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 Hashemi[1], Farhad Golshan-Iranpour[2,7], Gholam Reza Dashti[3,7*],Shahla Ishaqi[4,7],Afsaneh Jaberi Asl[5],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</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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-22]

[DOI: 10.52547/sjku.27.2.15]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و هفت / خرداد و تیر ۱۴۰۱/۲۷-۱۵

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،۷]، غلامرضا دشتی[۳،۷]، شیلا اسحاقی[۴،۷]، افسانه جابری اصل [۵]، ابوالفضل دشتی.[۶]

۱. دکترای پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی اصفهان، گروه علوم تشریحی، اصفهان ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۱۹۸۶-۳۶۲۹.

۲. دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده علوم پزشکی اصفهان، گروه علوم تشریحی، اصفهان، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۲۷۲۵-۶۴۲۳.

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: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۳۳۹۰-۳۲۳۳.

۴. کارشناس آزمایشگاه، بیمارستان شهید بهشتی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۹۱۸۱-۸۷۶۱

۵. دانشجوی دکتری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده علوم پزشکی اصفهان، گروه علوم تشریحی، اصفهان، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۷۳۶۲-۹۷۱۳.

۶. دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشگاه آزاد شهرکرد، دانشکده دامپزشکی، شهرکرد، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۸۰۸۸-۲۰۲۰.

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 اسیدفولیک در طی فرایند 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، اسیدفولیک(۵۰nM)، اسید نیکوتینیک(۱۰mM) و ترکیبی از هر دو منجمد شدند. بعد از انجماد، پارامترها اسپرم مجدد 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 نرم‌افزارCASA 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 ($p < ۰/۰۰۱$). کیفیت کروماتین، در دو گروه اسید فولیک و اسید نیکوتینیک+ اسید فولیک بیشترین و گروه کنترل کمترین بود ($p < ۰/۰۵$). درصد حیات اسپرم و موفولوژی نرمال، در گروه اسید فولیک و سایر گروه‌ها بیشترین و در گروه کنترل کمترین بود ($p < ۰/۰۵$). بیشترین درصد تمامیت غشاء در گروه اسیدفولیک و به ترتیب اسید نیکوتینیک+ اسید فولیک، اسید نیکوتینیک وکنترل بودند ($p < ۰/۰۵$). اسید فولیک نقش مهمی در حفظ پارامترهای اسپرم داشت.

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

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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-22]

[DOI: 10.52547/sjku.27.2.15]

مقدمه:

در شـــرایط فیزیولوژیـک، تولیـد گونـه‌هـای فعـال اکسیژن(reactive oxygen species-ROS) کم و در سـطوح پایه‌ای کنترل شـده، نقش مهم در عملکرد طبیعی اســپرم مـانـنـد بلوغ، ظرفیـت‌یـابی، واکنش آکروزومی، آمیختگی با ســلول تخمک و لقاح، ایفا می‌کند. گونه‌های فعال اکســیژن شــاملِ گونه فعال آنیونی ســوپراکســید، هیـدروکســیـل، هیـدوژن پراکســیـد و نیتریـک اکســـید متابولیت‌های نرمال در دسـتگاه تولید مثلی مردان هسـتند(۱-۳). اگر به هر علتی تعادل بین سطح گونه‌های فعال اکسیژن و آنتی‌اکسـیدان‌ها در بدن بر هم بخورد، اسـترس اکسـیداتیو (OS) **ایجاد می‌شود** ، که باعث آسیب به اسپرم و قدرت باروری در مردان را کاهش می‌دهد(۴). انجماد اســپرم، تکنیک مهمی در آزمایشـگاه‌ها، مراکز باروری- ناباروری و بانک اسپرم، جهت مدیریت و حفظ باروری مردان اسـتفاده می‌شـود. فرآیند انجماد اسپرم، شـامل ذخیره طولانی‌مدت آن در زمینه سرطان قبل از شیمی‌درمانی ،باروری و ناباروری و بانک اسـپرم هسـت. محققان نشـان داده‌اند که این اثرات نـامطلوب ،در تولیـد بیش از انـدازه‌ی رادیکـال‌هـای فعـال اکسیژن به دلیل شوکِ سرما، در طی فرآیند انجماد و ذوب کردن، حرکت و قابلیت حیات اســپرم را کاهش می‌دهد. تمامیت میتوکندری و غشـای آکروزوم تغییر و اشـکال غیر طبیعی اســپرم افزایش می‌یـابـد(۵-۸). انجمـاد بر فعـالیـت آنزیم‌های آنتی‌اکســیدان موجود در اســپرم نیز تأثیر دارد. کاتالاز، یک آنتی‌اکسـیدان اسـت که نقش مهمی در حفظ ســلامت اســپرم را دارد؛ولی در طی انجماد اســپرم کاهش می‌یابد. همچنین این کاهش به‌طور واضـح در سـوپر اکسـید دســموتاز مشــاهده شــده اســت. در نتیجه این تغییر تعادل آنتی‌اکســیدان‌ها و افزایش پراکســیداســیون لیپیدی روی باروری و کیفیت اسپرم تأثیر دارد(۹).

با وجود پیشرفت‌های چشمگیر در زمینه انجماد اسپرم، ما با کاهش حیات و حرکت در اســپرم پس از انجماد مواجه هستیم. محققین، یکی از راهکــارهای مفید و مناسب بــرای بهبـــود کیفیت اسپرم منجمد شده، افزودن مواد مختلف از جمله آنتی‌اکسـیدان‌ها به محیط انجماد اسـپرم اسـت(۱۰). مطالعات نشان داده‌اند، اضافه کردن ویتامین C وE به محیط انجماد، به صــورت جداگانه باعث بهبود حرکت، بقا و تمامیت غشـای اسـپرم خروس می‌شـوند.(۱۱). ویتامین C و منتون در دوزهای بالا، اثر مثبتی بر کاهش آســیبDNA اسپرم موش صحرایی دارند

(۱۲). تیموکینون، بدون کاهش تعداد اســپرم های زنده، حرکت اســپرم را کاهش می‌دهد (۱۳). دوز های ۵ و۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصـاره سـیاه دانه، درصـد اسـپرم‌های متحرک را در محیط کشـت کاهش می‌دهد؛ ولی با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، تغییری در درصـــد اســپرم‌های زنده صورت نمی‌گیرد(۱۴). ویتامین E ، آسیب DNA اسپرم را در خرگوش ناشـی از مصـرف کلسـترول و آهن را کاهش می‌دهد(۱۵). اســید فولیک یا ویتامین ب ۹ از ویتامین‌های محلول در آب و دارای خاصـیت آنتی‌اکسـیدانی اسـت (۱, ۱۶). یکی از ویتامین‌های اساسی بدن است و قادر به تولید آن نیســت . این ویتامین در مواد غذایی مانند ســبزی‌ها با برگ های ســبز، مرکبات، زرده‌ی تخم‌مرغ و جگر وجود دارد. اسـیدفولیک، از نظر متابولیکی فعال نیسـت و باید طی فرآیندهای آنزیمی به فرم فعال خود تبدیل شــود(۱۷, ۱۸). مکمل های فولیک اســید اثرات ســودمندی بر پارامترهای اسپرم از جمله کاهش آسیب هایDNA دارد(۱۹). اسید نیکوتینیک، از ویتامین های محلول در آب و دارای خاصیت آنتی‌اکســیدانی اســت . در فرآیندهای مختلف بیولوژیکی شــرکت می‌کند و به تولید انرژی میتوکندریایی کمک می‌کند. .مصرف مکمل اسید نیکوتینیک، نیاسین یا ویتامین B به عنوان یک انتخاب مناسب در درمان بیماری‌های کبد با منشأ استرس اکسیداتیو است(۲۰). مصرف نیکوتینیک اسید به مدت ســه ماه در مردان نابارور منجر به افزایش تولید و تحرک اسپرم می‌شود(۲۱).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-22]

[DOI: 10.52547/sjku.27.2.15]

مطالعات زیادی، درباره تأثیر آنتی‌اکسیدان به محیط انجماد اسپرم را صورت گرفته است. در مطالعات قبلی، اسیدفولیک و اسید نیکوتینیک هر کدام به طور جدا گانه به عنوان آنتی‌اکسیدان در محیط انجماد اسپرم استفاده شده و اثر مثبت، بر پارامترهای اسپرم و بهبود عملکرد آن مشاهده گردیده است. در این مطالعه، تأثیر اسیدفولیک و اسید نیکوتینیک را بر اسپرم مردان نورموزواسپرمی، به طور همزمان و در مقایسه با هم در انجماد اسپرم بررسی شد. هدف این مطالعه کمک به بهبود عملکرد اسپرم و قابلیت باروری آن در طی فرآیند انجماد بود تا گامی در جهت بهبود روش‌های کمک باروری و درمان ناباروری و کاهش آثار مخرب آن‌ها بردارد.

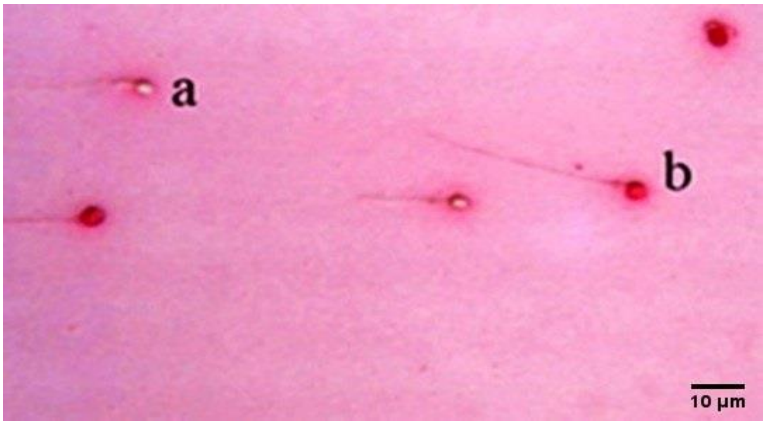
مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت کار آزمایی بر روی ۳۰ نمونه، مایع منی مردان نورموزواسپرمی مراجعه کننده به مرکز فوق تخصصی باروری ناباروری حضرت مریم (س) بیمارستان شهید بهشتی و آزمایشگاه بافت شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، بعد از اخذ مجوز از کمیته‌ی اخلاق انجام گرفت. افراد که دارای معیار های مورد نظر بودند به صورت نمونه‌گیری تصادفی و با گرفتن رضایت 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 میلی‌لیتر F10 Ham's نگهداری شدند(۲۲). قبل از فرآیند انجماد اسپرم ها از نظر حیات، تراکم کروماتین، تمامیت غشاء، حرکت و مورفورولوژی مورد بررسی قرار گرفتند و در ۴ گروه کنترل، محیط‌های غنی شده با ۵۰nM اسیدفولیک، ۱۰mM اسید نیکوتینیک و ترکیب هر دو منجمد شدند.

رنگ‌آمیزی 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.

لام های اسمیر 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).



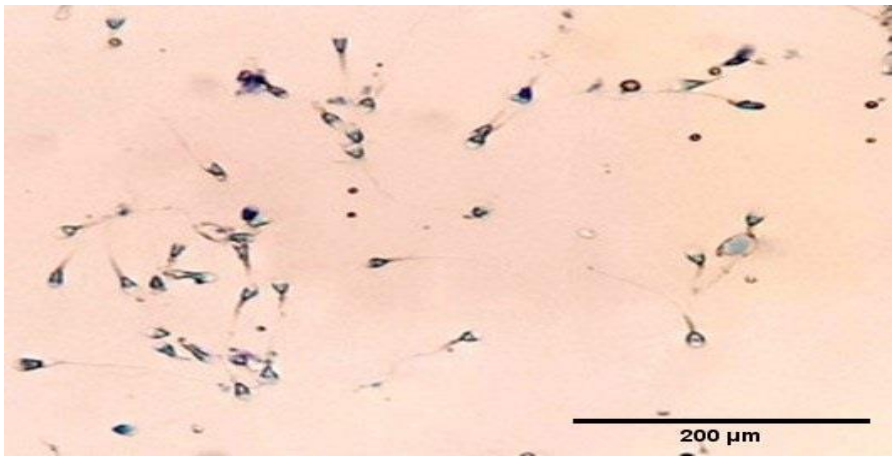
تصویر ۱: رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین. اسپرم‌های بدون رنگ (a)، به عنوان سلول زنده و اسپرم‌های قرمز رنگ(b) به عنوان سلول مرده در نظر گرفته شدند (میکروسکوپ نوری بزرگ نمایی ×۱۰۰۰)

رنگ‌آمیزی Toluidine Blue(TB):

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-22]

[DOI: 10.52547/sjku.27.2.15]

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 سیترات فسفات ۵۰٪، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رنگ شدند. ازهر 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 ۱و۲ به عنوان سلول غیر طبیعی ارزیابی شدند(۲۴).



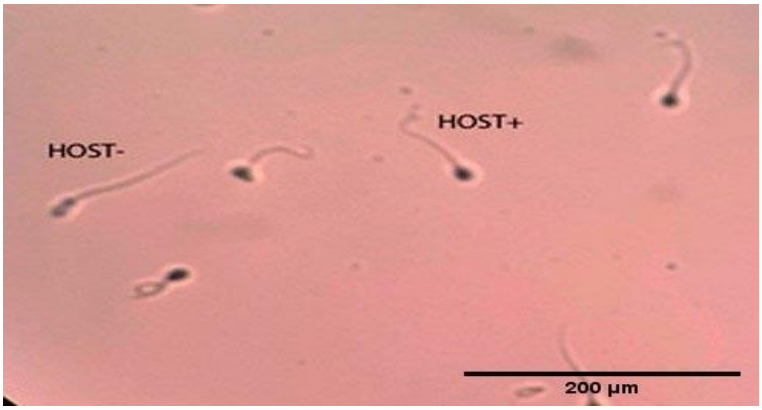
۰ تصویر ۲: رنگ‌آمیزی تولوییدین بلو: آبی روشن (کروماتین خوب) ۱: آبی تیره (کروماتین غیرطبیعی به صورت خفیف) ۲: بنفش و ارغوانی(کروماتین شدیداً غیرطبیعی). (میکروسکوپ نوری بزرگ نمایی ×۱۰۰۰)

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

برای تهیه محلول ایجاد کننده تورم در اسپرم، ۷۳۵/. گرم سدیم سیترات دی هیدرید و ۱/۳۵۱ گرم فروکتوز-دی در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب خالص حل شد. سپس کسرهای ۱ میلی‌لیتری 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 ° ۳۷ قرار دادیم تا گرم شود. ۱۰۰ میکرو لیتر از نمونه مایع منی به ویال اضافه و مخلوط شدند. مخلوط را در دمای ° 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).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-22]

[DOI: 10.52547/sjku.27.2.15]



تصویر ۳: رنگ‌آمیزی HOST. اسپرم‌های با دم پیچ خورده، دارای غشا سالم(+HOST) و اسپرم‌های با دم صاف دارای غشا ناسالم(-HOST)(میکروسکوپ نوری بزرگ‌نمایی ×۱۰۰۰)

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 ویال های انجماد(cryovial) و مراحل انجماد و ذوب بر اساس روش vitrolife انجام گرفت. نمونه‌ها در۴ گروه کنترل، محیط انجماد غنی شده با اسیدفولیک، 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. کرایوویال ها ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در معرض بخار نیتروژن مایع و سپس بلافاصله در داخل تانک حاوی نیتروژن مایع در دمای ۱۹۶ - درجه سانتی گراد ذخیره شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، ویال ها از تانک خارج و بلافاصله داخل ظرف حاوی نیتروژن مایع و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب ۲ ± ۳۵ درجه سانتی گراد 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 وآنالیز آماری:

داده‌ها پس از جمع‌آوری وارد نرم افزار 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 تجزیه‌وتحلیل آزمون T وابسته و آنالیز واریانس و متغیرهای کیفی، آزمون کای دو (X^2) و Mc Nemar به کارگرفته شد.

یافته ها

افزودن اسید فولیک و اسید نیکوتینیک به محیط انجماد اسپرم، تأثیر مثبت در حفظ کیفیت تراکم کروماتین، حیات، تمامیت غشاءومورفولوژی 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 شماره۱). افزودن اسیدفولیک و اسید نیکوتینیک به محیط انجماد اسپرم، تأثیری بر حرکت آن در مقایسه با گروه کنترل

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-22]

[DOI: 10.52547/sjku.27.2.15]

نداشت(جدول شماره ۳). حرکت اسپرم در همه گروه‌ها بعد از انجماد، کاهش یافته بود (جدول شماره۲).

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.

متغیر	گروه	قبل از انجماد		بعد از انجماد		P-value
		میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	
تراکم کروماتین	اسید نیکوتینیک	۹۴/۷	۶/۳	۸۶/۱	۸/۴	<۰/۰۰۱
	اسید نیکوتینیک+ اسید فولیک	۹۴/۷	۶/۳	۸۷/۸	۹/۲	<۰/۰۰۱
	اسید فولیک	۹۴/۷	۶/۳	۸۹/۳	۹/۴	<۰/۰۰۱
	کنترل	۹۴/۷	۶/۳	۷۷/۴	۹/۶	<۰/۰۰۱
حیات اسپرم	اسید نیکوتینیک	۶۵/۱	۸/۹	۳۱/۹	۱۰/۶	<۰/۰۰۱
	اسید نیکوتینیک+ اسید فولیک	۶۵/۱	۸/۹	۳۱/۱	۱۰/۱	<۰/۰۰۱
	اسید فولیک	۶۵/۱	۸/۹	۳۷/۵	۹/۵	<۰/۰۰۱
	کنترل	۶۵/۱	۸/۹	۲۲/۶	۹/۱	<۰/۰۰۱
درصد اسپرم با غشاء سالم	اسید نیکوتینیک	۷۹/۱	۸/۱	۶۲/۸	۸/۵	<۰/۰۰۱
	اسید نیکوتینیک+ اسید فولیک	۷۹/۱	۸/۱	۳۱/۱	۱۰/۱	<۰/۰۰۱
	اسید فولیک	۷۹/۱	۸/۱	۷۲/۰۱	۷/۹	<۰/۰۰۱
	کنترل	۷۹/۱	۸/۱	۵۴/۵	۱۰/۴	<۰/۰۰۱
درصد اسپرم با شکل نرمال	اسید نیکوتینیک	۵/۵	۰/۸	۱/۹	۱/۹	<۰/۰۰۱
	اسید نیکوتینیک+ اسید فولیک	۵/۵	۰/۸	۱/۹	۱/۹	<۰/۰۰۱
	اسید فولیک	۵/۵	۰/۸	۱/۷	۱/۸	<۰/۰۰۱
	کنترل	۵/۵	۰/۸	۰/۱	۰/۳	<۰/۰۰۱

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).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-22]

[DOI: 10.52547/sjku.27.2.15]

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

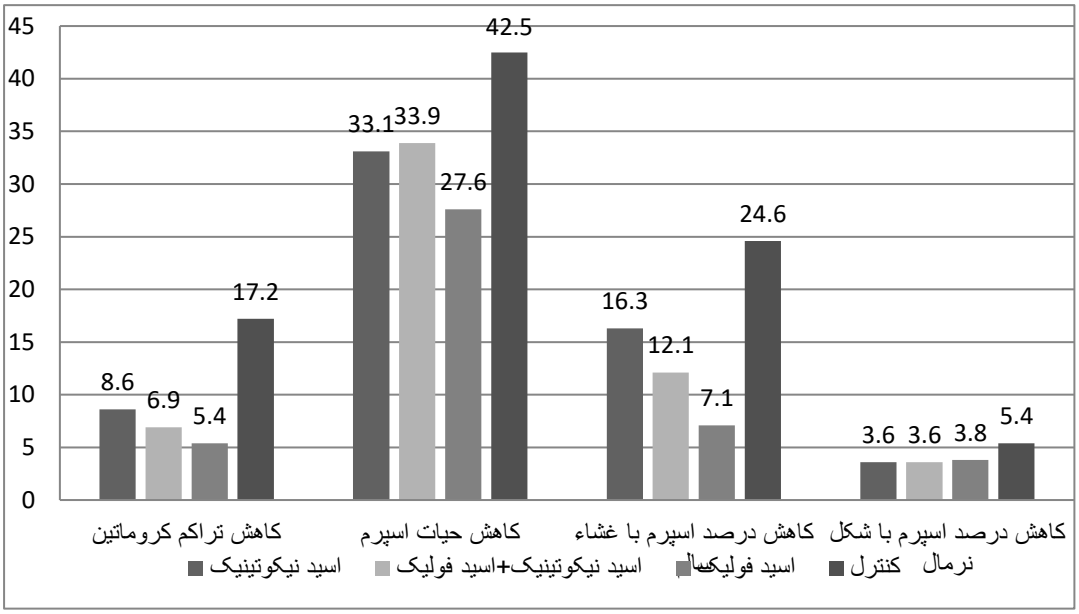
متغیر	گروه	قبل از انجماد		بعد از انجماد		P-value
		میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	
درصد اسپرم با حرکت پیشرونده سریع	اسید نیکوتینیک	۲۲/۳	۸/۰۳	۳/۳	۳/۴	<۰/۰۰۱
	اسید نیکوتینیک+ اسید فولیک	۲۲/۳	۸/۰۳	۲/۳	۲/۶	<۰/۰۰۱
	اسید فولیک	۲۲/۳	۸/۰۳	۱/۷	۱/۹	<۰/۰۰۱
	کنترل	۲۲/۳	۸/۰۳	۰/۴	۰/۸	<۰/۰۰۱
درصد اسپرم با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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-22]

[DOI: 10.52547/sjku.27.2.15]

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 ($p<۰/۰۰۱$). میانگین کاهش تراکم کروماتین بعد از انجماد در دو گروه اسید فولیک و اسیدنیکوتینیک+اسید فولیک کمتر از گروه اسید نیکوتینیک و در گروه اسید نیکوتینیک کمتر از گروه کنترل بود ($p<۰/۰۵$). حیات اسپرم در گروه اسید فولیک کمتر از دو گروه اسید نیکوتینیک +اسیدفولیک و اسید نیکوتینیک بود، و در این دو گروه کمتر از گروه کنترل بود ($p<۰/۰۵$) .درصد اسپرم با غشاء سالم در گروه کنترل بیشتر از گروه اسید نیکوتینیک، در گروه اسید نیکوتینیک بیشتر از گروه اسیدنیکوتینیک +اسید فولیک و در گروه اسید نیکوتینیک +اسید فولیک بیشتر از گروه اسید فولیک بود ($p<۰/۰۵$). درصد اسپرم با شکل نرمال در گروه کنترل بیشتر از سه گروه دیگر بود ($p<۰/۰۵$)؛ اما بین سه گروه دیگر اختلاف معنادار مشاهده نشد ($p<۰/۰۵$).



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
کاهش درصد اسپرم با حرکت پیشرونده سریع	اسید نیکوتینیک	۱۹/۱	۸/۲	۰/۵۸
	اسید نیکوتینیک+ اسید فولیک	۲۰/۰۱	۸/۱	
	اسید فولیک	۲۰/۷	۷/۷	
	کنترل	۲۱/۹	۸/۱	

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-22]

[DOI: 10.52547/sjku.27.2.15]

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

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 اسیدفولیک 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 کردن۳۰mM 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-22]

[DOI: 10.52547/sjku.27.2.15]

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 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 منافعی ندارند.

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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-22]

[DOI: 10.52547/sjku.27.2.15]

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 peroxidationand 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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-22]

[DOI: 10.52547/sjku.27.2.15]

24.Pourentezari 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 cirurgica 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 parametrs in subfertile men: A double-blin, randomized, placebo-controlled study. JBRA Assisted Reproduction 2013;17(3):152-7.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-12-22]

[DOI: 10.52547/sjku.27.2.15]