Sarem Journal of Medical Research. Volume 6, Issue 1, spring 2021: 35-43

Sperm Epigenome Characteristics Related to Folic Acid: A Randomized Controlled Trial

ARTICLE INFO

Article Type
Original article

Authors

Ali Reza Talebi [1], PhD
Ehsan Farashahi Yazd [2], PhD
Javad Amini Mahabadi [3], PhD
Saeed Ghasemi-Esmailabad [1], PhD
Esmat Mangoli [2], PhD
Tahereh Rahiminia[3*], PhD

[1] Research and Clinical Center for Infertility; Shahid Sadoughi University of Medical Sciences; Yazd: Iran.
[2] Stem Cell Biology Research Center, Research and Clinical Centre for Infertility; Shahid Sadoughi University of Medical Sciences; Yazd: Iran
[3] Ph.D of Reproductive Biology, Gametogenesis Research Center, fertility and infertility, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.

Corresponding Author
Address: Gametogenesis Research Center, Fertility, and Infertility Center; Kashan University of Medical Sciences; Kashan: Iran.
Postcode: 8715981151
Work Phone: +98 03155540026
Work Phone: +98 09133643211
tahereh.rahiminia@gmail.com

Article History
Received: June 10, 2021
Accepted: June 21, 2021
e Published: December 15, 2021

ABSTRACT

Aims: Folic acid is a prominent intermediary in transferring the methyl groups in DNA synthesis, stability, and integrity.
Material and methods: In this study, we divided one hundred subjects into three groups as the controls, as well as two randomly intervention groups such as first treatment (vitamin E 400 IU and selenium 200 µg per day) and second treatment (selenium 200 µg, folic acid 5 mg daily, & vitamin E 400 IU). The DNA methylation percentages, the sperm chromatin/DNA quality, and DNMTs expressions profiles were evaluated before and after each intervention using ELISA, cytochemical tests, and qRT-PCR, respectively.
Results: Sperm parameters were considerably enhanced in comparison to the three-drug group. Moreover, sperm decondensation and fragmentation of sperm DNA in the three-drug group were significantly lower than in the two-drug group. The global methylation of sperm DNA in the three-drug group was significantly reduced compared to pre-intervention.
Conclusion: The increased global methylation has an association with the declined sperm parameters as well as chromatin integrity. The expression of DNMTs was not affected by the intervention. The utilization of folic¬ acid could ameliorate sperm quality and epigenetic features in terms of balancing the status of global methylation, increasing DNA integrity and chromatin, and also improving the sperm parameters.

Keywords: Methyltransferases; Gene Expression; Spermatozoa, Global Methylation; Chromatin; Folic Acid.

Abbreviations:

DNMTs: DNA Methyltransferases
qRT-PCR: Quantitative real time polymerase chain reactions.
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.
SAM: S-Adenosyl-L-Methionine

Copyright© 2021, ASP Ins. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License which permits Share (copy and distribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-Noncommercial terms.

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-09-10]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.1.35]

ویژگی‌های اپی‌ژنوم اسپرم مربوط به اسید فولیک: یک کارآزمایی تصادفی کنترل شده

علیرضا طالبی[۱]، احسان فرح شاهی یزدی[۲]، جواد امینی مهابادی[۳]، سعید قاسمی اسماعیل آباد[۱]، عصمت منگلی[۲]، طاهره رحیمی‌نیا*[۳]

[۱] مرکز تحقیقات و بالینی ناباروری؛ دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد-ایران.
[۲] مرکز تحقیقات زیست شناسی سلول های بنیادی، مرکز تحقیقات و بالینی ناباروری؛ دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد-ایران.
[۳] دکترای بیولوژی تولید مثل، مرکز تحقیقات گامتوژنزیس، باروری و ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان-ایران.

چکیده

هدف: اسید فولیک یک واسطه ی مهم در انتقال گروه های متیل در سنتز، ثبات و یکپارچگی DNA است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ما تعداد ۱۰۰ نفر را به سه گروه، شامل گروه کنترل و همچنین دو گروه مداخله تصادفی شامل، اولین درمان (ویتامین E به میزان ۴۰۰ واحد بین‌المللی و سلنیوم ۲۰۰ میکروگرم در روز) و دومین درمان (سلنیوم ۲۰۰ میکروگرم، اسید فولیک ۵ میلی‌گرم در روز و ویتامین E به مقدار ۴۰۰ واحد بین‌المللی) تقسیم کردیم. درصد متیلاسیون DNA، کیفیت کروماتین اسپرم/DNA و مشخصات بیان DNMTs قبل و بعد از هر مداخله به ترتیب با استفاده از ELISA، تست‌های سیتوشیمیایی و qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته ها: پارامترهای اسپرم در مقایسه با گروه سه دارویی به میزان قابل توجهی افزایش یافته است. علاوه بر این، تراکم اسپرم و فرگمنته شدن DNA اسپرم در گروه سه دارویی به طور قابل توجهی کمتر از گروه دو دارویی بود. متیلاسیون گلوبال DNA اسپرم در گروه سه دارویی در مقایسه با قبل از مداخله به میزان قابل توجهی کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: افزایش متیلاسیون گلوبال با کاهش پارامترهای اسپرم و دست نخوردگی کروماتین ارتباط دارد. بیان DNMT ها تحت تأثیر مداخله قرار نگرفت. استفاده از اسید فولیک می‌تواند کیفیت اسپرم و ویژگی‌های اپی‌ژنتیکی را از نظر متعادل کردن وضعیت متیلاسیون گلوبال، افزایش یکپارچگی DNA و کروماتین و همچنین اصلاح پارامترهای اسپرم بهبود بخشد.

کلید واژه‌ها: متیل ترانسفرازها؛ بیان ژن؛ اسپرم؛ متیلاسیون گلوبال؛ کروماتین؛ اسید فولیک.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۳۱
*نویسنده مسئول: طاهره رحیمی‌نیا

مقدمه

ناباروری، شایع‌ترین مشکل سلامتی است که نسبت مساوی از مردان و زنان را درگیر می‌کند [۱]. در بهبود کروماتین اسپرم، تاکنون مکمل‌ها به عنوان تکمیل کننده در فرآیند اسپرماتوژنز در مردانی که دارای نقص کیفیت اسپرم هستند، استفاده شده‌اند [۲]. به عنوان مثال، نقش ویتامین E با اثرات آنتی‌اکسیدانی آن در ایجاد اسپرماتوژنز طبیعی در عملکرد طبیعی اسپرم مهم است [۳]. جهت بهبود عملکرد اسپرم و غدد ضمیمه، استفاده از این ویتامین یا سایر آنتی‌اکسیدان‌ها مانند سلنیوم را منطقی می‌سازد [۴]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز [۱] وابستگی شدیدی به حضور سلنیوم در محل فعال آنزیم‌ها دارد. این آنزیم در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپید غشای اسپرم موثر است و در نهایت با بهبود تحرک اسپرم بر عملکرد اسپرم تأثیر می‌گذارد [۵]. از نگاه دیگر، در ناباروری مردان تغییرات اپی‌ژنتیکی می‌تواند در تعدیل و نگهداری سلول‌های زایای مردان نقش داشته باشند. بنابراین، اختلالات اپی‌ژنتیکی با اختلالات تنظیم متیلاسیون DNA در سلول‌های اسپرم همراه است [۶و۷]. تغییرات قابل توجه در سطح متیلاسیون نمونه‌های اسپرم در مردان نابارور منجر به سقط جنین در حدود ۲۰ درصد موارد می‌شود. نتیجه‌ای که این مسئله را تأیید می‌کند این است که اختلالات اپی‌ژنتیکی می‌توانند دلیلی برای افزایش وقوع سقط جنین در انسان باشد [۸]. اسپرم‌های با کیفیت مناسب، احتمالاً دارای وضعیت ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی پایدار بوده و اطلاعات کافی را در مورد رشد و نمو جنین ارایه می‌دهند [۹].

یکی از خانواده‌های DNA متیل ترانسفرازها [۲] متیلاسیون DNA را کاتالیز می‌کند. *DNMT1* یکی از فراوان‌ترین DNMT ها در سلول‌های سوماتیک است و در رشته DNA نیمه متیله، دارای اولویت عملکردی است. بنابراین،

[۱] Glutathione Peroxidase

[۲] DNA methyltransferases (DNMTs)

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-09-10]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.1.35]

به عنوان آنزیم اصلی مسئول کپی و حفظ الگوی متیلاسیون پس از تکثیر DNA در نظر گرفته می‌شود [۱۰]. علاوه بر این، *DNMT3B* و *DNMT3A* هر دو کاندیدای مهمی برای تشکیل الگوهای متیلاسیون جدید هستند [۱۱]. یکی از واسطه‌های مهم در انتقال گروه‌های متیل، اسید فولیک است که به سنتز DNA، ثبات، یکپارچگی و به عنوان اهدا کننده اصلی متیل در متیلاسیون و تولید ماکرومولکول کمک می‌کند [۱۲]. اسید فولیک به ۵-متیل تتراهیدروفولات [۳]تبدیل می شود که در تبدیل هموسیستئین [۴]به متیونین [۵]نقش دارد. سپس، متیونین به اس-آدنوزیل متیونین [۶]متابولیزه می‌شود که یکی از اهدا کنندگان متیل در متیلاسیون و سنتز ماکرومولکولی است [۱۳].

در یک مطالعه با بررسی اثر سولفات روی و همچنین اسید فولیک بر کیفیت اسپرم، محققان محتوای پروتامین و یکپارچگی آکروزوم بعد از واریکوسلکتومی [۷]را مورد ارزیابی قرار دادند؛ هر دو مکمل به عنوان ضد رادیکال‌های آزاد اکسید کننده، بیشترین تاثیرات را در متغیرها داشتند [۱۴]. در مردانی که میزان فولات بیشتری دریافت کردند، کاهش فراوانی از انواع مختلف آنیوپلوئیدی اسپرم مانند تریزومی۲۱ و X گزارش شد [۱۵]. در یک مدل حیوانی، دریافت رژیم غذایی بدون اسید فولیک به مدت ۳۶ هفته منجر به تغییرات جبران ناپذیری شد و این نشان می دهد که کمبود طولانی مدت رژیم غذایی باعث ایجاد تغییرات پایدار ژنتیکی و اپی ژنتیکی در کبد می شود که با اصلاح رژیم غذایی طبیعی قابل جبران نیست [۱۶].

با توجه به اینکه مصرف اسید فولیک در اختلالات اسپرماتوژنز با هدف خاصیت آنتی اکسیدانی آن تجویز می‌شود، تجویز این مکمل با رویکردی برای بهبود وضعیت متیلاسیون DNA اسپرم در مواردی که بیماران از اختلالات اسپرماتوژنز رنج می‌برند، مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین، تحقیق حاضر با هدف بررسی بهبود پارامترهای اسپرم و کروماتین و متعادل سازی سطوح متیلاسیون ژنوم اسپرم با بهبود متیلاسیون DNA گلوبال و رونویسی ژن های متیل ترانسفراز مانند *DNMT3A*، *DNMT3B* و *DNMT1* پس از استفاده از اسید فولیک در مردان با اختلال عملکرد شدید اسپرماتوژنز انجام شد.

مواد و روش‌ها

انتخاب بیماران

در این مطالعه کارآزمایی بالینی تصادفی شده، تعداد ۱۰۰ نفر مرد که به آزمایشگاه آندرولوژی مرکز تحقیقات و کلینیک ناباروری یزد مراجعه کرده بودند، جمعیت این مطالعه را تشکیل دادند. این تحقیق در سامانه ثبت کارآزمایی‌های بالینی ایران با شماره شناسه IRCT201507285261N2 ثبت گردید. مردان نابارور با الیگواستنوتراتوزواسپرمیا [۸] (تعداد ۵۰ نفر) مطابق معیارهای WHO در سال ۲۰۱۰ [۱۷ و ۱۸]، به عنوان گروه تداخل و مردان بارور که دارای پارامترهای منی طبیعی بودند به عنوان گروه شاهد (تعداد ۵۰ نفر) در نظر گرفته شدند.

در این مطالعه، گروه تداخل (مردان نابارور OAT) به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. تعداد ۲۵ نفر، سه دارو شامل، ویتامین E به میزان ۴۰۰ واحد بین المللی، اسید فولیک ۵ میلی گرم و سلنیوم ۲۰۰ میکروگرم روزانه و ۲۵ نفر دیگر دو داروی سلنیوم ۲۰۰ میکروگرم و ویتامین E به میزان ۴۰۰ واحد بین المللی را روزانه دریافت کردند. این نسخه به مدت سه ماه توسط متخصص اورولوژی تجویز و پیگیری شد. معیارهای ورود بیماران شامل: سن ۲۵ تا ۴۰ سال، عدم استفاده از فنی‌توئین و فنوباربیتال، غلظت اسپرم ۷ تا ۱۴ میلیون بر میلی لیتر، مورفولوژی طبیعی کمتر از ۴ درصد و تحرک کمتر از ۴۰ درصد بود.

وجود اختلالات ژنتیکی شناخته شده مانند کریپتورکیدیسم، حذف کروموزوم Y، واریکوسل، ناباروری ناشناخته معیارهای خروج بودند. قابل ذکر است که کمیته اخلاق مرکز تحقیقات بالینی و ناباروری یزد این پژوهش را تأیید کرد. بنابراین، فرم رضایت آگاهانه توسط هر یک از شرکت کنندگان امضا شد و استفاده از همه نمونه‌ها با رعایت استانداردهای قانونی در کمیته اخلاق بیمارستان شهید صدوقی با شماره اخلاقی (IR.SSU.MEDICINE.REC.1396.163) مطابقت گردید که مطابق با مفاد مقررات هلسینکی (بازنگری شده در توکیو ۲۰۰۴) بود.

پارامترهای اسپرم

با توجه به طرح تحقیق، نمونه‌های منی از طریق خودارضایی پس از ۲-۵ روز پرهیز جنسی جمع آوری شدند. سپس، همه نمونه‌ها تحت مایع شدن [۹]قرار گرفتند و بر اساس معیارهای WHO [۱۸] از نظر غلظت، مورفولوژی و تحرک اسپرم ارزیابی شدند. به منظور ارزیابی ناهنجاری مورفولوژیکی، حداقل ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید [۱۹] مورد بررسی قرار گرفت و از لام شمارش Makler برای ارزیابی غلظت اسپرم استفاده گردید. همچنین، برای ارزیابی میزان زنده‌مانی [۱۰]آن، رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین [۱۱]انجام شد و مقدار ۱۰ میکرولیتر از اسپرم تهیه شده با مقدار ۱۰ میکرولیتر رنگ ائوزین-نیگروزین بر روی یک لام شیشه‌ای مخلوط گردید. سپس، از میکروسکوپ نوری برای تعیین درصد اسپرم زنده استفاده شد. هر تجزیه و تحلیل توسط یک تکنسین آزمایشگاهی حرفه‌ای انجام شد که از این تحقیق اطلاعاتی نداشت.

آزمایش‌های مربوط به یکپارچگی DNA اسپرم

یکپارچگی DNA اسپرم با تست TUNEL، به منظور تشخیص فرگمنتاسیون [۱۲]DNA اسپرم، مورد ارزیابی قرار گرفت. رنگ‌آمیزی آنیلین

[۳] 5-Methyltetrahydrofolate
[۴] Homocysteine
[۵] Methionine
[۶] S-Adenosyl Methionine
[۷] Varicocelectomy
[۸] Oligoasthenoteratozoospermia (OAT)
[۹] Liquefaction
[۱۰] Viability
[۱۱] Eosin- Nigrosin
[۱۲] Fragmentation

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-09-10]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.1.35]

بلو [۱۳]برای تشخیص هیستون اضافی در کروماتین اسپرم و تولوئیدین بلو [۱۴]برای تراکم کروماتین اسپرم انجام شد [۲۰].

آزمایش‌های سنجش TUNEL

در این مرحله، از روش TUNEL با کیت تشخیص مرگ سلولی در شرایط *In-Situ* [۱۵]برای تعیین درصد اسپرم‌های آپوپتوز در همه نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت استفاده شد؛ به طوری که DNA نرمال به صورت سبز Light تشخیص داده شد و DNA آسیب دیده به رنگ سبز Bright مشاهده گردید [۲۱].

رنگ آمیزی آنیلین بلو و تولوئیدین بلو

همانند تحقیقات قبلی، رنگ آمیزی آنیلین بلو انجام شد [۲۲] و سپس اسمیرهای خشک شده در هوا در گلوتارآلدئید [۶]بافر ۳ درصد در بافر فسفات ۰٫۲ مولار و نیز در pH ۷٫۲ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق ثابت گردیدند. پس از آن، تمامی اسمیرها با ۵ درصد رنگ آبی آنیلین بلو در اسید استیک ۴ درصد و در pH ۳٫۵ به مدت پنج دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. نتایج نشان داد که اسپرم‌های رنگ‌آمیزی نشده و یا رنگ شده به صورت آبی کم‌رنگ (آبی آنیلین منفی) به عنوان طبیعی و اسپرم‌های رنگ‌آمیزی شده به صورت آبی تیره (آبی آنیلین مثبت) به عنوان غیر طبیعی در نظر گرفته شدند.

همچنین، رنگ آمیزی تولوئیدین بلو بر طبق دستورالعمل‌های قبلی انجام شد [۲۳]. در این تحقیق، سلول‌های اسپرم آبی کم رنگ به عنوان سلول‌های طبیعی (تولوئیدین آبی-) در نظر گرفته شدند و اسپرم‌های آبی تیره یا بنفش و ارغوانی به عنوان سلول‌های غیر طبیعی (تولوئیدین آبی+) طبقه بندی گردیدند. قابل توجه است که برای دو آزمایش، حداقل ۲۰۰ اسپرم در همه اسلایدها بررسی شدند و بنابراین اسپرم‌های طبیعی و همچنین غیر نرمال به صورت درصد ارائه شدند.

آماده سازی اسپرم از طریق گرادیان تراکم ناپیوسته

آماده سازی اسپرم برای همه نمونه‌های مایع منی با جداسازی گرادیان استاندارد انجام شده توسط سازمان WHO در سال ۲۰۱۰ [۱۸] به منظور جداسازی و تخلیص نمونه‌های اسپرم انجام شد. بنابراین، در این تحقیق یک محیط گرادیان چگالی (*In vitro*، دانمارک) در یک فالکن ۱۵ میلی لیتری از طریق لایه‌بندی به مقدار یک میلی لیتر از گرادیان چگالی ۴۰ درصد (v/v) بر روی یک میلی‌لیتر گرادیان چگالی ۸۰ درصد (v/v) تهیه گردید. تقریباً مقدار یک میلی‌لیتر از هر نمونه که کاملاً مخلوط شده بود در بالای محیط گرادیان چگالی قرار داده شد. سپس سانتریفیوژ در دور RCF ۰٫۴ به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. پس از شستشو، نمونه‌ها در ظروف استریل جمع‌آوری شدند و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای تجزیه و تحلیل بیشتر ذخیره گردیدند.

تجزیه و تحلیل متیلاسیون DNA گلوبال

با توجه به طرح تحقیق، از 5-mC DNA ELISA Kit [۱۷]برای انجام تجزیه و تحلیل متیلاسیون DNA استفاده شد. سپس، مقدار ۱۰۰ نانوگرم از DNAاسپرم دناتوره شده (تک رشته ای) و نیز جدا شده از نمونه‌های انتخاب شده با بافر 5-mC Coating حل شده و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انجام شد. پس از برداشتن و شستشوی همه چاهک‌ها (Wells) در سه نسخه با ۲۰۰ میکرولیتر بافر-5 ELISA mC، انکوباسیون نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت. سپس ۵-متیل سیتوزین و آنتی‌بادی ثانویه در بافر ELISA 5-mC ریخته شد و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انجام گردید. پس از شستن چاهک‌ها، HRP Developer را به همه چاهک‌ها اضافه شد و اجازه داده شد تا به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق رنگ شوند.

در این مرحله، جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از ELISA Plate-Reader [۱۸]اندازه‌گیری شد. سپس، منحنی استاندارد با استفاده از کنترل‌های داخلی مثبت و منفی در یک پلیت مشابه از طریق رقت‌های مختلف ایجاد گردید. پس از آن، کنترل منفی DNA متشکل از صفر درصد ۵-متیل سیتوزین بدون متیله و کنترل‌های داخلی مثبت DNA متشکل از ۵ درصد ۵-متیل سیتوزین متیله شد. در نهایت، متیلاسیون گلوبال همه نمونه‌ها دو بار انجام شد و مقدار متوسط حاصل به دست آمد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

کیت RNeasy Plus Universal Mini [۱۹]برای استخراج RNA کل از همه نمونه‌ها طبق دستورالعمل‌های شرکت سازنده استفاده شد. غلظت RNA توسط اسپکتروفتومتری NanoDrop [۲۰]تعیین گردید. غلظت تنظیم شده ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر RNA کل تخلیص شده برای سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA RevertAid First-Strand بر اساس راهنمای شرکت Thermo Scientific استفاده شد.

Real Time Polymerase Chain Reaction

از RT-PCR کمی، برای ارزیابی بیان ژن با استفاده از Fast SYBR®Green Master Mix، Applied Biosystems استفاده شد. تمامی ژن‌های مورد ارزیابی (*DNMT1*، *DNMT3A* و *DNMT3B*) و آغازگرهای ژن کنترل داخلی بتا-۲-میکروگلوبولین (B2M) در جدول ۱ ارائه شدند.

[۱۳] Aniline Blue
[۱۴] Toluidine Blue
[۱۵] In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Germany)
[۱۶] Glutaraldehyde
[۱۷] Cat. No: D5326
[۱۸] Star Fax-2100, Awareness Technology, USA
[۱۹] QIAGEN, Germany
[۲۰] Thermo Scientific, 2000c

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-09-10]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.1.35]

جدول ۱. توالی آغازگر ژن، توالی تکثیر یافته و اندازه محصول

ژن	توالی پرایمر (۳'-۵')	توالی تکثیر یافته	اندازه محصول
DNMT1	F: TGGACGACCCTGACCTCAAAT R: GCTTACAGTACACACTGAAGCA	NM_001318731.1	168 bp
DNMT3A	F: TATTGATGAGCGCACAAGAGAG R: GGGTGTTCCAGGGTAACATTGAG	NM_001320893.1	111 bp
DNMT3B	F: GGCAAGTTCTCCGAGGTCTCTG R: TGGTACATGGCTTTTCGATAGGA	NM_001207056.1	113 bp
B2M	F: AGATGAGTATGCCTGCCGTG R: TGCGGCATCTTCAAACCTC	NM_004048.2	106 bp

DNMT; DNA Methyltransferase
B2M; Beta-2-Microglobulin

مسترمیکس PCR در تمامی چاهک‌ها شامل ۱۲٫۵ میکرولیتر SYBR®Green Master Mix، ۸٫۵ میکرولیتر dH2O، ۲ میکرولیتر cDNA تک رشته‌ای (ssDNA) و همچنین یک میکرولیتر از پرایمرهای فوروارد[۲۱] و ریورس[۲۲] (۱۰ پیکومول بر میکرولیتر) و رساندن به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بودند. طرح سیکل دمایی شامل انکوباسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۴۰ سیکل در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ثانیه و ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. نتایج مرحله ۵۸ تا ۹۵ درجه برای شکل‌گیری منحنی ذوب[۲۳] به کار گرفته شد. اختصاصی بودن محصول با آنالیز منحنی مشخص گردید. تمام مراحل بیان چهار ژن برای نمونه‌ها به صورت دوبل انجام شد. به منظور تأیید تجزیه و تحلیل و تولید محصول، محصولات نهایی PCR را بر روی ژل آگارز ۲ درصد لود شد. $2^{-\Delta CT}$ برای نشان دادن سطح بیان ژن‌ها پس از نرمال شدن نسبت به B2M محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

در این مرحله، از آزمون ناپارامتری[۲۴] Mann-Whitney برای تجزیه و تحلیل تفاوت در پارامترهای اسپرم، کروماتین، متیلاسیون DNA گلوبال و همچنین بیان mRNA بین گروه کنترل و گروه‌های درمانی استفاده شد. علاوه براین، تست Wilcoxon Signed-Rank برای مقایسه قبل و بعد از درمان و نیز از آزمون اسپیرمن[۲۵] برای محاسبه همبستگی استفاده گردید. در نهایت ، از نرم افزار آماری SPSS ورژن ۱۸ برای تجزیه و تحلیل استفاده شد و مقدار P کمتر از ۰٫۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه RCT، متغیرهای دموگرافیک بیماران در دو گروه درمان با دارو به ترتیب از نظر سن (۲±۲۷ در مقابل ۲±۲۸)، مدت زمان ناباروری (۰٫۶±۴٫۵ در مقابل ۰٫۵±۴) و BMI (۱٫۷±۲۲٫۶ در مقابل ۲ ±۲۳٫۴) مشابه بود. نتایج مقایسه متغیرها در گروه‌های کنترل و درمان در جدول ۲، در مورد پارامترهای اسپرم، دست نخوردگی DNA و نتایج آزمایش‌های کروماتین اسپرم، متیلاسیون DNA گلوبال و همچنین بیان ژن‌های *DNMTs* ذکر شد. غلظت اسپرم در هر دو گروه درمانی افزایش قابل ملاحظه‌ای را در مقایسه با قبل از تیمار شدن (P=۰٫۰۰۱ در مقابل P=۰٫۰۳۵) نشان داد، در حالی که هنوز در مقایسه با گروه شاهد به میزان قابل توجهی پایین بود. پس از درمان سه دارو، مورفولوژی طبیعی و تحرک پیشرونده در مقایسه با قبل از درمان به میزان قابل توجهی افزایش یافت. چنین بهبودی در گروه دو دارو رخ نداد. زنده ماندن اسپرم پس از دوره درمان سه دارو در مقایسه با گروه شاهد افزایش قابل توجهی نشان داد (P=۰٫۰۲ در مقابل P=۰٫۰۷)، در حالی که این بهبود در نتیجه درمان در گروه درمان دو دارو مشاهده نشد (جدول ۲).

بر اساس نتایج آنیلین بلو+، میزان بیش از حد هیستون کروماتین اسپرم پس از درمان سه دارو در مقایسه با پیش تیمار و برخلاف گروه درمان دو دارو کاهش قابل توجهی نشان داد. با این حال، سطح بالاتری از اسپرم‌های رنگ‌آمیزی به صورت آبی تیره در گروه درمان سه دارو در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. سطح بالایی از تراکم کروماتین پس از هر دو درمان سه دارویی و دو دارویی به دست آمد. میزان DNA فرگمنته شده اسپرم‌ها با تست $TUNEL^+$ در هر دو گروه درمانی از نظر آماری به طور معنی‌دار کاهش یافت (P=۰٫۰۰۱)، اما همچنان به میزان قابل توجهی بیشتر از گروه شاهد بود که در جدول شماره ۲ نمایش داده شده است.

با درک درست

جدول ۲. مقایسه پارامترهای اسپرم، یکپارچگی کروماتین/DNA بین گروه‌های مورد مطالعه

پارامتر	درمان سه دارویی (تعداد ۲۵ نفر)			درمان دو دارویی (تعداد ۲۵ نفر)			گروه کنترل (تعداد ۵۰ نفر)		
	قبل	بعد	P^*	قبل	بعد	P^*		P^{**}	P^{***}
غلظت (میلیون/میلی‌لیتر)	10 (0, 12)	30 (23, 39)	0.005a	13 (11, 13.5)	20 (12, 34)	0.035a	138 (50, 150)	<0.001a	<0.001a
تحرک پیشرونده (٪)	3.5 (2, 20.7)	45 (17, 46)	0.01a	25 (15, 30)	33 (16, 38)	0.47	46 (42, 51.5)	0.08	0.002a
مورفولوژی نرمال (٪)	1 (0.5, 2.5)	3 (2.1, 4.9)	0.005a	1 (0.3, 1.6)	1 (0.36, 1.5)	0.85	15 (12, 17.7)	<0.001a	<0.001a
زنده‌مانی (٪)	48 (30, 60)	60 (54.5, 67)	0.02a	55 (50, 62)	60 (50, 65)	0.1	70 (64, 74)	0.07	0.008a
آنیلین بلو+ (٪)	40 (37, 8.7)	35 (30.7, 39.6)	0.005a	45 (40, 47.5)	42 (37, 45.9)	0.16	25 (24.8, 30)	0.02a	<0.001a
کروماتین بلو+ (٪)	62.5 (57, 66)	60 (60.2, 63)	0.005a	61 (63, 70)	65 (63.7, 67)	0.005a	40 (37, 42.7)	<0.001a	<0.001a
TUNEL+ (٪)	18 (16, 19.8)	12 (10.4, 13.6)	0.005a	15 (17.5, 21)	14 (13, 16.4)	0.005a	10 (8, 10)	0.004a	<0.001a

Median (lower bound, upper bound) was measured
*Wilcoxon Signed-Rank Test
**Mann-Whitney U Test, comparing control and after three- drug treatment
***Mann-Whitney U Test, comparing control and after two- drug treatment
a Statistical Significant

سطح بیان ژن‌های *DNMT3A*، *DNMT3B* و *DNMT1* پس از درمان در گروه دو و سه دارو تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد. متیلاسیون گلوبال پس از درمان سه دارو به میزان قابل توجهی کاهش یافت (P=۰٫۰۰۲)، در حالی که هنوز تفاوت قابل توجهی در سطح متیلاسیون در گروه کنترل مشاهده شد. با این حال، متیلاسیون گلوبال اسپرم تفاوت قابل توجهی در درمان دو دارویی نشان نداد (جدول ۳).

[۲۱] Forward
[۲۲] Reverse
[۲۳] Melting Curve
[۲۴] Nonparametric
[۲۵] Spearman Correlation Test

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-09-10]
[DOI: 10.52547/sjrm.6.1.35]

جدول ۳. مقایسه بیان *DNMTs* و متیلاسیون DNA گلوبال بین گروه‌های مورد مطالعه

پارامتر	درمان سه دارویی (تعداد ۲۵ نفر)			درمان دو دارویی (تعداد ۲۵ نفر)			کنترل (تعداد ۵۰ نفر)		
	قبل	بعد	P*	قبل	بعد	P*		P**	P***
DNMT1 Expression	0.038 (0.02, 0.11)	0.03 (0.02, 0.25)	0.46	0.06 (0.03, 0.09)	0.04 (0.02,0.09)	0.6	0.0052 (0.16, 0.53)	0.16	0.21
DNMT3A Expression	0.049 (0.01, 0.13)	0.06 (0.02, 0.26)	0.77	0.06 (0.02, 0.21)	0.05 (0.02, 0.08)	0.19	0.004 (0.013, 0.19)	0.59	0.71
DNMT3B Expression	0.11 (0.04, 0.17)	0.1 (0.05, 0.21)	0.95	0.21 (0.11, 0.86)	0.12 (0.05, 0.19)	0.17	0.016 (0.003, 0.08)	0.27	0.42
Global DNA Methylation (%)	3.1 (2.9, 3.8)	2.6 (2.3, 3.2)	0.002*	3.2 (2.7, 3.6)	3.2 (2.8, 3.6)	0.64	2 (1.7, 2.55)	0.01	<0.001*

Median (lower bound, upper bound) was measured
*Wilcoxon signed-rank test
**Mann-Whitney U test, comparing control and after three- drug treatment
***Mann-Whitney U test, comparing control and after two- drug treatment
a Statistical Significant

غلظت اسپرم با رونویسی *DNMT3B* رابطه معکوس داشت. هیچ ارتباط معنی‌داری بین تحرک پیشرونده، مورفولوژی طبیعی و زنده ماندن اسپرم با میزان بیان ژن‌های *DNMTs* مشاهده نشد. نتایج $TUNEL^+$ مستقیماً با رونویسی *DNMT3A* و *DNMT3B* مرتبط بود. سطح متیلاسیون گلوبال ارتباط منفی با غلظت، مورفولوژی طبیعی و همچنین تحرک پیشرونده اسپرم‌ها نشان داد (P=۰,۰۰۱). اما، همان طور که در جدول ۴ گزارش گردید، متیلاسیون گلوبال با نتایج $TUNEL^+$، آنیلین بلو+ و تولوئیدین بلو+ رابطه مثبتی داشت.

جدول ۴. ارتباط بین کیفیت اسپرم، متیلاسیون DNA گلوبال و بیان متیل ترانسفراز

پارامتر	Correlations			
	DNMT1 Expression	*DNMTA3* Expression	*DNMTB3* Expression	Global DNA Methylation
غلظت (×۱۰^۶/ml)	-0.023 (0.829)	-0.196 (0.065)	-0.222 (0.035)[a]	-0.418 (0.000)[a]
تحرک پیشرونده (٪)	-0.158 (0.137)	-0.204 (0.054)	-0.171 (0.106)	-0.378 (0.000)[a]
مورفولوژی نرمال (٪)	0.072 (0.497)	-0.053 (0.618)	-0.115 (0.279)	-0.384 (0.000)[a]
زنده مانی (٪)	0.043 (0.688)	-0.204 (0.054)	-0.161 (0.129)	-0.139 (0.192)
متیلاسیون DNA گلوبال (٪)	0.203 (0.055)	0.207 (0.049)[a]	0.146 (0.168)	-
نتایج آنیلین بلو$^+$ (٪)	-0.026 (0.804)	0.149 (0.162)	0.179 (0.091)	0.378 (0.000)[a]
نتایج تولوئیدین بلو$^+$ (٪)	-0.107 (0.316)	0.045 (0.676)	0.1 (0.347)	0.386 (0.000)[a]
نتایج $TUNEL^+$ (%)	0.116 (0.278)	0.282 (0.007)[a]	0.303 (0.004)[a]	0.479 (0.000)[a]

The Spearman correlation test was done.
Data was shown as R (P-Value).
a Statistical Significant

بحث

برای اولین بار در مطالعه ما، اسید فولیک با کاربرد اپی‌ژنتیکی خود در مورد بیان متیل ترانسفرازها، متیلاسیون DNA گلوبال و کروماتین در اسپرم انسان استفاده شد. تعداد ۵۰ نفر بیمار نابارور OAT به طور تصادفی به دو گروه درمانی تقسیم شدند. هیچ عارضه‌ای در زمان مصرف دارو گزارش نشد. تحقیقات دیگری که توسط Wong و همکاران (۲۰۰۲) گزارش شد نشان دادند که غلظت فولات در خون و مایع منی در محدوده طبیعی و در گروه های بارور و نابارور قبل از شروع مداخله دارویی مشابه بود [۱۹]. به همین دلیل، ما غلظت فولات را در این مطالعه مورد بررسی قرار ندادیم.

گروه‌های درمانی و کیفیت، کروماتین و یکپارچگی DNA ی اسپرم

بهبود قابل توجهی در گروه درمان سه دارو پس از درمان با توجه به پارامترهای اسپرم مشاهده شد. پارامترهای اسپرم مانند غلظت، مورفولوژی طبیعی، زنده ماندن اسپرم و همچنین تحرک پیشرونده به طور قابل توجهی در درمان سه دارو افزایش یافت. در راستای این یافته، یک مطالعه تأثیر ۵ میلی‌گرم اسید فولیک و همچنین ۶۶ میلی‌گرم سولفات روی را بر پارامترهای مایع منی در مردان نابارور به مدت ۲۶ هفته مورد بررسی قرار داد و افزایش قابل توجهی در تعداد کل اسپرم‌ها گزارش کرد [۱۹].

نتایج تست‌های تولوئیدین بلو و TUNEL در هر دو گروه درمانی در مقایسه با پیش تیمار بهبود چشمگیری را نشان داد. علاوه بر این، نتایج آنیلین بلو+ کاهش قابل ملاحظه‌ای در میزان اضافی هیستون در گروه درمان سه دارویی در مقایسه با پیش تیمار مشخص کرد. همچنین در این رابطه، Amar و همکاران در سال ۲۰۱۵ دریافتند که درمان با آنتی اکسیدان‌ها و ویتامین‌های گروه B از جمله اسید فولیک مورد نیاز برای سیکل‌های تک کربنی در متابولیسم، با کاهش سطح فرگمنته شدن DNA اسپرم و نتایج آنیلین بلو+ (با آمار ، کورنت ، کوهن و منزو) کروماتین اسپرم را بیشتر از درمان با آنتی اکسیدان‌ها بهبود می‌بخشد [۲۰]. علاوه بر این، در نقش اپی‌ژنتیک، فولات می‌تواند از طریق عملکرد خود در سنتز DNA به باروری منجر شود زیرا نقش مهمی در بیوسنتز پورین، پیریمیدین و برخی اسیدهای آمینه دارد [۲۴].

گروه‌های درمانی، بیان متیل ترانسفرازها و متیلاسیون DNA گلوبال

بررسی رونویسی متیل ترانسفراز نشان داد که رونویسی‌ها پس از درمان تغییر ناچیزی داشتند. به عبارت دیگر، متیلاسیون DNA اسپرم در گروه درمان سه دارو از جمله اسید فولیک در مقایسه با قبل از درمان به میزان قابل توجهی کاهش یافت. اما، این اثر در گروه درمان دو دارو رخ نداد. از آنجا که هیچ مطالعه‌ای در مورد تجویز اسید فولیک با بررسی متغیرهای اپی‌ژنتیکی وجود ندارد، می‌توان آن را از نظر فقر فولات مورد بحث قرار داد. تغییرات اپی‌ژنتیکی در سرطان ناشی از کمبود فولات در موش‌ها به طور قابل توجهی غلظت‌های اس- آدنوزیل-ال-متیونین [۲۶]را در کبد مورد آزمایش به مدت ۹ هفته کاهش داد. سطح mRNA و پروتئین DNMTs در پاسخ به کمبود متیل پس از ۹ ماه تغییر کرد [۲۵]. هایپومتیلاسیون گلوبال به عنوان یکی از موارد رایج اپی‌ژنتیکی در مراحل اولیه سرطان به ویژه در عناصر تکراری و آنکوژن‌ها معرفی شده است. نتیجه جالب این بود که علاوه بر هایپومتیلاسیون DNA، کمبود متیل و فولات ممکن است باعث هایپرمتیلاسیون مقطعی و نقطه‌ای [۲۶] بسیار شبیه به اختلالات متیلاسیون، مناطق هایپرمتیله شده و هایپومتیله شده در مناطق ژنوم اسپرم در مردان نابارور گردد [۲۷و۲۸].

[۲۶] S-Adenosyl-L-Methionine (SAMe)

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-09-10]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.1.35]

ارتباط بین بیان متیل ترانسفراز و کیفیت اسپرم

از نظر پارامترهای اسپرم، فقط غلظت اسپرم به میزان قابل توجهی به mRNA ی *DNMT3B* مربوط است. علاوه بر این، غلظت اسپرم‌ها با افزایش در این رونویسی کاهش می‌یابند. حتی اگر هیچ تحقیقی متیل ترانسفراز را همراه با تجزیه و تحلیل اسپرم بررسی نکرده باشد، ممکن است بین وجود چند مورفیسم در *DNMT1* و الیگو-استنوسپرمی ارتباط وجود داشته باشد [۲۹]. بررسی محتویات mRNA از ژن‌های Imprinted در Modulation اپی‌ژنتیکی در مردان نیمه بارور، وجود *DNMT3A* در میزان بیشتر تحرک ضعیف اسپرم، بدون ارتباط قابل توجهی با غلظت اسپرم‌ها نشان داده شد. نتایج بدست آمده نشان دهنده نقص اسپرم غیرطبیعی برای بدست آوردن الگوی صحیح متیلاسیون است [۳۰].

ارتباط بیان متیل ترانسفراز، کروماتین و یکپارچگی DNA اسپرم

خروجی‌های $TUNEL^+$ ارتباط قابل توجهی با سطوح mRNAهای *DNMT3B* و *DNMT3A* نشان داد؛ به طوری که با افزایش رونویسی، فرگمنته شدن DNA اسپرم افزایش پیدا کرد. حتی اگر پارامترها و مکانیسم‌های ذکر شده در تحقیقات قبلی قابل توجیه نباشند، ممکن است به یک همبستگی کلی در مورد یکپارچگی کروماتین با متغیرهای تنظیم اپی‌ژنتیک بپردازیم. بنابراین، در مورد سلول‌های آپوپتوز شده اسپرم، تعدادی از تحقیقات نشان داد که پاسخ های اولیه به استرس اکسیداتیو [۲۷] می‌تواند ناشی از افزایش بیان متیل ترانسفراز DNA باشد [۳۱].

با توجه به خروجی‌های همبستگی بیان هر دو ژن اپی‌ژنتیک هیستون دی استیلاز-۱ [۲۸](*HDAC1*) و *DNMT3A* و نیز یکپارچگی کروماتین، در صورت بیان بسیار زیاد *HDAC1*، فرض ما این بود که هیستون‌ها با پروتامین به سبب ایجاد نقص در ساختار کروماتین اسپرم با DNA کمتر فشرده شده جایگزین نشده‌اند. بنابراین، تراکم ناقص هسته‌ای در نتیجه بیان بیشتر *DNMT3A* و *HDAC1* می‌تواند بلوغ کلی اسپرم‌ها را مختل کند [۳۲].

ارتباط متیلاسیون گلوبال و کیفیت اسپرم ها

نتایج این مطالعه، ارتباط قابل ملاحظه متیلاسیون گلوبال را با غلظت، عدم تحرک، مورفولوژی طبیعی و همچنین تحرک پیشرونده اسپرم تعیین کرد. علاوه براین، بین متیلاسیون گلوبال بیشتر و پارامترهای ضعیف اسپرم همبستگی وجود داشت. با این حال، با توجه به بررسی بیماران اولیگو-استنوسپرمیک، متیلاسیون معیوب MEST یا H19 در حدود ۴۵ درصد با مقدار کمتر از ۱۰ میلیون اسپرم در هر میلی لیتر نشان داده شدند [۲۷]. با این وجود، Olszewska و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی سطح متیلاسیون گلوبال در اسپرم‌های متشکل از آنوپلوئیدی کروموزومی و همچنین نورمواسپرمیا [۲۹]با استفاده از ایمونوفلورسانس و کروماتوگرافی پرداختند و هیچ ارتباطی بین متیلاسیون گلوبال و کیفیت اسپرم‌ها نشان ندادند [۳۱].

این تفاوت ممکن است ناشی از محیط نامشخص، شیوه زندگی، تعامل محیطی ژن‌ها یا سایر پارامترهای اندازه گیری نشده موثر بر فعالیت‌ها و همچنین بیان متیل ترانسفرازهای DNA و در دسترس بودن گروه‌های متیلی باشد.

ارتباط متیلاسیون گلوبال، کروماتین اسپرم و یکپارچگی DNA

با توجه به داده‌ها، متیلاسیون گلوبال با هر نتیجه آزمایش یکپارچگی کروماتین مانند TUNEL، تولوئیدین بلو و آنیلین بلو ارتباط معنی‌داری مشاهده گردید. افزایش متیلاسیون گلوبال در مواردی، عدم تجزیه کروماتین و DNA اسپرم را افزایش داد. با توجه به نتایج حاصل از فرگمنتاسیون بیشتر DNA در مردان نابارور با متیلاسیون گلوبال بیشتر DNA اسپرم آن‌ها، این وضعیت با کاهش کیفیت مایع منی، یکپارچگی کروماتین و همچنین DNA اسپرم همراه بود [۳۳]. علاوه بر این، با تجزیه و تحلیل می‌توان به ارتباط سطح متیلاسیون گلوبال با شرایط از بین بردن پروتئین کروماتین و نیز با استفاده از تست آنیلین بلو به رابطه مثبت بین هر دو پارامتر اشاره کرد [۳۱]. به عبارت دیگر، تمایلات آبشار آپوپتوتیک ذاتی در ارتباط با وضعیت متیلاسیون DNA اسپرم مشاهده گردید [۳۴]. برخی از محققان نشان دادند که غلظت کمتر هموسیستئین و نیز فولات چرخه متیلاسیون را مختل می‌کند. در صورت بروز اختلال در ترکیب اوراسیل به همراه کمبود فولات، بی‌ثباتی در کروموزوم مشاهده می‌شود. در پایان، تأمین گروه‌های متیل برای حفاظت DNA در برابر قرار گرفتن در معرض رادیکال‌های آزاد از اهمیت بالایی برخوردار خواهد بود [۳۵].

کاربردهای بالینی و نتیجه‌گیری

تغییرات عمده‌ای در ساختارهای کروماتین اسپرم و افزایش سطوح در سازمان هسته‌ای بلافاصله پس از لقاح ایجاد شده است که برای شروع و تعدیل فعالیت‌های ژن پدری در مراحل اولیه نمو جنین مهم تلقی می‌شود. ما نتایج تکنیک‌های کمک باروری [۳۰]ART برای ارزیابی تأثیرات بهبود وضعیت اپی‌ژنتیک همراه با بیان متیل ترانسفراز و همچنین متیلاسیون گلوبال در موفقیت درمان IVF مورد بررسی قرار ندادیم. می‌توان بیان کرد که کاهش متیلاسیون DNA اسپرم در درمان دارویی مانند اسید فولیک به دلیل جمعیت اسپرم‌ها با سلامت اپی‌ژنتیک بیشتر، می‌تواند بر نتایج ART تأثیر بگذارد. به علاوه، بین متیلاسیون گلوبال اسپرم و کیفیت جنین و لقاح همبستگی وجود دارد [۳۴]. در نتیجه می‌توان گفت که در هنگام ناهنجاری‌های اسپرم، اسپرم با افزایش متیلاسیون از روند بیان ژن حذف می‌شود. تا زمانی که متیل کافی در دسترس باشد، بیان ژن تعادل ژنوم را از سر می‌گیرد و از حالت هایپرمتیله به هایپومتیله تغییر می‌کند. این منجر به بهبود وضعیت اسپرم از نظر پارامترها و کروماتین می‌شود. بهبود اسپرم با سطوح متعادل در متیلاسیون گلوبال در درمان سه دارویی برای بهبود

[۲۷] Oxidative Stress
[۲۸] Histone deacetylase 1 (HDAC1)
[۲۹] Normospermia
[۳۰] Assisted Reproductive Technology (ART)

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-09-10]
[DOI: 10.52547/sjrm.6.1.35]

اپی‌ژنتیک، کیفیت اسپرم و کروماتین، در مواردی احتمالاً به دلیل اثرات اسید فولیک است.

تشکر و قدردانی

دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی مسئول حمایت مالی تحقیق حاضر به عنوان به عنوان پایان نامه دکتری بود. بنابراین، ما از کارکنان مرکز تحقیقات سقط مکرر و نیز مرکز تحقیقاتی و بالینی ناباروری دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد قدردانی می کنیم.

تعارض منافع

اعلام شده است که آن ها هیچ گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

1. Amini Mahabadi J, Karimian M, Aghighi F, Enderami SE, Seyyed Hosseini E, Talaei SA, et al. Retinoic acid and 17β-estradiol improve male germ cell differentiation from mouse-induced pluripotent stem cells. Andrologia. 2020;52(2):e13466.
2. Amini MR, Kohram H, Shahaneh AZ, Zhandi M, Sharideh H, Nabi MM. The effects of different levels of vitamin E and vitamin C in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. Cell Tissue Bank. 2015;16(4):587–92.
3. Gadallah K. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. Surg Med Open Acc J. 2018;1(2):1–10.
4. Zini A, Al-Hathal N. Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction? Asian J Androl. 2011;13(3):374.
5. Alonge S, Melandri M, Leoci R, Lacalandra GM, Caira M, Aiudi GG. The effect of dietary supplementation of vitamin E, selenium, zinc, folic acid, and N-3 polyunsaturated fatty acids on sperm motility and membrane properties in dogs. Animals. 2019;9(2):34.
6. Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. Reproduction. 2010;139(2):287–301.
7. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. Nat Genet. 2007;39(4):457–66.
8. Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? Hum Reprod Update. 2007;13(3):313–27.
9. Carrell DT. Contributions of spermatozoa to embryogenesis: assays to evaluate their genetic and epigenetic fitness. Reprod Biomed Online. 2008;16(4):474–84.
10. Gong EJ, Shin IS, Son TG, Yang K, Heo K, Kim JS. Low-dose-rate radiation exposure leads to testicular damage with decreases in DNMT1 and HDAC1 in the murine testis. J Radiat Res. 2014;55(1):54–60.
11. Vymetalkova V, Vodicka P, Vodenkova S, Alonso S, Schneider-Stock R. DNA methylation and chromatin modifiers in colorectal cancer. Mol Aspects Med. 2019;69:73–92.
12. Steluti J, Palchetti CZ, Miranda AM, Fisberg RM, Marchioni DM. DNA methylation and one-carbon metabolism related nutrients and polymorphisms: analysis after mandatory flour fortification with folic acid. Br J Nutr. 2020;123(1):23–9.
13. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. J Nutr Biochem. 1990;1(5):228–37.
14. Azizollahi G, Azizollahi S, Babaei H, Kianinejad M, Baneshi MR, Nematollahi-mahani SN. Effects of supplement therapy on sperm parameters, protamine content and acrosomal integrity of varicocelectomized subjects. J Assist Reprod Genet. 2013;30(4):593–9.
15. Young SS, Eskenazi B, Marchetti FM, Block G, Wyrobek AJ. The association of folate, zinc and antioxidant intake with sperm aneuploidy in healthy non-smoking men. Hum Reprod. 2008;23(5):1014–22.
16. Kennedy BP, Davies PL. Phosphorylation of a group of high molecular weight basic nuclear proteins during spermatogenesis in the winter flounder. J Biol Chem. 1981;256(17):9254–9.
17. Menkveld R. Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Asian J Androl. 2010;12(1):47.
18. Organization WH. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010;
19. Wong WY, Merkus HMWM, Thomas CMG, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RPM. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Fertil Steril. 2002;77(3):491–8.
20. Amar E, Cornet D, Cohen M, Ménézo Y. Treatment for high levels of sperm DNA fragmentation and nuclear decondensation: sequential treatment with a potent antioxidant followed by stimulation of the one-carbon cycle vs

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-09-10]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.1.35]

one-carbon cycle back-up alone. Austin J Reprod Med Infertil. 2015;2(1):1006.
21. Rahiminia T, Hosseini A, Anvari M, Ghasemi-Esmailabad S, Talebi AR. Modern human sperm freezing: effect on DNA, chromatin and acrosome integrity. Taiwan J Obstet Gynecol. 2017;56(4):472–6.
22. Talebi AR, Mangoli E, Nahangi H, Anvari M, Pourentezari M, Halvaei I. Vitamin C attenuates detrimental effects of diabetes mellitus on sperm parameters, chromatin quality and rate of apoptosis in mice. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2014;181:32–6.
23. Mangoli E, Talebi AR, Anvari M, Pourentezari M. Effects of experimentally-induced diabetes on sperm parameters and chromatin quality in mice. Iran J Reprod Med. 2013;11(1):53.
24. Wagner C. Biochemical role of folate in cellular metabolism. Clin Res Regul Aff. 2001;18(3):161–80.
25. Ghoshal K, Li X, Datta J, Bai S, Pogribny I, Pogribny M, et al. A folate-and methyl-deficient diet alters the expression of DNA methyltransferases and methyl CpG binding proteins involved in epigenetic gene silencing in livers of F344 rats. J Nutr. 2006;136(6):1522–7.
26. Brandalize APC, Bandinelli E, dos Santos PA, Roisenberg I, Schüler-Faccini L. Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as maternal risk factors for Down syndrome and congenital heart defects. Am J Med Genet Part A. 2009;149(10):2080–7.
27. 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. MHR-Basic Sci Reprod Med. 2008;14(2):67–74.
28. 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(5):1728–33.
29. Cheng P, Chen H, Zhang R-P, Liu S, Zhou-Cun A. Polymorphism in DNMT1 may modify the susceptibility to oligospermia. Reprod Biomed Online. 2014;28(5):644–9.
30. Pacheco LD, Saade G, Hankins GD V, Clark SL, (SMFM S for M-FM. Amniotic fluid embolism: diagnosis and management. Am J Obstet Gynecol. 2016;215(2):B16–24.
31. Olszewska M, Barciszewska MZ, Fraczek M, Huleyuk N, Chernykh VB, Zastavna D, et al. Global methylation status of sperm DNA in carriers of chromosome structural aberrations. Asian J Androl. 2017;19(1):117.
32. 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(6):e20280.
33. Aoki VW, Emery BR, Carrell DT. Global sperm deoxyribonucleic acid methylation is unaffected in protamine-deficient infertile males. Fertil Steril. 2006;86(5):1541–3.
34. Barzideh J, Scott RJ, Aitken RJ. Analysis of the global methylation status of human spermatozoa and its association with the tendency of these cells to enter apoptosis. Andrologia. 2013;45(6):424–9.
35. Du Q, Luu P-L, Stirzaker C, Clark SJ. Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. Epigenomics. 2015;7(6):1051–73.

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-09-10]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.1.35]