Arshive of SID

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ٤٤٥/هفته‌ی اول آبان ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۳۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۲۶

بررسی رابطه‌ی یوبیکوئیتیناسیون با تحرک، ریخت‌شناسی و متیلاسیون DNA اسپرم موش صحرایی

شهناز رضوی[۱]، فرناز خدیوی[۲]، فاطمه هاشمی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: امروزه، برای درمان ناباروری با علت مردانه، روش‌های مختلفی وجود دارد که برای به کارگیری آن‌ها، ابتدا ارزیابی‌هایی برای تعیین علت ناباروری صورت می‌گیرد که برای نمونه می‌توان به ارزیابی‌های مولکولی پیشرفته و بررسی پارامترهای اسپرمی اشاره کرد. بر اساس بررسی‌های انجام شده، مطالعه‌ای در راستای بررسی ارتباط بین پارامترهای اسپرمی به عنوان یک شاخص ابتدایی در ناباروری مردان، متیلاسیون DNA به عنوان یک مکانیسم مهم اپی‌ژنتیکی با یوبیکوئیتیناسیون اسپرم موش صحرایی انجام نشده بود. هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی تحرک، ریخت‌شناسی، متیلاسیون DNA و یوبیکوئیتیناسیون در اسپرم موش صحرایی و تعیین ارتباط بین آن‌ها بود.

روش‌ها: ابتدا ۱۰ موش صحرایی بالغ نر به مدت ۹ هفته (یک چرخه‌ی اسپرماتوژنز) در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. بعد از قربانی کردن موش‌های صحرایی، از نمونه‌ی مایع منی آن‌ها برای تعیین تحرک، ریخت‌شناسی اسپرم و تهیه‌ی اسمیر استفاده شد. از اسمیر تهیه شده و به کمک تکنیک ایمونوفلورسنت، درصد اسپرم‌های یوبیکوئیتینه شده و متیله شده تعیین گردید. در نهایت، ضریب همبستگی بین آن‌ها محاسبه شد.

یافته‌ها: ارتباط معنی‌داری بین یوبیکوئیتیناسیون و متیلاسیون DNA وجود نداشت؛ در حالی که بین درصد یوبیکوئیتیناسیون و ریخت‌شناسی غیر طبیعی اسپرم‌ها رابطه‌ی معکوس و معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) مشاهده گردید. درصد اسپرم‌های یوبیکوئیتینه شده با تحرک اسپرم ارتباط معنی‌داری نشان نداد.

نتیجه‌گیری: یوبیکوئیتیناسیون به عنوان یکی از فرایندهای مولکولی مهم از مشارکت اسپرم‌های ناقص در لقاح و انتقال نقایص به نسل بعدی جلوگیری می‌کند. متیلاسیون DNA و یوبیکوئیتیناسیون به عنوان فرایندهایی که کروماتین اسپرم را تحت تأثیر قرار می‌دهند، می توانند به صورت مستقل از یکدیگر عمل کنند.

واژگان کلیدی: تحرک اسپرم، متیلاسیون DNA، ناباروری، یوبیکوئیتیناسیون

ارجاع: رضوی شهناز، خدیوی فرناز، هاشمی فاطمه. **بررسی رابطه‌ی یوبیکوئیتیناسیون با تحرک، ریخت‌شناسی و متیلاسیون DNA اسپرم موش صحرایی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۴۵): ۱۱۵۵-۱۱۵۱

مقدمه

امروزه، ناباروری یکی از معضلات بزرگ اجتماعی است و عوامل مردانه، نقش مهمی در ایجاد آن ایفا می‌کنند (۱). یکی از روش‌های معمولی که به صورت اولیه برای ارزیابی عوامل مردانه‌ی ناباروری استفاده می‌شود،آنالیز مایع منی است. در این روش، تعداد، تحرک و ریخت‌شناسی اسپرم ارزیابی می‌شود. یافته‌های قبلی نشان داد که ریخت‌شناسی غیر طبیعی اسپرم، تأییدی برای تغییرات پاتولوژیک و ناباروری می‌باشد (۲).

آنالیز استاندارد مایع منی، اطلاعات مفید، اما محدودی در رابطه با مردان نابارور ارایه می‌دهد؛ چرا که در این روش، محتوای کروماتین اسپرم ارزیابی نمی‌شود (۳). بنابراین، ارزیابی نشانگرهای مولکولی مرتبط در بررسی ناباروری مردان مفید می‌باشد. یکی از این نشانگرها، یوبیکوئیتیناسیون است که در حذف اسپرم ناقص نقش دارد. یوبیکوئیتین، یکی از ۲۰۰ پروتئین اصلی است که به روش آپوکرین از اپی‌تلیوم اپی‌دیدیم ترشح می‌شود. این پروتئین، در تثبیت غشا نقش دارد و در ناباروری تأثیرگذار است (۴). مولکول‌های ناقص در سطح غشای اسپرم در هنگام عبوراز اپی‌دیدیم شناخته می‌شوند و مورد هدف یوبیکوئیتین قرار می‌گیرند و در نهایت، اسپرم یوبیکوئیتینه شده توسط سلول‌های اپی‌تلیال اپی‌دیدیم فاگوسیت می‌شوند (۵). یوبیکوئیتین در فرایندهای مختلفی مانند پروتئولیز، ارایه‌ی آنتی‌ژن، آندوسیتوز گیرنده‌ی غشایی، کنترل رونویسی و آپوپتوز نقش دارد (۶).

۱- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: شهناز رضوی
Email: razavi@med.mui.ac.ir

www.SID.ir

Arshive of SID

متیلاسیون DNA از دیگر عوامل مهم و غیر قابل تشخیص با آنالیز مایع منی می‌باشد. متیلاسیون DNA به عنوان یکی از شناخته شده‌ترین مکانیسم‌های اپی ژنتیک است که در حین عبور اسپرم از اپی‌دیدیم رخ می‌دهد. الگوی صحیح متیلاسیون DNA در غیر فعال‌سازی کروموزوم X در خانم‌ها، جلوگیری از رونویسی ژن‌ها، جلوگیری از بدخیمی‌ها و اختلالات ایمپرینتینگ نقش دارد و هر گونه نقص در الگوی صحیح متیلاسیون DNA، منجر به شکست در لانه‌گزینی و پیشبرد سرطان می‌شود؛ در حالی که این اسپرم‌ها، از نظر آنالیز استاندارد مایع منی، طبیعی به نظر می‌رسند (۷).

در پژوهش‌های انجام گرفته، هم‌چنان در بررسی ارتباط بین یوبیکوئیتیناسیون و پارامترهای اسپرمی انسان تناقضاتی وجود دارد. در پژوهشی، بین افزایش یوبیکوئیتیناسیون و پارامترهای اسپرمی، نتیجه‌ی معکوسی گزارش شد (۸). در حالی که در مطالعه‌ی دیگری بین این پارامترها چنین رابطه‌ای مشاهده نشده است (۹).

با توجه به تناقضات مشاهده شده در بررسی ارتباط بین پارامترهای اسپرمی و یوبیکوئیتیناسیون در مطالعات انسانی قبلی و همچنین، از آن جایی که مطالعه‌ای در راستای تعیین ارتباط بین دو عامل مهم در ناباروری مردان، متیلاسیون DNA با یوبیکوئیتیناسیون صورت نگرفته بود، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی ارتباط بین درصد اسپرم‌های یوبیکوئیتینه شده با متیلاسیون DNA، تحرک و ریخت‌شناسی اسپرم موش صحرایی انجام شد.

روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی: در این آزمایش، ۱۰ موش صحرایی نر بالغ Wistar، با سن ۱۵-۱۲ هفته و وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم، از مؤسسه‌ی پاستور تهران خریداری شدند. موش‌ها قبل از شروع مطالعه، به مدت دو هفته در شرایط مشابه با دوره‌ی آزمایش نگهداری شدند. حیوانات در شرایط استاندارد، در دمای ۲۵-۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰-۵۰ درصد، تحت شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی همراه با دسترسی آزاد به غذاو آب دلخواه، در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان نگهداری شدند. موش‌های صحرایی به مدت ۹ هفته (طی شدن یک چرخه‌ی اسپرماتوژنز) در شرایط آزمایش نگهداری شدند و پس از اتمام دوره‌ی آزمایش، موش‌های صحرایی با تزریق داخل صفاقی Xylazine و Ketamine بیهوش و سپس قربانی شدند.

جداسازی اسپرم از اپی‌دیدیم: ابتدا، اپی‌دیدیم چپ موش‌های صحرایی جدا گردید و در پتری‌دیش حاوی ۱ میلی‌لیتر نرمال‌سالین قرار داده شد. سپس، روی دم اپی‌دیدیم، چندین برش زده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد تا اسپرم‌ها خارج شوند و سوسپانسیونی از اسپرم تهیه گردید. از این سوسپانسیون، به منظور بررسی تحرک، ریخت‌شناسی، سنجش متیلاسیون DNA و یوبیکوئیتیناسیون در اسپرم موش‌های صحرایی استفاده شد.

بررسی تحرک و ریخت‌شناسی اسپرم موش صحرایی: سوسپانسیون اسپرم با نرمال‌سالین گرم شده با نسبت ۱:۲۰ رقیق گردید و ۱۰ میکرولیتر روی لام نئوبار قرار داده شد. حداقل ۲۰۰ اسپرم با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ × به کمک میکروسکوپ فاز کنتراست برای تعیین نقایص ریخت‌شناسی بررسی گردید و به صورت درصد ریخت‌شناسی غیر طبیعی گزارش شد. همچنین، درصد اسپرم‌های متحرک و غیر متحرک با بررسی حداقل ۱۰ میدان میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست و بزرگ‌نمایی ۲۰۰ × تعیین شد (۱۰).

بررسی یوبیکوئیتیناسیون و متیلاسیون DNA اسپرم موش صحرایی با تکنیک Immunofluorescence: پس از تهیه ی اسمیر، تثبیت آن‌ها به کمک محلول کارنوی (اسید استیک و اتانول، ۳:۱) در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. به منظور دستیابی به کروماتین اسپرم، از اسید دترجنت به مدت ۳ دقیقه استفاده شد. پس از شستشو با Phosphate buffered saline (PBS) اسمیرها به مدت ۳۰ دقیقه در محلول بلاکینگ انکوبه گردیدند. اسمیرها به مدت ۲ ساعت با آنتی‌بادی اولیه‌ی Mouse anti 5-Methyl cytidine و Mouse anti-ubiquitin انکوبه شدند و پس از شستشو با PBS، به مدت ۳۰ دقیقه از آنتی‌بادی ثانویه‌ی Fluorescein isothiocyanate (FITC) استفاده شد. در نهایت، اسلایدها مونت شدند و آنالیز میکروسکوپی به کمک میکروسکوپ فلورسنت انجام شد (۱۱).

برای هر نمونه، حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. با بررسی تصاویر به دست آمده از رنگ‌آمیزی یوبیکوئیتیناسیون، در اسپرم‌هایی که به رنگ سبز درخشان دیده می‌شدند، فرایند یوبیکوئیتیناسیون انجام شده بود؛ در حالی که اسپرم‌های با رنگ سبز کدر، یوبیکوئیتینه شده نبودند. به طور مشابه، پس از بررسی تصاویر حاصل از بررسی متیلاسیون DNA، اسپرم‌های سبز درخشان متیله و اسپرم‌های سبز کدر، غیر متیله بودند.

آنالیز آماری: آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, IBM Corporation, Armonk, NY) انجام گرفت. ارتباط داده‌ها با استفاده از آزمون Correlation coefficient سنجیده شد. $P < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری تفاوت‌ها در نظر گرفته شد.

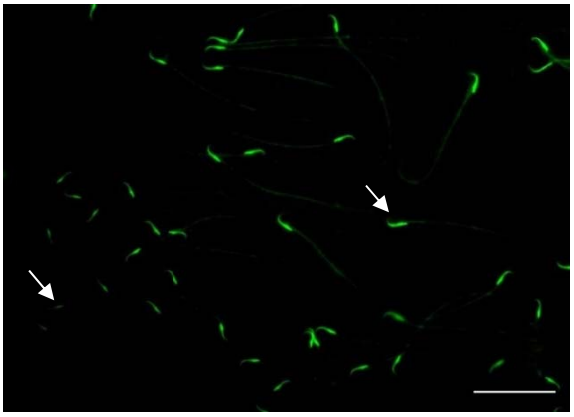
یافته‌ها

با توجه به تصاویر تهیه شده از تکنیک ایمونوفلورسنس، اسپرم‌ها با رنگ سبز درخشان و سبز کدر مشاهده شدند. اسپرم‌های با رنگ سبز

www.SID.ir

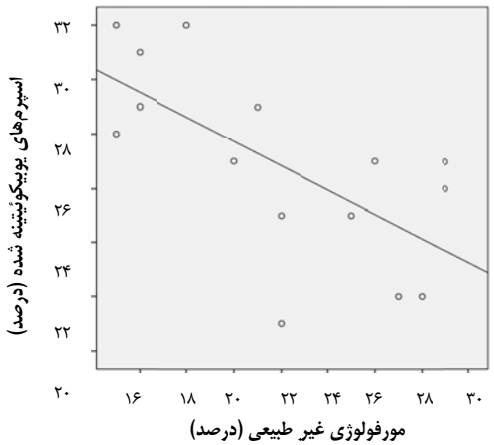
Arshive of SID

درخشان، یوبیکوئیتینه شده بودند و مورد شمارش قرار گرفتند. به طور مشابه، در تصاویر تهیه شده برای تعیین متیلاسیون DNA نیز اسپرم‌های با رنگ سبز درخشان متیله شده بودند و شمارش شدند (شکل ۱).



شکل ۱: فتومیکروگراف تهیه شده از اسپرم‌ها که به منظور بررسی میانگین درصد اسپرم‌های یوبیکوئیتینه شده تهیه گردید (بزرگنمایی ۴۰۰ ×)، پیکان سمت راست اسپرم یوبیکوئیتینه شده (سبز درخشان) را نشان می‌دهد. پیکان سمت چپ نشانگر اسپرم غیر یوبیکوئیتینه شده (سبز کدر) می‌باشد.

نتایج شمارش اسپرم‌ها از نظر وجود یا عدم وجود ارتباط بین یوبیکوئیتیناسیون با متیلاسیون DNA، تحرک و ریخت‌شناسی اسپرمی بررسی شدند. بر این اساس، بین اسپرم‌های یوبیکوئیتینه شده با اسپرم‌های دارای ریخت‌شناسی غیر طبیعی، ارتباط معکوس معنی‌داری وجود داشت (P = ۰/۰۰۷؛ r = −۰/۶۶۷) (شکل ۲). در حالی که، بین درصد یوبیکوئیتیناسیون با متیلاسیون DNA (P = ۰/۹۵۰؛ r = +۰/۱۵۰) و بین اسپرم‌های یوبیکوئیتینه شده با تحرک اسپرم (P = ۰/۴۳۰؛ r = −۰/۲۲۰) رابطه‌ی معنی‌داری مشاهده نشد.



شکل ۲، ضریب همبستگی بین اسپرم‌های یوبیکوئیتینه شده با اسپرم‌های دارای مورفولوژی غیر طبیعی

بحث

یکی از علل مهم ناباروری در میان زوج‌ها، عوامل مردانه است که می‌تواند ناشی از واریکوسل، کریپتورکیدیسم، عفونت، شیمی‌درمانی، تومورها و ضایعات انسدادی باشد (۱۲). آسیب کروماتین اسپرم، یکی از عوامل مهمی است که می‌تواند منجر به ناباروری شود. آسیب DNA اسپرم، می‌تواند ناشی از عوامل اندوژنوس یا اگزوژنوس باشد (۱۳). در بدن، سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی برای مقابله در برابر این آسیب‌ها وجود دارد. سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی بدن شامل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی می‌باشند (۱۴). از جمله مکانیسم‌های حفاظتی دیگر اسپرم در مقابل آسیب‌ها، فرایند اسپرمیوژنز و متراکم شدن کروماتین در اثر جایگزینی هیستون با پروتامین می‌باشد که این تراکم، از اسپرم در مقابل آسیب‌ها حفاظت می‌کند (۱۵).

آنالیز استاندارد اسپرم، به عنوان اولین و یکی از مهم‌ترین ارزیابی‌ها، تحرک، ریخت‌شناسی و غلظت اسپرم را تعیین می‌کند، اما اطلاعاتی درباره‌ی سلامت کروماتین اسپرم نمی‌دهد. به همین دلیل، امروزه ارزیابی های دیگری به منظور تعیین سلامت اسپرم از نظر وجود آسیب کروماتین، Protamination صحیح، آپوپتوز، سلامت غشا و وجود رادیکال‌های آزاد انجام می‌شود. در مطالعات قبلی، رابطه‌ی بین درصد اسپرم‌های یوبیکوئیتینه شده و پارامترهای اسپرمی در انسان بررسی و نتایج متناقضی بین آن‌ها گزارش شده است. در مطالعه‌ی حاضر، با توجه به اهمیت یوبیکوئیتیناسیون و متیلاسیون DNA در سلامت اسپرم جهت داشتن لقاح موفق، برای اولین بار ارتباط بین اسپرم‌های یوبیکوئیتینه شده در موش صحرایی با پارامترهای اسپرمی و متیلاسیون DNA که با آنالیز مایع منی قابل تشخیص نمی‌باشد، بررسی گردید.

نتایج مطالعه‌ی حاضر، ارتباط معنی‌داری بین درصد اسپرم‌های یوبیکوئیتینه شده با ریخت‌شناسی غیر طبیعی نشان داد؛ چرا که پروتئین یوبیکوئیتین، با اتصال به غشای اسپرم‌های ناقص نظیر نقص‌های ریخت‌شناسی، منجر به حذف آن‌ها در اپی‌دیدیم می‌شود و از مشارکت این گونه اسپرم‌ها در فرایند لقاح و انتقال ناهنجاری‌ها به فرزندان جلوگیری می‌کند. همان‌طور که مشاهده گردید، در مطالعه‌ی اخیر نیز با افزایش درصد اسپرم‌های یوبیکوئیتینه شده، درصد ریخت‌شناسی غیر طبیعی کاهش یافت. بین درصد یوبیکوئیتیناسیون با تحرک و متیلاسیون DNA اسپرم رابطه‌ی معنی‌داری مشاهده نشد.

متیلاسیون DNA، شامل اضافه شدن گروه متیل به کربن شماره‌ی ۵ در حلقه‌ی سیتوزین است که به کمک آنزیم DNA متیل ترانسفراز (DNA methyltransferase یا DNMT) انجام می‌شود. رخداد صحیح متیلاسیون DNA، بسیار مهم است؛ چرا که هر گونه تغییر در الگوی طبیعی متیلاسیون DNA، منجر به هیپرمتیلاسیون و هیپومتیلاسیون ژنوم می‌گردد که بیان نادرست ژن‌ها به ویژه ژن‌های

www.SID.ir

Arshive of SID

سرکوب کننده‌ی تومور، تنظیم کننده‌ی چرخه‌ی سلولی، ژن‌های مرتبط با آپوپتوز و پیری را به همراه دارد (۱۶).

در مطالعه‌ی حاضر، ارتباط معنی‌داری بین وقوع یوبیکوئیتیناسیون با متیلاسیون DNA دیده نشد. هر چند که متیلاسیون DNA و یوبیکوئیتیناسیون به عنوان فرایندهایی که کروماتین اسپرم را تحت تأثیر قرار می‌دهند و با آنالیز استاندارد مایع منی قابل بررسی نمی‌باشند، اما با این حال، این دو فرایند می‌توانند به صورت مستقل از یکدیگر عمل کنند. از این رو، ارتباط معنی‌داری بین این دو فرایند مشاهده نگردید.

پیشنهاد می شود در آینده، فرایندهای مولکولی دخیل در این وقایع، ارتباط بین یوبیکوئیتیناسیون با عوامل دیگر مانند تراکم کروماتین و دیگر نقایص ساختاری و عملکردی اسپرم در حجم بزرگ‌تر نمونه و در صورت امکان بر روی نمونه‌های انسانی سنجیده شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به شماره‌ی ۳۹۶۱۴۷ می‌باشد. از این رو، نویسندگان از معاونت پژوهش و فن‌آوری این دانشگاه جهت حمایت مالی پژوهش حاضر، سپاسگزاری می‌نمایند.

References

1. Brugh VM 3rd, Lipshultz LI. Male factor infertility: evaluation and management. Med Clin North Am 2004; 88(2): 367-85.
2. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Veeck LL, et al. New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. Urology 1987; 30(3): 248-51.
3. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. N Engl J Med 2001; 345(19): 1388-93.
4. Kirchhoff C. Molecular characterization of epididymal proteins. Rev Reprod 1998; 3(2): 86-95.
5. Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson WE, Schatten G. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. J Cell Sci 2001; 114(Pt 9): 1665-75.
6. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. Physiol Rev 2002; 82(2): 373-428.
7. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Embryogenesis: Demethylation of the zygotic paternal genome. Nature 2000; 403(6769): 501-2.
8. Hodjat M, Akhondi MA, Al-Hasani S, Mobaraki M, Sadeghi MR. Increased sperm ubiquitination correlates with abnormal chromatin integrity. Reprod Biomed Online 2008; 17(3): 324-30.
9. Eskandari-Shahraki M, Tavalaee M, Deemeh MR, Jelodar GA, Nasr-Esfahani MH. Proper ubiquitination effect on the fertilisation outcome post-ICSI. Andrologia 2013; 45(3): 204-10.
10. Linder RE, Strader LF, Slott VL, Suarez JD. Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to fourteen reproductive toxicants. Reprod Toxicol 1992; 6(6): 491-505.
11. Shi W, Haaf T. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. Mol Reprod Dev 2002; 63(3): 329-34.
12. Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: A common factor in testicular dysfunction. J Androl 2008; 29(5): 488-98.
13. McPherson S, Longo FJ. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. Eur J Histochem 1993; 37(2): 109-28.
14. Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. Oxid Med Cell Longev 2008; 1(1): 15-24.
15. Braun RE. Packaging paternal chromosomes with protamine. Nat Genet 2001; 28(1): 10-2.
16. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev 2002; 16(1): 6-21.

www.SID.ir

Arshive of SID

Journal of Isfahan Medical School Received: 22.08.2017

Vol. 35, No. 445, 1st Week, November 2017 Accepted: 17.09.2017

Investigating the Correlation between Ubiquitination with Motility, Morphology, and DNA Methylation in Rat Sperm

Shahnaz Razavi[1], Farnaz Khadivi[2], Fatemeh Hashemi[2]

Original Article

Abstract

Background: There are various techniques for treatment of male infertility, nowadays. At the beginning, evaluations are performed to determine the cause of infertility and the treatment. These include advanced molecular evaluations and assessment of sperm parameters. There is no study investigating the relationship between sperm parameters as an elementary index of male infertility, and DNA methylation as an important epigenetic mechanism with rat sperm ubiquitination, so far. The aim of this study was to evaluate the motility, morphology, DNA methylation, and ubiquitination in rat sperm and to determine the relationship between them.

Methods: First, 10 male mature rats were kept in experimental condition for 9 weeks (one cycle of spermatogenesis). After sacrificing, their semen samples were used to determine the sperm parameters and smear preparation. Through prepared smear and immunofluorescence assay, percentage of ubiquitinationed and methylated sperm were determined and finally, the correlation coefficient between them was calculated.

Findings: There was no significant correlation between the ubiquitination and DNA methylation. However, there was an inverse and significant correlation between the percentage of ubiquitination and morphological abnormalities in spermatozoa ($P < 0.05$). The percentage of ubiquitinized sperm and sperm motility showed no significant correlation.

Conclusion: Ubiquitination, as one of the important molecular processes, prevents the participation of defective sperm in fertilization, and transmission of disorders to next generation. DNA methylation and ubiquitination affect sperm chromatin, but these two processes act in an independent manner.

Keywords: Sperm motility, DNA methylation, Infertility, Ubiquitination

Citation: Razavi S, Khadivi F, Hashemi F. **Investigating the Correlation between Ubiquitination with Motility, Morphology, and DNA Methylation in Rat Sperm.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(445): 1151-5.

1- Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- MSc Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Shahnaz Razavi, Email: razavi@med.mui.ac.ir

www.SID.ir