Vol 26, No. 2, Summer 2024

University of Tehran Press

Journal of Animal Production

Online ISSN: 2382-994X

Homepage: https://jap.ut.ac.ir/

The effects of adding different levels of curcumin to the diluent on the epididymal sperm quality of Shal rams during storage at 5˚C

Ramin Farhadi[1]✉ | Abbas Farshad[2] | Jalal Rostamzadeh[3] | Abouzar Najafi[4]

1. Corresponding Author, Department of Animal Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. E-mail: rfarhadi81@gmail.com
2. Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. E-mail: afarshad@uok.ac.ir
3. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. E-mail: J.Rostamzadeh@uok.ac.ir
4. Department of Animal and Poultry Science, Faculty of Agricultural Technology, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Pakdasht, Iran. E-mail: abozar.najafi@ut.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received 19 November 2023
Received in revised form
16 June 2024
Accepted 21 June 2024
Published online 14 July 2024

Keywords:
Antioxidant
Cooling
Curcumin
Ram
Sperm

ABSTRACT

The present study was conducted in order to use different levels of curcumin in the diluting sperm epididymis of Shal breed rams during storage at five degrees Celsius in the form of a completely randomized design with four treatments in six replications. Sperm samples were extracted from the testicular tissue and used in the Tris-egg yolk diluent. Different concentrations of curcumin including 0, 10, 25 and 50 µM were added to the diluents. The samples were gradually cooled at 5°C and after stabilization at this temperature, in 6, 12, 24 and 48 hours, the parameters of total motility, progressive motility, viability, membrane integrity and the percentage of sperm abnormalities were evaluated. The results showed that the use of 25µM curcumin improved the parameters of total motility, progressive motility, viability and membrane integrity only at 6 and 12 hours, but no significant difference was observed at 24 and 48 hours compared to other treatment groups. Regarding sperm abnormalities, no significant difference was observed between the treatments in all the examined times. The results of this study indicate that using a concentration of 25µM curcumin can lead to the improvement of ram epididymal sperm quality in the initial periods of storage, but it loses its effect in longer periods of time. Therefore, it is recommended to use nanotechnology methods to improve the effectiveness of curcumin, especially during long-term storage of ram sperm.

Cite this article: Farhadi, R., Farshad, A., Rostamzadeh, J., & Najafi, A. (2024). The effects of adding different levels of curcumin to the diluent on the epididymal sperm quality of Shal rams during storage at 5˚C. *Journal of Animal Production*, 26 (2), 207-217. DOI: https://doi.org/10.22059/jap.2024.368364.623771

© The Author(s).
Publisher: The University of Tehran Press.
DOI: https://doi.org/10.22059/jap.2024.368364.623771

دوره بیست و ششم، شماره دوم، تابستان ۱۴۰۳

انتشارات دانشگاه تهران

تولیدات دامی

شاپا الکترونیکی: ۲۳۸۲-۹۹۴x

Homepage: https://jap.ut.ac.ir/

اثرات افزودن سطوح مختلف کورکومین به رقیق‌کننده بر کیفیت اسپرم اپیدیدمی قوچ نژاد شال طی نگهداری در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد

رامین فرهادی[۱]✉ | عباس فرشاد[۲] | جلال رستم‌زاده[۳] | ابوذر نجفی[۴]

۱. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. رایانامه: rfarhadi81@gmail.com

۲. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. رایانامه: afarshad@uok.ac.ir

۳. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. رایانامه: J.Rostamzadeh@uok.ac.ir

۴. گروه علوم دام و طیور، دانشکده فناوری کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران. رایانامه: abozar.najafi@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۲۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۳/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۰۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۴/۲۴

کلیدواژه‌ها:

آنتی‌اکسیدان

اسپرم

سردسازی

قوچ

کورکومین

چکیده

مطالعه حاضر به‌منظور استفاده از سطوح مختلف کورکومین در رقیق‌کننده اسپرم اپیدیدمی قوچ نژاد شال طی نگهداری در دمای پنج درجه سانتی‌گراد در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار در شش تکرار بررسی شد. نمونه‌های اسپرم از بافت بیضه استخراج و در رقیق‌کننده بر پایه تریس- زرده تخم مرغ استفاده شد. غلظت‌های مختلف کورکومین شامل صفر، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار به رقیق‌کننده اضافه شدند. نمونه‌ها به‌صورت تدریجی در دمای پنج درجه سانتی‌گراد سرد شده و پس از تثبیت در این دما، در زمان‌های شش، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، فراسنجه‌های جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی، یکپارچگی غشایی و درصد ناهنجاری‌های اسپرم ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که استفاده از ۲۵ میکرومولار کورکومین موجب بهبود فراسنجه‌های جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی غشا فقط در زمان‌های شش و ۱۲ شد ولی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به سایر گروه‌های تیماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. در مورد ناهنجاری‌های اسپرم، تفاوت معنی‌داری زمان‌های طولانی ذخیره‌سازی اسپرم قوچ توصیه می‌شود. بین تیمارها در تمامی زمان‌های موردبررسی مشاهده نگردید. نتایج این مطالعه بیانگر این است که استفاده از غلظت ۲۵ میکرومولار کورکومین تا حدودی می‌تواند در زمان‌های اولیه ذخیره‌سازی منجر به بهبود کیفیت اسپرم اپیدیدیمی قوچ شود، اما در زمان‌های طولانی‌تر اثرگذاری خود را از دست می‌دهد. از این‌رو، استفاده از روش‌های نانوفناوری جهت ارتقای اثرگذاری کورکومین به‌ویژه در زمان‌های طولانی ذخیره‌سازی اسپرم قوچ توصیه می‌شود.

استناد: فرهادی، رامین؛ فرشاد، عباس؛ رستم‌زاده، جلال و نجفی، ابوذر (۱۴۰۳). اثرات افزودن سطوح مختلف کورکومین به رقیق‌کننده بر کیفیت اسپرم اپیدیدمی قوچ نژاد شال طی نگهداری در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد. *نشریه تولیدات دامی*، ۲۶ (۲)، ۲۱۷-۲۰۷.

DOI: https://doi.org/10.22059/jap.2024.368364.623771

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

CC BY NC

۱. مقدمه

تلقیح مصنوعی می‌تواند نقش مهمی در پیشرفت ژنتیکی ایفا کرده و سبب افزایش بازده تولیدمثلی شود. استفاده از این تکنیک می‌تواند موجب تسریع آزمون نتاج، کنترل بیماری‌های مقاربتی و واردات دام‌های زنده از کشورهای خارجی بدون صرف هزینه‌های سنگین حمل و نقل و قرنطینه‌کردن آن‌ها، استفاده از دام‌های نر برتر بدون نیاز به خرید و نگهداری آن‌ها شود (Vicente, 2009). به‌منظور تحقق بخشیدن به بسیاری از این مزایای بالقوه تلقیح مصنوعی، ذخیره‌سازی منی برای بلندمدت یک امر ضروری محسوب می‌شود. اما در طول فرآوری اسپرم و کاهش دما، تنش‌های فیزیکی و شیمیایی به‌وجود می‌آید که موجب کاهش کیفیت، زنده‌مانی، تحرک و توان باروری اسپرم‌ها می‌شود، هردو این تنش‌ها با تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد (ROS)[1] و پراکسیداسیون فسفولیپیدها در غشای سلول اسپرم همراه است (Chatterjee *et al*., 2001). اسپرم قوچ دارای نسبت کلسترول به فسفولیپید درون غشایی پایینی در مقایسه با گونه‌های حیوانی دیگر است. از این‌رو حساسیت به سرما در اسپرم قوچ نسبت به سایرگونه‌ها بیش‌تر است (Salamon & Maxwell., 1995). تولید ROS به‌وسیله اسپرم یک فرایند طبیعی است، اما بالاتر از سطح فیزیولوژیک آن باعث آسیب سلولی و ناباروری جنس نر می‌شود. اسپرم‌ها از سازوکار آنتی‌اکسیدانی اعم از آنزیمی و غیرآنزیمی برخوردار بوده اما مقدار آن کافی نبوده و برای فرآوری اسپرم نیاز به افزودن آنتی اکسیدان‌هایی با منشأ خارجی می‌باشد (Bansal & Bilaspuri., 2011). کورکومین یک ترکیب پلی‌فنل است که دارای سه آنالوگ مهم کورکومین، دمتوکسی کورکومین و بیس دمتوکسی کورکومین است که در مجموع کورکومینوئیدها نامیده می‌شوند که یک ماده آنتی‌اکسیدان طبیعی قوی محسوب می‌شوند. علاوه بر این، خاصیت ضد آپوپتوز، ضد التهاب، ضد سمی و ضد سرطان این ماده نیز به اثبات رسیده است (Zhang *et al*., 2013). توان آنتی‌اکسیدانی کورکومین با ویتامین‌های E و C و هم‌چنین آنزیم سوپراکسید دسموتاز یکسان می‌باشد (Marianna *et al*., 2002). اما با این وجود کورکومین به‌صورت بلور نامحلول در آب است و در حلال‌هایی مانند اتانول، استن و متانول قابل‌حل می‌باشد (Tsai *et al*., 2011). هم‌چنین مشخص شده است که کورکومین زیست‌فراهمی کم، متابولیسم سریع و نیمه عمر کوتاهی داشته و قابلیت جذب غشایی پایینی دارد (Zaki *et al*., 2020).

هدف این پژوهش بررسی اثرات استفاده از کورکومین بعنوان ترکیب آنتی اکسیدانی بر کیفیت اسپرم اپیدیدیمی قوچ نژاد شال در دمای پنج درجه سانتی‌گراد و در زمان‌های مختلف سردسازی بود.

۲. پیشینه پژوهش

کورکومین [۱و ۷ بیس (۴ هیدروکسی- ۳- متوکسی فنیل)- ۱ و ۶- هپتادین-۳ و ۵- دیون] یک فیتوشیمیایی اصلی است که معمولاً در ریشه زردچوبه یافت می‌شود و رنگ اصلی زرد در زردچوبه مربوط به همین ماده است (Aggarwal *et al*., 2007). کورکومین دارای ساختار فنوکسی و پیوندهای دوگانه کونژوگه می‌باشد که می‌تواند رادیکال‌های آزاد مانند رادیکال هیدروکسیل را به‌خوبی به دام انداخته و حذف نماید. علاوه بر حذف مستقیم رادیکال‌های آزاد، این ماده می‌تواند فعالیت آنزیم‌های داخل سلولی مانند سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز که نقش آنتی‌اکسیدانی دارند را افزایش دهد. هم‌چنین با کمپلکس‌نمودن برخی از فلزات داخل سلولی مانند آهن و مس که نقش اکسیداتیو در داخل سلول دارند می‌تواند نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا کند (Zhang *et al*., 2013). هم‌چنین مشخص شده است که این

1. Reactive oxygen species

ترکیب به علت خاصیت ضد سرمایی بسیار کارآمد، می‌تواند به‌عنوان یک محافظت‌کننده در برابر شوک سرمایی و آسیب اکسیداتیو عمل کند که به‌تازگی موردتوجه پژوهش‌گران قرار گرفته است (Bucak *et al*., 2010). با توجه به وضعیت ساختاری، کورکومین دارای دو حلقه فنولی در مولکول خود است، درحالی‌که معروف‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند BHT و BHA تنها یک حلقه فنولی در ساختمان خود دارند و از این‌رو کورکومین می‌تواند ترکیب آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نسبت به آن‌ها محسوب شود. از طرف دیگر کورکومین علاوه بر حلقه فنولی، یک بخش بتا دی‌کتونی در ساختمان خود دارد که این ویژگی منحصربه‌فرد بوده و توان آنتی‌اکسیدان آن را دو چندان می‌کند (Cleary, 2004). پژوهش‌ها نشان داده است که کورکومینوئیدها رادیکال‌های آزاد و و انواع اکسیژن فعال (ROS) نظیر رادیکال‌های هیدروکسیل، سوپر اکسید، پروکسیل و پروکسی نیتریت که محصولات آن‌ها به‌طور مستقیم در القای اکسیداسیون نقش دارند را خنثی و مهار کنند. هم‌چنین به‌طور مؤثر رادیکال‌های آزاد پایدار ۱ و ۱- دی فنیل ۲- پیکریل- هیدرازین (DPPH) را خنثی می‌کنند و این واکنش اغلب برای مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ترکیبات مختلف استفاده می‌شود (Jayaprakasha *et al*., 2006). استفاده از کورکومین در فرآوری اسپرم انسان (Santonastaso *et al*., 2021)، موش (Katarzyna *et al*., 2014)، گاو (Bucak *et al*. 2012) مثبت گزارش شده است.

۳. روش شناسی پژوهش

مطالعه حاضر در آزمایشگاه فیزیولوژی گروه علوم دام و طیور پردیس ابوریحان دانشگاه تهران در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و شش تکرار انجام شد. در این مطالعه بافت‌های بیضه قوچ نژاد شال از کشتارگاه تهیه و در فلاکس مخصوص همراه یخ در کم‌تر از یک ساعت به آزمایشگاه انتقال داده شد. بعد از برش بخش دم اپیدیدیم، اسپرم‌ها استخراج و موردارزیابی اولیه قرار گرفت که نمونه‌های با اسپرم بالای ۷۰ درصد تحرک پیش‌رونده و درصد ناهنجاری کم‌تر از ۱۰ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به رقیق‌کننده اضافه شدند (Najafi *et al*., 2023). در این آزمایش از رقیق‌کننده بر پایه تریس- زرده تخم مرغ (تریس ۲۷/۱ گرم در لیتر، اسید سیتریک ۱۴ گرم در لیتر، فروکتوز ۱۰ گرم در لیتر، زرده تخم‌مرغ ۲۰ درصد، گلیسرول هفت درصد) استفاده شد (Purdy, 2006). غلظت‌های مختلف کورکومین (ساخت شرکت سیگما- آلدریچ) شامل صفر، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به رقیق‌کننده اضافه گردید. گروه‌های تیماری در فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری در داخل بشر حاوی آب هم‌دما شده به دمای پنج درجه سانتی‌گراد منتقل شده و طی حدود دو ساعت در این دما تثبیت شدند. سپس در زمان‌های شش، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تثبیت تیمارها در دمای پنج درجه سانتی‌گراد، فراسنجه‌های جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی، یکپارچگی غشایی و درصد ناهنجاری‌های اسپرم ارزیابی گردید.

۳. ۱. فراسنجه‌های جنبایی کل و پیش‌رونده اسپرم

فراسنجه‌های جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده به‌وسیله سامانه CASA[1] (Vidio Test Sperm 3.1, jepan مدل) ارزیابی شد. روش کار بدین صورت بود که ابتدا پنج میکرولیتر نمونه رقیق‌کننده حاوی اسپرم را در روی لام گذاشته و با لامل پوشش داده شد و سپس به‌وسیله سامانه CASA تعداد ۲۰۰ سلول اسپرم به‌صورت کاملاً تصادفی در حداقل ۱۰ فیلد بررسی گردید (Safa *et al*., 2016).

1. Computer Assisted Sperm Analyzer

۳. ۲. درصد زنده‌مانی اسپرم

درصد زنده‌مانی با استفاده از روش رنگ ائوزین- نیگروزین (۱۶/۷ گرم ائوزین، ۱۰۰ گرم نیگروزین، ۲۹ گرم بافر سیترات در یک لیتر آب دوبار تقطیر) ارزیابی شد. برای این کار مقدار پنج میکرولیتر نمونه اسپرم با پنج میکرولیتر رنگ ائوزین- نیگروزین مخلوط و گسترش تهیه گردید. پس از خشک شدن لام، روی میکروسکوپ (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) با بزرگنمایی۴۰۰× تعداد ۲۰۰ سلول اسپرم به‌طور تصادفی در حداقل ۱۰ فیلد شمارش شد و اسپرم‌هایی که رنگ به خود جذب کرده بودند مرده و اسپرم‌هایی که رنگ به خود جذب نکرده بودند زنده در نظر گرفته شدند (فرهادی و همکاران، ۱۳۹۴).

۳. ۳. یکپارچگی غشای اسپرم

جهت ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرم از تست HOST (نه گرم فروکتوز، ۴/۹ گرم سیترات‌سدیم در یک لیتر آب دو بار تقطیر با اسمولاریته ۱۰۰ میلی‌اسمول) استفاده شد. برای انجام این تست ابتدا ۵۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم به‌آرامی با ۵۰۰ میکرولیتر محلول هیپواسموتیک مخلوط شده و به‌مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) انکوبه شد. مقدار پنج میکرولیتر از نمونه مخلوط‌شده، روی لام از پیش هم‌دما شده قرار داده و با لامل پوشانده شد. سپس لام روی میکروسکوپ (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) قرار داده شد. تعداد ۲۰۰ اسپرم با بزرگنمایی۴۰۰× در حداقل۱۰ فیلد شمارش شد که اسپرم‌های با دم متورم و تاب خورده به‌عنوان اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم در نظر گرفته شدند (Daghigh Kia *et al*., 2016).

۳. ۴. درصد ناهنجاری‌های اسپرم

برای ارزیابی درصد ناهنجاری‌های اسپرم از محلول هانکوک استفاده شد. این محلول حاوی ۶۲/۵ میلی‌لیتر فرمالین ۳۷ درصد، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول سالین، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر بود. برای ارزیابی درصد ناهنجاری اسپرم‌ها ۳۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم با ۳۰۰ میکرولیتر محلول هانکوک مخلوط شد. سپس پنج میکرولیتر از این مخلوط روی لام قرار گرفته و با بزرگنمایی ۴۰۰× میکروسکوپ (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) تعداد ۲۰۰ سلول اسپرم از نظر درصد ناهنجاری‌ها (ناهنجاری‌های آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم) در حداقل ۱۰ فیلد بررسی و شمارش شد (Najafi *et al*., 2023).

آنالیز آماری

داده‌های حاصل با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS (نسخه۹/۲) تجزیه و میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح معنی‌داری پنج درصد مقایسه شدند.

۴. یافته‌های پژوهش و بحث

نتایج اثر استفاده از کورکومین بر جنبایی کل اسپرم در جدول (۱) نشان داده شده است. افزودن ۲۵ میکرومولار کورکومین به رقیق‌کننده نسبت به سایر سطوح به‌طور معنی‌داری موجب بهبود جنبایی کل اسپرم‌ها تنها در زمان شش شده، اما در سایر زمان‌های موردارزیابی اثر معنی‌داری مشاهده نگردید.

جدول ۱. اثر سطوح مختلف کورکومین بر درصد جنبایی کل اسپرم اپیدیدیمی قوچ طی نگهداری در دمای پنج درجه سانتی‌گراد

کورکومین (میکرومول)/ زمان‌ها (ساعت)	شش	۱۲	۲٤	٤۸
صفر	۶۲/۰۰^{b}	۵۸/۷۹^{a}	۵۳/۲۰^{a}	۴۵/۵۸^{a}
۱۰	۶۲/۱۳^{b}	۵۹/۹۵^{a}	۵۳/۰۵^{a}	۴۷/۵۵^{a}
۲۵	۶۸/۰۵^{a}	۶۲/۳۴^{a}	۵۶/۰۸^{a}	۴۸/۰۰^{a}
۵۰	۶۱/۶۱^{b}	۶۱/۱۶^{a}	۵۴/۱۰^{a}	۴۱/۸۳^{b}
SEM	۴/۲۷	۳/۶۵	۳/۹۲	۱/۹۴

تفاوت اعداد در هر ستون، با حروف نامشابه دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

نتایج حاصل از اثر استفاده از کورکومین بر جنبایی پیش‌رونده در جدول (۲) نشان داده شده است. رقیق‌کننده حاوی ۲۵ میکرومولار کورکومین توانست به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر رقیق‌کننده‌ها در زمان‌های شش و ۲۴ جنبایی پیش‌رونده را بهبود دهد (P<۰/۰۵). در زمان ۱۲ هر سه غلظت کورکومین نسبت به گروه کنترل تأثیر معنی‌داری بر جنبایی پیش‌رونده اسپرم قوچ داشت و در زمان ۴۸ هیچ‌کدام از تیمارها موجب بهبود جنبایی پیش‌رونده اسپرم نشدند.

جدول ۲. اثر سطوح مختلف کورکومین بر درصد جنبایی پیش‌رونده اسپرم اپیدیدیمی قوچ طی نگهداری در دمای پنج درجه سانتی‌گراد

کورکومین (میکرومول)/ زمان‌ها (ساعت)	شش	۱۲	۲٤	٤۸
صفر	۴۶/۸۶^{b}	۳۸/۶۵^{b}	۳۵/۷۳^{ab}	۳۱/۳۰^{a}
۱۰	۴۸/۲۸^{b}	۴۳/۳۴^{a}	۳۸/۵۳^{ab}	۳۲/۴۹^{a}
۲۵	۵۲/۴۰^{a}	۴۵/۰۸^{a}	۴۱/۷۵^{a}	۳۳/۸۹^{a}
۵۰	۴۷/۷۸^{b}	۴۳/۲۰^{a}	۳۶/۲۴^{b}	۳۲/۶۰^{b}
SEM	۲/۱۴	۲/۹۳	۴/۲۶	۲/۸۳

تفاوت اعداد در هر ستون، با حروف نامشابه دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

نتایج اثر افزودن سطوح مختلف کورکومین بر زنده‌مانی اسپرم اپیدیدمی قوچ در زمان‌های مختلف در جدول (۳) نشان داده شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که در تنها در زمان شش رقیق‌کننده حاوی ۲۵ میکرومولار کورکومین توانست به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر رقیق‌کننده‌ها زنده‌مانی اسپرم‌های اپیدیدمی قوچ را بهبود دهد (P<۰/۰۵). در سایر زمان‌ها تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نگردید.

جدول ۳. اثر سطوح مختلف کورکومین بر درصد زنده‌مانی اسپرم اپیدیدمی قوچ طی نگهداری در دمای پنج درجه سانتی‌گراد

کورکومین (میکرومول)/ زمان‌ها (ساعت)	شش	۱۲	۲٤	٤۸
صفر	۶۹/۵۵^{b}	۶۴/۷۵^{a}	۶۰/۲۱^{a}	۴۹/۵۰^{a}
۱۰	۶۸/۷۱^{b}	۶۵/۹۴^{a}	۶۱/۲۹^{a}	۴۹/۷۸^{a}
۲۵	۷۵/۴۶^{a}	۶۶/۶۲^{a}	۶۳/۵۴^{a}	۵۰/۳۷^{a}
۵۰	۶۸/۴۵^{b}	۶۵/۶۳^{a}	۶۰/۶۰^{a}	۴۹/۰۵^{a}
SEM	۳/۵۰	۲/۹۰	۳/۳۳	۱/۰۸

تفاوت اعداد در هر ستون، با حروف نامشابه دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

نتایج حاصل از اثر استفاده از کورکومین بر یکپارچگی غشا در جدول (۴) نشان داده شده است. افزودن ۲۵ میکرومولار کورکومین به رقیق‌کننده توانست به‌طور معنی‌داری یکپارچگی غشای اسپرم را در زمان شش نسبت به سایر سطوح بهبود دهد ولی در سایر زمان‌ها بین تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ٤. اثر سطوح مختلف کورکومین بر یکپارچگی غشای اسپرم اپیدیدیمی قوچ طی نگهداری در دمای پنج درجه سانتی‌گراد

کورکومین (میکرومول)/ زمان‌ها (ساعت)	شش	۱۲	۲٤	٤۸
صفر	۶۶/۲۱^{b}	۶۲/۰۲^{a}	۵۷/۳۲^{a}	۴۶/۷۵^{a}
۱۰	۶۵/۵۶^{b}	۶۲/۸۳^{a}	۵۸/۲۵^{a}	۴۷/۲۸^{a}
۲۵	۷۴/۵۴^{a}	۶۵/۲۷^{a}	۶۰/۰۱^{a}	۴۷/۴۴^{a}
۵۰	۶۵/۲۷^{b}	۶۲/۷۵^{a}	۵۷/۷۰^{a}	۴۶/۰۲^{a}
SEM	۳/۸۳	۳/۱۱	۳/۶۶	۱/۵۶

تفاوت اعداد در هر ستون، با حروف نامشابه دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

نتایج اثر استفاده از سطوح مختلف کورکومین بر درصد ناهنجاری‌های اسپرم در تمامی زمان‌های موردبررسی بین تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۵).

جدول ۵. اثر سطوح مختلف کورکومین بر ناهنجاری‌های اسپرم اپیدیدیمی قوچ طی نگهداری در دمای دمای پنج درجه سانتی‌گراد

کورکومین (میکرومول)/ زمان‌ها (ساعت)	شش	۱۲	۲٤	٤۸
صفر	۱۴/۰۹^{a}	۱۴/۵۰^{a}	۱۵/۷۳^{a}	۱۷/۵۳^{a}
۱۰	۱۴/۱۰^{a}	۱۴/۲۴^{a}	۱۶/۰۹^{a}	۱۷/۶۹^{a}
۲۵	۱۴/۰۴^{a}	۱۴/۰۴^{a}	۱۵/۹۲^{a}	۱۷/۲۴^{a}
۵۰	۱۴/۰۷^{a}	۱۴/۱۶^{a}	۱۶/۰۰^{a}	۱۷/۵۱^{a}
SEM	۰/۵۰	۰/۶۳	۰/۶۱	۰/۲۱

تفاوت اعداد در هر ستون، با حروف نامشابه دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از ۲۵ میکرومولار کورکومین تنها در مراحل ابتدایی ذخیره‌سازی اسپرم در دمای پنج درجه سانتی‌گراد (شش و تا حدودی ۱۲) توانست کیفیت اسپرم اپیدیدمی قوچ نژاد شال را بهبود دهد و در زمان‌های دیگر تقریباً اثرات خود را از دست داد. به‌نظر می‌رسد کورکومین علاوه بر حلالیت پایین در محلول‌های آبی، نسبت به دماهای پایین نیز حساس باشد. هم‌چنین از این مطالعه می‌توان دریافت که کورکومین در طی گذشت زمان درجه اثرگذاری خود را از دست داده و این مسئله می‌تواند استفاده آن را در فرآوری اسپرم به‌ویژه ذخیره‌سازی مایع اسپرم را با چالش روبه‌رو کند. به‌نظر می‌رسد دلیل این مسئله داشتن زیست‌فراهمی پایین، حلالیت پایین در محلول‌های آبی، متابولیسم سریع و نیمه‌عمر کوتاه کوروکومین باشد (Zaki *et al*., 2020). تاکنون آزمایشی روی تأثیر افزودن کورکومین به رقیق‌کننده اسپرم در دمای پنج درجه سانتی‌گراد انجام نشده است، اما در مورد افزودن کورکومین در رقیق‌کننده اسپرم منجمدشده چند آزمایش انجام شده و موفقیت‌آمیز گزارش شده است. در یک آزمایشی افزودن ۰/۵ میلی‌مولار کورکومین به رقیق‌کننده اسپرم گاو بعد از انجماد/یخ‌گشایی منجر به کاهش درصد ناهنجاری کل اسپرم در مقایسه با گروه شاهد شد، اما این سطح بر روی فراسنجه‌های دیگر مانند لیپید پراکسیداسیون و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی محیط اسپرم تأثیر

معنی‌داری نداشت (Bucak *et al*., 2012). در یک آزمایش مقایسه‌ای کورکومین با اینوزیتول و کارنیتین، افزودن ۲/۵ میلی‌مولار کورکومین به رقیق‌کننده اسپرم بز توانست به‌طور معنی‌داری فراسنجه جنبایی پیش‌رونده را نسبت به سایرگروه‌ها بهبود دهد، هرچند در مورد سایر فراسنجه‌های تحرکی تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. هم‌چنین در همین آزمایش افزودن سطوح ۲/۵، پنج و ۱۰ میلی‌مولار کورکومین توانست درصد ناهنجاری کل و سلامت غشای آکروزوم اسپرم را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد، اما تأثیر معنی‌داری بر کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدهید و حفظ فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نداشت (Bucak *et al*., 2010). در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که خوراندن ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کورکومین می‌تواند اثر محافظتی در برابر آسیب DNA، جلوگیری از آپوپتوز سلول اسپرم رت و توسعه بافت بیضه داشته باشد (Omar *et al*., 2017). در یک آزمایش دیگر، افزودن ۲۵ و۵۰ میکرومولار کورکومین به رقیق‌کننده اسپرم گاو توانست فراسنجه‌های تحرکی، زنده‌مانی، فعالیت میتوکندری، پراکسیداسیون لیپیدی و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی محیط اسپرم را بهبود بخشد (Tvrda *et al*., 2016). افزودن ۱/۵ میلی‌مولار کورکومین به رقیق‌کننده اسپرم گاومیش هم توانست بعد از انجماد/یخ‌گشایی فراسنجه‌های تحرکی و یکپارچگی DNA، زنده‌مانی، سلامت آکروزوم، یکپارچگی غشای اسپرم گاومیش را نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بهبود دهد (Shah *et al*., 2017). در اغلب تحقیقات تأثیرات آنتی‌اکسیدانی کورکومین قوی گزارش شده است، به‌طوری‌که براساس گزارش‌های علمی اثرات آنتی‌اکسیدانی آن ۳۰۰ برابر بیش‌تر از ویتامین E معرفی شده است (Sahebkar, 2016). افزودن کورکومین به رقیق‌کننده حاوی اسپرم بز آنقوره توانست تحرک و زنده‌مانی را به‌طور معنی‌داری بهبود دهد و از طرف دیگر موجب کاهش بروز فرایند LPO گردید (Bukak *et al*., 2010). در پژوهش دیگری، افزودن ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کورکومین به جیره پایه خروس‌ها از ۴۹–۶۱ هفتگی موجب افزایش کیفیت اسپرم خروس شد و توانست به‌طور معنی‌داری جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی، عملکرد غشایی اسپرم را بهبود بخشد (جلیلی و همکاران، ۱۳۹۸). در آزمایش تأثیر کورکومین بر کیفیت اسپرم منجمد انسان نیز مشخص شد که افزودن ۱۰ میکرومولار کورکومین به‌طور معنی‌داری جنبایی پیش‌رونده، تراکم کروماتین و یکپارچگی DNA را پس از فرایند انجماد/یخ‌گشایی ارتقا بخشید (Karakus *et al*., 2021). در آزمایشی با هدف سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی کورکومین، مشخص شد که کورکومین می‌تواند فعالیت چندین آنزیم دفاعی مانند SOD و GSH را در پلاسمای منی با تداوم سیگنالینگ ردوکس میتوکندری عملکردهای تنفسی را بهبود بخشد (Raza *et al*., 2008). هم‌چنین با افزایش سنتز گلوتاتیون به‌صورت غیرمستقیم به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل کرده که می‌تواند فعالیت مولکول‌های اکسیداتیو و التهابی را مهار کند (Hatcher *et al*., 2012). با این‌وجود به‌دلیل متفاوت‌بودن روش فرآوری و گونه حیوانی نمی‌توان نتایج آزمایش حاضر را با نتایج آزمایش‌های اشاره‌شده مقایسه کرد. در آزمایشی که انجام شد هدف اصلی بررسی اثرگذاری کورکومین در طول زمان‌های ذخیره‌سازی که بود که نتایج کاملاً گویای این بود که اثرات آنتی‌اکسیدانی این ماده با گذشت زمان در دمای سردسازی اسپرم (پنج درجه سانتی‌گراد) کاهش می‌یابد که پیشنهاد می‌شود از فناوری‌های نانو جهت حل این مسئله بهره گرفت و روش‌های متعددی جهت حل این مسئله در صنعت داروسازی و صنایع غذایی به‌کار گرفته شده و نتایج خوبی هم حاصل شده است (Amjadi *et al*., 2018). استفاده از کورکومین به‌دلیل پایین‌بودن حلالیت و زیست‌فراهمی در محلول‌های آبی در استفاده از این ماده محدودیت ایجاد شده است (Tsai *et al*., 2011). به‌عنوان مثال برای غلبه بر این مشکلات، بهره‌گیری از روش نانولیپوزوم برای تهیه نانوذرات کورکومین می‌تواند مفید واقع شود که این روش حلالیت کورکومین را در محلول‌های آبی برطرف کرده و هم‌چنین موجب زیست‌فراهمی بالا، نیمه‌عمر بالا، قابلیت جذب بالا، متابولیسم بهینه مولکول‌های کورکومین شده و در نتیجه ذرات کورکومین به‌صورت هدف‌دار به سلول‌های هدف معرفی می‌شود. ازآنجایی‌که لیپوزوم‌ها ساختار مشابهی با غشای

سلول دارند و به‌دلیل وجود فسفولیپیدها وقتی در محیط آبی قرار می‌گیرند به‌صورت کروی شکل درآمده و می‌تواند ترکیبات آب‌گریز و آب‌دوست را حمل کنند. این لیپوزوم‌ها در محیط اطراف سلول‌های هدف با سازوکارهایی مانند چسبیدن به غشای سلول هدف و همجوشی با غشا، یکی‌شدن غشای لیپوزوم با غشای سلول موجب انتقال ماده حمل شده در سطح غشا و داخل سلول (با پدیده آندوسیتوز) می‌شود و از این‌رو با ورود ذرات مواد به داخل اندامک‌های مختلف سلول می‌تواند تأثیرات خود را انجام دهند (نظری وانانی و همکاران، ۱۳۹۶).

۵. نتیجه‌گیری کلی

براساس نتایج حاصل، افزودن ۲۵ میکرومولار کورکومین می‌تواند تنها در زمان‌های اولیه ذخیره‌سازی (شش و ۱۲ ساعت) موجب بهبود فراسنجه‌های کیفی مورد ارزیابی اسپرم اپیدیدمی قوچ در دمای پنج درجه سانتی‌گراد می‌شود، اما در طولانی مدت اثرگذاری خود را از دست می‌دهد. بنابراین استفاده از سطح ۲۵ میکرومولار کورکومین در رقیق‌کننده اسپرم قوچ توصیه می‌شود.

۶. تشکر و قدردانی

از مجموعه مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و گروه علوم دامی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تشکر و قدردانی می‌گردد.

۷. تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

۸. منابع

جلیلی، فایزه؛ زارع شحنه، احمد؛ زین‌الدینی، سعید؛ یوسفی، علیرضا و کاظمی‌زاده، امین (۱۳۹۸). تأثیر کورکومین بر فراسنجه‌های کیفی و باروری اسپرم خروس‌های مادرگوشتی پس از یخ‌گشایی. مجله علوم دامی ایران. ۴ (۵۰)، ۲۹۵-۳۰۶.

فرهادی، رامین؛ دقیق‌کیا، حسین؛ حسین‌خانی، علی؛ قاسمی‌پناهی، بابک؛ دهقان، غلامرضا و اشرفی، ایرج (۱۳۹۴). اثر عصاره اتانولی گیاه مرزنجوش بر فراسنجه‌های کیفی و غلظت مالون‌دی‌آلدهید اسپرم منجمد یخ‌گشایی‌شده گاو هلشتاین. پژوهش‌های علوم دامی. ۲۵ (۱)، ۱-۱۱.

نظری وانانی، راضیه؛ ستاراحمدی، نغمه و هلی، حسین (۱۳۹۶). روش‌های نانوفناورانه برای افزایش فراهمی زیستی کورکومین: یک مطالعه مروری. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا. ۷ (۲)، ۱۵۲- ۱۶۱.

References

Aggarwal, BB., Sundaram, C., Malani, N., & Ichikawa, H. (2007). Curcumin: the Indian solid gold. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 595, 1-75.

Amjadi, S., Ghorbani, M., Hamishehkar, H., & Roufegarinejad, L. (2018). Improvement in the stability of betanin by liposomal nanocarriers: Its application in gummy candy as a food model. *Food Chemistry*, 256, 156-162.

Bailey, J.L., Bilodeau, J.F., & Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *Andrology*, 21, 1-7.

Bansal, A.K., & Bilaspuri, G.S. (2011). Impacts of oxidative stress and Antioxidants one semen functions. *Veterinary Medicine international*, 686137, 1-7.

Bucak, M.N., Sarıozkan, S., Tuncer, P.B., Sakin, F., Ateşşahin, A., Kulaksız, R., & Cevik, M. (2010). The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancryrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*, 89(1), 24-30.

Bucak, M.N., Başpınar, N., Tuncer, P.B., Coyan, K., Sarıozkan, S., & Akalın, P.P. (2012). Effectsof curcumin and dithioerythritol onfrozen/thawed bovine semen. *Andrologia*, 44(s1), 102-109.

Chatterjee, S., Lamirande, E., & Gagnon, C. (2001). Cryopreservation alters membrane*-e sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Molecular Reproduction Development*, 60, 498-506.

Cleary, K. (2004). Effects of oxygen and turmeric on the formulation of oxidative aldehyde in freshpack dill pickles. A Thesis submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University.

Daghigh Kia, H., Farhadi, R., Ashrafi, I., & Mahdipour, M. (2016). Anti-oxidative Effects of Ethanol Extract of Origanum vulgare on Kinetics, Microscopic and Oxidative Parameters of Cryopreserved Holstein Bull Spermatozoa. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 6(4), 783-789.

Farhadi, R., Daghigh kia, H., Hosenkhani, A., Ghasemi Panahi, B., Dehghan, G., & Ashrafi, I. (2015). Effect of Origanum vulgare ethanol extract on quality parameters and malondialdehyde concentration of cryopreserved Holstein bull sperm. *Journal of Animal Science Research*, 5(1), 1-11. (In Persian).

Hatcher, H.C., Torti, F.M., & Torti, S.V. (2012). Curcumin, oxidative stress, and cancer therapy. *Oxidative stress in cancer biology and therapy*, 233-256.

Jalili, F., Zare-Shahneh, A., Zeinoaldini, S., Yousefi, A.R., & Kazemizadeh, A. (2019). The effect of curcumin on frozen-thawed sperm quality and fertility of broiler breeder roosters. *Iranian Journal of Animal Science*, 50, 4, 295-306. (In Persian).

Jayaprakasha, G.K., Jaganmohan, L.G., & Sakariah, K.K. (2006). Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chemistry*, 98(4), 720-724.

Karakus, N., Kuran, B., & Solakoglu, S. (2021). Effect of curcumin on sperm parameters after the cryopreservation. *Journal of obstetrics and gynecology and reproductive biology*, 267, 161-166.

Katarzyna, G., Agnieszka, B., Marta, S.P., Marta, K., Gabriela, S., & Józefa, S. (2014). Curcumin influences semen quality parameters and reverses the di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)-induced testicular damage in mice. *Pharmacology Reproduction*, 66 (5), 782-787.

Makker, K., Agarwal, A., & Sharma, R. (2009). Oxidative stress and male infertility. *Indian journal Medicine Reserch*, 357-367.

Marianna, S., Filomena, M., Concetta, I., Nicola, C., & Lucia, R. (2002). Protective Effects of Curcumin on the Outcome of Cryopreservation in Human Sperm. *Reproduction Science*, 28 (10), 2895- 2905.

Mocé, E., & Vicente, J.S. (2009). Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Animal Reproduction Science*, 110, 1-24.

Mortimer, D. (1994). Practical Laboratory Andrology. Oxford University Press incorporated. Chapt14, *Semen cryopreservation*, 301-323.

Najafi, A., Mohammadi, H., & Sharifi, S.D. (2023). Enhancing post-thaw quality of ram epididymal sperm by supplementation of rutin in cryopreservation extender. *Scientifc Reports*, 13, 10873, 1-10.

Nazari Vanani, R., Sattarahmady, N., & Heli, H. (2017). Nanotechnological Methods for Increasing the Bioavailability of Curcumin; A Review. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, 7(2), 152-161. (In Persian).

Omar, AH., Farid, A., Maha, N., Rania, F., & Ahmed Rofanda, M.B. (2017). Beneficial effects of curcumin nano-emulsion on spermatogenesis and reproductive performance in male rats under protein deficient diet model: enhancement of sperm motility, conservancy of testicular tissue integrity, cell energy and seminal plasma amino acids content. *Journal of Biomedical Science*, 24(66), 2-14.

Purdy, P.H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63(3), 215-225.

Raza, H., John, A., Brown, E.M., Benedict, S., & Kambal, A. (2008). Alterations in mitochondrial respiratory functions, redox metabolism and apoptosis by oxidant 4-hydroxynonenal and antioxidants curcumin and melatonin in PC12 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 226, 161-168.

Safa, S., Moghaddam, G., Jozani, R.J., DaghighKia, H., & Janmohammadi, H. (2016). Effect of vitamin E andselenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. *Animal Reproduction Science*, 174, 100-106.

Sahebkar, A. (2016). Curcumin downregulates human tumor necrosis factor-alpha levels: a systematic review and meta-analysis ofrandomized controlled trials. *Pharmacology Reserch*, 107, 234-242.

Salamon, S., Maxwell, WMC. (1995). Frozen storage of ram semen I. processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37(3-4), 185-249.

Shah, S.A.H., Andrabi, S.M.H., & Qureshi, I.Z. (2017). Freezability of water buffalo bull (Bubalus bubalis) spermatozoa is improved with the addition of curcumin (diferuoyl methane) in semen extender. *Andrologia*, 49(8), e12713.

Tsai, YM., Chien, CF., Lin, LC., & Tsai, TH. (2011). Curcumin and its nano -formulation: the kinetics of tissue distribution and blood–brain barrier penetration. *International Journal of Pharmaceutics*, 416(1), 33, 1 -8.

Tvrda, E., Tusimova, E., Kovacik, A., Paal, D., Greifova, H., Abdramanov, A., & Lukac, N. (2016). Curcumin has protective and antioxidant properties on bull spermatozoa subjected to induced oxidative stress. *Animal Reproduction Science*, 172, 10-20.

Zaki, S.M., Algaleel, W.A.A., Imam, R.A., Soliman, G.F., & Ghoneim, F.M. (2020). Nano-curcumin versus curcumin inamelioration of deltamethrin-induced hippocampal damage. *Histo chemistry Cell Biology*, 154(2), 157-175.

Zhang, DW., Gao, S.H., & Liu, J.L. (2013). Curcumin and Diabetes: A Systematic Review. *Evid Based Complement Alternative medicine*, 636053, 1-16.