

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen120080>

Научная статья

Дифференциальное распределение 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина в сперматогенных клетках и сперматозоидах человека

О.А. Ефимова¹, М.И. Крапивин¹, С.Е. Парфеньев², И.Д. Мекина¹, Е.М. Комарова¹,
М.А. Ищук¹, А.В. Тихонов¹, И.Ю. Коган¹, А.В. Голубева², Е.В. Даев², А.М. Гзгзян¹,
О.Н. Беспалова¹, А.А. Пендина^{1, 2}

¹ Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия;

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Актуальность. Эпигеном половых клеток формируется под влиянием как программы развития, так и средовых факторов. Специфика возникновения и изменения в сперматогенезе человека продуктов окисления цитозина изучена недостаточно.

Цель — оценка распределения 5-формилцитозина (5fC) и 5-карбоксилцитозина (5caC) в сперматогенных клетках и в сперматозоидах человека.

Материалы и методы. Исследование проведено на образцах тестикулярной ткани 10 пациентов с диагнозом «азооспермия» и образцах эякулята 5 доноров спермы и 8 пациентов из бесплодных пар. Из образцов готовили микроскопические препараты. 5fC и 5caC выявляли методом непрямой иммунофлуоресценции. Определение ploидности ядер сперматогенных клеток проводили методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

Результаты. 5fC и 5caC отсутствовали в митотически и мейотически делящихся сперматогенных клетках и были характерны только для некоторых интерфазных ядер сперматогониев и сперматид, а также для некоторых эякулированных сперматозоидов. Частота сперматозоидов с высоким уровнем 5fC и 5caC в эякуляте пациентов из бесплодных пар варьировала в широком диапазоне и была выше, чем у доноров спермы ($p = 0,007$, $p = 0,028$ соответственно). Увеличение частоты сперматозоидов с высоким уровнем 5fC и 5caC сопровождалось снижением частоты морфологически нормальных и прогрессивно-подвижных сперматозоидов.

Выводы. 5fC и 5caC дифференциально распределены в сперматогенных клетках и сперматозоидах человека. Одним из вероятных объяснений повышенного уровня 5fC и 5caC, выявляемого методом непрямой иммунофлуоресценции в некоторых эякулированных сперматозоидах, является окислительный стресс, вызванный воздействием внешних и внутренних факторов. Оценку 5fC и 5caC можно потенциально использовать как дополнительный критерий качества эякулята.

Ключевые слова: эпигенетика; сперматогенез человека; 5-формилцитозин; 5-карбоксилцитозин; азооспермия; тестикулярная ткань; иммунофлуоресценция; флуоресцентная гибридизация *in situ*.

Как цитировать:

Ефимова О.А., Крапивин М.И., Парфеньев С.Е., Мекина И.Д., Комарова Е.М., Ищук М.А., Тихонов А.В., Коган И.Ю., Голубева А.В., Даев Е.В., Гзгзян А.М., Беспалова О.Н., Пендина А.А. Дифференциальное распределение 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина в сперматогенных клетках и сперматозоидах человека // Экологическая генетика. 2023. Т. 21. № 1. С. 61–74. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen120080>

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen120080>

Research Article

Differential distribution of 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine in human spermatogenic cells and spermatozoa

Olga A. Efimova¹, Mikhail I. Krapivin¹, Sergey E. Parfenyev²,
Irina D. Mekina¹, Evgeniia M. Komarova¹, Mariia A. Ishchuk¹, Andrei V. Tikhonov¹,
Igor Yu. Kogan¹, Arina V. Golubeva², Eugene V. Daev², Aleksander M. Gzgzyan¹,
Olesya N. Beshpalova¹, Anna A. Pendina^{1,2}

¹ D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia;

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

BACKGROUND: The epigenome of gametes is formed under the control of the developmental programme and the influence of environmental factors. How cytosine oxidation patterns are formed and altered in human spermatogenesis remains obscure so far.

AIM: The aim of the study was to assess 5-formylcytosine (5fC) and 5-carboxylcytosine (5caC) patterns in human spermatogenic cells and spermatozoa.

MATERIALS AND METHODS: The study was performed on testicular biopsy samples of 10 azoospermic patients and ejaculate samples of 5 sperm donors and 8 patients from infertile couples. The microscope slides were prepared for further indirect immunofluorescence to detect 5fC and 5caC and FISH to determine spermatogenic cell ploidy.

RESULTS: 5fC and 5caC were undetectable in mitotic and meiotic chromosomes of spermatogenic cells, and was present exclusively in some spermatogonia and spermatid interphase nuclei as well as in some ejaculated spermatozoa. The frequency of spermatozoa with 5fC and 5caC varied in a wide range and was higher in patients than in sperm donors ($p = 0.007$, $p = 0.028$). The increase in frequency of spermatozoa with 5fC and 5caC was accompanied with the decrease in frequency of morphologically normal and progressively motile spermatozoa.

CONCLUSIONS: 5fC and 5caC are differentially distributed in human spermatogenic cells and spermatozoa. The immunocytochemically detected increase of 5fC and 5caC in individual spermatozoa is most likely induced by oxidative stress caused by effects of internal and external factors rather than developmental programme. The evaluation of 5fC and 5caC in spermatozoa can be potentially used as an additional criterion of ejaculate quality.

Keywords: epigenetics; human spermatogenesis; 5-formylcytosine; 5-carboxylcytosine; azoospermia; testicular tissue; immunofluorescence; fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

To cite this article:

Efimova OA, Krapivin MI, Parfenyev SE, Mekina ID, Komarova EM, Ishchuk MA, Tikhonov AV, Kogan IYu, Golubeva AV, Daev EV, Gzgzyan AM, Beshpalova ON, Pendina AA. Differential distribution of 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine in human spermatogenic cells and spermatozoa. *Ecological genetics*. 2023;21(1):61–74. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen120080>

Received: 30.12.2022

Accepted: 20.03.2023

Published: 31.03.2023

АКТУАЛЬНОСТЬ

Сперматозоиды человека — высокоспециализированные клетки, способные передать свой геном и эпигеном и инициировать развитие нового организма [1]. Формирование уникального эпигенома сперматозоида происходит поэтапно в ходе длительного периода развития от первичных половых клеток до зрелых гамет. Ключевыми механизмами в установлении специфичных для сперматозоида эпигенетических профилей являются деметилирование/реметилирование ДНК и ремоделирование хроматина.

Установление специфичных для половых клеток эпигенетических профилей, с одной стороны, строго детерминированный процесс, с другой — процессы модифицирования цитозина обратимы, что делает эпигеном пластичным и способным изменяться под воздействием внешних факторов [2, 3]. В процессе сперматогенеза человека, длящегося 70 дней, по мере последовательной дифференцировки сперматогониев в сперматоциты, сперматиды, а затем в сперматозоиды происходит уменьшение объема цитоплазмы. Это снижает возможности репарации и делает как геном, так и эпигеном в значительной степени подверженными влиянию факторов среды [4]. На сегодняшний день не вызывает сомнений взаимосвязь изменений метилирования ДНК сперматозоидов с их морфологией, подвижностью и оплодотворяющей способностью [5, 6]. Доказано, что aberrантные изменения характера метилирования ДНК сперматозоидов, возникающие из-за негативного влияния факторов среды, связаны с существенным снижением репродуктивного потенциала [6–12].

В цикле деметилирования/реметилирования ДНК, помимо 5-метилцитозина (5mC), задействованы еще три формы модифицированного цитозина, являющиеся кислородсодержащими производными метилированного цитозина: 5-гидроксиметилцитозин (5hmC), 5-формилцитозин (5fC) и 5-карбоксилцитозин (5caC). Все три кислородсодержащие производные 5-метилцитозина — промежуточные продукты в серии реакций активного (ферментативного) деметилирования ДНК [13, 14], обладающие определенной стабильностью и, по мнению многих авторов, являющиеся не только маркерами процесса активного деметилирования ДНК, но и обладающие собственным эпигенетическим (регуляторным) эффектом в отношении активности генома [2, 15–17]. В отличие от 5mC, изучаемого несколько десятилетий, его кислородсодержащие производные открыты относительно недавно — в 2009–2011 гг. [13, 14] — и исследованы мало.

В 2017 г. была показана ассоциация между повышением уровня 5hmC в сперматозоидах и снижением качества эякулята [18, 19] и прослежена динамика изменений паттернов гидроксиметилирования в дифференцирующихся сперматогенных клетках [18, 20]. Эти результаты свидетельствуют в пользу перспективности изучения

эпигенетических модификаций цитозина в сперматогенезе человека в качестве маркеров снижения фертильности, в том числе за счет негативных средовых воздействий.

Цель — оценка распределения не изученных ранее продуктов окисления 5-метилцитозина — 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина — в сперматогенных клетках и в сперматозоидах человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение образцов тестикулярной ткани и эякулята

Биологические образцы были получены у пациентов, направленных на обследование и/или лечение в отдел вспомогательных репродуктивных технологий НИИ АГиР им. Д.О. Отта. Образцы тестикулярной ткани получены путем открытой биопсии яичка у 10 пациентов (возраст от 24 до 51 года, средний возраст $37,4 \pm 2,9$ года) с диагнозом «азооспермия». Сразу после получения фрагменты ткани помещали в чашку Петри с питательной средой Flushing medium (Origio, 10845060, Дания) и хранили при комнатной температуре не более 1 ч.

Образцы эякулята получены от 5 доноров спермы (возраст от 22 до 34 лет, средний возраст $27,8 \pm 2,01$ года) и 8 пациентов (возраст от 21 до 39 лет, средний возраст $31,4 \pm 2,04$ года) путем мастурбации после 3–5 дней воздержания от половой жизни. Донорами спермы были физически и психически здоровые мужчины с нормальным кариотипом и следующими показателями качества спермы: объем ≥ 2 мл, концентрация ≥ 64 млн/мл, частота прогрессивно-подвижных сперматозоидов ≥ 49 %, частота сперматозоидов с нормальной морфологией [21] ≥ 6 %, криотолерантность ≥ 50 %. Критерий включения в исследование пациентов: бесплодие в паре — ненаступление беременности в течение года регулярной половой жизни без предохранения. У всех пациентов был установлен нормальный кариотип 46,XY и отсутствие делеций локуса AZF.

Биологические образцы использованы в исследовании с информированного письменного согласия пациентов и доноров спермы. Исследование одобрено этическим комитетом НИИ АГиР им. Д.О. Отта (протокол № 117 от 19.04.2022).

Приготовление микроскопических препаратов

Препараты хромосом и интерфазных ядер из образцов тестикулярной ткани готовили «прямым» методом (без предварительного культивирования). Последовательно инкубировали фрагменты ткани в гипотоническом растворе (0,9 % цитрат натрия) с колхицином (2,5 мкг/мл) и в фиксирующем растворе (метанол – ледяная уксусная кислота, 3 : 1), затем фрагменты ткани мацерировали в каплях 60 % уксусной кислоты на предметном стекле и распределяли получившуюся суспензию по стеклу, согласно описанному ранее протоколу приготовления «прямых» препаратов из фрагментов ткани [18, 22].

Препараты эякулированных сперматозоидов готовили из аликвот нативного эякулята объемом 1 мл, последовательно обрабатывая образцы гипотоническим раствором (0,9 % цитрат натрия) и фиксирующим раствором (метанол – ледяная уксусная кислота, 3 : 1), а затем раскапывающую суспензию на предметные стекла, согласно описанному ранее протоколу [23].

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization — FISH)

Для определения пloidности интерфазных ядер, по которой можно судить, прошла ли сперматогенная клетка мейоз, на препаратах хромосом и интерфазных ядер из образцов тестикулярной ткани проводили FISH с ДНК-зондом, специфичным к центромерной последовательности хромосомы 8: Leica SE8 (D8Z1) (Kreatech, Германия). Все этапы гибридизации, включая предобработку препаратов, гибридизацию и отмывки препаратов после гибридизации, проводили в соответствии с описанным ранее протоколом [24].

Иммуноцитохимическая детекция 5fC и 5caC

Иммуноцитохимическую детекцию 5fC и 5caC на препаратах из образцов тестикулярной ткани и эякулята проводили с помощью специфических антител к 5fC (mouse anti-5fC, Millipore, Германия) и 5caC (rabbit anti-5caC, ActiveMotif, США) в разведении 1 : 200 и вторых антител, конъюгированных с флуорохромом Alexa 488 (goat anti-rabbit, Life technologies, США) и Alexa 555 (goat anti-mouse, Life technologies, США) в разведении 1 : 500, согласно описанному ранее протоколу [25]. Этап денатурации ДНК в 2 М HCl в течение 25 мин при комнатной температуре проводили только для препаратов сперматозоидов, так как препараты из образцов тестикулярной ткани были подвержены денатурации ранее при проведении FISH.

Метод TUNEL

Для оценки целостности ДНК сперматозоидов на препаратах применяли метод выявления одно- и двунитевых разрывов ДНК (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labelling — TUNEL). Использовали коммерческий набор реагентов с флуоресцеином (*In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche-11684795910, США) согласно стандартному протоколу [26] с собственными модификациями, подробно описанными нами ранее [18].

Микроскопический анализ препаратов

Анализ препаратов проводили с помощью микроскопа Leica DM 2500. Цифровые фотоизображения получали с помощью камеры Leica DFC345 FX и программного обеспечения Leica Application Suite V.3.8.0. Обработку полученных изображений, включающую регулировку резкости, яркости и контрастности, применяемой ко всему изображению, проводили с помощью графического редактора PhotoshopOnline.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism, Version 6.01, используя тест Д'Агостино – Пирсона для проверки распределения на нормальность, *U*-критерий Манна – Уитни для сравнения непараметрических величин и непараметрический тест Спирмена для вычисления коэффициентов корреляции.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гетерогенное распределение 5fC и 5caC в сперматогенных клетках из биоптатов семенников

Детекцию 5fC и 5caC в геноме сперматогенных клеток осуществляли иммуноцитохимическим методом на цитогенетических препаратах из биоптатов семенников 10 пациентов с диагнозом «азооспермия» и с установленным ранее нормальным кариотипом. Наличие и распределение 5fC и 5caC оценивали визуально в интерфазных ядрах сперматогенных клеток, проводя анализ 2000 ядер у каждого из 10 пациентов, в митотических хромосомах (в делящихся сперматогониях, $n = 42$) и в мейотических хромосомах (в делящихся сперматоцитах, $n = 179$), а также в сперматозоидах из биоптатов семенников ($n = 884$). Для установления пloidности интерфазных ядер, по которой можно судить, прошла ли сперматогенная клетка мейотическое деление, перед иммуноцитохимической детекцией 5fC и 5caC проводили FISH с ДНК-зондом к центромерному району хромосомы 8.

Как 5fC, так и 5caC не были выявлены в митотически делящихся сперматогониях, в сперматоцитах на стадии мейоза. Распределение 5fC и 5caC в интерфазных ядрах было гетерогенным: некоторые характеризовались высоким содержанием 5fC и/или 5caC, тогда как в других был выявлен фоновый уровень 5fC и/или 5caC, то есть эти соединения практически отсутствовали.

Частота диплоидных интерфазных ядер (ядра сперматогониев) с высоким содержанием 5fC варьировала в пределах от 2,8 до 10,2 % у разных индивидов, частота гаплоидных (ядра сперматид) — от 6,0 до 18,9 %. Похожую картину наблюдали и в отношении 5caC: он был выявлен в 3,9–11,8 % диплоидных и в 6,6–21,6 % гаплоидных интерфазных ядер у разных индивидов.

Всего было установлено четыре типа ядер: с обоими соединениями, только с 5fC, только с 5caC, без 5fC и 5caC (рис. 1). Соотношение интерфазных ядер с 5fC и 5caC среди сперматогониев и сперматид у 10 пациентов с азооспермией приведено на рис. 2. В подавляющем большинстве отсутствовали оба соединения. Следующим по частоте был тип ядер с одновременным присутствием 5fC и 5caC. При этом 5fC локализовался в тех же областях хроматина, что и 5caC, за исключением небольших участков, где присутствовало только одно из двух соединений (рис. 3). Реже были отмечены ядра, содержащие только 5caC; крайне редко наблюдали ядра только с 5fC.

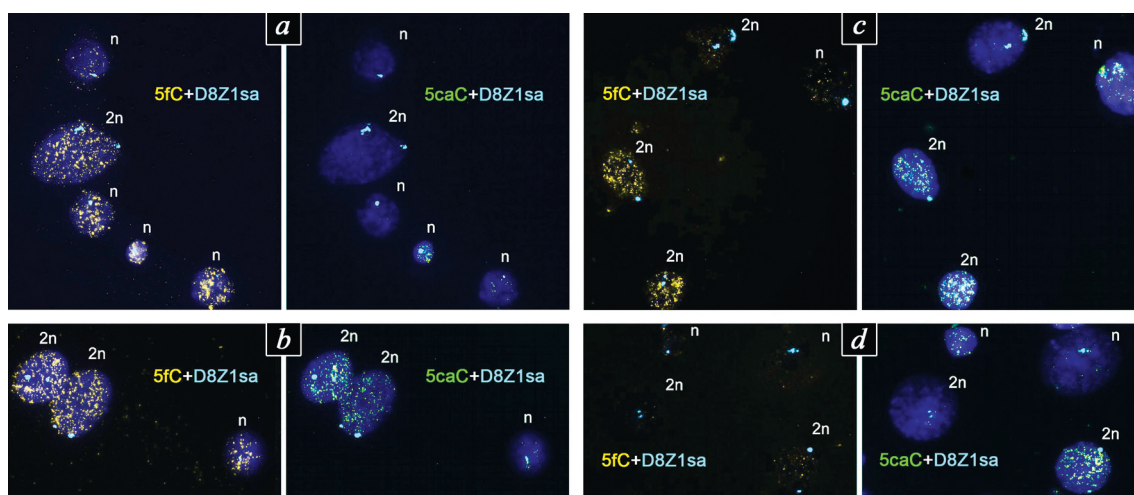


Рис. 1. Интерфазные ядра сперматогенных клеток из биоптата семенника пациента с азооспермией после гибридизации с ДНК-зондом к центромерному участку хромосомы 8 (голубой) с последующей иммуноцитохимической детекцией 5fC (желтый) и 5caC (зеленый). ДНК окрашена 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, синий). Представлены цифровые фотоизображения четырех областей на препарате (a–d)

Fig. 1. Interphase nuclei of spermatogenic cells from azoospermic patient after hybridization with DNA probe specific to centromeric region of chromosome 8 (aqua) and subsequent immunodetection of 5fC (yellow) and 5caC (green). DNA is stained with DAPI (blue). Four areas on the preparation are shown (a–d)

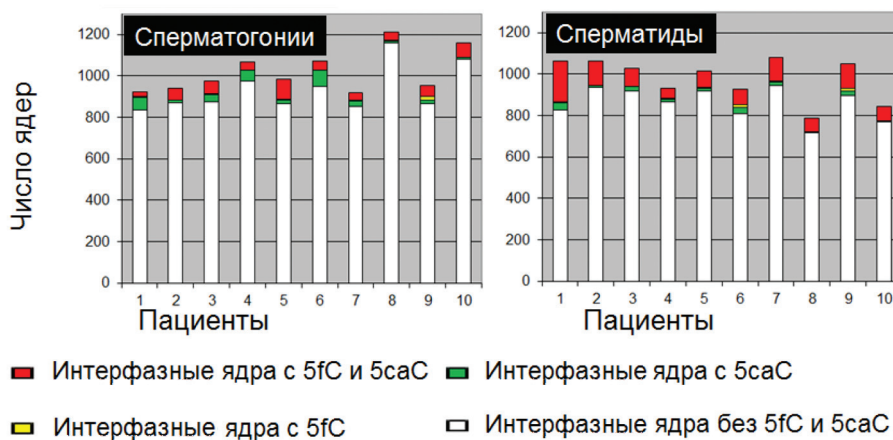


Рис. 2. Соотношение интерфазных ядер с 5fC и 5caC среди сперматогониев и сперматид у 10 пациентов с азооспермией

Fig. 2. The ratio of interphase nuclei with 5fC and 5caC among spermatogonia and spermatids in 10 azoospermic patients

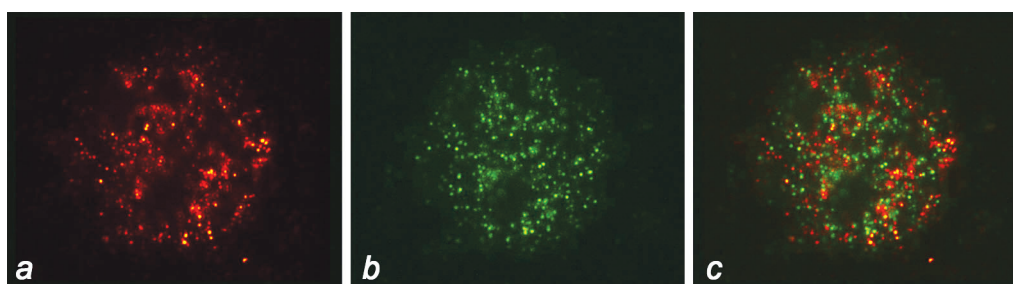


Рис. 3. Интерфазное ядро сперматогенной клетки из биоптата семенника пациента с азооспермией: a — иммуноцитохимическая детекция 5fC*; b — иммуноцитохимическая детекция 5caC; c — совмещенное изображение 5fC + 5caC;

*Для улучшения качества совместной визуализации флуоресцентных сигналов изначально оранжевый цвет на изображении a был изменен в фоторедакторе на красный

Fig. 3. Interphase nucleus of spermatogenic cell from testicular biopsy of azoospermic patient: a — immunocytochemical detection of 5fC*; b — immunocytochemical detection of 5caC; c — merged image (5fC + 5caC).

*To improve quality of the merged image, picture a was converted from orange to red pseudocolor

На препаратах из образцов тестикулярной ткани было обнаружено 884 сперматозоида. Все они характеризовались практически полным отсутствием (фоновым содержанием) 5fC и 5caC.

Таким образом, распределение 5fC и 5caC в сперматогенных клетках человека характеризуется определенной специфичностью: карбонильная и карбоксильная формы 5mC отсутствуют в митотически и мейотически делящихся сперматогенных клетках и характерны только для некоторых интерфазных ядер сперматогониев и сперматид.

Наличие 5fC и 5caC в единичных сперматозоидах из эякулята

Детекцию 5fC и 5caC в геноме эякулированных сперматозоидов осуществляли иммуноцитохимическим методом на цитологических препаратах из образцов эякулята 8 пациентов из бесплодных пар и 5 доноров спермы. Наличие и распределение 5fC и 5caC оценивали качественно путем визуального анализа иммунофлуоресцентного сигнала в 5000 сперматозоидов у каждого из 13 индивидов.

Установлено, что для большинства сперматозоидов характерен крайне слабый (фоновый) уровень флуоресценции, свидетельствующий об очень низком содержании как 5fC, так и 5caC или об их отсутствии. Высокий уровень 5fC и 5caC был выявлен лишь в отдельных сперматозоидах (обозначим их здесь и далее как 5fC⁺- и 5caC⁺-сперматозоиды) (рис. 4). Анализ взаимосвязи частот 5fC⁺- и 5caC⁺-сперматозоидов в эякуляте, проведенный с помощью вычисления коэффициента корреляции по Спирмену, показал положительную умеренную, близкую к сильной, зависимость между этими параметрами — $r = 0,67$, $p = 0,01$ (рис. 5).

У пациентов из бесплодных пар число сперматозоидов с высоким уровнем 5fC и 5caC варьировало в широких пределах: от 12 до 1016 и от 16 до 705 на 5000 соответственно. У доноров спермы, напротив, число 5fC⁺- и 5caC⁺-сперматозоидов было низким и варьировало в узком диапазоне: от 3 до 28 и от 26 до 54 на 5000 соответственно (рис. 6). При сравнении частоты 5fC⁺- и 5caC⁺-сперматозоидов у пациентов из бесплодных пар с таковым у доноров спермы установлены достоверные отличия: у пациентов из бесплодных пар она была выше: $p = 0,007$ — для 5fC⁺-, и $p = 0,028$ — для 5caC⁺-сперматозоидов, критерий Манна – Уитни (рис. 6).

При анализе взаимной локализации 5fC и 5caC в 5fC⁺- и 5caC⁺-сперматозоидах установлена их колокализация в некоторых областях хроматина и взаимоисключающее расположение в других областях (рис. 7).

Таким образом, частоты 5fC⁺- и 5caC⁺-сперматозоидов в эякуляте являются взаимозависимыми параметрами. Частота сперматозоидов с высоким уровнем 5fC и 5caC различается в эякуляте пациентов из бесплодных пар и доноров спермы: она стабильно низка у доноров и варьирует в широком диапазоне у пациентов — от значений,

близких к таковым у доноров, до значений, достигающих 13–32-кратной разницы по сравнению с таковыми у доноров.

Взаимосвязь частоты сперматозоидов с высоким уровнем 5fC и 5caC с показателями спермиологического анализа и фрагментацией ДНК

Учитывая широкий диапазон варьирования частоты 5fC⁺- и 5caC⁺-сперматозоидов в эякуляте, представлялась целесообразной проверка ее возможной взаимосвязи с показателями спермиологического анализа: подвижностью, частотой сперматозоидов с нормальной общей морфологией, частотой сперматозоидов с нормальной морфологией головки, частотой сперматозоидов с аномальным хвостом, частотой сперматозоидов с аномальной шейкой. Указанные показатели спермиологического анализа доноров спермы и пациентов из бесплодных пар приведены в таблице.

Оценку взаимосвязи проводили с помощью вычисления коэффициента корреляции по Спирмену, учитывая данные 13 индивидов (рис. 8). В результате проведенного анализа установлена умеренная, близкая к сильной, отрицательная корреляция частоты 5fC⁺-сперматозоидов с частотой сперматозоидов с нормальной морфологией головки ($r = -0,62$, $p = 0,023$) и с частотой сперматозоидов с нормальной общей морфологией ($r = -0,66$, $p = 0,014$). Не установлено достоверной корреляции между частотой 5fC⁺-сперматозоидов в эякуляте и долей непрогрессивно-подвижных сперматозоидов ($r = 0,33$, $p = 0,26$), долей прогрессивно-подвижных сперматозоидов ($r = -0,42$, $p = 0,15$), общей подвижностью сперматозоидов ($r = 0,32$, $p = 0,27$), долей сперматозоидов с аномалиями хвоста ($r = -0,25$, $p = 0,36$). При анализе взаимосвязи частоты 5caC⁺-сперматозоидов с показателями спермиологического анализа установлена умеренная, близкая к сильной, отрицательная корреляция с частотой сперматозоидов с нормальной морфологией головки ($r = -0,68$, $p = 0,011$), с частотой сперматозоидов с нормальной общей морфологией ($r = -0,68$, $p = 0,012$) и с частотой прогрессивно-подвижных сперматозоидов ($r = -0,64$, $p = 0,019$). Не установлено достоверной корреляции между частотой 5caC⁺-сперматозоидов в эякуляте и частотой непрогрессивно-подвижных сперматозоидов ($r = 0,37$, $p = 0,21$), общей подвижностью сперматозоидов ($r = 0,21$, $p = 0,49$), долей сперматозоидов с аномалиями хвоста ($r = -0,06$, $p = 0,79$).

Проведена оценка взаимосвязи частоты 5fC⁺- и 5caC⁺-сперматозоидов в эякуляте с уровнем фрагментации ДНК в сперматозоидах. Оценку частоты сперматозоидов с фрагментированной ДНК проводили на цитологических препаратах с помощью метода TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT — mediated dUTP Nick and Labelling), позволяющего выявить одно- и двуниевые разрывы в ДНК. Производили подсчет TUNEL⁺-сперматозоидов на 2000 сперматозоидов у каждого

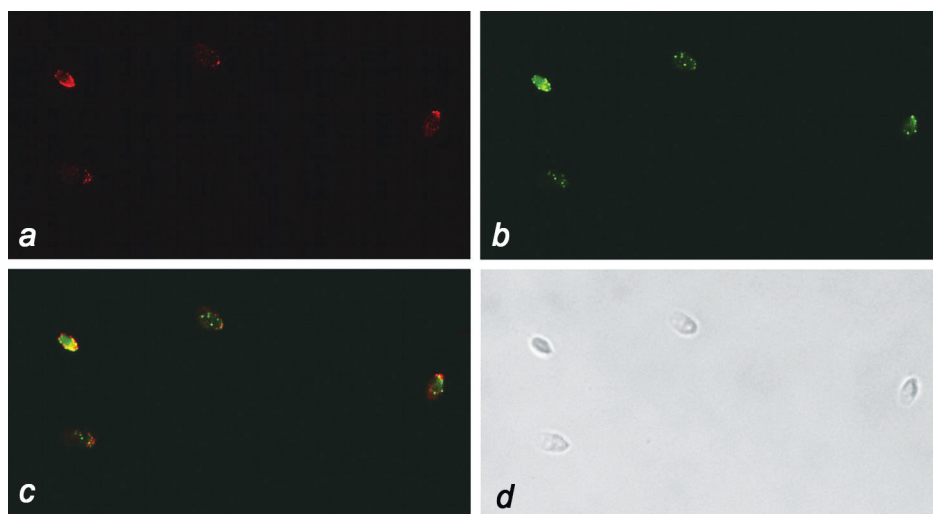


Рис. 4. Сперматозоиды из эякулята человека, окрашенные с помощью антител, специфичных к 5fC (a)*, 5caC (b), совмещенное изображение 5fC + 5caC (c), фазово-контрастное изображение (d).

*Для улучшения качества совместной визуализации флуоресцентных сигналов изначально оранжевый цвет на изображении a был изменен в фоторедакторе на красный

Fig. 4. Human ejaculated spermatozoa stained with anti-5fC (a)* and anti-5caC (b) antibodies, merged image — 5fC + 5caC (c), phase contrast image (d).

*To improve quality of the merged image, picture a was converted from orange to red pseudocolor

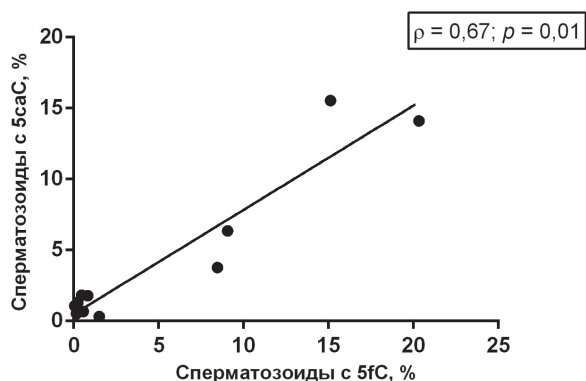


Рис. 5. Взаимосвязь содержания в эякуляте 5fC⁺- и 5caC⁺-сперматозоидов. Показана линия регрессии, коэффициент корреляции Спирмена ρ и p -значение. Установлена достоверная положительная зависимость

Fig. 5. Positive correlation between the frequency of 5fC⁺ and 5caC⁺-spermatozoa in ejaculate (Spearman test)

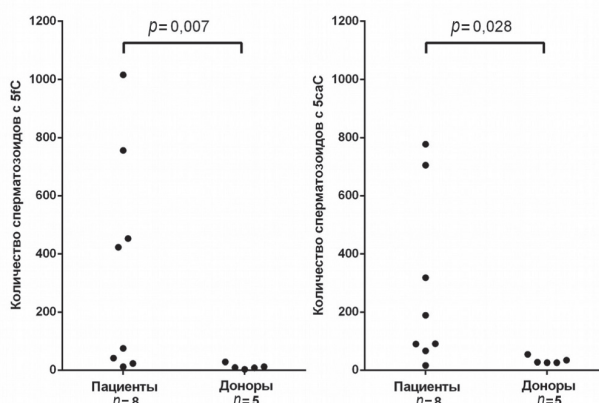


Рис. 6. Содержание сперматозоидов с 5fC⁺ и 5caC⁺ в эякуляте пациентов из бесплодных пар и доноров спермы

Fig. 6. Scatter dot plots showing the frequency of immunocytochemically detected 5fC⁺ and 5caC⁺-spermatozoa in ejaculate of patients from infertile couples and sperm donors

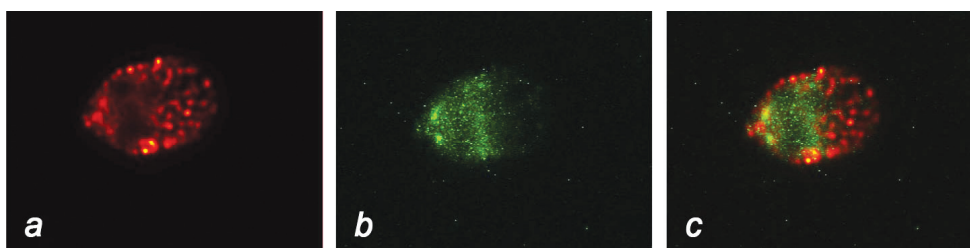


Рис. 7. Сперматозоид из эякулята человека, окрашенный с помощью антител, специфичных к 5fC (a)*, 5caC (b), и совмещенные изображения 5fC + 5caC (c). *Для улучшения качества совместной визуализации флуоресцентных сигналов изначально оранжевый цвет на изображении a был изменен в фоторедакторе на красный

Fig. 7. Ejaculated spermatozoon stained with anti-5fC (a)* and anti-5caC (b) antibodies, merged image — 5fC + 5caC (c). *To improve quality of the merged image, picture a was converted from orange to red pseudocolor

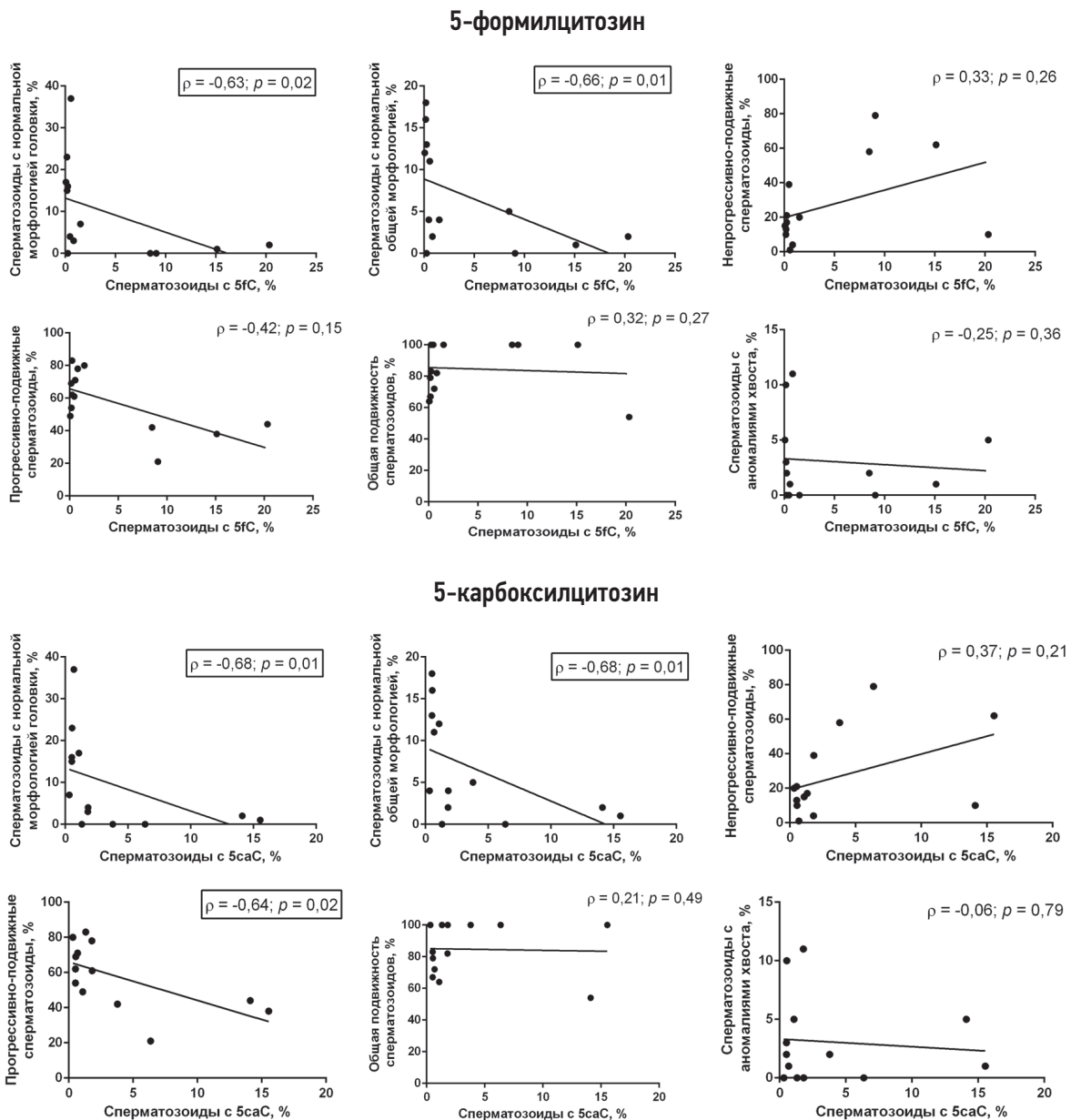


Рис. 8. Взаимосвязь содержания в эякуляте 5fC⁺- и 5caC⁺-сперматозоидов с показателями спермиологического анализа и фрагментацией ДНК. Показаны линии регрессии, коэффициент корреляции Спирмена ρ и p -значения. Достоверные корреляции выделены рамкой

Fig. 8. Correlations between the frequency of 5fC⁺ / 5caC⁺-spermatozoa in ejaculate and semen parameters. Statistically significant correlations are framed (Spearman test)

индивида. Частоты сперматозоидов с фрагментированной ДНК у доноров спермы и пациентов из бесплодных пар приведены в таблице.

Не выявлено корреляции между частотой сперматозоидов с фрагментированной ДНК и между частотой как 5fC⁺-, так и 5caC⁺-сперматозоидов, $\rho = 0,23$, $p = 0,44$ и $\rho = 0,29$, $p = 0,32$ соответственно (рис. 9).

Таким образом, увеличение частоты 5fC⁺- и 5caC⁺-сперматозоидов в эякуляте сопровождается снижением частоты морфологически нормальных и прогрессивно-подвижных сперматозоидов.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе изучено распределение 5fC и 5caC в сперматогенезе человека: в сперматогенных клетках семенников — от сперматогониев до сперматид, и в зрелых сперматозоидах из эякулята. В качестве способа выявления 5fC и 5caC была выбрана иммуноцитохимическая детекция с помощью специфичных антител на цитологических препаратах с последующим микроскопическим анализом. Такой способ, несмотря на трудоемкость, обладает определенными преимуществами по сравнению с молекулярно-генетическими методами. Последние

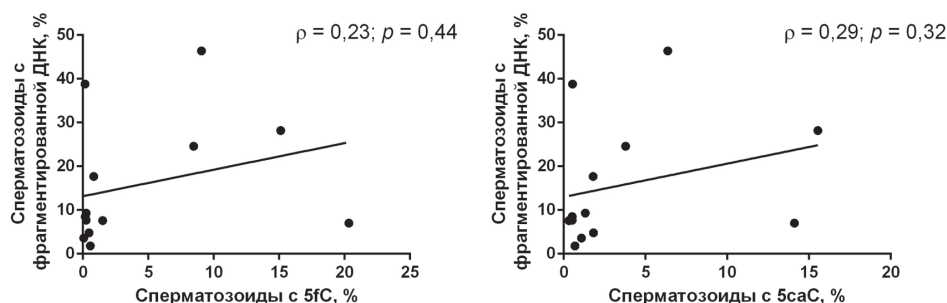


Рис. 9. Взаимосвязь содержания в эякуляте 5fC⁺- и 5caC⁺-сперматозоидов с фрагментацией ДНК. Показаны линии регрессии, коэффициент корреляции Спирмена ρ и p -значения

Fig. 9. Correlations between the frequency of 5fC⁺ / 5caC⁺-spermatozoa in ejaculate and DNA fragmentation (Spearman test)

Таблица. Показатели спермиологического анализа доноров спермы и пациентов из бесплодных пар

Table. Semen parameters of sperm donors and patients from infertile couples

№ пациента	Содержание в эякуляте различных категорий сперматозоидов, %						
	с нормальной головкой	с нормальной общей морфологией	непрогрессивно-подвижные	общая подвижность	прогрессивно-подвижные	с аномальным хвостом	с фрагментированной ДНК
1*	17	12	15	64	49	5	3,6
2*	15	18	13	67	54	3	8,5
3*	16	13	21	83	62	2	7,7
4*	23	16	10	79	69	10	38,8
5*	37	11	1	72	71	1	1,8
6	0	0	17	100	83	0	9,3
7	3	2	4	82	78	11	17,7
8	0	0	79	100	21	0	46,4
9	4	4	39	100	61	0	4,8
10	1	1	62	100	38	1	28,2
11	2	2	10	54	44	5	7
12	0	5	58	100	42	2	24,6
13	7	4	20	100	80	0	7,6

*Донор спермы.

менее трудоемки и позволяют анализировать содержание модифицированного цитозина в значительно большем числе образцов. Однако анализ геномной ДНК, выделенной из образца, содержащего большое число клеток, показывает усредненное содержание модифицированного цитозина. При этом его повышение в одних клетках и снижение в других в пределах одного образца останется не выявленным. Наиболее надежным и точным для подобного рода исследований является метод микроскопического анализа, позволяющий вести поклеточный анализ. Такой подход позволяет учитывать особенности разных типов сперматогенных и не сперматогенных клеток при исследовании образцов тестикулярной ткани и особенности индивидуальных сперматозоидов при анализе эякулята [27].

Метод иммуноцитохимической детекции модифицированного цитозина на микроскопических препаратах уже был нами успешно применен ранее при изучении метилирования и гидроксиметилирования ДНК в сперматогенезе человека [18]. Именно благодаря возможности

индивидуального анализа клеток нами было обнаружено дискретное распределение 5hmC: в отличие от 5mC, выявленного во всех сперматогенных клетках и сперматозоидах, 5hmC локализовался только в интерфазных ядрах сперматогониев Ad, в незначительной доле сперматид и в некоторых эякулированных сперматозоидах [18]. При этом частота сперматозоидов с высоким уровнем 5hmC, выявленных иммуноцитохимическим методом, характеризовалась повышенной межиндивидуальной вариабельностью, положительно коррелировала с содержанием сперматозоидов с фрагментированной ДНК и отрицательно — с качеством эякулята и фертильностью, что позволило рассматривать 5hmC в качестве негативного маркера качества мужских гамет [18].

5fC и 5caC являются промежуточными продуктами ферментативного деметилирования ДНК. Они образуются, преимущественно, при последовательном окислении 5mC диоксигеназами ТЕТ до 5hmC, затем до 5fC и, наконец, до 5caC. 5fC и 5caC заменяются на немодифицированный

цитозин системой эксцизионной репарации клетки [13, 14]. Известно, что в онтогенезе млекопитающих масштабное деметилирование ДНК, сочетающее как активные (ферментативные), так и пассивные механизмы, происходит дважды: первая волна в первичных половых клетках, а вторая — в период делений дробления эмбриона [28, 29]. Именно эти периоды характеризуются образованием в ДНК значительного количества 5hmC, 5fC и 5caC. Однако немаловажно, что при этом происходит существенное снижение уровня метилирования ДНК [23, 30, 31]. В нашем предыдущем исследовании, сфокусированном на изучении гидроксиметилирования ДНК в сперматогенезе, показано наличие 5hmC лишь в отдельных сперматогониях, сперматиде и сперматозоидах, не сопровождающееся уменьшением в них уровня метилирования ДНК [18]. Картина распределения в сперматогенных клетках 5fC и 5caC, представленная нами в настоящем исследовании, обладает сходством с выявленным ранее характером гидроксиметилирования — оба соединения присутствуют в небольшой доле интерфазных ядер сперматогониев и сперматид, а также в отдельных сперматозоидах в эякуляте. Такое дифференциальное распределение кислородсодержащих производных 5mC, вероятнее всего, свидетельствует не о масштабном деметилировании ДНК в рамках эпигенетического репрограммирования, а о локальных эпигенетических изменениях, касающихся генома отдельных клеток в пределах ткани.

Появление в клетках кислородсодержащих производных 5mC не всегда связано с предопределенным программой развития ферментативным деметилированием ДНК. Так, в условиях оксидативного стресса гидроксильный радикал может прямо атаковать метилированный цитозин, в результате чего образуются его окисленные формы — 5hmC и 5fC [32, 33]. Причиной возникновения оксидативного стресса могут стать негативные воздействия внешних факторов, вредные привычки, воспаление, избыточные физические нагрузки, переутомление. Из-за разнообразия причин оксидативного стресса, степень его выраженности может существенно варьировать как среди разных индивидов, так и у одного и того же индивида в разные периоды времени. При этом достоверно известно, что повышенный уровень оксидативного стресса ассоциирован со снижением мужской фертильности [34].

Приведенные сведения позволяют предположить, что наблюдаемая в нашем исследовании картина распределения 5fC и 5caC в сперматозоидах в эякуляте, характеризующаяся высокой межиндивидуальной вариабельностью и различающаяся у доноров спермы и пациентов из бесплодных пар, вероятнее всего, является отражением воздействия на эпигеном сперматозоидов оксидативного стресса. В пользу предположения о преимущественно неферментативном пути появления 5fC и 5caC в сперматозоидах косвенно свидетельствуют данные, полученные при изучении мРНК *TET* в эякуляте [35]. Авторами было показано, что уровень мРНК *TET* в сперматозоидах

взаимосвязан с показателями спермиологического анализа и что он значительно снижен у субфертильных пациентов [35].

Учитывая наиболее вероятное спонтанное появление 5fC и 5caC в сперматозоидах в результате воздействия негативных факторов, ожидаемой представляется обнаруженная взаимосвязь частоты 5fC⁺- и 5caC⁺-сперматозоидов в эякуляте с некоторыми показателями спермиологического анализа, которые также подвержены средовым воздействиям. Снижение частоты морфологически нормальных и прогрессивно-подвижных сперматозоидов при повышении частоты 5fC⁺- и 5caC⁺-сперматозоидов в эякуляте свидетельствует в пользу возможной перспективы использования последней в качестве дополнительного критерия качества эякулята.

Закономерно возникает вопрос, на каком этапе сперматогенеза в отдельных клетках может повышаться уровень 5fC и 5caC. В настоящем исследовании высокий уровень 5fC и 5caC был выявлен не только в эякулированных сперматозоидах, но и в небольшой доле сперматогенных клеток — как в сперматогониях, так и в сперматиде. Однако предположение, что аномальное увеличение в геноме уровня 5fC и 5caC под воздействием негативных факторов происходит в диплоидных сперматогониях и сохраняется на всех дальнейших этапах сперматогенеза вплоть до зрелых сперматозоидов, не кажется правомерным по крайней мере по двум причинам. Во-первых, в отличие от эякулированных сперматозоидов, частота 5fC⁺- и 5caC⁺-сперматогониев не характеризуется выраженной межиндивидуальной вариабельностью. Во-вторых, ни 5fC, ни 5caC не были обнаружены при анализе митотических и мейотических хромосом, что указывает на то, что карбоксильная и карбонильная формы 5mC не сохраняются в геноме сперматогенных клеток при прохождении ими этапов дифференцировки. Частота 5fC⁺- и 5caC⁺-сперматид варьирует между индивидами в более широких пределах. Однако при анализе сперматозоидов, находящихся в образцах тестикулярной ткани, 5fC и 5caC не обнаружено. Этот факт свидетельствует в пользу того, что повышенный уровень 5fC и 5caC в эякулированных сперматозоидах является следствием воздействия на находящиеся вне тестикулярной ткани клетки, вероятнее всего, в эпидидимисе, где сперматозоиды наиболее подвержены негативным факторам [36]. Наличие же 5fC и 5caC в отдельных сперматогониях и сперматиде, вероятно, носит закономерный характер и обусловлено не спонтанными средовыми стимулами, а программой сперматогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что продукты окисления метилированного цитозина — 5fC и 5caC — характеризуются дифференциальным распределением в сперматогенезе человека. Опираясь на собственные и литературные данные об эпигенетическом репро-

граммировании половых клеток человека и воздействию на их эпигеном экзо- и эндогенных факторов, мы предполагаем, что присутствие 5fC и 5caC в отдельных сперматогониях и сперматидях, наиболее вероятно, связано с реализацией программы развития организма. Повышенный уровень 5fC и 5caC, выявляемый иммуноцитохимическим методом в некоторых эякулированных сперматозоидах, напротив, скорее всего, следствие негативного воздействия на их эпигеном внешних и внутренних факторов. Взаимосвязь частоты 5fC⁺- и 5caC⁺-сперматозоидов с фертильностью и некоторыми параметрами спермиологического анализа позволяет говорить о возможности разработки новых дополнительных критериев качества эякулята на основе анализа эпигенома сперматозоидов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Вклад каждого автора: О.А. Ефимова, А.А. Пендина, И.Ю. Коган, А.М. Гзгзян, О.Н. Беспалова — дизайн эксперимента; М.А. Ищук, И.Д. Мекина, Е.М. Комарова, А.М. Гзгзян, И.Ю. Коган — формирование групп исследования, получение и первичная обработка биологического материала; С.Е. Парфеньев, А.В. Тихонов, А.В. Голубева, М.И. Крапивин, М.А. Ищук, И.Д. Мекина, Е.М. Комарова — проведение эксперимента; С.Е. Парфеньев, Е.В. Даев, М.И. Крапивин — статистическая обработка данных; С.Е. Парфеньев, О.А. Ефимова, А.А. Пендина, А.В. Тихонов — анализ данных литературы; О.А. Ефимова, С.Е. Парфеньев — написание текста; С.Е. Парфеньев, А.А. Пендина, О.А. Ефимова, М.И. Крапивин — подготовка иллюстраций; О.А. Ефимова, А.А. Пендина, Е.В. Даев, О.Н. Беспалова — проверка текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reik W., Surani M.A. Germline and Pluripotent Stem Cells // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015. Vol. 7, No. 11. P. a019422. DOI: 10.1101/cshperspect.a019422
2. Efimova O.A., Pendina A.A., Tikhonov A.V., Baranov V.S. The evolution of ideas on the biological role of 5-methylcytosine oxidative derivatives in the mammalian genome // *Russ J Genet Appl Res.* 2018. Vol. 8, No. 1. P. 11–21. DOI: 10.1134/S2079059718010069
3. Efimova O.A., Koltsova A.S., Krapivin M.I., et al. Environmental Epigenetics and Genome Flexibility: Focus on 5-Hydroxymethylcytosine // *Int J Mol Sci.* 2020. Vol. 21, No. 9. P. 3223. DOI: 10.3390/ijms21093223
4. Aitken R.J., Gibb Z., Baker M.A., et al. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa // *Reprod Fertil Dev.* 2016. Vol. 28, No. 1–2. P. 1–10. DOI: 10.1071/RD15325
5. Gunes S., Arslan M.A., Hekim G.N.T., Asci R. The role of epigenetics in idiopathic male infertility // *J Assist Reprod Genet.* 2016. Vol. 33, No. 5. P. 553–569. DOI: 10.1007/s10815-016-0682-8
6. Jenkins T.G., Aston K.I., Meyer T.D., et al. Decreased fecundity and sperm DNA methylation patterns // *Fertil Steril.* 2016. Vol. 105, No. 1. P. 51–7.e1–3. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.09.013
7. Aston K.I., Uren P.J., Jenkins T.G., et al. Aberrant sperm DNA methylation predicts male fertility status and embryo quality // *Fertil Steril.* 2015. Vol. 104, No. 6. P. 1388–97.e1–5. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.08.019
8. Urduingio R.G., Bayon G.F., Dmitrijeva M., et al. Aberrant DNA methylation patterns of spermatozoa in men with unexplained infertility // *Hum Reprod.* 2015. Vol. 30, No. 5. P. 1014–1028. DOI: 10.1093/humrep/dev053
9. Du Y., Li M., Chen J., et al. Promoter targeted bisulfite sequencing reveals DNA methylation profiles associated with low sperm motility in asthenozoospermia // *Hum Reprod.* 2016. Vol. 31, No. 1. P. 24–33. DOI: 10.1093/humrep/dev283
10. Laqqan M.M., Yassin M.M. Cigarette heavy smoking alters DNA methylation patterns and gene transcription levels in humans spermatozoa // *Environ Sci Pollut Res Int.* 2022. Vol. 29, No. 18. P. 26835–26849. DOI: 10.1007/s11356-021-17786-8
11. Li J., Xu J., Yang T., et al. Genome-wide methylation analyses of human sperm unravel novel differentially methylated regions in asthenozoospermia // *Epigenomics.* 2022. Vol. 14, No. 16. P. 951–964. DOI: 10.2217/epi-2022-0122

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-75-10046).

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

Этический комитет. Исследование одобрено этическим комитетом НИИ АГиР им. Д.О. Отта (протокол № 117 от 19.04.2022).

ADDITIONAL INFORMATION

Author contribution. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published, and agree to be accountable for all aspects of the study. The contributions of each author: O.A. Efimova, A.A. Pendina, I.Yu. Kogan, A.M. Gzgzyan, O.N. Bespalova — experiment design; M.A. Ishchuk, I.D. Mekina, E.M. Komarova, A.M. Gzgzyan, I.Yu. Kogan — formation of research groups, obtaining and primary processing of biological material; S.E. Parfenyev, A.V. Tikhonov, A.V. Golubeva, M.I. Krapivin, M.A. Ishchuk, I.D. Mekina, E.M. Komarova — conducting the experiment; S.E. Parfenyev, E.V. Dayev, M.I. Krapivin — statistical data processing; S.E. Parfenyev, O.A. Efimova, A.A. Pendina, A.V. Tikhonov — analysis of literature data; O.A. Efimova, S.E. Parfenyev — writing the text; S.E. Parfenyev, A.A. Pendina, O.A. Efimova, M.I. Krapivin — preparation of illustrations; O.A. Efimova, A.A. Pendina, E.V. Dayev, O.N. Bespalova — checking the text of the article.

Funding source. This work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 18-75-10046).

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval. This study was approved by the Ethical Committee of D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology (No. 117/19/4/2022).

12. Zhang Z., Wang J., Shi F., et al. Genome-wide alternation and effect of DNA methylation in the impairments of steroidogenesis and spermatogenesis after PM2.5 exposure // *Environ Int.* 2022. Vol. 169. P. 107544. DOI: 10.1016/j.envint.2022.107544
13. Tahiliani M., Koh K.P., Shen Y., et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1 // *Science.* 2009. Vol. 324, No. 5929. P. 930–935. DOI: 10.1126/science.1170116
14. Ito S., Shen L., Dai Q., et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine // *Science.* 2011. Vol. 333, No. 6047. P. 1300–1303. DOI: 10.1126/science.1210597
15. Branco M.R., Ficz G., Reik W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome // *Nat Rev Genet.* 2011. Vol. 13, No. 1. P. 7–13. DOI: 10.1038/nrg3080
16. Pfeifer G.P., Kadam S., Jin S.G. 5-hydroxymethylcytosine and its potential roles in development and cancer // *Epigenetics Chromatin.* 2013. Vol. 6, No. 1. P. 10. DOI: 10.1186/1756-8935-6-10
17. Efimova O.A., Pendina A.A., Tikhonov A.V., et al. Oxidized form of 5-methylcytosine–5-hydroxymethylcytosine: a new insight into the biological significance in the mammalian genome // *Russ J Genet Appl Res.* 2015. Vol. 5. P. 75–81. DOI: 10.1134/S2079059715020033
18. Efimova O.A., Pendina A.A., Tikhonov A.V., et al. Genome-wide 5-hydroxymethylcytosine patterns in human spermatogenesis are associated with semen quality // *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, No. 51. P. 88294–88307. DOI: 10.18632/oncotarget.18331
19. Zheng H., Zhou X., Li D.K., et al. Genome-wide alteration in DNA hydroxymethylation in the sperm from bisphenol A-exposed men // *PLoS One.* 2017. Vol. 12, No. 6. P. e0178535. DOI: 10.1371/journal.pone.0178535
20. Nettersheim D., Heukamp L.C., Fronhoffs F., et al. Analysis of TET expression/activity and 5mC oxidation during normal and malignant germ cell development // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, No. 12. P. e82881. DOI: 10.1371/journal.pone.0082881
21. Kruger T.F., Menkveld R., Stander F.S., et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization // *Fertil Steril.* 1986. Vol. 46, No. 6. P. 1118–1123. DOI: 10.1016/s0015-0282(16)49891-2
22. Pendina A.A., Efimova O.A., Chiryaeva O.G., et al. A comparative cytogenetic study of miscarriages after IVF and natural conception in women aged under and over 35 years // *J Assist Reprod Genet.* 2014. Vol. 31, No. 2. P. 149–155. DOI: 10.1007/s10815-013-0148-1
23. Efimova O.A., Pendina A.A., Tikhonov A.V., et al. Chromosome hydroxymethylation patterns in human zygotes and cleavage-stage embryos // *Reproduction.* 2015. Vol. 149, No. 3. P. 223–233. DOI: 10.1530/REP-14-0343
24. Pendina A.A., Efimova O.A., Tikhonov A.V., et al. Immunofluorescence Staining for Cytosine Modifications Like 5-Methylcytosine and Its Oxidative Derivatives and FISH. In: *Fluorescence in situ hybridization (FISH)*. Ed. by T. Liehr. Berlin: Heidelberg: Springer, 2017. P. 337–346. DOI: 10.1007/978-3-662-52959-1_35
25. Efimova O.A., Pendina A.A., Krapivin M.I., et al. Inter-Cell and Inter-Chromosome Variability of 5-Hydroxymethylcytosine Patterns in Noncultured Human Embryonic and Extraembryonic Cells // *Cytogenet Genome Res.* 2018. Vol. 156, No. 3. P. 150–157. DOI: 10.1159/000493906
26. Negoescu A., Lorimier P., Labat-Moleur F., et al. *In situ* apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations // *J Histochem Cytochem.* 1996. Vol. 44, No. 9. P. 959–968. DOI: 10.1177/44.9.8773561
27. World Health Organization. Laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition. Geneva: World Health Organization, 2021. 276 p.
28. Seisenberger S., Peat J.R., Hore T.A., et al. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013. Vol. 368, No. 1609. P. 20110330. DOI: 10.1098/rstb.2011.0330
29. Marcho C., Cui W., Mager J. Epigenetic dynamics during pre-implantation development // *Reproduction.* 2015. Vol. 150, No. 3. P. R109–R120. DOI: 10.1530/REP-15-0180
30. Fulka H., Mrazek M., Tepla O., Fulka J.Jr. DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos // *Reproduction.* 2004. Vol. 128, No. 6. P. 703–708. DOI: 10.1530/rep.1.00217
31. Pendina A.A., Efimova O.A., Fedorova I.D., et al. DNA methylation patterns of metaphase chromosomes in human preimplantation embryos // *Cytogenet Genome Res.* 2011. Vol. 132, No. 1–2. P. 1–7. DOI: 10.1159/000318673
32. Madugundu G.S., Cadet J., Wagner J.R. Hydroxyl-radical-induced oxidation of 5-methylcytosine in isolated and cellular DNA // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42, No. 11. P. 7450–7460. DOI: 10.1093/nar/gku334
33. Cadet J., Wagner J.R. Radiation-induced damage to cellular DNA: Chemical nature and mechanisms of lesion formation // *Radiation Physics and Chemistry.* 2016. Vol. 128. P. 54–59. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2016.04.018
34. Alahmar A.T. Role of Oxidative Stress in Male Infertility: An Updated Review // *J Hum Reprod Sci.* 2019. Vol. 12, No. 1. P. 4–18. DOI: 10.4103/jhrs.JHRS_150_18
35. Ni K., Dansranjav T., Rogenhofer N., et al. TET enzymes are successively expressed during human spermatogenesis and their expression level is pivotal for male fertility // *Hum Reprod.* 2016. Vol. 31, No. 7. P. 1411–1424. DOI: 10.1093/humrep/dew096
36. Sakkas D., Alvarez J.G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis // *Fertil Steril.* 2010. Vol. 93, No. 4. P. 1027–1036. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.046

REFERENCES

1. Reik W, Surani MA. Germline and Pluripotent Stem Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(11): a019422. DOI: 10.1101/cshperspect.a019422
2. Efimova OA, Pendina AA, Tikhonov AV, Baranov VS. The evolution of ideas on the biological role of 5-methylcytosine oxidative derivatives in the mammalian genome. *Russ J Genet Appl Res.* 2018;8(1):11–21. DOI: 10.1134/S2079059718010069
3. Efimova OA, Koltsova AS, Krapivin MI, et al. Environmental Epigenetics and Genome Flexibility: Focus on 5-Hydroxymethylcytosine. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9):3223. DOI: 10.3390/ijms21093223
4. Aitken RJ, Gibb Z, Baker MA, et al. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* 2016;28(1–2): 1–10. DOI: 10.1071/RD15325

5. Gunes S, Arslan MA, Hekim GNT, Asci R. The role of epigenetics in idiopathic male infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(5): 553–569. DOI: 10.1007/s10815-016-0682-8
6. Jenkins TG, Aston KI, Meyer TD, et al. Decreased fecundity and sperm DNA methylation patterns. *Fertil Steril.* 2016;105(1): 51–7.e1–3. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.09.013
7. Aston KI, Uren PJ, Jenkins TG, et al. Aberrant sperm DNA methylation predicts male fertility status and embryo quality. *Fertil Steril.* 2015;104(6):1388–97.e1–5. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.08.019
8. Urduingio RG, Bayón GF, Dmitrijeva M, et al. Aberrant DNA methylation patterns of spermatozoa in men with unexplained infertility. *Hum Reprod.* 2015;30(5):1014–1028. DOI: 10.1093/humrep/dev053
9. Du Y, Li M, Chen J, et al. Promoter targeted bisulfite sequencing reveals DNA methylation profiles associated with low sperm motility in asthenozoospermia. *Hum Reprod.* 2016;31(1):24–33. DOI: 10.1093/humrep/dev283
10. Laqqan MM, Yassin MM. Cigarette heavy smoking alters DNA methylation patterns and gene transcription levels in humans spermatozoa. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2022;29(18):26835–26849. DOI: 10.1007/s11356-021-17786-8
11. Li J, Xu J, Yang T, et al. Genome-wide methylation analyses of human sperm unravel novel differentially methylated regions in asthenozoospermia. *Epigenomics.* 2022;14(16):951–964. DOI: 10.2217/epi-2022-0122
12. Zhang Z, Wang J, Shi F, et al. Genome-wide alternation and effect of DNA methylation in the impairments of steroidogenesis and spermatogenesis after PM2.5 exposure. *Environ Int.* 2022;169:107544. DOI: 10.1016/j.envint.2022.107544
13. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science.* 2009;324(5929):930–935. DOI: 10.1126/science.1170116
14. Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science.* 2011;333(6047):1300–1303. DOI: 10.1126/science.1210597
15. Branco MR, Ficz G, Reik W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat Rev Genet.* 2011;13(1):7–13. DOI: 10.1038/nrg3080
16. Pfeifer GP, Kadam S, Jin SG. 5-hydroxymethylcytosine and its potential roles in development and cancer. *Epigenetics Chromatin.* 2013;6(1):10. DOI: 10.1186/1756-8935-6-10
17. Efimova OA, Pendina AA, Tikhonov AV, et al. Oxidized form of 5-methylcytosine — 5-hydroxymethylcytosine: a new insight into the biological significance in the mammalian genome. *Russ J Genet Appl Res.* 2015;5:75–81. DOI: 10.1134/S2079059715020033
18. Efimova OA, Pendina AA, Tikhonov AV, et al. Genome-wide 5-hydroxymethylcytosine patterns in human spermatogenesis are associated with semen quality. *Oncotarget.* 2017;8(51):88294–88307. DOI: 10.18632/oncotarget.18331
19. Zheng H, Zhou X, Li DK, et al. Genome-wide alteration in DNA hydroxymethylation in the sperm from bisphenol A-exposed men. *PLoS One.* 2017;12(6): e0178535. DOI: 10.1371/journal.pone.0178535
20. Nettersheim D, Heukamp LC, Fronhoffs F, et al. Analysis of TET expression/activity and 5mC oxidation during normal and malignant germ cell development. *PLoS One.* 2013;8(12): e82881. DOI: 10.1371/journal.pone.0082881
21. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril.* 1986;46(6):1118–1123. DOI: 10.1016/s0015-0282(16)49891-2
22. Pendina AA, Efimova OA, Chiryayeva OG, et al. A comparative cytogenetic study of miscarriages after IVF and natural conception in women aged under and over 35 years. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31(2):149–155. DOI: 10.1007/s10815-013-0148-1
23. Efimova OA, Pendina AA, Tikhonov AV, et al. Chromosome hydroxymethylation patterns in human zygotes and cleavage-stage embryos. *Reproduction.* 2015;149(3):223–233. DOI: 10.1530/REP-14-0343
24. Pendina AA, Efimova OA, Tikhonov AV, et al. Immunofluorescence Staining for Cytosine Modifications Like 5-Methylcytosine and Its Oxidative Derivatives and FISH. In: *Fluorescence in situ hybridization (FISH)*. Ed. by T. Liehr. Berlin: Heidelberg: Springer; 2017. P. 337–346. DOI: 10.1007/978-3-662-52959-1_35
25. Efimova OA, Pendina AA, Krapivin MI, et al. Inter-Cell and Inter-Chromosome Variability of 5-Hydroxymethylcytosine Patterns in Noncultured Human Embryonic and Extraembryonic Cells. *Cytogenet Genome Res.* 2018;156(3):150–157. DOI: 10.1159/000493906
26. Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, et al. *In situ* apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem.* 1996;44(9):959–968. DOI: 10.1177/44.9.8773561
27. World Health Organization. Laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition. Geneva: World Health Organization; 2021. 276 p.
28. Seisenberger S, Peat JR, Hore TA, et al. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013;368(1609):20110330. DOI: 10.1098/rstb.2011.0330
29. Marcho C, Cui W, Mager J. Epigenetic dynamics during pre-implantation development. *Reproduction.* 2015;150(3):R109–R120. DOI: 10.1530/REP-15-0180
30. Fulka H, Mrazek M, Tepla O, Fulka J Jr. DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. *Reproduction.* 2004;128(6):703–708. DOI: 10.1530/rep.1.00217
31. Pendina AA, Efimova OA, Fedorova ID, et al. DNA methylation patterns of metaphase chromosomes in human preimplantation embryos. *Cytogenet Genome Res.* 2011;132(1–2):1–7. DOI: 10.1159/000318673
32. Madugundu GS, Cadet J, Wagner JR. Hydroxyl-radical-induced oxidation of 5-methylcytosine in isolated and cellular DNA. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(11):7450–7460. DOI: 10.1093/nar/gku334
33. Cadet J, Wagner JR. Radiation-induced damage to cellular DNA: Chemical nature and mechanisms of lesion formation. *Radiation Physics and Chemistry.* 2016;128:54–59. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2016.04.018
34. Alahmar AT. Role of Oxidative Stress in Male Infertility: An Updated Review. *J Hum Reprod Sci.* 2019;12(1):4–18. DOI: 10.4103/jhrs.JHRS_150_18
35. Ni K, Dansranjav T, Rogenhofer N, et al. TET enzymes are successively expressed during human spermatogenesis and their expression level is pivotal for male fertility. *Hum Reprod.* 2016;31(7):1411–1424. DOI: 10.1093/humrep/dew096
36. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril.* 2010;93(4):1027–1036. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.046

ОБ АВТОРАХ

***Ольга Алексеевна Ефимова**, канд. биол. наук, заведующая лабораторией цитогенетики и цитогеномики репродукции; адрес: Россия, 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4495-0983>; eLibrary SPIN: 6959-5014; Scopus Author ID: 14013324600; e-mail: efimova_o82@mail.ru

Михаил Игоревич Крапивин, мл. научн. сотр.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1693-5973>; eLibrary SPIN: 4989-1932; Scopus Author ID: 56507166200; e-mail: krapivin-mihail@mail.ru

Сергей Евгеньевич Парфеньев, студент; Scopus Author ID: 57190742512; eLibrary SPIN: 9703-0273; e-mail: gen21eration@gmail.com

Ирина Дмитриевна Мекина, канд. биол. наук, ст. научн. сотр.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0813-5845>; Scopus Author ID: 7006299063; eLibrary SPIN: 4682-8590; e-mail: irendf@mail.ru

Евгения Михайловна Комарова, канд. биол. наук, заведующая лабораторией раннего эмбриогенеза; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9988-9879>; Scopus Author ID: 57191625749; eLibrary SPIN: 1056-7821; e-mail: evgmkomarova@gmail.com

Мария Алексеевна Ищук, мл. научн. сотр.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4443-4287>; Scopus Author ID: 24779589100; eLibrary SPIN: 1237-6373; e-mail: mashamazilina@gmail.com

Андрей Владимирович Тихонов, канд. биол. наук, научн. сотр.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2557-6642>; Scopus Author ID: 57191821068; eLibrary SPIN: 3170-2629; e-mail: tixonov5790@gmail.com

Игорь Юрьевич Коган, д-р мед. наук, чл.-корр. РАН, директор; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7351-6900>; Scopus Author ID: 56895765600; eLibrary SPIN: 6572-6450; e-mail: ikogan@mail.ru

Арина Вячеславовна Голубева, студент; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1613-222X>; e-mail: AlikovaAV1504@yandex.ru

Евгений Владиславович Даев, д-р биол. наук, профессор кафедры генетики и биотехнологии; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2036-6790>; Scopus Author ID: 6701779129; eLibrary SPIN: 8926-6034; e-mail: e.daev@spbu.ru

Александр Мкртичевич Гзгзян, д-р мед. наук, заведующий отделом репродуктологии; Scopus Author ID: 56232643300; eLibrary SPIN: 6412-4801; e-mail: agzgzyan@gmail.com

Олеся Николаевна Беспалова, д-р мед. наук, заместитель директора по научной работе; Scopus Author ID: 57189999252; eLibrary SPIN: 4732-8089; e-mail: shiggerra@mail.ru

Анна Андреевна Пендина, канд. биол. наук, ст. научн. сотр.; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9182-9188>; Scopus Author ID: 6506976983; eLibrary SPIN: 3123-2133; e-mail: pendina@mail.ru

AUTHORS' INFO

***Olga A. Efimova**, Cand. Sci. (Biol.), head of Laboratory of cytogenetics and cytogenomics of reproduction; address: 3 Mendeleevskaya line, Saint Petersburg, 199034, Russia; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4495-0983>; eLibrary SPIN: 6959-5014; Scopus Author ID: 14013324600; e-mail: efimova_o82@mail.ru

Mikhail I. Krapivin, junior research associate; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1693-5973>; eLibrary SPIN: 4989-1932; Scopus Author ID: 56507166200; e-mail: krapivin-mihail@mail.ru

Sergey E. Parfenyev, student; Scopus Author ID: 57190742512; eLibrary SPIN: 9703-0273; e-mail: gen21eration@gmail.com

Irina D. Mekina, Cand. Sci. (Biol.), senior research associate; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0813-5845>; Scopus Author ID: 7006299063; eLibrary SPIN: 4682-8590; e-mail: irendf@mail.ru

Evgeniia M. Komarova, Cand. Sci. (Biol.), head of Laboratory of preimplantation development; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9988-9879>; Scopus Author ID: 57191625749; eLibrary SPIN: 1056-7821; e-mail: evgmkomarova@gmail.com

Mariia A. Ishchuk, junior research associate; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4443-4287>; Scopus Author ID: 24779589100; eLibrary SPIN: 1237-6373; e-mail: mashamazilina@gmail.com

Andrei V. Tikhonov, Cand. Sci. (Biol.), research associate; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2557-6642>; Scopus Author ID: 57191821068; eLibrary SPIN: 3170-2629; e-mail: tixonov5790@gmail.com

Igor Yu. Kogan, MD, Dr. Sci. (Med.), Correspondent member RAS, director; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7351-6900>; Scopus Author ID: 56895765600; eLibrary SPIN: 6572-6450; e-mail: ikogan@mail.ru

Arina V. Golubeva, student; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1613-222X>; e-mail: AlikovaAV1504@yandex.ru

Eugene V. Daev, Dr. Sci. (Biol.), professor of genetics and biotechnology Department; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2036-6790>; Scopus Author ID: 6701779129; eLibrary SPIN: 8926-6034; e-mail: e.daev@spbu.ru

Aleksander M. Gzgzyan, MD, Dr. Sci. (Med.), head of Reproductology Department; Scopus Author ID: 56232643300; eLibrary SPIN: 6412-4801; e-mail: agzgzyan@gmail.com

Olesya N. Bespalova, Dr. Sci. (Med.); deputy director for science; Scopus Author ID: 57189999252; eLibrary SPIN: 4732-8089; e-mail: shiggerra@mail.ru

Anna A. Pendina, Cand. Sci. (Biol.), senior research associate; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9182-9188>; Scopus Author ID: 6506976983; eLibrary SPIN: 3123-2133; e-mail: pendina@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author