Journal of Animal Biology, Autumn 2024; 17(1): 177-184

Research Article

Association of DNA Methylation of GTL2 with Semen Parameters

Fouzieh Karami Hezarcheshmeh [1], Parichehreh Yaghmaei[1], Nasim Hayati Roodbari[1], Kheirollah Yari[2*]

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: 10.60833/ascij.2024.1129141

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.

زیست‌شناسی جانوری، سال هفدهم، شماره اول، پاییز ۱۴۰۳، صفحات ۱۸۴-۱۷۷

مقاله پژوهشی

ارتباط متیلاسیون ژن GTL2 با پارامترهای اسپرمی انسان

فوزیه کرمی هزارچشمه[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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۰۸

DOI: 10.60833/ascij.2024.1129141

چکیده

ناباروری مردان یک مشکل پیچیده چندعاملی است که حدود ۷ درصد از مردان و ۱۵ درصد از زوج‌ها را در سراسر جهان با آسیب شناسی چند عاملی مانند عوامل محیطی، ژنتیکی و اپی ژنتیکی 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 =۰/۰۲۰؛ p = −۰/۳۴۵) و غلظت اسپرم (p =۰/۰۱۵؛r=−۰/۳۶۱) همه بیماران مشاهده شد. در مجموع، وضعیت متیلاسیون DNA غیرطبیعی GTL2-DMRs ممکن است نشانگر تشخیصی اپی ژنتیکی 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

ناباروری مردان یک مشکل پیچیده چندعاملی است که حدود ۷ درصد از مردان و ۱۵ درصد از زوج ها 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 نسبتا 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، توجه زیادی بر روی تغییرات اپی ژنتیکی به عنوان یک عامل مهم در ناباروری صورت گرفته است. تغییرات اپی ژنتیکی می تواند بیان ژن‌های متعددی را که در تشکیل سیستم تناسلی مرد، لقاح، توسعه/تمایز اسپرم و رشد جنین دخیل هستند، تحت تاثیر قرار دهد (۳، ۱۰). در زمینه تولید مثل، اصلاح اپی ژنتیکی 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

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، ۱٤، ۱۷). بیشتر ژن‌های imprinted شناخته شده توسط نواحی متیله متفاوت (DMRs) تنظیم می شوند که متیلاسیون متفاوتی را در سایت‌های CpG در یکی از آلل‌ها نشان می‌دهند (۱٦). 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 (٦). در غیر این صورت، ارتباط بین پارامترهای ضعیف مایع منی و الگوهای متیلاسیون DNA تغییر یافته ژن‌های imprinted مشاهده شد (۱٦، 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 پدررا 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 الیگوآستنوتراتاسپرمی، همچنین ارتباط بین متیلاسیون GTL2 و پارامترهای منی بود. این نتایج یک رویکرد جدیدی را در مورد ناباروری مردان ارائه می دهد.

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 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. ٤٥ 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 روش های کمک باروری به دنیا آورده بودند.

جمع‌آوری و تجزیه وتحلیل 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 ≤۱۵ میلیون در میلی‌لیتر، تحرک ≤ ٤۰ درصد و مورفولوژی ≤ ٤ درصد (۳). مورفولوژی و بلوغ هسته ای اسپرم‌ها با رنگ آمیزی آنیلین بلو ارزیابی شد. برای انجام رنگ‌آمیزی، لام‌های اسپرم خشک شده در فرمالدئید ٤ 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

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 ۱۰۰× 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 اسپکتروفتومتر نانودراپ (Thermo Fisher Scientific, USA) استفاده شد. نمونه های DNA خالص (با نسبت ۲۶۰/۲۸۰ از۱/۸–۱/۶) برای اصلاح بی سولفیت در نظر گرفته شد. ۱ میکروگرم نمونه DNA با بی سولفیت سدیم (کیت تیمار سدیم بی سولفیت 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 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 ± 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 مقایسه های چندگانه دان انجام شد. برای تحلیل همبستگی از همبستگی ناپارامتریک اسپیرمن استفاده شد. مقدار احتمال (*p*-value) کمتر از۰/۰۵ به معنی‌دار تعریف شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار Stata (نسخه ۱۴.۱) (Stata corp, college station, TX, USA) استفاده شد

.

جدول ۱- توالی پرایمر های ژنGTL2

Table 1. Primers sequence of GTL2 gene

Gene	Sequence
Methylated	F: 5’-GTTAGTAATCGGGTTTGTCGGC-3’ R: 5’-AATCATAACTCCGAACACCCGCG-3’
Unmethylated	F: 5’-GAGGATGGTTAGTTATTGGGGT-3’ R: 5’-CCACCATAACCAACACCCTATAATCACA-3’

نتایج

میانگین سنی شرکت کنندگان ، در نورموسپرمی ۴/۱۸ ± ۳۸/۲۴، در آستنوسپرمی ۴/۸۱ ± ۳۶/۷۸ و در الیگوآستنوتراتوسپرمی ۵/۴۶±۳۷/۱۷ که تفاوت معنی داری از نظر آماری نداشت. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، میانگین درصد تعداد و غلظت اسپرم در الیگوآستنوتراتوسپرمی به طور قابل توجهی کمتر از آستنوسپرمی و نورموسپرمی بود. همچنین، میانگین درصد تحرک، پیشرفت و مورفولوژی کل در

نرموسپرمی به طور قابل توجهی بیشتر از الیگوآستنوتراتوسپرمی و آستنوسپرمی بود و در آستنواسپرمی نسبت به اولیگوآستنوتراتوسپرمی به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر بود (p <۰/۰۵). میانگین درصد ناهنجاری‌های جایگزینی هیستون در الیگوآستنو تراتوسپرمی به طور قابل توجهی بیشتر از آستنوسپرمی و نورموسپرمی بود (p <۰/۰۵) (جدول ۲). جدول ۳ همبستگی منفی بین متیلاسیون GTL2 با تعداد اسپرم (p =۰/۰۲۰؛ r = -۰/۳٤٥) و غلظت (p =۰/۰۱۵؛ r = -۰/۳٦۱) در همه بیماران را نشان می‌دهد. همچنین، همبستگی مثبتی بین متیلاسیون GTL2 با تحرک کل در الیگوآستنوتراتوسپرمی وجود داشت (p =۰/۰۱۸؛r=۰/٦۰۰). علاوه بر این، بین متیلاسیون GTL2 با غلظت اسپرم در آستنوسپرمی همبستگی منفی وجود داشت (p =۰/۰۳۹؛ r = -۰/٥۳٦) .

جدول۲ – مقایسه پارامترهای اسـپرمی در گروه‌های مورد مطالعه

Table 2. Comparison of sperm parameters in the study groups

Sperm parameters	Normozoospermic (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

جدول۳- 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		Normozoospermic		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	-0.147	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 فزاینده ای 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 می شود. 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

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، GTL2را با استفاده از qMS-PCR مبتنی بر اصلاح بی سولفیت بررسی کردیم. در مطالعه حاضر، DMRs GTL2 در بیماران آستنوسپرمی و اولیگوآستنوتراتوسپرمی 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. متیلاسیون های تغییر یافته برای هر دو ژن مشاهده شد، اما هیچ ارتباطی در نتیجه ART یافت نشد (۱۳، ۱٤). نتایج pyrosequencing در نمونه‌های اسپرم منجمد شده ارتباط معنی‌داری را بین الیگوزواسپرمی و ناهنجاری‌های متیلاسیون DNA برای MEG3/DLK1، H19/IGF2-CTCF6، IGF2-DMR2 و SNURF در 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 آستنواسپرمی مردان نابارور مرتبط بود (۱). در مطالعه دیگری که بر روی DNA اسپرم مردان مبتلا به نورموزواسپرمی و آستنواسپرمی انجام شد، تفاوت های قابل توجهی در متیلاسیون کلی در نواحی پروموتر PEG3، MEG3، IGF2 و MEST در آستنواسپرمی در مقایسه با نورموزواسپرمی مشاهده شد. این الگوهای متیلاسیون نابجا در نمونه‌هایی با کیفیت پایین مایع منی، به ویژه در آنهایی که 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 imptinting از جمله GSTM1, MTHFR, CREM و DAZL با استفاده از روشNGS هدفمند مورد آنالیز قرا گرفت (٤). 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 IGF2/H19 ICR1به 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 (٤). متیلاسیون DNA برخی از ژن‌های imprinted که نقش کلیدی در رشد جنین دارند، در اسپرم مردانی که شریک‌شان دچار سقط مکرر

حاملگی شده‌اند مورد مطالعه قرار گرفت. IG-DMR و IGF2-H19-DMR کاهش قابل توجهی در متیلاسیون DNA اسپرم نشان دادند، در حالی که PEG3، ZAC، MEST، KvDMR و PEG10 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 اپی‌ژنتیک، 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, Mongioì 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 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 c*hildren 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.

12. Marzouni E.T., 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):1-12.

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., 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.