

The role and importance of DNA methylation in spermatogenesis process

Arezou Nematollahi¹, Marziyeh Tavalae², Atefeh Rezaeian¹, Mohammad Hossein Nasr- Esfahani^{3, 4}

¹ MSc, Department of Animal Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran

² Associate Professor, Department of Animal Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran

³ Professor, Department of Animal Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran

⁴ Embryologist, Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran

Abstract

Background: DNA methylation is one of the epigenetic marks that are created by de novo DNA methylation and be maintained through cell division. This process is catalyzed by DNA methyltransferases. DNA methylation establishment in germ line is important, since they have the potential to regulate gene expression in offspring and improper DNA methylation patterns in germ lines has serious consequences on development post fertilization. Dysregulation in epigenetic changes, especially sperm DNA methylation, may play an important role in the development of numerous diseases and has a negative effect on male fertility. The aim of this review study was to discuss about DNA methylation process and enzymes involved in this procedure and also the impact of environmental factors on the spermatogenesis process.

Materials and methods: A search was conducted according to keywords in databases such as Scopus, PubMed and Google Scholar. Then, all articles that met the inclusion criteria, between 1975 and 2017, were examined.

Results: Disorders in expression of DNA methyltransferases increase cellular oxidative stress and lifestyle can affect DNA methylation patterns during spermatogenesis and fertility potential in men.

Conclusion: As sperm DNA methylation is closely related to male infertility, it is important to understand underlying DNA methylation mechanisms in order to develop therapeutic strategies.

Keywords: *Epigenetic, DNA methylation, Spermatogenesis, Male infertility.*

Cited as: Nematollahi A, Tavalae M, Rezaeian A, Nasr- Esfahani MH. The role and importance of DNA methylation in spermatogenesis process. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2021; 31(1): 1-13.

Correspondence to: Marziyeh Tavalae

Tel: +98 95015682-31

E-mail: m.tavalae@royan-rc.ac.ir

ORCID ID: 0000-0001-9954-964X

Received: 7 Jun 2020; **Accepted:** 3 Sep 2020

نقش و اهمیت متیلاسیون DNA در روند اسپرماتوژنز

آرزو نعمت الهی^۱، مرضیه تولائی^۲، عاطفه رضائیان^۱، محمدحسین نصر اصفهانی^{۳،۴}

^۱ کارشناس ارشد پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران
^۲ دانشیار پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران
^۳ استاد پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران
^۴ جنین شناس، مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: متیلاسیون DNA یکی از عوامل تنظیم اپیژنتیکی است که به صورت *de novo* ایجاد شده، سپس تثبیت، و از طریق تقسیم سلولی در نسل های متوالی حفظ می شود. این فرآیند توسط آنزیم های DNA متیل ترانسفراز کاتالیز می شود. متیلاسیون DNA در رده های زایا به اندازه ای ایجاد متیلاسیون در گامت ها اهمیت دارد. از آنجایی که در تنظیم بیان ژن در نسل بعدی نقش دارد و عدم ایجاد الگوهای درست متیلاسیون DNA در رده های زایا عواقب جدی برای تکوین پس از لقاح دارد. اختلال در تنظیمات اپیژنتیکی، به ویژه متیلاسیون DNA اسپرم، نقش مهمی در ایجاد بیماری های متعدد و تأثیرات منفی بر باروری مردان داشته باشد. هدف این مطالعه مروری بررسی متیلاسیون DNA و آنزیم های دخیل در این فرآیند و همچنین عوامل محیطی طی فرآیند اسپرماتوژنز و لقاح بود.

روش بررسی: جستجو در بانک های اطلاعاتی نظیر *Pubmed*، *Scopus* و *Google Scholar* براساس کلید واژه ها انجام گرفت. سپس مقالاتی که دارای معیار ورود به مطالعه بودند بین سال های ۱۹۷۵ تا ۲۰۱۷ بررسی شدند.

یافته ها: اختلالات بیان آنزیم های *DNA methyltransferase* استرس اکسیداتیو سلولی را افزایش می دهد و سبک زندگی نیز می تواند الگوهای متیلاسیون DNA طی اسپرماتوژنز و پتانسیل باروری مردان را تحت تاثیر قرار دهد.

نتیجه گیری: از آنجایی که متیلاسیون DNA اسپرم ارتباط نزدیکی با ناباروری مردان دارد، درک مکانیسم های زیر بنایی متیلاسیون DNA به منظور توسعه استراتژی های درمانی مهم است.

واژگان کلیدی: اپیژنتیک، متیلاسیون DNA، اسپرماتوژنز، ناباروری مردان.

مقدمه

نمی شود (۱)؛ بدنبال آن اپیژنتیک به صورت تغییرات توارث پذیری که بدون ایجاد تغییر در توالی DNA، بیان ژن را تنظیم می کند، توصیف شد (۲).

تغییرات اپی ژنتیک متیلاسیون در سطح هیستون ها

تغییرات دم های هیستونی از جمله متیلاسیون، استیلاسیون، فسفریلاسیون، یوبی کوئیتیناسیون، ریبوزیلاسیون و ساموئیلایسیون پس از رونویسی به واسطه آنزیم های متعددی انجام می شود (۳). آنزیم هیستون استیل ترانسفراز HAT (Histone acetyltransferase) در افزودن یک گروه استیل به هیستون نقش دارد (۴)، در حالی که حذف آن توسط هیستون داستیلاز (Histone deacetylase) HDAC انجام می شود.

واژه اپیژنتیک اولین بار در سال ۱۹۵۷ توسط کنراد وادینگتون به کار برده شد که آن را به صورت "تعامل علت و معلولی بین ژن ها و محصولات آن ها که باعث به وجود آمدن فنوتیب می شود." تعریف کرد. وادینگتون اظهار داشت که ژن های اپی ژنتیک همیشه بیان نمی شوند، DNA همیشه به RNA ترجمه نشده و RNA هم همیشه به پروتئین ترجمه

آدرس نویسنده مسئول: اصفهان، پژوهشگاه رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه زیست فناوری جانوری، مرضیه تولائی (email: m.tavalaee@royan-re.ac.ir)
 ORCID ID 0000-0001-9954-964X
 تاریخ دریافت مقاله: ۹۸۱۰/۱۷
 تاریخ پذیرش مقاله: ۹۹/۶/۱۳

فسفات آدنین (CpA) و سیتوزین فسفات سیتوزین (CpC) (۹). تاکنون دو مکانیسم متفاوت متیلاسیون DNA شناسایی شده: حفظ و نگهداری (Maintenance) و متیلاسیون از نو (Denovo). به‌طور کلی هایپرمتیلاسیون DNA با مهار رونویسی مرتبط است در حالی که هایپومتیلاسیون DNA منجر به فعال‌سازی رونویسی می‌شود. در ادامه این مقاله مروری به شرح کاملی از نقش‌ها و عملکردهای تغییرات متیلاسیون DNA پرداخته می‌شود.

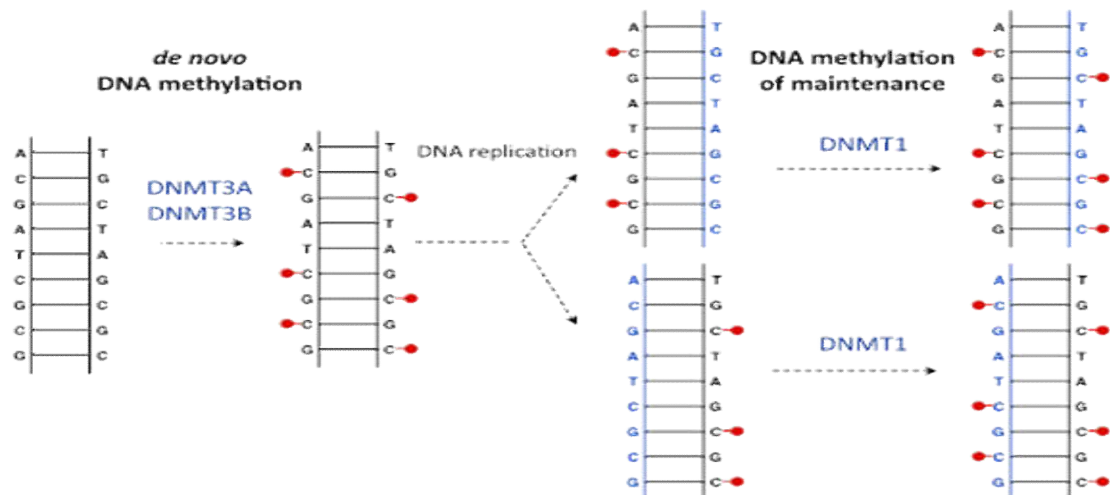
آنزیم‌های دخیل در فرایند متیلاسیون

آنزیم‌های DNA متیل ترانسفراز (DNMTs) DNA methyltransferase) به‌عنوان حد واسط انتقال گروه متیل به DNA در طی متیلاسیون DNA شناخته شده‌اند (۱۰). از نظر ساختاری و عملکردی ۵ آنزیم DNMT مختلف در پستانداران شناسایی شده، شامل DNMT1، DNMT2، DNMT3A، DNMT3B، DNMT3L، DNMT3L، DNMT3B در سلول‌های تمایز یافته و تمایز نیافته یافت می‌شود (۲)؛ این آنزیم پروفایل متیلاسیون را بعد از همانندسازی با اضافه کردن گروه‌های متیل به توالی CpG همی‌متیله، حفظ می‌کند؛ در واقع الگوهای تثبیت‌شده متیلاسیون DNA را از رشته والدی به رشته‌های دختری منتقل می‌کند و باعث می‌شود تا توارث اپی‌ژنتیک حفظ شود. DNMT3A، DNMT3B، و کوفاکتور DNMT3L از جمله DNA متیل ترانسفرازهای متیلاسیون از نو هستند که DNA را طی جنین‌زایی و در سلول‌های تمایز یافته متیله می‌کنند و به میزان بالایی در سلول‌های بنیادی جنینی بیان می‌شوند و متیلاسیون از نو را روی توالی‌های CpG متیله نشده انجام

استیلاسیون تمایل هیستون را به DNA کاهش می‌دهد و عموماً به وضعیت باز کروماتین (یوکروماتین) منجر می‌شود و ژن‌ها را از نظر عملکردی فعال می‌کند. از طرف دیگر هیستون داستیلاسیون منجر به تراکم کروماتین می‌شود، و ژن‌ها را از نظر رونویسی غیرفعال می‌کند. متیلاسیون هیستون، توسط آنزیم هیستون متیل ترانسفراز HMT (Histone methyltransferase) و دمتیلاسیون هیستون، توسط آنزیم هیستون دمتیلاز HDM (Histone demethylase) صورت می‌گیرد. متیلاسیون هیستون بسته به موقعیت و تعداد اسید آمینه‌های متیله شده، یک تنظیم‌کننده کلیدی برای فعال یا غیرفعال بودن رونویسی است (۵، ۲). برای مثال متیلاسیون لیزین 4 هیستون H3 (H3K4) و لیزین 36 (H3K36) و لیزین 79 (H3K79) با بیان ژن رابطه دارد؛ در حالی که دی و تری متیلاسیون لیزین 9 و 27 هیستون H3 (H3K9) و (H3K27) با عدم بیان ژن همراه است (۶).

متیلاسیون در سطح DNA

از بین تغییرات DNA، ابتدا متیلاسیون DNA پروکاریوت‌ها شناسایی شد. سپس در سال ۱۹۷۷ ۵-متیل سیتوزین 5mC (5-methylcytosine) در DNA یوکاریوتی شناسایی شد (۷). در طی متیلاسیون DNA، یک گروه متیل به اتم کربن ۵ در اسید آمینه سیتوزین اضافه می‌شود، S-آدنوزیل متیونین SAM (S-adenosyl methionine) دهنده گروه متیل است (۸). عموماً متیلاسیون DNA در سایت‌های دی‌نوکلئوتید CpG رخ می‌دهد، اما به‌ندرت در جایگاه‌های غیر CpG هم ظاهر می‌شود مانند سیتوزین فسفات تیمین (CpT)، سیتوزین



شکل ۱. DNMT1 به‌طور عمده در حفظ و نگهداری متیلاسیون DNA درگیر است، در حالی که DNMT3A و DNMT3B متیل ترانسفرازهای denovo هستند. گروه متیل در سایت CPG با رنگ قرمز مشخص شده است (Moison, 2014) (۱۱).

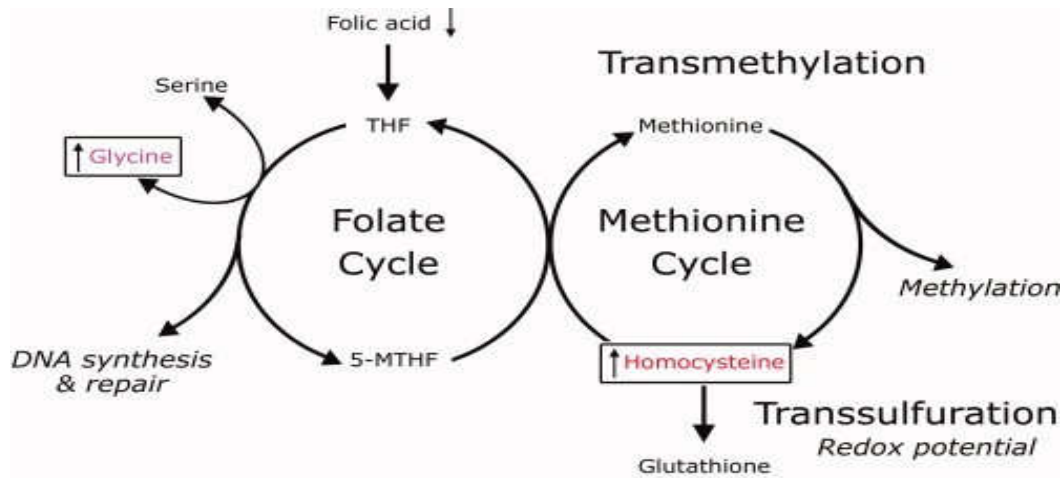
می‌دهند (۲،۴) (شکل ۱) (۱۱). DNMT3L فاقد دمین کاتالیتیکی بوده و نقش کوفاکتور را ایفا می‌کند و عملکرد متیلاسیون از نو را توسط DNMT3A و DNMT3B ممکن می‌سازد. DNMT2 تفاوت‌های ساختاری و عملکردی با سایر DNMTs دارد. بنابراین در فرایند متیلاسیون از نو و متیلاسیون حفاظت‌شده نمی‌تواند شرکت کند (۹). بیش از ۵۰٪ ژن‌های انسان دارای جزایر CpG (CpG islands) در نواحی پروموتورشان هستند که بیشتر آن‌ها در سلول‌های سوماتیک غیرمتیله باقی‌مانده‌اند (۱۲).

در پروموتورهای هایپرمتیله شده اتصال فاکتورهای رونویسی متوقف شده و بیان ژن غیر ممکن می‌شود. به‌طور کلی هایپرمتیلاسیون DNA با مهار رونویسی مرتبط است در حالی که هایپومتیلاسیون DNA منجر به فعال‌سازی رونویسی می‌شود. گروه‌های متیل توسط سیکل‌های متیونین و فولات فراهم می‌شوند که به‌عنوان "چرخه تک‌کربنه" هم شناخته می‌شوند و منجر به تولید S-آدنوزیل متیونین (SAM) می‌شوند (۴،۸). در طی این چرخه اسیدفولیک وارد سلول شده به تتراهیدروفولات (THF) احیا می‌شود. سپس THF به ۵ و ۱۰-متیلن تتراهیدروفولات و سپس توسط متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) به 5-متیلن تتراهیدروفولات (5MTHF) تبدیل می‌شود. با 5-متیلن شدن 5MTHF سیکل فولات کامل می‌شود. سیکل متیونین با هموسیستئین آغاز می‌شود؛ با آنزیم متیونین سنتتاز و کوفاکتور ویتامین B12 واحد متیل 5MTHF به هموسیستئین منتقل شده و 5MTHF به متیونین تبدیل می‌شود. در نهایت متیونین توسط آنزیم متیونین آدنیل ترانسفراز (MAT) یک متیل دیگر گرفته و به S-آدنوزیل متیونین (SAM) تبدیل می‌شود. SAM به‌عنوان دهنده عمومی گروه متیل، هم برای DNA متیل ترانسفرازها و هم هیستون متیل ترانسفرازها ایفای نقش می‌کند (۸،۱۳) (شکل ۲) (۱۳). در طی فرایند رشد و تمایز، دو نوع 5-متیلاسیون DNA شناخته شده است: DNA 5-متیلاسیون غیرفعال که با کاهش فعالیت یا عدم حضور DNMT1 در هسته رخ می‌دهد (۱۴)؛ و نوع دیگر DNA 5-متیلاسیون فعال که بر روی 5-متیل سیتوزین (5mC) واکنش‌های پی‌درپی اکسیداسیون توسط آنزیم‌های گروه TET (Ten-Eleven-Translocation) رخ داده و به 5-هیدروکسی 5-متیل سیتوزین (5hmC) اکسیدشده سپس به 5-فرمیل

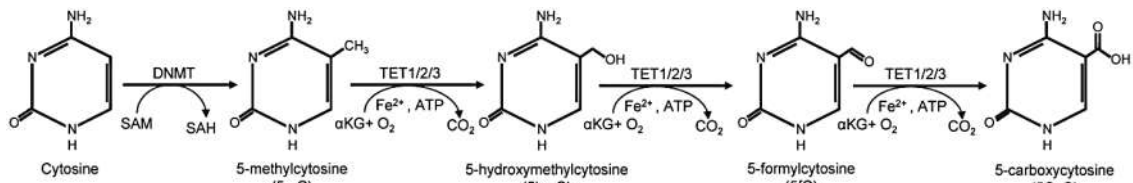
سیتوزین 5fC و در نهایت به 5-کربوکسیل سیتوزین 5caC تبدیل می‌شود (۴) (شکل ۳) (۲). آنزیم‌های TET شامل TET1، TET2، TET3 متعلق به خانواده بزرگ ۲-اکسوگلوکوتارات (2-OG) و دی‌اکسیژناز وابسته به Fe^{2+} هستند که به‌واسطه آن‌ها واکنش‌های پی‌درپی اکسیداسیون بر 5mC رخ می‌دهد (۱۵،۱۶). چندین مطالعه مشخص کرده‌اند که پروتئین‌های TET با ایجاد 5hmC به‌عنوان حد واسطه، ممکن است به‌عنوان تنظیم‌گرهای محدود کننده سرعت 5-متیلاسیون DNA عمل کنند (۱۴،۱۷). تغییرات اپی‌ژنتیکی با تغییر در بیان ژن بعضی از عملکردهای سلولی را کنترل می‌کنند. و متیلاسیون DNA به‌عنوان یک تعدیل‌کننده کلیدی اپی‌ژنتیک است که اثری و برگشت‌پذیر بوده و به‌صورت پایدار بعد از همانندسازی DNA ایجاد می‌شود. متیلاسیون DNA نقش محوری در برخی فرایندهای بیولوژیکی از جمله تکوین جنین، حک‌گذاری ژنومی، ثبات کروموزوم، تنظیم بیان ژن، برنامه‌ریزی مجدد (Reprogramming)، تمایز سلولی (Differentiation)، مهار ترانسپوزون، پیرایش RNA، ترمیم DNA و غیر فعال‌سازی کروموزوم X دارد (۲). در این راستا مطالعات پیشین نشان داده‌اند که متیلاسیون DNA نقش مهمی در مهار یا فعال کردن ژن‌های حک‌گذاری مثل ژن‌های H19 و IGF2 در طی تکوین دارد (۹). به علاوه در طی غیر فعال‌سازی کروموزوم X یک DNA 5-متیلاسیون گسترده در سایت‌های CpG برای غیرفعال کردن یکی از کروموزوم‌های X در جنس مونث رخ می‌دهد که این متیلاسیون DNA می‌تواند این غیر فعال‌سازی را در طول عمر سلول‌های مونث حفظ کند. با توجه به اهمیت متیلاسیون DNA در طی تکوین، در ادامه به تغییرات متیلاسیون در رده سلول‌های زایا و فرایند اسپرماتوژنز تا زمان لقاح و تکوین جنینی پرداخته می‌شود و سپس نقص آن در ناباروری بحث خواهد شد.

مواد و روشها

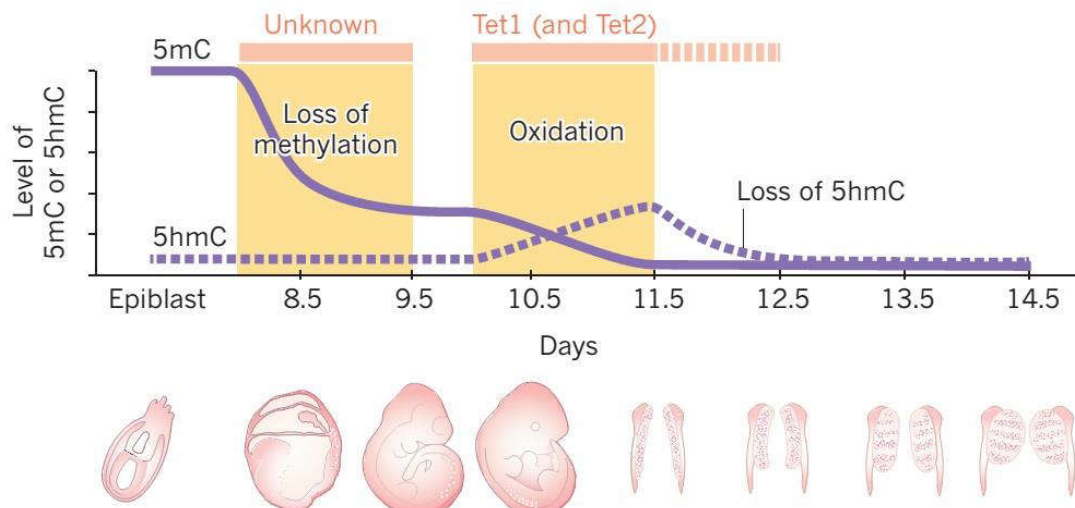
مطالعه حاضر، یک مطالعه مروری نظام‌مند است که تمام مراحل تحقیق اعم از جستجو، انتخاب مطالعات و ارزیابی کیفی در مورد آن صورت گرفته است. جمع‌آوری اطلاعات از پایگاه‌های معتبر علمی نظیر Scopus، Pubmed و همچنین موتور جستجوی Google Scholar براساس کلید واژه‌ها انجام گرفت.



شکل ۲. متابولیسم چرخه تک کرینه (Schaevitz, 2012) (۱۳).



شکل ۳. تغییرات پویای سیتوزین (C). سیتوزین با آنزیم‌های DNA متیل ترانسفراز (DNMTs) با انتقال یک گروه متیل از S-آدنوزیل متیونین (SAM) به 5mC تبدیل می‌شود. سپس، پروتئین‌های خانواده TET (TET1 / 2/3) می‌توانند اکسیداسیون 5mC به 5hmC و سپس به 5fC و 5CaC از طریق یک واکنش شیمیایی شامل آلفا کتوگلو تارات، اکسیژن، آدنوزین تری فسفات (ATP) و Fe^{2+} را کاتالیز کنند (Liyanage, 2014) (۲).



شکل ۴. تغییرات 5mC و 5hmC طی تکوین PGCs (Kohli et al., 2013) (۱۴).

متیلاسیون DNA، اسپرماتوژنز، ناباروری مردان و تکنیک‌های کمک باروری (epigenetic, DNA methylation, spermatogenesis, male infertility, assisted reproductive techniques) هم ۱۷ یافته بود. در پایان، یافته‌های مشترک بین پایگاه‌های اطلاعاتی، یافته‌های غیر از مقاله (کنفرانس، نظر سنجی

در ابتدا کلید واژه‌های اپی ژنتیک، متیلاسیون DNA، ناباروری مردان یا اسپرماتوژنز استفاده شد که نتیجه ۵۰۵ یافته بود. در مرحله بعد واژه تکنیک‌های کمک باروری نیز استفاده شد و نتیجه آن ۳۲۷ یافته بود. در این مرحله تعداد بسیاری از مطالعات مربوط به زنان بودند که حذف شدند. با کلمات کلیدی اپی ژنتیک،

و فصول کتاب)، همچنین یافته‌های غیر زبان انگلیسی و آن‌هایی که با موضوع مرتبط نبودند از مطالعه حذف شدند. در مرحله ارزیابی کیفی نیز برخی مقالات مروری با مطالعه خلاصه آن‌ها، با توجه به تکراری بودن مطالب یا عدم کیفیت مورد نظر برای مطالعه حذف شدند در نهایت ۶۵ مقاله مرتبط در فاصله سال‌های ۱۹۷۵ تا ۲۰۱۷ انتخاب شده و وارد مطالعه شدند.

یافته‌ها

تغییرات متیلاسیون در سلول‌های رده زایا

سلول‌های زایای بدوی PGCs در روز ۶/۵ (در جنین موش) و طی هفته دوم حاملگی (در انسان) از سلول‌های سوماتیکی کیسه زرده، یعنی از زیرمجموعه سلول‌های لایه اپی‌بلاست منشأ می‌گیرند. در ابتدا یک جمعیت حدود ۴۰ سلولی در روز E7.25 در اپی‌بلاست به وجود می‌آیند آن‌ها طی مهاجرت متحمل تقسیمات میتوزی فراوانی می‌شوند؛ در E9.5، حدوداً ۲۰۰ PGCs از طریق آندودرم روده پسین شروع به مهاجرت می‌کنند و در حدود E10.5-11.5 به ستیغ تناسلی می‌رسند (۹، ۴) و در گنادها تحت تکوین خاص جنسی قرار می‌گیرند. برنامه‌ریزی مجدد رده زایا زمانی که PGC ها در طول روده پسین مهاجرت می‌کنند تا وارد ستیغ تناسلی شوند، در روز ۱۱ جنینی (در موش) یا طی هفته پنجم حاملگی (در انسان)، آغاز می‌شود. PGC ها که بعد از ورود به غدد جنسی گنوسیت نامیده می‌شوند، شروع به ایجاد تغییرات اپی‌ژنتیک خاص جنسی مانند حک گذاری ژنومی می‌کنند. در واقع برنامه‌ریزی مجدد در

PGCs منجر به پاک شدن تقریباً کامل متیلاسیون DNA در E13.5 شده و سپس متیلاسیون DNA از نو در پرواسپرماتوگونی‌ها در مناطق حک‌گذاری شده و عناصر تکراری شروع می‌شود و با شروع تمایز به اسپرماتوسیت‌های پاک‌تن که غنی از توالی‌های غیرتکراری هستند، کامل خواهد شد (۴). فرایند دمتیلاسیون DNA در PGC ها شامل سه مرحله است: ۱) از دست دادن حجم بالایی از متیلاسیون DNA در اپی‌بلاست: کاهش غیرفعال (passive dilution) 5mC و 5hmC در یک روش کاملاً وابسته به همانندسازی (مستقل از TET)؛ ۲) اکسیداسیون 5mC باقی‌مانده به 5hmC بوسیله پروتئین‌های TET1 و TET2 در اپی‌بلاست ۳) از دست دادن 5hmC طی یک مسیر کاهش غیرفعال (passive dilution pathway) وابسته به همانندسازی (شکل ۴) (۱۴).

متیلاسیون طی فرایند اسپرماتوژنز

رویداد مهم در طی فرایند اسپرمیوژنز در اسپرماتیدهای هاپلوئید، جایگزینی عمده هیستون‌های متصل به DNA با پروتامین‌ها است که به‌عنوان یک مکانیسم اپی‌ژنتیک ویژه اسپرم در نظر گرفته شده است چرا که پروتامین منجر به بسته‌بندی محکم کروماتین و در نهایت توقف رونویسی می‌شود (۴). این فرایند جابجایی پروتامین-هیستون بصورت دو مرحله‌ای تنظیم می‌شود. در گام اول، هیستون‌های موجود در اسپرماتیدهای گرد در نتیجه هیستون هایپرآستیلیسیون، با پروتئین‌های هسته‌ای (پروتئین‌های انتقالی یا TP) جایگزین می‌شوند. گام دوم در

جدول ۱. ارتباط بین ناباروری مردانه و بیان DNMT و DNA متیلاسیون تغییر یافته.

منبع	وضعیت متیلاسیون و DNMT	طبقه بندی ناباروری
Hartmann et al., 2006 Takashima et al., 2009 Kobayashi et al., 2007 Raman et al. 1995 Cheng et al., 2014 Filipponi et al., 2009	متیلاسیون غیرطبیعی DNA و بیان غیرطبیعی DNMT1 هایپومتیلاسیون DNA در سلول‌های زایا متیلاسیون غیرطبیعی DNA در ژن‌های حک گذاری	اختلال اسپرماتوژنز الیگوزواسپرمی
Marques et al., 2008 Boure'his et al., 2004 Kaneda et al., 2004 Marques et al., 2010 Minor et al., 2011 Minor et al., 2011	بیان تغییر یافته DNMT3A، پلی مورفیسم در ژن DNMT1 متیلاسیون نابجای DNA در سلول‌های بیضه‌ای کاهش Dnmt3a یا Dnmt3L	آزواسپرمی
Urduingio et al., 2015 Tavalaee et al., 2014 Bahreinian et al., 2015 Tavalaee et al., 2009 Benchaib et al., 2005 Tunc et al. 2009	کاهش متیلاسیون DNA در ژن H19 الگوهای متیلاسیون غیرطبیعی DNA در سلول‌های اسپرم متیلاسیون غیرطبیعی سراسری DNA، ناکارایی DNMTs متیلاسیون غیرطبیعی DNA	آزواسپرمی انسدادی ناباروری بدون علت ناباروری مردان مبتلا به واریکوسول افراد نابارور کاندید IVF یا ICSI

DNMT = DNA methyltransferase

برای مثال، تجزیه و تحلیل نمونه‌های بیوپسی بیضه مردان نابارور یک هایپراستیلایسیون زودرس هیستون H4 در اسپرماتوسیت‌ها به‌جای اسپرماتیدها را نشان می‌دهد (۲۳). آنزیم‌های TET هم در بازسازی اپی‌ژنتیک نقش دارند. مطالعه منتشرشده در سال ۲۰۱۶ نشان داد آنزیم‌های TET که در طی اسپرماتوژنز انسانی بیان می‌شوند، با آنزیم TET2 در اسپرماتیدهای مرحله آخر پایی تن آغاز می‌شوند و به دنبال آن TET1 و TET3 به ترتیب در مرحله ۱ و ۳ اسپرماتیدهای گرد بیان می‌شوند. مردان الیگوزواسپرمی و آستنوزواسپرمی در مقایسه با افراد سالم میزان کاهش یافته TET1-3 را در اسپرم دارند (۲۴). بعد از لقاح، ژنوم مادری دوباره برنامه‌ریزی می‌شود تا با متیلایسیون پدری مطابق شود یعنی متیلایسیون اولیه جنین از سلول‌های اسپرم به ارث می‌رسد نه از تخمک (۲۵). اگرچه اندازه سلول اسپرم نسبت به تخمک حجم کمتری دارد و RNAها و پروتئین‌های محدودی دارد، ولی متیلایسیون DNA اسپرم ممکن است نقش اساسی برای جنین و فرزند در حال تکوین و توارث اطلاعات ژنتیک ایفا کند. اسپرم بالغ پروفایل CpG متیلایسیون گسترده ژنومی منحصربه‌فردی را نشان می‌دهد. از جمله این پروفایل منحصربه‌فرد می‌توان متیلایسیون خاص پدری در ژن‌های حک‌گذاری شده، تعدادی پروموتورهای ژنی هایپر و هایپومتیله شده خاص اسپرم، هایپومتیلایسیون سراسری نواحی سانترومر و برخی انواع عناصر DNA تکرارشونده ترنسپوزونی را نام برد (۲۶). متیلایسیون DNA اسپرم متفاوت از سلول‌های سوماتیک است، چرا که غالباً خارج از نواحی پروموتور رخ می‌دهد و همچنین متیلایسیون DNA اسپرم متفاوت از تخمک‌ها است. برخلاف تخمک‌های بالغ و جنین‌های اولیه، اسپرم بالغ به شدت متیله است. میزان متیلایسیون DNA در اسپرم دو برابر تخمک برآورد شده است (۲۷). در واقع ژنوم اسپرم پوشش تقریباً کاملی از متیلایسیون دارد، به‌جز در مناطق غنی از CpG، درحالی‌که تخمک‌ها یک هایپومتیلایسیون کلی را نشان می‌دهند (۴). دمتیلایسیون بعلاوه نشان داده‌شده که پیش‌هسته‌های نر و ماده بعد از لقاح الگوهای دمتیلایسیون مجزایی نشان می‌دهند (۹). همان‌گونه که قبلاً ذکر شد، پاک شدن پروفایل متیلایسیون DNA شامل مراحل فعال و غیرفعال است. دمتیلایسیون غیرفعال به علت عدم حضور DNMT1 کوفاکتور E3 یوبی‌کوئیتین پروتئین لیگاز UHRF1 است (۲۸)، درحالی‌که دمتیلایسیون فعال با آنزیم‌های TET انجام

اسپرماتیدهای طویل شده رخ می‌دهد که جایگزینی TP1 و TP2 با پروتامین‌ها می‌باشد. پروتامین‌ها عملکردهای مختلفی دارند: آن‌ها اجازه می‌دهند تراکم هسته رخ دهد و نقش مهمی در حک‌گذاری اپی‌ژنتیک ایفا می‌کنند (۵). پس از ورود اسپرم به تخمک، کروماتین اسپرم باید از تراکم خارج شود بنابراین پروتامین‌های درون پرونوکلئوس پدری با هیستون‌های مشتق شده از تخمک جایگزین می‌شوند که این فرایند قبل از لانه‌گزینی صورت می‌گیرد. با توجه به اهمیت پروتامین‌ها برای ساختار مناسب کروماتین اسپرم و ارتباط بین ساختار کروماتین اسپرم و برنامه‌ریزی مجدد اپی‌ژنتیک در گامت نر، مشاهده شده است که کمبود پروتامین در مردان نابارور ممکن است با وضعیت غیرطبیعی حک‌گذاری مرتبط باشد (۱۸). همچنین کمبود پروتامین اسپرم می‌تواند منجر به شکست لقاح و حاملگی در افراد نابارور گردد (۱۹). مطالعات بر روی ژن‌های اختصاصی اسپرماتوژنز نشان می‌دهد که دستیابی به الگوی مناسب متیلایسیون DNA توسط ژنوم اسپرم نقش حیاتی در بلوغ اسپرم دارد (۲۰). میزان متیلایسیون گامت‌های نر و ماده ممکن است پتانسیل تکوین جنین را تحت تاثیر قرار دهد (۲۱). پروفایل متیلایسیون DNA در بافت بیضه نسبت به بافت‌های سوماتیکی تا ۸ برابر جایگاه ژنی هایپومتیله بیشتر را نشان می‌دهد. مناطق هایپومتیله عموماً داخل توالی‌های غیرتکراری خارج پروموتورهای ژن قرارگرفته‌اند که با توالی‌های غنی از GC مرتبط هستند. مطالعات نشان داده‌اند که اسپرماتوژنز مختل شده، با متیلایسیون نادرست DNA در نواحی متیلایسیون DNA کلی (global DNA methylation Regions) مرتبط است.

برخلاف سلول‌های سوماتیک، سلول‌های زایای نر، DNA هایپومتیله دارند. نشان داده‌شده که هایپومتیلایسیون سلول‌های زایا باروری مردان را تحت تاثیر قرار می‌دهد، برای مثال هایپومتیلایسیون پروموتور CREM در اسپرماتیدها باعث نسبت غیرطبیعی پروتامین ۱ به پروتامین ۲ می‌شود و با تراکم ناقص کروماتین اسپرم، کاهش تحرک اسپرم و با ناباروری مرتبط است (۴). سطوح نابجای پروتامین در مردان الیگوزواسپرمی با الگوی تغییریافته متیلایسیون DNA در ۷ ژن imprinted مرتبط است (MEST, SNRPN, PLAGL1, PEG3, H19, IGF2, KCNQ10T1) (۲۲). تاثیر چندین فرایند اپی‌ژنتیک و تنظیم‌کننده روی حک‌گذاری اپی‌ژنتیک طی اسپرماتوژنز و تاثیر احتمالی آن روی باروری مردان بررسی شده است.

می‌شود. برخلاف مطالعات قبلی که عنوان می‌کردند فقط ژنوم جنس نر بعد از لقاح دستخوش دِمِتیلاسیون فعال می‌شود (۲۷)، مطالعات اخیر نشان می‌دهد که هر دو ژنوم پدری و مادری دِمِتیلاسیون فعال و غیرفعال را دارند. با این حال میزان دِمِتیلاسیون فعال یا درجه دِمِتیلاسیون در پرونوکلئوس نر نسبت به پرونوکلئوس ماده بالاتر است، این به احتمال زیاد به دلیل متیلاسیون اولیه بالاتر در اسپرم است (۲۹).

بحث

متیلاسیون و ناباروری

با در نظر گرفتن اهمیت متیلاسیون DNA اسپرم به عنوان تنظیم‌کننده اصلی اپی‌ژنتیک، مطالعات متعددی سطح آن را در افراد نابارور در مقایسه با افراد بارور پایین‌تر گزارش کرده‌اند و نشان داده‌اند که در بین نمونه‌های افراد نابارور هتروژنیسیته بیشتری در سطح متیلاسیون DNA اسپرم وجود دارد (۳۲-۳۰). در این راستا Benchaib و همکارانش در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که میزان باروری در افراد دارای شدت بالای متیلاسیون DNA، بالاتر است (۳۳). متیلاسیون غیرطبیعی در ژن‌های حک‌گذاری شده می‌تواند منجر به اسپرماتوژنز غیرطبیعی شود مثلاً مردان نابارور با حک‌گذاری ژنومی غیرطبیعی H19 مستعد نقایص اسپرماتوژنی هستند (۳۴،۳۵). به علاوه، مهار بیان آنزیم‌های DNMTs (مسئول متیلاسیون نواحی حک‌گذاری شده) منجر به الیگوزواسپرمی در مردان می‌شود (۳۴). هایپومتیلاسیون و هایپرمتیلاسیون رشته DNA ممکن است به‌طور منفی فرایند تمایز سلول اسپرماتوگونی به اسپرماتوزوا را تحت تاثیر قرار دهد که منجر به subfertility و یا ناباروری شود (۹،۳۴). در سال ۲۰۱۱ Minor و همکاران گزارش دادند که متیلاسیون DNA در مناطق DMR ژن H19 به‌طور قابل توجهی در سلول‌های اسپرم بیضه بیماران آزواسپرمی انسدادی در مقایسه با مردان بارور بالاتر بوده است (۳۶). Pacheco در سال ۲۰۱۱ دریافت که ۹۱۸۹ سایت CpG میزان‌های مختلفی از DNA متیلاسیون متفاوت در بیماران نابارور داشتند که می‌تواند با تحرک پایین نمونه‌های اسپرم در مقایسه با افراد بارور همراه باشد. در آن مطالعه افزایش بیان DNMT3A در سلول‌های اسپرمی که تحرک کم و سایت‌های CpG هایپومتیله شده داشتند، شناسایی شد (۳۷). در جدول ۱ خلاصه‌ای از برخی مقالاتی که متیلاسیون DNA و آنزیم‌های DNMT را در افراد نابارور

بررسی کرده‌اند، گزارش شده است (۹). از آنجایی که DNMT1 در تمام انواع سلول‌های اسپرماتوژنیک انسانی بیان می‌شود، به نظر می‌رسد که فاکتور مهمی برای اسپرماتوژنز طبیعی باشد؛ بنابراین بیان غیرطبیعی DNMT1 در بافت‌های بیضه به‌دست‌آمده از بیماران دارای نقص اسپرماتوژنز شناسایی شد و مشابه آن هم در مدل موشی گزارش شده است (۳۸). Ordinguio و همکارانش (۲۰۱۵) مشخص کردند که سطوح متیلاسیون DNA در سلول‌های اسپرم حاصله از بیماران ناباروری ناشناخته، الگوهای متیلاسیون متفاوتی در مقایسه با مردان بارور نشان دادند (۳۹). به علاوه آسیب رشته DNA هم می‌تواند نتایج بالینی را در گروه‌های مختلف نابارور تحت تاثیر قرار دهد (۱۹،۴۰،۴۱).

سبک زندگی و ناباروری

اخیراً محققین به بررسی تاثیر عوامل محیطی و رژیم غذایی بر اپی‌ژنتیک توجه خاصی کرده‌اند. مطالعات موشی در این زمینه نشان داده است که عوامل رژیم غذایی می‌تواند چشم‌انداز اپی‌ژنتیک را در سلول‌های زایا تغییر دهد و اسپرم نیز می‌تواند این علائم اپی‌ژنتیک تغییر یافته را به نسل بعد منتقل کند (۴۲،۴۳). در مردان، تکوین سلول بنیادی اسپرماتوگونی به اسپرم بالغ ۶۴ روز طول می‌کشد و به دنبال آن ۲ هفته زمان بلوغ اپی‌دیدیمی است؛ بنابراین هرگونه تأثیری از تغییر در عادات‌های غذایی روی کیفیت اسپرم تا سه ماه بعد از تغییر محسوس نخواهد بود (۴). Takumi و همکارانش در سال ۲۰۱۵ در آزمایشی نشان دادند که موش‌های تغذیه‌شده با رژیم غذایی با مقدار ناکافی متیونین-کولین برای یک هفته کاهش سطوح S-آدنوزیل متیونین (SAM) را در کبد نشان دادند (۴۴). بعلاوه Eustche و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه خود نشان دادند که در معرض قرارگیری رت‌ها با دوز پایین مواد فتوشیمیایی از جمله genistein (یک ایزوفلاوین در دانه‌های سویا و محصولات سویا) با ناباروری جنس نر مرتبط بود که منجر به کاهش تعداد اسپرم، کاهش تحرک و رونوشت نابجا در سلول‌های جنسی نر شد (۴۵). به‌جز مواد فتوشیمیایی، مواد معدنی و ویتامین‌ها هم می‌توانند تنظیمات اپی‌ژنتیک را تحت تاثیر قرار دهند. مطالعات متعددی بهبود کیفیت اسپرم انسان از طریق مکمل‌های غذایی با فولات، ویتامین C، ویتامین D، ویتامین E، β -کاروتن، لیکوپن و روی Zn را گزارش داده‌اند (۴). در رت‌ها کمبود فولات در پدر و مادر به مدت ۴ هفته قبل از تولیدمثل با متیلاسیون نابجای DNA، فولات کاهش یافته و هموسیستئین افزایش یافته پلاسمایی در کبد فرزندانشان همراه بود (۴۶).

محتوای پروتامین؛ در سلول اسپرم و تخمک با تاثیر بر الگوهای متیلاسیون DNA (۵۱). علاوه بر این، متیلاسیون CpGs، همراه با متیلاسیون لیزین هیستون (۵۲)، وضعیت کروماتین را تنظیم می‌کند به طوری که متیلاسیون گسترده با فشرده‌گی کروماتین، منجر به یک وضعیت رونویسی خاموش که یک فاز بلوغ ضروری برای هر دو اسپرم و تخمک است، می‌شود. جزایر CpG عمده‌ترین هدف آسیب اکسیداتیو هستند. اکسیداسیون سیتوزین‌های متیله شده در CpGs ها تولید هیدروکسی متیل سیتوزین (OH-MC) می‌کند که مرحله شروع برای دمتیلاسیون فعال است و ممکن است منجر به از دست دادن نشانه‌های اپیژنتیک شود. علاوه بر این، در جزایر CpG که به درستی متیله شده‌اند اکسیداسیون متیل سیتوزین و یا متیل گوانوزین (برای ایجاد ۸-اکسو-گوانوزین) باعث از دست دادن مهار اتصال فاکتورهای رونویسی، یعنی از دست دادن تنظیم اپیژنتیک می‌شود (۵۱). از دست دادن تنظیم اپیژنتیک در گامت‌ها منجر به فنوتیپ نامنظم می‌شود که قطعاً توان لقاح و همچنین فعال‌سازی، زنده ماندن و تکوین جنین تولید شده را تحت تاثیر قرار می‌دهد. آسیب DNA متیلاسیون ناشی از استرس اکسیداتیو هم بر ثبات و هم بر تفکیک کروموزوم تاثیر می‌گذارد و ممکن است به آنیوپلویدی هر دو اسپرم و تخمک منجر شود (۵۳). لذا بهبود آسیب اکسیداتیو گامت‌های نر با مصرف مکمل‌های حاوی آنتی‌اکسیدانت‌های خوراکی ممکن است کیفیت گامت و شانس برای رسیدن به یک حاملگی موفق را بهبود بخشد (۵۱).

تکنیک‌های کمک باروری

امروزه یکی از درمان‌های مهم و بسیار معمول برای افراد نابارور استفاده از تکنیک‌های کمک باروری ART (Assisted Reproductive Techniques) است. اولین نوزاد حاصل از IVF (In vitro fertilization) در سال ۱۹۷۸ متولد شد و در سال ۱۹۹۲ تکنیک ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) برای درمان ناباروری مردان معرفی شد. تعداد بسیاری از مقالات، شامل مطالعات انسانی و حیوانی، نگرانی‌هایی در مورد افزایش خطر بیماری‌های مختلف در فرزندان حاصل از ART را مطرح کرده‌اند (۵۴،۵۵). سوپراوولاسیون (القای مصنوعی تخمک‌گذاری با دوز بالای گنادوتروپین) روند متیلاسیون، تکوین و رشد جنین را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۵۴،۵۶). بعلاوه انجماد جنین نیز ممکن است اثرات مخربی بر DNA، بیان ژن جنینی، تلومرها و سلامت غشای پلاسمایی و غشاء هسته‌ای داشته باشد (۵۴)؛ Chiba و همکارانش (۲۰۱۳) بیان

یک متآنالیز منتشرشده در سال ۲۰۱۵ از ۳۰ مقاله شامل ۱۱۵۱۵۸ شرکت‌کننده، ارتباط معنی‌داری بین چاقی مردان و کاهش توان باروری و نیز کاهش تولد زنده را گزارش کردند (۴۷). به دنبال کاهش وزن، بهبود تعداد اسپرم، مورفولوژی، تحرک و سلامت DNA هم در انسان و هم در موش نر دیده شد و در اسپرم موش‌های نر چاق تغییر در رونویسی ژن‌های سلول‌های زایا در بیضه و بیان miRNA و همینطور الگوهای نابجای متیلاسیون DNA و در اسپرم آن‌ها را نشان داده شد (۴۸)؛ بنابراین subfertility ناشی از چاقی ممکن است با تغییرات علائم اپیژنتیک اسپرم ایجاد شود. موش‌های نر با رژیم غذایی چرب در اسپرماتیدهای طولی، علاوه بر کاهش متیلاسیون DNA، کاهش بیان هیستون داستیلز را دارند که منجر به شکست DNA و افزایش استیلاسیون هیستون می‌شود (۴۹). عوامل شیمیایی هم می‌تواند متیلاسیون DNA را مهار کند یا دمتیلاسیون DNA را القا کند. آن‌ها به طور گسترده‌ای در تحقیقات مربوط به متیلاسیون DNA بکار می‌روند. 5-Azocytidin یک آنالوگ شیمیایی سیتوزین است که با غلظت کم مانع متیلاسیون DNA می‌شود. مطالعات اخیر آشکار کرده که ویتامین C هم می‌تواند دمتیلاسیون DNA را با افزایش فعالیت آنزیم‌های TET القا کند بنابراین تبدیل 5mC به فرم دمتیله 5hmC را بهبود می‌بخشد (۱۲). همچنین محققین دریافتند که برخی عوامل مانند سیگار کشیدن و پیری ممکن است به طور منفی بر استقرار متیلاسیون DNA طی اسپرماتوژنز تاثیر بگذارد؛ مثلاً کشیدن سیگار باعث افزایش متیلاسیون DNA در نواحی پروموتور ژن *pebp1* (پروتئین متصل شونده به فسفاتیدیل اتانل آمین) در بیضه موش می‌شود (۵۰). در مجموع، این مطالعات نشان می‌دهد که فاکتورهای تغذیه‌ای، اضافه و حذف شدن نشان‌های شیمیایی از DNA یا هیستون‌ها آن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند و این علائم اپیژنتیک وراثتی بوده و قادر است ژن‌های فرزند را به طور غیرطبیعی خاموش یا روشن کند. افزایش سطح استرس اکسیداتیو از جمله عوامل مهمی است که می‌تواند تاثیر بسزایی بر روی ساختار کروماتین گامت و تغییرات اپیژنتیک بگذارد. آسیب اکسیداتیو مولکولی در تمام سلول‌ها رخ می‌دهد اما به احتمال بسیار زیاد توسط آنتی‌اکسیدانت‌های داخل سلولی ترمیم خواهد شد. اسپرماتیدها، تخمک‌ها و سلول زیگوت دارای ظرفیت ترمیم قدرتمند هستند، اما افزایش بیش از حد اکسیداتیو ممکن است ساختار کروماتین و تنظیم اپیژنتیک گامت‌ها را حداقل به دو طریق تحت تاثیر قرار دهد: در اسپرم، با تاثیر بر

هایپومتیلاسیون DNA مواجه هستند (۳۱). همچنین مطالعه بحرینیان و همکارانش نشان داد که نه تنها پارامترهای اسپرمی در افراد مبتلا به واریکوسل کمتر است، بلکه درصد ROS، آسیب DNA و کمبود پروتامین اسپرم به طور معنی داری در این افراد بالاتر بود. علاوه بر این، درصد و شدت متیلاسیون DNA در افراد مبتلا به واریکوسل در مقایسه با مردان بارور کمتر بود. این نتایج نشان می‌دهد که اسپرم افراد مبتلا به واریکوسل درجه بلوغ پایین‌تر، میزان شکست DNA بالاتر و وضعیت اپیژنتیک تغییر یافته‌تری دارند (۳۲). در عصر فن‌آوری‌های کمک باروری (ART)، تفاوت قابل توجه در محیط کشت جنین‌های IVF و جنین‌های طبیعی در نظر گرفته می‌شود. برخورد با عوامل محیطی ممکن است علائم اپیژنتیک را تغییر داده و به طور منفی سلامت جنین در زمان بلوغ را تحت تاثیر قرار دهد. مشاهده شده که سطوح TET2 در اسپرم به طور معنی داری با میزان بارداری در زوج‌های تحت درمان IVF ارتباط دارد. بعلاوه ارتباط معنی داری بین متیلاسیون DNA اسپرم با میزان حاملگی وجود دارد (۳۳).

متیلاسیون DNA یکی از عوامل تنظیم اپیژنتیکی است که بعنوان تنظیم‌گر اصلی بیان ژن در طی رشد و تمایز سلول نقش دارد. متیلاسیون DNA بیان ژن‌های بیضه‌ای که برای فرآیند طبیعی اسپرماتوژنز ضروری است را تنظیم می‌کند. هر گونه نقص در آنزیم‌های دخیل در فرآیند متیلاسیون DNA و یا عواملی از جمله افزایش سطح استرس اکسیداتیو، سبک زندگی افراد (تغذیه و عوامل محیطی) و یا دستکاری‌های تجربی در طی درمان افراد نابارور در روند استفاده از تکنیک‌های کمک باروری می‌تواند بر الگوی متیلاسیون DNA تاثیر گذارد و سلامت و رشد جنین و حتی نسل آینده را تحت تاثیر قرار دهد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری مسئولین پژوهشگاه رویان که زمینه اجرای این تحقیق را فراهم آوردند تقدیر و تشکر می‌شود.

کردند که خود تکنیک‌های ART (IVF, ICSI) و سایر روش‌های مربوطه از طریق دست‌کاری تخمک و اسپرم، می‌تواند خطاهای حک‌گذاری را در جنین منجر شود (۵۷). در جنین‌های موشی که پیش از مرحله لانه‌گزینی در سرم کشت شده بودند، بیان و متیلاسیون چندین ژن حک‌گذاری شده (مانند H19, IGF2, GRB10, GRB7) تغییر یافته بود و این تغییرات ناهنجار اپیژنتیک، منجر به رشد غیرطبیعی جنین در حیوانات ART می‌گردد (۵۸). در انسان شیوع بالای سندرم‌های مرتبط با تغییرات حک‌گذاری به‌ویژه سندرم‌های بک ویت وایدمن (Beckwith-Wiedemann) و آنجلمن (Angelman syndrome) AS در بچه‌های متولد شده از ART در مقایسه با بچه‌های متولد شده طبیعی گزارش شده است (۵۹،۶۰). مطالعات ریسک بالای چاقی یا دیابت نوع II را در زمان بزرگسالی کودکان حاصل از ART نیز در مطالعه‌ای نشان داده شده است (۶۱). این نتایج نشان می‌دهد اثر فرایندهای ART نه تنها در هنگام تولد بلکه در اواخر دوران کودکی یا حتی زمان بزرگسالی هم آشکار می‌شود. البته برخلاف این مطالعات اخیراً سلامت نوزادان پس از تکنیک ICSI گزارش شد که نوزادان از سلامت جسمی، روحی و روانی برخوردار بودند (۶۲). چندین مطالعه نشان دادند که تغییرات متیلاسیون DNA در جایگاه‌های حک‌گذاری شده در اسپرم مردان الیگوزواسپرمی به ارث می‌رسد (۳۵،۶۳).

واریکوسل از بحث‌انگیزترین موضوعات در زمینه آندرولوژی است، مکانیسم دقیقی که از طریق آن واریکوسل اسپرماتوژنز یا عملکرد بیضوی را تحت تاثیر قرار می‌دهد هنوز روشن نشده است. میزان استرس اکسیداتیو در افراد واریکوسل نسبت به افراد بارور بالاتر است (۶۴) که این تولید ROS باعث پراکسیداسیون لیپیدی بالا و افزایش آسیب DNA در اسپرم این افراد می‌شود. علاوه بر این یک ارتباط معنی‌دار منفی بین ROS و تغییرات اپیژنتیک مانند متیلاسیون DNA در مردان نابارور گزارش شده است (۶۵). در این راستا گزارش شده است که شدت متیلاسیون DNA به‌طور معنی داری در افراد الیگوزواسپرمی که واریکوسل داشته‌اند در مقایسه با افراد سالم پایین‌تر بوده، بنابراین افراد الیگواسپرمی با شدت بیشتری با

REFERENCES

1. Waddington CH, Ed. The Evolution of an Evolutionist. Ithaca, NY: Cornell University Press; 1975.
2. Liyanage VR, Jarmasz JS, Murugesan N, Del Bigio MR, Rastegar M, Davie JR. DNA modifications function and applications in normal and disease States. *Biology (Basel)* 2014; 3: 670 -723.
3. Hashimoto H, Vertino PM, Cheng X. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics* 2010; 2:657-69.

4. Schagdarsurengin U, Steger K. Epigenetics in male reproduction: effect of paternal diet on sperm quality and offspring health. *Nat Rev Urol* 2016; 13: 584-95.
5. Stuppia L, Franzago M, Ballerini P, Gatta V, Antonucci I. Epigenetics and male reproduction: the consequences of paternal lifestyle on fertility, embryo development, and children lifetime health. *Clin Epigenetics* 2015; 7:120.
6. Boissonnas CC, Jouannet P, Jammes H. Epigenetic disorders and male subfertility. *Fertil Steril* 2013; 99: 624–31.
7. Razin A, Riggs AD. DNA methylation and gene function. *Science* 1980; 210: 604–10.
8. Yuan HF, Zhao K, Zang Y, Liu CY, Hu ZY, Wei JJ, *et al.* Effect of folate deficiency on promoter methylation and gene expression of *Esr1*, *Cav1*, and *Elavl1*, and its influence on spermatogenesis. *Oncotarget* 2017; 8: 24130-141.
9. Uysal F, Akkoyunlu G, Ozturk S. DNA methyltransferases exhibit dynamic expression during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2016; 33:690-702.
10. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy. *Genes Cancer* 2011; 2:607-17.
11. Moison C, Guieysse-Peugeot AL, Arimondo PB. DNA methylation in cancer. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2014; 18: 285-92.
12. Sun X, St John JC. The role of the mtDNA set point in differentiation, development and tumorigenesis. *Biochem J* 2016; 473: 2955-71.
13. Schaevitz LR, Picker JD, Rana J, Kolodny NH, Shane B, Berger-Sweeney JE, *et al.* Glutamate carboxypeptidase II and folate deficiencies result in reciprocal protection against cognitive and social deficits in mice: implications for neurodevelopmental disorders. *Dev Neurobiol* 2012; 72:891-905.
14. Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 2013; 502: 472–9.
15. Tan L, Shi YG. Tet family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in development and disease. *Development* 2012; 139:1895-902.
16. Williams K, Christensen J, Helin K. DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep* 2012; 13: 28-35.
17. Branco MR, Ficz G, Reik W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat Rev Genet* 2012; 13:7-13.
18. Aoki VW, Emery BR, Carrell DT. Global sperm deoxyribonucleic acid methylation is unaffected in protamine-deficient infertile males. *Fertil Steril* 2006; 86:1541 –3.
19. Tavalae M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2009; 91:1119-1126.
20. Trasler JM, Hake LE, Johnson PA, Alcivar AA, Millette CF, Hecht NB. DNA methylation and demethylation events during meiotic prophase in the mouse testis. *Mol Cell Biol* 1990; 10:1828 –34.
21. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Embryogenesis: demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 2000; 403:501-502.
22. Hammoud SS, Purwar J, Pflueger C, Cairns BR, Carrell DT. Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertil Steril* 2010; 94:1728–33.
23. Sonnack V, Failing K, Bergmann M, Steger, K. Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* 2002; 34:384–90.
24. Ni K, Dansranjav T, Rogenhofer N, Oetzuerk N, Deuker J, Bergmann M, *et al.* TET enzymes are successively expressed during human spermatogenesis and their expression level is pivotal for male fertility. *Hum Reprod* 2016; 31:1411–24.
25. Potok ME, Nix DA, Parnell TJ, Cairns BR. Reprogramming the Maternal Zebrafish Genome after Fertilization to Match the Paternal Methylation Pattern. *Cell* 2013; 153:759-72.
26. Molaro A, Hodges E, Fang F, Song Q, Mc Combie WR, Hannon G.J, *et al.* Sperm methylation profiles reveal features of epigenetic inheritance and evolution in primates. *Cell* 2011; 146:1029-41.
27. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001;293:1089–93.
28. Kagiwada S, Kurimoto K, Hirota T, Yamaji M, Saitou M. Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *EMBO J* 2013; 32:340–53.

29. Smith ZD, Chan MM, Humm KC, Karnik R, Mekhoubad S, Regev A, et al. DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo. *Nature* 2014; 511:611–5.
30. Houshdaran S, Cortessis VK, Siegmund K, Yang A, Laird PW, Sokol RZ. Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PLoS One* 2007; 2:e1289.
31. Tavalae M, Bahreinian M, Barekat F, Abbasi H, Nasr-Esfahani, M.H. Effect of varicocele on sperm functional characteristics and DNA methylation. *Andrologia J* 2014; 47:904-9.
32. Bahreinian M, Tavalae M, Abbasi H, Kiani-Esfahani A, Shiravi AH, Nasr-Esfahani MH. DNA hypomethylation predisposes sperm to DNA damage in individuals with varicocele. *Syst Biol Reprod Med* 2015; 61:179-186.
33. Benchaib M, Braun V, Ressnikof D, Lornage J, Durand P, Ivelau A, et al. Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Hum Reprod* 2005; 20:768–73.
34. Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet* 2007; 16:2542–51.
35. Marques CJ, Costa P, Vaz B, Carvalho F, Fernandes S, Barros A, et al. Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 2008; 14:67–74.
36. Minor A, Chow V, Ma S. Aberrant DNA methylation at imprinted genes in testicular sperm retrieved from men with obstructive azoospermia and undergoing vasectomy reversal. *Reproduction* 2011; 141:749–57.
37. Pacheco SE, Houseman EA, Christensen BC, Marsit CJ, Kelsey KT, Sigman, M, et al. Integrative DNA methylation and gene expression analyses identify DNA packaging and epigenetic regulatory genes associated with low motility sperm. *PLoS One* 2011; 6:e20280.
38. Marques CJ, Joao Pinho M, Carvalho F, Bieche I, Barros A, Sousa M. DNA methylation imprinting marks and DNA methyltransferase expression in human spermatogenic cell stages. *Epigenetics* 2011; 6:1354–61.
39. Urdinguio RG, Bayon GF, Dmitrijeva M, Torano EG, Bravo C, Fraga MF, et al. Aberrant DNA methylation patterns of spermatozoa in men with unexplained infertility. *Hum Reprod* 2015; 30:1014–28.
40. Eskandari N, Tavalae M, Zohrabi D, Nasr-Esfahani MH. Association between total globozoospermia and sperm chromatin defects. *Andrologia* 2018;50.
41. Aghajanzpour S, Ghaedi K, Salamian A, Deemeh MR, Tavalae M, Moshtaghian J, et al. Quantitative expression of phospholipase C zeta, as an index to assess fertilization potential of a semen sample. *Hum Reprod* 2011; 26:2950-2956.
42. Lambrot R, Xu C, Saint-Phar S, Chountalos G, Cohen T, Paquet M, et al. Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. *Nat Commun* 2013; 4: 2889.
43. Radford EJ, Ito M, Shi H, Corish JA, Yamazawa K, Isganaitis E, et al. In utero effects. In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. *Science* 2014; 345:125903.
44. Takumi S, Okamura K, Yanagisawa H, Sano T, Kobayashi Y, Nohara K. The effect of a methyl-deficient diet on the global DNA methylation and the DNA methylation regulatory pathways. *J Appl Toxicol* 2015; 35:1550–6.
45. Eustache F, Mondon F, Mondon MC, Lesaffre C, Fulla Y, Berges R, et al. Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility. *Environ Health Perspect* 2009; 117:1272–9.
46. Mejos KK, Kim HW, Lim EM, Chang N. Effects of parental folate deficiency on the folate content, global DNA methylation, and expressions of FR α , IGF-2 and IGF-1R in the postnatal rat liver. *Nutr Res Pract* 2013; 7:281–6.
47. Campbell JM, Lane M, Owens JA, Bakos HW. Paternal obesity negatively affects male fertility and assisted reproductive outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2015; 31:593–604.
48. Fullston T, Palmer NO, Owens JA, Mitchell M, Bakos HW, Lane M. Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. *Hum Reprod* 2012; 27:1391–400.
49. Palmer NO, Fullston T, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. SIRT6 in mouse spermatogenesis is modulated by diet-induced obesity. *Reprod Fertil Dev* 2011; 23: 929–39.
50. Xu W, Fang P, Zhu Z, Dai J, Nie D, Chen Z, et al. Cigarette smoking exposure alters pebp1 DNA methylation and protein profile involved in MAPK signaling pathway in mice testis. *Biol Reprod* 2013; 89:142.
51. Dattilo M, Giuseppe D, Ettore C, Ménéz Y. Improvement of gamete quality by stimulating and feeding the endogenous antioxidant system: mechanisms, clinical results, insights on gene-environment interactions and the role of diet. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33:1633-48.

52. Rose NR, Klose RJ. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochim Biophys* 2014; 1839:1362-72.
53. Chan RC, Severson AF, Meyer BJ. Condensin restructures chromosomes in preparation for meiotic divisions. *J Cell Biol* 2004; 167: 613-625.
54. Kitamura A, Miyauchi N, Hamada H, Hiura H, Chiba H, Okae H, *et al.* Epigenetic alterations in sperm associated with male infertility. *Congenit Anom (Kyoto)* 2015; 55:133-144.
55. Ghosh J, Coutifaris C, Sapienza C, Mainigi M. Global DNA methylation levels are altered by modifiable clinical manipulations in assisted reproductive technologies. *Clin Epigenetics* 2017; 9:14.
56. Sato A, Otsu E, Negishi H, Utsunomiya T, Arima T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod* 2007; 22:26-35.
57. Chiba H, Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, *et al.* DNA methylation errors in imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Pediatr Int* 2013; 55:542-9.
58. Khosla S, Dean W, Brown D, Reik W, Feil R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod* 2001; 64:918-26.
59. Gosden R, Trasler J, Lucifero D, Faddy M. Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. *Lancet* 2003; 361:1975-7.
60. Castillo-Fernandez JE, Loke YJ, Bass-Stringer S, Gao F, Xia Y, Wu H, *et al.* DNA methylation changes at infertility genes in newborn twins conceived by in vitro fertilisation. *Genome Med* 2017; 9:28.
61. Chen M, Norman RJ, Heilbronn LK. Does in vitro fertilisation increase type 2 diabetes and cardiovascular risk? *Curr Diabetes Rev* 2011; 7:426-32.
62. Deemeh MR, Tavalaei M, Nasr-Esfahani MH. Health of children born through artificial oocyte activation: a pilot study. *Reprod Sci* 2015; 22:322-8.
63. Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM, Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2013; 11:66.
64. Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 2006; 21:986-93.
65. Tunc O, Tremellen K. Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26:537-44.