Research on Animal Production, Vol. 15, Issue 2, 2024 p: 44-52

Research Paper

The Effects of Adding Different Levels of Curcumin Nanoparticles and Sucrose Sugar on Qualitative and Structural Parameters of Ram Epididymal Sperm after Cooling

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: 31 December, 2023 Accepted: 3 February, 2024

Extended Abstract

Background: Artificial insemination is one of the important management tools to control reproductive activities and increase the productivity of the livestock industry. This technique can play an important role in genetic improvement even in small herds. Sperm preparation is of particular importance for reproductive techniques, such as artificial insemination, but many harmful factors, such as temperature shock and oxidative stress, reduce sperm quality and directly affect sperm fertility during sperm preparation and storage. Therefore, the addition of protective substances and antioxidants in the diluent is considered essential in maintaining sperm quality during the cooling and freezing stages. Curcumin is a yellow substance obtained from the root of turmeric, and its biochemical structure contains a phenolic ring and a beta-di-ketone part in its structure. It can neutralize free radicals, but it has low solubility in hydrophilic environments. To solve this problem, the nanoliposome method has been proposed. Using this method can solve the problem of curcumin's low solubility in aqueous solutions and, additionally, curcumin nanoparticles can be guided to exert their effects in a completely targeted manner inside the target cell. On the other hand, sucrose protects sperm from cold shock by first rinsing sperm cells and maintaining the osmotic pressure of the diluting medium. This study aimed to investigate the effects of separate and mixed use of different levels of curcumin nanoparticles and sucrose sugar in ram epididymal sperm diluent during storage at 5 ˚C at different cooling times.

Methods: The present study was conducted in the Animal Physiology Laboratory of the Department of Animal and Poultry Sciences, Aburihan Agricultural Campus, the University of Tehran. The testicular tissues were prepared from a slaughterhouse on the day of the experiment and transported to the laboratory with special flux in less than an hour. Sperm samples were collected from the epididymal tail of the ram testicular tissue in the laboratory. Sperm was sampled after initial evaluation, with progressive motility of more than 75% and abnormality of less than 10%, and were added to the diluent at 37 °C. In this study, the diluent consisted of Tris (27.1 g/L), citric acid (14 g/L), fructose (10 g/L), egg yolk (20%), and glycerol (7%), with a pH of around 6.2-7.8. The osmolarity was set at about 310-320 milliosmoles. Sucrose sugar was obtained from the Sigma Aldridge Company, and curcumin nanoparticles were prepared from pure curcumin powder (Sigma Aldridge) by the nanoliposome method and using rotary devices, a homogenizer, and a prop sonicator. A DLS device was used to examine the particle size of curcumin nanoparticles (less than 80 nanograms). The experimental groups included 25 and 50 µM of nanoparticles of curcumin (NC), sucrose (S) at 100 and 150 mM separately, combined levels (25NC100S, 25NC150S, 50NC100S, and 50NC150S), and a group without these additives (control), which were added to the diluent at 37 °C. The diluents containing different levels of the treatments were refrigerated in 15 ml falcones and inside a water container at the same temperature, which gradually reached a temperature of 5 ˚C in about 2 hours. After stabilization at this temperature, total motility parameters, progressive motility using the KASA system, the viability with the eosin-nigrosin method (16.7 g of eosin, 100 g of nigrosin, and 29 g

Copyright ©2024 Farhadi et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 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.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.44]

of citrate buffer in 1 L of double-distilled water), membrane integrity by the HOST solution method (9 g of fructose and 4.9 g of sodium citrate in 1 L of double-distilled water with an osmolarity of 100 milliosmoles), and the percentage of sperm abnormalities using Hancock's solution (5 62/L of 37% formalin, 150 ml of saline solution, 150 ml of a buffer solution, and 500 ml of double distilled water) were evaluated at 6, 12, 24, and 48 hours.
The experimental results were analyzed in a completely random design by SAS software (9.2) and the GLM procedure at a significance level of $P < 0.05$. The means of the treatments were compared with Tukey's test.
Results: The use of 25NC100S in the diluent improved the parameters of total motility, progressive motility, viability, and integrity of ram epididymal sperm membrane in all evaluated times compared to the other groups, especially the control group ($p < 0.05$). No significant differences were observed between the treatments in the percentage of sperm abnormalities at 6 and 12 hours ($p > 0.05$). At 24 and 48 hours, however, the 25NC100S concentration significantly reduced the percentages of sperm abnormalities compared to the other concentrations ($p < 0.05$). Compared to the control group, adding different levels of curcumin nanoparticles and sucrose sugar separately significantly improved the evaluated parameters, but the best performance was observed in the combined treatment, indicating the synergistic role of these two compounds.
Conclusion: The results of the present study demonstrate that using a mixture of curcumin nanoparticles with sucrose in the diluent can protect sperm against oxidative damage and cold shock. The antioxidant effects of curcumin nanoparticles and the protective effects of sucrose sugar can result in positive effects on the quality of ram epididymal sperm during cooling. Therefore, it is recommended to use the 25NC100S level in ram sperm diluents.

Keywords: Sperm quality, Oxidative Stress, Cold Shock, Curcumin, Nanoliposome

How to Cite This Article: Farhadi, R., Farshad, A., Rostamzadeh, J., & Najafi, A. (2024). The Effects of Adding Different Levels of Curcumin Nanoparticles and Sucrose Sugar on Qualitative and Structural Parameters of Ram Epididymal Sperm after Cooling. *Res Anim Prod,* 15(2), 44-52. DOI: 10.61186/rap.15.2.44

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.44]

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقاله پژوهشی

اثرات نانوذرات کورکومین و قند ساکارز بر پارامترهای کیفی و ساختاری اسپرم اپیدیدمی قوچ نژاد شال پس از سردسازی

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

۱- دانشجوی دکتری تخصصی فیزیولوژی دام و طیور 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: ۱۴۰۲/۱۰/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۴
صفحه ۴۴ تا ۵۲

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: تلقیح مصنوعی یکی از ابزارهای مدیریتی مهم برای کنترل فعالیت‌های تولیدمثلی و افزایش بازده صنعت پرورش دام می‌باشد. این تکنیک می‌تواند نقش مهمی در پیشرفت ژنتیکی حتی در گله‌های کوچک می‌شود. آماده‌سازی اسپرم جهت اجرای تکنیک‌های تولیدمثلی مانند تلقیح مصنوعی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. اما در طول آماده‌سازی و نگهداری اسپرم، عوامل متعدد آسیب زا مانند شوک دمایی و تنش اکسیداتیو موجب کاهش کیفیت اسپرم‌ها شده و به‌طور مستقیم باروری اسپرم را تحت تاثیر قرار می‌دهند. لذا افزودن مواد محافظت‌کننده و آنتی‌اکسیدان در رقیق‌کننده امری ضروری در حفظ کیفیت اسپرم در مراحل سردسازی و انجماد محسوب می‌شود.کورکومین ماده زرد رنگی است که از ریشه زردچوبه حاصل می‌شود واز نظر ساختار بیوشیمیایی با داشتن حلقه فنلی و بخش بتا دی–کتونی در ساختمان خود می‌تواند رادیکال‌های آزاد را خنثی کند ولی در محیط‌های آبدوست حلالیت پایینی دارد. جهت رفع این مشکل، روش نانولیپوزوم پیشنهاد شده است که با بهره‌گیری از این روش، علاوه بر رفع مشکل حلالیت پایین کورکومین در محلول‌های آبی، نانوذرات کورکومین بصورت کاملا هدفمند به داخل سلول هدف هدایت و تاثیرات خود را انجام می‌دهد. از طرف دیگر قند ساکارز با آبکشی اولیه سلول‌های اسپرم و حفظ فشار اسمزی محیط رقیق کننده، اسپرم‌ها را از شوک سرمایی محافظت می‌کند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثرات استفاده جداگانه و مخلوط سطوح مختلف نانو ذرات کورکومین و قند ساکارز در رقیق‌کننده اسپرم اپیدیمی قوچ طی نگهداری در دمای ۵°C در زمان‌های مختلف سردسازی بود.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر در آزمایشگاه فیزیولوژی دام گروه علوم دام و طیور پردیس کشاورزی ابوریحان دانشگاه تهران انجام شد. بافت‌های بیضه در روز آزمایش از کشتارگاه تهیه و به‌وسیله فلاکس مخصوص در فاصله کمتر از یک ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. اسپرم از ناحیه دم اپیدیدیم بافت بیضه قوچ در آزمایشگاه جمع‌آوری شد. نمونه‌های اسپرم پس از ارزیابی اولّیه و دارا بودن تحرک پیشرونده بیش از ۷۵ درصد و ناهنجاری کمتر از ۱۰ درصد انتخاب و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به رقیق‌کننده افزوده شدند. ترکیب رقیق کننده در این مطالعه شامل: تریس ۲۷/۱ گرم در لیتر، اسید سیتریک ۱۴ گرم در لیتر، فروکتوز ۱۰ گرم در لیتر، زرده تخم‌مرغ ۲۰ درصد، گلیسرول ۷ درصدبود که PH رقیق کننده در حدود ۶/۸ – ۷/۲ و اسمولاریته در حدود ۳۱۰– ۳۲۰ میلی اسمول تنظیم گردید. قند ساکارز ساخت شرکت سیگما آلدریچ تهیه شد و نانوذرات کورکومین نیز از پودر کورکومین خالص ساخت شرکت سیگما آلدریچ به روش نانولیپوزوم و با استفاده از دستگاه های روتاری، هموژنایزر و سونیکاتور پروپ تهیه شد. برای بررسی اندازه ذرات نانوذرات کورکومین نیز از دستگاه DLS استفاده شد و ذرات در حدود کمتر از ۸۰ نانوگرم بودند. گروه‌های آزمایشی شامل غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار نانوذرات کورکومین (NC)، ساکارز (S) در دو غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار بصورت جداگانه، سطوح ترکیبی شامل (25NC100S، 25NC150S، 50NC100S، 50NC150S) و یک گروه فاقد این افزودنی‌ها (شاهد) بودند که در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به رقیق‌کننده اضافه شدند. رقیق‌کننده‌های حاوی سطوح مختلف تیماری در فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتر و در داخل ظرف آب هم دما به داخل یخچال منتقل شدند که به‌صورت تدریجی در طول حدود ۲ ساعت به دمای ۵°C رسیدند. پس از تثبیت در این دما، در زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، پارامترهای جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده با استفاده از سیستم کاسا، زنده‌مانی با روش ائوزین– نیگروزین (۱۶/۷ گرم ائوزین، ۱۰۰ گرم نیگروزین، ۲۹ گرم بافر سیترات در یک لیتر آب دوبار تقطیر)، یکپارچگی غشایی با روش محلول HOST (۹ گرم فروکتوز، ۴/۹ گرم سیترات سدیم در یک لیتر آب دو بار تقطیر با اسمولاریته ۱۰۰ میلی اسمول) و درصد ناهنجاری‌های اسپرم با استفاده از محلول هانکوک (۶۲/۵ لیتر فرمالین ۳۷ درصد، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول سالین، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر) ارزیابی شدند. نتایج حاصل از آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌وسیله نرم افزار SAS (۹/۲) و رویه GLM آنالیز و سطح معنی‌داری (P<۰/۰۵) در نظر گرفته شد. برای مقایسه میانگین تیمارها نیز از آزمون توکی استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از 25NC100S در رقیق کننده موجب بهبود پارامترهای جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم اپیدیمی قوچ در تمامی زمان‌های مورد ارزیابی نسبت به سایر گروه‌ها بخصوص گروه شاهد شد (p<۰/۰۵). در مورد درصد ناهنجاری‌های اسپرم در زمان‌های ۶ و ۱۲ ساعت بین تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵) ولی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت غلظت 25NC100S موجب کاهش معنی‌دار درصد ناهنجاری‌های اسپرم نسبت به سایر غلظت‌ها شد (P<۰/۰۵). افزودن سطوح مختلف نانوذرات کورکومین و قند ساکارز بصورت جداگانه نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری پارامترهای مورد ارزیابی را بهبود داده بودند ولی بهترین عملکرد در تیمار ترکیبی مشاهده شد که می‌تواند نشان دهنده نقش هم‌افزایی این دو ترکیب باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از مخلوط نانوذرات کورکومین با ساکارز در رقیق‌کننده می‌تواند اسپرم‌ها را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو و شوک سرمایی محافظت کند. اثرات آنتی‌اکسیدانی نانوذرات کورکومین و اثرات محافظتی قند ساکارز می‌تواند علت تاثیر مثبت بر کیفیت اسپرم اپیدیمی قوچ در زمان‌های سردسازی باشد و از اینرو استفاده از سطح 25NC100S در رقیق کننده اسپرم قوچ توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: کیفیت اسپرم، تنش اکسیداتیو، شوک سرمایی، کورکومین، نانولیپوزوم

مقدمه

بهینه‌سازی تولیدمثل با استفاده از تکنیک‌های کمک باروری شامل جمع‌آوری و ذخیره منی، همزمان‌سازی فحلی، تلقیح مصنوعی (AI)[۱]، لقاح آزمایشگاهی (IVF)[۲] و تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم حاصل می‌شود. موفقیت به‌کارگیری تکنیک‌های تلقیح مصنوعی، انتقال جنین با تخمک‌گذاری

1- Artificial insemination
2- In Vitro Fertilization

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]
[DOI: 10.61186/rap.15.2.44]

متعدد و فناوری IVF عمدتاً به کیفیت مایع منی بستگی دارد و روش فرآوری و کیفیت رقیق‌کننده به‌شدت کیفیت مایع منی از جمله ویژگی‌های فراساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی اسپرم را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Salamon & Maxwell, 2000). برای افزایش طول عمر اسپرم در فرآیند ذخیره‌سازی اسپرم از کاهش دما بهره گرفته می‌شود تا با کاهش نرخ متابولیسم موجب افزایش طول عمر این سلول‌ها شود. اما با این حال در طول این فرآیند، بر اثر افت دما و تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[1]، تعادل ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌ها/ پراکسیدان‌ها بهم ریخته و منجر به تنش اکسیداتیو و متعاقب آن پراکسیداسیون لیپیدی (LPO)[2] و آسیب‌های متعدد ساختاری و عملکردی اسپرم می‌شود (Ikeda et al., 1999). رادیکال‌های ROS محصولات جانبی طبیعی متابولیسم سلولی هستند و در مقادیر نسبتاً کم، نقش کلیدی در عملکردهای اسپرم مانند ظرفیت پذیری، واکنش آکروزوم و اتصال به زونا پلوسیدا دارند (Bansal & Bilaspuri, 2011). علاوه بر این، اسپرم قوچ دارای نسبت کلسترول به فسفولیپید درون غشایی پایینی نسبت به گونه‌های دیگر است و همچنین غشای اسپرم قوچ غنی از اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه است که آنها را به‌شدت در برابر شوک سرمایی و بروز فرآیند LPO مستعد می‌کند. برای به حداقل رساندن اثرات مضر مربوط به سردسازی و ذخیره‌سازی، یک رقیق‌کننده بهینه مایع منی نه‌تنها باید محیطی با pH و ظرفیت بافری مناسب برای محافظت از اسپرم‌ها در برابر تنش‌های اسمزی و شوک سرمایی داشته باشد، بلکه باید از تولید ROS اضافی نیز جلوگیری کند. از این‌رو افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در رقیق‌کننده اسپرم قوچ امر ضروری به‌نظر می‌رسد (Kameni *et al.*, 2021).

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 تمامی این سه ترکیب خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارند (Joe *et al.*, 2004). علاوه بر این، خاصیت ضد آپوپتوز، ضد التهاب، ضد سمی و ضد سرطان این ماده نیز به اثبات رسیده است (Zhang *et al.*, 2013). به‌دلیل ایمنی، سمیت کم و استفاده از کارآیی آن در آزمایش‌های انسانی و حیوانی، سازمان غذا و داروی ایالات متحده کورکومین را به‌عنوان یک ماده کاملاً بی‌خطر تلقی کرده و در مصارف انسانی و حیوانی توصیه کرده است (Thumann & Mehta, 2020). با این‌حال، کورکومین به‌صورت بلور نامحلول در آب است و در حلال‌هایی مانند اتانول، استن و متانول قابل حل می‌باشد. همچنین این ماده به‌دلیل فراهمی زیستی کم و پایین بودن جذب غشایی در کاربردهای پزشکی و داروئی محدود است که ممکن است به‌دلیل جذب ضعیف و متابولیسم سریع باشد. برای غلبه بر این مشکل، فرمول‌های مختلفی از تهیه نانوذرات کورکومین در خوراک مورد بررسی قرار گرفته‌اند که البته مثبت گزارش شده است (Ahmed-Farid *et al.*, 2017). امروزه روش نانوذرات به‌دلیل افزایش فراهمی زیستی، مقیاس پایدارتر و کوچکتر، رویکرد کارآمدی در دارورسانی محسوب می‌شود (Isaac *et al.*, 2017). به‌نظر می‌رسد استفاده از روش نانولیپوزوم برای تهیه نانوذرات کورکومین می‌تواند مشکل حلالیت کورکومین را در محلول‌های آبی برطرف کرده و همچنین موجب زیست‌فراهمی بالا، نیمه‌عمر بالا، قابلیت جذب بالا و متابولیسم بهینه مولکول‌های کورکومین شده و از طرف دیگر ذرات کورکومین به‌صورت هدف‌دار به سلول‌ها معرفی گردد. از طرف دیگر، استفاده از قند ساکارز در رقیق کننده باعث ایجاد فشار اسمزی و در نتیجه خروج آب از سلول اسپرم می‌شود که این مساله به‌طور ویژه می‌تواند اسپرم‌ها را از بروز شوک سرمایی در مرحله سردسازی محافظت نموده و با آبکشی اولیه سلول پیش از انجماد، از تشکیل کریستال‌های یخ درون سلولی جلوگیری و یا آن‌را به حداقل می‌رساند و از این طریق میزان صدمات وارده به سلول‌های اسپرم را کاهش می‌دهد (Aisen *et al.*, 2002). هدف این پژوهش بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی نانوذرات‌کورکومین و نقش محافظتی قند ساکارز به دو حالت جداگانه و مخلوط بر کیفیت اسپرم اپیدیدیمی قوچ نژاد شال پس از سردسازی در دمای ۵°C بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در آزمایشگاه فیزیولوژی گروه علوم دام و طیور پردیس ابوریحان دانشگاه تهران انجام شد. قند ساکارز و پودر کورکومین ساخت شرکت سیگما- آلدریچ تهیه و استفاده شدند. فرآیند نانو کردن پودر کورکومین به‌روش نانولیپوزوم با استفاده از ماده لسیتین و دستگاه‌های روتاری (Heidolph Hei-VAP, Germany) و هموژنایزر (MTOPS, South Korea) انجام شد. جهت همگن‌سازی محلول نیز از دستگاه سونیکاتور پروپ (Hielscher, German) استفاده شد و محلول نانو ذرات کورکومین در یک غلظت استوک (۵۰ میلی‌گرم در ۵۰۰ میلی‌لیتر) تهیه شد. جهت بررسی اندازه ذرات محلول ساخته شده نیز از دستگاه DLS[3] (Malvern Zetasaizer Nano Zs, Enghlish) استفاده شد (Amjadi *et al.*, 2018). در این مطالعه اسپرم از دم اپیدیدیم بافت بیضه در آزمایشگاه جمع‌آوری و مورد ارزیابی قرار گرفت (Purdy., 2006). نمونه‌های بالای ۷۵ درصد تحرک پیش‌رونده و ناهنجاری کمتر از ۱۰ درصد انتخاب و در رقیق کننده بر پایه تریس-زرده تخم‌مرغ (تریس ۲۷/۱ گرم در لیتر، اسیدسیتریک ۱۴ گرم در لیتر، فروکتوز ۱۰ گرم در لیتر، زرده تخم‌مرغ ۲۰ درصد، گلیسرول ۷ درصد) اضافه شد (Najafi *et al.*, 2023). قبل از تیماربندی، غلظت‌های مختلف هر دو ترکیب آزمایش شده و سرانجام تیمارها در ۹ گروه شامل ۲۵ و ۵۰ میکرومولار نانوذرات کورکومین (NC)، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار ساکارز (S)، 25NC100S، 25NC150S، 50NC100S، 50NC150S و یک گروه فاقد این افزودنی‌ها (کنترل) انتخاب شده و به رقیق‌کننده اضافه شدند. گروه‌های آزمایشی در فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری به دمای ۵°C منتقل شده و طی حدود دو ساعت در این دما تثبیت شدند. سپس در زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تثبیت تیمارها در دمای ۵°C، پارامترهای جنبایی کل،

1- Reactive Oxygen Species 2- Lipid Peroxidation 3- Dynamic Light Scattering

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]
[DOI: 10.61186/rap.15.2.44]

جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی، یکپارچگی غشایی و درصد ناهنجاری‌های اسپرم ارزیابی شد.

ارزیابی پارامترهای جنبایی کل و پیش‌رونده اسپرم:

پارامترهای جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده به‌وسیله سیستم CASA[1] (Vidio Test Sperm 3.1, jepan مدل) ارزیابی شد. روش کار بدین‌صورت بود که ابتدا ۵ میکرولیتر نمونه رقیق‌کننده حاوی اسپرم را در روی لام گذاشته و با لامل پوشش داده شد و سپس به‌وسیله سیستم CASA تعداد ۲۰۰ سلول اسپرم به‌صورت کاملاً تصادفی در حداقل ۱۰ فیلد بررسی شد (Safa *et al.*, 2016).

ارزیابی 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 ۵ میکرولیتر نمونه اسپرم با ۵ میکرولیتر رنگ ائوزین- نیگروزین مخلوط و گسترش تهیه شد. پس از خشک شدن لام، روی میکروسکوپ (Labomed LX400; Labomed Inc., Culver City, CA, USA) با بزرگنمایی ۴۰۰ × 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 (Farhadi *et al.*, 2015).

ارزیابی یکپارچگی غشاء اسپرم:

جهت ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرم از تست HOST (۹ گرم فروکتوز، ۴/۹ گرم سیترات سدیم در یک لیتر آب دو بار تقطیر با اسمولاریته ۱۰۰ میلی اسمول) استفاده شد. برای انجام این تست ابتدا ۵۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم به آرامی با ۵۰۰ میکرولیتر محلول هیپواسموتیک مخلوط شده و بمدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم (۳۷°C) انکوبه شد. مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه مخلوط شده، 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 بزرگنمایی ۴۰۰× در حداقل۱۰ فیلد شمارش شد که اسپرم‌های با دم متورم و تاب خورده به‌عنوان اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم در نظر گرفته شدند و نتایج به‌صورت درصد ثبت شد (Daghigh Kia *et al.*, 2016).

ارزیابی درصد ناهنجاری‌های اسپرم:

برای ارزیابی درصد ناهنجاری‌های اسپرم از محلول هانکوک استفاده شد. این محلول حاوی ۶۲/۵ لیتر 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 ۵ 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.*, 2020).

آنالیز آماری

نتایج حاصل از آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌وسیله نرم‌افزار SAS (۹/۲) و رویه GLM آنالیز و سطح معنی‌داری (P<۰/۰۵) در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون توکی انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج اثر استفاده از نانوذرات کورکومین و قند ساکارز بر جنبایی کل اسپرم در جدول ۱ آمده است. نتایج نشان داد که افزودن سطح 25NC100S به رقیق‌کننده نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) موجب بهبود جنبایی کل اسپرم‌ها در تمامی زمان‌های مورد ارزیابی شده بود.

نتایج حاصل از اثر استفاده از نانوذرات کورکومین و قند ساکارز بر جنبایی پیش‌رونده در جدول ۲ آمده است. نتایج این مطالعه نشان داد که رقیق‌کننده دارای 25NC100S توانست به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی جنبایی پیش‌رونده را در هر ۴ زمان مورد بررسی بهبود دهد (P<۰/۰۵).

نتایج اثر افزودن سطوح مختلف نانوذرات کورکومین و قند ساکارز بر زنده‌مانی اسپرم اپیدیدمی قوچ در زمان‌های مختلف در جدول ۳ آمده است. نتایج نشان داد که در تمامی زمان‌ها، رقیق‌کننده دارای 25NC100S نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی به‌طور معنی‌داری زنده‌مانی اسپرم اپیدیدمی قوچ را بهبود داده است (P<۰/۰۵).

جدول ۱- اثر سطوح مختلف نانوذرات کورکومین و قند ساکارز بر درصد جنبایی کل اسپرم قوچ در زمان‌های مختلف پس از سردسازی

Table 1. The effect of different levels of curcumin nanoparticles and sucrose sugar on the total motility percentage of ram sperm at different times after coolin

تیمارها/ زمان‌ها (ساعت) (hours) Times/ Treat	6	12	24	8
Control	69.55^{f}	64.75^{e}	60.21^{d}	45.58^{f}
25 µmol NC	82.86^{b}	74.25^{b}	71.02^{ab}	50.91^{de}
50 µmol NC	78.44^{cd}	73.83^{b}	64.18^{cd}	49.75^{e}
100 mmol S	79.85^{c}	72.81^{bc}	68.29^{bc}	53.53^{bc}
150 mmol S	75.73^{de}	68.14^{de}	64.50^{cd}	50.91^{cde}
25NC100S	87.73^{a}	83.24^{a}	75.15^{a}	57.26^{a}
25NC150S	79.85^{c}	73.83^{b}	68.22^{bc}	54.76^{ab}
50NC100S	75.15^{de}	73.20^{b}	63.92^{cd}	52.93c^{de}
50NC150S	72.44^{ef}	69.55^{cd}	61.95^{d}	49.53^{e}
SEM	2.96	4.03	5.35	2.25

* اعداد دارای حروف غیر مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵) S = ساکارز NC= نانو ذرات کورکومین

* Numbers with non-common letters in each column are significantly different (P<0.05) S= Sucrose NC= Curcumin nanoparticles

1- Computer Assisted Sperm Analyzer

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.44]

جدول ۲- اثر سطوح مختلف نانوذرات کورکومین و قند ساکارز بر درصد جنبایی پیش‌رونده اسپرم قوچ در زمان های مختلف پس از سردسازی
Table 2. The effect of different levels of curcumin nanoparticles and sucrose sugar on the progressive motility percentage of ram sperm at different times after cooling

48	24	12	6	تیمارها/ زمان‌ها (ساعت) (hours) Times/ Treat
31.30^{e}	35.73^{d}	38.65^{e}	46.86^{d}	Control
37.80^{bc}	45.33^{ab}	49.33^{b}	61.06^{ab}	25 µmol NC
35.98^{cd}	41.93^{bcd}	45.51^{cd}	53.48^{bc}	50 µmol NC
37.22^{bc}	44.27^{ab}	47.63^{bc}	56.65^{b}	100 mmol S
34.97^{cd}	43.61^{abc}	43.34^{d}	51.53^{c}	150 mmol S
42.23^{a}	49.46^{a}	56.24^{a}	62.88^{a}	25NC100S
40.15^{ab}	41.93^{abc}	49.69^{b}	54.81^{bc}	25NC150S
36.34^{cd}	41.68^{bcd}	45.64^{cd}	51.72^{c}	50NC100S
33.50^{de}	36.83^{cd}	42.63^{d}	47.33^{d}	50NC150S
2.71	5.26	2.94	3.28	SEM

اعداد دارای حروف غیر مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵) S = ساکارز NC= نانو ذرات کورکومین
❋Numbers with non-common letters in each column are significantly different (P<0.05) S= Sucrose NC= Curcumin nanoparticles

جدول ۳- اثر سطوح مختلف نانوذرات کورکومین و قند ساکارز بر درصد زنده‌مانی اسپرم قوچ در زمان‌های مختلف پس از سردسازی
Table 3. The effect of different levels of curcumin nanoparticles and sucrose sugar on the viability percentage of ram sperm at different times after coolin

48	24	12	6	تیمارها/ زمان‌ها (ساعت) (hours) Times/ Treat
49.78^{d}	60.21^{e}	64.75^{d}	69.55^{f}	Control
57.69^{ab}	71.02^{b}	74.25^{bc}	83.86^{b}	25 µmol NC
54.13^{cd}	64.18^{cde}	73.83^{bc}	78.44^{cd}	50 µmol NC
58.34^{bc}	68.29^{bc}	72.81^{bc}	79.85^{c}	100 mmol S
55.06^{cd}	64.50^{bcd}	68.14^{cd}	75.73^{de}	150 mmol S
61.40^{a}	75.15^{a}	83.24^{a}	87.73^{a}	25NC100S
59.32^{ab}	68.22^{bc}	73.83^{b}	79.85^{c}	25NC150S
56.42^{c}	63.92^{cde}	73.20^{bc}	75.15^{de}	50NC100S
53.85^{cd}	61.95^{de}	69.55^{cd}	72.44^{ef}	50NC150S
1.58	3.63	2.93	3.11	SEM

❋ اعداد دارای حروف غیر مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵) S = ساکارز NC= نانو ذرات کورکومین
❋Numbers with non-common letters in each column are significantly different (P<0.05) S= Sucrose NC= Curcumin nanoparticles

نتایج حاصل از اثر استفاده از سطوح نانوذرات کورکومین و قند ساکارز و ترکیب این دو ماده بر یکپارچگی غشای اسپرم در جدول ۴ آمده است. نتایج نشان داد که تیمار دارای غلظت 25NC100S توانست به‌طور معنی‌داری یکپارچگی غشای اسپرم را در تمامی زمان‌های مورد بررسی نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌های تیماری بهبود دهد (P<۰/۰۵).

جدول ۴- اثر سطوح مختلف نانوذرات کورکومین و قند ساکارز بر درصد یکپارچگی غشای اسپرم قوچ در زمان‌های مختلف پس از سردسازی
Table 4. The effect of different levels of curcumin nanoparticles and sucrose sugar on the sperm membrane integrity percentage of ram sperm at different times after coolin

48	24	12	6	تیمارها/ زمان‌ها (ساعت) (hours) Times/ Treat
46.75^{f}	57.32^{d}	62.02^{d}	66.21^{f}	Control
56.05^{bc}	68.01^{ab}	72.53^{bc}	79.79^{b}	25 µmol NC
50.64^{e}	60.90^{cd}	70.50^{bc}	74.79^{cd}	50 µmol NC
56.09^{bc}	64.63^{bc}	69.98^{bc}	76.30^{bc}	100 mmol S
52.60^{de}	61.08^{cd}	65.42^{cd}	72.62^{cd}	150 mmol S
59.36^{a}	72.39^{a}	77.52^{a}	84.13^{a}	25NC100S
57.27^{ab}	65.06^{bc}	71.03^{b}	75.77^{bc}	25NC150S
54.77^{cd}	60.90^{cd}	69.32^{bc}	71.10^{de}	50NC100S
52.04^{e}	58.61^{d}	66.08^{cd}	67.79^{ef}	50NC150S
1.95	3.83	3.22	3.49	SEM

❋ اعداد دارای حروف غیر مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵) S = ساکارز NC= نانو ذرات کورکومین
❋Numbers with non-common letters in each column are significantly different (P<0.05) S= Sucrose NC= Curcumin nanoparticles

نتایج اثر استفاده از سطوح نانوذرات کورکومین و قند ساکارز بر درصد ناهنجاری‌های اسپرم در جدول ۵ آمده است. نتایج نشان داد که در زمان‌های ۶ و ۱۲ بین تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P<۰/۰۵) ولی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ رقیق‌کننده حاوی 25NC100S به‌طور معنی‌داری درصد ناهنجاری‌های اسپرم را نسبت به سایر سطوح کاهش داده بود (P<۰/۰۵).

جدول ۵- اثر سطوح مختلف نانوذرات کورکومین و قند ساکارز بر درصد ناهنجاری‌های اسپرم قوچ در زمان‌های مختلف پس از سردسازی
Table 5. The effect of different levels of curcumin nanoparticles and sucrose sugar on the percentage of sperm abnormalities ram sperm at different times after cooling

48	24	12	6	تیمارها/ زمان‌ها (ساعت) (hours) Times/ Treat
17.53^{d}	15.72^{b}	14.50^{a}	14.09^{a}	Control
16.58^{bc}	15.30^{ab}	13.93^{a}	13.38^{a}	25 µmol NC
16.63^{bc}	15.67^{b}	14.15^{a}	14.05^{a}	50 µmol NC
16.15^{bc}	15.15^{ab}	13.93^{a}	13.74^{a}	100 mmol S
16.56^{bc}	15.42^{ab}	14.11^{a}	14.07^{a}	150 mmol S
15.83^{a}	14.95^{a}	13.90^{a}	13.25^{a}	25NC100S
15.96^{ab}	15.28^{ab}	13.95^{a}	13.56^{a}	25NC150S
16.58^{cd}	15.38^{ab}	14.11^{a}	14.14^{a}	50NC100S
16.78^{c}	15.50^{ab}	14.30^{a}	14.14^{a}	50NC150S
0.53	0.50	0.59	0.61	SEM

❋ اعداد دارای حروف غیر مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵) S = ساکارز NC= نانو ذرات کورکومین
❋Numbers with non-common letters in each column are significantly different (P<0.05) S= Sucrose NC= Curcumin nanoparticles

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]
[DOI: 10.61186/rap.15.2.44]

ساختمان فسفولیپیدهای غشای اسپرم در اثر تغییرات دمایی دچار تغییر شده و در نتیجه بر همکنش‌های لیپید–پروتئین، لیپید–کربوهیدرات و پروتئین–کربوهیدرات تغییر می‌یابد که این مساله برای فعالیت مناسب غشاء ضروری است. تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) منجر به تغییرات عمده پروتئین، چربی و کربوهیدرات در غشای اسپرم به دلیل کاهش پیوندهای دی سولفیدی بین پروتئین‌های غشایی، پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشایی و تغییرات گلیکوکالیکس اسپرم می‌شود. در نتیجه غشای اسپرم شکننده می‌شود و خاصیت نیمه تراوا آن از بین می‌رود. تولید بیش از حد ROS در طول ذخیره اسپرم همچنین ممکن است باعث آسیب DNA و اختلال در چندین پروتئین آکسونمی و میتوکندری شود که بر فعالیت میتوکندری و یکپارچگی آکسونم تأثیر منفی می‌گذارد و در نتیجه تحرک اسپرم از بین می‌رود (Kasimanickam *et al.*, 2011). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که تشکیل ROS را مهار، سرکوب و یا در تولید آن اختلال ایجاد می‌کنند. ترکیبات متعدد آنتی‌اکسیدانی در رقیق کننده اسپرم قوچ به‌کار رفته و تا حدودی نتایج مفیدی در این مورد حاصل شده است ولی تاکنون ذخیره‌سازی اسپرم قوچ در شرایط سردسازی و انجماد به وضعیت مطلوب نرسیده است (Kameni et al., 2021). کربوهیدرات‌ها در اشکال مختلف (مونوساکاریدها، دی ساکاریدها و تری ساکاریدها) به‌طور گسترده در ذخیره سازی مایع منی مورد توجه قرار گرفته‌اند. ساکارز یک دی ساکارید، غیرقابل نفوذ است که معمولاً در ذخیره سازی اسپرم استفاده می‌شود که خواص آن به توانایی آن در حفظ فشار اسمزی رقیق کننده و یکپارچگی غشای اسپرم نسبت داده می‌شود (Salamon & Maxwell, 2000). نتایج مطالعه حاضر نشانگر این است که به کارگیری نانوذرات کورکومین و قند ساکارز بصورت جداگانه نسبت به گروه شاهد بطور معنی‌داری پارامترهای تحرکی (تحرک کل و پیش‌رونده)، زنده مانی، یکپارچگی غشایی و ناهنجاری‌های اسپرم قوچ را بهبود بخشید ولی بهترین نتیجه در تیمار مخلوط نانوذرات کورکومین و قند ساکارز مشاهده شد بطوریکه رقیق کننده حاوی 25NC100S بطور معنی‌داری تمامی پارامترهای کیفی مورد ارزیابی اسپرم اپیدیدیمی قوچ را نسبت به رقیق کننده‌های دیگر بهبود داد. سطوح بالاتر این دو ترکیب عملکرد پایین‌تری داشت که به نظر می رسد ناشی از بهم خوردن تعادل فشار اسمزی و شرایط بهینه رقیق کننده باشد. تاکنون مطالعه‌ای روی تأثیر افزودن نانوذرات کورکومین به رقیق‌کننده اسپرم انجام نشده است ولی در مورد افزودن کورکومین در رقیق‌کننده چند مطالعه‌ای انجام شده و موفقیت‌آمیز گزارش شده است. استفاده از کورکومین در رقیق کننده اسپرم انسان بعد از انجماد مثبت ارزیابی شده و موجب بهبود تحرک پیشرونده پس از ذوب، تراکم کروماتین اسپرم و یکپارچگی DNA شد (Karakus et al., 2021). استفاده از ۲۵ میکرومولار کورکومین در رقیق کننده بر پایه تریس اسپرم گاو در دو مرحله سردسازی و انجماد توانست بطور معنی‌داری پارامترهای تحرک، زنده مانی، یکپارچگی غشاء را بهبود بخشد (Tvrda et al., 2016). در یک مطالعه مشابه دیگر، افزودن ۲۵ میکرومولار کورکومین به رقیق‌کننده اسپرم گاو منجر به حفظ حرکت، فعالیت میتوکندری، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم گاو بعد از انجماد شد (Tvrdá et al., 2018). همچنین افزودن ۰/۵ میلی‌مولار کورکومین به رقیق‌کننده اسپرم گاو منجر به کاهش درصد ناهنجاری کل اسپرم در مقایسه با گروه شاهد شد ولی این سطح بر روی پارامترهای دیگر مانند لیپید پراکسیداسیون و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی محیط اسپرم تأثیر معنی‌داری نداشت (Bucak et al., 2012). در یک مطالعه‌ای سطوح مختلف کورکومین، الاژیک اسید و متیونین بصورت جداگانه و مخلوط به رقیق کننده اسپرم قوچ اضافه شد که سطح مخلوط بهترین عملکرد را نسبت به سطوح جداگانه داشت و پارامترهای تحرکی، زنده مانی، سلامت آکروزومی و غشایی اسپرم قوچ را بطور معنی‌داری حفظ کرده بود (Bucak et al., 2012). در یک مطالعه مقایسه‌ای کورکومین با اینوزیتول و کارنیتین، افزودن ۲/۵ میلی‌مولار کورکومین به رقیق‌کننده اسپرم بز توانست به‌طور معنی‌داری پارامتر جنبایی پیش‌رونده را نسبت به سایرگروه‌ها بهبود دهد ولی هرچند در مورد سایر پارامترهای تحرکی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در همین مطالعه افزودن سطوح ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی مولار کورکومین توانست درصد ناهنجاری کل و سلامت غشای آکروزوم اسپرم را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد ولی تأثیر معنی‌داری بر کاهش غلظت مالون دی آلدئید و حفظ فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نداشت (Bucak et al., 2010). افزودن ۱/۵ میلی مولار کورکومین به رقیق‌کننده اسپرم گاومیش هم توانست بعد از انجماد/یخ گشایی پارامترهای تحرکی و یکپارچگی DNA، زنده‌مانی، سلامت آکروزوم، یکپارچگی غشای اسپرم گاومیش را نسبت به گروه شاهد به‌طورمعنی‌داری بهبود دهد (Shah et al., 2017). افزودن کورکومین به رقیق‌کننده حاوی اسپرم بز آنقوره توانست پارامترهای تحرک، زنده‌مانی را به‌طور معنی‌داری بهبود دهد و از طرف دیگر موجب کاهش بروز فرآیند LPO شد. همچنین این ماده به علت خاصیت ضد سرمایی بسیار کارآمد، می‌تواند بعنوان یک محافظت‌کننده در برابر شوک سرمایی و آسیب اکسیداتیو عمل کند که این مهم اخیرا مورد توجه محققان قرار گرفته است (Bucak et al., 2010). با وجود گزارشات مثبت در رابطه با افزودن کورکومین در رقیق‌کننده، اما حلالیت و زیست‌فراهمی پایین در محلول‌های آبی و همچنین متابولیسم سریع کورکومین در محیط‌های اسیدی و دمای پایین، استفاده از این ماده را با محدودیت مواجه کرده است (Tsai et al., 2011). در صنایع دارویی و غذایی یکی از روش‌هایی که برای رفع این محدودیت به کار گرفته شده است، استفاده از فناوری نانولیپوزوم است. از آنجایی که لیپوزوم‌ها ساختار مشابهی با غشای سلول دارند و به دلیل وجود فسفولیپیدها در ساختمان خود، وقتی در محیط آبی قرار می‌گیرند به‌صورت کروی شکل درآمده و می‌توانند ترکیبات آب‌گریز و آب‌دوست را حمل کنند. این لیپوزوم‌ها در محیط اطراف سلول‌های هدف با سازوکارهایی مانند چسبیدن به

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]
[DOI: 10.61186/rap.15.2.44]

غشای سلول هدف و همجوشی با غشا، یکی شدن 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 (Nazari-Vanani *et al*., 2017). با بهره‌گیری از روش نانولیپوزوم در این مطالعه، علاوه بر رفع حلالیت این ماده در محلول آبی (رقیق کننده) به‌نظر می‌رسد علت تداوم اثرگذاری نانوذرات کورکومین بخصوص در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ می‌تواند ناشی از روش نانولیپوزوم باشد. هرچند جهت اثبات این موضوع نیاز به مطالعات بیشتری می‌باشد. همچنین در مطالعه حاضر مشخص شد که استفاده از قند ساکارز می‌تواند تاثیر مثبتی بر کیفیت اسپرم قوچ در طی مرحله سردسازی داشته باشد که به‌نظر می‌رسد ساکارز با حفظ فشار اسمزی و آبکشی اولیه اسپرم‌ها را از شوک سرمایی محافظت می‌کند. در یک مطالعه‌ای افزودن ۰/۴ مول ساکارز به رقیق کننده اسپرم قوچ توانست مورفولوژی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشایی و تحرک اسپرم را هم در مرحله سردسازی و هم بعد از انجماد بهبود دهد (Arando et al., 2017). در مطالعات انجام شده، دی ساکاریدهای مختلف (ساکارز، ترهالوز) و یا تری ساکاریدها (رافینوز) به‌طور موفقیت‌آمیزی در رقیق‌کننده‌های اسپرم قوچ (Bucak et al., 2013)، گاو نر (El-Sheshtawy et al., 2015; Tuncer et al., 2011) و بز (Farshad & Akhondzadeh, 2008) گنجانده شده‌اند. تاکنون مطالعه‌ای بر روی مخلوط نانوذرات کورکومین و قند ساکارز بر فرآیند سردسازی اسپرم صورت نگرفته است که این مطالعه می‌تواند اولین گزارش در این زمینه باشد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن ۲۵ میکرومولار نانوذرات کورکومین و ۱۰۰ میلی مولار قند ساکارز بصورت ترکیبی می‌تواند موجب بهبود تمامی پارامترهای کیفی مورد ارزیابی اسپرم قوچ در دمای ۵°C (سردسازی) شده و استفاده از فناوری نانو با فرم نانولیپوزوم می‌تواند اثرگذاری کورکومین را به مراتب ارتقا بخشد. از این‌رو افزودن سطح 25NC100S به رقیق‌کننده اسپرم قوچ پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

از زحمات پرسنل مرکز تحقیقات کاربردی داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز بخصوص آقای حامد همیشه کار و آقای سجاد امجدی تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

Ahmed-Farid, O. A., Nasr, M., Ahmed, R. F., & Bakeer, R. M. (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*, 1-14.

Aisen, E., Medina, V., & Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *theriogenology, 57*(7), 1801-1808.

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.

Arando, A., Gonzalez, A., Delgado, J., Arrebola, F., & Perez-Marín, C. (2017). Storage temperature and sucrose concentrations affect ram sperm quality after vitrification. *Animal reproduction science, 181*, 175-185.

Bansal, A. K., & Bilaspuri, G. (2011). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary medicine international, 2011*(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., Keskin, N., Taşpınar, M., Çoyan, K., Başpınar, N., Cenariu, M. C., Bilgili, A., Öztürk, C., & Kurşunlu, A. N. (2013). Raffinose and hypotaurine improve the post-thawed Merino ram sperm parameters. *Cryobiology, 67*(1), 34-39.

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.

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.

El-Sheshtawy, R. I., Sisy, G. A., & El-Nattat, W. S. (2015). Effects of different concentrations of sucrose or trehalose on the post-thawing quality of cattle bull semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction, 4*(1), 26-31.

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

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.44]

Farshad, A., & Akhondzadeh, S. (2008). Effects of sucrose and glycerol during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, *21*(12), 1721-1727.

Ikeda, M., Kodama, H., Fukuda, J., Shimizu, Y., Murata, M., Kumagai, J., & Tanaka, T. (1999). Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biology of reproduction*, *61*(2), 393-399.

Isaac, A. V., Kumari, S., Nair, R., Urs, D. R., Salian, S. R., Kalthur, G., Adiga, S. K., Manikkath, J., Mutalik, S., & Sachdev, D. (2017). Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation medium minimizes the freeze-thaw-induced damage to spermatozoa. *Biochemical and biophysical research communications*, *494*(3-4), 656-662.

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.

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., 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.

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*, Vol. 7, No.2:152-161. (In Persian).

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.

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.

Thumann, A., & Mehta, P. (2020). Standards, codes and regulations. In *Energy Management Handbook* (pp. 549-559). River Publishers.

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.

Tuncer, P. B., Sarıözkan, S., Bucak, M. N., Ulutaş, P. A., Akalın, P. P., Büyükleblebici, S., & Canturk, F. (2011). Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *theriogenology*, *75*(8), 1459-1465.

Tvrdá, E., Greifová, H., Mackovich, A., Hashim, F., & Lukáč, N. (2018). Curcumin Offers Antioxidant Protection to Cryopreserved Bovine Semen. *Czech Journal of Animal Science*, *63*(7).

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.

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

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.44]