Journal of Animal Biology,Summer 2024; 16(4):13-22

Research Article

Investigation of the 5 and10 Methylene Tetrahydrofolate Reductase gene Methylation with Sperm Parameters in the Male of Kermanshah

Tayebeh Amjadian[1], Parichehreh Yaghmaei[1], Nasim Hayati Roodbari[1], Kheirollah Yari[2*]

1-Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad Universit, Tehran, Iran
2-Medical Biology Research Center, Health Technology Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
*Corresponding author: khirollah.yari@yahoo.com & kyari@kums.ac.ir

Received: 19 January 2024 Accepted: 8 March 2024

DOI: 10.60833/ascij.2024.1103212

Abstract

Infertility is one of the most common health problems in the world, affecting about 15% of couples. Abnormal DNA methylation in sperm can be affective in male infertility. 5 and 10-methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) is a vital enzyme for regulating DNA methylation patterns in sperm and the folate cycle, playing a crucial role in spermatogenesis processes. A Change in the expression level of this gene can lead to male infertility. This study aimed to investigate the level of methylation of the MTHFR gene in different methylated regions (DMRs) and the correlation between sperm DNA methylation patterns with semen quality parameters in fertile and infertile individuals. Semen samples were collected from 30 infertile men and 15 fertile men. After DNA treatment with sodium bisulfite, the methylation status of the MTHFR gene in DMRs was evaluated by qMSP method. There is a significant correlation between DMR methylation of the MTHFR gene in the infertile group compared to the fertile group (p = 0.036) and an increase was observed in infertile men. Additionally, a significant decrease in sperm parameters (sperm concentration, count, and morphology) was observed in the men of the infertile group. Also, there was a negative correlation between the methylation of DMRs of the MTHFR gene and semen parameters in patients. Hypermethylation of the MTHFR gene in DMRs in infertile individuals is associated with a decrease in sperm parameters.

Keywords: Male infertility, DNA methylation, MTHFR gene, qMSP.

مقاله پژوهشی

بررسی متیلاسیون ژن ۵ و۱۰متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز در مردان نابارور استان کرمانشاه

طیبه امجدیان [۱]، پریچهره یغمایی [۱]، نسیم حیاتی رودباری [۱]، خیراله یاری [۲*]

۱- گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، پژوهشکده فناوری های سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

*مسئول مکاتبات: khirollah.yari@yahoo.com & kyari@kums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۸

DOI: 10.60833/ascij.2024.1103212

چکیده

ناباروری یکی از شایع ترین مشکلات بهداشتی جهان است این مشکل حدود ۱۵ درصد از زوج‌ها را درگیر می‌کند. متیلاسیون غیرطبیعی DNA اسپرم می تواند در میزان ناباروری مردان موثر باشد. ۵ و۱۰متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) یک آنزیم حیاتی برای تنظیم الگوهای متیلاسیون DNA اسپرم و چرخه فولات است که نقش اساسی در فرایندهای اسپرماتوژنز ایفا می‌کند. تغییر در سطح بیان این ژن می‌تواند منجر به ناباروری مردان شود. هدف این مطالعه بررسی میزان متیلاسیون ژن MTHFR در مناطق متفاوت متیله شده (DMRs) و همبستگی بین الگوهای متیلاسیون DNA اسپرم با پارامترهای کیفیت منی در افراد بارور و نابارور است. نمونه‌های منی از ۳۰ مرد نابارور و ۱۵ مرد بارور جمع‌آوری شد. پس از تیمار DNA ها توسط بی سولفیت سدیم، وضعیت متیلاسیون MDRs ژن MTHFR با روش qMSP ارزیابی شد. ارتباط معناداری بین متیلاسیون DMRژن MTHFR در گروه نابارور در مقایسه با بارور وجود دارد (p =۰/۰۳۶) و افزایش در مردان گروه نابارور مشاهده شد. علاوه بر این، روند کاهشی قابل توجهی در پارامترهای اسپرمی (غلظت اسپرم، تعداد، و مورفولوژی) در مردان گروه نابارور مشاهده شد. همچنین بین متیلاسیون DMRs ژن MTHFR و پارامترهای مایع منی در بیماران همبستگی منفی وجود داشت. هایپرمتیلاسیون ژن MTHFR در مناطق DMRs افراد نابارور با کاهش پارامترهای اسپرم مرتبط است.

کلمات کلیدی: ناباروری مردان ، متیلاسیون DNA، ژن MTHFR، qMSP

مقدمه

بر اساس گزارش جدیدی که در ٤ آوریل ۲۰۲۳ توسط WHO منتشر شد، تقریباً از هر ٦ نفر در سراسر جهان ۱ نفر (حدود ۱۷/۵ درصد از جمعیت بزرگسال) ناباروری را تجربه می‌کند (۲۲). این موضوع اثرات منفی قابل توجهی بر سلامتی و اجتماعی بر زندگی زوج های نابارور دارد. اگرچه فناوری های کمک باروری (ARTs) در سال‌های اخیر پیشرفت قابل توجهی داشته اند، استفاده از آنها با نگرانی در بروز خطاهای ژنتیکی و اپی ژنتیکی در فرزندان همراه است (۱۸). مطالعه خطاهای ژنتیکی و اپی ژنتیکی درگیر در ناباروری می‌تواند برای دانستن اینکه آیا این اختلالات توسط خود ARTها ایجاد می‌شوند یا ناهنجاری‌های ژنومی که در سلول‌های زایا رخ می‌دهند، مفید باشد (۳۱). گزارش‌ها نشان داده‌اند که اپی‌ژنتیک از جمله تغییرات و یا تبادل هیستون و پروتامین، متیلاسیون DNA تغییر یافته و

ناهنجاری در کروماتین اسپرم در ناباروری مردان نقش دارد(۹). متیلاسیون DNA پرمطالعه‌ترین شکل مکانیسم اپی‌ژنتیکی است که فرآیندهای اسپرم‌زایی و لقاح را تنظیم می‌کند (۳۱). چندین مطالعه نشان داده-اند که متیلاسیون DNA در بلوغ وتولید اسپرم نقش دارد و همچنین با پارامترهای اسپرم و پیامدهای ARTs در ارتباط است(۵، ۱۰). بنابراین، بررسی متیلاسیون DNA ژن‌های خاص می‌تواند نشانگرهای تشخیصی مفیدی را در کلینیک‌ها ارائه دهد. وضعیت نابجای متیلاسیون DNA هم در ژن‌های imprinting وnon imprinting با ناباروری، پارامترهای ضعیف اسپرم، عوارض بارداری و افزایش احتمال بیماری‌های مادرزادی همراه است (۱۵، ۳۲). الیگوزواسپرمی، مورفولوژی غیرطبیعی و کاهش تحرک به متیلاسیون غیرعادی DNA چندین ژن imprinting در اسپرم مربوط می‌شود (۱۱، ۲۱). در نتیجه این مردان در معرض خطر بالاتری برای انتقال ناهنجاری‌های اپی ژنتیکی به نسل بعدی هستند. از سوی دیگر، نشان داده شده است که بین الگوهای متیلاسیون DNA و پارامترهای اسپرم از جمله مورفولوژی اسپرم، تعداد اسپرم، تحرک اسپرم، همچنین کروماتین اسپرم و یکپارچگی DNA همبستگی وجود دارد (۲۶، ۳۰).

هایپومتیلاسیون H19 در مناطق متیله متفاوت (DMRs) در مردان با کاهش تعداد اسپرم ناشناس گزارش شد. هوشداران و همکاران همچنین دریافت که هایپرمتیلاسیون PAX8، PLAG1، MEST، NTF3، DIRAS3، SFN، و HRAS در نواحی پروموتر با کاهش تعداد، تحرک و مورفولوژی طبیعی اسپرمها مرتبط است (۱۲). بنابراین، بهبود در درک ارتباط بین الگوهای متیلاسیون دی‌ان‌ای اسپرم مختل و تغییرات در پارامترهای اسپرم نه تنها برای یافتن عوامل مؤثر در ناباروری مردان، بلکه به دلیل نگرانی‌هایی که در رابطه با نتاج ARTها وجود دارد، مورد نیاز است (۱۳). شواهد انباشته نشان می‌دهد که متابولیسم فولات نقش موثری در سلامت باروری انسان و همچنین نتایج ART دارد (۸). ۵ و۱۰-متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) یک تنظیم کننده کلیدی متابولیسم فولات و هموسیستئین است که تبدیل ۱۰،۵ متیلن تتراهیدروفولات به ۵-متیل تتراهیدروفولات را کاتالیز می‌کند(۲٤). تغییرات در MTHFR که منجر به یک ژن غیرفعال می‌شود می تواند در عملکرد آن در باروری مردان اختلال ایجاد کند (۱۹، ۲۹). هیپرمتیلاسیون MTHFR در پروموتر باعث افزایش خطر ناباروری مردان می‌شود (۱٤). هایپرمتیلاسیون MTHFR در محل‌های پروموتر CpG در ۵۳ درصد از مردان مبتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی گزارش شده است، در حالی که در مردان مبتلا به آزواسپرمی انسدادی شناسایی نشده است (۱۷). متیلاسیون معیوب MTHFR همچنین ممکن است از طریق افزایش شاخص تراکم‌زدایی هسته اسپرم به عوارض اسپرم کمک کند (٦). بر اساس این داده‌ها مطالعه ما با هدف بررسی ارتباط بین هرگونه تغییر بالقوه در متیلاسیون DNA MTHFR-DMRs و ناهنجاری‌های پارامترهای اسپرم در زوج‌هایی که برای ناباروری مشاوره می‌کنند، انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها: تعداد ٤٥ نمونه مایع منی از افراد جمع‌آوری شد، این نمونه‌ها برحسب مشخصات میکروسکوپی اسپرم‌ها و بر اساس غلظت، مورفولوژی وحرکت در دو گروه مرد بارور نورموسپرمی (normospermia) (۱۵نمونه) و مرد نابارور (۳۰ نمونه) قرار گرفتند. افراد بیمار برای درمان با تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) به دلیل ناباروری تحت مشاوره بودند. شرکت کنندگان از مرکز ناباروری جهاد دانشگاهی کرمانشاه (کرمانشاه، ایران) انتخاب شدند. از کلیه

شرکت‌کنندگان رضایت آگاهانه و تاییدیه اخلاقی از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (IR.IAU.SRB.REC.1401.184) اخذ شد. معیارهای انتخاب به شرح زیر بود: عدم وجود جراحی واریکوسل، و عدم مصرف الکل (در ۳ ماه گذشته) یا سوء مصرف مواد.

جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل مایع سمن: نمونه‌ها پس از ۵ تا ۷ روز پرهیز جنسی گرفته شد. نمونه‌های جمع آوری شده بلافاصله در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از مایع سازی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه، مقدار کمی از نمونه برای آنالیز مایع منی استفاده شد. تعداد اسپرم، تحرک، غلظت، مورفولوژی و تحرک کل اسپرم بر اساس دستورالعمل WHO ارزیابی شد. پارامترهای اسپرم زمانی که تحرک کل اسپرم (پیشرونده + غیر پیشرونده) ≤ ٤٠ درصد، غلظت اسپرم ≤ ١٥ × ١٠٦ / ml و مورفولوژی طبیعی اسپرم ≤ ٤ درصد بود، طبیعی گزارش شد. بلوغ اسپرم و وضعیت کروماتین اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی آنیلین بلو (AB) همانطور که در مطالعه اخیر منتشر شده ما گزارش شده است، ارزیابی شد(۱).

استخراج DNA از اسپرم: پس از ذوب نمونه‌های اسپرم، DNA با استفاده از کیت اختصاصی،(کیت اسپرم آزما اکسیر پژوه،ساخت ایران) مطابق پروتکل شرکت سازنده استخراج شد. به طور خلاصه، نمونه‌ها ابتدا در g ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. PB و معرف فعال کننده به رسوب به دست آمده اضافه شد و در دمای ٦٥ درجه سانتیگراد به مدت ١٥ ساعت انکوباسیون انجام شد، سپس در دمای ٨٥ درجه سانتیگراد به مدت ١٠ دقیقه انکوبه شد. بافر VR اضافه شد و به مدت ١٥ دقیقه در g ١٢٠٠٠ سانتریفیوژ شد. بافر PE به فاز بالایی تشکیل شده اضافه شد و به مدت ٢ ساعت در دمای ٢٠- درجه سانتیگراد نگهداری شد. پس از سانتریفیوژ در g ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، بافر شستشو به پلت اضافه و دوباره سانتریفیوژ شد. غلظت DNA با استفاده ازروش اسپکتروفتومتر نانودراپ (Thermo Fischer Scientific, USA) با محاسبه نسبت OD 260/280 اندازه‌گیری شد. نمونه‌های DNA استخراج شده (با نسبت‌های ۲۸۰/۲٦۰ و در بازه ۱/۸-۱/۵) برای تیمار با بی سولفیت سدیم استفاده شد.

تیمار سدیم بی سولفیت و انجام واکنش متیلاسیون به روش Methylation Specefic PCR (MSP): میزان متیلاسیون ژن MTHFR توسط qMSP ارزیابی شد. ابتدا ۱ میکروگرم از نمونه DNA با بی سولفیت سدیم(کیت تیمار سدیم بی سولفیت شرکت آناسل ساخت ایران) طبق پروتکل سازنده تیمار شد. در این فرایند سیتوزین های غیرمتیله به یوراسیل تبدیل شدند و سیتوزین های متیله شده بدون تغییر باقی خواهند ماند(٣٤). تجزیه و تحلیل نمونه‌ها به طور مستقل توسط دو واکنش MS-PCR انجام شد. حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر بود که حاوی ۱۲/۵ میکرومولار مستر میکس ۲X PCR (شرکت سیناکلون، ساخت ایران)، ۰/۵ میکرومولار پرایمر-M (متیله) فوروارد و ۰/۵ میکرومولار پرایمر-M (متیله) معکوس در PCR متیله و ۰/۵ میکرومولار پرایمر-U (غیرمتیله) فوروارد. و ۰/۵ میکرومولار پرایمر-U(غیرمتیله) معکوس در PCR غیر متیله، و ۵۰ نانوگرم DNA تیمار شده با بی سولفیت برای هر واکنش استفاده شد(۳۵). توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. PCR شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ٤٠ سیکل ٤٠ ثانیه ای در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، به دنبال آن ٤٠ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد برای اتصال پرایمرها ٦٠ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه به عنوان بسط نهایی بود.

در نهایت قطعات تکثیر شده روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند.

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم‌افزار Stata (نسخه ۱۴/۱) (Stata Corp, College Station, TX, USA) انجام شد. همگنی و نرمال بودن توسط تست کولموگروف اسمیرنوف بررسی شد. برای مقایسه دو گروه از آزمونU Mann-Whitney استفاده شد. برای تحلیل همبستگی از تست همبستگی ناپارامتریک اسپیرمن استفاده شد. مقادیر $p < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱- توالی پرایمر های ژن MTHFR (16)

Table 1. Primers sequence of MTHFR gene

Gene	Sequence	Product length
Methylated	F: 5'-TAGATTTAGGTACGTGAAGTAGGGTAGAC-3' R: 5'-GAAAAACTAATAAAAAACCGACGAA-3'	186
Unmethylated	F: 5'-TTTAGGTATGTGAAGTAGGGTAGATGT-3' R: 5'-CAAAAAACTAA TAAAAAACCAACAAA-3'	178

نتایج

نتایج نشان داد که میانگین سنی شرکت‌کنندگان در گروه بارور ۴/۱۸±۳۸/۲۴ سال و در گروه نابارور ۴/۸۱±۳۶/۹۷ سال می‌باشد که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت. نتایج نشان داد، بین میانگین تعداد و غلظت اسپرم، مورفولوژی در گروه نابارور و گروه بارور تفاوت معناداری وجود دارد. از طرفی بین میانگین درصد تحرک، تحرک پیشرونده و ناهنجاری های انتقال هیستون در گروه نابارور و گروه بارور تفاوت معناداری وجود ندارد (جدول ۲). نتایج نشان می‌دهد که میانگین درصد متیلاسیون MTHFR در گروه ناباور به طور قابل توجهی بیشتر از گروه بارور بود (۰/۰۳۶ > P) (جدول۳). همچنین همبستگی منفی بین متیلاسیون MTHFR با تعداد اسپرم، غلظت اسپرم و مورفولوژی در گروه نابارور وجود دارد. اما رابطه ی معناداری بین متیلاسیون MTHFR با تحرک اسپرم تحرک پیشرونده و ناهنجاری جایگزینی هیستونی وجود ندارد. همچنین، همبستگی معناداری بین متیلاسیون MTHFR با پارامترهای اسپرمی در گروه بارور مشاهده نشد.

جدول۲ – مقایسه پارامترهای اسـپرمی در گروه‌های مورد مطالعه

Table 2. Comparing sperm parameters in studied groups

Variable	Fertile	Infertile	p
Count of sperm (10^6 cells per ejaculate)	144.18 ±23.44	105 ± 44.52	0.30
Sperm Concentration (10^6 cells/mL)	56.85 ±10.18	28.36 ± 8.35	0.0001
Total Motility (%)	54.64 ±8.86	27.50 ± 4.27	0.0001
Progressive (%)	32.53 ± 1.24	9.53 ± 4.72	0.0001
Morphology (%normal)	4.73± ۰0.45	1.30 ± 0.25	0.0001
Histone transition abnormality (%)	0.07 ±0.04	0.96 ± 0.03	0.068

جدول ۳- وضعیت متیلاسیون ژن MTHFR در گروه‌های مورد مطالعه

Table 3. The methylation status of MTHFR gene in studied groups

Variable	Fertile	Infertile	p
Methylation percent	0.62 ± 0.07	9.49 ± 3.32	0.036

جدول٤- بررسی ارتباط بین متیلاسیون ژن MTHFR با پارامترهای اسپرمی در افراد بارور و نابارور

Table 4. Investigating the relationship between MTHFR gene methylation and sperm parameters in fertile and infertile people

Variable	Total		Fertile		Infertile	
	r	P	r	P	r	P
Count of sperm (10^6 cells per ejaculate)	-0.451	0.002	-0.070	0.805	-0.430	0.018
Sperm Concentration (10^6 cells/mL)	0.434	0.003	0.009	0.975	-0.382	0.037
Total Motility (%)	-0.154	314	0.009	0.975	0.185	0.327
Progressive (%)	-0.384	0.019	0.426	0.113	-0.300	0.108
Morphology (%normal)	0.440	0.003	-٠0.244	0.380	-0.416	0.022
Histone transition abnormality (%)	0.051	740	-٠0.090	0.749	0.038	0.841

بحث

ژنتیک مولکولی، ناهنجاری‌های RNA، پروتئین و تغییرات اپی‌ژنتیکی در ناباروری مردان نقش دارند(۲۳). متیلاسیون DNA نقش کلیدی در تنظیم ژن و مدل سازی ساختار کروماتین در طی اسپرماتوژنز دارد(۲۸). علاوه بر این، به نظر می‌رسد متیلاسیون DNA عاملی مرتبط با پارامترهای مایع منی باشد (۲۷). هایپرمتیلاسیون ژن‌های MTHFR، GTL2، NTF3، PAX8، SFN، JHM2DA، PLAG1، H19، IGF2، RASGRF1، D1RAS3، MEST، HRAS، SNRPN، KCNQ1 و LIT1 در نواحی پروموتر با پارامترهای ضعیف منی همراه بوده است (۲۵). با توجه به اهمیت این موضوع، متیلاسیون منطقه MTHFR-DMRs در نمونه‌های اسپرم مردان سالم و نابارور را با هدف ارتباط بین متیلاسیون نابه‌جا ژن‌های imprinting و non imprinting و ناهنجاری‌های مرتبط با کیفیت اسپرم مورد مطالعه قرار دادیم. نقش‌پذیری ژنومی بیان تک آللی والد منشاء را نشان می‌دهند که توسط DMR ها کنترل می‌شود (۲۵). بنابراین، مطالعه DMR ها می‌تواند تا حد زیادی به درک ما از اهمیت نقش آفرینی تنظیم باروری کمک کند. El Hajj و همکاران وضعیت متیلاسیون مادری H19 و GTL2، همچنین مادری ژن‌های NESPAS، LIT1، PEG3، SNRPN، و MEST را در ۱٤۱ نمونه مایع منی که کاندیدای ART بودند، مطالعه کرد. ارتباط معنی‌داری بین خطاهای متیلاسیون در ژن‌ها و پارامترهای غیرطبیعی مایع منی مشاهده شد، اما تأثیری بر نتایج ART پیدا نشد (۷). در مطالعه دیگری که بر روی اسپرم ۱۱۹ مرد نرموزواسپرم و ۱۷۵ مرد الیگوزواسپرمی که ناباروری آنها تایید شده بود، انجام شد، تغییرات متیلاسیون در DMR ژن PEG1/MEST و H19-DMR در الیگوزواسپرمی مشاهده شد. با این حال، هیچ ارتباطی

بین میزان بارداری از طریق ART و پروفایل های متیلاسیون تغییر یافته یافت نشد (۲۰). مشابه مطالعه ما، هایپرمتیلاسیون پروموتر MTHFR در اسپرم در ارتباط با ناباروری مردان گزارش شد. در یک مطالعه که بر روی ۷۳ مرد اولیگوزواسپرم و ۷۸ مرد بارور انجام شد، نتایج به‌دست‌آمده از MSP، متیلاسیون پروموتر جزایرCpG در ژن MTHFR را در الیگوزواسپرمی نشان داد. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل سیلیکو نشان داد که پروموتر این ژن حاوی ۱۴ محل اتصال به فاکتور رونویسی، یک ناحیه حذف نوکلئوزوم و یک CGI bonafide است که مستقیماً در اسپرم‌زایی نقش دارند (۲۷). هایپرمتیلاسیون پروموتر ژن MTHFR در اسپرم ۴۰ مرد نابارور ایدیوپاتیک با پیروسکوئنسینگ (Pyrosequencing) ارزیابی شد. سطح متیلاسیون در مردان نابارور به طور قابل توجهی بالاتر از کنترل سالم نرموزواسپرم بود. این نتایج نشان می‌دهد که هایپرمتیلاسیون ژن MTHFR منجر به افزایش خطر ناباروری مردان می‌شود. در مطالعه دیگری، هایپرمتیلاسیون پروموتر MTHFR در بیوپسی بیضه تایید شد. گزارش شد که ۵۳ درصد از مردان مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی در پروموتر MTHFR هایپرمتیله شدند، در حالی که هیچ یک از مردان مبتلا به آزواسپرمی انسدادی هایپرمتیلاسیون را نشان ندادند (۱۴). این نشان می‌دهد که خاموش شدن ژن MTHFR می تواند در ناباروری مردان نقش داشته باشد (۱۶). کمی‌سازی متیلاسیون پروموترهای MTHFR و SNRPN توسط روش qMSP در مردان نابارور، ارتباط هایپرمتیلاسیون آنها را با تحرک کم و مورفولوژی ضعیف اسپرم نشان داد (۳). الگوهای متیلاسیون MTHFR در پروموتر در اسپرم ۹۴ مرد نابارور ایدیوپاتیک با نورموزواسپرمی و الیگوزواسپرمی با استفاده از MSP و توالی یابی بی سولفیت بررسی شد. ۴۵ درصد از مردان نابارور هایپرمتیلاسیون MTHFR در مقایسه با ۱۵ درصد از گروه شاهد بارور داشتند. سطح متیلاسیون بالاتری در الیگوزواسپرمی در مقایسه با مردان نرموزواسپرم مشاهده شد (۳۳). در مطالعه حاضر، ارتباط بین وضعیت متیلاسیون MTHFR-DMRs در اسپرم مردان نابارور و پارامترهای کیفیت مایع منی تجزیه و تحلیل شد. ناباروری مردان با پارامترهای مایع منی، مانند تعداد کل اسپرم، حجم مایع منی، درصد اسپرم‌ها با مورفولوژی طبیعی، و حرکت پیشرونده به سمت جلو مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برخی از مطالعات ارتباط بین این پارامترها و وضعیت متیلاسیون DNA اسپرم را نشان دادند.Hammoud و همکاران متیلاسیون DNA SNRPN، MEST، LIT1، PLAGL1، PEG3 و H19 را در سایت‌های CpG در مردان مبتلا به کمبود پروتامین در کروماتین‌های غیرطبیعی و الیگوزواسپرمی ارزیابی کرد. متیلاسیون DNA اسپرم‌ها به طور قابل توجهی برای همه ژن‌ها در بیماران نابارور تغییر یافت. علاوه بر این، ارتباط معنی‌داری بین هایپرمتیلاسیون این ژن‌ها و اسپرماتوژنز غیرطبیعی مشاهده شد (۱۱). Boissonnas و همکاران دریافتند که IGF2-H19 در مردان مبتلا به الیگوآستنوتراتوزواسپرمی و تراتوزواسپرمی به طور قابل توجهی هیپومتیله شده است و این متیلاسیون DNA تغییر یافته با افزایش شدت بیماری مرتبط است. آنها همچنین ارتباط بین متیلاسیون و غلظت اسپرم را در بیماران گزارش کردند (۲). تجزیه و تحلیل متیلاسیون با استفاده از متیلاسیون EPIC Infinium در نمونه‌های مایع منی با شاخص‌های قطعه قطعه شدن DNA (DNA fragmentation index) مختلف انجام شد. در ۲۶۶ نمونه، ۶۶ منطقه DMR در ژن‌های MEST، BLCAP، TSPAN32، PSMA8، DIRAS3، GNAS، FAM50B، TEX12 و SYCP1 مورد بررسی قرار

گرفت و متیلاسیون نابجای قابل‌توجهی در آنهایی که قطعه قطعه شدن DNA بالایی داشتند نشان داد (۳۶). در مطالعه‌ای متیلاسیون ژن‌های H19، DAZL، SNRPN، MTHFR، CREM و GSTM1 و یکپارچگی DNA اسپرم‌ها در ۸۶ نورموسپرمی و ۸۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت.تفاوت متیلاسیون در پروموترهای ژن‌ها شناسایی شد و همچنین با اختلال در یکپارچگی DNA اسپرم ارتباط داشتند (۳۰). این نتایج نشان می‌دهد که الگوهای متیلاسیون DNA و کیفیت اسپرم باید به عنوان دو عامل مرتبط در نظر گرفته شوند. برخی از مطالعات نشان داده اند که پلی-مورفیسم MTHFR، عمدتا C677T، با ناباروری مردان مرتبط است. یک مطالعه C677T SNP را با توجه به متیلاسیون DNA اسپرم در DMRهای ژن‌های ایمپرنتینگ در مردان نابارور و سالم ارزیابی کرد و تفاوت قابل توجهی در وضعیت متیلاسیون DNA بین ژنوتیپ‌ها پیدا نکرد (٤).

نتیجه‌گیری

عدم موفقیت آزمایش‌های ART منجر به هزینه‌های زیادی برای زوجین نابارور چه از نظر مالی چه از نظر روانی می‌شود، بنابراین بررسی دلایل اساسی عدم موفقیت در این مسیر می‌تواند برای حمایت از متخصصان این حوزه در راستای بهبود نتایج بسیار مهم باشد. در مطالعات زیادی در مورد امکان تأثیر متیلاسیون ژن MTHFR در ناباروری مردانه و زنانه صحبت شده است، در همین راستا، نتایج ما نشان داد ارتباط معنی‌داری بین متیلاسیون گروه نابارور با گروه بارور وجود دارد و یک همبستگی منفی بین متیلاسیون MTHFR با فاکتورهای تعداد اسپرم، غلظت اسپرم و مورفولوژی در گروه نابارور وجود دارد.

منابع

1. Amjadian T., Yaghmaei P., Nasim H.R. Yari K. 2023. Impact of DNA methylation of the human mesoderm-specific transcript (MEST) on male infertility. *Heliyon*, 9(10): e21099.

2. Boissonnas C.C., Abdalaoui H.E., Haelewyn V., Fauque P., Dupont J.M., Gut I., Vaiman D., Jouannet P., Tost J. Jammes H. 2010. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *European Journal of Human Genetics*, 18(1):73-80.

3. Botezatu A., Socolov R., Socolov D., Iancu I.V. Anton G. 2014. Methylation pattern of methylene tetrahydrofolate reductase and small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N promoters in oligoasthenospermia: a case-control study. *Reproductive BioMedicine Online*, 28(2):225-231.

4. Camprubí C., Pladevall M., Grossmann M., Garrido N., Pons M.C. Blanco J. 2013. Lack of association of MTHFR rs1801133 polymorphism and CTCFL mutations with sperm methylation errors in infertile patients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(9):1125-1131.

5. Cannarella R., Crafa A., Mongioì L.M., Leggio L., Iraci N., La Vignera S., Condorelli R.A. Calogero A.E. 2022. DNA Methylation in Offspring Conceived after Assisted Reproductive Techniques: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Clinical Medicine*, 11(17):5056-5068.

6. Cornet D., Cohen M., Clement A., Amar E., Fournols L., Clement P., Neveux P. Ménézo Y. 2017. Association between the MTHFR-C677T isoform and structure of sperm DNA. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 34(10):1283-1288.

7. El Hajj N., Zechner U., Schneider E., Tresch A., Gromoll J., Hahn T., Schorsch M. Haaf T. 2011. Methylation status of imprinted genes and repetitive elements in

sperm DNA from infertile males. *Sexual Development,* 5(2):60-69.

8. Gernand A.D., Schulze K.J., Stewart C.P., West K.P., Jr. Christian P. 2016. Micronutrient deficiencies in pregnancy worldwide: health effects and prevention. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(5):274-289.

9. Ghasemi H., Mozaffari H.R., Kohsari M., Hatami M., Yari K. Marabi M.H. 2023. Association of interleukin-8 polymorphism (+ 781 C/T) with the risk of oral Lichen Planus disease. *BMC Oral Health*, 23(1): 404-411.

10. Haberg S.E., Page C.M., Lee Y., Nustad H.E., Magnus M.C., Haftorn K.L., Carlsen E., Denault W.R.P., Bohlin J., Jugessur A., Magnus P., Gjessing H.K. Lyle R. 2022. DNA methylation in newborns conceived by assisted reproductive technology. *Nature Communications,* 13(1):1896-1908.

11. Hammoud S.S., Nix D.A., Hammoud A.O., Gibson M., Cairns B.R. Carrell D.T. 2011. Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Human Reproduction*, 26(9):2558-2569.

12. Houshdaran S., Cortessis V.K., Siegmund K., Yang A., Laird P.W. Sokol R.Z. 2007. Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PLoS One*, 2(12): e1289.

13. James E. Jenkins T.G. 2018. Epigenetics, infertility, and cancer: future directions. *Fertility and Sterility*, 109(1): 27-32.

14. Karaca M.Z., Konac E., Yurteri B., Bozdag G., Sogutdelen E. Bilen C.Y. 2017. Association between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene promoter hypermethylation and the risk of idiopathic male infertility. *Andrologia*, 49(7):e12698.

15. Khambata K., Raut S., Deshpande S., Mohan S., Sonawane S., Gaonkar R., Ansari Z., Datar M., Bansal V., Patil A., Warke H. Balasinor N.H. 2021. DNA methylation defects in spermatozoa of male partners from couples experiencing recurrent pregnancy loss. *Human Reproduction,* 36(1):48-60.

16. Khazamipour N., Noruzinia M., Fatehmanesh P., Keyhanee M. Pujol P. 2009. MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility. *Human Reproduction*, 24(9):2361-2364.

17. Kobayashi H., Hiura H., John R.M., Sato A., Otsu E., Kobayashi N., Suzuki R., Suzuki F., Hayashi C., Utsunomiya T., Yaegashi N. Arima T. 2009. DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *European Journal of Human Genetics*, 17(12):1582-1591.

18. Kushnir V.A., Barad D.H., Albertini D.F., Darmon S.K. Gleicher N. 2017. Systematic review of worldwide trends in assisted reproductive technology 2004-2013. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 15(1):6-17.

19. Liu K., Zhao R., Shen M., Ye J., Li X., Huang Y., Hua L., Wang Z. Li J. 2015. Role of genetic mutations in folate-related enzyme genes on Male Infertility. *Scientific Reports*, 5:15548-15561.

20. Montjean D., Ravel C., Benkhalifa M., Cohen-Bacrie P., Berthaut I., Bashamboo A. McElreavey K. 2013. Methylation changes in mature sperm deoxyribonucleic acid from oligozoospermic men: assessment of genetic variants and assisted reproductive technology outcome. *Fertility and Sterility,* 100(5):1241-1247.

21. Montjean D., Zini A., Ravel C., Belloc S., Dalleac A., Copin H., Boyer P., McElreavey K. Benkhalifa M. 2015. Sperm global DNA methylation level: association with semen parameters and genome integrity. *Andrology*, 3(2): 235-240.

22. Njagi P., Groot W., Arsenijevic J., Dyer S., Mburu G. Kiarie J. 2023. Financial costs of assisted reproductive technology for patients in low- and middle-income countries: a systematic review. *Human Reproduction Open*, 2023(2): hoad007.

23. Pisarska M.D., Chan J.L., Lawrenson K., Gonzalez T.L. Wang E.T. 2019. Genetics and Epigenetics of Infertility and Treatments on Outcomes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 104(6): 1871-1886.

24. Rahimi Z., Bozorgi M., Rahimi Z., Shakiba E., Yari K., Jalilian N. Vaisi-Raygani A. 2019. MTHFR C677T polymorphism is associated with the risk of breast cancer among Kurdish population from western Iran. *International Journal of Cancer Management*, 12(3).

25. Rajender S., Avery K. Agarwal A. 2011. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation Research*, 727(3):62-71.

26. Rajender S., Avery K. Agarwal A. 2011. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation Research*, 727(3):62-71.

27. Rezaeian A., Karimian M. Hossienzadeh Colagar A. 2021. Methylation Status of MTHFR Promoter and Oligozoospermia Risk: An Epigenetic Study and in Silico Analysis. *Cell Journal*, 22(4): 482-490.

28. Rotondo J.C., Lanzillotti C., Mazziotta C., Tognon M. Martini F. 2021. Epigenetics of Male Infertility: The Role of DNA Methylation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9:689624.

29. Shahrokhi S.Z., Kazerouni F., Ghaffari F., Hadizadeh M. Zolfaghary Z. 2021. The effect of A1298c polymorphism of the MTHFR gene on anti-Müllerian hormone levels: experimental and Web-based analysis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 35(9):e23948.

30. Song B., Wang C., Chen Y., Li G., Gao Y., Zhu F., Wu H., Lv M., Zhou P., Wei Z., He X. Cao Y. 2021. Sperm DNA integrity status is associated with DNA methylation signatures of imprinted genes and non-imprinted genes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(8):2041-2048.

31. Tahmasbpour Marzouni E., Ilkhani H., Beigi Harchegani A., Shafaghatian H., Layali I. Shahriary A. 2022. Epigenetic Modifications, A New Approach to Male Infertility Etiology: A Review. *International Journal of Fertility and Sterility*, 16(1):1-9.

32. Vermeiden J.P. Bernardus R.E. 2013. Are imprinting disorders more prevalent after human in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection? *Fertility and Sterility*, 99(3):642-651.

33. Wu W., Shen O., Qin Y., Niu X., Lu C., Xia Y., Song L., Wang S. Wang X. 2010. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant promoter methylation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *PLoS One*, 5(11): e13884.

34. Yari K., Payandeh M. Rahimi Z. 2016. Association of the hypermethylation status of PTEN tumor suppressor gene with the risk of breast cancer among Kurdish population from Western Iran. *Tumour Biology*, 37(6): 8145-8152.

35. Yari K. Rahimi Z. 2019. Promoter Methylation Status of the Retinoic Acid Receptor-Beta 2 Gene in Breast Cancer Patients: A Case Control Study and Systematic Review. *Breast Care (Basel)*, 14(2):117-123.

36. Zhu W., Jiang L., Pan C., Sun J., Huang X. Ni W. 2021. Deoxyribonucleic acid methylation signatures in sperm deoxyribonucleic acid fragmentation. *Fertility and Sterility*, 116(5):1297-1307.