Research on Animal Production, Vol. 15, Issue 4, 2024 p: 107-116

Research Paper

Antioxidant Effects of Curcumin on the Motility and Structural and Biochemical Parameters of Epididymal Sperm in Shal Rams after the Freezing-Thawing Process

Ramin Farhadi[1], Abbas Farshad[2], Jalal Rostamzadeh[3] and Abouzar Najafi[4]

1- Ph.D. Student in Animal Physiology, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, (Corresponding author: rfarhadi81@gmail.com)
2- Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
3- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
4- Assistant Professor, Department of Animal and Poultry Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 10 April, 2024 Accepted: 3 August, 2024

Extended Abstract

Background: Artificial insemination is widely used as a basic technique in livestock and poultry breeding programs. The use of this technique requires sperm freezing, a process during which superior genes are widely expanded and more progeny can be obtained from a male animal with high genetic characteristics. However, sperm undergoes much damage during the cooling and freezing process due to the drop in temperature and cold shock and the subsequent excessive production of free radicals. Lipid peroxidation (LPO) of the sperm plasma membrane occurs due to the production of reactive oxygen species (ROS), which damages the structure of the sperm membrane. The attack of free radicals on intracellular organelles, especially mitochondria and sperm DNA, can often disrupt sperm functions and have a very negative effect on sperm fertility. Therefore, adding antioxidant compounds to sperm thinners is considered essential for freezing and maintaining sperm quality. Curcumin, as a natural antioxidant compound obtained from turmeric root, with the characteristic of having a phenolic ring and a beta-di-ketone part in its structure, is capable of neutralizing free radicals and thus maintaining the quality of sperm cells. This compound has been introduced as a very strong antioxidant compound in most pharmaceutical, medical, and food industry studies, and even in some studies, it has been reported to be the co-base of known antioxidant compounds, such as vitamins E and C, and the superoxide dismutase enzyme. This experiment aimed to investigate the effects of adding different levels of curcumin to diluents on the physical, structural, and biochemical parameters (oxidative stress) of ram epididymal sperm after the freezing-thawing process.

Methods: In this experiment, testicular tissue was collected from a slaughterhouse and transferred to the laboratory. Sperm cells were collected by cutting the tail of the epididymis. Sperm samples were selected after an initial evaluation and diluted in a Tris-egg yolk-based diluent with a concentration of 50 million sperm per milliliter. Different concentrations of curcumin, including 0, 10, 25, and 50 µM, were added to the sperm-containing diluent at 37 °C. Samples containing different concentrations of curcumin in different experimental groups were poured into a 15 ml Falcon and transferred to 5 °C in isothermal water for cooling. After about 2 hours, the samples reached equilibrium at this temperature. Then, the experimental groups were filled and sealed at the same temperature in one-quarter straws at the same temperature. The peyotes were frozen at a distance of 4 cm from the surface of liquid nitrogen by nitrogen vapor for 7 minutes and then immersed in liquid nitrogen. The frozen peyotes were kept in a nitrogen tank until the evaluation (about 1 month). Physical parameters, survival, apoptosis status, plasma membrane health, abnormality percentage, biochemical parameters (including measurement of malondialdehyde (MDA) concentration, activity of superoxide dismutase enzymes (SOD), glutathione peroxidase (GPX), and catalase (CAT), and H_2O_2 concentration assay were evaluated after thawing at 37 °C for 30 seconds. The data obtained from the evaluations were analyzed by SAS software and the GLM procedure at a significance level of 0.05.

Results: The results of kinematic parameters, such as the total kinematics (TM) of the diluent containing 10 and 25 µM curcumin, the progressive kinematics (PM) of the diluent containing all three concentrations of curcumin (10, 25, and 50 µM), and the speed in the mean path (VCL) diluent containing 25 µM of curcumin, showed significantly better performance than the control group ($p < 0.05$). However, no significant differences were observed between the experimental

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.61186/rap.15.4.107]

Copyright ©2024 Farhadi et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 Unported License, which allows users to read, copy, distribute, and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

groups for the other kinematic parameters such as velocity in a curved path (VAP), velocity in a straight path (VSL), transverse head movement (ALH), linearity of kinematics (LIN), and the percentage of straight movement (STR) ($p > 0.05$). The analysis of structural parameters indicated that the diluent containing all three levels of curcumin (10, 25, and 50 µM) significantly increased the percentage of sperm plasma membrane health after thawing. Moreover, the diluent containing 25 µM of curcumin significantly increased the viability percentage compared to the other treatment groups, with better performance. The addition of the same level significantly reduced the percentage of early apoptosis compared to the other groups ($p < 0.05$). No significant differences were observed among the treatments in the percentage of secondary apoptosis, necrosis, and abnormalities ($p > 0.05$). The results of the evaluation of biochemical parameters (oxidative stress) showed that the MDA concentration and CAT enzyme activity did not differ significantly among the experimental groups ($p > 0.05$). In the case of SOD activity, dilutions containing 10 and 25 µM of curcumin, and for GPX, dilutions containing 25 µM of curcumin significantly increased the activity of these antioxidant enzymes ($p < 0.05$). Furthermore, the addition of all three concentrations of curcumin (10, 25, and 50 µM) significantly reduced the H_2O_2 concentration compared to the control group ($p < 0.05$).

Conclusion: The results of this experiment show that the use of curcumin in the freezing diluent can improve the quality of ram epididymal sperm after the freezing-thawing process. Therefore, it is recommended to use a curcumin concentration of 25 µM in the freezing diluent.

Keywords: Antioxidant, Curcumin, Free radical, Freezing–thawing, Sperm

How to Cite This Article: Farhadi, R., Farshad, A., Rostamzadeh, J. & Najafi, A. (2024). Antioxidant Effects of Curcumin on the Motility and Structural and Biochemical Parameters of Epididymal Sperm in Shal Rams after the Freezing-Thawing Process. *Res Anim Prod,* 15(4), 107-116. DOI: 10.61186/rap.15.4.107

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.61186/rap.15.4.107]

مقاله پژوهشی

اثرات آنتی‌اکسیدانی کورکومین بر فراسنجه‌های جنبایی، ساختاری و بیوشیمیایی اسپرم اپیدیدیمی قوچ نژاد شال پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی

رامین فرهادی[۱]، عباس فرشاد[۲]، جلال رستم‌زاده[۳] و ابوذر نجفی[۴]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی فیزیولوژی دام و طیور، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، (نویسنده مسوول: rfarhadi81@gmail.com)
۲- دانشیار ،گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
۴- استادیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۱۳
صفحه: ۱۰۷ تا ۱۱۶

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: در برنامه‌های تولیدمثلی دام و طیور تکنیک تلقیح مصنوعی به‌عنوان یک تکنیک پایه کابرد فراوانی دارد. لازمه استفاده از این تکنیک، انجماد اسپرم می‌باشد. انجماد اسپرم فرآیندی است که طی آن ژن‌های برتر به‌طور وسیعی گسترش یافته و می‌توان از یک دام نر با خصوصیات ژنتیکی بالا به تعداد نتاج بیشتری دست پیدا کرد. اما طی فرآیند سردسازی و انجماد، در اثر افت دما و شوک سرما و به‌دنبال آن تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد، آسیب‌های زیادی به اسپرم وارد می‌شود. پراکسیداسیون لیپیدی غشای پلاسمایی اسپرم (LPO) در نتیجه تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) رخ می‌دهد که به ساختار غشای اسپرم آسیب می‌رساند. حمله رادیکال‌های آزاد به اندامک‌های داخل سلولی به‌خصوص میتوکندری و DNA اسپرم می‌تواند اغلب عملکردهای اسپرم را مختل کرده و تأثیر بسیار منفی بر باروری اسپرم‌ها داشته باشد. از این‌رو افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به رقیق‌کننده اسپرم یک امر ضروری جهت انجماد و حفظ کیفیت اسپرم‌ها محسوب می‌شود. کورکومین به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی طبیعی حاصل از ریشه زردچوبه با ویژگی داشتن حلقه فنلی و بخش بتا دی- کتونی در ساختمان خود قادر به خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و در نتیجه حفظ کیفیت سلول‌های اسپرم می‌باشد. این ترکیب در اغلب مطالعات دارویی، پزشکی و صنایع غذایی به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی معرفی شده و حتی در برخی مطالعات، هم‌پایه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شناخته شده مانند ویتامین‌های E و C و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز گزارش شده است. هدف از این آزمایش، بررسی اثرات افزودن سطوح مختلف کورکومین به رقیق‌کننده‌ها بر فراسنجه‌های جنبایی، ساختاری و بیوشیمیایی (تنش اکسیداتیو) اسپرم اپیدیدمی قوچ پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها: در این آزمایش بافت بیضه از کشتارگاه جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد و با برش دم اپیدیدیم سلول‌های اسپرم جمع‌آوری شد. نمونه‌های اسپرم پس از ارزیابی اولیه انتخاب و در رقیق‌کننده بر پایه تریس- زرده تخم‌مرغ با غلظت ۵۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر رقیق شدند. در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد غلظت‌های مختلف کورکومین شامل ۰، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار به رقیق‌کننده حاوی اسپرم اضافه شد. نمونه‌های حاوی غلظت‌های مختلف کورکومین در گروه‌های آزمایشی مختلف در فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته و در داخل آب هم‌دما به دمای ۵ درجه سانتی‌گراد برای سردسازی منتقل شدند. پس از حدود دو ساعت نمونه‌ها در این دما به تعادل رسیدند. سپس گروه‌های آزمایشی در همان دما در پایوت‌های یک چهارم هم‌دما پر شده و مهر و موم شدند. پایوت‌ها در فاصله چهار سانتی‌متری از سطح ازت مایع به‌وسیله بخار ازت به‌مدت هفت دقیقه منجمد شده و سپس در داخل ازت مایع غوطه‌ور شدند. پایوت‌های منجمد شده تا زمان ارزیابی (حدود یک ماه) در داخل تانک ازت نگهداری شدند. پس از یخ‌گشایی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، فراسنجه‌های جنبایی، زنده‌مانی و وضعیت آپوپتوزیس، سلامت غشای پلاسمایی، درصد ناهنجاری‌ها، فراسنجه‌های بیوشیمیایی شامل سنجش غلظت مالون دی‌آلدهید (MDA)، فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)، کاتالاز (CAT) و سنجش غلظت H_2O_2 ارزیابی شدند. داده‌های حاصل از ارزیابی‌ها توسط نرم‌افزار SAS و رویه GLM در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ واکاوی شدند.

یافته‌ها: نتایج این آزمایش نشان داد که در مورد فراسنجه‌های جنبایی مانند جنبایی کلی (TM) رقیق‌کننده حاوی ۱۰ و ۲۵ میکرومولار کورکومین، جنبایی پیش‌رونده (PM) رقیق‌کننده حاوی هر سه غلظت کورکومین (۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار) و سرعت در مسیر میانگین (VCL) رقیق‌کننده حاوی ۲۵ میکرومولار کورکومین به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد عملکرد بهتری داشتند (P<۰/۰۵). اما برای سایر فراسنجه‌های جنبایی مانند سرعت در مسیر منحنی (VAP)، سرعت در مسیر مستقیم (VSL)، حرکت عرضی سر (ALH)، خطی بودن جنبایی (LIN) و درصد حرکت مستقیم (STR) بین گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵). در بررسی فراسنجه‌های ساختاری مشخص شد که رقیق‌کننده حاوی هر سه سطوح کورکومین (۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار) درصد سلامت غشای پلاسمایی اسپرم را پس از یخ‌گشایی به‌طور معنی‌داری افزایش داده بود و در مورد درصد زنده‌مانی، رقیق‌کننده حاوی ۲۵ میکرومولار کورکومین به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌های تیماری عملکرد بهتری داشت و افزودن همین سطح درصد آپوپتوزیس اولیه را نسبت به سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش داد (p<۰/۰۵). در مورد صفات درصد آپوپتوزیس ثانویه، نکروز و ناهنجاری‌ها در میان تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵). نتایج ارزیابی فراسنجه‌های بیوشیمیایی (تنش اکسیداتیو) نشان داد که غلظت MDA و فعالیت آنزیم CAT در میان گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری ندارد (p>۰/۰۵)، ولی در مورد فعالیت آنزیم SOD رقیق‌کننده حاوی ۱۰ و ۲۵ میکرومولار کورکومین و برای GPX رقیق‌کننده حاوی ۲۵ میکرومولار کورکومین به‌طور معنی‌داری موجب افزایش فعالیت این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد (p<۰/۰۵). همچنین افزودن هر سه غلظت کورکومین (۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار) غلظت H_2O_2 را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش داد (p<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از کورکومین در رقیق‌کننده انجمادی می‌تواند موجب بهبود کیفیت اسپرم اپیدیدمی قوچ پس از فرآیند انجماد- یخ گشایی شود. از این‌رو استفاده از غلظت ۲۵ میکرومولار کورکومین در رقیق‌کننده انجمادی توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، اسپرم، انجماد- یخ‌گشایی، رادیکال‌آزاد، کورکومین

مقدمه

تلقیح مصنوعی یکی از تکنیک‌های مدیریتی مهم برای کنترل فعالیت‌های تولیدمثلی در صنعت دام و طیور است که می‌تواند نقش مهمی در برنامه‌های اصلاح نژادی و افزایش راندمان تولیدمثل داشته باشد. استفاده از این تکنیک می‌تواند موجب تسریع آزمون نتاج، کنترل بیماری‌های مقاربتی، واردات دام‌های زنده از کشورهای خارجی بدون صرف هزینه‌های سنگین حمل و نقل و قرنطینه کردن آنها، استفاده از دام‌های نر برتر بدون نیاز به خرید و نگهداری آنها شود (kumar Patel *et al.*, 2017). برای رسیدن به این اهداف، نگهداری اسپرم به‌صورت سرد شده و منجمد شده از اهمیت بسیاری برخوردار است. انجماد اسپرم ابزار خوبی برای نگهداری بلندمدت اسپرم

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-13]
[DOI: 10.61186/rap.15.4.107]

و مواد ژنتیکی گونه‌های برجسته به‌خصوص گونه‌های در معرض خطر انقراض می‌باشد (Heres *et al*., 2021). همچنین استفاده از اسپرم منجمد شده نقش بسیار مهمی در پیشرفت تکنیک‌های اصلاح نژادی، لقاح آزمایشگاهی (IVF)[1] و تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)[2] دارد (Salamon & Maxwell, 2000). با این‌حال، در اثر کاهش دما تولید رادیکال‌های آزاد به‌شدت افزایش می‌یابد و غشای سلول‌های اسپرم را مورد حمله قرار می‌دهد و در نهایت موجب آسیب‌های متعدد ساختاری و عملکردی اسپرم می‌شوند. مکانیسم آسیب‌های سرمایی ممکن است مربوط به تنش اسمزی، شوک سرمایی، تشکیل بلورهای یخ درون سلولی، تولید بیش از حد ROS باشد (Alevra *et al*., 2022). در حالت طبیعی بین تولید رادیکال‌های آزاد و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم یک تعادل نسبی برقرار است و حتی در مقادیر پایه وجود رادیکال‌های آزاد در عملکردهای اسپرم از جمله ظرفیت‌پذیری، واکنش آکروزوم و اتصال به زونا پلوسیدا نقش بسیار مهمی دارند (Asaduzzaman *et al*., 2021). از طرف دیگر غشای اسپرم قوچ با توجه به داشتن اسیدهای چرب غیر اشباع فراوان و نسبت پایین کلسترول به فسفولیپید به‌شدت در برابر رادیکال‌های آزاد حساس هستند (Kameni *et al*., 2021). همچنین در زمان اسپرم‌زایی و تقسیمات سیتوپلاسمی، اسپرم دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پایینی است و در نتیجه افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی خارجی به رقیق‌کننده اسپرم قوچ ضروری است (Bansal & Bilaspuri, 2011; Santonastaso *et al*., 2021). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که تولید رادیکال‌های آزاد به‌خصوص ROS را کاهش و با خنثی‌سازی از ازدیاد آنها جلوگیری می‌کنند (Sikka, 1996). طی یک دهه اخیر با توجه به بروز مشکلات سمی، ایمنی و هزینه بالای برخی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی سنتتیک، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی مورد توجه محققان زیادی قرار گرفته و در مطالعات مربوط به انجماد اسپرم نیز از این مورد بهره گرفته شده است (Malo *et al*., 2011). کورکومین یا دی فرولیل متان ($C_{12}H_{20}O_6$) یک پلی‌فنول هیدروفوب مشتق شده از ریزوم گیاه زردچوبه است که دارای سه آنالوگ مهم کورکومین، دمتوکسی کورکومین و بیس دمتوکسی کورکومین است که در مجموع کورکومینوئیدها نامیده می‌شوند و خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارند (Joe *et al*., 2004). توان آنتی‌اکسیدانی کورکومین همانند توان آنتی‌اکسیدانی ویتامین‌های E و C و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز گزارش شده است (Miquel *et al*., 2002). علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی، خاصیت ضد آپوپتوز، ضد التهاب، ضد سمی و ضد سرطان این ماده نیز به اثبات رسیده است (Zhang *et al*., 2013). البته با این‌حال، کورکومین حلالیت پایینی در آب داشته و در حلال‌هایی مانند اتانول، استن و متانول قابل حل می‌باشد. همچنین کاربرد این ماده به‌دلیل فراهمی زیستی کم و پایین بودن جذب غشایی به‌دلیل جذب ضعیف و متابولیسم سریع در زمینه‌های پزشکی و داروئی محدود است. از این‌رو استفاده از این ماده در مطالعات داروئی و صنایع غذایی با مشکل مواجه است که برای رفع این مشکل امروزه از روش‌های مختلف نانوکپسولاسیون استفاده می‌کنند (Abdelnour *et al*., 2020; Jayaprakasha *et al*., 2006). هدف این آزمایش بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی کورکومین بر فراسنجه‌های جنبایی، ساختاری و بیوشیمیایی (تنش اکسیداتیو) اسپرم اپیدیدیمی قوچ نژاد شال پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها

آزمایش حاضر در آزمایشگاه فیزیولوژی گروه علوم دام و طیور پردیس ابوریحان دانشگاه تهران و مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد. پودر کورکومین با وزن مولکولی ۳۶۸/۳۸ گرم بر مول (شماره کاتالوگ: C1386) با خلوص ۹۵ درصد ساخت شرکت سیگما- آلدریچ تهیه و در این آزمایش استفاده شد. پودر کورکومین (با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر) با استفاده از دستگاه‌های هموژنایزر (MTOPS, South Korea) و سونیکاتور پروپ (Hielscher, German) و افزودن ۵۰ میکرولیتر توئین ۸۰ محلول شد. در روز آزمایش بافت‌های بیضه قوچ نژاد شال (۲ الی ۳ سال) از کشتارگاه تهیه و کمتر از یک ساعت با فلاسک مخصوص همراه یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. برای تهیه اسپرم در هر تکرار، دم اپیدیدیم بیضه (۱۰ جفت) برش و خرد شده و اسپرم‌ها جمع‌آوری شد. پس از ارزیابی اولیه نمونه‌های اسپرم با جنبایی پیش‌رونده بالای ۷۵ درصد و زنده‌مانی بالای ۸۵ درصد و ناهنجاری کمتر از ۱۰ درصد انتخاب و در رقیق‌کننده موردنظر با غلظت ۵۰ میلیون اسپرم در یک میلی‌لیتر رقیق‌کننده، رقیق شدند (Merati *et al*., 2018; Najafi *et al*., 2023). در این آزمایش از رقیق‌کننده بر پایه تریس- زرده تخم‌مرغ (تریس ۲۷/۱ گرم در لیتر، اسید سیتریک ۱۴ گرم در لیتر، فروکتوز ۱۰ گرم در لیتر، زرده تخم‌مرغ ۲۰ درصد، گلیسرول هفت درصد) برای رقیق‌سازی اسپرم استفاده شد (Najafi *et al*., 2023). غلظت‌های مختلف کورکومین شامل ۰، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار (انتخاب بر اساس آزمایش‌های سطح‌یابی) نیز در همین دما به رقیق‌کننده اضافه شدند. سپس گروه‌های آزمایشی در فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری در آب هم دما به دمای ۵ درجه سانتیگراد منتقل شده و پس از دو ساعت به تعادل رسیدند (Daghigh Kia *et al*., 2016). نمونه‌های سرد شده در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به داخل پایوت‌های یک چهارم کشیده شده و با الکل پلی‌ونیل مهر و موم شدند. پایوت‌ها در فاصله چهار سانتیمتری از سطح ازت مایع با بخار ازت به‌مدت هفت دقیقه منجمد شده و سپس در داخل ازت مایع (دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) غوطه‌ور شدند. پایوت‌ها تا زمان ارزیابی (حدود یک ماه) در داخل تانک ازت (به‌مدت یک ماه) نگهداری شدند (Mehdipour *et al*., 2022).

یخ‌گشایی

برای ارزیابی تمامی فراسنجه‌های کیفی اسپرم، تمامی نمونه‌های منجمد شده (پس از گذشت حدود یک ماه از فرآیند انجماد) در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه یخ‌گشایی شدند (Najafi *et al*., 2023).

1- In vitro Fertilisation

2- Intra-cytoplasmic sperm injection

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.61186/rap.15.4.107]

ارزیابی فراسنجه‌های جنبایی اسپرم

فراسنجه‌های جنبایی شامل جنبایی کل (TM)[1] و پیش‌رونده (PM)[2]، سرعت در مسیر میانگین (VCL)[3]، سرعت در مسیر مستقیم (VSL)[4]، سرعت در مسیر منحنی (VAP)[5]، خطی بودن جنبایی (LIN)[6]، حرکت عرضی سر اسپرم (ALH)[7] و درصد حرکت مستقیم (STR)[8] به‌وسیله سیستم CASA[9] (Video Test Sperm 3.1, jepan مدل) و ضبط تصویر با فریم ریت ۶۰ هرتز، شماره فریم ۳۰ و اندازه سلول پنج پیکسل ارزیابی و ثبت شد. ابتدا ۵ میکرولیتر اسپرم رقیق شده را روی لام قرار داده و با لامل پوشش داده شده و تعداد ۲۰۰ سلول اسپرم به‌صورت کاملاً تصادفی با میکروسکوپ فازکنتراست (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) بررسی شد (Safa *et al*., 2016).

ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرم

برای ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرم از تست هیپوسمتیک یا HOST (۹ گرم فروکتوز، ۴/۹ گرم سیترات سدیم در یک لیتر آب دو بار تقطیر با اسمولاریته ۱۰۰ میلی اسمول) استفاده شد (Najafi *et al*., 2019). برای این‌کار 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 ۵ میکرولیتر از نمونه روی لام از پیش گرم شده قرار داده و با لامل پوشانده شد. تعداد ۲۰۰ سلول اسپرم با بزرگنمایی ×۴۰۰ به‌وسیله میکروسکوپ فازکنتراست (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) شمارش شد. اسپرم‌های با دم متورم و تاب خورده به‌عنوان اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم در نظر گرفته شدند (Daghigh Kia *et al*., 2016).

ارزیابی درصد ناهنجاری‌های اسپرم

برای ارزیابی درصد ناهنجاری‌های اسپرم از محلول هانکوک (۶۲/۵ لیتر فرمالین ۳۷ درصد، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول سالین، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر) استفاده شد (Mehdipour *et al*., 2018). ابتدا مقدار ۳۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم با ۳۰۰ میکرولیتر محلول هانکوک مخلوط شد. بلافاصله ۵ میکرولیتر از این مخلوط روی لام قرار داده و با بزرگنمایی ×۴۰۰ به‌وسیله میکروسکوپ فازکنتراست (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) بررسی شد. برای این هدف، تعداد ۲۰۰ سلول اسپرم از نظر درصد ناهنجاری‌ها (ناهنجاری‌های آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم) به‌صورت کاملا تصادفی بررسی و شمارش شدند (Najafi *et al*., 2020).

ارزیابی زنده‌مانی و وضعیت آپوپتوزیس در اسپرم

درصد زنده‌مانی، وضعیت آپوپتوزیس و اسپرم مرده با کیت انکسین–V (Yasgen Company- Esfahan- Iran) بررسی شد. پس از یخ‌گشایی نمونه‌های منی منجمد، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بافر PBS به نمونه‌ها اضافه شد و پس از سانتریفیوژ (۱۲۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه)، پلت تشکیل شده با ۵۰۰ میکرولیتر بافر PBS مخلوط شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر بافر کلسیم و ۱۰ میکرولیتر انکسین–V اضافه شد و نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در مکانی تاریک در دمای اتاق انکوبه شدند. در ادامه ۱۰ میکرولیتر پروپیدیوم یدید (PI) به نمونه‌ها اضافه و به‌مدت ۱۵ دقیقه مجدد در مکانی تاریک در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس، جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین غشاهای اسپرم توسط دستگاه فلوسایتومتری (BD Facscalibur, USA) با نور سبز و قرمز به‌ترتیب در کانال FL1 (طول موج ۵۳۰ نانومتر) و FL3 (طول موج ۶۱۰ نانومتر) بررسی شد. در ارزیابی همه نمونه‌ها ۱۰ هزار رویداد ثبت شد. نمونه‌های انکسین منفی و PI منفی به‌عنوان اسپرم زنده و نمونه‌های انکسین مثبت و PI منفی به‌عنوان اسپرم زنده اما دچار آپوپتوز اولیه در نظر گرفته شدند. نمونه‌های انکسین مثبت و PI مثبت به‌عنوان اسپرم مرده با آپوپتوز ثانویه و نمونه‌های انکسین منفی و PI مثبت به‌عنوان اسپرم‌های نکروز شده در نظر گرفته شدند. نتایج به‌وسیله نرم‌افزار Flowjo نسخه ۷.۶ (FlowJo, Ashland, OR) تجزیه و تحلیل شد (Mehdipour *et al*., 2022).

ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپید

غلظت مالون دی‌آلدهید (MDA) به‌عنوان شاخص مهم پراکسیداسیون لیپیدی در نمونه‌های منی محسوب می‌شود. ابتدا در یک فالکون مخصوص هر تیمار، یک میلی‌لیتر از نمونه یخ‌گشایی شده (۲۵۰×۱۰^{۶} اسپرم) با یک میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید سرد (TCA) ۲۰ درصد (w/v) مخلوط شد تا پروتئین‌ها رسوب کنند. برای مهار فرآیند لیپید پراکسیداسیون یک میلی‌لیتر محلول بتا هیدروکسی تولوئن (BHT) دو درصد (محلول در اتانول) و یک میلی‌لیتر محلول EDTA (غلظت نهایی یک میلی‌مولار) قبل از مرحله رسوب اضافه شد. فالکون‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند. در ادامه یک میلی‌لیتر از محلول رویی نمونه‌های سانتریفیوژ شده با یک میلی‌لیتر محلول تیوباربیتوریتیک اسید (TBA) ۶۷ درصد (w/v) مخلوط شده (در میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری) و میکروتیوب‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم با ۹۵ درجه سانتی‌گراد (جهت واکنش MDA با TBA و تشکیل کمپلکس صورتی رنگ) حرارت داده شدند. سپس میکروتیوب‌ها داخل یخ سرد شده و به دمای اتاق رسیدند. عدد جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Hermle Labortechnik GmbH, Germany) به‌دست آمده و سپس غلظت MDA (nmol/ml) با معادله بیر– لامبرت (A= εCL) محاسبه شد (Mehdipour *et al*., 2016).

ارزیابی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنزیم SOD طبق پروتکل کیت مخصوص اندازه‌گیری SOD شرکت Navand Lab Kit- Urmia, Iran (کد محصول: NS-15033) ارزیابی شد. ابتدا نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد یخ‌گشایی شد و غلظت اسپرم محیط نمونه‌ها حداقل یک میلیون سلول تنظیم گردید. سپس نمونه‌ها با ۸۰۰ دور در دقیقه به‌مدت دو دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد. سلول‌های ته‌نشین شده را با بافر PBS خنک شستشو داده و مرحله قبلی دوباره تکرار شد. در مرحله بعد، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر لیز کننده (Buffer Lysing) به نمونه‌ها اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت یخ ورتکس شد. سپس سلول‌ها را همراه بافر لیزکننده، سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ دور در

1- Total Motility 2- Progressive Motility 3- Curvilinear Velocity 4- Straight Linear Velocity
5- Average Path Velocity 6– Linearity 7- Amplitude of lateral head displacement 8- Straightness
9- Computer Assisted Sperm Analyzer

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-13]
[DOI: 10.61186/rap.15.4.107]

دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه) کرده و از مایع رویی به‌عنوان نمونه استفاده گردید. مطابق دستورالعمل کیت، نمونه‌ها و معرف‌ها در چاهک شیشه‌ای اضافه و پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و تاریکی، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر (BioTek ELX800, USA) قرائت شد. جهت نرمال‌سازی اعداد جذب نمونه‌ها با اعداد جذب پروتئین کل از کیت اندازه‌گیری سنجش پروتئین شرکت Navand Lab Kit- Urmia, Iran (کد محصول: ۱۵۰۷۲) استفاده شد. فعالیت SOD نمونه‌ها به‌وسیله فرمول استاندارد (SOD = OD Test/ OD Control × 200) محاسبه و به‌دست آمد (Partyka *et al*., 2012).

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) طبق پروتکل کیت مخصوص اندازه‌گیری CAT شرکت Navand Lab Kit-Urmia, Iran (کد محصول: NS-15054) ارزیابی شد. برای سنجش فعالیت این آنزیم از روش Goth (۱۹۹۱) استفاده شد. ابتدا مقدار ۲۰۰ میکرولیتر اسپرم در یک میلی‌لیتر بافر لیز کننده (۶۵ مول پراکسید هیدروژن در یک میلی‌لیتر و ۶۰ میلی‌مول در لیتر پتاسیم فسفات سدیم، pH ۷/۴) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه انکوبه شد. یک واحد CAT در این شرایط، یک مول پراکسید هیدروژن را در دقیقه تجزیه می‌کند. واکنش آنزیمی با استفاده از افزودن یک میلی‌لیتر مولیبدات آمونیوم (۳۲/۴ میلی‌مول در لیتر) خاتمه یافته و کمپلکس زرد مولیبدات و پراکسید هیدروژن در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از میکروپلیت ریدر (BioTek ELX800, USA) اندازه‌گیری شد. اعداد جذب نمونه‌ها با اعداد جذب پروتئین کل نرمال‌سازی و به‌وسیله فرمول استاندارد (y=Ax+B) فعالیت آنزیم کاتالاز محاسبه شد (Goth, 1991).

فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) نیز مطابق دستور کیت شرکت سازنده Navand Lab Kit- Urmia, Iran (کد محصول: NS-15082) ارزیابی شد. این آنزیم یک آنزیم سیتوزولی است که تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن و همچنین تبدیل رادیکال‌های پراکسید به الکل و اکسیژن را کاتالیز می‌کند. ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های اسپرم با ۸۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد. پلت سلول‌ها با مقدار ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده مخلوط شده و با ۹۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. از محلول رویی به‌عنوان نمونه استفاده شد. سپس در چاهک شیشه‌ای مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه با ۴۰ میکرولیتر معرف A و ۱۰ میکرولیتر معرف B مخلوط شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در محیط اتاق انکوبه شد. عدد جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۴۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر (BioTek ELX800, USA) اندازه‌گیری و با اعداد جذب پروتئین کل نرمال‌سازی شد. فعالیت GPx با فرمول استاندارد (y=Ax+B) محاسبه و به‌دست آمد (Mehdipour *et al*., 2016).

ارزیابی سطوح H_2O_2

در این آزمایش برای اندازه‌گیری سطوح H_2O_2 از کیت (SKU: KROS96) Kiazist Company- Hamedan- Iran با رنگ‌آمیزی دی‌کلرو-دی‌هیدرو- فلوروسین- دی‌استات (DCFH-DA)[1] ارزیابی شد. رنگ DCFH-DA حساسیت بسیار بالایی به رادیکال H_2O_2 دارد و به سلول‌های زنده نفوذ کرده و سپس توسط آنزیم‌های استراز داخل سلولی دی استریفه (de-esterified) می‌شود. در حضور رادیکال H_2O_2، رنگ DCFH به DCF اکسید شده و رنگ سبز ساطع می‌کند. بدین‌منظور، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر نمونه‌های اسپرم (تعداد ۲۰ میلیون اسپرم) با ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ DCFH-DA (۲۵µM) مخلوط و به‌مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول بافری کیت اضافه و نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و تاریکی انکوبه شدند. قبل از ارزیابی مقدار ۲ میکرولیتر PI (۱میکروگرم در میلی‌لیتر) به نمونه‌ها اضافه و مقدار اکسیداسیون رنگ DCFH به DCF به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتری (BD Facscalibur, USA) با طول موج (نانومتر Em^2/EX^3=۴۸۸/۵۲۵) اندازه‌گیری شد. هیستوگرام نمونه کنترل به‌عنوان پایه (نمونه فاقد رنگ) برای gating به‌کار رفت و هیستوگرام تمامی نمونه‌های تیماری در کانال FL1 ترسیم و فاصله هیستوگرام‌های تیمارها با کنترل پایه به‌صورت درصد نشان داده شد. نتایج حاصل شده به‌وسیله نرم‌افزار Flowjo نسخه ۷.۶ (FlowJo, Ashland, OR) تجزیه و تحلیل شد (Sharma *et al*., 2017).

واکاوی داده‌ها

این آزمایش در چهار تیمار و شش تکرار انجام شد. نتایج حاصل از آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌وسیله نرم‌افزار SAS (۹/۱) و رویه GLM واکاوی شد و سطح معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون توکی انجام شد. مدل آماری این آزمایش عبارت است از:

$Yij = \mu + Treati + eij$

Yij = مشاهده ij ام

μ= میانگین جمعیت

$Treati$ = اثر تیمارها

eij = اثر عوامل ناشناخته ij ام

نتایج و بحث

نتایج اثر افزودن کورکومین به رقیق‌کننده انجمادی اسپرم قوچ بر فراسنجه‌های جنبایی اسپرم پس از انجماد- یخ‌گشایی در جدول ۱ گزارش شده است. نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از غلظت‌های ۱۰ و ۲۵ میکروولار کورکومین ویژگی جنبایی TM و هر سه غلظت‌های کورکومین (۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار) فراسنجه جنبایی PM و غلظت ۲۵ میکرومولار کورکومین ویژگی جنبایی VCL را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد بهبود بخشید ($p<۰/۰۵$) اما سایر فراسنجه‌های جنبایی، تفاوت معنی‌داری در میان گروه‌های آزمایشی نشان ندادند ($p>۰/۰۵$).

نتایج حاصل از افزودن سطوح مختلف کورکومین به رقیق‌کننده اسپرم اپیدیدیمی قوچ پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی بر فراسنجه‌های ساختاری در جدول ۲ نشان داده شده است. یافته‌های این پژوهش نشان داد که رقیق‌کننده حاوی هر سه غلظت‌های کورکومین (۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار)

1- Dichloro-dihydro-fluorescein-diacetate 2– Emission 3- Excitation

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-13]
[DOI: 10.61186/rap.15.4.107]

منجر به افزایش درصد اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم پس از انجماد- یخ‌گشایی نسبت به گروه شاهد شد. در مورد درصد زنده‌مانی اسپرم، رقیق‌کننده حاوی ۲۵ میکرومولار کورکومین به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی عملکرد بهتری داشت و همین سطح درصد آپوپتوزیس اولیه را نسبت به سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش داد ($p<۰/۰۵$). در مورد درصد اسپرم‌های دچار آپوپتوزیس ثانویه، نکروز و ناهنجاری‌ها در میان تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

نتایج حاصل از افزودن غلظت‌های مختلف کورکومین به رقیق‌کننده انجمادی اسپرم اپیدیدیمی قوچ بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی در جدول ۳ نشان داده شده است. ارزیابی فراسنجه‌های بیوشیمیایی (تنش اکسیداتیو) نشان داد که غلظت MDA و فعالیت آنزیم CAT در بین گروه‌های تیماری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($p>۰/۰۵$). اما فعالیت آنزیم SOD در رقیق‌کننده حاوی غلظت‌های ۱۰ و ۲۵ میکرومولار کورکومین و فعالیت آنزیم GPX در رقیق‌کننده حاوی غلظت ۲۵ میکرومولار کورکومین به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). همچنین، افزودن هر سه غلظت‌های کورکومین (۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار) به رقیق‌کننده انجمادی اسپرم، غلظت ROS را نسبت به گروه شاهد کاهش داد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۱- اثرات سطوح مختلف کورکومین بر فراسنجه‌های جنبایی اسپرم اپیدیدیمی قوچ پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی
Table 1. The effects of different levels of curcumin on the motility characteristics of ram epididymal sperm after freezing/thawing process

(µm) ALH	(%) STR	(%) LIN	(µm/s) VAP	(µm/s) VSL	(µm/s) VCL	(%) PM	(%) TM	تیمارها/ فراسنجه‌ها Parameters/ Treat
1.83	82.02	30.09	26.59	21.81	72.46^{b}	$46/23^{b}$	59.75^{b}	Control
2.21	78.79	30.42	30.42	23.96	78.74^{ab}	$51/43^{a}$	65.18^{a}	10 µmol C
2.16	78.50	28.55	30.87	24.23	84.87^{a}	$53/80^{a}$	$65/86^{a}$	25 µmol C
2.08	79.16	29.93	29.14	23.07	77.06^{ab}	$49/86^{a}$	$63/25^{ab}$	50 mmol C
0.35	3.11	1.92	4.26	4.19	7/09	2/43	2/97	SEM

* اعداد دارای حروف غیرمشترک در هر ستون تفاوت معنی‌داری دارند ($p<۰/۰۵$) C= کورکومین SEM= خطای استاندارد میانگین‌ها

*Numbers with non-common letters in each column are significantly different ($p<0.05$)
C= Curcumin SEM= Standard error of the means

جدول ۲- اثرات سطوح مختلف کورکومین بر فراسنجه‌های ساختاری اسپرم اپیدیدیمی قوچ پس از فرآیند انجماد/یخ گشایی
Table 2. Effects of different levels of curcumin on structural parameters of ram epididymal sperm after freezing/thawing process

نکروز (%)	آپوپتوز ثانویه (%)	آپوپتوز اولیه (%)	زنده‌مانی (%)	ناهنجاری‌ها (%)	یکپارچگی غشای پلاسمایی (%)	تیمارها/ فراسنجه‌ها Parameters/ Treat
13.63	11.73	9.69^{a}	64.93^{b}	18.58	61.76^{b}	Control
13.27	11.09	8.34^{ab}	67.23^{ab}	19.37	66.71^{a}	10 µmol C
12.78	10.76	7.87^{b}	68.53^{a}	18.99	67.80^{a}	25 µmol C
12.90	10.81	9.78^{a}	66.50^{ab}	19.09	65.53^{a}	50 mmol C
2.19	1.19	1.35	1.91	1.53	2.83	SEM

* اعداد دارای حروف غیر مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌داری دارند ($p<۰/۰۵$) C= کورکومین SEM= خطای استاندارد میانگین‌ها

*Numbers with non-common letters in each column are significantly different ($p<0.05$)
C= Curcumin SEM= Standard error of the means

جدول ۳- اثرات سطوح مختلف کورکومین بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی (تنش اکسیداتیو) اسپرم اپیدیدیمی قوچ پس از انجماد- یخ‌گشایی
Table 3. Effects of different levels of curcumin on biochemical characteristics (oxidative stress) of ram epididymal sperm after freezing/thawing

H_2O_2 (%)	CAT (IU/mg protein)	GPX (IU/mg protein)	SOD (IU /mg Protein)	MDA (nmol/ml)	تیمارها/ فراسنجه‌ها Parameters/ Treat
11.49^{b}	9.69	54.66^{c}	102.16^{b}	5.09	Control
9.02^{a}	8.78	59.52^{b}	110.50^{a}	4.75	10 µmol C
8.43^{a}	9.72	63.28^{a}	116.50^{a}	4.54	25 µmol C
8.04^{a}	9.32	61.75^{ab}	103.66^{b}	5.13	50 mmol C
0.93	1.16	2.85	5.47	0.47	SEM

* اعداد دارای حروف غیر مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌داری دارند ($p<۰/۰۵$) C= کورکومین SEM= خطای استاندارد میانگین‌ها

*Numbers with non-common letters in each column are significantly different ($p<0.05$)
C= Curcumin SEM= Standard error of the means

با توجه به مطالعات انجام شده در چند سال اخیر، نشان داده شده است که در مراحل سردسازی و انجماد اسپرم به‌دلیل کاهش شدید دما تولید رادیکال‌های آزاد به‌ویژه ROS چندین برابر افزایش پیدا می‌کند. این فرآیند تعادل بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و رادیکال‌های آزاد را به‌هم زده و پدیده‌ای به‌نام تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد که آسیب‌های ساختاری و عملکردی زیادی به اسپرم‌ها وارد می‌کند. از این‌رو، اسپرم در این وضعیت به‌شدت آسیب پذیر بوده و می‌تواند آسیب‌های ساختاری مانند پراکسیداسیون لیپیدی غشاء، تخریب ماکرو مولکول‌ها، تخریب اندامک‌های حیاتی داخل سلولی مانند میتوکندری، DNA اسپرم و بروز آپوپتوزهای القایی و در نهایت مرگ سلول‌های اسپرم رخ دهد که به‌دنبال این‌ها باروری اسپرم‌ها کاهش می‌یابد (Chatterjee *et al*., 2001). به‌عنوان مثال تولید بیش از حد ROS منجر به تغییرات عمده در ساختمان پروتئین، چربی و کربوهیدرات در غشای اسپرم به‌دلیل کاهش پیوندهای دی‌سولفیدی بین پروتئین‌های غشایی، پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشایی و تغییرات گلیکوکالیکس اسپرم می‌شود. در نتیجه غشای اسپرم شکننده شده و خاصیت نیمه تراوای آن از بین می‌رود. همچنین، تولید بیش از حد ROS طی ذخیره‌سازی اسپرم ممکن است باعث آسیب DNA و

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-13]
[DOI: 10.61186/rap.15.4.107]

اختلال در چندین پروتئین آکسونمی و میتوکندری شود که بر فعالیت میتوکندری و یکپارچگی آکسونم تأثیر منفی می‌گذارد و در نتیجه جنابی اسپرم را کاهش می‌دهد (Kasimanickam *et al*., 2011). در چند سال اخیر در رابطه با انجماد اسپرم قوچ آزمایشات متعددی انجام شده و چندین نوع رقیق‌کننده نیز مورد بررسی قرار گرفته است. این پژوهش‌ها تلاش کرده‌اند تا اثرات محافظت‌کننده‌های انجمادی را برای محافظت از اسپرم در برابر اثرات مضر انجماد بررسی کنند (Salamon & Maxwell, 2000). اما به‌دلیل وجود اسیدهای چرب غیر اشباع فراوان و نسبت کلسترول به فسفولیپید پایین در غشای اسپرم قوچ حساسیت آنها در برابر تنش اکسیداتیو بسیار بالاست و از این‌رو انجماد اسپرم قوچ به کیفیت مطلوبی نرسیده است (Kameni *et al*., 2021). بنابراین به‌کارگیری ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در رقیق‌کننده اسپرم قوچ از اهمیت بالایی برخوردار است. در میان آنتی‌اکسیدان‌ها، تمایل به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌دلیل عدم وجود مشکلات سمی، ایمونولوژیک و از طرف دیگر سهولت دسترسی و ارزان قیمت بودن آنها بیشتر شده است (Malo *et al*., 2011). در این مطالعه از یک آنتی‌اکسیدان کاملاً طبیعی به‌نام کورکومین استفاده شده است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی ثابت شده است. ساختار شیمیایی منحصر به‌فرد این ترکیب شامل پیوندهای دوگانه کربن–کربن، گروه B-diketo و حلقه‌های فنیل با جایگزین‌های هیدروکسیل و متوکسی به فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن ثابت شده است. محققان بر این باورند که فراسنجه‌های آنتی‌اکسیدانی قوی کورکومین عمدتاً به‌دلیل اهدای اتم H آن از گروه فنولیک است. به‌طوریکه مشخص شده است که کورکومین با داشتن قدرت زیادی در مهار پراکسیداسیون لیپیدی، می‌تواند با قرار گرفتن در داخل غشای سلولی از غشای سلولی در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت کند. این عمل به‌وسیله خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد به‌خصوص ROS صورت می‌گیرد (Wright, 2002). همچنین، کورکومین آنزیم‌های لیپواکسیژناز و سیکلواکسیژناز (LOX و COX که آنزیم‌های کلیدی در تبدیل اسید آراشیدونیک به پروستاگلاندین هستند) را مهار کرده و بنابراین از پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری می‌کند (Grynkiewicz & Ślifirski, 2012). استفاده از غلظت ۲۵ میکرومولار این ماده توانست کیفیت اسپرم اپیدیدمی قوچ را پس از انجماد–یخ‌گشایی بهبود بخشد. هرچند این ماده تمامی فراسنجه‌های کیفی اسپرم را بهبود نداد که در بخش نتایج به‌طور واضح بیان شد. در یک آزمایش، افزودن این ماده در رقیق‌کننده اسپرم اپیدیدیمی قوچ در فرآیند سردسازی نتایج جالبی را نشان داد، اثربخشی این ماده تنها در زمان‌های اولیه سردسازی (حداکثر تا ۲۴ ساعت پس از سردسازی) تأثیر مثبت بر فراسنجه‌های کمی و کیفی اسپرم داشت ولی در زمان‌های بیشتر (بالای ۲۴ ساعت) تقریباً اثر بخشی خود را از دست داده بود (Farhadi *et al*., 2024). ممکن است علت این مشکل این‌طور باشد که کورکومین با حلالیت و زیست‌فراهمی پایین در محلول‌های آبی و همچنین متابولیسم سریع آن در محیط‌های اسیدی و دمای پایین، دارای میزان اثرگذاری کوتاه‌مدت باشد (Tsai *et al*., 2011; Zaki *et al*., 2020). در یک مطالعه‌ای استفاده از کورکومین در رقیق‌کننده اسپرم انسان بعد از انجماد مثبت ارزیابی شده و پس از یخ‌گشایی موجب بهبود جنابی پیش‌رونده، تراکم کروماتین اسپرم و یکپارچگی DNA شد که بهبود حاصل شده در جنابی پیش‌رونده با نتیجه آزمایش ما موافق بود (Karakus *et al*., 2021). استفاده از ۲۵ میکرومولار کورکومین در رقیق‌کننده اسپرم گاو بر پایه تریس در دو مرحله سردسازی و انجماد توانست به‌طور معنی‌داری فراسنجه‌های جنابی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء را بهبود بخشد که به‌طور کامل با نتایج آزمایش حاضر موافق بود (Tvrda *et al*., 2016). همچنین افزودن ۰/۵ میلی‌مولار کورکومین به رقیق‌کننده اسپرم گاو منجر به کاهش درصد اسپرم‌های غیر طبیعی در مقایسه با گروه شاهد شد ولی این سطح بر سایر فراسنجه‌ها مانند لیپید پراکسیداسیون و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم تأثیر معنی‌داری نداشت که نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه حاضر مخالف بود (Bucak *et al*., 2012). در یک مطالعه‌ای سطوح مختلف کورکومین، الاژیک اسید و متیونین به‌صورت جداگانه و مخلوط به رقیق‌کننده اسپرم قوچ اضافه شد که سطح مخلوط بهترین عملکرد را نسبت به سطوح جداگانه داشت و فراسنجه‌های جنابی، زنده‌مانی، سلامت آکروزومی و غشای پلاسمایی اسپرم قوچ را به‌طور معنی‌داری حفظ کرده بود (Omur *et al*., 2014). در یک مطالعه مقایسه‌ای کورکومین با اینوزیتول و کارنیتین، افزودن ۲/۵ میلی‌مولار کورکومین به رقیق‌کننده اسپرم بز توانست به‌طور معنی‌داری جنابی پیش‌رونده را نسبت به سایر گروه‌ها بهبود دهد ولی هرچند در مورد سایر فراسنجه‌های جنابی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در همین مطالعه افزودن سطوح ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کورکومین توانست درصد ناهنجاری کل و سلامت غشای آکروزوم اسپرم را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد ولی تأثیر معنی‌داری بر کاهش غلظت MDA و حفظ فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نداشت (Bucak *et al*., 2010). افزودن ۱/۵ میلی‌مولار کورکومین به رقیق‌کننده اسپرم گاومیش پس از انجماد– یخ گشایی فراسنجه‌های جنابی و یکپارچگی DNA، زنده‌مانی، سلامت آکروزوم، یکپارچگی غشای اسپرم گاومیش را نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بهبود بخشید (Shah *et al*., 2017). نتایج آزمایش حاضر تا حدودی با نتایج مطالعات اشاره شده موافق بود. استفاده از کورکومین در این آزمایش به‌طور واضح موجب کاهش غلظت ROS شده بود که این می‌تواند به‌طور مستقیم فراسنجه‌های جنابی، سلامت غشایی و زنده‌مانی اسپرم را تحت تأثیر قرار داده و موجب حفظ کیفیت اسپرم پس از انجماد– یخ‌گشایی شود. هرچند در این مطالعه نتایج مانند غلظت MDA به‌عنوان یک شاخص مهم در لیپید پراکسیداسیون غشایی، هیچ بهبودی در نتیجه استفاده از کورکومین در رقیق‌کننده مشاهده نشد. اما نکته جالب توجه این بود که استفاده از کورکومین در رقیق‌کننده توانسته بود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD و GPX را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش دهد که این می‌تواند به‌طور مستقیم در کاهش غلظت ROS و متعاقب آن کاهش آسیب‌های اسپرم دخیل باشد. چراکه در مطالعات دیگر نیز یکی دیگر از مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-13]
[DOI: 10.61186/rap.15.4.107]

کورکومین مربوط به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی داخل سلولی گزارش شده است (Zhang *et al*., 2013). در یک مطالعه‌ای مشخص شد که کورکومین با فعال‌سازی مسیر Nrf2-Keap1 و بیان ژن‌های دخیل در این مسیر موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز شده و از این طریق می‌تواند انواع اکسیدان‌ها را در سطح سلول‌ها از بین ببرد که این می‌تواند با نتایج آزمایش حاضر ارتباط داشته باشد (Lin *et al*., 2019).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزودن ۲۵ میکرومولار کورکومین می‌تواند موجب بهبود فراسنجه‌های جنبایی، ساختاری و بیوشیمیایی اسپرم اپیدیدیمی قوچ پس از فرآیند انجماد– یخ‌گشایی شود. استفاده از غلظت ۲۵ میکرولیتر این ماده در رقیق‌کننده اسپرم قوچ توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

از زحمات پرسنل محترم مرکز تحقیقات کاربردی داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و گروه علوم دام و طیور پردیس کشاورزی ابوریحان دانشگاه تهران تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

References

Abdelnour, S. A., Hassan, M. A., Mohammed, A. K., Alhimaidi, A. R., Al-Gabri, N., Al-Khaldi, K. O., & Swelum, A. A. (2020). The effect of adding different levels of curcumin and its nanoparticles to extender on post-thaw quality of cryopreserved rabbit sperm. *Animals*, *10*(9), 1508.

Alevra, A. I., Exadactylos, A., Mente, E., & Papadopoulos, S. (2022). The protective role of melatonin in sperm cryopreservation of farm animals and human: lessons for male fish cryopreservation. *Animals*, 12(6), 791.

Asaduzzaman, M., Saha, A., Akter, S., Biswas, S., Alam, M. G. S., & Bari, F. Y. (2021). Quality changes in spermatozoa of exotic muzaffarnagari cross-breed ram semen during the stages of frozen production. *Online Journal of Animal and Feed Research*, 11(6), 206-212.

Bansal, A. K., & Bilaspuri, G. (2011). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, (1), 686137.

Bucak, M., Başpınar, N., Tuncer, P., Coyan, K., Sarıözkan, S., Akalın, P., Büyükleblebici, S., & Küçükgünay, S. (2012). Effects of curcumin and dithioerythritol on frozen-thawed bovine semen. *Andrologia*, 44, 102-109.

Bucak, M.N., Sarıözkan, S., Tuncer, P. B., Sakin, F., Ateşşahin, A., Kulaksız, R., & Çevik, 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.

Chatterjee, S., de Lamirande, E., & Gagnon, C. (2001). Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, *60*(4), 498-506.

Daghigh Kia, H., Farhadi, R., Ashrafi, I., & Mehdipour, 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., 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 [In Persian]

Goth, L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 196(2-3), 143-151.

Grynkiewicz, G., & Ślifirski, P. (2012). Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status. *Acta Biochimica Polonica*, 59(2), 201-212.

Heres, P., Troncoso, J., & Paredes, E. (2021). Larval cryopreservation as new management tool for threatened clam fisheries. *Scientific Reports*, 11(1), 15428.

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

Joe, B., Vijaykumar, M., & Lokesh, B. (2004). Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*(2), 97-111.

Kameni, S. L., Meutchieye, F., & Ngoula, F. (2021). Liquid storage of ram semen: associated damages and improvement. *Open Journal of Animal Sciences*, 11(3), 473-500.

Karakus, F. N., Kuran, S. B., & Solakoglu, S. (2021). Effect of curcumin on sperm parameters after the cryopreservation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 267, 161-166.

Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Tibary, A., & Pelzer, K. (2011). Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4 C. *Small Ruminant Research*, 99(2-3), 208-213.

kumar Patel, G., Haque, N., Madhavatar, M., kumar Chaudhari, A., kumar Patel, D., Bhalakiya, N., Jamnesha, N., Patel, P., & Kumar, R. (2017). Artificial insemination: A tool to improve livestock productivity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6S), 307-313.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.61186/rap.15.4.107]

Lin, X., Bai, D., Wei, Z., Zhang, Y., Huang, Y., Deng, H., & Huang, X. (2019). Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264. 7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway. *PloS One*, 14(5), e0216711.

Malo, C., Gil, L., Cano, R., Martínez, F., & Galé, I. (2011). Antioxidant effect of rosemary (Rosmarinus officinalis) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*, 75(9), 1735-1741.

Mehdipour, M., Daghigh-Kia, H., Najafi, A., Mehdipour, Z., & Mohammadi, H. (2022). Protective effect of rosiglitazone on microscopic and oxidative stress parameters of ram sperm after freeze-thawing. *Scientific Reports*, 12(1), 13981.

Mehdipour, M., Kia, H. D., Moghaddam, G., & Hamishehkar, H. (2018). Effect of egg yolk plasma and soybean lecithin on rooster frozen-thawed sperm quality and fertility. *Theriogenology*, *116*, 89-94.

Mehdipour, M., Kia, H. D., Najafi, A., Dodaran, H. V., & García-Álvarez, O. (2016). Effect of green tea (Camellia sinensis) extract and pre-freezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*, 73(3), 297-303.

Merati, Z., Farshad, A., Farzinpour, A., Rostamzadeh, J., & Sharafi, M. (2018). Anti-apoptotic effects of minocycline on ram epididymal spermatozoa exposed to oxidative stress. *Theriogenology*, 114, 266-272.

Miquel, J., Bernd, A., Sempere, J., Dıaz-Alperi, J., & Ramırez, A. (2002). The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 34(1), 37-46.

Najafi, A., Kia, H. D., Mehdipour, M., Hamishehkar, H., & Álvarez-Rodríguez, M. (2020). Effect of quercetin loaded liposomes or nanostructured lipid carrier (NLC) on post-thawed sperm quality and fertility of rooster sperm. *Theriogenology*, 152, 122-128.

Najafi, A., Kia, H. D., Mehdipour, M., Shamsollahi, M., & Miller, D. J. (2019). Does fennel extract ameliorate oxidative stress frozen-thawed ram sperm? *Cryobiology*, 87, 47-51.

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

Omur, A., Coyan, K., Ozturk, C., Gungor, S., & Bucak, M. (2014). The effects of curcumin, ellagic acid and methionine on post-thawed Merino rams sperm parameters (759.1). *The Faseb Journal*, 28, 759.751.

Partyka, A., Łukaszewicz, E., & Niżański, W. (2012). Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*, 77(8), 1497-1504.

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

Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 77-111.

Santonastaso, M., Mottola, F., Iovine, C., Colacurci, N., & Rocco, L. (2021). Protective effects of curcumin on the outcome of cryopreservation in human sperm. *Reproductive Sciences*, 28, 2895-2905.

Shah, S., Andrabi, S., & Qureshi, I. (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.

Sharma, R., Roychoudhury, S., Singh, N., & Sarda, Y. (2017). Methods to measure reactive oxygen species (ROS) and total antioxidant capacity (TAC) in the reproductive system. In *Oxidative stress in human reproduction: Shedding Light on a Complicated Phenomenon* (pp. 17-46). Cham: Springer International Publishing.

Sikka, S. C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*, 1, e78-86.

Tsai, Y.-M., Chien, C.-F., Lin, L.-C., & Tsai, T.-H. (2011). Curcumin and its nano-formulation: the kinetics of tissue distribution and blood–brain barrier penetration. *International Journal of Pharmaceutics*, 416(1), 331-338.

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

Wright, J. S. (2002). Predicting the antioxidant activity of curcumin and curcuminoids. *Journal of Molecular Structure: Theochem*, 591(1-3), 207-217.

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

Zhang, D.-w., Fu, M., Gao, S.-H., & Liu, J.-L. (2013). Curcumin and diabetes: a systematic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (1), 636053.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.61186/rap.15.4.107]