نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد چهارم، شماره سوم، ۱۳۹۵
http://ejrr.gau.ac.ir

تأثیر ویتامین B_{12} در رقیق‌کننده بر پایه تریس بر حفاظت اسپرم قوچ زل

مهناز احمدی همدانی[۱]، *عبدالمنصور طهماسبی[۲]، عباسعلی ناصریان[۲] و یوسف جعفری‌آهنگری[۳]

[۱]دانشجوی دکتری و [۲]استاد گروه علوم‌دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
[۳]استاد گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم‌دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲۰

چکیده

سابقه و هدف: ویتامین B_{12} از ویتامین‌های محلول در آب است که در فرآیند اسپرماتوژنسیز و بقای عملکرد طبیعی اسپرماتووزا ضروری است. در حال حاضر اطلاعات اندکی در خصوص مکمل ویتامین B_{12} بر کیفیت سیمن منجمد شده موجود است. بنابراین هدف از انجام این پژوهش بررسی تأثیر سطوح مختلف ویتامین B_{12} بر کیفیت اسپرم قوچ زل در شرایط پیش و پس از انجماد بود.

مواد و روش‌ها: مایع منی از شش رأس قوچ سالم و بالغ با میانگین وزنی ۵±۵۵ کیلوگرم و سن ۳-۲ ساله با استفاده از شوکر الکتریکی اخذ شد و نمونه‌های مناسب با رقیق‌کننده تریس به نسبت ۱ به ۴ مخلوط و پس از سردسازی تا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، ارزیابی شدند. سپس، پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری با مایع منی رقیق شده پر و ابتدا در ازت مایع در دمای ۱۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۸-۶ دقیقه قرار داده شد و سپس، در ازت مایع در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد، منجمد و نگهداری شدند. پس از مدت زمان ۱۰ روز، پایوت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد یخ گشایی شدند و ویژگی‌های زنده‌مانی، تحرک، حرکت پیشرونده، درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی، نقایص آکروزومی، درصد اسپرم طبیعی، یکپارچگی غشا پلاسمایی و درصد بازیابی زنده‌مانی و تحرک اسپرماتوزوا با استفاده از رنگ‌آمیزی و ارزیابی میکروسکوپی انجام شد و میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز منی نیز، اندازه‌گیری شد. این پژوهش، در قالب طرح

*نویسنده مسؤل: a.tahmasbi@lycos.com

کاملاً تصادفی با چهار تیمار شامل سطوح مختلف (صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ویتامین B_{12} با هشت تکرار انجام شد. داده‌های حاصل از این آزمایش، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تأثیر ویتامین B_{12} بر پارامترهای حیاتی اسپرم از جمله درصد زنده‌مانی، حرکت پیشرونده، یکپارچگی غشا پلاسمایی، نقایص آکروزومی و درصد اسپرم طبیعی در شرایط سردسازی تا ۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط پس از انجماد معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$) و بالاترین میزان این صفات در سطح ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ویتامین B_{12} مشاهده شد. استفاده از ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ویتامین B_{12} در رقیق‌کننده، توانست درصد بازیابی تحرک و زنده‌مانی اسپرم را بهبود بخشد. همچنین، منجر به افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز مایع منی گردید که کمترین میزان این آنزیم‌ها در گروه کنترل و بیشترین مقدار آنها در سطح ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ویتامین B_{12} در رقیق‌کننده تریس به دست آمد اما نتوانست منجر به افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نسبت به گروه کنترل گردد.

نتیجه‌گیری: می‌توان پیشنهاد نمود که از سطح ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ویتامین B_{12} در رقیق‌کننده تریس، می‌توان برای محافظت اسپرم و جلوگیری از آسیب‌های ساختاری ناشی از رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپید و بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در طی فرآیند انجماد- یخ گشایی منی قوچ زل استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: ویتامین B_{12}، کیفیت اسپرم، رقیق‌کننده، رادیکال آزاد، قوچ زل.

مقدمه

یکی از بزرگترین چالش‌های موجود در تلقیح مصنوعی، آسیب‌های وارده بر اسپرم در طی فرآیند انجماد منی می‌باشد. فرآیند انجماد با تأثیر بر غشا پلاسمایی، اسکلت سلول، هسته و متابولیسم سلول اسپرم، باروری آن را متاثر می‌سازد (۱۲).

مطالعات نشان می‌دهد که در طول فرآیند انجماد-یخگشایی، با افزایش سطح گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر،[1] اسیدهای چرب غیراشباع غشا پلاسمایی اسپرم مستعد پراکسیدسیون لیپید می‌شود، به‌علاوه ترکیبات سمی حاصل از این فرآیند (مالونیل دی‌آلدئید) می‌تواند در ساختار و عملکرد اندامک‌های مهمی مانند غشا پلاسمایی، میتوکندری و DNA اختلال ایجاد کند. در نتیجه، این تغییرات تحرک، زنده مانی و در نهایت باروری اسپرم را کاهش می‌دهد (۴). بنابراین، در این شرایط، استفاده از مواد آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در بهبود خصوصیات اسپرم مؤثر باشد (۳۵).

آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که با کاهش سرعت اکسیداسیون، باعث حفظ سلول از آسیب‌های اکسیداسیون می شوند. این ترکیبات ممکن است به طور طبیعی در مواد وجود داشته باشند و یا از طریق مصنوعی سنتز و به آنها اضافه گردند. ماکسول و واتسون (۱۹۹۶) بیان نمودند که افزودن آنتی‌اکسیدانت‌های گوناگون به رقیق‌کننده منی قوچ در طی مدت ذخیره‌سازی اسپرم، تحرک اسپرم را بهبود می‌بخشد و میزان آسیب سلولی را کاهش داده و سبب بهبود یکپارچگی آکروزوم و افزایش زنده‌مانی و ظرفیت باروری در شرایط لقاح درون آزمایشگاهی می‌گردد.

یکی از این آنتی‌اکسیدانت‌ها، ویتامین B_{12} است. ویتامین B_{12}، یکی از ویتامین‌های محلول در آب است که به عنوان یک کوآنزیم در سنتز متیونین و متابولیسم اسیدهای آمینه شاخه دار عمل می‌کند. ویتامین B_{12} به همراه اسیدفولیک و ویتامین B_6، در کنترل سطوح هموسیستئین عمل می‌کند (۲۳). سیانوکوبالامین، به دلیل پایداری‌اش، فرم معمول مورد استفاده این مکمل ویتامینی است. این ویتامین در باروری حیوان نر نیز مؤثر است. واتانیب و همکاران (۲۰۰۳) گزارش نمودند که، کمبود ویتامین B_{12}، تعداد اسپرم طبیعی، تحرک و سرعت اسپرم را در موش‌های نر کاهش داد. همچنین در قوچ، پیشنهاد شده است که ویتامین‌های B_1، B_6 و B_{12}، نقش کلیدی در تنظیم دمای پوست اسکروتوم، دمای راست روده، میل جنسی، کیفیت منی و باروری در شرایط استرس گرمایی بازی می‌کنند (۱۵).

1- ROS

مطالعات پیشین نشان داده است که مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی مثل سیانوکوبالامین در رقیق‌کننده کیفیت اسپرم یخگشایی شده را بهبود می‌بخشد و متعاقباً توانایی باروری در گاو و قوچ را موجب می‌گردد (۳). همچنین، تعیین میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدانی موجود در ویتامین B_{12} می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد و مطالعات زیادی در خصوص نقش آنها در بیولوژی تولیدمثل صورت گرفته است و این آنزیم‌ها در برابر سمیت خود به خودی اکسیژن، پراکسیداسیون لیپید و اثرات مخرب آن از اسبرم محافظت می‌کنند (۱۸). به هرحال، افزودن بیش از اندازه، ویتامین B_{12} به رقیق‌کننده منی می‌تواند استرس‌های اکسیداتیو را از طریق تشکیل گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر، فعال سازد و عملکرد طبیعی اسپرم را متوقف سازد (۳). بنابراین، انتخاب غلظت آنتی‌اکسیدانت مناسب برای نگهداری طبیعی و تعادل بین تولید و فعالیت‌های پاکسازی رادیکال‌های آزاد، بسیار حائز اهمیت است. بعلاوه، اطلاعات محدودی در خصوص اثر افزودن ویتامین B_{12} در رقیق‌کننده بر کیفیت منی منجمد شده در قوچ موجود است (۳).

بنابراین، هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف مکمل ویتامین B_{12} در رقیق‌کننده منی قوچ زل در شرایط قبل و پس از انجماد بود.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش، قوچ‌ها به مدت ۲ هفته به اسپرم‌گیری عادت‌دهی شدند و سپس نمونه‌های منی از ۶ رأس قوچ بالغ و سالم نژاد زل (۳-۲ ساله) با میانگین وزنی ۵±۵۰ کیلوگرم به وسیله شوکر الکتریکی اخذ شده و با یکدیگر مخلوط و در رقیق‌کننده حاوی ۳/۸۷۶ گرم تریس، ۰/۵۲۳ گرم گلوکز، ۲/۱۲۳ گرم اسیدسیتریک، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین، ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین، ۵ درصد گلسیرول، ۱۵ درصد زرده تخم‌مرغ (۷ به ۷) و آب مقطر تا حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق شد و به آن سطوح مختلف ویتامین B_{12} (صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به‌صورت پودری که از کارخانه کیمیا رشد گرگان تهیه شده بود، افزوده و سطوح بکار گرفته شده نیز، براساس تحقیقات سایر پژوهشگران بر گاو و قوچ در شرایط مایع، انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت (۳، ۱۱). با توجه به حساس بودن ویتامین B_{12} به نور، این ویتامین به صورت پودری در ویال‌های تیره در شرایط دور از نور مستقیم به رقیق‌کننده اضافه شد. همچنین، در این تحقیق، نسبت رقیق‌سازی منی بصورت یک قسمت منی و چهار قسمت رقیق‌کننده تریس بود. لوله‌های حاوی منی و رقیق‌کننده‌ها در حمام آبگرم

در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در صورت مناسب بودن کیفیت منی (جدول۱)، بخشی از منی رقیق شده را خنک نمودیم. برای این منظور، لوله‌های آزمایش را در ظرف آب که دمایی معادل دمای منی داشت قرار داده و سپس لوله‌ها به یخچال منتقل شد تا دمای آنها طی ۲- ۱/۵ ساعت به ۵ درجه سانتی‌گراد کاهش یابد. بخش دیگری از نمونه‌های رقیق شده از لحاظ خصوصیات حیاتی اسپرم از جمله زنده‌مانی، تحرک، حرکت پیشرونده، درصد ناهنجاری مورفولوژیکی (ناهنجاری‌های اولیه و ثانویه)، یکپارچگی سلامت غشا و آکروزوم و درصد اسپرم طبیعی مورد ارزیابی قرار گرفت. بقیه نمونه‌های سردشده، به داخل پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری ریخته و منجمد شد. در این تحقیق، انجماد پایوت‌ها به روش دستی انجام گرفت. بدین صورت که پایوت‌ها در سبد مخصوص حمل پایوت قرار داده شد و به مدت ۸-۶ دقیقه در ارتفاع میانی مخزن مخصوص انجماد اسپرم نگه داشته شد و پس از ۱۰ دقیقه قرار گرفتن در ارتفاع ۵ سانتی‌متری بالای سطح ازت، پایوت‌ها در ازت مایع غوطه‌ور شدند. ۱۰روز پس از انجماد پایوت‌ها، از ازت مایع خارج و یخگشایی شدند. روش یخگشایی نیز، بدین صورت بود که پایوت‌ها در حمام آبگرم که بر دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود، برای مدت ۴۵ ثانیه قرار داده شدند تا نمونه‌ها ذوب شوند و خصوصیات حیاتی اسپرم ارزیابی شود.

در این آزمایش حجم منی با استفاده از پیپت مدرج تعیین شد (۷) و pH منی با استفاده از دستگاه pH سنج دیجیتالی اندازه‌گیری شد (۱۷).

اندازه‌گیری غلظت منی: برای تعیین اندازه‌گیری غلظت منی از لام هموسیتومتر استفاده شد که که برای منظور، ابتدا لامل را بر روی قسمت مدرج لام قرار داده و سپس بوسیله پیپت نمونه منی را تا درجه ۰/۵ کشیده و همچنین محلول آب نمک ۳ درصد را تا درجه ۱۰۱ آن بالا می‌کشیم. سپس ته پیپت را با انگشت سبابه بسته و پیپت را تکان داده تا موجب مخلوط شدن منی با مایع رقیق کننده شود. تماس نوک پیپت با لبه شمارشگر موجب خارج شدن قطره‌ای از منی رقیق شده و پخش شدن آن در زیر لامل می‌گردد. پس از ۵ دقیقه، اسپرم‌ها بر روی لام شمارشگر ته نشین می‌شود. آنگاه لام شمارشگر را در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰X قرار داده و شمارش اسپرماتوزوآ در پنج مربع بزرگ که هر کدام دارای ۱۶ مربع کوچک می‌باشند انجام می‌شود. مربع‌های بزرگ که در هر زاویه قرار گرفته‌اند همراه با یک مربع میانی شمارش می‌شوند. غلظت اسپرماتوزوآ در میلی‌لیتر منی از طریق ضرب کردن تعداد اسپرم‌های موجود در ۵ مربع بزرگ در ۱۰ میلیارد محاسبه شد (۳۷).

تعیین حرکت موجی اسپرم: برای تعیین حرکت موجی، یک قطره منی را بر روی یک لام با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بدون لامل گذاشته و با بزرگنمایی ۱۰X میکروسکوپ، حرکت موجی مورد مشاهده قرار گرفت. امتیازبندی حرکت موجی از صفر تا ۵ در نظر گرفته شد که امتیاز ۵ شامل حرکت موجی خیلی سریع با ۹۰ درصد اسپرماتوزوآی فعال است و امتیاز صفر شامل تمام اسپرماتوزوآی مرده یا بدون حرکت است (۷).

درصد تحرک اسپرم: به منظور تعیین درصد تحرک اسپرم، یک قطره منی و یک قطره سرم فیزیولوژی روی لام از پیش گرم شده قرار داده، سپس روی آن لامل گذاشته تا نمونه‌ها به طور یکنواخت گسترش یابند. با مشاهده مستقیم و شمارش سلول‌های اسپرم دارای حرکت در میدان دید میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰X، تعداد ۲۰۰ اسپرم متحرک محاسبه شد.

درصد حرکت پیشرونده اسپرم: برای تعیین حرکت پیشرونده، تعداد اسپرم‌های دارای حرکت رو به جلو و یا دارای مسیر مستقیم روی خط راست که دم آنها دارای حرکت شناگری بود، با شمارش چشمی بوسیله میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰X، ارزیابی شد.

درصد زنده‌مانی اسپرم: درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها به کمک روش رنگ آمیزی ائوزین- نکروزین ارزیابی شد. بدین ترتیب که گسترشی از یک قطره نمونه منی و دو قطره رنگ روی یک لام گرم تهیه شد و زنده‌مانی تعداد ۲۰۰ اسپرم در هر لام بوسیله میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰X شمارش شد. میانگین سه مشاهده یا لام بعنوان یک داده واحد در نظر گرفته شد. اسپرم‌هایی که سر آنها به‌طور جزئی یا کامل رنگ بنفش را نشان دادند مرده و تنها اسپرم‌هایی که از ورود رنگ به داخل قسمت سر ممانعت کرده بودند به عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شدند (۳۷).

تعیین درصد اسپرم‌های ناهنجار: برای بررسی درصد اسپرم‌های ناهنجار، نمونه کوچکی از منی، با رنگ ائوزین- نیگروزین رنگ‌آمیزی شد. برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم، ناهنجاری‌هایی همچون: ناهنجاری‌های اولیه سر اسپرم شامل: سرهای گلابی شکل ، سرهای گرد، سرهای باریک، سرهای کوچک، سرهای بزرگ و سرهای دوقلو مورد نظر قرارگرفت.

ناهنجاری‌های اولیه قطعه میانی اسپرم شامل: قطعه میانی خمیده دارای زاویه راست (قائم)، قطعه میانی دو تایی (دو قلو)، قطعه میانی متورم یا ضخیم و قطعه میانی برون از مرکز ارزیابی شد. ناهنجاری‌های اولیه دم اسپرم شامل: دم پیچیده یا مجعد و دم دوتایی (دو قلو) بررسی شد.

ناهنجاری‌های ثانویه ساختمانی اسپرم شامل: سرهای جدا شده از دم (سرهای بدون دم)، داشتن قطره پرو توپلاسمی، دم گره کفشی، جدا شدن آکروزوم از سر که با بزرگنمایی ۴۰X بررسی شدند و با شمارش ۲۰۰ اسپرم در هر لام، درصد اسپرم‌های ناهنجار اولیه و ثانویه تعیین شد (۳۷).

تست فشار هیپواسمتیک یا یکپارچگی غشای پلاسمایی (HOST): یکپارچگی غشای پلاسمایی براساس روش بوکت و همکاران (۱۹۹۷) به کمک میزان پاسخ مثبت به محلول HOST (۹گرم فروکتوز، ۴/۹ گرم سیترات‌سدیم در یک لیتر آب مقطر دوبار تقطیر با اسموزیته ۱۰۰ میلی‌اسمز بر کیلوگرم) تعیین شد. برای انجام این تست، ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه اسپرم یخگشایی شده به ۵۰ میکرولیتر محلول هیپواسموتیک اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، نمونه به آرامی مخلوط شد و یک قطره از محلول عمل‌آوری شده بر روی لام گرم قرار گرفت و بر روی آن لامل گذاشته و با میکروسکوپ ۴۰X بررسی شد. از ۴۰۰ اسپرم که در هر تکرار شمارش شد، درصد اسپرم‌های با دم پیچ خورده و متورم تعیین شد.

یکپارچگی آکروزم: برای ارزیابی سلامت آکروزوم، میزان ۵۰۰ میلی‌لیتر از نمونه اسپرم با ۱۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد تثبیت شد و سپس محلول به مدت۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا فرآیند تثبیت به طور کامل انجام شود. پس از آن، ۲۰ میکرولیتر از رنگ PSA (Pisum sativum agglutinin) به آن اضافه و یک لام گسترش تهیه شد و پس از غوطه‌ور کردن آن در آب اجازه داده می‌شود تا لام خشک شود و با استفاده از میکروسکوپ تعداد اسپرم‌های با آکروزم سالم شمرده شد. اسپرم‌هایی با سر سبز به عنوان آکروزوم سالم و اسپرم با کمربند سبز به‌عنوان آکروزوم تخریب شده در نظر گرفته شد (۳۷).

تعیین درصد بازیابی زنده‌مانی اسپرم: درصد بازیابی زنده‌مانی اسپرم از نسبت اسپرم زنده پس از انجماد به اسپرم زنده قبل از انجماد ضرب در ۱۰۰، محاسبه شد (۲۰).

تعیین درصد بازیابی تحرک اسپرم: درصد بازیابی تحرک اسپرم از نسبت اسپرم متحرک پس از انجماد به اسپرم متحرک قبل از انجماد ضرب در ۱۰۰ بدست آمد (۲۰).

تعیین درصد بازیابی تحرک پیشرونده: از نسبت اسپرم متحرک پیشرونده پس از انجماد به اسپرم متحرک پیشرونده قبل از انجماد ضرب در ۱۰۰ تعیین گردید (۲۰).

اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: اندازه‌گیری آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز براساس روش Paglia & Valentine انجام شد. این آنزیم با استفاده از اکسیداسیون، کیومن هیدروپراکسیدگلوتاتیون را کاتالیز

می‌کند. در حضور آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز و NADPH شکل اکسیده شده گلوتاتیون نیز، به فرم گلوتاتیون احیا تبدیل می‌شود. همزمان با آن $NADP^+$ اکسید شده و به NADPH تبدیل می‌گردد. کاهش جذب NADPH در ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد که متناسب با غلظت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز است (۲۶).

در اندازه‌گیری میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، با استفاده از گزانتین و آنزیم گزانتین اکسیداز، رادیکال‌های آزاد سوپراکسید تولید می‌شود. این رادیکال‌های آزاد سپس با کروموژن I.N.T واکنش داده، تا رنگ ایجاد شود. میزان فعالیت آنزیم از طریق مهار این واکنش و جلوگیری از تشکیل رنگ قابل اندازه‌گیری است. یک واحد سوپراکسید دیسموتاز مقداری از آنزیم است که در شرایط آزمایش از ۵۰ درصد میزان واکنش تولید رنگ جلوگیری نماید (۲۴).

برای اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز اسپرم در این مطالعه از روش Aebi استفاده گردید. اساس این روش، کاهش جذب نوری آب اکسیژنه در طول موج ۲۴۰ نانومتر است (۱).

تحلیل آماری

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۸ تکرار انجام شد. داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SPSS آنالیز شدند. داده‌های حاصل از هر مرحله آزمایش مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند و میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

تأثیر ویتامین B_{12} بر فراسنجه‌های اسپرم سردسازی شده در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است. اثر ویتامین B_{12} در رقیق‌کننده بر پایه تریس بر درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم معنی‌دار بود به‌طوری‌که رقیق‌کننده حاوی ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ویتامین B_{12}، منجر به بهبود آنها در مقایسه با گروه کنترل شد ($p<۰/۰۵$). نتایج نشان داد که با افزایش میزان ویتامین B_{12} در رقیق‌کننده تریس تا سطح ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، روند افزایشی در خصوصیات حیاتی اسپرم مشاهده شد و پس از آن سیر نزولی یافت. تأثیر سطوح مختلف ویتامین B_{12} در رقیق‌کننده تریس بر خصوصیات اسپرم منجمد و یخگشایی شده در جدول ۳ نشان داده شده است. درصد تحرک، حرکت پیشرونده و زنده‌مانی با حضور ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ویتامین B_{12} در رقیق‌کننده تریس، نسبت به گروه کنترل بهبود یافت. افزودن ویتامین B_{12} بر

ناهنجاری‌های مورفولوژیکی و آکروزومی نیز معنی‌دار بود و بیشترین میزان آن در گروه کنترل مشاهده شد. درصد بازیابی زنده‌مانی، تحرک و حرکت پیشرونده نیز در جدول۴ نشان داده شده است. بالاترین میزان درصد بازیابی تحرک (۱/۴۷±۳۴/۴۱)، درصد بازیابی حرکت پیشرونده (۲/۱۰±۳۱/۱۴) و درصد بازیابی زنده‌مانی (۱/۱۸±۳۷/۲۳)، در رقیق‌کننده حاوی ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ویتامین B_{12} به‌دست آمد. تاثیر ویتامین B_{12} بر میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در جدول ۵ نشان داده شده است. نتایج این آزمایش نشان داد که سطوح مختلف ویتامین B_{12} بر میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نیز معنی‌دار بود و از گروه کنترل تا سطح ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ویتامین B_{12}، بیشترین فعالیت این آنزیم‌ها با ۰/۰۱۵± ۱/۷۱۶ و ۰/۰۲۷± ۳/۲۳ به‌ترتیب بدست آمد. اما با افزایش سطح ویتامین B_{12}، از میزان فعالیت این دو آنزیم کاسته شد. اثر ویتامین B_{12} بر گلوتاتیون پراکسیداز نیز معنی‌دار بود اما، از سطح ۱ تا ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ویتامین B_{12}، روند افزایشی بر میزان فعالیت این آنزیم مشاهده شد اما بیشترین میزان آن در گروه کنترل و سپس ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ویتامین B_{12} مشاهده گردید. حساسیت اسپرماتوزوآ، به گونه‌های واکنش‌پذیر در طی فرآیند انجماد، یکی از تغییرات اساسی در اسپرم است (۳۰). استرس‌های اکسیداتیوی، منجر به کاهش سطوح ATP داخل سلولی می‌شود که تحرک اسپرم را کاهش داده و منجر به پراکسیداسیون لیپید در غشا پلاسمایی اسپرم می‌گردد (۳۲). سیانوکوبالامین (ویتامین B_{12})، در طی تکثیر سلولی و سنتز DNA، فعال می‌شود و برای درمان ناباروری در انسان مورد استفاده قرار گرفته است (۱۶).

شارپ و وایت (۱۹۶۲) بیان نمودند که، مصرف ویتامین B_{12} نقش مهمی را در اسپرماتوژنسیز بازی می‌کند و شواهد بالینی نشان داده است که ویتامین B_{12} یک مکمل مهم در تداوم باروری طبیعی در مردان است. بنابراین، در شرایط درون[1] و برون تنی[2] می‌تواند تا حدودی مؤثر واقع شود. بعلاوه، بوکسمر و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که، یک ارتباط مثبت بین غلظت کل ویتامین B_{12} در پلاسمای منی و غلظت اسپرماتوزوآ در منی وجود دارد. مکمل ویتامین B_{12}، مقدار ROS تولید شده از استرس اکسیداتیو در منی انسان را کاهش می‌دهد (۱۴،۱۳). در مطالعه حاضر، اثر ویتامین B_{12} بر خصوصیات اسپرماتوزوآی قوچ زل در شرایط سردسازی و انجماد بررسی شد. نتایج نشان داد که افزودن ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ویتامین B_{12}، تحرک، حرکت پیشرونده، زنده‌مانی، یکپارچگی غشا پلاسمایی و

1. In Vivo
2. In Vitro

آکروزوم و تعداد اسپرم‌های طبیعی را افزایش داد. ظرفیت ویتامین B_{12} در نگهداری اسپرم بر علیه استرس ایجاد شده در طی سردسازی، ممکن است بطور وسیعی با غلظت مورد استفاده آن در رقیق‌کننده در ارتباط باشد. اسدپور و همکاران (۲۰۰۲) نیز بیان نمودند که، افزودن ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ویتامین B_{12} به رقیق‌کننده، تحرک و زنده‌مانی اسپرم را در قوچ‌های دورگه قزل × بلوچی و آکرامرینوس و قزل، در شرایط سردسازی تا ۵ درجه سانتی‌گراد افزایش داد و این بیانگر آن است که، این آنتی‌اکسیدان توانسته است از غشا اسپرم در طی سردسازی تا ۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط نگهداری مایع، محافظت نماید.

در مطالعه دیگری، هو و زوا (۲۰۰۳) گزارش نمودند که، رقیق‌کننده حاوی مکمل ویتامین B_{12}، کیفیت منی یخگشایی شده را بهبود می‌بخشد. شاید مکانیسم حفاظتی ویتامین B_{12} در رقیق‌کننده مربوط به این باشد که ویتامین B_{12} ویتامینی محلول در آب بوده و به عنوان یک کوآنزیم برای آنزیم‌های ضروری عملکرد سلول موردنیاز است. بعبارتی دیگر، کوآنزیم B_{12} به آنزیم‌های متیل مالونیل کوآنزیم A موتاز در تشکیل گلوگز کمک می‌کند (۶).

کای و همکاران (۲۰۰۴) گزارش نمودند که درصد تحرک اسپرم گاو در طی فرآیند انجماد یخگشایی با استفاده از ویتامین B_{12} در رقیق کننده افزایش یافت که با افزایش فعالیت کوآنزیم A ویتامین B_{12} همراه است. در طی عمل کوآنزیم ویتامین B_{12} فرم اکسیده (-S-S) کوآنزیم A به شکل (-SH) که برای واکنش آنزیمی، مورد نیاز است، کاهش می‌یابد. به‌علاوه، گلوتاتیون‌اکسیداز و هموسیستئین نیز به فرم گلوتاتیون‌ردوکتاز کاهش می‌یابد. به‌طور عمده، کاهش گلوتاتیون در فعالیت های بیولوژیکی متابولیسم اسپرم مهم است و احتمالاً علت افزایش تحرک و زنده‌مانی اسپرم است که اثر حفاظتی بر علیه پراکسیداسیون لیپید دارد (۲۰). طبق نتایج حاصل از آزمایش حاضر فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نیز با بکارگیری ویتامین B_{12}، در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. در واقع، با افزایش میزان گلوتاتیون پراکسیداز (در گروه کنترل)، کیفیت اسپرم کاهش یافت که شاید به این دلیل باشد که SGSH مصرف نشده است تا از اسپرم قوچ در برابر اثرات ROS حتی در طی مواجهه اسپرم در شرایط اکسیداتیو بالا محافظت کند و شاید کاهش GsH و GsH px در پلاسمای منی، به از دست دادن آنزیم‌ها از سلول‌های آسیب دیده مربوط باشد که منجر به سوراخ شدن غشا وخروج آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از سلول‌های اسپرم شده است. همچنین، نتایج این آزمایش نشان داد که، افزایش ویتامین B_{12} به بیش از ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر/ به‌طور معنی‌داری فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و

کاتالاز را کاهش و فعالیت GsH را افزایش داد کـه بـا نتـایج اسـدپور و همکـاران (۲۰۰۲) و هـولی و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت داشت. هو وزاو (۲۰۰۳) نشان دادند زمانی که ویتـامین B_{12} بـه رقیـق‌کننـده منی افزوده شد، میزان گلوتامیک اگزالواستیک ترانس‌آمیناز (GOT) در پلاسـمای منـی قـوچ، بـه طـور معنی‌داری کاهش یافت و این ممکن است فاکتورهای مهمی برای بهبود تحـرک اسـپرم باشـد. نیلـد و همکاران (۲۰۰۳) بیان نمودند کـه گلوتـاتیون پراکسـیداز از پلاسـمای منـی در طـی فرآینـد انجمـاد-یخگشایی آزاد می‌شود که به آکروزوم اسپرم آسیب می‌رساند. میزان غلظت مناسب مکمل ویتامین B_{12} در رقیق‌کننده، می‌تواند از فعالیت ROS و پراکسیداسیون لیپید غشا تولید شـده، جلـوگیری کـرده و بـر علیه ROS، عمل پاکسازی انجام دهد. بنابراین، اثرات مضر انجماد کاهش یافتـه و درصـد یکپـارچگی غشا و آکروزوم اسپرم پس از یخگشایی بهبود می‌یابد (۲۱).

یکی دیگر از فراسنجه‌های مورد بررسی در این آزمایش، ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی است که برای تعیین نفوذپذیری غشا پلاسمایی است که با تعداد اسپرم‌های درگیر در ظرفیـت‌پـذیری اسـپرم هم بستگی دارد (۲۲). در گزارش اسدپور و همکاران (۲۰۰۲)، افزودن ۲ میلی‌گرم برمیلی‌لیتـر ویتـامین B_{12} به‌عنوان آنتی اکسیدانی غیرآنزیمی، باعث افزایش یکپارچگی غشا پلاسمایی شد که این گزارشـات در تضاد با نتایج بوکاک و همکاران (۲۰۰۷) است که اثبات نمودند، افزودن برخی آنتی‌اکسـیدانت‌هـای غیرآنزیمی به رقیق‌کننده همچـون تـائورین و هیالورونـان و سیسـتامین کـه اثـر مثبـت معنـی‌داری بـر یکپارچگی اسپرم قوچ نداشته است. افزایش تحرک، زنده‌مانی و یکپارچگی غشا اسپرم شاید مربوط به افزایش گلوتاتیون‌پراکسیداز پلاسمای منی باشد که این نتایج مشابه یافته‌های گزارش شده توسط وزینـا و همکاران (۱۹۹۶) در انسان است. با افزایش ویتامین B_{12}، فعالیت گلوتاتیون پراکسـیداز نیـز افـزایش یافته که می‌تواند از اسپرم بر علیه پراکسیداسیون لیپید خودبخودی محافظت کند. همچنـین، آلـووراز و استوری (۱۹۸۴) نشان دادند که پراکسیداسیون لیپید خودبخودی موجـب از دسـت دادن توانـایی غشـا پلاسمایی به‌عنـوان یـک سـد نفوذپـذیر مـی‌گـردد و در نتیجـه، منجـر بـه از دسـت دادن آنـزیم‌هـای سیتوسولیک و کاهش تحرک و زنده‌مانی اسـپرم مـی‌شـود. اسـترادایولی و همکـاران (۲۰۰۷) گـزارش نمودند که کاهش کیفیت منی می‌تواند مربوط به نشت سلول اسپرم به واسطه آسیب غشـا پلاسـمایی و استرس اکسیداتیو باشد که در این مطالعه افزودن ویتامین B_{12} باعـث افـزایش یکپـارچگی آکـروزوم و غشا اسپرم گردید.

در مطالعه حاضر، ویتامین B_{12} احتمالاً حفاظت سلول اسپرم را از ناهنجاری‌های مورفولوژیکی بوسیله جلوگیری از رادیکال‌های آزاد که سبب آسیب به اسپرم می‌شود، را فراهم می‌سازد و از این رو، اثر محافظتی بر فعالیت متابولیکی و زنده‌مانی سلول اسپرم داشت. بعلاوه، اثرات زیان‌بار سردسازی و انجماد را کاهش و کیفیت منی را در شرایط قبل و پس از انجماد بهبود می‌بخشد. یوفان (۱۹۹۸) گزارش نمود که افزودن ویتامین B_{12} به رقیق‌کننده گاو منجر به بهبود فعالیت‌های اسپرم و کاهش اسپرم‌های غیرطبیعی و فعالیت GOT بطور معنی‌داری شد و طول عمر اسپرم را افزایش داد. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که ویتامین B_{12}، توانست از سلول اسپرم در برابر آسیب‌های ساختاری در طی انجماد، جلوگیری کند. در این آزمایش افزودن ویتامین B_{12} اثری برناهنجاری‌های اولیه نداشت، زیرا این آسیب‌ها در طی فرآیند اسپرماتوژنسیز رخ می‌دهند، اما مورد ارزیابی قرار گرفت تا مجموع نقایص و میزان اسپرم طبیعی محاسبه گردد. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که افزایش در میزان ویتامین B_{12}، نتوانست برخی خصوصیات اسپرم را در شرایط قبل و پس از انجماد بهبود بخشد. هو و همکاران (۲۰۰۹) گزارش نمودند که غلظت بالای ویتامین B_{12} (۳/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اثرات سمی را بر اسپرم گاو داشت. بهرحال، مکانیسم دقیق اثرات منفی غلظت‌های بالای ویتامین B_{12} بر فراسنجه‌های اسپرم نیازمند تحقیق و بررسی بیشتر جزئیات است. شاید مکانیسم حفاظتی ویتامین B_{12} در رقیق‌کننده، مربوط به آن باشد که، کوآنزیم B_{12} با آنزیم‌های متیل‌مالونیل کوآنزیم A موتاز در تشکیل گلوکز همکاری می‌کند و گلوکز نیز، بعنوان ماده‌ای جهت سوخت، تولید انرژی و تحرک مورد استفاده قرار می‌گیرد.

جدول ۱- ارزیابی خصوصیات حیاتی اسپرم پس از جمع‌آوری

Table 1. Characteristics of Zel ram spermatozoa, under fresh condition

Host	pH	حجم Volume (ml)	غلظت Concentration ($ml10^9$)	اسپرم طبیعی Normal Sperm	ناهنجاری ثانویه Major defects	ناهنجاری اولیه Minor Defects	حرکت پیشرونده Progressive Motility	تحرک Motility	حرکت موجی	زنده‌مانی Viability
86	7.1	1.2	3.5	91.1	2.6	6.3	80.2	86.4	5	90.3

جدول ۲- بررسی تأثیر سطوح مختلف ویتامین B_{12} در شرایط سردسازی تا ۵ درجه سانتی‌گراد بر ویژگی‌های اسپرم

Table 2. Characteristics of Zel ram spermatozoa with treatment of vitamin B_{12} in freezing (mean±S.E.M)

Host	اسپرم طبیعی Normal Sperm	نقایص آکروزومی Acrosomal damages	ناهنجاری ثانویه Major defects	ناهنجاری اولیه Minor Defect	زنده‌مانی Viability	حرکت پیشرونده Progressive Motility	تحرک Motility	تیمار Treatment (mg/ml)
$69.2^{c} \pm 0.73$	$83.0^{b} \pm 1.89$	$4.2^{a} \pm 0.58$	$10.6^{a} \pm 0.97$	2.2 ± 0.37	$73.0^{c} \pm 0/63^{c}$	$64.0^{c} \pm 1$	$68.0^{c} \pm 0.97$	شاهد Control
$71.8^{b} \pm 0.91$	$84.2^{b} \pm 0.58$	$4.6^{a} \pm 0.24$	$9.0^{ab} \pm 0.54$	2.2 ± 0.37	$75.0^{bc} \pm 0.94$	$68.0^{b} \pm 1.22$	$72.4^{b} \pm 1.12$	1
$76.8^{a} \pm 0.80$	$90.6^{a} \pm 1.16$	$2.8^{b} \pm 0.37$	$4.8^{c} \pm 0.80$	1.8 ± 0.37	$80.2^{a} \pm 0.91$	$73.6^{a} \pm 1.56$	$77.4^{a} \pm 1.12$	2
$73.0^{b} \pm 0.94$	$86.0^{b} \pm 1.14$	$4.2^{a} \pm 0.37$	$7.6^{b} \pm 0.87$	2.2 ± 0.48	$76.4^{b} \pm 0.92$	$69.4^{b} \pm 1.16$	$73.4^{b} \pm 1.02$	3

حروف کوچک از (a تا c) در هرستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در بین گروه‌ها است ($p<0.05$).

جدول ۳- بررسی تأثیر سطوح مختلف ویتامین B_{12} در شرایط پس از انجماد- یخگشایی بر ویژگی‌های اسپرم

Table 3. Characteristics of Zel ram spermatozoa with treatment of vitamin B_{12} in post freezing (mean±S.E.M)

Host	اسپرم طبیعی Normal Sperm	نقایص آکروزومی Acrosomal damages	ناهنجاری ثانویه Major defects	ناهنجاری اولیه Minor Defect	زنده‌مانی Viability	حرکت پیشرونده Progressive Motility	تحرک Motility	تیمار Treatment (mg/ml)
$15.0^{c} \pm 0.62$	$67.2^{b} \pm 1.01$	$9.4^{a} \pm 0.40$	$21.2^{a} \pm 0.58$	2.2 ± 0.37	$18.4^{c} \pm 0.67$	$11.0^{c} \pm$ ۱^{c}	$15.4^{c} \pm 0.4$	شاهد Control
$21.0^{b} \pm 0.63$	$70.8^{b} \pm 2.13$	$7.8^{b} \pm 0.20$	$17.4^{b} \pm 0.92$	2.0 ۰ ± 0.31	$24.6^{b} \pm 0.81$	$18.2^{b} \pm 1.24$	$21.4^{b} \pm 0.97$	1
$26.0^{a} \pm 0.70$	$75.0^{a} \pm 1.07$	$6.6^{c} \pm 0.37$	$14.4^{c} \pm 0.67$	2.0 ± 0.31	$29.8^{a} \pm 0.80$	$22.8^{a} \pm 1.35$	$26.6^{a} \pm 0.92$	2
$20.4^{b} \pm 0.50$	$76.4^{a} \pm 0.70$	$7.2^{bc} \pm 0.40$	$16.2^{bc} \pm 0.37$	2.2 ± 0.37	$24.2^{b} \pm 0.73$	$17.8^{b} \pm 0.96$	$20.8^{b} \pm 0.48$	3

حروف کوچک از (a تا c) در هرستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در بین گروه‌ها است ($p<0.05$).

جدول ۴- بررسی تأثیر سطوح مختلف ویتامین B_{12} بر درصد بازیابی خصوصیات اسپرم

Table 4. Recovery rate of characteristics of Zel ram spermatozoa, with treatment of vitamin B_{12} (mean±S.E.M)

درصد بازیابی زنده‌مانی Recovery Viability (%)	درصد بازیابی حرکت پیشرونده Recovery Progressive motility (%)	درصد بازیابی تحرک Recovery Motility (%)	تیمار (mg/ml) Treatment
$35.20^{c} \pm 0.95$	$17.31^{b} \pm 1.63$	$22.46^{c} \pm 0.70$	شاهد Control
$32.82^{b} \pm 1.12$	$26.74^{a} \pm 1.64$	$29.24^{b} \pm 1.44$	1
$37.23^{a} \pm 1.18$	$31.14^{a} \pm 2.10$	$34.41^{a} \pm 1.47$	2
$31.73^{b} \pm 1.31$	$27.12^{a} \pm 1.36$	$28.39^{b} \pm 1.06$	3

حروف کوچک از (a تا c) در هرستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در بین گروه‌ها است ($p<0.05$).

جدول ۵- تأثیر سطوح مختلف ویتامین B_{12} در رقیق‌کننده تریس بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

گلوتاتیون پراکسیداز (U/L) Glutathione peroxidase	کاتالاز (U/ml) Catalase	سوپراکسید دیسموتاز (U/ml) superoxide dismutase	تیمار (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) Treatment
$161.0^{a} \pm 0.03$	$2.04^{c} \pm 0.02$	$1.40^{c} \pm 0.02$	شاهد Control
$96.13^{d} \pm 0.46$	$2.79^{b} \pm 0.05$	$1.57^{b} \pm 0.04$	1
$102.35^{c} \pm 0.62$	$3.23^{a} \pm 0.02$	$1.71^{a} \pm 0.01$	2
$127.12^{b} \pm 1.35$	$1.09^{d} \pm 0.03$	$1.11^{d} \pm 0.01$	3

حروف کوچک از (a تاc) در هرستون بیانگر میانگین اختلاف معنی‌دار در بین گروه‌ها است ($p<0.05$).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه به نظر می‌رسد که مکمل ویتامین B_{12} در رقیق‌کننده منی به طور معنی‌داری کیفیت اسپرم را از جمله؛ تحرک، حرکت پیشرونده زنده‌مانی، یکپارچگی غشا پلاسمایی و آکروزوم درصد اسپرم طبیعی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز را در مقایسه با رقیق‌کننده فاقد ویتامین B_{12}، بهبود بخشید. طبق نتایج حاصل از این آزمایش، غلظت بهینه ویتامین B_{12} در رقیق‌کننده تریس برای نگهداری منی در قوچ‌های زل، ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است. تحقیقات گسترده‌تر و بررسی‌های بیشتری در خصوص ساختارهای درونی سلول اسپرم از جمله میتوکندری، DNA، کروماتین و میزان پراکسیداسیون لیپید غشا، مورد نیاز است تا نقش‌های بیشتر فیزیولوژیکی ویتامین B_{12} در تولیدمثل شناخته شود تا ارزیابی بهتری صورت گیرد و افت خصوصیات حیاتی اسپرم در طی انجماد را کاهش دهد.

منابع

1. Aebi, H. 1974. Methods of enzymatic analysis. Bergmeyer: Chemie Weinheim. 11: 673-84.
2. Alvarez, J.G., and Storey, B.T. 1984. Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa. Biol.Reprod. 30: 323-331.
3. Asadpour, R.M. Pourseif, M. Moghadam, G. Jafari, R. Tayefi, H., and Mahmodi, H. 2002. Effect of vitamin B12 addition to extenders on some physicochemical parameters of semen in crossbred rams. Afr. J. Biotechnol. 11(54): 11741-11745.
4. Bansal, A.K., and Bilaspuri, G.S. 2011. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. Vet. Med. Inter. 1-7.
5. Bearden, H.J., and Fuquay, J.W. 2000. Semen evaluation. In: Bearden HJ, Fuquay JW editors. Applied animal reproduction. New Jersey: Prentic Hall, Upper Saddle River, pp. 168-182.
6. Bergman, E.N. Roe, W.E., and Kon, K. 1966. Quantitative aspects of propionate metabolism and gluconeogenesis in sheep. Am. J. Physiol. 211:793-799.
7. Biswas, D. Bari, F.Y., Shamsuddin, M., Rahmand, M.M., and Rahman, M.M. 2002. Determination of glycerol percentage for preserving the black Bengal buck (Capra hircus) spermatozoa for long time. Pak. J. Bio. Sci. 5(6): 715-718.
8. Boxmeer, J.C., Smit, M., Weber, R.F., Lindemans, J., Romijn, J.C., Eijkemans, M.J., Macklon, N.S., and Steegers-Theunissen, R.P. 2007. Seminal plasma cobalamin significantly correlates with sperm concentration in men undergoing IVF or ICSI procedures. J. Andro. 28: 521-527.
9. Bucak, M.N,. Atessahin, A., Varish, O., Yuce, A., Tekin, N., and Akcay, A. 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. Theriogenology. 67: 1060-1067.
10. Buckett, W.M., Luckas, M.J., Aird, I.A., Farquharson, R.G., Kingsland, C.R., and Lewis-Jones, D.I. 1997. The hypoosmotic swelling test in recurrent miscarriage. Fert and Ster. 68: 506-509.
11. Cai, J.G., Sun, S.Q., Wang, L.G., and Gu, H.J. 2004. The effect of adding vitamin B12 in sperm diluter on quality of bull's straw frozen sperm. J. Liao. Agri. Coll. 6: 10-11. (Article in Chinese with an abstract in English).
12. Chatterjee, S. de-Lamirande, E., and Gagnon, C. 2001. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. J. Mol. Rep. Develop. 60: 498-506.
13. Chen, Q.X., Mei, J. Ng. V. Chia, S.E. Ling, W.H., and Ong, C.N. 2001a. Semen folate, vitamin B12 and reactive oxygen species, and their relationships with sperm parameters. Acta Nutriment Sinica. 23: 160-163.

14. Chen, Q.X., Ng. V., Mei, J., Chia, S.E., Tay, S.K., Ling, W.H., and Ong, C. N. 2001b. Comparison of seminal vitamin B_{12}, folate, reactive oxygen species and various sperm parameters between fertile and infertile males. J. Hygiene Res. 30: 80-82.
15. El-Darawany, A.A. 1999. Improving semen quality of heat stressed rams in Egypt. Indian J. Anim. Sci. 69: 1020-1023.
16. Eskenazi, B., Kidd, A.S., Marks, A.R., Sloter, E., Block, G., and Wyrobek, A.J. 2005. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. Hum. Reprod. 20: 1006-1012.
17. Evans, G., and Maxwell, W.M.C. 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, Sydney. pp194.
18. Gadea, J., Selles, E., Marco, M.A., Coy, P. Matas, C., Romar, R., and Ruiz, S. 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. Theriogenology. 62:690-01.
19. Ha, F., and Zhao, Y.Z. 2003. Vitamin B complex as a complements in the cryopreservation dilutions of the ram semen. J. Gansu. Agric. Univ. 38:17-19.
20. Hu, J.H., Li, Q.W., Chen, Y.L., Jiang, Z.L., Jia, Y.H., Wang, L.Q., and Ou, B.B. 2009. Effects of addition of vitamin B_{12} to the extender on post-thaw motility, acrosome morphology, and plasma membrane integrity in bull semen. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 33: 379-384.
21. Hu, J.H.,Tian, W.Q., Zhao, X.L., Zan, L.S.. Xin, Y.P., and Li, Q.W. 2011. The cryoprotective effects of vitamin B_{12} supplementation on bovine semen quality. Reprod. Domest. Anim. 46: 66-73.
22. Jeyendran, R.S., VanDer Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., and Zaneveld, LJD. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod. Fertil. 70:219-228.
23. Juanchi, X., Albarran, G., and Negron-Mendoza, A. 2000. Radiolysis of cyanocobalamin (vitamin B_{12}). Radiat. Phys. Chen. 57: 337-339.
24. Marklund, S., and Marklund, G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyragallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem. 47(3): 469-74.
25. Maxwell, W M.C., and Watson, P. F. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. Anim. Reprod. Sci. 42: 55–65.
26. Mendoza, C., Carreras, A., Moos, J., and Tesarik, J. 1992. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using Pisum sativum agglutinin. J. Reprod. Fertil. 95: 755-763.
27. Neild, D.M., Gabella, B.M., Chaves, M.G., Miragaya, M.H., Colenbrander, B., and Aguero, A. 2003. Membrane changes during different stages of a freeze-

thaw protocol for equine semen cryopreservation. Theriogenology. 59: 1693-1705.
28. Pagila, D.E., and Valentine, W.N. 1967. Methods of glutathione peroxidase activity assay. J. Lab Clin. Med. 70(3): 158-9.
29. Sharp, A.A., and Witts, L.J. 1962. Seminal vitamin B_{12} and sterility. Lancet. 1: 779.
30. Sikka, S.C. 1996. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Front. Biosci. 1: 78-86.
31. Stradaioli, G., Noro, T., Sylla, L., and Monaci, M. 2007. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation:comparison between two extenders. Theriogenology. 67: 1249–1255.
32. Verma, A., and Kanwar, K.C. 1998. Human sperm motility and lipid peroxidation in different ascorbic acid concentrations: An in vitro analysis. Androlgia. 30: 325-329.
33. Vezina, D., Mauffette, F., Roberts, K.D., and Bleau, G. 1996. Seleniumvitamin E supplementation in infertile men. Effects on semen parameters and micronutrient levels and distribution. Biol. Trace Elem. Res. 53: 65-83.
34. Watanabe, T., Ohkawa, K., Kasai, S., Ebara, S., Nakano, Y., and Watanabe, Y. 2003. The effects of dietary vitamin B12-deficiency on sperm maturation in developing and growing male rats. Congenit. Anom. (Kyoto). 43: 57-64.
35. Yousef, M.I., Abdollad, G.A., and Kamel, K. I. 2003. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. Anim. Reprod. Sci. 76:99-111.
36. Yufan, L. 1998. The effects of vitamin B_{12} on the quality of freezing bull semen sperm. J. Hebei Normal University Sci. Technol.
37. Zamiri, M. 2008. Reproductive Physiology. Published by Haghshenas. 448 pp. (In Persian).

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 4(3), 2016
http://ejrr.gau.ac.ir

The effect of vitamin B_{12} on bases of Tris extender on protection of Zel ram spermatozoa

M. Ahmadi Hamedani[1], *A.M. Tahmasebi[2], A.A. Naserian[2] and Y. Jafari Ahangari[3]

[1]Ph.D. student and Professor, Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad [3]Professor, Dept. of Animal and Poultry Physiology, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
Received: 06/01/2016; Accepted: 12/10/2016

Abstract

Background and objectives: Vitamin B_{12} is water-soluble vitamins that are essential in the process spermatogenesis and survival of normal function. We have little information about supplementation of vitamin B12, on quality of frozen semen. So the aim of this study was to investigate the effects of different levels of vitamin B_{12} on semen quality of Zel ram spermatozoa in pre and post freezing conditions.

Materials and methods: Samples were collected from 6 healthy and mature rams with 55± 5 Kg body weight and 2-3 years old by using electro-ejaculator. Suitable samples were mixed with Tris extender in a ratio of 1:4 semen and after cooled to 5-0^{0}C was assessed. Then, 0.25 ml of straws was filled with diluted semen. At first, straws put upper vapor liquid nitrogen for 6-8 min, then kept and frozen in -196°C. After 10 days straws were thawed in 37°C and viability, motility, progressive motility, morphological defects, acrosomal defects, normal spermatozoa, plasma membrane integrity and recovery rate of viability and motility of spermatozoa by using staining and microscopic evaluation was performed and the antioxidant enzymes catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase of semen were measured. This experiment was carried out on the basis of completely randomized design with 4 treatments including levels of vitamin B_{12} (0, 1, 2 and 3 mg/mL) and 8 replications. The data from these tests was analyzed by using SPSS software, version 15.

*Corrresponding author; a.tahmasbi@lycos.com

Results: Results showed that effect of vitamin B_{12} on vital parameters of spermatozoa such as viability, progressive motility, membrane integrity, defect acrosome and normal spermatozoa at cooled to $5^{o}C$ and post frozen conditions were significant ($p< 0.05$) and the highest percentages of these parameters were observed in extender with 2 mg/mL vitamin B_{12}. On the one hand the use of vitamin B_{12} in extender, could improve recovery rate of motility and viability percentages of spermatozoa. It also led to an increase in antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase of semen and the least of these enzymes in the control group and the highest level of these enzymes in 2 mg/ ml of vitamin B_{12} in Tris extender were obtained, but did not lead to increase glutathione peroxidase activity than the control of group.

Conclusion: Therefore, it could be suggested that the level of 2 mg /ml, vitamin B_{12} in Tris extender can be used to protect spermatozoa and prevent structural damage caused by free radicals and lipid peroxidation and improve antioxidant enzyme activity in the process of frozen thawed of Zel ram semen.

***Keywords*:** Vitamin B_{12}, Spermatozoa quality, Extender, Free Radical, Zel ram.