

Evaluation of the Effects of Nicotinic Acid and Folic Acid on Morphology, Membrane Integrity and Quality of Sperm Chromatin Concentration in Normozoospermic Men during Cryopreservation.

Raziah Hashemi¹, Farhad Golshan-Iranpour^{2,7}, Gholam Reza Dashti^{3,7*}, Shahla Ishaqi^{4,7}, Afsaneh Jaberi Asl⁵, Abol fazl dashti.⁶

1. MD, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. ORCID ID: 0000-0002-1986-3629.

2. Associated Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. ORCID ID: 0000-0003-3390-3233

3. Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. Email: dashti@mui.ac.ir; Tel: 03137929040, ORCID ID: 0000-0002-2725-6423.

4. Laboratory Technician, Shahid Beheshti hospital, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran: ORCID ID: 0000-0001-9181--8761.

5. Ph.D, Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. ORCID ID: 0000-0001-7362-9713.

6. Professional doctor of Veterinary Sciences, School of Veterinary Sciences, Azad University of Shahrekord, Shahrekord, Iran. ORCID ID: 0000-0001-8088-2020

7. Saint Maryam Fertility and Infertility center, Shahid Beheshti hospital, Isfahan, Iran

ABSTRACT

Background and Aim: Sperm cryopreservation is an important assisted reproductive technique. However, due to increased production of reactive oxygen species and oxidative stress, it can impair sperm function and reduce quality of fertility. The aim of this study was to investigate the effects of nicotinic acid and folic acid on maintenance of sperm function during cryopreservation by evaluation of sperm parameters and chromatin concentration.

Material and Methods: Thirty samples were collected from normozoospermic men and examined for chromatin quality, viability, membrane integrity, morphology and motility. The samples were frozen and placed in 4 groups: control, folic acid (50 nM), nicotinic acid (10 mM) and a combination of both. After cryopreservation, the four groups were compared with one another in regard to the sperm parameters. Also the sperm parameters were compared before and after freezing in every group. We assessed chromatin quality by TB staining, viability by eosin-nigrosin staining, membrane integrity by hypo osmotic swelling test, and morphology and movement by CASA software.

Results: Before cryopreservation chromatin quality, membrane integrity, normal morphology, sperm motility were lower and immotile sperms were higher in all groups compared to those after cryopreservation ($p < 0.001$). The highest chromatin quality was detected in the folic acid, folic acid + nicotinic acid groups and the lowest chromatin quality was observed in the control group ($p < 0.05$). The rates of sperm viability and normal morphology were lowest in the control group and highest in the folic acid and other groups ($p < 0.05$). percentage of membrane integrity was highest in the folic acid group followed by nicotinic acid + folic acid, nicotinic acid and control groups, respectively ($p < 0.05$). Folic acid played an important role in maintaining sperm parameters.

Conclusion: Nicotinic acid and folic acid have a positive effect on maintaining sperm function during cryopreservation.

Keywords: Nicotinic acid, Folic acid, Sperm, Chromatin, Cryopreservation.

Received: May 22, 2019

Accepted: July 27, 2021

How to cite the article: Raziah Hashemi, Farhad Golshan-Iranpour, Gholam Reza Dashti, Shahla Ishaqi, Afsaneh Jaberi Asl, Abol fazl dashti. Evaluation of the Effects of Nicotinic Acid and Folic Acid on Morphology, Membrane Integrity and Quality of Sperm Chromatin Concentration in Normozoospermic Men during Cryopreservation. *SJKU* 2022;27(1):15-27.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

بررسی تأثیر اسیدنیکوتینیک و اسید فولیک بر مورفولوژی، تمامیت غشاء و کیفیت تراکم

کروماتین اسپرم مردان نورموزواسپرمی در طی فرآیند انجماد

راضیه هاشمی^۱، فرهاد گلشن ایرانپور^۲، غلامرضا دشتی^۳، شیلا اسحاقی^۴، افسانه جابری اصل^۵، ابوالفضل دشتی^۶.

۱. دکترای پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی اصفهان، گروه علوم تشریحی، اصفهان ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰۰-۰۰۰۲-۳۶۲۹-۱۹۸۶

۲. دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده علوم پزشکی اصفهان، گروه علوم تشریحی، اصفهان، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰۰-۰۰۰۲-۲۷۲۵-۶۴۲۳

۳. استاد، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده علوم پزشکی اصفهان، گروه علوم تشریحی، اصفهان، ایران. نویسنده مسئول: پست الکترونیکی: dashti@mui.ac.ir، تلفن: ۰۳۱۳۷۹۲۹۰۴۰، کد ارکید: ۰۰۰۰۰-۰۰۰۳-۳۲۳۳-۳۳۹۰

۴. کارشناس آزمایشگاه، بیمارستان شهید بهشتی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰۰-۰۰۰۱-۹۱۸۱-۸۷۶۱

۵. دانشجوی دکتری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده علوم پزشکی اصفهان، گروه علوم تشریحی، اصفهان، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰۰-۰۰۰۱-۹۷۱۳-۷۳۶۲

۶. دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشگاه آزاد شهر کرد، دانشکده دامپزشکی، شهر کرد، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰۰-۰۰۰۱-۸۰۸۸-۲۰۲۰

۷. مرکز باوری و ناباروری حضرت مریم، بیمارستان شهید بهشتی-دانشگاه علوم پزشکی اصفهان- اصفهان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: انجماد اسپرم، یک تکنیک مهم کمک باروری است؛ اما به دلیل افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و ایجاد استرس اکسیداتیو، توانایی اختلال در عملکرد اسپرم و کاهش کیفیت باروری را دارد. هدف این مطالعه بررسی تأثیر اسیدنیکوتینیک و اسید فولیک در طی فرآیند انجماد بر پارامترهای اسپرمی و تراکم کروماتین به منظور حفظ عملکرد اسپرم بود.

روش‌ها: ۳۰ نمونه نورموزواسپرمی جمع‌آوری شد و از نظر کیفیت کروماتین، حیات، تمامیت غشاء، مورفولوژی و حرکت اسپرم بررسی و در ۴ گروه: کنترل، اسید فولیک (۵۰ nM)، اسید نیکوتینیک (۱۰ mM) و ترکیبی از هر دو منجمد شدند. بعد از انجماد، پارامترها اسپرم مجدداً بررسی و هر گروه با قبل از انجماد و سایر گروه‌ها مقایسه شد. کیفیت کروماتین با رنگ‌آمیزی TB، حیات با رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین، تمامیت غشاء با *hypo Osmotic swelling Test*، مورفولوژی و حرکت با نرم‌افزار CASA بررسی شدند.

یافته‌ها: کیفیت کروماتین، تمامیت غشاء، مورفولوژی نرمال، حرکت اسپرم در همه گروه‌ها کمتر و اسپرم‌های بی‌حرکت در همه گروه‌ها بیشتر از قبل از انجماد بود ($p < 0/001$). کیفیت کروماتین، در دو گروه اسید فولیک و اسید نیکوتینیک + اسید فولیک بیشترین و گروه کنترل کمترین بود ($p < 0/05$). درصد حیات اسپرم و مورفولوژی نرمال، در گروه اسید فولیک و سایر گروه‌ها بیشترین و در گروه کنترل کمترین بود ($p < 0/05$). بیشترین درصد تمامیت غشاء در گروه اسید فولیک و به ترتیب اسید نیکوتینیک + اسید فولیک، اسید نیکوتینیک و کنترل بودند ($p < 0/05$). اسید فولیک نقش مهمی در حفظ پارامترهای اسپرم داشت.

نتیجه‌گیری: اسیدنیکوتینیک و اسید فولیک طی انجماد اسپرم، با بالا بردن، بر حفظ عملکرد آن اثر مثبت دارند.

کلمات کلیدی: اسید نیکوتینیک، اسید فولیک، اسپرم، کروماتین، انجماد.

مقدمه:

در شرایط فیزیولوژیک، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (reactive oxygen species-ROS) کم و در سطوح پایه‌ای کنترل شده، نقش مهم در عملکرد طبیعی اسپرم مانند بلوغ، ظرفیت یابی، واکنش آکروزومی، آمیختگی با سلول تخمک و لقاح، ایفا می‌کند. گونه‌های فعال اکسیژن شامل گونه فعال آنیونی سوپراکسید، هیدروکسیل، هیدروژن پراکسید و نیتریک اکسید متابولیت‌های نرمال در دستگاه تولید مثلی مردان هستند (۱-۳). اگر به هر علتی تعادل بین سطح گونه‌های فعال اکسیژن و آنتی‌اکسیدان‌ها در بدن بر هم بخورد، استرس اکسیداتیو (OS) ایجاد می‌شود، که باعث آسیب به اسپرم و قدرت باروری در مردان را کاهش می‌دهد (۴). انجماد اسپرم، تکنیک مهمی در آزمایشگاه‌ها، مراکز باروری- ناباروری و بانک اسپرم، جهت مدیریت و حفظ باروری مردان استفاده می‌شود. فرآیند انجماد اسپرم، شامل ذخیره طولانی‌مدت آن در زمینه سرطان قبل از شیمی‌درمانی، باروری و ناباروری و بانک اسپرم هست. محققان نشان داده‌اند که این اثرات نامطلوب، در تولید بیش از اندازه‌ی رادیکال‌های فعال اکسیژن به دلیل شوک سرما، در طی فرآیند انجماد و ذوب کردن، حرکت و قابلیت حیات اسپرم را کاهش می‌دهد. تمامیت میتوکندری و غشای آکروزوم تغییر و اشکال غیر طبیعی اسپرم افزایش می‌یابد (۵-۸). انجماد بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موجود در اسپرم نیز تأثیر دارد. کاتالاز، یک آنتی‌اکسیدان است که نقش مهمی در حفظ سلامت اسپرم را دارد؛ ولی در طی انجماد اسپرم کاهش می‌یابد. همچنین این کاهش به‌طور واضح در سوپراکسید دسموتاز مشاهده شده است. در نتیجه این تغییر تعادل آنتی‌اکسیدان‌ها و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی روی باروری و کیفیت اسپرم تأثیر دارد (۹).

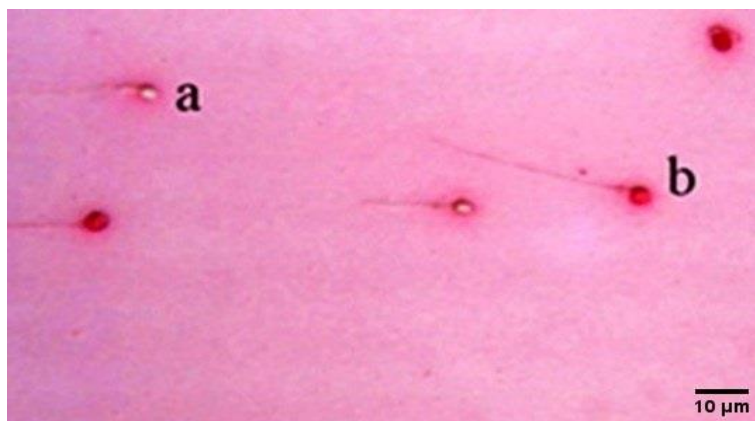
با وجود پیشرفت‌های چشمگیر در زمینه انجماد اسپرم، ما با کاهش حیات و حرکت در اسپرم پس از انجماد مواجه

هستیم. محققین، یکی از راهکارهای مفید و مناسب برای بهبود کیفیت اسپرم منجمد شده، افزودن مواد مختلف از جمله آنتی‌اکسیدان‌ها به محیط انجماد اسپرم است (۱۰). مطالعات نشان داده‌اند، اضافه کردن ویتامین C و E به محیط انجماد، به صورت جداگانه باعث بهبود حرکت، بقا و تمامیت غشای اسپرم خروس می‌شوند (۱۱). ویتامین C و متون در دوزهای بالا، اثر مثبتی بر کاهش آسیب DNA اسپرم موش صحرائی دارند (۱۲). تیموکینون، بدون کاهش تعداد اسپرم‌های زنده، حرکت اسپرم را کاهش می‌دهد (۱۳). دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره سیاه دانه، درصد اسپرم‌های متحرک را در محیط کشت کاهش می‌دهد؛ ولی با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، تغییری در درصد اسپرم‌های زنده صورت نمی‌گیرد (۱۴). ویتامین E، آسیب DNA اسپرم را در خرگوش ناشی از مصرف کلسترول و آهن را کاهش می‌دهد (۱۵). اسید فولیک یا ویتامین B₉ از ویتامین‌های محلول در آب و دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است (۱۶). یکی از ویتامین‌های اساسی بدن است و قادر به تولید آن نیست. این ویتامین در مواد غذایی مانند سبزی‌ها با برگ‌های سبز، مرکبات، زرده‌ی تخم‌مرغ و جگر وجود دارد. اسید فولیک، از نظر متابولیسمی فعال نیست و باید طی فرآیندهای آنزیمی به فرم فعال خود تبدیل شود (۱۷، ۱۸). مکمل‌های فولیک اسید اثرات سودمندی بر پارامترهای اسپرم از جمله کاهش آسیب‌های DNA دارد (۱۹). اسید نیکوتینیک، از ویتامین‌های محلول در آب و دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. در فرآیندهای مختلف بیولوژیکی شرکت می‌کند و به تولید انرژی میتوکندریایی کمک می‌کند. مصرف مکمل اسید نیکوتینیک، نیاسین یا ویتامین B₃ به عنوان یک انتخاب مناسب در درمان بیماری‌های کبد با منشأ استرس اکسیداتیو است (۲۰). مصرف نیکوتینیک اسید به مدت سه ماه در مردان نابارور منجر به افزایش تولید و تحرک اسپرم می‌شود (۲۱).

آگاهانه انتخاب شدند. مایع منی از مردان نورموزواسپرمی که حداقل ۳-۴ روز مقاربت نداشتند و بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۰ انتخاب و در ظروف استریل به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری تا به شکل مایع تبدیل شدند. نمونه‌ها، در محیط کشت آلبومین و ۵۰۰ میلی لیتر F10 Ham's نگهداری شدند (۲۲). قبل از فرآیند انجماد اسپرم‌ها از نظر حیات، تراکم کروماتین، تمامیت غشاء، حرکت و مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفتند و در ۴ گروه کنترل، محیط‌های غنی شده با ۵۰ nM اسید فولیک، ۱۰ mM اسید نیکوتینیک و ترکیب هر دو منجمد شدند.

رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین:

جهت بررسی حیات اسپرم، دو قطره ائوزین ۱٪ به یک قطره از نمونه مایع منی شده اضافه و بعد از گذشت ۳۰ ثانیه ۳ قطره نیگروزین ۱۰٪ به نمونه اضافه شدند. لام‌های اسپرم تهیه شد و بعد از خشک شدن در دمای آزمایشگاه به کمک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی عدسی شیئی ۱۰۰، تعداد ۲۰۰ اسپرم‌ها شمارش و درصد اسپرم‌های زنده محاسبه گردید. اسپرم‌های زنده به رنگ سفید و اسپرم‌های مرده با غشای پاره شده رنگ ائوزین را جذب و به رنگ قرمز ظاهر شدند (۲۳).

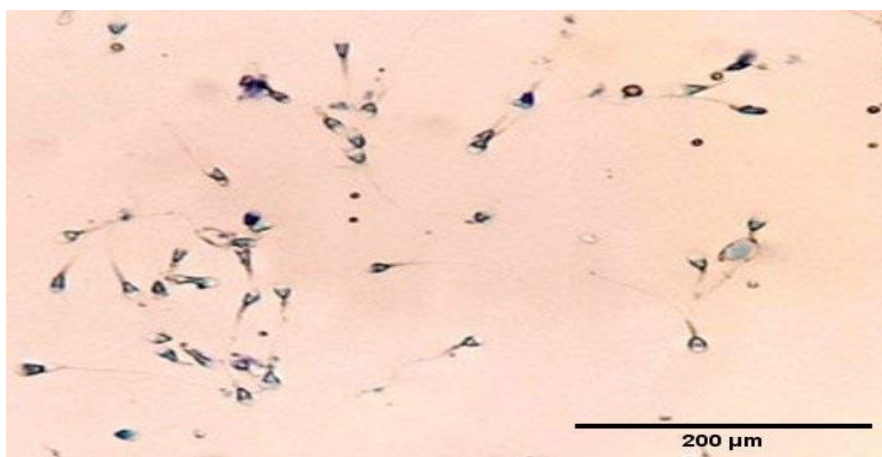


تصویر ۱: رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین. اسپرم‌های بدون رنگ (a)، به عنوان سلول زنده و اسپرم‌های قرمز رنگ (b) به عنوان سلول مرده در نظر گرفته شدند (میکروسکوپ نوری بزرگ نمایی $\times 1000$)

رنگ آمیزی (TB) Toluidine Blue:

اتاق رنگ شدند. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی عدسی شیئی ۱۰۰ شمارش شدند. با توجه به رنگ سر اسپرم‌ها، به آن‌ها نمره‌های ۰ تا ۲ داده شد. ۰: آبی روشن (کروماتین طبیعی)، ۱: آبی تیره (کروماتین غیرطبیعی خفیف)، ۲: بنفش و ارغوانی (کروماتین غیرطبیعی). اسپرم با نمره‌ی صفر سلول طبیعی و اسپرم با نمره‌های ۱ و ۲ به عنوان سلول غیر طبیعی ارزیابی شدند (۲۴).

تولویدین بلو جهت بررسی آسیب کروماتین اسپرم استفاده شد. ابتدا، اسمیرهای از مایع منی روی لام های تهیه شد، سپس با محلول اتانول ۹۶٪ و استون تازه به نسبت ۱:۱ در دمای °C ۴ به مدت ۳۰ دقیقه فیکس شدند. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای °C ۴ در محلول ۰٫۱ نرمال هیدروکلریک اسید انکوبه شدند. لام ها ۳ مرتبه و هر بار ۲ دقیقه با آب مقطر شستشو داده شدند. لام های از قبل آماده شده در محلول تولوئیدین بلو ۰/۰۵٪ و سترات فسفات ۵۰٪، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای

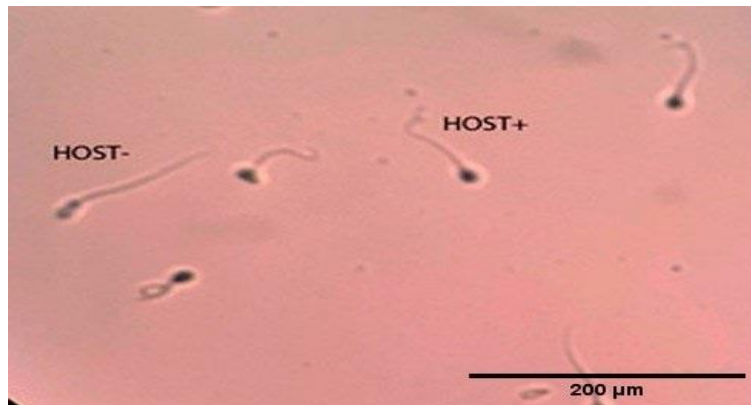


۰ تصویر ۲: رنگ آمیزی تولوئیدین بلو: آبی روشن (کروماتین خوب) ۱: آبی تیره (کروماتین غیرطبیعی به صورت خفیف) ۲: بنفش و ارغوانی (کروماتین شدیداً غیرطبیعی). (میکروسکوپ نوری بزرگ‌نمایی $\times 1000$)

لیتر از نمونه مایع منی به ویال اضافه و مخلوط شدند. مخلوط را در دمای °C ۳۷ به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری و ۱۰ میکرو لیتر از مخلوط را روی لام قرار داده و بررسی شد. از هر نمونه، ۲۰۰ اسپرم در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست شمارش و درصد اسپرم‌ها محاسبه گردید. اسپرم‌های زنده با غشا سالم دارای متورم و دم پیچ خورده بودند، اسپرم‌های با غشا سلولی تخریب شده متورم نشده بودند و دم صاف داشتند (۲۵).

بررسی تمامیت غشاء به روش HOST (Hypo Osmotic Swelling Test)

برای تهیه محلول ایجاد کننده تورم در اسپرم، ۰/۷۳۵ گرم سدیم سترات دی هیدرید و ۱/۳۵۱ گرم فروکتوز-دی در ۱۰۰ میلی لیتر آب خالص حل شد. سپس کسرهای ۱ میلی لیتری از این محلول در فریزر با دمای منهای °C ۲۰ نگهداری شد. هنگام استفاده، برای هر نمونه یکی از ویال‌های فریز شده را در دمای °C ۳۷ قرار دادیم تا گرم شود. ۱۰۰ میکرو



تصویر ۳: رنگ آمیزی HOST. اسپرم‌های با دم پیچ خورده، دارای غشا سالم (HOST+) و اسپرم‌های با دم صاف دارای غشا ناسالم (HOST-) (میکروسکوپ نوری بزرگ‌نمایی $\times 1000$)

بررسی حرکت و مورفولوژی اسپرم:

مورفولوژی و حرکت اسپرم به کمک نرم‌افزار کامپیوتر (computer assisted sperm analysis) CASA اندازه‌گیری شدند. مورفولوژی به صورت درصد اسپرم‌ها با شکل طبیعی و حرکت به صورت درصد اسپرم‌های متحرک و غیر متحرک بررسی شدند.

روش انجماد و ذوب اسپرم:

انجماد اسپرم با استفاده از محیط تجاری شرکت vitrolife (Sperm Freeze Solution, Vitrolife, Goteborg, Sweden) انجام گرفت. انجماد اسپرم، با ویال‌های انجماد (cryovial) و مراحل انجماد و ذوب بر اساس روش vitrolife انجام گرفت. نمونه‌ها در ۴ گروه کنترل، محیط انجماد غنی شده با اسید فولیک، اسید نیکوتینیک و ترکیب هر دو منجمد شدند.

بعد از بررسی اولیه، نمونه سمن با نسبت ۱:۱ در دمای اتاق با محلول انجماد اسپرم مخلوط و به داخل کرایو ویال انتقال داده شدند. مخلوط تهیه شده، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. کرایو ویال کدگذاری شده را بر حسب گروه نشانه‌گذاری گردید. کرایو ویال‌ها ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در معرض بخار نیتروژن مایع و سپس بلافاصله در داخل تانک حاوی نیتروژن مایع در دمای -196 - درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، ویال‌ها از تانک خارج و بلافاصله داخل ظرف حاوی نیتروژن مایع و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب 35 ± 2 درجه

سانتی‌گراد غوطه‌ور شد. محتوی داخل لوله‌ی سانتریفیوژ برای بررسی پارامترهای اسپرم از نظر حیات، تراکم کروماتین، تمامیت غشاء، حرکت و مورفولوژی مجدد مورد ارزیابی قرار گرفتند. هر کدام از پارامترهای اندازه‌گیری شده در هر گروه با داده‌های پایه قبل از انجماد و سایر گروه‌ها مقایسه شدند.

تجزیه و آنالیز آماری:

داده‌ها پس از جمع‌آوری وارد نرم‌افزار SPSS 20 و نتایج بر اساس متغیرهای کمی با شاخص‌های مرکزی و پراکندگی گزارش شد. برای متغیرهای کیفی از جدول و نمودار استفاده شد. جهت تجزیه و تحلیل آزمون T وابسته و آنالیز واریانس و متغیرهای کیفی، آزمون کای دو (X^2) و Mc Nemar به کار گرفته شد.

یافته‌ها

افزودن اسید فولیک و اسید نیکوتینیک به محیط انجماد اسپرم، تأثیر مثبت در حفظ کیفیت تراکم کروماتین، حیات، تمامیت غشاء و مورفولوژی نرمال در مقایسه با گروه کنترل داشت. اسید فولیک به تنهایی در مقایسه با سایر گروه‌ها نقش مهمی در ارتقا کیفیت تراکم کروماتین، حیات و تمامیت غشاء اسپرم همراه بود (جدول شماره ۱، نمودار شماره ۱). افزودن اسید فولیک و اسید نیکوتینیک به محیط انجماد اسپرم، تأثیری بر حرکت آن در مقایسه با گروه کنترل

نداشت (جدول شماره ۳). حرکت اسپرم در همه گروه‌ها بعد از انجماد، کاهش یافته بود (جدول شماره ۲).

جدول ۱: میانگین تراکم کروماتین، حیات اسپرم، درصد اسپرم با غشاء سالم و درصد اسپرم با شکل نرمال قبل و بعد از انجماد در چهار گروه.

P-value	بعد از انجماد		قبل از انجماد		گروه	متغیر
	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین		
<0/001	۸/۴	۸۶/۱	۶/۳	۹۴/۷	اسید نیکوتینیک	تراکم کروماتین
<0/001	۹/۲	۸۷/۸	۶/۳	۹۴/۷	اسید نیکوتینیک + اسید فولیک	
<0/001	۹/۴	۸۹/۳	۶/۳	۹۴/۷	اسید فولیک	
<0/001	۹/۶	۷۷/۴	۶/۳	۹۴/۷	کنترل	
<0/001	۱۰/۶	۳۱/۹	۸/۹	۶۵/۱	اسید نیکوتینیک	حیات اسپرم
<0/001	۱۰/۱	۳۱/۱	۸/۹	۶۵/۱	اسید نیکوتینیک + اسید فولیک	
<0/001	۹/۵	۳۷/۵	۸/۹	۶۵/۱	اسید فولیک	
<0/001	۹/۱	۲۲/۶	۸/۹	۶۵/۱	کنترل	
<0/001	۸/۵	۶۲/۸	۸/۱	۷۹/۱	اسید نیکوتینیک	درصد اسپرم با غشاء سالم
<0/001	۱۰/۱	۳۱/۱	۸/۱	۷۹/۱	اسید نیکوتینیک + اسید فولیک	
<0/001	۷/۹	۷۲/۰۱	۸/۱	۷۹/۱	اسید فولیک	
<0/001	۱۰/۴	۵۴/۵	۸/۱	۷۹/۱	کنترل	
<0/001	۱/۹	۱/۹	۰/۸	۵/۵	اسید نیکوتینیک	درصد اسپرم با شکل نرمال
<0/001	۱/۹	۱/۹	۰/۸	۵/۵	اسید نیکوتینیک + اسید فولیک	
<0/001	۱/۸	۱/۷	۰/۸	۵/۵	اسید فولیک	
<0/001	۰/۳	۰/۱	۰/۸	۵/۵	کنترل	

میانگین تراکم کروماتین، حیات اسپرم، درصد اسپرم با غشاء سالم و درصد اسپرم با شکل نرمال در هر چهار گروه بعد از انجماد به طور معناداری کمتر از قبل از انجماد ($P < 0/001$).

جدول ۲: میانگین درصد اسپرم با حرکت پیشرونده سریع، حرکت پیشرونده کند، حرکت درجا و بی حرکت قبل و بعد از انجماد در چهار گروه

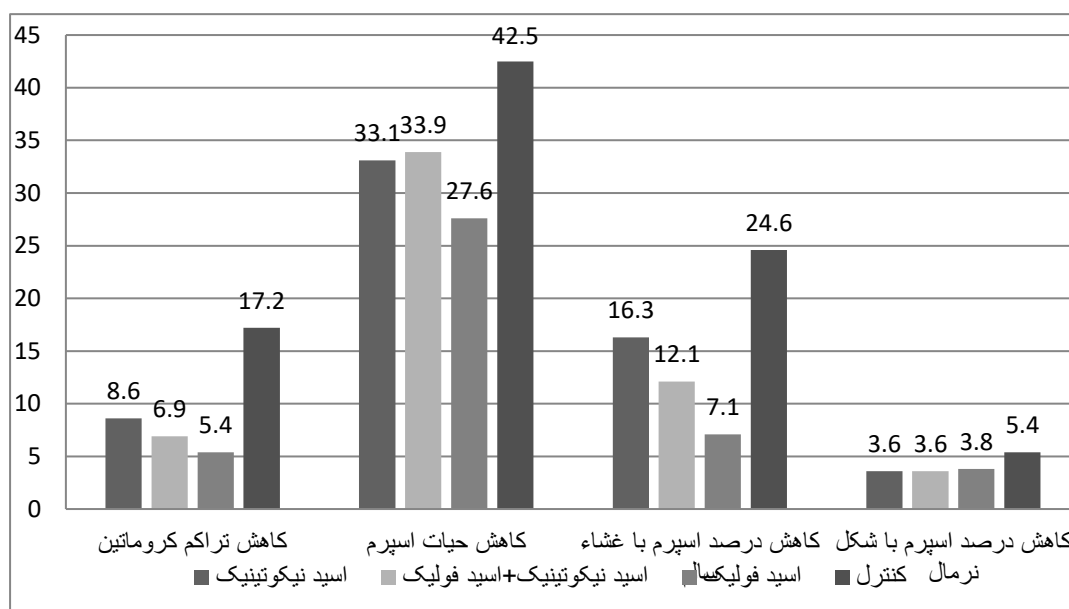
P-value	بعد از انجماد		قبل از انجماد		گروه	متغیر
	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین		
<۰/۰۰۱	۳/۴	۳/۳	۸/۰۳	۲۲/۳	اسید نیکوتینیک	درصد اسپرم با حرکت پیشرونده سریع
<۰/۰۰۱	۲/۶	۲/۳	۸/۰۳	۲۲/۳	اسید نیکوتینیک + اسید فولیک	
<۰/۰۰۱	۱/۹	۱/۷	۸/۰۳	۲۲/۳	اسید فولیک	
<۰/۰۰۱	۰/۸	۰/۴	۸/۰۳	۲۲/۳	کنترل	
<۰/۰۰۱	۱۱/۸	۱۵/۲	۸/۳	۴۱/۳	اسید نیکوتینیک	درصد اسپرم با حرکت پیشرونده کند
<۰/۰۰۱	۷/۵	۱۲/۷	۸/۳	۴۱/۳	اسید نیکوتینیک + اسید فولیک	
<۰/۰۰۱	۸/۹	۱۲/۴	۸/۳	۴۱/۳	اسید فولیک	
<۰/۰۰۱	۱۲/۲	۱۷/۸	۸/۳	۴۱/۳	کنترل	
<۰/۰۰۱	۵/۷	۸/۲	۴/۳	۲۳/۵	اسید نیکوتینیک	درصد اسپرم با حرکت درجا
<۰/۰۰۱	۴/۱	۱۱/۱	۴/۳	۲۳/۵	اسید نیکوتینیک + اسید فولیک	
<۰/۰۰۱	۶/۰۱	۱۰/۱	۴/۳	۲۳/۵	اسید فولیک	
<۰/۰۰۱	۴/۴	۷/۱	۴/۳	۲۳/۵	کنترل	
<۰/۰۰۱	۱۹/۰۲	۷۳/۳	۸/۴	۱۲/۹	اسید نیکوتینیک	درصد اسپرم بی حرکت
<۰/۰۰۱	۱۲/۳	۷۳/۸	۸/۴	۱۲/۹	اسید نیکوتینیک + اسید فولیک	
<۰/۰۰۱	۱۵/۴	۷۵/۹	۸/۴	۱۲/۹	اسید فولیک	
<۰/۰۰۱	۱۴/۹	۷۴/۷	۸/۴	۱۲/۹	کنترل	

اسپرم بی حرکت در چهار گروه بعد از انجماد به طور معناداری بیشتر از قبل از انجماد بود ($p < ۰/۰۰۱$).

درصد اسپرم با حرکت پیشرونده سریع، حرکت پیشرونده کند و حرکت درجا در چهار گروه بعد از انجماد به طور معناداری کمتر از قبل از انجماد بود ($p < ۰/۰۰۱$). درصد

نیکوتینیک بود، و در این دو گروه کمتر از گروه کنترل بود ($p < 0/05$). درصد اسپرم با غشاء سالم در گروه کنترل بیشتر از گروه اسید نیکوتینیک، در گروه اسید نیکوتینیک بیشتر از گروه اسید نیکوتینیک + اسید فولیک و در گروه اسید نیکوتینیک + اسید فولیک بیشتر از گروه اسید فولیک بود ($p < 0/05$). درصد اسپرم با شکل نرمال در گروه کنترل بیشتر از سه گروه دیگر بود ($p < 0/05$)؛ اما بین سه گروه دیگر اختلاف معنادار مشاهده نشد ($p < 0/05$).

میانگین کاهش تراکم کروماتین، حیات اسپرم، درصد اسپرم با غشاء سالم و درصد اسپرم با شکل نرمال بعد از انجماد نسبت به قبل از انجماد بین چهار گروه اختلاف معنادار داشت ($p < 0/001$). میانگین کاهش تراکم کروماتین بعد از انجماد در دو گروه اسید فولیک و اسید نیکوتینیک + اسید فولیک کمتر از گروه اسید نیکوتینیک و در گروه اسید نیکوتینیک کمتر از گروه کنترل بود ($p < 0/05$). حیات اسپرم در گروه اسید فولیک کمتر از دو گروه اسید نیکوتینیک + اسید فولیک و اسید



نمودار ۱: میانگین کاهش تراکم کروماتین، حیات اسپرم، اسپرم با غشاء سالم و اسپرم با شکل نرمال بعد از انجماد نسبت به قبل از انجماد در چهار گروه

جدول ۳: میانگین کاهش اسپرم با حرکت پیشرونده سریع، حرکت پیشرونده کند و حرکت درجا و افزایش اسپرم بی حرکت بعد از انجماد نسبت به قبل از انجماد در چهار گروه.

متغیر	گروه	میانگین	انحراف معیار	P-value
اسید نیکوتینیک	اسید نیکوتینیک	۱۹/۱	۸/۲	۰/۵۸
کاهش درصد اسپرم با حرکت پیشرونده	اسید نیکوتینیک + اسید فولیک	۲۰/۰۱	۸/۱	
سریع	اسید فولیک	۲۰/۷	۷/۷	
کنترل	کنترل	۲۱/۹	۸/۱	

	۱۵/۴	۲۶/۱	اسید نیکوتینیک	
۰/۴۸	۱۳/۱	۲۸/۳	اسید نیکوتینیک + اسید فولیک	کاهش درصد اسپرم با حرکت پیشرونده کند
	۱۳/۱	۲۸/۶	اسید فولیک	
	۱۴/۳	۲۳/۵	کنترل	
	۸/۵	۱۵/۳	اسید نیکوتینیک	
۰/۱۱	۵/۹	۱۲/۴	اسید نیکوتینیک + اسید فولیک	کاهش درصد اسپرم با حرکت درجا
	۶/۶	۱۳/۴	اسید فولیک	
	۵/۶	۱۶/۴	کنترل	
	۲۲/۱	۶۰/۴	اسید نیکوتینیک	
۰/۹۶	۱۶/۲	۶۰/۷	اسید نیکوتینیک + اسید فولیک	افزایش درصد اسپرم بی حرکت
	۱۷/۳	۶۲/۷	اسید فولیک	
	۱۴/۸	۶۱/۸	کنترل	

بحث

انجماد اسپرم، با ترکیبی از مکانیسم‌ها بر روی عملکرد اسپرم از جمله، آسیب کروماتین مؤثر است. کاربرد آنتی‌اکسیدان‌ها در محیط انجماد، مقاومت اسپرم را در مقابل آسیب‌های انجماد را بالا می‌برد (۲۵). مطالعه پیش رو نیز نشان داد که انجماد اسپرم در محیط‌های غنی شده با اسید فولیک و اسید نیکوتینیک و ترکیب هر دو همواره به نسبت گروه کنترل نقش مهمی در حفظ اسپرم در مقابل آسیب‌های انجماد داشت. مطالعات قبلی اثر مثبت کاربرد آنتی‌اکسیدان در محیط انجماد اسپرم را ثابت کرده‌اند، و توانایی به حداقل رساندن اثرات مخرب انجماد اسپرم و حفظ پتانسیل باروری را دارند (۲۶، ۲۷). فکوری و همکاران نشان داده‌اند، افزودن آنتی‌اکسیدان فولیک اسید سبب بهبود پارامترهای حرکتی در اسپرم رت می‌شود (۲۸). در مطالعه دیگر، مشخص شده است که اسید فولیک در محیط انجماد اسپرم انسان به طور کارآمد رادیکال‌های آزاد را پاکسازی و پراکسیداسیون لیپیدی (LPO) را مهار می‌کند. اضافه کردن اسید فولیک

به محیط انجماد قبل از فرآیند انجماد اسپرم، درصد حیات و حرکت پیشرونده سریع اسپرم را بعد از انجماد در مقایسه با گروه کنترل بهبود داد (۲۹). مطالعه پیشرو نیز نقش مهم اسید فولیک را در حفظ حیات، کیفیت کروماتین و تمامیت غشاء اسپرم نشان داد؛ اما حرکت اسپرم به نسبت گروه کنترل بعد از انجماد تفاوت معناداری نداشت.

تأثیر اسید نیکوتینیک در دو مطالعه دیگر بر روی اسپرم گراز وحشی و گاو بررسی شده است که نتایج حاصل از آن‌ها نشان داد است که اسید نیکوتینیک به میزان ۵mM و ۱۰، قابلیت حیات و کیفیت اسپرم، کیفیت رویان و تشکیل بلاستوسیست را بهبود می‌دهد. همچنین اسید نیکوتینیک در محیط انجماد، بر حیات، واکنش آکروزوم و تمامیت میتوکندری اسپرم گراز وحشی اثر مثبت دارد (۳۰). اضافه کردن ۳۰mM اسید نیکوتینیک به محیط انجماد در مقایسه با ۱۵mM اسید نیکوتینیک و کنترل، حیات و تمامیت میتوکندری اسپرم گاو را بهبود می‌بخشد و آسیب غشای آکروزوم و اشکال غیر طبیعی را کاهش می‌دهد (۳۱). مطالعه پیشرو نیز اثر مثبت اسید

اسیدفولیک در حفظ تمامیت غشاء اسپرم، بیشترین تأثیر داشت و بعد از آن به ترتیب گروه‌های اسیدفولیک+اسیدنیکوتینیک و اسید نیکوتینیک در مقایسه با کنترل اثر مثبت داشت. درصد اسپرم با اشکال غیر طبیعی و کاهش حرکت اسپرم، در گروه کنترل در مقایسه با سایر گروه‌ها بیشتر بود؛ ولی در بین سایر گروه‌ها تفاوت معناداری نداشت.

نتیجه گیری

اسیدفولیک، نقش مهمی در حفظ حیات و تمامیت غشاء اسپرم در طی انجماد داشت. اسید نیکوتینیک به طور جداگانه در مقایسه با اسید فولیک به تنهایی تأثیر مثبت کمتری داشت. به نظر می‌رسد میزان اسید نیکوتینیک کم بوده است و نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه است. ترکیب این دو آنتی‌اکسیدان می‌تواند نقش مهمی در حفظ حیات اسپرم و کاهش اثرات مخرب انجماد داشته باشد.

تشکر و قدردانی

از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و مرکز ناباروری بیمارستان شهید بهشتی اصفهان به سبب حمایت از این طرح سپاسگزاریم. هیچ کدام از نویسندگان مقاله تعارض منافی ندارند.

نیکوتینیک را بر حیات، تمامیت غشاء و کیفیت کروماتین و مورفولوژی اسپرم در مقایسه با کنترل نشان داد. همچنین، در ادامه مطالعات قبلی، تأثیر اضافه کردن ۵۰nM اسیدفولیک و ۱۰mM اسید نیکوتینیک به طور جداگانه و ترکیبی به محیط انجماد اسپرم انسان بررسی شد. درمان با اسید فولیک با دوز ۵ میلی گرم روزانه در مردان با کاهش قابلیت باروری، تأثیری بر روی پارامترهای اسپرمی از جمله حیات، حرکت و مورفولوژی در مقایسه با مصرف دارونما نداشت (۳۲).

اسیدفولیک در کاهش LPO، با مصرف خوراکی آن در مقایسه با دارونما، تفاوتی نشان نداد. در این مطالعه، اسیدفولیک نقش مهمی در انجماد اسپرم در طی حفظ پارامترهای اسپرمی ایفا کرد که همگام با مطالعه قبلی بود. با توجه به نتایج دست آمده، کیفیت تراکم کروماتین، حیات، تمامیت غشاء، مورفولوژی نرمال و حرکت اسپرم در همه گروه‌ها در مقایسه با قبل از انجماد کاهش یافت که این بیانگر آسیب وارده بر اسپرم در فرآیند انجماد بود. در بین گروه‌ها، گروه اسیدفولیک و اسیدفولیک + اسید نیکوتینیک بیشترین تأثیر را در حفظ کیفیت کروماتین در مقایسه با گروه‌های اسید نیکوتینیک و کنترل به ترتیب داشت. گروه اسید فولیک بیشترین تأثیر را در حفظ حیات اسپرم داشت. گروه اسید نیکوتینیک و اسید نیکوتینیک + اسید فولیک تأثیر بیشتری در حفظ حیات اسپرم به نسبت گروه کنترل داشت. گروه

منابع

1. Amidi F, Pazhoham A, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M, S. N. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and Tissue Banking* 2016;17(4):745-56.
2. Castro L, Hamilton T, Mendes C, Nichi M, Barnabe V, J. V. Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: flow cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation. *Journal of animal science and biotechnology*. 2016;7(1):1.
3. Toghiani S, Dashti GR, Roudbari NH, Roozbehani S. Effect of ascorbic acid and menthone on the caspase 3 in the sperm cells of acyclovir treated rats. *Acta Medica*. 2016;32:1213.
4. Alahmar AT. Role of Oxidative Stress in Male Infertility: An Updated Review. *J Hum Reprod Sci*. 2019;12(1):4-18.
5. Baishya S, Biswas R, Kadirvel G, Deka B, Kumar S, Sinha S, et al. Effect of conventional and controlled freezing method on the post thaw characteristics of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 2014;149(3):231-7.

6. Toghiani S, Dashti GR, Roudbari NH, Rouzbehani S, Monajemi R. Lithium carbonate inducing disorders in three parameters of rat sperm. *Adv. Biomed Res* 2013;2 :55.
7. Golshan-Iranpour F, Zamani Rarani F, Dashti GR. Effect of chromatin condensation on frozen-thawed sperm DNA integrity in normozoospermic men. *SJKU* 2019;24(3):34-42.
8. P. W. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*. 2000;60(1):48-92.
9. Partyka A, Lukaszewicz E, W. N. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*. 2012;77:1497-504.
10. Hsieh Y, Tsai H, Chang C, Lo H. Cryopreservation of human spermatozoa within human or mouse empty zona pellucidae. *Fertility and sterility*. 2000;73(4):694-8.
11. Amini MR, Kohram H, Shahaneh AZ, Zhandi M, Sharideh H, MM. N. The effects of different levels of vitamin E and vitamin C in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. *Cell and tissue banking*. 2015;16(4):587-92.
12. Toghiani S, Hayati Roudbari N, Dashti GR, S. R. The effects of vitamin C and menthone on acyclovir induced DNA damage in rat spermatozoa: An experimental study. *Int J Reprod BioMed*. 2018;16(11):703-10.
13. Golshan Iranpour F, Fazelian K, GR. D. Thymoquinone as a natural spermostatic substance in reproductive medicine: An experimental study. *Int J Reprod BioMed*. 2017;15(10):641-8.
14. Sadeghnejad N, Dashti GR, Zolfaghari B, Baghazadeh S, F. GI. Effects of High Doses of Hydroalcoholic Extract of *Nigella Sativa* on Sperm Motility and Apoptosis in Normozoospermic Men. *J Isfahan Med Sch*. 2016;34(381):470-7.
15. Ghasemi N, Dashti GhR, Amoozgar F, SA. V. Effect of Cholesterol, Iron and Vitamin E on Protamine Deficiency and DNA Fragmentation of Male Rabbit Sperm. *J Isfahan Med Sch*. 2014;31(259):1769-78.
16. Murphy LE, Mills JL, Molloy AM, Qian C, Carter TC, Strevens H, et al. Folate and vitamin B12 in idiopathic male infertility. *Asian journal of andrology*. 2011;13(6):856.
17. Greenberg JA, Bell SJ, Guan Y, Y-h. Y. Folic acid supplementation and pregnancy: more than just neural tube defect prevention. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*. 2011;4(2):52.
18. Pietrzik K, Bailey L, B. S. Folic acid and L-5-methyltetrahydrofolate. *Clinical pharmacokinetics*. 2010;49(8):535-48.
19. Huang WJ, Lu XL, Li JT, Zhang JM. Effects of folic acid on oligozoospermia with MTHFR polymorphisms in term of seminal parameters, DNA fragmentation, and live birth rate: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Andrology*. 2020;8(1):110-6.
20. Dou X, Shen C, Wang Z, Li S, Zhang X, Z. S. Protection of nicotinic acid against oxidative stress-induced cell death in hepatocytes contributes to its beneficial effect on alcohol-induced liver injury in mice. *J Nutr Biochem*. 2013;24(8):1520-8.
21. Rahiminia T, Hosseini A, Anvari M, Ghasemi-Esmailabad S, Talebi AR. Modern human sperm freezing: effect on DNA, chromatin and acrosome integrity Taiwanese. *J Obstet Gynecol*. 2017;56: 472–476.
22. Cooper TG, Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, Baker HG, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human reproduction update*. 2009;48.
23. Aghaz F, Khazaei M, Vaisi-Raygani A, Bakhtiyari M. Cryoprotective effect of sericin supplementation in freezing and thawing media on the outcome of cryopreservation in human sperm. *Aging Male*. 2018;19:1-8.

24. Pouretezari M, Talebi A, Abbasi A, Khalili MA, E. M. Effects of acrylamide on sperm parameters, chromatin quality, and the level of blood testosterone in mice. *International Journal of Reproductive BioMedicine*. 2014;12(5):335-42.
25. Sadeghi Z, Ishaqi S, Dashti GR. The effect of folic acid and nicotinic acid on malondialdehyde levels of semen in oligospermia men after cryopreservation. *J Isfahan Med Sch*. 2021; 38(603): 921-928. (In persian)
26. Bahrami A, Divar MR, Azari M, Kafi M. Nicotinic Acid (Niacin) Supplementation in Cooling and Freezing Extenders Enhances Stallion Semen Characteristics. *J Equine Vet Sci*. 2020;94:103236.
27. Lee Y-J, Lee S-H, Lee E, Lee S, Cheong H-T, Yang B, et al. Effect of Nicotinic Acid on Fresh Semen Characteristics in Miniature Pigs. *Journal of Embryo Transfer*. 2014;29:385-91.
28. Fakouri A, Asghari A, Akbari G, Mortazavi P. Effects of folic acid administration on testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta chirurgica brasileira*. 2017;32(9):755-66.
29. Khamsuk K, Seejorn K, Sinawat S, Pongsritasana T, S. S. The Effect of Folic Acid on Post-thaw Quality of Human Spermatozoa. *Srinagarind Medical Journal* 2014;29:4.
30. Kim Y-J, Lee S-H, Lee Y-J, Oh H-I, Cheong H-T, Yang B-K, et al. Effect of Nicotinic Acid on Sperm Characteristic and Oocyte Development after In Vitro Fertilization using Cryopreserved Boar Semen. *J Emb Trans*. 2015;30:7-15.
31. Kim YJ, Lee SH, Yang JW, Lee YJ, Choi SB, Lee KJ, et al. Effect of Nicotinic Acid on Frozen-Thawed Sperm Characteristics in Bulls. *Ann Anim Resour Sci* 2015;26(2):75-84.
32. Silva TM, Silva Maia MC, Arruda JT, Carmo Approbato F, Rodrigues Mendonca C, M. SA. Folic acid does not improve semen parameters in subfertile men: A double-blind, randomized, placebo-controlled study. *JBRA Assisted Reproduction* 2013;17(3):152-7.