержания, разведения, лактации и периода беременности (NFM18, Mucedola).

Экспериментальная стратегия по индуцированию дисбактериоза у животных

В возрасте 5 недель самцы мышей C57BL/6J без специфических патогенов (SPF) были переведены в обычное колониальное учреждение. Самцов мышей разделили на отдельные клетки (по одной мыши на клетку) и случайным образом распределили на две группы: (1) контрольная группа, которая получала обычную диету и стерильную фильтрованную (0,2 мкм) воду в течение шести последовательных недель (сокращенно мыши CON); (2) обработанная группа, которая получала обычную диету и стерильную фильтрованную (0,2 мкм) воду с добавлением коктейля из одобренного FDA pABX (неомицин 2,5 мг мл⁻¹, бацитрацин 2,5 мг мл⁻¹ и пимарицин 1,25 мкг мл⁻¹; сокращенно pABX) в течение 6 последовательных недель. Бутылка с водой и коктейль pABX заменялись свежими каждые 5 дней. В конце 6 недель лечения самцов мышей из обеих групп спаривали с необработанными 6-недельными инбредными самками мышей C57BL/6J. После спаривания самцов мышей содержали в течение дополнительных 8 недель без pABX (период восстановления), и они имели свободный доступ к обычной диете и стерильной фильтрованной (0,2 мкм) воде. В течение 8-недельного периода восстановления каждый самец спаривался в двух временных точках: через 4 недели после отмены pABX и через 8 недель после отмены pABX (обозначаемых как 6 недель + 4гес и 6 недель + 8гес соответственно). Все самки мышей получали обычную диету и воду в течение всего периода беременности и лактации. Следует отметить, что дозировка каждого используемого антибиотика ниже стандартной эквивалентной дозы для человека и составляет половину стандартной дозы, вводимой мышам в предыдущих исследованиях, и, следовательно, представляет собой относительно низкий режим дозировки, предназначенный для нарушения, а не уничтожения сообществ кишечной микробиоты^{30,48,49}.

Эквивалентная экспериментальная установка и 6-недельный курс времени использовались для альтернативных стратегий, чтобы вызвать острый дисбактериоз кишечника. Во-первых, введение *ad libitum* коктейля абсорбируемых антибиотиков (ампициллин 0,5 мг мл⁻¹, ванкомицин 0,25 мг мл⁻¹ и амфотерицин В 12,5 мкг мл⁻¹; сокращенно avaABX) в отфильтрованной (0,2 мкм) воде. Во-вторых, посредством очищения кишечника с использованием 5% ПЭГ (ПЭГ 4000, EMD Millipore). При этом самцам-производителям давали avaABX или 5% ПЭГ в питьевой воде в течение 6 недель, чтобы спровоцировать острый дисбактериоз кишечной микробиоты, тогда как случайно назначенная контрольная группа получала только стерильную отфильтрованную (0,2 мкм) воду. В конце 6 недель самцы мышей из каждой группы спаривались с нелечеными 6-недельными самками мышей C57BL/6J. Для каждого антибиотика вводимая доза была скорректирована до половины стандартной дозы антибиотика, которая использовалась в предыдущих исследованиях^{50, 51, 52}. Аналогично, концентрация ПЭГ была ниже стандартной дозы, используемой для очищения кишечника человека или для лечения запоров и в предыдущих исследованиях на мышах³¹.

Параметры мужской фертильности

Для оценки влияния дисбиоза, вызванного pABX, на самцов-производителей соотношение массы яичек к массе тела и стандартные параметры фертильности самцов были охарактеризованы на основе количественного описательного анализа, который включает массу тела самца, массу яичек, количество сперматозоидов и потенциальную плодовитость:

1. Соотношение веса яичек к весу тела: для оценки эффекта лечения pABX измеряли вес тела самцов-производителей, получавших лечение в течение 6

недель, и сравнивали его с весом самцов-производителей CON того же возраста. Кроме того, для оценки воздействия на репродуктивные органы яички были тщательно собраны у мышей, получавших лечение CON и nABX, взвешены и рассчитана разница в соотношении веса яичек к весу тела между двумя группами.

2. Подсчет сперматозоидов: для подсчета сперматозоидов использовался метод, описанный в ссылке 53. Вкратце, суспензии сперматозоидов готовили путем измельчения хвоста в 1 мл 1× PBS (pH 7,2). Суспензию пипетировали и фильтровали через нейлоновую сетку 80 мкм для удаления фрагментов тканей. Аликвоту (0,05 мл) из суспензии сперматозоидов (1 мл) разбавляли 1:40 PBS (pH 7,2) и тщательно перемешивали. Суспензию сперматозоидов подсчитывали с помощью камеры Бюркера после сброса нескольких капель суспензии. Чтобы определить количество сперматозоидов на миллилитр, количество сперматозоидов в каждом из четырех квадратов (1 мм²) усредняли и умножали на коэффициент разбавления $\times 10^4$ для расчета общего количества сперматозоидов на мышь.
3. Потенциал плодовитости: 11-недельные самцы-производители (обработанные как CON, так и nABX) спаривались с необработанными 6-недельными самками C57BL/6J. Самок проверяли на наличие копулятивной пробки в течение первых 4 дней и переводили в клетку для содержания, как только пробка оказывалась положительной, затем снова проверяли через 3 недели на беременность и размер помета.

Потомство поколения

Для получения потомства F 1 использовались как естественное спаривание, так и искусственное (ЭКО). Для обеспечения того, чтобы исследователи и сотрудники животноводческого хозяйства были вдвойне слепы к отцовскому режиму лечения, использовалась система кодирования.

Естественное спаривание

Для получения потомства F 1 каждый самец мыши CON или nABX был помещен с одной 6-недельной девственной самкой, не подвергавшейся лечению. В течение периода спаривания (1–4 дня) мыши содержались в стандартных оптимизированных условиях окружающей среды с неограниченным доступом к обычному рациону и воде. Каждое утро самок проверяли на вагинальный статус, всех самок с положительными признаками спаривания (вагинальные пробки) удаляли из клетки самцов и помещали в новую клетку, тогда как всех самок, у которых не было вагинальной пробки, возвращали в клетки самцов во второй половине дня и осматривали каждое последующее утро. Чтобы свести к минимуму передачу микробов между парами, содержащимися вместе, часы спаривания пар были ограничены с конца дня до раннего утра (15:00–09:00) в течение всего периода спаривания.

Экстракорпоральное оплодотворение

Как было описано ранее 54, этот метод генерации потомства F 1 следует пяти критическим этапам: (1) суперовуляция самок-доноров ооцитов; (2) подготовка свежей спермы от самцов-отцов; (3) сбор изогенных ооцитов от самок-доноров; (4) оплодотворение спермой и ооцитом *in vitro*; (5) перенос эмбрионов псевдобеременным суррогатным матерям CD1 или C57BL/6J. Этот процесс выполнялся следующим образом:

1. Суперовуляция: самкам мышей-доноров ооцитов C57BL/6J в возрасте 4 недель вводили внутривентрально 0,2 мл PMSG плюс антисыворотку ингибина (IAS). Ровно через 48 ч донорам ооцитов вводили внутривентрально ХГЧ (0,15 мл). При этом инъекция ХГЧ производилась в соответствии с запланированным временем оплодотворения спермой и ооцитом (примерно через 13–14 ч после инъекции ХГЧ).

2. Подготовка свежей спермы: cauda epididymis были иссечены у 11-недельных мышей, с очищением от избытка жировой ткани и крови. Затем cauda epididymis был перенесен в чашку для культивирования органов с центральным отверстием (Falcon), содержащую 120 мкл криопротекторного агента (CRA). Поперек каждой cauda epididymis было сделано от пяти до шести надрезов оптимизированными ножницами, и поверхность cauda была осторожно нажата для высвобождения спермы. Свежая сперма была предварительно инкубирована в CRA в течение 3 минут при 37 °C с легким перемешиванием чашки Петри каждую минуту. 10 мкл суспензии спермы было перенесено в центральную каплю 90 мкл среды TYN-MBCD, и свежая сперма была активирована путем инкубации в течение не менее 10–30 минут при 37 °C в инкубаторе с 5% CO₂. Чашки оставались неподвижными до тех пор, пока сперма не начинала быстро двигаться и не достигала равновесия в среде.
 3. Сбор ооцитов: за день до сбора ооцитов 90 мкл среды HTF, содержащей 1 mM GSH, покрывали парафиновым маслом и помещали на ночь при 37 °C в инкубатор с 5% CO₂ для достижения равновесия. На следующий день яйцевод, изолированный от каждой суперовулированной самки (всего десять доноров), разделяли на две части, половину использовали для оплодотворения спермой мышей CON, а половину — спермой мышей, обработанных nABX, что гарантировало изогенный источник ооцитов и исключало качество ооцитов-доноров как искажающий эффект. После того, как каждая половина ампул яйцевода была перенесена в чашку для оплодотворения, содержащую капли HTF, набухшие ампулы отсекали иглой 18G, чтобы высвободить кумулюсные массы в масло, а затем переносили в каплю для оплодотворения.
 4. Оплодотворение спермой и ооцитом: из капацитированных сперматозоидов в каплях TYN-MBCD брали 10 мкл суспензии спермы из периферической части капель преинкубации, которые содержали наиболее подвижные сперматозоиды. Затем аликвотированные сперматозоиды переносили либо от мышей CON, либо от мышей, обработанных nABX, в центр капель в чашке для оплодотворения, содержащей ооциты. После оплодотворения ооцитов спермой чашки для оплодотворения спермой и ооцитами культивировали при 37 °C в условиях 5% CO₂ в течение 3–4 часов. Через 3–4 часа инкубации предполагаемые зиготы промывали три-четыре раза 150 мкл каплями среды M2 и культивировали в течение ночи в четырехлуночных планшетах NUNC с 500 мкл среды KSOM, дополненной аминокислотами (KSOMaa), при 37 °C в условиях 5% CO₂ и 5% O₂ в инкубаторе. Через 18–24 часа оплодотворенные эмбрионы на стадии двух клеток переносили в яйцеводы псевдобеременных суррогатных мышей-самок CD1 или C57BL/6J.
 5. Перенос эмбрионов: перенос эмбрионов проводился, как описано ранее⁵⁵. Вазэктомированных самцов спаривали с самками CD1 в возрасте 6–8 недель или C57BL/6J (27–30 г) для получения псевдобеременных реципиентов в течение 0,5 дней после коитума (dpc). Самок с положительным результатом на плаг отбирали и анестезировали путем вдыхания изофлуорана. Для переноса эмбрионов на двухклеточной стадии применялись следующие последовательные шаги: открывалась дорсальная срединная линия, стенка тела яичника надрезалась и удерживалась снаружи тела, после разрыва сумки кончик капилляра вставлялся в воронку для переноса ±20 эмбрионов на одну псевдобеременную мышь CD1 или C57BL/6J и, наконец, легким нажатием через ротовую пипетку вытесняли эмбрионы из стеклянной капиллярной трубки в воронку одного яйцевода.
- Фенотип F1 после совместного содержания для изучения косвенных эффектов
- Чтобы отделить потенциальное косвенное влияние на потомство содержания самок с дисбиотическим самцом (например, микробный перенос к матерям или копрофагия фекалий nABX), мы использовали стратегию совместного содержания в сочетании с

контрольным (независимым) спариванием самцов. Самец, который либо подвергался 6-недельному воздействию nABX ранее, либо контрольный самец помещались к одной 6-недельной девственной самке, не проходившей лечение, в течение дня (09:00–16:00), повторяя полное родительское совместное воздействие. Самцов удаляли из клеток в 16:00, чтобы предотвратить спаривание ночью, а самки оставались в клетках самцов, чтобы максимально увеличить возможность обнаружения микробного переноса или копрофагических эффектов. Каждый день в 16:00 самок проверяли на вагинальный статус, все самки с положительными признаками спаривания (вагинальные пробки) исключались из исследования, тогда как все самки с отрицательным результатом на вагинальную пробку содержались в клетках самцов. В течение 4 дней совместного содержания мыши содержались в стандартных оптимизированных условиях окружающей среды с неограниченным доступом к пище и воде. После 4 дней совместного содержания все самки с отрицательным результатом на плаг (подвергнутые воздействию самцов nABX или CON) спаривались с самцами мышей C57BL/6J в возрасте 11 недель, выращенными традиционным способом (независимые наивные самцы), чтобы определить, можно ли обнаружить какие-либо косвенные эффекты предыдущего воздействия самцов nABX в фенотипах F 1 .

Потомство поколения F 2

Потомство F 2 было получено путем скрещивания двух братьев и сестер из поколения F 1 , полученных либо от дисбиотических (nABX), либо от CON F 0 производителей.

Фенотипирование и сбор тканей

Масса тела потомства и показатели выживаемости

Сравнительный анализ фенотипа роста был применен для оценки пренатального и постнатального развития F 1 . Спаривания были организованы с использованием системы слепого кода, а фенотипы F 1 были зарегистрированы отдельными лицами и/или персоналом животноводства без знания состояния отца. Для постнатального анализа регистрировался размер помета при рождении и отслеживались мертворожденные детеныши. Масса тела детенышей измерялась каждые 3 дня с постнатального дня P3 до возраста отъема (P3–P21) и каждую неделю до P56. Заболеваемость и смертность потомства F 1 также регистрировались ежедневно в этом возрастном диапазоне (P0–P60). Для учета выбросов из-за экстремальных эффектов размера помета в исследование были включены только пометы в пределах 2 sd от среднего размера помета (6 ± 2 детеныша на помет) (то есть пометы из 4–8 детенышей), что соответствовало примерно 81% от общего числа пометов. Аналогичным образом, траектории постнатального веса тела потомства F 1 , полученного с помощью ЭКО, были охарактеризованы и проанализированы с использованием вышеупомянутых методов. Обратите внимание, что беременные самки F 0 , а также потомство F 1 получали обычную диету и стерилизованную воду на протяжении всей беременности, лактации и периода после отлучения от груди. Для фенотипирования пренатального зачатка F 1 , полученного от самцов, обработанных CON или nABX, беременных самок убивали либо на E13.5, либо на E18.5. Плаценту и плод тщательно изолировали, очищали и взвешивали. Затем эмбриональные ткани и плаценты изолировали для транскриптомного профилирования. Плацентарную ткань далее собирали для иммунофлуоресцентного или ELISA-анализа.

Выделение тканей и спермы для науки

Яички и эпидидимальная сперма были выделены, как описано ранее 42 , для обеспечения максимальной чистоты и качества. Вкратце, яички были тщательно препарированы у 11-недельных мышей, со всеми жировыми подушечками, перед индивидуальным взвешиванием, быстро заморожены в жидком азоте и хранились при температуре -80°C до обработки для транскриптомики или анализа ELISA. Контралатеральное яичко было обработано для гистологического окрашивания. Для сбора спермы cauda epididymis была препарирована у мышей и помещена в среду M2 при

подогреве 37 °С. Два небольших разреза были сделаны на проксимальном конце cauda с помощью иглы 26G, и отверстия были проколоты в остальной ткани, чтобы позволить сперме выплыть и выпустить эпидидимальную жидкость. Среду, содержащую сперму, инкубировали в течение 30 минут при 37 °С, затем переносили в чистые пробирки и инкубировали еще 15 минут при 37 °С. После инкубации сперму собирали центрифугированием при 2000 g в течение 5 мин, затем промывали 1× PBS и второй промывкой буфером соматического лизиса (содержит 0,1% SDS и 0,5% Triton-100X, разведенных в дистиллированной H₂O) в течение 20 мин на льду, что важно для устранения любого потенциального загрязнения соматическими клетками. Затем образцы спермы, обработанные буфером соматического лизиса, собирали центрифугированием при 3000 g в течение 5 мин и, наконец, дважды промывали 1× PBS и хранили при температуре –80 °С. Очистка сперматозоидов была подтверждена микроскопическим исследованием.

Выделение отдельных клеток яичек для 10-кратного секвенирования РНК отдельных клеток

Отдельные клетки яичек были выделены с использованием двухэтапного протокола ферментативного переваривания, описанного ранее [56], с небольшими модификациями. Вкратце, яички самцов nABX и CON были вырезаны, дважды промыты в PBS, белочная оболочка удалена, каждое яичко помещено в 1 мл буфера для лизиса (1 мг мл⁻¹ коллагеназы А, разведенной в PBS) и измельчено пять раз с использованием наконечника Р1000 для разрушения ткани и инкубировано в течение 5 мин при 37 °С с легким встряхиванием при 300 об./мин. Канальцы были осаждены под действием силы тяжести, центрифугированы в течение 5 мин при 300 g при комнатной температуре. Супернатант был удален, а оставшаяся ткань промыта PBS и переварена в TrypLE (1×) и ДНКазе I. Суспензию энергично измельчено десять раз, инкубировано при 37 °С в течение 5 мин, затем повторено измельчение и инкубация до конца 15 мин. Расщепленную суспензию отдельных клеток последовательно фильтровали по размеру и промывали через фильтры 70 и 40 мкм и осаждали центрифугированием при 300 g в течение 5 мин. Осажденные клетки ресуспендировали в 1 мл холодного PBS + 0,04% BSA, объединяли в пробирке Falcon (четыре яичка на группу) и подсчитывали с помощью Countess II (средняя жизнеспособность 85–90%). Целевую концентрацию клеток регулировали в диапазоне около 1100 клеток мкл⁻¹ с помощью холодного PBS с 0,04% BSA и помещали на лед до загрузки на чип 10x Chromium.

Сбор семенной жидкости

Семенные пузырьки собирали в ламинарном боксе, как описано ранее [57] с небольшими модификациями. Для предотвращения перекрестного заражения одно экспериментальное животное (CON или nABX) помещали в бокс на каждый сбор образцов. Для обеспечения максимальной стерилизации экспериментатор надевал стерильный халат, перчатки, маску и мыл руки 70% этанолом, а затем выполнял следующие процедуры. Вкратце, мышей помещали в ламинарный бокс, который предварительно очищали 70% этанолом и 2% Virkon, после чего подвергали 2 часам ультрафиолетового облучения. Для асептического сбора семенных пузырьков мышей подвергали эвтаназии путем смещения шейных позвонков, а их брюшные области очищали 70% этанолом и надрезали стерилизованными пинцетом и ножницами. Затем семенные пузырьки вырезали с помощью новых стерилизованных пинцетов и ножниц и помещали в стерилизованную пробирку Эппендорфа объемом 2 мл, быстро замораживали в сухом льду и хранили при температуре –80 °С до извлечения ДНК для профилирования микробиома семенной жидкости. Обратите внимание, что инструменты для препарирования, использованные при этом сборе образцов, использовались только один раз для каждой мыши.

Сбор крови

Образцы крови собирали из микропробирок для сбора крови из подкожной вены ноги (Microvette 100K3E SARSTEDT, каталожный номер 20.1278.100) и центрифугировали

при 5000 об./мин в течение 10 мин при температуре 4 °C; плазму получали и хранили при температуре -80 °C до проведения анализа.

Сбор ткани плаценты

Плацентарные ткани собирали в соответствии с протоколом, описанным в ссылке 58. Вкратце, образцы собирали на E13.5 и E18.5, считая с E0.5 как дня обнаружения копулятивной пробки. Концептуусы удаляли у беременной мыши, а рог матки, содержащий один концептус, сегментировали. Используя микроножницы, маточную мышцу осторожно отслаивали от антимезометриальной стороны (стороны, которая наименее васкуляризирована), желточный мешок разрезали, чтобы обнажить амниотический мешок, а плаценту осторожно препарировали и отделяли от пуповины и желточного мешка, чтобы собрать весь плацентарный диск без остатков разрезов или разрывов. Образцы быстро замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80 °C до тех пор, пока они не были обработаны для РНК-секвенирования или зафиксированы в 4% параформальдегиде для гистологии и иммуногистохимического анализа.

Эмбрионы до имплантации

Для получения эмбрионов на стадии бластоцисты использовался метод ЭКО. Вкратце, самки мышей-доноров ооцитов C57BL/6J в возрасте 4 недель были подвергнуты суперовуляции с помощью внутрибрюшинных инъекций PMSG (0,1 мл) и hCG (0,1 мл) через 48 часов. Капацитированные суспензии спермы были приготовлены либо из контрольных, либо из лептин-дефицитных (ob/ob) мышей в возрасте 6 недель и перенесены в центр подготовленных капель в чашке для оплодотворения, содержащей ооциты. Обратите внимание, что контрольные (wt/wt) и лептин-дефицитные (ob/ob) самцы-доноры спермы были однопометниками, полученными от гетерозиготных скрещиваний (wt/ob) и, таким образом, почти изогенными. После оплодотворения ооцитов изолированной спермой чашки для оплодотворения сперма-ооцит культивировались при 37 °C в условиях 5% CO₂ в течение 3–4 часов. После 3–4 ч инкубации предполагаемые зиготы промывали 3–4 раза 150 мкл каплями среды M2 и культивировали в течение 4,5 дней в четырехлуночных планшетах NUNC с 500 мкл среды KSOM, дополненной аминокислотами (KSOMaa), при 37 °C в инкубаторе с 5% CO₂ и 5% O₂. Через 4,5 дня каждый эмбрион на стадии бластоцисты собирали в полоски ПЦР-пробирок объемом 0,2 мл (содержащие 2 мкл лизирующего буфера + 1 мкл dNTPs + 1 мкл олиго-dT-праймера) для анализа РНК-секвенирования одного эмбриона (Smart-Seq). Обратите внимание, состав лизирующего буфера: 0,5% Triton-X100 (об./об.) в H₂O + 2 ед. мкл –1 ингибитора РНКазы SUPERase In (20 ед. мкл –1 ; Thermo, AM2694) и праймер Oligo-dT: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT30VN-3'.

Гистологическое окрашивание

Ткань яичек, собранная у 6-недельных леченных (nABX) или CON самцов мышей-производителей, фиксировалась в фиксаторе Буэна, затем обрабатывалась градуированным этанолом и осветляющим агентом (ксилолом), после чего заливалась в парафин. Затем образцы последовательно разрезались на срезы толщиной 5–7 мкм и окрашивались стандартным гематоксилином и эозином. Морфометрический анализ семенных канальцев яичек (то есть сперматогоний, сперматоцит, сперматид и клетки Сертоли) и клеток Лейдига проводился с использованием лазерного микродиссекторного микроскопа LMD 7000 (Leica). Количественная оценка аномальных семенных канальцев проводилась следующим образом: для каждого образца анализировалось не менее десяти срезов с оценкой более 1000 семенных канальцев (нормальных или аномальных), и процент аномальных канальцев рассчитывался соответствующим образом. Для этого анализа изображения были получены с помощью цифрового слайд-сканера NanoZoomer S60 (Hamamatsu Photonics, C13210-01).

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Образцы плаценты, собранные на E18.5, фиксировали в 4% параформальдегиде при 4 °C, затем заливали в парафин и разрезали на срезы толщиной 7 мкм. Срезы образцов

монтировали на предметные стекла и высушивали при 40 °C на горячей пластине. Высушенные срезы подвергали термическому извлечению антигена с использованием цитратного буфера при pH 6,0, инкубировали в течение ночи при 4 °C с антимышиным VE-кадгерином (Thermo Fisher Scientific; eBiosciences. номер по каталогу 14-1441-81; 2,5 мкг мл⁻¹) и детектировали с помощью анти-Rat-Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher Scientific; номер по каталогу A-11077; 4 мкг мл⁻¹). Ядра были контрастно окрашены 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (Thermo Fisher Scientific; номер по каталогу D1306; 5 мкг мл⁻¹). Предметные стекла были промыты перед тем, как быть помещенными в ProLong Glass (Thermo Fisher Scientific; номер по каталогу P36983) и сфотографированы на Leica THUNDER Imager Live Cell с объективом ×20 (числовая апертура = 0,8). Программное обеспечение для анализа изображений QuPath v.0.2.1 использовалось для измерения площадей лабиринтной зоны и всей плаценты.

Плацентарные сосуды на E13.5 и E18.5 были окрашены изолектином B4. Вкратце, сагиттальные 7 мкм срезы образцов плаценты были депарафинированы ксилолом и регидратированы посредством снижения концентрации этанола. Срезы слайдов были подвергнуты термическому извлечению антигена в течение 10 мин в 10 мМ цитратном буфере pH 6.0. После этого эти срезы были пермеабелизованы 0.3% Triton-X100, заблокированы в 5% ослиной сыворотке и инкубированы в течение ночи при 4 °C с кроличьим изолектином HRP (Sigma, каталожный номер L5391) в концентрации 2 мкг мл⁻¹. Детекция хромагена проводилась с использованием реагентов из набора ABC DAB (Vector Laboratories № PK-6100) в соответствии с инструкциями производителя.

Анализ макромолекул

ИФА-анализ

Наборы ELISA использовались для определения концентрации специфического целевого белка в биологических образцах. Замороженные образцы плазмы и яиц использовались для измерения лептина (Lep) у самцов-производителей F 0, тогда как ткани плаценты F 1 использовались для измерения плацентарного фактора роста (Plgf) и растворимой fms-подобной тирозинкиназы-1 (sFlt1). Наборы MVR100 (R&D Systems) для определения лептина мыши и ELISA для определения Lep, Plgf и sFlt1 использовались для количественного определения Lep, Plgf и sFlt1 в соответствии с инструкциями производителя. Реагенты, разведения для стандартной кривой и образцы были подготовлены, как описано в наборах, и все образцы, стандарты и контроль были проанализированы в техническом дубликате с несколькими биологическими повторами. Для количественной оценки целевых концентраций белка полученные данные были интерполированы с помощью подгонки кривой нелинейной регрессионной модели.

Для количественного определения лептина в плазме аликвоту образцов плазмы, полученных от самцов-производителей F0 и хранившихся при температуре -80 °C, размораживали на льду, разбавляли в 20 раз разбавителем-калибратором и анализировали в соответствии с инструкцией производителя.

Для количественного определения лептина, Plgf и sFlt1 в тканях образцы яиц или плаценты размораживали на льду и промывали в PBS. Затем проводили гомогенизацию пестиком «А» (около десяти ударов) и пестиком «В» (около 20 ударов) в 2 мл измельчителя тканей Dounce, содержащего 1 мл буфера RIPA (Sigma-Aldrich), смешанного с коктейлем ингибиторов протеазы, выдерживали во льду в течение 5 минут при осторожном перемешивании и центрифугировали при 15 000 об/мин в течение 20 минут при 4 °C. После центрифугирования аликвоту прозрачного супернатанта использовали для анализа ELISA.

Для скрининга остатков антибиотиков и проверки возможности обнаружения pABX или его остатков в дистальных тканях или кровеносной системе мы применили независимые и взаимодополняющие подходы.

Масс-спектрометрия

Образцы для количественного определения антибиотиков в тканях яичек были подготовлены, как описано в разделе «Метабономика» ниже. Извлеченные и высушенные образцы были ресуспендированы в 20 мкл метанола:воды (1:1), и 10 мкл образцов были непосредственно введены в масс-спектрометр Agilent 6550 iFunnel qToF. Калибровочные кривые (двукратные разведения) были подготовлены с использованием химического стандарта, что привело к следующим диапазонам вводимых количеств: бактериоцин (5,6–90,0 пмоль), примарицин (7,0–112,5 пмоль) и неомицин (5,3–85,0 пмоль). Количественное определение антибиотиков было выполнено с использованием программного обеспечения MassHunter Quantitative Analysis (Agilent Technologies, v.10.0), а предел обнаружения был определен с помощью линейной регрессии с использованием R.

Функциональный скрининг остатков

Набор PremiTest (R-Biopharm) использовался для определения остатков nABX или avaABX в образцах яичек, хранящихся при температуре -80°C , что было выполнено в соответствии с инструкциями производителя по использованию в мясе. Принцип теста основан на спорах термофильных бактерий (*Bacillus stearothermophilus*), которые очень чувствительны к нескольким антибиотикам и сульфаниламидным соединениям. Вкратце, яички, собранные у 6-недельных леченных (nABX или avaABX) и нелеченных (CON) самцов-производителей, размораживались во льду и промывались в $1\times$ PBS, после чего гомогенизировались с использованием 2 мл измельчителя тканей Dounce, содержащего 200 мкл $1\times$ PBS с пестиком «А» (около десяти ударов) и пестиком «В» (около ударов). В данном случае стерилизованная вода использовалась в качестве отрицательного контроля, тогда как коктейль nABX, разведенный в воде, использовался в качестве положительного контроля в концентрации минимального предела обнаружения остатка ($0,5\text{ мкг мл}^{-1}$). Из гомогенизированного раствора образца 100 мкл пипеткой переносили на агар в ампуле и оставляли при комнатной температуре на 20 мин для предварительной диффузии. После предварительной диффузии раствор образца вымывали из ампулы, дважды промывая водой, и накрывали фольгой, чтобы избежать испарения. Затем тестовые ампулы инкубировали в нагревательном блоке Eppendorf при температуре $64 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение примерно 3–3,5 ч, пока отрицательный контроль не менял цвет с фиолетового на желтый. На этом этапе ампулы извлекали из нагревательного блока и интерпретировали результаты на основе двухцветного индикатора набора.

Анализ микробиоты

Сбор образцов фекалий

Свежие образцы фекалий собирали у каждого отдельно размещенного самца-производителя F 0 в несколько различных временных точек: (1) до введения nABX в день 0; (2) в конце 6-недельного лечения перед организацией спаривания; и (3) в период восстановления после отмены nABX. Образцы фекалий у самок и потомства F 1 собирали на стадии отъема (P21). Для сбора свежих образцов фекалий каждый родитель или потомок, у которого должны были быть собраны фекалии, помещали в чистые, без подстилки, автоклавированные клетки с едой и водой на 2–3 часа, фекальные гранулы собирали с помощью стерилизованного пинцета и немедленно помещали в морозильники при температуре -80°C до извлечения ДНК для профилирования микробиома.

Извлечение ДНК микроорганизмов

Все образцы хранились при температуре -80°C до обработки методом секвенирования 16S рРНК. Экстракция микробной ДНК из образцов фекалий (около 200 мг от родителя F 0 и около 100 мг от потомства F 1) проводилась с использованием набора для выделения ДНК QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (QIAGEN) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, образцы фекалий, обработанные с помощью набора для выделения ДНК, добавлялись в пробирку PowerBead и быстро гомогенизировались на адаптере Vortex (каталожный номер QIAGEN 13000-V1-24) с использованием смесителя Vortex-Genie 2 (Scientific Industries). После лизиса клеток и

удаления потенциальных ингибиторов общая геномная ДНК захватывается на кремниевой мембране, промывается и элюируется для последующего профилирования микробиоты кишечника.

Определение количества копий гена 16S рРНК

Относительное содержание числа копий гена 16S рРНК в фекалиях мышей определялось по стандартной кривой, полученной на основе серийных разведений контрольного образца с помощью количественной ПЦР в реальном времени с использованием праймеров F341 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' и R534 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3', как описано ранее⁵⁹.

Целевая амплификация области 16S рРНК V4 (последовательности праймеров F515 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' и R806 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' (ссылка 60)) была выполнена с использованием смеси KAPA HiFi HotStart PCR (Roche) в двухэтапном протоколе ПЦР со штрихкодом (набор NEXTFlex 16S V4 Amplicon-Seq; Bioo Scientific) с небольшими изменениями в инструкциях производителя. Продукты ПЦР были объединены, очищены с использованием селективных по размеру магнитных шариков SPRIselect (размер 0,8 слева), а затем секвенированы в размере 2 × 250 пар оснований (п.н.) на приборе Illumina MiSeq (Illumina) в Центре геномики Европейской молекулярной биологической лаборатории, Гейдельберг.

Необработанные считывания 16S рРНК были обрезаны, деноминированы и отфильтрованы для удаления химерных артефактов ПЦР с использованием DADA2 (ссылка 61). Полученные варианты последовательностей ампликонов затем были сгруппированы в операционные таксономические единицы (OTU) с 98% сходством последовательностей с использованием подхода с открытыми референтами: считывания сначала были сопоставлены с предварительно кластеризованным референтным набором полноразмерных последовательностей 16S рРНК с 98% сходством с использованием MAPseq⁶². Считывания, которые не были уверенно сопоставлены, были сопоставлены с бактериальными и архейными моделями рРНК, учитывающими вторичную структуру, с использованием Infernal⁶³ и сгруппированы в OTU со средним сцеплением 98% с использованием hpc-clust⁶⁴, как описано ранее⁶⁵. Полученные таблицы подсчета OTU были отфильтрованы шумом путем утверждения, что образцы сохранили не менее 1000 считываний, а таксоны были распространены по крайней мере в двух образцах; Эти фильтры удалили 58% ложных OTU, но только 0,09% от общего числа прочтений из набора данных.

Разнообразие локальных образцов рассчитывалось как богатство OTU, экспоненциальная энтропия Шеннона и обратный индекс Симпсона (соответствующий разнообразию Хилла порядка 0, 1 и 2 (ссылка 66)) как средние значения 100 итераций разрежения до 5000 прочтений на образец. Разнообразие сообщества между образцами рассчитывалось как несходство Брея–Кертиса. Тенденции в составе сообщества количественно определялись с использованием методов ординации (анализ главных координат, анализ избыточности на основе расстояния) и проверялись с использованием пермутационного многомерного дисперсионного анализа (PERMANOVA⁶⁷, как реализовано в пакете R vegan⁶⁸).

Совместное содержание для измерения перекрестного переноса микробиоты во время спаривания

Чтобы напрямую проверить, происходит ли перекрестный перенос микробиоты в период окна спаривания, мы отобрали образцы фекалий в двух временных точках. В этом 4-дневном эксперименте самцы из каждой группы (CON и 6-недельный пABX) содержались совместно в соотношении 1:1 в одной клетке с необработанной 6-недельной самкой мыши C57BL/6J непрерывно, независимо от положительности пробки (отдельные пары для размножения). В период спаривания обе группы содержались на обычном рационе и стерильной воде *ad libitum*. Мы отбирали образцы фекалий (как указано выше) в двух временных точках: на 0-й день до совместного размещения для определения

исходного уровня микробиоты и на 4-й день после спаривания (обозначаемые как до и после спаривания соответственно), чтобы изучить эффект воздействия/совместного проживания самок с самцами pABX. Кроме того, чтобы определить, происходит ли перенос микробиоты во время спаривания, мы отобрали образец копулятивной пробки из вагинальной области самки непосредственно после спаривания. С помощью тампонов были собраны контрольные образцы из рабочей зоны, а для взятия проб использовался стерильный пинцет с острыми зубцами.

Секвенирование РНК (транскриптомика)

мРНК-секв

Для секвенирования информационной РНК общая РНК была извлечена из четырех различных типов тканей: яички отца, плацента F 1 , мозг F 1 и F 1 (BAT), с использованием набора RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen) в соответствии с инструкциями производителя. Количество и качество общей РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop и системе Agilent TapeStation (Agilent) для обеспечения числа целостности РНК > 8,5. Для подготовки библиотеки мРНК сначала обогащали с помощью модуля магнитной изоляции мРНК NEBNext Poly(A) с 1 мкг входной РНК. Затем очищенную мРНК готовили в цепочечные библиотеки с помощью набора для подготовки направленной РНК-библиотеки NEBnext Ultra II в соответствии со всеми инструкциями производителя. Амплифицированные библиотеки мультиплексировали и секвенировали на Illumina NextSeq 500 (PE40).

Малая РНК-секв.

Для анализа малых РНК сперматозоидов общая РНК была выделена с помощью набора для выделения микроРНК miRVana (Thermo Fisher Scientific). Процедура была выполнена в соответствии с инструкциями производителя с небольшим изменением на этапе лизиса клеток, чтобы обеспечить полный лизис сперматозоидов. Вкратце, очищенные образцы спермы были разморожены на льду, а затем был добавлен буфер лизиса miRVana на 5 минут при комнатной температуре с последующим добавлением в образец 40 мМ дитиотреитола и 12 мкл мл⁻¹ протеиназы К. Затем образец был инкубирован при 56 °С в течение 20 минут на термошейкере при 450 об/мин. После этого шага гомогенат miRNA был добавлен к лизату, и были соблюдены инструкции набора, рекомендуемые для выделения общей РНК. Библиотеки малых РНК были подготовлены из 1 мкг этой общей РНК с использованием набора для подготовки библиотеки малых РНК Illumina Truseq в соответствии с инструкциями производителя. Библиотеки секвенировались на приборе Illumina HiSeq 2000.

Секвенирование РНК отдельных клеток (10X)

Отдельные клетки яичек, ресуспендированные в PBS + 0,04% BSA, были скорректированы до концентрации около 1100 клеток мкл⁻¹ для загрузки на чип 10x Chromium. Захват клеток и подготовка библиотеки проводились в соответствии с инструкциями набора (Chromium Next GEM Single Cell 3' v.3.1 (Dual Index) User Guide). Вкратце, для захвата на образец было выбрано около 6000 клеток; после синтеза комплементарной ДНК для амплификации библиотеки использовалось 12–14 циклов. Полученные библиотеки были выбраны по размеру, объединены и секвенированы с использованием протокола секвенирования Illumina NextSeq 2000 P2 flowcell (100CYC).

Гибридизация in situ секвенирование

Протокол был соблюден, как описано в ссылке 69. Вкратце, транскрипты мРНК были направлены из ткани яичка, криосеченной толщиной 10 мкм, закрепленной на адгезионных слайдах SuperFrost Plus. Срезы фиксировали в 3% формальдегиде, пермеабелизировали 0,1 М HCl в течение 5 мин и промывали PBS. Применяя SecureSeal Hybridization Chambers (Grace Bio-Labs) вокруг срезов ткани, мРНК была подвергнута обратной транскрипции в течение ночи при 37 °С с использованием случайных гексамеров, ингибитора РНКазы и обратной транскриптазы (BLIRT). Срезы ткани фиксировали в течение 40 мин после обратной транскрипции, промывали PBS,

фосфорилированные замковые зонды (PLP) гибридизовали в конечной концентрации 10 нМ/PLP и лигировали с Tth Ligase (BLIRT) и RNaseH. После промывки срезов PBS была проведена амплификация по методу катящегося кольца в течение ночи при 30 °C с использованием полимеразы phi29 и экзонуклеазы I (Thermo). После инкубации реагенты были удалены, образцы дважды промыты в PBS, и камера SecureSeal была удалена пинцетом, после чего проводилась гибридизация зондов Bridge (10 нМ) в течение 1 ч при комнатной температуре в гибридизационном буфере (2× SSC, 20% формамида) в темноте на качалке. После этого зонды детекции считывания (0,1 мкМ) были гибридизованы в темноте при комнатной температуре в течение 1 ч в гибридизационном буфере, дважды промыты PBS и окрашены DAPI (0,5 мкг мл⁻¹) в течение 5 мин при комнатной температуре. Срезы были промыты PBS и закреплены примерно в 20 мкл среды Fluoromount-G Mounting, покрыты покровным стеклом и хранились при 4 °C до получения изображения. Изображения были получены с помощью слайд-сканера SlideView vs200 (Olympus) и проанализированы с помощью TissUMaps.

Анализ TaqMan для малых РНК

Независимые самцы из образцов малых РНК-секвенирования использовались для извлечения очищенной общей РНК спермы с помощью набора для выделения микроРНК miRVana, применяя незначительные модификации для обеспечения полного лизиса. Количественное определение miRNA и tRNA выполнялось с использованием предварительно разработанных (miR-141-3p) и специально разработанных (tRNA-Gly-GCC-2) анализов TaqMan в соответствии с протоколом производителя (Applied Biosystems) с использованием 7 нг общей РНК от мышей CON (n = 4) и nABX (n = 4). Количественная ПЦР с обратной транскрипцией выполнялась в реакциях по 15 мкл с использованием TaqMan Fast Advanced Master Mix в соответствии со стандартной программой (10 мин при 95 °C; 15 с при 95 °C; 1 мин при 60 °C, в течение 40 циклов). snoRNA202 (Applied Biosystems) использовался в качестве эндогенного контроля для нормализации уровней miRNA и tRNA. Относительные количества были нормализованы по эндогенным контрольным значениям, а кратность изменения рассчитана с помощью метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Эффективность амплификации зондов TaqMan была подтверждена путем серийного разбавления прогонов шаблонов.

РНК-секвенирование одного эмбриона (Smart-Seq)

Секвенирование РНК одного эмбриона проводилось с использованием протокола Smart-Seq, как описано в ссылке 70. Для контроля качества и предварительной обработки данных необработанные считывания были выровнены с использованием STAR v.2.7.10a (ссылка 71) при настройках параметров по умолчанию с первичной сборкой генома mm10 (GRCm38). Данные были количественно оценены с использованием модуля featureCounts Subread v.2.0.1 (ссылка 72). Дифференциальная экспрессия и PCA были выполнены в R (v.4.1.2). Дифференциальная экспрессия была выполнена путем передачи необработанных подсчетов в пакет DESeq2 (v.1.34.0) 73. Функция vst использовалась для нормализации подсчетов при настройках по умолчанию, а для PCA использовались 500 лучших переменных генов. Для анализа онтологии генов веб-приложение Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html>) использовалось для вывода обогащения терминов онтологии генов 74. Список генов для тестирования был загружен в Metascape в виде текстового файла. Опция «Экспресс-анализ» была выбрана после установки параметров «Ввод как вид» и «Анализ как вид» для M. musculus.

секвенирование ДНК

Бисульфитное секвенирование всего генома

Извлечение общей ДНК спермы проводили с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN Hilden), оптимизированного для очистки геномной ДНК спермы. Извлечение ДНК проводили следующим образом. Замороженные чистые образцы спермы, хранившиеся при температуре -80 °C, размораживали на льду; к образцу добавляли 100 мкл буфера для извлечения ДНК (20 mM Tris Cl pH 8, 20 mM EDTA, 200 mM NaCl, 4%

SDS), содержащего 80 мМ дитиотреитола и 12 мкл мл⁻¹ протеиназы К; затем инкубировали при 56 °С на термомиксере Eppendorf до полного лизиса спермы (около 1 ч), периодически встряхивая во время инкубации для диспергирования образца. После инкубации применяли разработанный пользователем протокол DY03 (QIAGEN) для очистки общей ДНК из спермы животных. Библиотеки BS-Seq были созданы в соответствии с инструкциями производителя с использованием набора TruSeq DNA Methylation Library Prep Kit (Illumina). Амплифицированные библиотеки были мультиплексированы и секвенированы на Illumina NextSeq 500 (PE75).

De novo геномная ДНК-секвенция

Геномная ДНК была извлечена из контрольной или полученной от nABX печени потомства F 1 (нормальной или SGR) с использованием набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) в соответствии с инструкциями производителя. Количество и качество ДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop и системе Agilent TapeStation (Agilent) для обеспечения числа целостности ДНК > 7. Для подготовки библиотеки использовался набор NEBNext Ultra II DNA Library Prep kit в соответствии со всеми инструкциями производителя. Амплифицированные библиотеки были мультиплексированы и секвенированы на Illumina HiSeq 4000 (PE150) до соответствующей глубины.

Метаболомикка

Нецелевые метаболомные измерения

Все химикаты для анализа методом жидкостной хроматографии–масс-спектрометрии (ЖХ–МС), включая воду и ацетонитрил (класс ЖХ–МС), были приобретены у Fisher Scientific. Стандарты для онлайн-калибровки масс были приобретены у Agilent Technologies.

Подготовка образца

Образцы яичек были собраны у самцов-производителей, обработанных как CON, так и nABX, в течение трех временных точек размножения: сразу после 6 недель лечения (11-недельные мыши), через 4 недели после отмены лечения (15-недельные мыши) и через 8 недель после отмены лечения (19-недельные мыши). Сразу после сбора образцы были быстро заморожены в жидком азоте и хранились при температуре -80 °С. При извлечении к каждому образцу яичек добавляли 300 мкл ледяной смеси растворителей (ацетонитрил:метанол:вода, 2:2:1) и две бусины из карбида вольфрама, 3 мм от Qiagen. Образцы гомогенизировали с помощью Qiagen tissueLyser II при концентрации 30% в течение 5 минут. Лизированные образцы центрифугировали при 12700 RCF при 4 °С в течение 10 минут. Равный объем (125 мкл) экстракционного супернатанта переносили в два 96-луночных V-образных планшета Nunc и выпаривали в центрифужном концентраторе Genevac (Genevac) при 25 °С в течение 2 ч. Концентрированные образцы хранили при -80 °С и ресуспендировали в 20 мкл той же смеси растворителей для анализа методом ЖХ-МС.

ЖХ–МС измерения

Хроматографическое разделение проводили с использованием колонки Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3,0 × 150 мм 2, 2,7 мкм и системы ЖХ Agilent 1290 Infinity II, соединенной с масс-спектрометром 6550 iFunnel qToF. Температура колонки поддерживалась на уровне 45 °С со скоростью потока 0,4 мл мин⁻¹. Использовались следующие подвижные фазы: подвижная фаза А — вода с 0,1% муравьиной кислоты; и подвижная фаза В — ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты. 5 мкл образца вводили в 5% подвижной фазы В, поддерживали в течение 0,10 мин, затем линейный градиент до 30% В в течение 0,5 мин, затем линейный градиент до 95% В в течение 10 мин и поддерживали при 95% В в течение 1 мин. Колонке давали возможность повторно уравновеситься с начальными условиями в течение 3 мин перед каждым вводом образца. Масс-спектрометр работал как в положительном, так и в отрицательном режиме сканирования (50–1700 m/z) со следующими параметрами источника: VCap, 3500 В; напряжение сопла, 2000 В; температура газа, 275 °С; осушающий газ, 13 л мин⁻¹;

распылитель, 45 фунтов на кв. дюйм; температура защитного газа, 275 °C; поток защитного газа, 12 л мин⁻¹; фрагментатор, 130 В; и скиммер, 0 В. Онлайн-калибровка массы проводилась с использованием второго источника ионизации и постоянного потока (10 мкл мин⁻¹) растворителя эталонной массы (119,0363 и 1033,9881 m/z для отрицательного режима работы и 121,0509 и 922,0098 для положительного режима работы соответственно). Каждый образец измерялся отдельно как в положительном, так и в отрицательном режиме ионизации.

Извлечение метаболических признаков

Для извлечения метаболических признаков из полученных данных ЖХ–МС использовалось программное обеспечение MassHunter Qualitative Analysis Software (Agilent Technologies, v.10.0). Применялись следующие настройки: фильтр пиков абсолютной высоты: 5000 отсчетов, ограничение назначенных зарядовых состояний до 1, включались только заряженные молекулы $\pm H^+$ с оценками качества соединения более 80%. Выравнивание пиков и идентификация проводились с использованием Mass Profiler Professional (Agilent, v.15.1) с параметрами по умолчанию: допуск по массе 2 мДа или 20 ppm и допуск по времени удерживания 0,2 мин или 2%. Извлеченные и выровненные признаки экспортировались в виде файла .csv для дальнейшего анализа данных.

Статистический анализ

Статистический анализ был выполнен с использованием графического программного обеспечения Graphpad Prism v.8.4.3 и в R v.3.6.2. Значимые различия в массе тела и фенотипах потомства F₁ были определены с помощью «вложенных» анализов, при которых число повторений диктуется числом уникально экспонированных отцов (N), а не числом потомков (n), которое больше. Таким образом, хотя мы обычно генерируем $n > 150$ потомков на эксперимент, чтобы надежно зафиксировать размер эффекта и частично пенетрантные фенотипы, статистически говоря, каждая особь, полученная от одного отца, иерархически вложена в одно значение N. Например, вложенный t-тест сравнивает средние значения двух непарных групп (все потомки F₁ от контрольных или дисбиотических отцов), для которых существует вложенный фактор в этих группах лечения (общий отец среди каждого помета). Это необходимо, поскольку использование отдельных потомков в качестве независимых переменных в межпоколенческих исследованиях приведет к завышенным показателям альфа-ошибок и ложной значимости. Соотношение массы яиц к массе тела, фетоплацентарное соотношение и лабиринтная зона анализировались с помощью двухстороннего непарного t-критерия. Отношения шансов (OR) и 95% доверительные интервалы (CI) вычислялись с использованием метода Баптисты–Пайка, а статистическая значимость OR определялась с помощью критерия хи-квадрат. Метод Каплана–Майера применялся для построения кривых анализа выживаемости, сравниваемых с помощью логрангового теста (Мантеля–Кокса). Калибровочные кривые ELISA интерполировались с помощью нелинейной регрессионной модели гиперболы (X — концентрация) (приемлемым соответствием кривой было значение $R^2 > 0,99$).

Биоинформатический анализ

Выравнивание и картирование РНК-секвенирования отдельных клеток

Необработанные считывания были выровнены и сопоставлены с помощью модуля подсчета в 10x Genomics Cellranger 6.1.2 (ссылка 75) со сборкой транскриптома mm10 (2020-A) с параметрами по умолчанию.

Контроль качества секвенирования РНК отдельных клеток

Все последующие шаги были выполнены в R (v.4.1.2) с использованием пакета Seurat 76. Сначала клетки были отфильтрованы на основе трех параметров — количества уникальных молекулярных идентификаторов (nCount_RNA; 1,000:5,000), количества обнаруженных уникальных генов (nFeature_RNA; 500:5,000) и митохондриальной скорости (percent.mito) и рибосомальной скорости (percent.ribo; 0:20) — как описано ниже.

Затем образцы nABX и CON были кластеризованы отдельно с использованием подхода кластеризации Seurat по умолчанию. В обоих условиях кластеры, не имеющие уникально экспрессируемых генов (с использованием функции FindMarkers с $\log_{fc}\text{threshold} = 0.5$ и $\min.pct = 0.5$), были отброшены.

Интеграция РНК-секвенирования в одной клетке

Затем образцы nABX и CON были интегрированы с использованием канонического корреляционного анализа при настройках параметров по умолчанию, как рекомендовано пакетом Seurat.

Аннотация типа клетки РНК-секвенирования одиночной клетки

Затем интегрированный набор данных был кластеризован и аннотирован с использованием уникально экспрессируемых генов-маркеров. Как и выше, кластеры, не показывающие уникально экспрессируемых генов, были проигнорированы. Для определения более тонких аннотаций соматические и зародышевые клетки были разделены на различные объекты Сера и кластеризованы отдельно.

Дифференциальная экспрессия, специфичная для типа клеток при секвенировании РНК в отдельных клетках

Для каждого типа клеток, идентифицированного в наборе данных, использовалась функция FindMarkers для определения DEG между ячейками nABX и CON с использованием $\log_{fc}\text{threshold} = 0,25$ и $p_val_adj < 0,01$.

Контроль качества РНК-секвенирования и подготовка данных

Качество необработанных прочтений было урезано с помощью Trim Galore (0.4.3.1, `-phred33 --quality 20 --stringency 1 -e 0.1 --length 20`). Они были сопоставлены со сборкой генома мыши mm10 (GRCm38) с помощью RNA Star (2.5.2b-0, параметры по умолчанию, за исключением `--outFilterMultimapNmax 1000`), а прочтения с оценкой MAPQ менее 20 были отброшены, чтобы гарантировать, что для анализа экспрессии генов использовались только высококачественные выравнивания с уникальным картированием. Данные были количественно оценены с помощью конвейера количественной оценки RNA-seq для направленных библиотек в программном обеспечении seqmonk для генерации значений экспрессии генов $\log_2$ прочтений на миллион (RPM) или скорректированных по длине гена (RPKM).

РНК-сек дифференциальный анализ

DEG определялись с использованием пакета DESeq2 (v.1.24.0), вводя необработанные подсчеты картирования и применяя скорректированное с множественным тестированием значение P (коэффициент ложного обнаружения (FDR)) $< 0,05$ порога значимости. Дополнительный фильтр кратности изменения более 2 применялся для генерации окончательных DEG.

Анализ главных компонент РНК-секвенирования

Анализ основных компонентов транскриптомов был выполнен в статистическом программном обеспечении seqmonk и R с использованием всех экспрессированных генов в качестве входных данных. Они были определены как имеющие $RPKM > 0,1$ по крайней мере в двух повторах во всех исследованных образцах.

Обогащение класса онтологии генов РНК-сек

DEG или списки интересующих генов были введены в базу данных STRING v.11.0 77 и извлечен анализ обогащения, связанный с путями Reactome и KEGG, с фильтрацией по рангу FDR.

Контроль качества и подготовка данных для секвенирования малых РНК

Адаптеры были удалены с помощью fastx-clipper; файлы fastq были преобразованы в fasta с помощью пользовательского скрипта perl, а чтения длиной 18–33 нуклеотида были сохранены с помощью пользовательского скрипта perl. Чтения были выровнены с версией генома мыши mm10 с помощью bowtie, сообщая только о лучшем выравнивании и требуя 0 несовпадений (параметры `-v 0 -k 1 --best --sam`). Файлы выравнивания sam были преобразованы в файлы bam с помощью samtools v.1.9, а файлы bam были преобразованы

в файлы bed с помощью bedtools v.2. Для количественной оценки miRNAs intersectBed -с использовался для подсчета количества чтений, перекрывающих позиции известных miRNAs M. musculus (из miRbase www.miRBase.org). tRNAs были получены с помощью intersectBed -с для подсчета количества прочтений, перекрывающих файл bed, документирующий предсказанные координаты мышинной tRNA, загруженные из базы данных сканирования tRNA (<http://gtfnadb.ucsc.edu/genomes/eukaryota/Mmuscle10/>). Координаты piwi-взаимодействующей РНК были взяты из ссылки 78 и преобразованы в mm10 с помощью liftover. piRNAs были количественно определены путем выбора РНК длиной от 26 до 32 нуклеотидов с U в качестве первого нуклеотида и пересечения этих РНК с координатами piRNA с помощью intersectBed -с.

Дифференциальный анализ малых РНК-секвенирования

Для исследования значимых различий данные обрабатывались с помощью DESeq2, а отрицательный биномиальный тест использовался для выявления значимых различий после коррекции множественного теста Бенджамани–Хохберга.

Бисульфитное секвенирование всего генома

Необработанные последовательности fastq были качественно и по адаптеру обрезаны с помощью Trim Galore (0.4.3.1), а прочтения выровнены с mm10 с помощью Bismark (0.20.0), отбрасывая первые 8 пар оснований с 5' конца и последние 2 пары оснований с 3' одноконцевых прочтений. Статус метилирования цитозина был извлечен из картированных прочтений с помощью инструмента Bismark methylation extractor. Вызовы метилирования по всему геному были проанализированы с помощью программного обеспечения Seqmonk (1.44.0) с пятью биологически независимыми наборами данных репликации для каждого состояния. Для идентификации DMRs геном сначала был разбит на скользящие плитки, содержащие 50 последовательных CpG, и их статус метилирования был определен с помощью конвейера метилирования ДНК. DMR были идентифицированы путем запуска чувствительной к глубине прочтения логистической регрессии ($P(\text{adj}) < 0,05$) с минимум десятью прочтениями и применением порогового значения для абсолютного изменения метилирования ДНК в 20%. Уровень метилирования в определенных геномных признаках (например, отпечатках) был рассчитан с использованием конвейера метилирования ДНК в Seqmonk по целевым признакам.

De novo геномная ДНК-секвенция

Считывания выравнивания были обрезаны с помощью Trim Galore (v.0.6.3) 79 , затем первые десять 5' оснований обоих считываний были удалены с помощью Cutadapt (v.2.3) 80 . Считывания были выровнены с эталонным геномом M. musculus (mm10) с помощью bwa mem (BWA-0.7.17) 81 перед фильтрацией с помощью samtools (v.1.10) 82 view с флагами '-h -F 256 -f 2 -q 30' и дедулицированы с помощью Picard toolkit (v.2.9.0) MarkDuplicates 83 . SNP и небольшие INDEL были вызваны с помощью GATK (v.4.1.6.0) 84 HaplotypeCaller. Варианты были отфильтрованы для удаления тех, у которых качество сайта (QUAL) по версии PHRED было меньше 30, частота аллеля меньше 0,2 или низкое покрытие сайта (скользящая шкала) у более чем одного человека. Функциональная область варианта была аннотирована с помощью ANNOVAR (2020Jne07) annotate_variation.pl 85 . Структурные варианты были вызваны с помощью вызова Delly2 (v.0.8.7) 86 .

Контроль качества метаболомики и подготовка данных

Все статистические анализы и построение графиков были выполнены в R v.3.6.2 (ссылка 87). Чтобы исключить ввод плохого образца из последующих анализов, сумма всех извлеченных признаков метаболита (TIC) сравнивалась между образцами (среднее = $1,600 \times 10^{10}$, диапазон = $[1,419 \times 10^{10} ; 1,808 \times 10^{10}]$), и образцы исключались, если их TIC не находился в пределах 3 sd от среднего значения (0 исключенных образцов). Отсутствующие данные были приписаны фиксированному порогу, установленному на уровне 5000 отсчетов. Точно дублированные признаки или признаки, попадающие в (1)

окно 0,002 а.е.м. (абсолютный порог) или 20 ppm (относительный порог) и (2) окно времени удерживания 0,15 мин (абсолютный порог) или 2% (относительный порог), считались разделенными пиками и, следовательно, объединялись. Была рассчитана корреляция между весом яиц и весом тела животного, чтобы убедиться в отсутствии значимой корреляции между двумя значениями ($\text{cor} = 0,1870$, $P = 0,2477$). Поэтому Z-оценки веса яиц использовались для нормализации значений интенсивности площади под кривой, чтобы учесть вариацию интенсивности сигнала, полученную из размера яиц. Признаки (1) с нулевой дисперсией; (2) являющиеся одиночными; и (3) присутствующие менее чем в 75% образцов для каждого класса, были удалены. Наконец, таблицы признаков, полученные из положительного и отрицательного режима, были свернуты вместе после проверки на точно дублирующиеся признаки или на наличие признака, попадающего в окно 0,002 Да или 20 ppm; если это так, признак с более высокой средней интенсивностью сохранялся, и обе аннотации сохранялись. Полученная таблица включала все 30 образцов и в общей сложности 10 582 метаболитических признака.

Аннотация к метаболитическим веществам метаболита

Аннотация была извлечена из базы данных метаболома человека (HMDB, <https://hmdb.ca/>) [88](#)·[89](#) путем поиска метаболитов с точно такой же массой или попадающих в окно 0,002 а.е.м. или 20 ppm от моноизотопной массы метаболита. При наличии было извлечено несколько аннотаций. Только аннотируемые признаки были сохранены для последующего анализа. Более того, для каждого признака из HMDB были извлечены класс и суперкласс метаболита, при наличии.

Анализ главных компонент метаболомики

РСА был рассчитан [как](#) для полного набора данных, так и после его стратификации по неделе выборки для всех метаболитических характеристик и только для аннотированных характеристик.

Метаболомный дифференциальный анализ

Статистическая значимость различий интенсивности признаков оценивалась с использованием двустороннего t-теста (функция `stats::t.test` в R) логарифмически масштабированных данных, а значения P были скорректированы по FDR для проверки нескольких гипотез с использованием процедуры Бенджамини–Хохберга (функция `stats::p.adjust` в R с параметром BH). Скорректированные значения P и кратные изменения визуализировались с помощью графиков Volcano. Масса, время удерживания, аннотация HMDB, класс, суперкласс и составной спектр были получены для всех признаков, показывающих значительно различную интенсивность между обработанной и контрольной группами и абсолютную кратность изменения более 2.

Метаболомный анализ обогащения классов метаболитов

Анализ обогащения классов и суперклассов метаболитов между обработанной и контрольной группами был рассчитан с использованием точного теста Фишера. Все значения P были скорректированы по FDR для проверки нескольких гипотез с использованием процедуры Бенджамини–Хохберга (функция `stats::p.adjust` в R с параметром BH).