DOI: 10.22122/jims.v38i603.13411 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و هشتم/شماره‌ی ۶۰۳/هفته‌ی سوم بهمن ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۱۵ تاریخ چاپ: ۱۳۹۹/۱۱/۲۱

تأثیر فولیک اسید و نیکوتینیک اسید بر سطح مالون دی‌آلدئید مایع سیمن مردان الیگواسپرمی پس از فرایند انجماد

زهرا صادقی[۱]، شهلا اسحاقی[۲]، غلامرضا دشتی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species یا ROS) یکی از مهم‌ترین عوامل آسیب‌رسان بر کیفیت اسپرم در طی فرایند انجماد می‌باشند که باعث افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی (Lipid peroxidation یا LPO) غشای سلول می‌باشد. مطالعه‌ی حاضر، با هدف اندازه‌گیری غلظت مالون دی‌آلدئید (Malondialdehyde یا MDA) در مایع سیمن مردان الیگواسپرمی پیش و پس از فرایند انجماد و بررسی تأثیر فولیک اسید و نیکوتینیک اسید بر غلظت MDA این افراد پس از فرایند انجماد انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، نمونه‌ی مایع سیمن از ۲۵ مرد الیگواسپرمی در محدوده‌ی سنی ۴۵-۲۵ سال جمع‌آوری گردید. هر نمونه به ۵ گروه شامل گروه تازه (Fresh) ، گروه انجماد بدون آنتی‌اکسیدان (شاهد)، گروه انجماد با نیکوتینک اسید (۱۰ میلی‌مول)، گروه انجماد با فولیک اسید (۵۰ نانومول) و گروه انجماد با ترکیبی از نیکوتینک اسید (۱۰ میلی‌مول) + فولیک اسید (۵۰ نانومول) تقسیم شدند. میزان غلظت MDA با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۵ نانومتر بر حسب نانومول/میلی‌لیتر در هر گروه ارزیابی گردید.

یافته‌ها: مطالعه‌ی حاضر نشان داد که میانگین غلظت MDA در مایع سیمن پس از فرایند انجماد (۰/۱۲ ± ۱/۷۳ نانومول/میلی‌لیتر) در مقایسه با قبل از انجماد (۰/۰۲ ± ۰/۴۵ نانومول/میلی‌لیتر) افزایش یافت ($P < ۰/۰۰۱$). همچنین، میانگین غلظت MDA در گروه فولیک اسید + نیکوتینیک اسید (۰/۰۶ ± ۰/۶۸ نانومول/میلی‌لیتر) در مقایسه با سایر گروه‌های بعد از انجماد کمتر بود ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: ترکیب آنتی‌اکسیدان‌های فولیک اسید و نیکوتینیک اسید همراه محیط انجماد اسپرم منجر به کاهش سطح MDA و LPO غشای اسپرم در طی فرایند انجماد و حفظ پتانسیل باروری مردان الیگواسپرمی می‌شود.

واژگان کلیدی: فولیک اسید؛ نیکوتینیک اسید؛ مالون دی‌آلدئید؛ مایع سیمن؛ الیگواسپرمی؛ انجماد

ارجاع: صادقی زهرا، اسحاقی شهلا ، دشتی غلامرضا. **تأثیر فولیک اسید و نیکوتینیک اسید بر سطح مالون دی‌آلدئید مایع سیمن مردان الیگواسپرمی پس از فرایند انجماد.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۹؛ ۳۸ (۶۰۳): ۹۲۸-۹۲۱.

مقدمه

نزدیک به ۱۰ درصد از زوجین در سراسر جهان از ناباروری رنج می‌برند و علت ۵۰ درصد از موارد ناباروری در ارتباط با عوامل مردانه است (۱). میزان شیوع ناباروری در کشور ایران ۱۳/۲ درصد است (۲). انجماد اسپرم از روش‌های مهم در آزمایشگاه‌ها و مراکز باروری- ناباروری جهت نگهداری طولانی مدت اسپرم، مدیریت و حفظ باروری مردان می‌باشد (۳-۴). در این روش، خطر آسیب به اسپرم به دنبال پراکسیداسیون لیپیدی (Lipid peroxidation یا LPO) غشای اسپرم وجود دارد (۵).

غشای اسپرم به علت وجود اسیدهای چرب غیر اشباع بسیار، نسبت به گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species یا ROS) آسیب پذیر است (۶). آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو اسپرم، باعث کاهش تحرک اسپرم می‌شود و در لقاح تخمک و اسپرم، اختلال ایجاد می‌کند. افزایش میزان LPO غشای پلاسمایی به عنوان دلیل مهم ناباروری مردان پیشنهاد شده است (۷).

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- کارشناس، آزمایشگاه باروری- ناباروری حضرت مریم (س)، بیمارستان شهید بهشتی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: غلامرضا دشتی؛ استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: dashti@med.mui.ac.ir

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

www.SID.ir

Archive of SID

مایع منی محتوی آنتی‌اکسیدان‌هایی است که در کاهش میزان اثرات ROS نقش دارد. بررسی غلظت Malondialdehyde (MDA) که فراورده‌ی LPO پایدار غشای اسپرم است، یک روش ساده برای بررسی اثر LPO بر روی غشای اسپرم می‌باشد (۸). سنجش میزان MDA، یک نشانگر مهم برای سنجش میزان استرس اکسیداتیو در مردان نابارور است (۹). طبق مطالعات پیشین، سطح MDA در مایع منی با زنده ماندن اسپرم ارتباط معکوس دارد (۱۱-۱۰). در مطالعه‌ای مشخص شد که میزان MDA در طی انجماد اسپرم گوسفند افزایش می‌یابد (۱۲). تحقیقات نشان داد که میزان ROS باعث آسیب‌های DNA در مردان الیگواسپرمی بیشتر از مردان بارور است و منجر به کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های مایع منی نیز می‌شود (۱۰). بین میزان تولید ROS و آنتی‌اکسیدان‌های منی، تعادل نسبی است و بر هم خوردن این تعادل، باعث تشدید اثرات مخرب می‌شود که با کاربرد مکمل‌های آنتی‌اکسیدان می‌توان این تعادل را تا حدودی دوباره ایجاد کرد (۱۴-۱۳).

دو آنتی‌اکسیدان فولیک اسید و نیکوتینیک اسید، در جلوگیری از LPO در غشای پلاسمایی نقش مهمی دارند (۱۶-۱۵). فولات، یکی از ویتامین‌های محلول در آب است. فولیک اسید از لحاظ متابولیکی فعال نیست؛ به منظور فعالیت، ابتدا به ترکیبات فعال کوچک‌تری از طریق آنزیم Dihydrofolate Reductase (DHFR) مانند Dihydrofolate (DHF) و Tetrahydrofolate (THF) تبدیل می‌شود و سپس، THF به وسیله‌ی آنزیم Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) به L-Methyl folate تبدیل می‌شود (۱۷). نیکوتینیک اسید با فرمول شیمیایی C6H5NO2، نیاسین یا ویتامین B3 نیز نامیده می‌شود. این ویتامین، پیش‌ساز کوآنزیم‌های نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید (NAD) و نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات (NADP) می‌باشد (۱۴). جهت تبدیل فولیک اسید به فرم فعال آن، نیاز به صرف انرژی و اکسیداسیون موادی نظیر NADP (NADPH) می‌باشد (۱۷).

تا زمان اجرای این مطالعه، هیچ مطالعه‌ای تأثیر آنها را بر اثرات سوء ROS بر اسپرم مردان الیگواسپرمی در شرایط انجماد به صورت توام و جداگانه مورد بررسی قرار نداده بود. مطالعه‌ی حاضر، با هدف اندازه‌گیری غلظت مالون دی‌آلدئید (Malondialdehyde یا MDA) در مایع سیمن مردان الیگواسپرمی پیش و پس از فرایند انجماد و بررسی تأثیر فولیک اسید و نیکوتینیک اسید بر غلظت MDA این افراد پس از فرایند انجماد انجام شد.

روش‌ها

جمعیت مطالعه: در یک مطالعه‌ی تجربی، طبق مجوز کمیته‌ی اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به شماره‌ی IR.MUI.MED.REC.1398.595، نمونه‌ی مایع سیمن از ۲۵ مرد مبتلا به الیگواسپرمی، در محدوده‌ی سنی ۴۵-۲۵ سال، که در سال‌های ۹۹-۱۳۹۸ به مرکز باروری- ناباروری بیمارستان شهید بهشتی اصفهان مراجعه کرده بودند، بعد از اخذ رضایت آگاهانه، جمع‌آوری گردید.

در ابتدا، نمونه‌ها از مردان الیگواسپرمی که حداقل ۴-۳ روز مقاربت نداشتند، در ظروف استریل مخصوص گرفته شد. بر اساس دستور سازمان بهداشت جهانی (۲۰۱۰) الیگواسپرمی، کسانی هستند که تعداد اسپرم‌های موجود در هر میلی‌لیتر از مایع سیمن آنان، کمتر از ۱۵ میلیون عدد باشد (۱۸).

آماده‌سازی نمونه‌ها: نمونه‌ها برای مایع‌سازی به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. تحرک اسپرم در هر گروه با نرم‌افزار کامپیوتری Common Astronomy Software Application (CASA) اندازه‌گیری شد. هر نمونه به ۵ گروه مساوی شامل گروه تازه (Fresh)، گروه انجماد بدون آنتی‌اکسیدان (شاهد)، گروه انجماد با نیکوتینک اسید (۱۰ میلی‌مولار)، گروه انجماد با فولیک اسید (۵۰ نانومول) وگروه انجماد با ترکیبی از نیکوتینک اسید (۱۰ میل‌مول) + فولیک اسید (۵۰ نانومول) تقسیم شد. سپس انجماد نمونه‌ها انجام شد.

انجماد اسپرم: ابتدا، نمونه‌ها ۲ بار در سرم آلبومین ۵ درصد شستشو شدند. حجم برابری از محلول انجماد اسپرم (10137,Sperm freeze solution, Vitrolife, Goteborg, Sweden) و مایع منی با هم مخلوط گردید. ویال‌ها بر اساس گروه، نشانه‌گذاری شدند. مخلوط منی به ویال افزوده شد. ویال‌ها برای انجماد به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. ویال‌های انجماد به مدت ۳۰ دقیقه بر روی حمام نیتروژن مایع با دمای ۱۹۶- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از ۲ هفته، نمونه‌های ذوب به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد و سرعت حرکت اسپرم‌ها بار دیگر اندازه‌گیری گردید (۲۰-۱۹).

آماده‌سازی مایع سیمن: نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با شتاب ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت نمونه برداشته شد و سپس، ۳۰۰ میکرولیتر MDA Lysis Buffer با ۳ میکرولیتر Butylated hydroxytoluene (BHT) به نمونه‌ها اضافه و نمونه‌ها با شتاب ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی برداشته و به منظور اندازه‌گیری غلظت MDA از تیوباربیتوریک اسید (Thiobarbituric acid یا TBA) استفاده شد (۲۱).

گونه‌های واکنش‌پذیر اسید تیوباربیتوریک: سطح LPO با استفاده از TBA سنجیده شد (۱۵). ابتدا، مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از تری‌کلرواستیک اسید (Trichloroacetic acid) با ۵۰ میلی‌لیتر TBA و مقدار برابری از Hydrochloric acid مخلوط شد. ۵۰ میلی‌لیتر از نمونه در دمای اتاق ذوب، با ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول پیش‌گفته مخلوط

www.SID.ir
http://jims.mui.ac.ir

Archive of SID

و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب قرار گرفت. نمونه‌ها به مدت ۱۵–۱۰ دقیقه در یخچال با دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس، ۱۰ دقیقه با شتاب ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در پایان، غلظت MDA هر نمونه از طریق فرمول زیر به دست آمد (۲۲–۲۱).

$$\frac{\text{Optical density} \times \text{total volume}}{1.56 \times 105 \times \text{Sample volume}} \times 10\text{^}6 \text{ nmol/ml}$$

واکاوی آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, IBM Corporation, Armonk, NY) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از آزمون‌های حداقل اختلاف معنی‌دار مقایسه‌ی میانگین‌ها و آزمون ANOVA استفاده شد. بر اساس نوع مطالعه، P < ۰/۰۰۱ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. زمانی که سطح معنی‌داری آزمون صفر می‌شد، به صورت P < ۰/۰۰۱ نشان داده می‌شد.

یافته‌ها

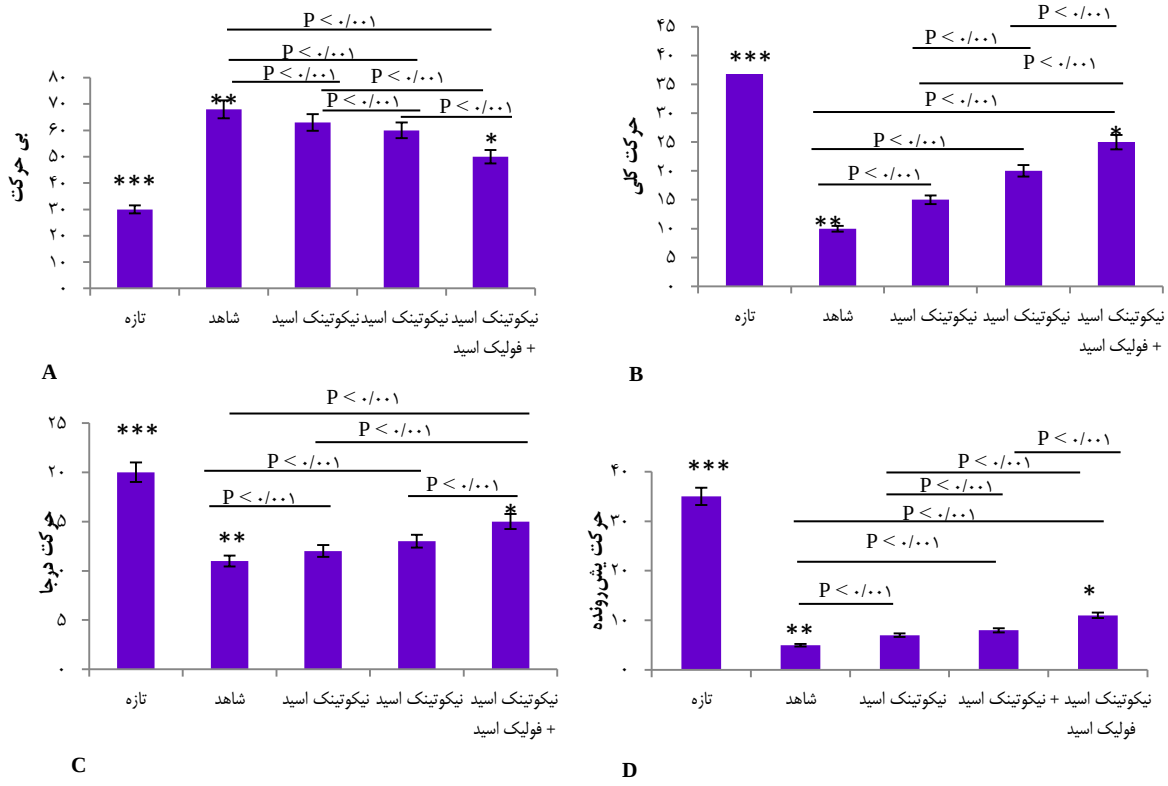
نتایج حاصل از بررسی تحرک اسپرم: شکل ۱. مقایسه‌ی درصد اسپرم‌های بی‌حرکت، دارای حرکت کلی، حرکت درجا و پیش‌رونده بین گروه‌های مختلف مورد مطالعه به تفکیک نوع حرکت را نشان می‌دهد.

در جدول ۱ درصد اسپرم‌های بدون حرکت بین گروه‌های مختلف مورد مطالعه مقایسه شده است.

با توجه به شکل A–۱ و جدول ۱، میانگین درصد اسپرم‌های بدون حرکت در گروه قبل از انجماد (۵/۹۲ ± ۲۸/۴۸)، کمتر از گروه‌های شاهد (۵/۸۶ ± ۶۸/۱۴)، نیکوتینیک اسید (۶/۱۰ ± ۶۴/۹۲)، فولیک اسید (۶/۲۹ ± ۶۳/۲۵) و فولیک اسید–نیکوتینیک اسید (۶/۲۵ ± ۵۵/۷۹) بود که این اختلاف، معنی‌دار بود (P < ۰/۰۰۱).

میانگین درصد اسپرم‌های بدون حرکت در گروه شاهد (۵/۸۶ ± ۶۸/۱۴) بیشتر از گروه‌های نیکوتینیک اسید (۶/۱۰ ± ۶۴/۹۲)، فولیک اسید (۶/۲۹ ± ۶۳/۲۵) و فولیک اسید–نیکوتینیک اسید (۶/۲۵ ± ۵۵/۷۹) بود که این اختلاف معنی‌دار است (P < ۰/۰۰۱).

میانگین درصد اسپرم‌های بدون حرکت در گروه نیکوتینیک اسید بیشتر از گروه فولیک اسید و فولیک اسید– نیکوتینیک اسید بود که این اختلاف معنی‌دار است (P < ۰/۰۰۱).



شکل ۱. مقایسه‌ی درصد اسپرم‌های بی‌حرکت، دارای حرکت کلی، حرکت درجا و پیش‌رونده بین گروه‌های مختلف مورد مطالعه به تفکیک نوع حرکت

*** درصد اسپرم‌های دارای حرکت کلی، حرکت پیش‌رونده و حرکت درجا در گروه قبل از انجماد در مقایسه با گروه‌های بعد از انجماد بیشتر بود. بین درصد اسپرم‌های بدون حرکت در گروه قبل از انجماد در مقایسه با سایر گروه‌های انجماد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (n = ۲۵) (P < ۰/۰۰۱)

www.SID.ir
http://jims.mui.ac.ir

Archive of SID

جدول ۱. مقایسه‌ی درصد اسپرم‌های بدون حرکت بین گروه‌های مختلف مورد مطالعه

گروه	میانگین ± انحراف معیار	اختلاف میانگین؛ مقدار P*			
		قبل از انجماد	شاهد	نیکوتینیک اسید	فولیک اسید
قبل از انجماد	۲۸/۴۸ ± ۵/۹۲	–			
شاهد	۶۸/۱۴ ± ۵/۸۶	< ۰/۰۰۱ ؛۳۹/۶۶	–		
نیکوتینیک اسید	۶۴/۹۲ ± ۶/۱۰	< ۰/۰۰۱ ؛۳۶/۴۴	< ۰/۰۰۱ ؛۳/۲۲	–	
فولیک اسید	۶۳/۲۵ ± ۶/۲۹	< ۰/۰۰۱ ؛۳۴/۷۷	< ۰/۰۰۱ ؛۴/۸۹	< ۰/۰۰۱ ؛۱/۶۷	–
نیکوتینیک- فولیک اسید	۵۵/۷۹ ± ۶/۲۵	< ۰/۰۰۱ ؛۲۷/۳۱	< ۰/۰۰۱ ؛۱۲/۳۵	< ۰/۰۰۱ ؛۹/۱۳	< ۰/۰۰۱ ؛۷/۴۶

* P < ۰/۰۰۱

میانگین درصد اسپرم‌های بدون حرکت در گروه فولیک اسید از گروه فولیک اسید- نیکوتینیک اسید بیشتر که این اختلاف معنی‌دار است (P < ۰/۰۰۱).

جدول ۲ مقایسه‌ی درصد اسپرم‌های دارای حرکت کلی بین گروه‌های مختلف مورد مطالعه نشان می‌دهد.

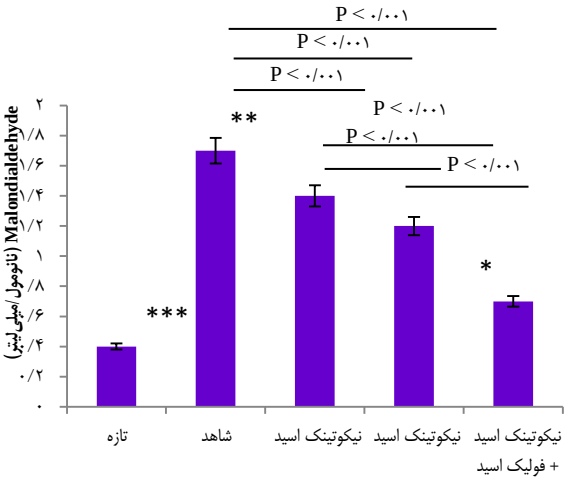
با توجه به شکل ۱- B و جدول ۲، میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت کلی در گروه قبل از انجماد(۶/۳۷ ± ۴۱/۰۸) بیشتر از گروه‌های شاهد (۱/۴۳ ± ۱۰/۵۲)، نیکوتینیک اسید (۱/۰۸ ± ۱۵/۰۸)، فولیک اسید (۱/۶۶ ± ۲۰/۱۸) و فولیک اسید- نیکوتینیک اسید (۱/۵۰ ± ۲۴/۳۳) بود که اختلاف بین گروه‌ها معنی‌دار بود (P < ۰/۰۰۱).

میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت کلی در گروه شاهد (۱/۴۳ ± ۱۰/۵۲) از گروه‌های نیکوتینیک اسید (۱/۰۸ ± ۱۵/۰۸)، فولیک اسید (۱/۶۶ ± ۲۰/۱۸) و فولیک اسید- نیکوتینیک اسید را نشان داد (P < ۰/۰۰۱).

نتایج حاصل از بررسی غلظت MDA بین گروه‌های مورد مطالعه:

با توجه به و جدول ۳ و شکل ۲، میانگین غلظت MDA در گروه قبل از انجماد (۰/۰۲ ± ۰/۴۵) کمتر از گروه‌های شاهد (۰/۱۲ ± ۱/۷۳)، نیکوتینیک اسید (۰/۱۴ ± ۱/۴۴)، فولیک اسید (۰/۱۵ ± ۱/۱۸) و فولیک اسید- نیکوتینیک اسید (۰/۰۶ ± ۰/۶۸) بود که این اختلاف، معنی‌دار بود (P < ۰/۰۰۱).

میانگین میزان جذب MDA در گروه شاهد (۰/۱۲ ± ۱/۷۳) بیشتر از گروه‌های نیکوتینیک اسید (۰/۱۴ ± ۱/۴۴)، فولیک اسید (۰/۱۵ ± ۱/۱۸) و نیکوتینیک- فولیک اسید (۰/۰۶ ± ۰/۶۸) بود که این اختلاف، معنی‌دار بود (P < ۰/۰۰۱).



شکل ۲. مقایسه‌ی غلظت Malondialdehyde (MDA) (نانومول/میلی‌لیتر) بین گروه‌های مختلف مورد مطالعه

*** کمترین غلظت **MDA** در گروه قبل از انجماد دیده شد. ** غلظت **MDA** در گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت. * این غلظت در گروه فولیک اسید- نیکوتینیک اسید کاهش یافت (**n** = ۲۵) (**P** < ۰/۰۰۱).

جدول ۲. مقایسه‌ی درصد اسپرم‌های دارای حرکت کلی بین گروه‌های مختلف مورد مطالعه

گروه	میانگین ± انحراف معیار	اختلاف میانگین؛ مقدار P*			
		قبل از انجماد	شاهد	نیکوتینیک اسید	فولیک اسید
قبل از انجماد	۴۱/۰۸ ± ۶/۳۷	–			
شاهد	۱۰/۵۲ ± ۱/۴۳	< ۰/۰۰۱ ؛۳۰/۵۶	–		
نیکوتینیک اسید	۱۵/۰۸ ± ۱/۰۸	< ۰/۰۰۱ ؛۲۶/۰۰	< ۰/۰۰۱ ؛۴/۵۶	–	
فولیک اسید	۲۰/۱۸ ± ۱/۶۶	< ۰/۰۰۱ ؛۲۰/۹۰	< ۰/۰۰۱ ؛۹/۶۶	< ۰/۰۰۱ ؛۵/۱۰	–
نیکوتینیک و فولیک اسید	۲۴/۳۳ ± ۱/۵۰	< ۰/۰۰۱ ؛۱۶/۷۵	< ۰/۰۰۱ ؛۱۳/۸۱	< ۰/۰۰۱ ؛۹/۲۶	< ۰/۰۰۱ ؛۴/۱۵

* P < ۰/۰۰۱

www.SID.ir
http://jims.mui.ac.ir

Archive of SID

جدول۳. مقایسه ی میزان جذب مالون دی آلدهید در گروه های مختلف مورد مطالعه

	میانگین ± انحراف معیار	اختلاف میانگین؛ مقدار P*			
گروه		قبل از انجماد	شاهد	نیکوتینیک اسید	فولیک اسید
قبل از انجماد	۰/۴۵ ± ۰/۰۲	–			
شاهد	۱/۷۳ ± ۰/۱۲	< ۰/۰۰۱ ؛۱/۲۸	–		
نیکوتینیک اسید	۱/۴۴ ± ۰/۱۴	< ۰/۰۰۱ ؛۰/۹۹	< ۰/۰۰۱ ؛۰/۲۹	–	
فولیک اسید	۱/۱۸ ± ۰/۱۵	< ۰/۰۰۱ ؛۰/۷۳	< ۰/۰۰۱ ؛۰/۵۵	< ۰/۰۰۱ ؛۰/۲۶	–
نیکوتینیک و فولیک اسید	۰/۶۸ ± ۰/۰۶	< ۰/۰۰۱ ؛۰/۲۳	< ۰/۰۰۱ ؛۱/۰۵	< ۰/۰۰۱ ؛۰/۷۶	< ۰/۰۰۱ ؛۰/۵۰

* P < ۰/۰۰۱

میانگین میزان جذب MDA در گروه نیکوتینیک اسید (۰/۱۴ ± ۱/۴۴) بیشتر از گروه فولیک اسید (۰/۱۵ ± ۱/۱۸) و نیکوتینیک- فولیک اسید (۰/۰۶ ± ۰/۶۸) بود و این اختلاف معنی‌دار بود (P < ۰/۰۰۱).

میانگین میزان جذب MDA در گروه فولیک اسید از گروه نیکوتینیک- فولیک اسید بیشتر و اختلاف بین گروه‌ها معنی‌دار بود (P < ۰/۰۰۱).

گروه قبل از انجماد در مقایسه با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان داد (P < ۰/۰۰۱).

بحث

فریز اسپرم، تکنیک مهمی در آزمایشگاه‌ها و مراکز باروری- ناباروری بانک اسپرم، جهت مدیریت و حفظ باروری مردان با سطح اسپرم کم می‌باشد. در این روش، به دلیل وجود مقادیر زیادی از اسیدهای چرب غیر اشباع در غشای اسپرم، خطر LPO غشای سلولی و آسیب به غشای میتوکندری وجود دارد (۲۳، ۳).

افزایش تولید ROS در طی تکنیک انجماد اسپرم، منجر به افزایش میزان LPO غشای اسپرم می‌شود (۲۱-۲۰). میزان MDA از نشانگرهای مهم در سنجش میزان استرس اکسیداتیو می‌باشد (۲۴). افزایش LPO با تخریب غشای اسپرم و سطح بالای MDA همراه است (۲۲). غلظت MDA در مایع سیمن مردان الیگواسپرمی و آزواسپرمی ۱/۵ برابر بیشتر از مردان بارور است (۲۵).

مطالعه‌ی حاضر، با هدف اندازه‌گیری غلظت MDA در اسپرم مردان الیگواسپرمی و بررسی تأثیر آنتی‌اکسیدان‌های فولیک اسید و نیکوتینیک اسید بر میزان LPO غشا در جریان انجماد انجام شد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، غلظت MDA و میزان استرس اکسیداتیو در طی فرایند انجماد اسپرم افزایش یافت. مطالعه‌ای بیان کرد LPO در طی فرایند انجماد اسپرم گاو افزایش یافت و این افزایش، مستقل از سن گاو است و تنها به علت شرایط انجماد رخ می‌دهد (۲۲).

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که سطح MDA تولید شده در اثر LPO غشای اسپرم با اضافه کردن فولیک اسید یا نیکوتینیک اسید به محیط انجماد اسپرم کاهش معنی‌داری پیدا کرد. این آنتی‌اکسیدان‌ها با قطع پیوندهای جدید تشکیل شده بین ROS و پیوند دوگانه‌ی اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در غشای پلاسمایی، از LPO و تولید MDA جلوگیری می‌کند. نتایج این مطالعه، با مطالعه‌ی دیگری مطابقت داشت (۲۶).

در یک بررسی، کوتریموکسازول و اسید فولیک در Ratهای نر منجر به افزایش کیفیت مایع سیمن و کاهش LPO شد (۲۷).

پژوهش حاضر نشان داد فولیک اسید در مقایسه با نیکوتینیک اسید، تأثیر بیشتری بر کاهش سطح MDA و نیز LPO دارد. در این مطالعه، میزان افزایش غلظت MDA در گروهی که هم فولیک اسید و هم نیکوتینیک اسید را دریافت کرده بودند، از سایر گروه‌های بعد از انجماد کمتر بود که خود دلیل بر اثربخشی مؤثر این ترکیب آنتی‌اکسیدانی می‌باشد.

در مطالعه‌ی حاضر، فولیک اسید و نیکوتینیک اسید، باعث کاهش میزان LPO غشای سلولی اسپرم طی فرایند انجماد شدند و از اثرات مخرب ROS بر غشای اسپرم می‌کاهند و به حفظ مؤثر پتانسیل باروری مردان الیگواسپرمی کمک می‌کنند. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها منجر به بهبود متغیرهای اسپرم مانند تحرک می‌گردد (۲۹-۲۸).

میزان حرکت اسپرم‌ها پس از انجماد در مقایسه با گروه قبل از انجماد کاهش یافت. در بین گروه‌های بعد از انجماد، در گروهی که فولیک اسید دریافت کرده بودند، متغیرهای حرکتی نسبت به گروه نیکوتینیک اسید بهتر بود.

در این مطالعه، متغیرهای حرکتی در گروهی که ترکیبی از فولیک اسید و نیکوتینیک اسید را دریافت کردند، نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری داشت.

بر اساس نتایج این مطالعه، می‌توان گفت که آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش LPO غشا به حفظ بیشینه‌ی تحرک اسپرم پس از انجماد کمک می‌کنند.

www.SID.ir
http://jims.mui.ac.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این تحقیق و سایر مطالعات انجام شده، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر فولیک اسید و نیکوتینیک اسید پس از فرایند انجماد اسپرم، با مهار غلظت MDA و در نتیجه، LPO ناشی از ROS در حفظ تحرک اسپرم و پتانسیل باروری مردان الیگواسپرمی مؤثر است. پیشنهاد می‌شود اثرات آنتی‌اکسیدان‌های دیگر بر سطح LPO قبل و پس از فرایند فریز اسپرم مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به دلیل حمایت مالی سپاسگزاری می‌گردد. این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد در رشته‌ی علوم تشریحی به شماره‌ی ۳۹۸۸۰۰ می‌باشد. از شرکت کنندگان و افرادی که به نحوی در این مطالعه همکاری داشتند، صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Nachtigall RD. International disparities in access to infertility services. Fertil Steril 2006; 85(4): 871-5.
2. Moghadam A, Delpisheh A, Sayehmiri K. The prevalence of infertility in Iran. A systematic review. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2014; 16(81): 1-7. [In Persian].
3. Oberoi B, Kumar S, Talwar P. Study of human sperm motility post cryopreservation. Med J Armed Forces India 2014; 70(4): 349-53.
4. Verza S, Feijo CM, Esteves SC. Resistance of human spermatozoa to cryoinjury in repeated cycles of thaw-refreezing. Int Braz J Urol 2009; 35(5): 581-90.
5. Sa-Ardrit M, Saikhun J, Thongtip N, Damyang M, Mahasawangkul S, Angkawanish T, et al. Ultrastructural alterations of frozen-thawed Asian elephant (Elephas maximus) spermatozoa. Int J Androl 2006; 29(2): 346-52.
6. Esmaeili V, Shahverdi AH, Moghadasian MH, Alizadeh AR. Dietary fatty acids affect semen quality: A review. Andrology 2015; 3(3): 450-61.
7. Fazeli F, Salimi S. Correlation of seminal plasma total antioxidant capacity and malondialdehyde levels with sperm parameters in men with idiopathic infertility. Avicenna J Med Biochem 2016; 4(1): 4-29736.
8. Sariozkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutas PA, Bilgen A. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. Cryobiology 2009; 58(2): 134-8.
9. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxid Med Cell Longev 2014; 2014: 360438.
10. Collodel G, Moretti E, Micheli L, Menchiari A, Moltoni L, Cerretani D. Semen characteristics and malondialdehyde levels in men with different reproductive problems. Andrology 2015; 3(2): 280-6.
11. Das P, Choudhari AR, Singh AK, Singh R. Correlation among routine semen parameters, sperm viabilty and malondialdehyde levels in human subjects with different fertility potential. Indian J Physiol Pharmacol 2009; 53(3): 253-8.
12. Banday MN, Lone FA, Rasool F, Rashid M, Shikari A. Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. Cryobiology 2017; 74: 25-30.
13. Ghasemi N, Dashti G, 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 2013; 31(259): 1769-78. [In Persian].
14. Lee YJ, Lee SH, Lee E, Lee ST, Cheong HT, Yang BK, et al. Effect of nicotinic acid on fresh semen characteristics in miniature pigs. Journal of Embryo Transfer 2014; 29(4): 385-391.
15. Joshi R, Adhikari S, Patro BS, Chattopadhyay S, Mukherjee T. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. Free Radic Biol Med 2001; 30(12): 1390-9.
16. Kim YJ, Lee SH, Lee YJ, Oh HI, Cheong HT, Yang B, et al. Effect of nicotinic acid on sperm characteristic and oocyte development after in vitro fertilization using cryopreserved boar semen. Journal of Embryo Transfer 2015; 30(1): 7-15.
17. 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.
18. Cooper TG, Noonan E, von ES, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update 2010; 16(3): 231-45.
19. Rarani FZ, Golshan-Iranpour F, Dashti GR. Correlation between sperm motility and sperm chromatin/DNA damage 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): 367-78.
20. Golshan-Iranpour f, Zamani Rarani F, Dashti GR. Effect of chromatin condensation on frozen-thawed sperm DNA integrity in normozoospermic men. Sci J Kurdistan Univ Med Sci 2019; 24(3): 34-42. [In Persian].
21. Subramanian V, Ravichandran A, Thiagarajan N, Govindarajan M, Dhandayuthapani S, Suresh S. Seminal reactive oxygen species and total antioxidant capacity: Correlations with sperm parameters and impact on male infertility. Clin Exp Reprod Med 2018; 45(2): 88-93.
22. Hosseinzadeh CA, Karimi F, Jorsaraei SG. Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno- and oligoasheno- teratospermic men. Iran Red Crescent Med J 2013; 15(9): 780-5.
23. Martinez G, Daniels K, Chandra A. Fertility of men and women aged 15-44 years in the United States: National Survey of Family Growth, 2006-2010. Natl

www.SID.ir
http://jims.mui.ac.ir

Archive of SID

Health Stat Report 2012; (51): 1-28.
24. 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.
25. Tavilani H, Doosti M, Saeidi H. Malondialdehyde levels in sperm and seminal plasma of asthenozoospermic and its relationship with semen parameters. Clin Chim Acta 2005; 356(1-2): 199-203.
26. 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.
27. Salarkia E, Sepehri G, Torabzadeh P, Abshenas J, Saberi A. Effects of administration of co-trimoxazole and folic acid on sperm quality and histological changes of testes in male rats. Int J Reprod Biomed 2017; 15(10): 625-34.
28. Toghiani S, Hayati RN, Dashti GR, Rouzbehani S. 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.
29. Barik G, Chaturvedula L, Bobby Z. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility: An interventional study. J Hum Reprod Sci 2019; 12(3): 204-9.

www.SID.ir

Archive of SID
DOI: 10.22122/jims.v38i603.13411 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School Vol. 38, No. 603, 3rd Week, February 2021

Received: 16.05.2020 Accepted: 06.10.2020 Published: 19.02.2021

The Effect of Folic Acid and Nicotinic Acid on Malondialdehyde Levels of Semen in Oligospermia Men after Cryopreservation

Zahra Sadeghi[1], Shahla Ishaqi[2], Gholam Reza Dashti[3]

Original Article

Abstract

Background: Reactive oxygen species (ROS) are of the most important detrimental factors on sperm quality during freezing process, which increases the lipid peroxidation (LPO) of cell membranes. In this study, the concentration of malondialdehyde (MDA) levels in semen of men with oligospermia before and after cryopreservation process was measured to evaluate the effect of folic acid and nicotinic acid on the MDA concentration after freezing.

Methods: In this experimental study, semen fluid sample was collected from 25 men with oligospermia in age range of 25-45 years. Each sample was divided into 5 groups: Fresh group, Freeze group without antioxidants (control), Freeze group with nicotinic acid (10 mM), Freeze group with folic acid (50 nM), and Freeze group with a combination of nicotinic acid (10 mm) + folic acid (50 nM). The concentration of MDA in nmol/ml was measured in each group with spectrophotometer at 535 nm.

Findings: The mean concentration of MDA in semen increased after freezing (1.73 ± 0.12) compared to before freezing (0.45 ± 0.02) ($P < 0.001$). Mean concentration of MDA in the group of folic acid + nicotinic acid (0.68 ± 0.06) was lower compared to other groups after freezing (P ± 0.001).

Conclusion: The combination of folic acid and nicotinic acid antioxidants with sperm freezing medium reduces the level of MDA and LPO of sperm membrane during freezing process, and thereby maintains the fertility potential in men with oligospermia.

Keywords: Folic acid; Nicotinic acid; Malondialdehyde; Semen; Oligospermia; Cryopreservation

Citation: Sadeghi Z, Shahla 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): 921-8.

1- MSc Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Laboratory Technician, St. Maryam Fertility and Infertility Center, Behesti Hospital, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Gholam Reza Dashti, Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: dashti@med.mui.ac.ir

www.SID.ir