

**Research Article**

## **Association of DNA Methylation of *GTL2* with Semen Parameters**

**Fouzieh Karami Hezarcheshmeh<sup>1</sup>, Parichehreh Yaghmaei<sup>1</sup>, Nasim Hayati Roodbari<sup>1</sup>, Kheirollah Yari<sup>2\*</sup>**

1-Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2-Medical Biology Research Center, Health Technology Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

\*Corresponding author Email: khirollah.yari@yahoo.com & kyari@kums.ac.ir

Received: 14 August 2024

Accepted: 29 September 2024

DOI:

### **Abstract**

Male infertility is a complex multifactorial problem that affects approximately 7% of men and 15% of couples worldwide with multifactorial pathology such as environmental, genetic, and epigenetic factors. In general, abnormal methylation of imprinted genes in sperm DNA is associated with poor semen parameters. In this study, the DNA methylation status of the imprinting Gene trap locus 2 (*GTL2*) gene at differentially methylated regions (DMRs) was assessed in the semen samples of infertile men. Sperm DNA was extracted from 30 infertile, and 15 healthy fertile men. Following the modification of DNA by sodium bisulfite treatment the methylation status of the *GTL2* gene at MDRs was evaluated by qMS-PCR. A negative correlation between *GTL2* methylation and sperm count ( $p = 0.020$ ;  $p = -0.345$ ) and sperm concentration ( $r = -0.361$ ;  $p = 0.015$ ) was observed in all patients. Taken together, the abnormal DNA methylation status of *GTL2*-DMRs may be an epigenetic diagnostic marker of male infertility. Further research is needed to pursue other mechanisms affecting methylation in semen samples and their impact on human infertility.

**Keywords:** DNA methylation, Sperm, Male infertility, *GTL2*.

ارتباط متیلاسیون ژن *GTL2* با پارامترهای اسپرمی انسانفوزیه کرمی هزارچشمه<sup>۱</sup>، پریچهره یغمایی<sup>۱</sup>، نسیم حیاتی رودباری<sup>۱</sup>، خیراله یاری<sup>۲\*</sup>

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، پژوهشکده فناوری‌های سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

\*مسئول مکاتبات: khirollah.yari@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۴

DOI:

## چکیده

ناباروری مردان یک مشکل پیچیده چندعاملی است که حدود ۷ درصد از مردان و ۱۵ درصد از زوج‌ها را در سراسر جهان با آسیب‌شناسی چند عاملی مانند عوامل محیطی، ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی تحت تأثیر قرار می‌دهد. به طور کلی، متیلاسیون غیرطبیعی ژن‌های *imprinted* در DNA اسپرم با پارامترهای ضعیف مایع منی مرتبط است. در این مطالعه، وضعیت متیلاسیون DNA ژن *imprinting (GTL2)* در مناطق متیله متفاوت (DMRs) در نمونه‌های مایع منی مردان نابارور بررسی شد. DNA اسپرم از ۳۰ مرد نابارور و ۱۵ مرد بارور سالم استخراج شد. به دنبال اصلاح DNA ها توسط تیمار بی سولفیت سدیم، وضعیت متیلاسیون ژن *GTL2* در MDRs توسط qMS-PCR ارزیابی شد. یک همبستگی منفی بین متیلاسیون *GTL2* با تعداد اسپرم ( $p = 0.020$ ) و غلظت اسپرم ( $p = -0.045$ ) و همبستگی مثبت بین *GTL2* و غلظت اسپرم ( $r = -0.361$ ;  $p = 0.015$ ) همه بیماران مشاهده شد. در مجموع، وضعیت متیلاسیون DNA غیرطبیعی *GTL2*-DMRs ممکن است نشانگر تشخیصی اپی‌ژنتیکی ناباروری مردان باشد. تحقیقات بیشتری برای دنبال کردن مکانیسم‌های دیگر مؤثر بر متیلاسیون در نمونه‌های مایع منی و تأثیر آنها بر ناباروری انسان مورد نیاز است.

کلمات کلیدی: متیلاسیون، ناباروری مردان، DNA اسپرم، ژن *GTL2*.

## مقدمه

توجه زیادی بر روی تغییرات اپی‌ژنتیکی به عنوان یک عامل مهم در ناباروری صورت گرفته است. تغییرات اپی‌ژنتیکی می‌تواند بیان ژن‌های متعددی را که در تشکیل سیستم تناسلی مرد، لقاح، توسعه/تمایز اسپرم و رشد جنین دخیل هستند، تحت تأثیر قرار دهد (۳، ۱۰). در زمینه تولید مثل، اصلاح اپی‌ژنتیکی که بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته، متیلاسیون DNA است که نقش کلیدی در نقش‌پذیری ژنومی دارد (۱۹). در همین حال، الگوهای نابجای متیلاسیون DNA ژن‌های *imprinted* و *non imprinting* در

ناباروری مردان یک مشکل پیچیده چندعاملی است که حدود ۷ درصد از مردان و ۱۵ درصد از زوج‌ها را در سراسر جهان با آسیب‌شناسی چند عاملی مانند عوامل محیطی، ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی تحت تأثیر قرار می‌دهد (۵). تشخیص ناباروری مردان بر اساس تجزیه و تحلیل مایع منی یک رویکرد سریع و نسبتاً کم هزینه است. اما اغلب نمی‌تواند دلایل ناباروری را روشن کند یا برای پیش‌بینی اثربخشی درمانی به کار رود (۱۲). بنابراین، اقدامات جدیدی برای یافتن علت ناباروری مردان مورد نیاز است. در مطالعات اخیر،

کلیه آزمودنی‌ها قبل از ثبت نام در پژوهش رضایت کتبی و آگاهانه اخذ شد. افراد با سابقه واریکوسل، انسداد مجرای دفران، ناهنجاری‌های کروموزومی، بیماری‌های مزمن (دیابت، سرطان و غیره)، استعمال زیاد دخانیات، مصرف الکل یا سوء مصرف مواد از مطالعه حذف شدند. ۴۵ مرد وارد مطالعه شدند: ۱۵ نفر شاهد و ۳۰ بیمار نابارور. شرکت‌کنندگان از بین افرادی که برای ICSI با عامل ناباروری مردانه به مرکز ناباروری جهاد دانشگاهی کرمانشاه (کرمانشاه، ایران) مراجعه کرده بودند، انتخاب شدند. گروه شاهد از بین مردان سالمی انتخاب شدند که حداقل یک فرزند بدون استفاده از روش‌های کمک باروری به دنیا آورده بودند.

**جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل مایع منی:** نمونه منی پس از ۷ روز پرهیز جنسی در یک ظرف جمع‌آوری پلی پروپیلن استریل جمع‌آوری شد. نمونه‌ها تا زمان انجام آنالیز در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از انتقال به آزمایشگاه، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مایع شده و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پارامترهای اسپرم شامل تعداد، غلظت، تحرک، حرکت پیشرونده رو به جلو، و مورفولوژی بر اساس دستورالعمل‌های سازمان بهداشت جهانی ارزیابی شد (۳). یک نمونه مایع منی به شرط داشتن معیارهای زیر طبیعی در نظر گرفته شد: تعداد  $\leq 15$  میلیون در میلی‌لیتر، تحرک  $\leq 40$  درصد و مورفولوژی  $\leq 4$  درصد (۳). مورفولوژی و بلوغ هسته ای اسپرم‌ها با رنگ آمیزی آنیلین بلو ارزیابی شد. برای انجام رنگ‌آمیزی، لام‌های اسپرم خشک شده در فرمالدئید ۴ درصد در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت شدند و با محلول آبی ۵ درصد آنیلین بلو تیمار شدند. سلول‌های آبی تیره و سلول‌های آبی کم رنگ یا رنگ‌پریده به ترتیب

کیفیت اسپرم با ناباروری، پارامترهای ضعیف مایع منی و احتمال افزایش یافتن بیماری‌های مادرزادی در کودکانی که از طریق فناوری‌های کمک باروری متولد شده‌اند، مرتبط است (۹، ۱۴، ۱۷). بیشتر ژن‌های *imprinted* شناخته شده توسط نواحی متیله متفاوت (DMRs) تنظیم می‌شوند که متیلاسیون متفاوتی را در سایت‌های CpG در یکی از آلل‌ها نشان می‌دهند (۱۶). جایگاه لوکوس ژنی *Dlk1-Meg3* در موقعیت *14q32.2* قرار دارد و شامل: ژن *Dlk1* بیان شده توسط آلل پدری و ژن بیان شده توسط آلل مادری (*Meg3* همچنین به عنوان ژن *GTL2* شناخته می‌شود) می‌باشد. این لوکوس توسط مناطق بین ژنی و بالادستی *IG-DMR* و *MEG3-DMR* کنترل می‌شود (۶). در غیر این صورت، ارتباط بین پارامترهای ضعیف مایع منی و الگوهای متیلاسیون DNA تغییر یافته ژن‌های *imprinted* مشاهده شد (۱۶، ۲۱). کاهش متیلاسیون *H19 DMR* بیان شده توسط پدر در اسپرم مردان با کاهش تعداد اسپرم گزارش شد. و هیپومتیلاسیون در این مکان با سندرم سیلور-راسل مرتبط است (۱۱). مطالعات روی پانل بزرگ‌تری از ژن‌ها، هیپرمتیلاسیون در ژن‌های *imprinted* توسط پدر در بیماران نابارور تایید کرد (۱۳، ۱۹). بنابراین، در این مطالعه، هدف ما بررسی وضعیت متیلاسیون *GTL2-DMR* در مردان نابارور مبتلا به آستنوسپرمی و الیگواسنتوتراتاسپرمی، همچنین ارتباط بین متیلاسیون *GTL2* و پارامترهای منی بود. این نتایج یک رویکرد جدیدی را در مورد ناباروری مردان ارائه می‌دهد.

#### مواد و روش‌ها

**نمونه‌ها:** این مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (IR.IAU.SRB.REC.1401.183.) قرار گرفت و از

های DNA ژنومی اصلاح نشده برای بررسی ویژگی پرایمر استفاده شد. روش PCR در شرایط زیر انجام شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۴۰ سیکل ۴۰ ثانیه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای اتصال پرایمر، ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مرحله بسط نهایی. در نهایت قطعات تکثیر شده روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند. **تجزیه و تحلیل آماری:** متغیرهای کمی به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SD) توصیف شدند. همگنی و نرمال بودن توسط کولموگروف سیمونوف بررسی شد. برای مقایسه میانگین‌ها برای بیش از دو گروه، آزمون کروسکال-والیس و آزمون مقایسه‌های چندگانه دان انجام شد. برای تحلیل همبستگی از همبستگی ناپارامتریک اسپیرمن استفاده شد. مقدار احتمال (*p-value*) کمتر از ۰/۰۵ به معنی‌دار تعریف شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار Stata (نسخه ۱۴.۱) (Stata corp, college station, TX, USA) استفاده شد

اسپرم‌های غیرطبیعی (کروماتین هسته‌ای نابالغ) و طبیعی (هسته‌های بالغ) در نظر گرفته شدند. حداقل ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید زیر میکروسکوپ میدان دید روشن با بزرگنمایی  $\times 100$  ارزیابی شد. **استخراج DNA، تیمار بی‌سولفیت، و PCR کمی ویژه متیلاسیون:** جداسازی DNA ژنومی از اسپرم با استفاده از کیت اسپرم (آزما اکسیر پژوه، ایران) طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد. برای ارزیابی غلظت و خلوص DNA بدست آمده از اسپکتروفوتومتر نانودراپ (Thermo Fisher Scientific, USA) استفاده شد. نمونه‌های DNA خالص (با نسبت ۲۶۰/۲۸۰ از ۱/۶-۱/۸) برای اصلاح بی‌سولفیت در نظر گرفته شد. ۱ میکروگرم نمونه DNA با بی‌سولفیت سدیم (کیت تیمار سدیم بی‌سولفیت شرکت آناسل، ایران) طبق پروتکل سازنده تیمار شد. در این فرآیند سیتوزین‌های غیر متیله به یوراسیل تبدیل شدند، درحالی‌که سیتوزین‌های متیله شده، بدون تغییر باقی خواهند ماند. ۵۰ نانوگرم از DNA تیمار شده با بی‌سولفیت سدیم توسط qMS-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی DMRهای ژن GTL2 تکثیر شد (جدول ۱). نمونه

جدول ۱- توالی پرایمر های ژن GTL2

Table 1. Primers sequence of GTL2 gene

Gene	Sequence
Methylated	F: 5'-GTTAGTAATCGGGTTTGTTCGGC-3' R: 5'-AATCATAACTCCGAACACCCGCG-3'
Unmethylated	F: 5'-GAGGATGGTTAGTTATTGGGGT-3' R: 5'-CCACCATAACCAACACCCTATAATCACA-3'

## نتایج

نشان داده شده است، میانگین درصد تعداد و غلظت اسپرم در الیگواستنوتراوسپرمی به طور قابل توجهی کمتر از آستنوسپرمی و نورموسپرمی بود. همچنین، میانگین درصد تحرک، پیشرفت و مورفولوژی کل در

میانگین سنی شرکت کنندگان، در نورموسپرمی ۴/۱۸  $\pm$  ۳۸/۲۴، در آستنوسپرمی ۴/۸۱  $\pm$  ۳۶/۷۸ و در الیگواستنوتراوسپرمی ۳۷/۱۷  $\pm$  ۵/۴۶ که تفاوت معنی داری از نظر آماری نداشت. همانطور که در جدول ۲

نرموسپرمی به طور قابل توجهی بیشتر از الیگوآستنوتراتوسپرمی و آستنوسپرمی بود و در آستنوسپرمی نسبت به اولیگوآستنوتراتوسپرمی به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر بود ( $p < 0/05$ ). میانگین درصد ناهنجاری‌های جایگزینی هیستون در الیگوآستنوتراتوسپرمی به طور قابل توجهی بیشتر از آستنوسپرمی بود (جدول ۲). جدول ۳ همبستگی منفی بین متیلاسیون GTL2 با تعداد اسپرم منفی وجود داشت ( $r = -0/536$ ;  $p = 0/039$ ).

جدول ۲ - مقایسه پارامترهای اسپرمی در گروه‌های مورد مطالعه

Table 2. Comparison of sperm parameters in the study groups

Sperm parameters	Normozoospermia (n=15)	Asthenospermia (n=15)	Oligoasthenoteratospermia (n=15)	P
Sperm Count ( $10^6$ cells per ejaculate)	144.18±53.44	180.73±84.52	29.26±16.84	0.001
Sperm Concentration ( $10^6$ cells/mL)	56.85±15.18	47.66±16.35	9.06±4.78	0.001
Total Motility (%)	54.64±8.86	33.40±4.27	21.60±11.31	0.001
Progressive (%)	32.53±1.24	13.93±4.72	5.13±3.92	0.001
Morphology (%normal)	4.73±0.45	2.06±0.25	0.53±0.51	0.001
Histone transition abnormality (%)	0.07±0.04	0.07±0.03	0.12±0.05	0.002

جدول ۳- بررسی ارتباط بین متیلاسیون ژن GTL2 با پارامترهای اسپرمی در گروه‌های مورد مطالعه

Table 3. Study of the relationship between GTL2 gene methylation and sperm parameters in the study groups

Sperm parameters	All patients		Normozoospermia		Asthenospermia		Oligoasthenoteratospermia	
	r	P	r	P	r	P	r	P
Sperm Count ( $10^6$ cells per ejaculate)	-0.345	0.020	-0.281	0.311	-0.267	0.335	-0.448	0.094
Sperm Concentration ( $10^6$ cells/mL)	-0.361	0.015	0.007	0.980	-0.536	0.039	-0.376	0.167
Total Motility (%)	-0.061	0.689	0.168	0.549	-0.087	0.759	0.600	0.018
Progressive (%)	-0.101	0.510	0.303	0.273	0.188	0.503	0.239	0.391
Morphology (%normal)	-0.280	0.062	-0.349	0.202	-0.186	0.507	-0.046	0.869
Histone transition abnormality (%)	0.123	0.421	-0.14	0.415	-0.065	0.819	-0.364	0.182

## بحث

شیوع بیماری‌های دستگاه تناسلی مردان در سراسر جهان در حال افزایش است. درک بیشتر تغییرات اپی-ژنتیک و فناوری‌های کمک باروری می‌تواند به بهبود ناباروری کمک کند. در تغییرات اپی‌ژنتیکی، مقدار فزاینده‌ای از داده‌ها وجود دارد که نقش متیلاسیون افتراقی را در اختلال در اسپرم‌زایی و اختلال عملکرد تولیدمثل مردانه ایفا می‌کند. یک یافته دقیق از وضعیت

متیلاسیون DNA اسپرم در ارتباط با کاهش باروری منجر به پیشرفت گزینه‌های تشخیصی جدید برای ناباروری می‌شود. از این رو، مطالعات بیشتری برای آشکار کردن مکانیسم‌های دخیل در متیلاسیون DNA اسپرم و اثرات آن بر ناباروری مردان مورد نیاز است. یک بررسی سیستماتیک بیان کرد که تغییر در متیلاسیون ژن‌های imprinted در اسپرم با آسیب

شدید DNA اسپرم داشتند، بیشتر بود (۲۰). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که هیپرمتیلاسیون اثر مخرب قوی بر دستگاه تناسلی مرد در انسان دارد. امروزه ارزیابی الگوهای متیلاسیون DNA در مایع منی انسان به دلیل افزایش ناباروری موضوع مهمی است. بر اساس داده‌های فعلی، شواهد نشان داده است که بین الگوهای متیلاسیون DNA و پارامترهای مایع منی همبستگی وجود دارد. نتایج ما نشان داد که وضعیت متیلاسیون DNA تغییر یافته GTL2-DMRs با پارامترهای ضعیف مایع منی در مردان نابارور همراه بود. بین متیلاسیون GTL2-DMRs و پارامترهای کیفیت اسپرم همبستگی منفی وجود داشت. در مطالعه‌ای که بر روی نمونه‌های اسپرمی با نقص در یکپارچگی DNA انجام شد، وضعیت متیلاسیون ۲۵۷ ناحیه CpG از ژن‌های مربوط به ناباروری در مردان شامل دو دسته‌ی، ژن‌های H19 imprinted، SNRPN و هم چنین ژن‌های غیر imprinting از جمله MTHFR، GSTM1، DAZL و با استفاده از روش NGS هدفمند مورد آنالیز قرار گرفت (۴). متیلاسیون متمایز در همه ژن‌ها تایید شد، با این حال، ژن‌های imprinting درجات بالاتری از ارتباط با مناطق CpG متیله‌شده را به نسبت ژن‌های non-imprinting نشان دادند. این میزان از تغییر متیلاسیون با کاهش وضعیت یکپارچگی DNA اسپرم مرتبط بود (۲۱). هیپرمتیلاسیون MEST و هیپومتیلاسیون ICR1 IGF2/H19 به طور مستقیم با تعداد کم اسپرم در مردان نابارور ایدیوپاتیک مرتبط بود (۱۵). علاوه بر این، هیپرمتیلاسیون PAX8، MEST، PLAG1، DIRAS3، NTF3، SFN و HRAS در پروموترها با کاهش تعداد، تحرک و مورفولوژی طبیعی اسپرم‌ها ارتباط داشت (۴). متیلاسیون DNA برخی از ژن‌های imprinted که نقش کلیدی در رشد جنین دارند، در اسپرم مردانی که شریک‌شان دچار سقط مکرر

DNA اسپرم، باروری مردانه، میزان از دست دادن بارداری و فناوری‌های کمک باروری (ART) همراه است (۲). در این مطالعه، ما وضعیت متیلاسیون DNA DMR های یک ژن imprinted مادری، GTL2 را با استفاده از qMS-PCR مبتنی بر اصلاح بی سولفیت بررسی کردیم. در مطالعه حاضر، DMRs GTL2 در بیماران آستنوسپرمی و اولیگوآستنوتراوسپرمی هیپرمتیله شد. مونژان و همکاران (۲۰۱۳) سطوح متیلاسیون H19-DMR و PEG1/MEST-DMR را در اسپرم مردان نرموسپرمیک و الیگوزواسپرمی که برای ART مشاوره می‌کردند، مورد مطالعه قرار دادند. متیلاسیون‌های تغییر یافته برای هر دو ژن مشاهده شد، اما هیچ ارتباطی در نتیجه ART یافت نشد (۱۳، ۱۴). نتایج pyrosequencing در نمونه‌های اسپرم منجمد شده ارتباط معنی‌داری را بین الیگوزواسپرمی و ناهنجاری‌های متیلاسیون DNA برای MEG3/DLK1، SNURF و IGF2-DMR2، H19/IGF2-CTCF6 مقایسه با گروه کنترل نشان داد (۱). بررسی متیلاسیون H19، GTL2، ZAC، PEG1، LIT1، PEG3 و SNRPN در DMRs روی منی به‌دست‌آمده از مردان مبتلا به اولیگوزواسپرمی، متیلاسیون غیرطبیعی را نشان داد (۸). علاوه بر این، متیلاسیون نادرست ژن‌های KCNQ1، KCNQ1OT1 و IGF-2 که imprinted پدری بودند با الیگوزواسپرمی و آستنوسپرمی مردان نابارور مرتبط بود (۱). در مطالعه دیگری که بر روی DNA اسپرم مردان مبتلا به نورموزواسپرمی و آستنوسپرمی انجام شد، تفاوت‌های قابل توجهی در متیلاسیون کلی در نواحی پروموتر PEG3، MEG3، IGF2 و MEST در آستنوسپرمی در مقایسه با نورموزواسپرمی مشاهده شد. این الگوهای متیلاسیون نابجا در نمونه‌هایی با کیفیت پایین مایع منی، به ویژه در آنهایی که آسیب

methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PLoS One*, 2(12):e1289-1297.

5. Jazayeri M., Alizadeh A., Sadighi M., Eftekhari-Yazdi P., Sharafi M., Shahverdi A. 2022. Underestimated aspects in male infertility: epigenetics is a new approach in men with obesity or diabetes: A review. *International Journal of Fertility and Sterility*, 16(3):132-139.

6. Kagami M., Mizuno S., Matsubara K., Nakabayashi K., Sano S., Fuke T., Fukami M., Ogata T. 2015. Epimutations of the IG-DMR and the MEG3-DMR at the 14q32. 2 imprinted region in two patients with Silver-Russell syndrome-compatible phenotype. *European Journal of Human Genetics*, 23(8):1062-1067.

7. 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.

8. Kobayashi H., Sato A., Otsu E., Hiura H., Tomatsu C., Utsunomiya T., Sasaki H., Yaegashi N., Arima T. 2007. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Human Molecular Genetics*, 16(21):2542-2551.

9. Lazaraviciute G., Kauser M., Bhattacharya S., Haggarty P., Bhattacharya S. 2014. A systematic review and meta-analysis of DNA methylation levels and imprinting disorders in children conceived by IVF/ICSI compared with children conceived spontaneously. *Human Reproduction Update*, 20(6):840-852.

10. Mani S., Ghosh J., Coutifaris C., Sapienza C., Mainigi M. 2020. Epigenetic changes and assisted reproductive technologies. *Epigenetics*, 15(1-2):12-25.

11. Marques C.J., Carvalho F., Sousa M., Barros A. 2004. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *The Lancet*, 363(9422):1700-1702.

IG-DMR. مطالعه قرار گرفت. IGF2-H19-DMR و کاهش قابل توجهی در متیلاسیون DNA اسپرم نشان دادند، در حالی که PEG10 و KvDMR، MEST، ZAC، PEG3 هیپرمتیله شدند (۷).

### نتیجه‌گیری

در حال حاضر، روش‌های تشخیص علت ناباروری و نیز درمان‌های در دسترس، پاسخگوی تمام موارد ناباروری مردان نیست. عوامل اپی ژنتیک از عواملی هستند که در ایجاد این نوع ناباروری دخیل دانسته شده‌اند. به همین منظور باید برای بررسی افراد نابارور این جنبه نیز مد نظر قرار گیرد. از این گذشته، به دلیل پویا بودن الگوی اپی ژنتیک، تصحیح این عوامل بسیار راحت‌تر از تصحیح ژنتیک افراد است. پس از تجزیه و تحلیل جامع نتایج فوق، درک الگوهای متیلاسیون افتراقی ژن‌های متعدد در اسپرم می‌تواند راهگشای ناباروری مردان باشد.

### منابع

1. Bruno C., Blagoskonov O., Barberet J., Guilleman M., Daniel S., Tournier B., Binquet C., Choux C., Fauque P. 2018. Sperm imprinting integrity in seminoma patients? *Clinical Epigenetics*, 10(1):1-9.
2. Cannarella R., Crafa A., Condorelli R.A., Mongioi L.M., La Vignera S., Calogero A.E. 2021. Relevance of sperm imprinted gene methylation on assisted reproductive technique outcomes and pregnancy loss: A systematic review. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 67(4):251-259.
3. Gunes S., Esteves S.C. 2021. Role of genetics and epigenetics in male infertility. *Andrologia*, 53(1):e13586.
4. Houshdaran S., Cortessis V.K., Siegmund K., Yang A., Laird P.W., Sokol R.Z. 2007. Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA

- Arima T. 2011. Assessing loss of imprint methylation in sperm from subfertile men using novel methylation polymerase chain reaction Luminex analysis. *Fertility and Sterility*, 95(1):129-134.
19. Servy E., Menezo Y. 2017. The Methylene Tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) isoform challenge. High doses of folic acid are not a suitable option compared to 5 Methyltetrahydrofolate treatment. *Clinical Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine*, 3(6):1-5.
20. Song B., Chen Y., Wang C., Li G., Wei Z., He X., Cao Y. 2022. Poor semen parameters are associated with abnormal methylation of imprinted genes in sperm DNA. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 20(1):1-7.
21. 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.
22. Yan J., Guo X., Xia J., Shan T., Gu C., Liang Z., Zhao W., Jin S. 2014. MiR-148a regulates MEG3 in gastric cancer by targeting DNA methyltransferase 1. *Medical Oncology*, 31:1-7.
12. Marzouni E.T., Ilkhani H., Beigi Harchegani A., Shafaghathian 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):1-12.
13. 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.
14. Organization WHO. 2021. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2021: World Health Organization.
15. Poplinski A., Tüttelmann F., Kanber D., Horsthemke B., Gromoll J. 2010. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1. *International Journal of Andrology*, 33(4):642-649.
16. Rajender S., Avery K., Agarwal A. 2011. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 727(3):62-71.
17. Santi D., De Vincentis S., Magnani E., Spaggiari G. 2017. Impairment of sperm DNA methylation in male infertility: a meta-analytic study. *Andrology*, 5(4):695-703.
18. Sato A., Hiura H., Okae H., Miyauchi N., Abe Y., Utsunomiya T., Yaegashi N.,