Effects of Biotin and Folic Acid on Motility, Viability, Morphology, Chromatin Density and Integrity of Cryopreserved and Thawed Sperm in Normozoospermic Men

Reyhaneh Montazari[1], Farhad Golshan-Iranpour.[2,6], Gholam Reza Dashti:[3,6], Shahla Ishaqi[4,6], Abol fazl dashti.[5]

1. Medical doctor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. ORCID ID: 0000-0001-5414-6118.
2. Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. ORCID ID: 0000-0002-2725-6423.
3.Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. (Corresponding Author) Email: dashti@mui.ac.ir, Tel: 03137929040, ORCID ID: 0000-0003-3390-3233.
4. Laboratory Technician, Shahid behesti hospital, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. ORCID ID: 0000-0001-9181--8761.
5. Doctor of Veterinary Medicine,School of Veterinary Medicine, Azad University of Shahrekord, Shahrekord, Iran. ORCID ID: 0000-0001-8088-2020.
6. Saint Maryam Fertility and Infertility center, Shahid beheshti hospital, Isfahan, Iran.

ABSTRACT

Background and aim: Cryopreservation is one of the common techniques in the management of infertility, which can damage the sperm cell and its function by producing reactive oxygen species. To determine health and fertility of cryopreserved sperm, we evaluated different markers in infertile men. The aim of this study was to investigate the effect of biotin and folic acid on motility, viablity, shape, chromatin density and membrane integrity of cryopreserved and thawed sperm in normozoospermic men.

Materials and Method: In this experimental study, 30 samples were collected from normozoospermic men. Every sample included fresh pre-cryopreservation group, cryopreserved control groups, biotin (10 mM), folic acid (50 nM), and combination of biotin (10 mM) and folic acid (50 nM) groups. Sperms were frozen for two weeks using the usual freezing technique at -196 ° C and then thawed. Samples were evaluated for motility before and after freezing using computer-aided sperm analysis software. We assessed sperm viability by eosin-negrosin staining, chromatin density by toluidine blue staining and membrane integrity by hypo osmotic swelling test.

Results: Before cryopreservation, motility, viability, chromatin density, sperm membrane integrity were higher and the number of immotile sperms were lower in all groups ($p < 0.001$). Quality of chromatin was higher in the groups of folic acid, biotin + folic acid and biotin than in the control group. Mean sperm viability was higher in the three above mentioned groups than in the control group. We found higher sperm membrane integrity in the folic acid, biotin and combination groups than in control group ($p < 0.001$). After cryopreservation, a positive correlation was found between sperm chromatin quality and membrane integrity.

Conclusion: Biotin and folic acid showed a protective effects on chromatin quality, membrane integrity, viability of the sperms and played an important role in maintaining sperm parameters after cryopreservation.

Keywords: Biotin, Folic acid, Chromatin, Viability, Sperm, Cryopreservation.
Received: May 22, 2019 **Accepted:** April 27, 2021

How to cite the article: Reyhaneh Montazari, Farhad Golshan-Iranpour, Gholam Reza Dashti, Shahla Ishaqi, Abol fazl dashti. Effects of biotin and folic acid on motility, viability, morphology, chromatin density and integrity of cryopreserved and thawed sperm in normozoospermic men. SJKU 2021;26(4):38-49.

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 بیوتین و اسیدفولیک بر حرکت، حیات، شکل، تراکم کروماتین و تمامیت غشا اسپرم انجماد و ذوب شده در مردان نورموزواسپرمی.

ریحانه منتظری[۱]،فرهادگلشن ایرانپور[۲،۶]، غلام رضا دشتی[۳،۶]، شیلا اسحاقی[۴،۶]، ابوالفضل دشتی[۵].

۱. دکترای پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی ، گروه علوم تشریح، اصفهان، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۵۴۱۴-۶۱۱۸

۲. دانشیار ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، 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 الکترونیک: 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. دکترای حرفه ای دامپزشکی، دانشگاه آزاد شهرکرد، دانشکده دامپزشکی، شهرکرد، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۸۰۸۸-۲۰۲۰

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

چکیده

زمینه و هدف: انجماد یکی از تکنیکی رایج در باروری-ناباروری است، با تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن موجب آسیب سلول اسپرم و عملکرد آن می‌شود. تشخیص سلامت و قدرت باروری اسپرم انجماد، ارزیابی مارکرهای مختلف در مردان ناباروری است. در این مطالعه، هدف ما بررسی تأثیر بیوتین و اسید فولیک بر حرکت، حیات، شکل، تراکم کروماتین و تمامیت غشا اسپرم انجماد و ذوب شده در مردان نورموزواسپرمی است.

مواد و روش ها: در این مطالعه‌ی تجربی، ۳۰ نمونه نورموزواسپرمی جمع‌آوری شد. هر نمونه، شامل گروه تازه قبل از انجماد، گروه‌های انجماد شده ی کنترل، بیوتین (۱۰mM) ، اسیدفولیک (۵۰nM) و ترکیب بیوتین (۱۰mM) و اسید فولیک (۵۰nM). اسپرم‌ها به مدت دو هفته با تکنیک رایج انجماد در دمای ۱۹۶- درجه‌ی سانتی‌گراد انجام و سپس ذوب شدند. نمونه ها قبل و بعد از انجماد از لحاظ حرکت با نرم افزار آنالیز اسپرم computer-aided sperm analysis ارزیابی شد. حیات اسپرم با رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین، تراکم کروماتین با رنگ آمیزی تولوییدین بلو (Toluidine blue) و تمامیت غشا با hypo Osmotic swelling Test بررسی شدند.

یافته ها: قبل از انجماد حرکت، حیات، شکل ، تراکم کروماتین، تمامیت غشا اسپرم در همه گروه‌ها بیشتر و اسپرم‌های بی‌حرکت کمتر دیده شد ($p< ۰/۰۰۱$). کیفیت کروماتین، در گروه‌های اسید فولیک، بیوتین+اسیدفولیک وبیوتین نسبت به کنترل بیشتر بود. میانگین حیات اسپرم در سه گروه بیشتر از کنترل بود. اسپرم با غشا سالم در گروه‌های اسیدفولیک، بیوتین و ترکیب هر دو بیشترازکنترل بود ($p< ۰/۰۰۱$). پس از انجماد ارتباط مثبت بین کیفیت طبیعی کروماتین اسپرم و یکپارچگی غشا اسپرم دیده شد.

نتیجه‌گیری: بیوتین و اسید فولیک اثر محافظتی روی کیفیت کروماتین، غشای سالم، حیات اسپرم و نقش مهمی در حفظ پارامترهای اسپرم بعد از انجماد داشت.

واژه‌های کلیدی: بیوتین، اسید فولیک، کروماتین، حیات، اسپرم، انجماد.

وصول مقاله:۹۸/۳/۱ اصلاحیه نهایی:۱۴۰۰/۲/۶ پذیرش:۱۴۰۰/۲/۷

مقدمه

فرایند انجماد اسپرم از جمله تکنیک‌های پرکاربرد در زمینه باروری و ناباروری و بانک اسپرم است. در این تکنیک سلول‌های اسپرم از آسیب ناشی از واکنش‌های شیمیایی سلولی محافظت می‌شوند و امکان ذخیره اسپرم به مدت طولانی فراهم می‌کند(۴-۱). این روش به منظور حفظ باروری بیماران مردان مبتلا به سرطان قبل از شروع شیمی درمانی، رادیوتراپی یا اعمال جراحی با احتمال آسیب به بیضه ها با احتمال نارسایی بیضه‌ای با مشکلات انزالی و نیز در مردان تحت عمل جراحی وازکتومی جهت ذخیره اسپرم از فرآیند انجماد استفاده می‌شود(۵ -۴). امروزه این تکنیک نه تنها در اسپرم‌های انزالی بلکه در نگهداری اسپرم به دست آمده از بافت بیضه جهت انجام intracytoplasmic sperm injection (ICSI) مورد استفاده قرار می‌گیرد(۵). غشا پلاسما سلول های پستانداران دارای اسید چرب غیر اشباع (PUFA) است که حساس به آنزیم لیپیدپراکسیداز می باشد و این آنزیم در اثر رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS) باعث تخریب ماتریکس و اختلال عملکرد اسپرم می شود(۶).گامت ها، تولید داخلی رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارند و همچنین محیط آزمایشگاه و تکنیک‌های کمک باروری ازجمله نور مرئی،ترکیب محیط کشت، دارو، PH، دما، غلظت اکسیژن، سانترفیوژ کردند و طی آماده سازی اسپرماتوزوآ، نیز در تولید رادیکال های فعال اکسیژن (ROS) مؤثر هستند(۸ - ۷). عملکرد ROS یا تغییر در پروتامین اسپرم باعث افزایش حساسیت DNA اسپرم به تکه تکه شدن آن می‌شود(۹). بازهای DNA اسپرم و پیوند فسفودی استراز به صدمات ROS حساس هستند و موجب تخریب بازها، پیوستگی عرضی پروتیین ها و تجزیه شدن DNA می شود(۱۱ -۱۰). آنتی‌اکسیدان ها موجب خنثی رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS) موجود در سمن می شود(۱۱,۱۲). به طور طبیعی بین تولید ROS و آنتی اکسیدان های سمن تعادل نسبی دیده می شود ولی در صورت به هم خوردن تعادل موجب تشدید اثرات مخرب می‌شود و با استفاده از آنتی‌اکسیدان می‌توان تا حدودی تعادل حفظ کرد(۱۳). مصرف ویتامین E به عنوان آنتی اکسیدان موجب کاهش آسیب DNA اسپرم خرگوش ناشی از مصرف غذاهای پرکلسترول و آهن می شود(۱۴). ویتامین C و منتون که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است موجب کاهش آسیب DNA اسپرم و حمایت از سلول های اسپرم در برابر آپوپتوز در مقابل اثر سیتوتوکسی آسیکلوویر می شوند(۱۵). اسید فولیک یا ویتامین ب ۹ ویتامین محلول درآب است که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است. اسید فولیک فرم سنتتیک وصناعی این ویتامین می باشد(۱۶). بیوتین (ویتامین ۷) یک ریز مغزی مهم برای رشد وتکامل است و به عنوان یک کوا آنزیم در همه واکنش های کربوکسیلاسیون درساخت اسیدهای چرب، گلوکونوژنز؛ متابولیسم آمینواسید وسنتز دوباره نوکلیوتید پورین نقش دارد. مطالعات ثابت کرده اند که کمبود بیوتین در دوران جنینی باعث تراتوژنسیتی درموش ها و همسترها میشود؛ اگرچه اثر بیوتین روی عملکرد اسپرم هنوز ناشناخته است(۱۷). در مطالعه ای نشان داده که بهترین غلظت بیوتین ۱۰ nMاست(۱۷). در مطالعه ی دیگری افزودن دوز ۵۰ nmol/L فولیک اسید به محیط قبل از انجماد اسپرم انسانی موجب بهبود پارامترهای اسپرم شامل حیات وحرکت می شود(۱۸). با توجه به استفاده از روش انجماد اسپرم برای حفظ باروری و نقش آنتی اکسیدان ها در کاهش اثرات رادیکال‌های آزاد اکسیژن، هدف ما در این مطالعه بررسی تأثیر افزودن دو ماده اسید فولیک و بیوتین را بر روی پارامترهای اسپرم شامل حرکت، حیات، شکل، تمامیت غشا و میزان آسیب کروماتین اسپرم انجماد و ذوب شده در مردان نورموزواسپرمی می‌باشد. تا بتوان به سمت کاهش هزینه های مصرفی وافزایش باروری و بقا اسپرم ها در فرایند انجماد داشته باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع کارآزمایی (experimental) آینده نگر بوده که پس از اخذ مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد. جمعیت مورد مطالعه ۳۰ نمونه مایع اسپرم مردان نورموزواسپرم مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری بیمارستان شهید بهشتی اصفهان در سال ۹۷ انجام گرفت. نمونه ها به روش نمونه گیری تصادفی از بین افراد سنین ۲۵ تا ۴۵ سال و دارای معیارهای نورموزواسپرمی طبق معیارهای سازمان جهانی بهداشت(WHO)در سال ۲۰۱۰(۱۹) شامل موارد زیر و با گرفتن رضایت آگاهانه انجام شد. نمونه های مایع اسپرم از مردانی که حداقل ۳ الی ۴ روز پیش مقاربت نداشتند و درظروف استریل گرفته شد.

سپس نمونه ها درآزمایشگاه شسته شده ودرمحیط کشت آلبومین (Ham'sF10) نگهداری گردید.آنالیزنمونه ها مطابق استانداردهای سازمان بهداشت جهانی صورت گرفت. نمونه ها را به ۵ قسمت تقسیم کردیم و یک قسمت آن قبل انجماد پارامترهای لازم شامل: غلظت، مورفولوژی، حیات وتحرک اسپرم، کیفیت کروماتین مورد بررسی قرار گرفت؛ و ۴ قسمت باقی مانده را هر کدام جداگانه در ویال های ۲ سی سی (cryovial) درچهارگروه؛ انجماد با محیط فریز اسپرم بدون آنتی اکسیدان (گروه کنترل)، انجماد با محیط فریزاسپرم حاوی غلظ۱۰mM بیوتین، انجماد بامحیط فریز اسپرم حاوی غلظت۵۰nM اسید فولیک انجماد با محیط فریز اسپرم حاوی غلظت ۵۰nM اسید فولیک و غلظت ۱۰mM بیوتین، نمونه ها بعد از دو هفته انجماد خارج و ذوب شدند ومجددا از لحاظ پارامترهای اسپرم بررسی شد.

روش انجماد وذوب اسپرم:

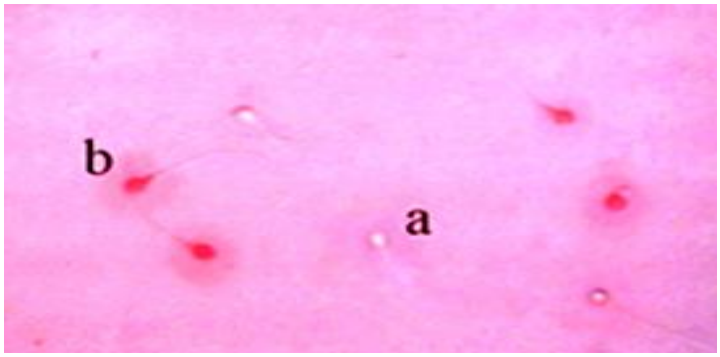
محیط فریز اسپرم انسانی، از شرکت (Sperm vitrolife Freeze Solution,Vitrolife, Goteborg, Sweden)خریداری شد. فریز اسپرم با استفاده از ویال‌های فریز ۲ سی سی که مراحل فریز وذوب بر اساس پروتکل vitrolife انجام گرفت. برطبق گروه‌هایی که توصیف شدند، این محیط با اسید فولیک یا بیوتین یا هردوغنی سازی شدند. مراحل انجماد به منظورحفظ حد اکثری قابلیت و عملکرد اسپرم درکوتاهترین زمان و دقت انجام شد. ابتدا همانطورکه بیان شد، بر طبق نیاز مطالعه تمامی پارامترها وآنالیزها به منظور داشتن داده‌های پایه بررسی شد. سپس اطمینان حاصل کردیم که درجه ی حرارت مایع سمن و محلول فریز اسپرم برابر با دمای اتاق باشد. حجم برابری از محلول فریزاسپرم ومایع سمن را با هم مخلوط کردیم. به اینصورت که به آرامی وقطره قطره محلول فریز اسپرم را به مایع سمن اضافه کرده و بعد از هر قطره با دقت لوله را تکان دادیم. سپس درب لوله را محکم بسته. سپس به مدت بیش از ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. ویال‌ها را بر حسب گروه نشانه گذاری کردیم وسپس مخلوط مایع اسپرم تهیه شده را به به ویال اضافه کردیم. ویال‌های انجماد را روی صفحه ای به ضخامت ۱-۳ سانتیمتری گذاشته وصفحه را روی حمام نیتروژن مایع (۱۹۶-) به مدت ۳۰ دقیقه قرار دادیم. (باانجام این مرحله و پرهیز از انجماد ناگهانی نمونه ها، آسیب ها به حد اقل رسید.) سپس ویال ها را داخل نیتروژن مایع فرو بردیم و دردمای ۱۹۶ – درجه ی سانتی‌گراد ذخیره کردیم. بعد از دو هفته ویال ها از تانک خارج و بالافاصله داخل ظرف حاوی نیتروژن مایع و نهایتا به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب ۲±۳۵ درجه سانتی گراد غوطه ور شده و سپس ارزیابی یارامترهای اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند.

روش تعیین میزان حرکت، غلظت و مورفولوژی اسپرم ها:

آنالیز اسپرم بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (WHO World Health Organization) انجام شد. تحرک ومورفولوژی اسپرم یکی ازمهمترین فاکتورها درتعیین پتانسیل باروری فرد می باشد که با استفاده از نرم افزارکامپیوتر(CASA) assisted sperm analysis computer اندازه گیری شد(۲۰).

ارزیابی حیات اسپرم ها بارنگ آمیزی ائوزین-نگروزین:

بررسی حیات اسپرم با رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین صورت گرفت(۲۱). یک قطره ازمحلول اسپرماتوزوآ ذوب شده با دوقطره ائوزین ۱٪ آماده شده را درآب مقطرمخلوط شد وپس ازگذشت زمان ۳۰ ثانیه ۳ قطره ازنگروزین ۱۰٪ به هرمحلول اضافه گردید. ازهرنمونه بر روی لامهای شیشهای اسمیر تهیه شد؛ پس ازخشک شدن در دمای آزمایشگاه توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی عدسی شیئی ۱۰۰ به تعداد حد اقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شده ودرصد اسپرمهای زنده محاسبه گردید. دراین رنگ آمیزی اسپرمهای زنده به رنگ سفید، درحالی که اسپرم های مرده باغشای پاره شده رنگ ائوزین راجذب کرده وبه رنگ قرمز ظاهرشدند(۲۲-۲۱) (شکل ۱)



.شکل ۱.رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین. اسپرم های بدون رنگ (a)، سلول زنده و اسپرم های قرم زرنگ (b) به عنوان سلول مرده در نظرگرفته شد (میکروسکوپ نوری، بزرگ نمایی ۱۰۰۰×).

بررسی آسیب کروماتین اسپرم با رنگ آمیزی تولوئیدین بلو (Toluidine Blue (TB :

در این روش رنگ آمیزی، کیفیت وکمیت تراکم کروماتین هسته ی اسپرم رامشخص می کند. اسمیرهای اسپرم تهیه شده را با محلول اتانول ۹۶٪ واستون تازه به نسبت ۱:۱ دردمای ۴ درجه ی سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه فیکسکرده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه ی سانتی گراد در محلول ۰/۱ نرمال هیدروکلریک اسید انکوبه کردیم. اسلاید ها به مدت ۲ دقیقه و ۳ مرتبه باآب مقطرشسته شد ونهایتا درمحلول تولوئیدین بلو۰/۰۵٪ درسیتراتفسفات ۵۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده ورنگ شد. درهرنمونه ۲۰۰ اسپرماتوزوآ در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی عدسی چشمی۱۰۰ برابر بررسی و شمارش شد. برطبق رنگ آمیزی سر اسپرماتوزوآ، نمره های۰ تا ۲ به هر اسپرم داده شد.اسپرم با نمره صفر به عنوان سلول دارای کروماتین نرمال یا طبیعی (TB) دارای سر آبی روشن و اسپرم با کروماتین غیر طبیعی دارای سر با رنگ آبی تیره با نمره های ۱و ۲ به عنوان سلول غیرطبیعی (TB+) درنظرگرفته شدند(۲۳, ۲۲) (شکل ۲).

شکل ۲. رنگ آمیزی تولوئیدین بلو.: آبی روشن (کروماتین طبیعی) ۱: آبی تیره (کروماتین غیرطبیعی به صورت خفیف) ۲:بنفش و ارغوانی(کروماتین شدیدا غیرطبیعی). (میکروسکوپ نوری، بزرگ نمایی ۱۰۰۰×).

بررسی تمامیت غشا به روش HOST(Hypo Osmotic swelling Test):

برای تهیه محلول ایجادکننده تورم در اسپرم ۰/۷۳۵گرم سدیم سیترات دی هیدرید و ۱/۳۵۱ گرم دی فروکتوز در ۱۰۰ میلی لیتر آب خالص حل شد. سپس قسمت های ۱ میلی لیتری از این محلول در انجماد با دمای منهای ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. موقع استفاده برای هر نمونه یکی از ویال های انجمادشده را در دمای ۳۷ درجه قرار نمودیم تا گرم شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه مایع اسپرم به ویال اضافه و خوب مخلوط کردیم. بعد در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار دادیم.سپس ۱۰ میکرولیتر از مخلوط تهیه شده روی یک لام قرارداده و سپس روی آن لامل گذاشتیم . با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی عدسی شیئی ۱۰۰ از هر نمونه حداقل ۲۰۰ اسپرماتوزوآ شمارش شدند و درصد اسپرم های متورم با دم پیچ خورده محاسبه شد.در این روش اسپرم های زنده با غشا سالم، دم پیچ خورده و متورم واسپرم ها با غشای سلولی تخریب شده، دم صاف و متورم نشده مشاهده شدند(۲۴)(شکل۳).

شکل ۳. رنگ آمیزی HOST. اسپرم های با دم پیچ خورده، دارای غشا سالم(+HOST) واسپرم های با دم صاف دارای غشا ناسالم(-HOST).(میکروسکوپ نوری، بزرگ نمایی ۱۰۰۰×).

آنالیز آماری:

آنالیز آماری از نرم افزار SPSSVersion 20 (Inc.,Chicago.IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در این مطالعه از آزمون آماری T وابسته و آنالیز واریانس یکطرفه مقایسه و بررسی شد. مقدار p <۰/۰۰۱ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

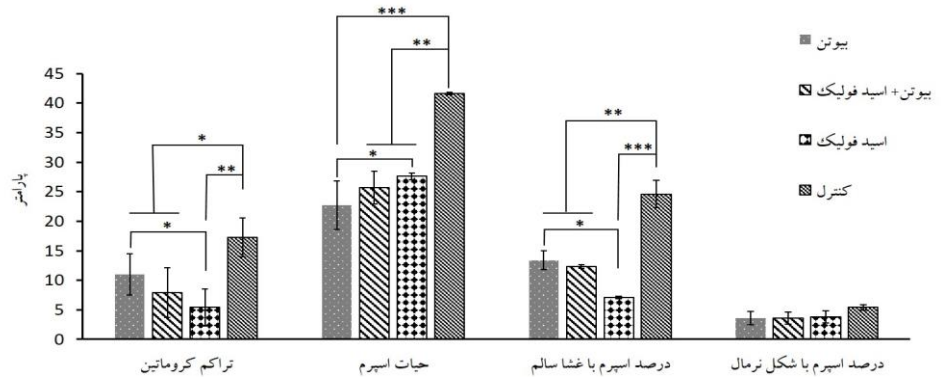
نتایج:

بر اساس جدول ۳-۱ونمودار ۱، در نمونه های تازه و قبل از فرآیند انجماد و ذوب، بین تراکم غیر طبیعی کروماتین و میزان کاهش اسپرم با غشاء سالم ارتباط مستقیم وجود داشت (p<۰/۰۰۱). همچنین پس از انجماد، باافزودن بیوتین و اسید فولیک به محیط کشت اسپرم موجب افزایش اسپرم ها با تراکم کرماتین سالم و اسپرم ها با غشاء سالم داشت که اسیدفولیک نسبت به بیوتین موثرتر بود و نسبت به قبل از انجماد این ارتباط معناداری بود.در حالی که بیوتین و اسیدفولیک باعث حفظ حیات و مورفولوژی اسپرم شد. میانگین اسپرم های زنده و با شکل طبیعی در گروه های دارای بیوتین و اسیدفولیک بیشتر از گروه کنترل بود (p <۰/۰۰۱). در حالی که میانگین تراکم کروماتین، حیات اسپرم، اسپرم با غشاء سالم و اسپرم با شکل نرمال در هر چهار گروه بعد از انجماد به طور معناداری کمتر از قبل از انجماد بود (p < ۰/۰۰۱). کاهش تراکم کروماتین، حیات اسپرم، اسپرم با غشاء سالم و اسپرم با شکل نرمال بعد از انجماد نسبت به قبل از انجماد بین چهار گروه اختلاف معناداری داشت (p< ۰/۰۰۱). همچنین کاهش تراکم کروماتین بعد از انجماد در گروه اسید فولیک کمتر از گروه بیوتین+ اسید فولیک بود، در گروه بیوتین+اسید فولیک کمتر از گروه بیوتین و در گروه بیوتین کمتر از گروه کنترل

بـود. پـس از انجمـاد، درصـد اسـپرم بـا حرکـت پیشـرونده سریع(A)، حرکت پیشرونده کنـد(B) و حرکـت درجـا(C) در هر چهار گروه به طور معناداری کمتـر از قبـل از انجمـاد بود (p< ۰/۰۰۱)؛ اما درصد اسپرمهای بی حرکت (D)در هر چهـار گـروه بـه طـور معنـاداری بیشـتر از قبـل از انجمـاد بود.کاهش حیات اسپرم در گروه کنتـرل بـه طـور معنـاداری بیشتر از سه گروه دیگر بـود (p< ۰/۰۰۱) امـا بـین سـه گـروه دیگر اختلاف معناداری وجود نداشت (p > ۰/۰۵).

جدول ۱. تراکم کروماتین، حیات اسپرم، اسپرم با غشاء سالم و 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	
تـــــراکم کروماتین	بیوتین	۹۴/۷	۶/۳	۸۳/۷	۹/۸	<۰/۰۰۱
	بیوتین+اسید فولیک	۹۴/۷	۶/۳	۸۶/۸	۱۰/۵	<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
حیـــــات اسپرم	بیوتین	۶۵/۱	۸/۹	۴۲/۴	۱۳/۰۱	<۰/۰۰۱
	بیوتین+اسید فولیک	۶۵/۱	۸/۹	۳۹/۴	۱۱/۷	<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
درصـــــد اسـپرم بـا غشاء سالم	بیوتین	۷۹/۱	۸/۱	۶۵/۷	۹/۷	<۰/۰۰۱
	بیوتین+اسید فولیک	۷۹/۱	۸/۱	۶۶/۸	۸/۴	<۰/۰۰۱
	اسید فولیک	۷۹/۱	۸/۱	۷۲/۰۲	۷/۹	<۰/۰۰۱
	کنترل	۷۹/۱	۸/۱	۵۴/۵	۱۰/۴	<۰/۰۰۱
درصـــــد اسـپرم بـا شکل نرمال	بیوتین	۵/۵	۰/۸	۱/۹	۱/۹	<۰/۰۰۱
	بیوتین+اسید فولیک	۵/۵	۰/۸	۱/۹	۱/۸	<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



نمودار۱: کاهش تراکم کروماتین، حیات اسپرم، اسپرم با غشاء سالم و اسپرم با شکل نرمال بعدازانجماد نسبت به قبل ازانجماد درچهارگروه.

جدول۲: اسپرم با حرکت پیشرونده سریع، حرکت پیشرونده کند، با 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	بیوتین	۲۲/۳	۸/۰۳	۱/۹	۱/۵	<۰/۰۰۱
	بیوتین+اسید فولیک	۲۲/۳	۸/۰۳	۴/۳	۶/۱	<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	بیوتین	۴۱/۳	۸/۳	۱۵/۶	۱۱/۷	<۰/۰۰۱
	بیوتین+اسید فولیک	۴۱/۳	۸/۳	۱۵/۵	۱۳/۵	<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	بیوتین	۲۳/۵	۴/۳	۹/۶	۵/۳	<۰/۰۰۱
	بیوتین+اسید فولیک	۲۳/۵	۴/۳	۷/۴	۴/۴	<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 بی حرکت	بیوتین	۱۲/۹	۸/۴	۷۲/۸	۱۶/۴	<۰/۰۰۱
	بیوتین+اسید فولیک	۱۲/۹	۸/۴	۷۲/۷	۲۰/۹	<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

جدول۳. کاهش ٪ اسپرم با حرکت A، حرکت B و حرکتC و افزایش ٪ اسپرم D 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	بیوتین	۲۰/۴	۸/۲	۰/۳۲
	بیوتین+اسید فولیک	۱۸/۰۳	۸/۴	
	اسید فولیک	۲۰/۷	۷/۷	
	کنترل	۲۱/۹	۸/۱	
کاهش درصد اسپرم با حرکت پیشرونده کند	بیوتین	۲۵/۷	۱۵/۶	۰/۶۴
	بیوتین+اسید فولیک	۲۵/۵	۱۷/۱	
	اسید فولیک	۲۸/۶	۱۳/۱	
	کنترل	۲۳/۵	۱۴/۳	
کاهش درصد اسپرم با حرکت درجا	بیوتین	۱۳/۹	۶/۹	۰/۲۱
	بیوتین+اسید فولیک	۱۶/۱	۷/۱	
	اسید فولیک	۱۳/۴	۶/۶	
	کنترل	۱۶/۴	۵/۶	
افزایش درصد اسپرم بی حرکت	بیوتین	۵۹/۹	۱۶/۹	۰/۸۹
	بیوتین+اسید فولیک	۵۹/۶	۲۱/۹	
	اسید فولیک	۶۲/۷	۱۷/۳	
	کنترل	۶۱/۸	۱۴/۸	

کاهش درصد اسپرم با حرکت A، حرکت B و حرکت C و افزایش اسپرم حرکتD بعد از انجماد نسبت به قبل از انجماد بین چهار گروه اختلاف معناداری نداشت (p> ۰/۰۵).

بحث

در مطالعه حاضر تاثیر بیوتین و اسید فولیکو ترکیب هر دو به عنوان آنتی اکسیدان در مقابل گروه کنترل در فرایند انجماد اسپرم بر روی حفظ پارامترهای اسپرم نقش مهمی داشته است. دراین مطالعه یتراکم کروماتین با رنگ آمیزی تولوئیدن بلو سنجیده و مشاهده شد،اسید فولیکو بیوتین و ترکیب هردو موجب حفظ بهتر کروماتین دارد. مطالعات گذشته نشان داده اند که فرآیند انجماد میتواند بر پارامتر های اسپرمی نظیر حرکت، بقا و نیز ماده ی ژنتیکی آن اثرات مخربی دارد(۲۲). در یک مطالعه نتیجه کرفتند که استرس اکسیداتیو نقش عمده ای در القای آسیب انجماد بر روی یکپارچگی DNA اسپرم انسان دارد (۲۴). فکوری و همکاران نشان دادند افزودن آنتی اکسیدان اسیدفولیک بهبود پارامترهای حرکتی در اسپرم رت را به همراه داشت (۲۵) همچنین در مطالعه دیگری گزارش شد سطح پایین فولات موجب افزایش آسیب DNA می شود (۲۶).

در مطالعات دیگر، اثر مثبت کاربرد آنتی اکسیدان در محیط انجماد اسپرم را ثابت کرده اند و توانایی به حداقل رساندند تاثیرکاهش قدرت باروری انجماد اسپرم دارند (۲۷,۲۸). Fortes و همکاران با مطالعه ۱۳۳ گاو نر و با اندازه گیری محتوای پروتامین اسپرم آن ها و مشاهده ی ارتباط آن با میزان تخریب DNA گزارش کردند که احتمالا کمبود پروتامین فاکتور تاثیر گذاری در تخریب و یا آسیب پذیری DNA این سلول ها می‌باشد(۲۹).

دراین مطالعه تاثیر اسید فولیک درجلوگیری از آسیبکروماتین اسپرم بیشتر از بیوتین داشته است. همچنین حیات اسپرم که با رنگ آمیزی ائوزین- نگروزین بررسی شد، بیوتین و اسیدفولیک هر دو موجب افزایش حیات

اسپرم شدند ولی تفاوتی بین سه گروه بیوتین،اسیدفولیک و ترکیب هر دو آنها مشاهده نشد.در مطالعه ی، گزارش شده که بیوتین موجب افزایش حیات وبهبودحرکت اسپرم نسبت به گروه کنترل درفرایند انجماد موثر بوده است (۱۷). مطالعات قبلی اثر مثبت کاربرد آنتی اکسیدان، اسیدفولیک به محیط انجماد قبل از فرآیند انجماد اسپرم، درصد حیات وحرکت اسپرم را بعد از انجماد در مقایسه با گروه کنترل موجب بهبود حیات اسپرم دا شته است(۱۱,۱۸,۲۲).نتایج پژوهش‌های انجام شده در شرایطی که بر میزان تراکم کروماتین تاثیر گذار است، هم‌راستا با نتایج مطالعه ی ما می‌باشد.

نتایج مطالعه ی دیگر، تاثیر پنتوکسی فیلین(ویتامین ب ۵) روی تمامیت غشا اسپرم با روش HOST در فرایند فریز اسپرم در حفظ غشا موثر نبوده است(۳۰). مطالعه گذشته نشان داد که تست تورم هیپو اسمزی ابزاری مهم برای ارزیابی میزان آسیب غشایی ناشی از سیگار کشیدن است در مردان ناباروری(۳۱).در مطالعه حاضر اثر مثبت کاربرد دو آنتی اکسیدان برروی حفظ تمامیت غشا اسپرم بررسی گردید،بیوتین و اسید فولیک هر دو در حفظ غشا موثر بودند و تاثیر اسید فولیک بیشتر از بیوتین در حرکت و کیفیت اسپرم بوده است.همراستا با این نتایج، در یک مطالعه ، درمان با اسید فولیک، موجب افزایش حرکت وتعداد سلول های اسپرم نرمال نسبت به گروه کنترل شد(۳۲).

با توجه به نتایج این بررسی از سلامت کروماتین وتمامیت غشا اسپرم،قبل و بعد از فرآیند انجماد پیشنهاد می‌شود که تراکم غیر طبیعی کروماتین اسپرم می‌تواند یکی از دلایل حساسیت بیشتر تمامیت غشا اسپرم آن نسبت به آسیب باشد. به نظر می‌رسد در مردان نورموزواسپرمی قبل از فریز، ارزیابی وضعیت تراکم کروماتین با TB و تمامیت غشا اسپرم با روش HOST نشان دهنده حفظ پتانسیل باروری فرد باشد. تست HOST میتواند نقشی حیاتی در ارزیابی عملکرد اسپرم باشد. غشای معیوب دراسپرم از طریق آزمایش HOST تشخیص داده می شود که ممکن است در بهبود میزان موفقیت در لقاح و HOST مفید باشد. در حالی که کاربرد دو آنتی اکسیدان بیوتین و اسیدفولیک در محیط انجماد اسپرم قبل از انجماد و ذوب، یا به عبارت بهتر در نمونه‌های در معرض آسیب، با انجام رنگ آمیزی نسبتا ساده و ارزان TB می توان با اطمینان بیشتری به وضعیت سلامت کروماتین اسپرم پی برد.

نتیجه گیری

بیوتین و اسید فولیک اثر محافظتی روی کیفیت کروماتین، غشائ سالم، حیات اسپرم و نقش مهمی در حفظ پارامتر های اسپرم در فرایند انجماد اسپرم و تکنیک های وابسته به آن داشته باشد، اما برای تأیید این اثر تحقیقات بیشتری لازم است. در مطالعات آینده می توانیم از ترکیب هر دو روش خوراکی و افزودن به محیط انجماد استفاده کنیم. همچنین می توان تاثیر این دو ماده را در مردان با مشکل باروری نیز مورد بررسی قرار داد.

تشکر وقدر دانی

از معاونت محترم تحقیقات وفن آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به دلیل حمایت از این طرح سپاسگذاریم. این مقاله از پایان نامه دکتری پزشکی به شماره طرح ۳۹۶۶۸۰ استخراج شده است.

منابع

1.Oberoi B, Kumar S, Talwar P. Study of human sperm motility post cryopreservation.. Med J Armed Forces India 2014;70(4):349-53.

2. Verza Jr S, Feijo CM, Esteves SC. Resistance of human spermatozoa to cryoinjury in repeated cycles of thaw-refreezing. Int Braz J Urol. 2009;35(5):581-91.

3.Sa-Ardrit M, Saikhun J, Thongtip N, Damyang M, Mahasawangkul S, Angkawanish T, et al. Ultra-structural alterations of frozen-thawed Asian elephant (Elephas maximus) spermatozoa. Int J Androl 2006; 29(2): 346-52.
4.NaeiniZK,BafraniHH,Nikzad.Evaluation of ebselen supplementationon cryopreservation medium in human semen. Iran J Reprod Med. 2014;12(4):24.
5. 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.
6.Soltanpour F, Moghaddam G, Asadpour R, Rafat SA. Effect of Antioxidant combinations on sperm quality of cross breed rams during liquid storage. Int J of Adv. Biological and Biomed Res. 2014;2(3):732-40.
7. Amidi F, Pazhohan A, Nashtaei MS, Khodarahmian M, Nekoonam S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. Cell and tissue banking. 2016;17(4):745-56.
8.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.
9.Hamilton T, Assumpcao M. Sperm DNA fragmentation: Causes and identification. Zygote.2020;28(1):1-8.
10.Hosen MB, Islam MR, Begum F, Kabir Y, Howlader MZ. Oxidative stress induced sperm DNA damage, a possible reason for male infertility. Iran J Reprod Med 2015; 13(9): 525-32.
11. 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)
12. Hosseini J, Mamaghani AM, Hosseinifar H, Gilani MAS, Dadkhah F, Sepidarkish M. The influence of ginger (Zingiber officinale) on human sperm quality and DNA fragmentation A double-blind randomized clinical trial. Int J of Reprod BioMed. 2016;14(8):533.
13. Iranpour FG, Fazelian K, Dashti GR (2017) Thymoquinone as a natural spermostatic substance in reproductive medicine: an experimental study. Int J Reprod Biomed.2017; 15:641.
14. Ghasemi N,Dashti GhR,Amoozgar F,Vaez SA.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
15. Toghiani SH,Hayati N,Dashti GH,Rouzbehani SH.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):703-710.
16. 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
17. Kalthur G, Salian SR, Keyvanifard F, Sreedharan S, Thomas JS, Kumar P, et al. Supplementation of biotin to sperm preparation medium increases the motility and longevity in cryopreserved human spermatozoa. J of Assisted Reprod and Genetics.2012;29(7):631-5.
18. Khamsuk K, Sinawat S, Seejorn K, Pongsritasana T, Sukkasame S. The Effect of Folic Acid on Post-thaw Quality of Human Spermatozoa. Sri Nagarind Med J. 2014;29(4):141-5.
19. Cooper TG, Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, Baker H, Behre HM, et al.World Health Organization reference values for human semen characteristics. Human Reprod Update. 2010; 16(3):231-45.
20.Sadeghnejad N, Dashti GR, Zolfaghari B, Baghazadeh S, Golshan-Iranpour F. Effects of high doses of hydroalcoholic extract of nigella sativa on sperm motility and apoptosis innormozoospermic men. J Isfahan Med Sch. 2016; 34(381): 470-7. (In persian)

21.Fazelian Kh, Dashti Gh, Golshan-Iranpour F, Baghazadeh Sh. Effect of low doses of exogenous thymoquinone on sperm motility and viability of normozoospermic men**.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(287): 776-83(In persian)
22. Rarani F.Z, Golshan-Iranpour F, Dashti G.R. Correlation between sperm motility and sperm chromatin/DNAdamage before and after cryopreservation and the effect of folic acid and nicotinic acid on post-thaw sperm quality in normozoospermic men. Cell Tissue Bank. 2019;20(3):367-378.
23. 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.
24.Ramu S, Jeyendran RS. The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity. Methods Mol Biol.2013;927:21-5.
25. Pietrzik K, Bailey L, Shane B. Folic acid and L-5-methyltetrahydrofolate: comparison of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. Clin Pharmacokinet. 2010;49(8):535-48.
26.Boxmeer JC, Smit M, Utomo E, Romijn JC, Eijkemans MJ, Lindemans J, Laven JS, Macklon NS, Steegers EA, Steegers-Theunissen RP. Low folate in seminal plasma is associated with increased sperm DNA damage. Fertil steril. 2009 Aug 1;92(2):548-56.
27. Mangoli E, Talebi AR, Anvari M, Taheri F, Vatanparast M, Rahiminia T, Hosseini A. Vitamin C attenuates negative effects of vitrification on sperm parameters, chromatin quality, apoptosis and acrosome reaction in neat and prepared normozoospermic samples. Taiwan J Obstet Gynecol. 2018;57(2):200-204.
28. Aghaz F, Khazaei M, Vaisi-Raygani A, Bakhtiyari M. Cryoprotective effect of sericin supplementation in freezing and thawing media on outcome of cryopreservation in human sperm. Aging Male.2018;19:1-8.
29.Fortes MR, Satake N, Corbet DH, Corbet NJ, Burns BM, Moore SS, Boe-Hansen GB. Sperm protamine deficiency correlates with sperm DNA damage in B os indicus bulls. Andrology. 2014;2(3):370-8.
30.Stanic P, Sonicki Z, Suchanek E. Effect of pentoxifylline on motility and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. Int J of Andrology. 2002;25(3):186-90.
31.Sreenivasa G, Prasad DRM, Malini SSN. Evaluating the Functional Status of Spermatozoa in Smokers by Using Hypo-Osmotic Swelling Test. Asia Pac J Med Toxicol. 2016;5: 83-7.
32. Ghadhban R.F, Alwan N.A. The Role of Folic Acid on Some Physiological Parameters and Efficiency of Sperm in Male Rabbits. Sys Rev Pharm .2020;11(9):1003-1007.