نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۳؛ ۱۸(۱): ۱۳-۲۳.
http://doi.org/10.22034/ijvcs.2024.14469.1056

مقایسه شاخص‌های قابل اندازه‌گیری توسط CASA در نمونه‌های اسپرم گاوهای نر سیمنتال همراه‌شده با غلظت‌های متفاوت نانوکورکومین

امیر خاکی[1]*، شهره عالیان سماک خواه[2]، امیر افشنگ[3]

۱. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل- ایران.
۲. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل- ایران.
۳. دانشجوی رشته علوم آزمایشگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل- ایران.

دریافت: ۲ مردادماه ۱۴۰۲ **پذیرش:** ۲۵ فروردین‌ماه ۱۴۰۳

چکیده

زردچوبه (*Curcuma longa*) گیاهی چندساله متعلق به خانواده زنجبیل است. فراهمی زیستی ضعیف کورکومین به‌دلیل جذب پایین، سوخت‌وساز سریع و حذف سیستمیک سریع از بدن و همچنین میزان حلالیت کم، مشکلی مهم در استفاده از آن است. یکی از پیشنهادها به‌منظور بهبود فراهمی زیستی کورکومین، استفاده از نانوذرات آن است. مشخص شده که کورکومین اثرات آنتی‌اکسیدانی چشمگیری داشته و استفاده از آن سبب بهبود فعالیت تولیدمثلی جنس نر می‌شود؛ بنابراین، هدف این مطالعه بررسی اثرات افزودن نانوکورکومین به رقیق‌کننده اسپرم بر پارامترهای کیفی منی در اسپرم‌های تازه و یخ‌گشایی شده در گاوهای نر سیمنتال دومنظوره (Fleckvieh) بود. نمونه‌های منی از ۱۲ گاو نر در سه تکرار در بازه زمانی سه‌ماهه اخذ شد. هر انزال به‌طور مساوی به سه قسمت برای گروه‌های آزمایشی (کنترل، نانوکورکومین ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و نانوکورکومین ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) تقسیم شد. انجماد اسپرم به‌روش رقیق‌سازی دومرحله‌ای انجام شد. پارامترهای کیفی اسپرم شامل تحرک، زنده‌مانی، شکل‌شناسی و یک‌پارچگی غشا قبل و بعد انجماد بررسی شدند. نتایج یافته‌ها نشان داد که نانوکورکومین بر کیفیت اسپرم‌های قبل از انجماد تأثیر مثبتی نداشت، اما سبب افزایش تحرک و پارامترهای تحرک در گروه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در اسپرم‌های منجمد یخ‌گشایی شده گردید. ازآنجایی‌که تحرک پیش‌رونده پس از انجماد از مهم‌ترین شاخص‌های تخمین کیفیت اسپرم است، پیشنهاد می‌شود نانوکورکومین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم به رقیق‌کننده اسپرم گاوهای نر اضافه شود و پژوهش‌های برون‌تنی و درون‌تنی جهت تعیین میزان باروری و نرخ آبستنی در تخمک‌های بارورشده و گاوهای ماده لقاح‌یافته با اسپرم‌های غنی‌شده با نانوکورکومین، انجام شود.

واژه‌های کلیدی: نانوکورکومین، کیفیت اسپرم، سیمنتال

مقدمه

زردچوبه (*Curcuma longa*) گیاهی چندساله متعلق به خانواده زنجبیل است. ریزوم آن منبع پودر زردچوبه است که به‌عنوان ادویه استفاده می‌شود. زردچوبه دارای چندین ترکیبات فیتوشیمیایی است که طیف گسترده‌ای از خواص دارویی ازجمله عملکرد علیه تومور سلولی، اختلالات هورمونی، التهاب، عفونت باکتریایی، استرس اکسیداتیو و انگل‌ها را دارا است (۷). عنصر فعال اصلی زردچوبه، کورکومین (diferuloylmethane)، یک پلی‌فنل چربی‌دوست بوده که عملاً نامحلول در آب است، اما در pH اسیدی معده کاملاً پایدار است. فعالیت دارویی زردچوبه، به‌طور چشمگیری وابسته به فعالیت زیستی کورکومین است (۱۶). فراهمی زیستی ضعیف کورکومین به دلیل جذب پایین، سوخت و ساز سریع و حذف سیستمیک سریع از بدن یک مسأله مهم در استفاده از این ماده است (۵). یکی از پیشنهادات به‌منظور بهبود فراهمی زیستی کورکومین استفاده از نانوذرات کورکومین که جذب خوراکی را افزایش می‌دهد، است (۲۲). استفاده از نانوذرات کورکومین باعث

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: a.khaki@ausmt.ac.ir

افزایش توزیع بافتی و نیمه‌عمر آن در موش صحرایی شده‌است (۲۱).

پژوهش‌های متعددی وجود دارد که در آن‌ها حیوانات آزمایشگاهی نر در معرض ترکیبات سمی قرار گرفته و درنتیجه فعالیت دستگاه تولیدمثلی آن‌ها دچار اختلال می‌شود. در پژوهش‌های ذکرشده نشان داده شده است که کورکومین اثر محافظتی چشمگیری بر آسیب‌های واردشده به بیضه و پارامترهای کیفی اسپرم دارد. ازجمله آن‌ها می‌توان به موارد ذیل اشاره کرد؛ محافظت در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از دی‌کرومات‌پتاسیم بر سمیت تولیدمثلی در رت‌های نر بالغ (۱۰)، بهبودی اثرات سمی کلریدکادمیوم بر دستگاه تناسلی رت‌های نر (۲۳)، اثر محافظتی بر سمیت تولیدمثلی ناشی از تقویت‌کننده طعم مونوسدیم‌گلوتامات در رت‌های نر (که تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از این تقویت‌کننده طعم را در بیضه و اپیدیدیم بهبود بخشید و تعداد اسپرم را افزایش داد. همچنین به‌طور چشمگیری تستوسترون و میزان هورمون LH سرم را افزایش داد) (۲۶)، مهار اثرات نامطلوب ناشی از نیکوتین بر شاخص‌های تولیدمثلی (۱۵)، اثرات بهبودبخشی بر استرس اکسیداتیو، آپوپتوز بافت بیضه و کیفیت اسپرم ناشی از آلومینیوم در رت‌های نر (۱۱)، افزایش میانگین درصد تحرک اسپرم، تعداد اسپرم، وزن بیضه و سطح سرمی تستوسترون در رت‌های نر دریافت‌کننده کورکومین با غلظت‌های ۱۰، ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در موش‌های تحت درمان با مورفین و بهبود تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از مورفین در بیضه و افزایش تعداد اسپرم (۲۴)، اثر محافظتی مطلوب در برابر سمیت بیضه ناشی از استات سرب در موش‌ها با بهبود بافت بیضه، افزایش تعداد اسپرم، تحرک، زنده‌مانی، و افزایش سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون‌پراکسیداز و کاهش مالون‌دی‌آلدئید (۳۱)، نقش محافظتی در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از پاراستامول و اختلال عملکرد کبد، کلیه و بیضه (۱۲) اثرات مثبت بر باروری رت‌های نری که در معرض نور شدید لامپ‌های فلورسنت قرار داشتند (۲۰) و اثرات التیام‌بخشی کورکومین در برابر آسیب بیضه ناشی از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در موش (۱۸)، کاهش سمیت بیضه ناشی از دوکسوروبیسین (۳). همچنین بیان شد که تجویز کورکومین به میزان ۲۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۱۴ روز قبل و بعد از تزریق سیکلوفسفامید اثرات مخرب آن را بر محور بیضه، مغز و هیپوفیز در رت‌ها با افزایش سطح آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی در اپیدیدیم، حفظ ساختارهای بافتی اپیدیدیم، فعالیت‌های ضدآپوپتوزی، افزایش کیفیت و کمیت اسپرم و سرکوب شاخص‌های التهابی و همچنین فعالیت‌های کاسپاز-۳ بهبود خواهد بخشید (۲).

پژوهش‌هایی نیز در زمینه تأثیر کورکومین بر تولیدمثل نرهای دیابتی انجام شده است که می‌توان به موارد ذیل اشاره کرد؛ اثر محافظتی بر شاخص‌های کیفی اسپرم و تغییرات بافت بیضه در رت‌های دیابتی (۲۵). بلهان و همکاران (۲۰۲۰) اثر بر شاخص‌های اسپرم، هورمون‌های تولیدمثلی، پروفایل لیپیدی، شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی بیوشیمیایی و ساختار هیستوپاتولوژیک بیضه در موش‌های صحرایی نر دیابتی با دوز خوراکی ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم که سبب افزایش تحرک و تراکم اسپرم و کاهش میزان اسپرم غیرطبیعی و پروفایل لیپیدی و افزایش سطح هورمون FSH و تستوسترون (۸).

تجویز کورکومین به‌عنوان یک پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد، می‌تواند سطح نیتروژن‌مونوکسید را کاهش داده و شاخص‌های اسپرم را در رت‌های نر مبتلا به واریکوسل بهبود بخشد (۱۴). تجویز نانوذرات اکسید آهن سوپر پارامغناطیس بارگذاری شده با کورکومین در جیره غذایی می‌تواند اثرات مضر ایسکمی بیضه را جبران کند و کیفیت کروماتین اسپرم را در موش‌ها بهبود بخشد (۲۹). کورکومین می‌تواند به‌طور چشمگیری تحرک اسپرم بیماران لکوسیتوسپرمی را در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 بهبود بخشد (۳۳). مردانی مبتلا به آستنوتراتوزواسپرمیا که روزانه ۸۰ میلی‌گرم نانومیسل‌کورکومین را به مدت ۱۰ هفته دریافت کردند، افزایش چشمگیری در تعداد کل اسپرم، غلظت و تحرک اسپرم و بهبود در سطوح پلاسما ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، مالون‌دی‌آلدئید، پروتئین واکنش‌گر C و فاکتور a نکروز تومور در مقایسه با گروه دارونما شد. (۴). در

پژوهشی با هدف ارزیابی اثر تجویز دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن کورکومین به موش‌های مسن شده به‌واسطه تزریق با ۳۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن دی‌گالاکتوز بر کیفیت اسپرم و استرس اکسیداتیو، این نتیجه حاصل شد که تجویز کورکومین به مدت ۱۴ روز باعث بهبود کیفیت اسپرم و کاهش استرس اکسیداتیو در بیضه موش‌های مسن می‌گردد (۳۲)؛ بنابراین در خصوص تأثیر کورکومین بر شاخص‌های کیفی اسپرم، هدف از این پژوهش بررسی اثرات افزودن ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوکورکومین به رقیق‌کننده اسپرم بر کیفیت اسپرم تازه و منجمد یخ‌گشایی شده در گاوهای نر سیمنتال دومنظوره بود.

به‌منظور انجام این پژوهش، از ۱۲ گاو نر مولد نژاد سیمنتال دومنظوره آلمانی (سه تکرار برای هر گاو و در مجموع ۳۶ انزال) که پیش‌تر مراحل ارزیابی توان تولیدمثلی آن‌ها در مرکز اصلاح‌نژادی و تولید اسپرم گاو سیمنتال ایران (شرکت آمارددام طبرستان) واقع در شهرستان آمل انجام و به تأیید مرکز اصلاح نژاد کشور رسید، به‌عنوان مولدین سالم بارور استفاده شد. تمامی گاوهای نر این مرکز از یک گله مولد نژاد سیمنتال خالص و تحت شرایط نگه‌داری و تغذیه کاملاً یکسان تأمین شدند. ترکیبات، درصد نهاده‌ها و مقدار خوراک مصرفی دام‌ها در جدول شماره یک درج شده است. نمونه‌گیری اسپرم طی بازه زمانی ۳ ماهه (فروردین ماه تا خرداد ماه سال ۱۴۰۲) با استفاده از مهبل مصنوعی انجام شد.

مواد و روش کار

جدول۱- ترکیبات، درصد و مقادیر جیره غذایی گاو نر تولیدمثلی نژاد سیمنتال دومنظوره آلمانی (Fleckvieh)

ترکیبات جیره	مقدار (کیلوگرم)	ترکیبات شیمیایی					
		پروتئین خام (٪)	NDF (٪)	ADF (٪)	چربی (٪)	خاکستر (٪)	ماده خشک (٪)
کنسانتره[a]	۹	۱۴/۶۸	۱۶/۸	۱۳/۱	۳/۲	۷/۴	۸۹/۲
سیلو	۱۸	۸/۵	۵۴/۵	۳۲/۷	۱/۸	۵/۷	۲۵
یونجه	۳	۱۶/۸	۴۴/۷	۳۴/۶	۲/۵	۹/۷	۱/۸۸
کاه	در اختیار دام	۳/۹	۷۰/۳	۴۵/۵	۱/۱	۹/۸	۹۴/۸
مکمل معدنی[b]	در اختیار دام	-	-	-	-	-	-
آب	در اختیار دام	-	-	-	-	-	-

[a] کلسیم ۰/۷۴٪، فسفر ۰/۵۳٪، سدیم ۰/۴۹٪، منیزیم ۰/۲۹٪، روی ۳۷۵ ppm، منگنز ۳۸۱/۴۴ ppm، کبالت ۱/۰۱ ppm، سلنیوم ۲/۷۵ ppm و افزودنی‌های ویتامینه (ویتامین ۷۵۰۰AU/kg، ویتامین ۱۰۰۰D3U/kg، ویتامین ۱۰ Emg/kg). [b] منیزیم ۲/۱٪، سدیم ۷٪، آهن ۳۵۵ mg/kg، روی ۱۵۶۰ mg/kg، مس ۳۹۰ mg/kg، منگنز ۱۵۶۰ mg/kg، سلنیوم ۷/۵ mg/kg، کبالت ۳ mg/kg، ید ۱۵/۵ mg/kg. ADF (Acid Detergent Fiber) فیبرهای نامحلولی که در شوینده اسیدی باقی می‌مانند. NDF (Neutral Detergent Fiber) فیبرهای نامحلولی که در شوینده خنثی باقی می‌مانند. منبع: داده‌ها به‌وسیله آزمایشگاه تغذیه دام دانشکده علوم دامی دانشگاه تهران محاسبه شده‌اند.

نمونه‌های منی توسط مهبل مصنوعی که از قبل در دمای ۴۶ °C گرم شده بود، جمع‌آوری و هر انزال به سه قسمت مساوی جهت این پژوهش نظر تقسیم شد (گروه کنترل، گروه ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و گروه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر). آماده‌سازی جنسی گاو نر با سه پرش کاذب با ایستادن به مدت ۱۰ دقیقه در کنار مانکن مقید شده در باکس اسپرم‌گیری که یک گاو نر بود انجام شد. فوری پس از اسپرم‌گیری شاخص‌های کیفی اسپرم از قبیل حجم انزال و غلظت منی بررسی شد. غلظت اسپرم‌ها با دستگاه فتومتر SDM 1 (مینی‌تیوب، تیفنباخ، آلمان) اندازه‌گیری شد. برای تخمین تحرک اسپرم تازه، دو قطره کوچک از مایع منی رقیق‌شده روی یک لام شیشه‌ای ریخته و با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست MBL 2000 (مینی‌تیوب،

تیفنباخ، آلمان) با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر مجهز به صفحه گرم، آنالیز شد.

در این پژوهش از رقیق‌کننده استریدیل محصول کمپانی مینی‌تیوب کشور آلمان با شماره ثبت ۱۳۵۰۰/۰۲۶۰ (مینی‌تیوب، تیفنباخ، آلمان) استفاده شد. ترکیبات آن شامل تریس، اسید سیتریک، قند، بافرها، گلیسرول، خالص‌ترین آب، زرده تخم‌مرغ استریل و آنتی‌بیوتیک‌ها (تایلوزین، جنتامایسین، اسپکتینومایسین، لینکومایسین) است. برای تهیه رقیق‌کننده نهایی ۷۵۰ میلی‌لیتر آب خالص دو بار تقطیر به یک بسته کامل رقیق‌کننده استریدیل در یک ارلن ۱۵۰۰ میلی‌لیتری اضافه شد.

در این پژوهش از نانوکورکومین کپسول ژلاتینی سیناکورکومین (شرکت سینادارو، ایران، تهران) با شماره پروانه بهداشتی ۱۲۲۸۲۲۵۷۶۵ استفاده شد. هر کپسول حاوی ۴۰ میلی‌گرم نانوکورکومین بود که با سرنگ به‌طور کامل تخلیه و به داخل میکروتیوب‌های با گنجایش ۱ میلی‌لیتر قرار داده شد و در رک شناور در بن‌ماری قرار گرفت. سپس باتوجه‌به مقدار رقیق‌کننده لازم برای هر انزال و با محاسبه، حجم لازم جهت تهیه رقیق‌کننده‌های حاوی نانوکورکومین ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه می‌شد. پس از افزودن نانوکورکومین به فلاسک‌های دارای رقیق‌کننده آماده که داخل آن مگنت استریل قرار داشت، بر روی استیرر مغناطیسی حاوی صفحه گرم قرار داده می‌شد تا به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه به‌خوبی همگن‌سازی شود.

ترکیب پیش رقیق‌سازی با افزودن ملایم رقیق‌کننده آماده به مایع منی با نسبت ۱:۱ تهیه شد. سپس این محلول به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری تنظیم شده در دمای ۳۴ °C قرار داده شد. حجم نهایی رقیق‌کننده لازم به صورت فرمول زیر محاسبه شد. تعداد دوز اسپرم = (حجم منی × غلظت مایع منی × درصد تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها × درصد اسپرم‌های طبیعی از لحاظ شکل‌شناسی) ÷ (تعداد اسپرم در هر پایت [۱۵ میلیون]).

در این پژوهش انجماد به روش رقیق‌سازی دومرحله‌ای انجام شد. قبل از محاسبه میزان رقیق‌کننده نهایی لازم برای هر نمونه، ترکیب پیش رقیق‌سازی که به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۴ °C قرار داشت، به‌آرامی به یک ظرف شیشه‌ای مات حاوی درپوش با گنجایش ۵۰۰ میلی‌لیتر اضافه شد که از قبل حاوی ۲۰ میلی‌لیتر رقیق‌کننده آماده شده بود که این ترکیب نیز از قبل در دمای ۳۴ °C در بن‌ماری قرار داشت. ترکیب به‌دست‌آمده در این ظرف در یک ظرف پلاستیکی حاوی آب ۳۴ °C قرار داده شد. سپس بطری در یک کابینت سرد در دمای ۴ °C به مدت یک ساعت و سی دقیقه قرار داده شد. در نهایت رقیق‌کننده نهایی با افزودن رقیق‌کننده محاسبه شده باقیمانده که قبلاً در کابینت سرد در دمای ۴ °C نگه‌داری می‌شد، به ظرف حاوی اسپرم رقیق‌شده، تهیه شد. مایع منی رقیق‌شده نهایی به مدت پنج ساعت دور از نور در کابینت سرد به تعادل رسید. مایع منی رقیق‌شده در پایت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری (مینی‌تیوب، اسلوواکی) در دمای ۴ °C در یک کابینت سرد با دستگاه پرکننده و پرچ‌کننده خودکار پایت‌ها به نام MPP Uno (مینی‌تیوب، تیفنباخ، آلمان)، بسته‌بندی شد. سپس پایت‌ها روی سینی‌های مخصوص پایت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری قرار گرفتند. منی بسته‌بندی شده در دستگاه انجماد MT Freezer (مینی‌تیوب، تیفنباخ، آلمان) بر اساس پروتکل زیر منجمد شد: از ۴ °C + تا ۱۲ °C- با سرعت ۴ °C- در دقیقه، از ۱۲ °C- تا ۴۰ °C- با سرعت ۴۰ °C- در دقیقه و از ۴۰ °C- تا ۱۲۰ °C- با سرعت ۵۰ °C- در دقیقه. سپس پایت‌های منجمدشده در گوبلت‌های جداگانه درون کنیسترهای کانتینر نیتروژن مایع ذخیره شدند.

تحرک اسپرم تازه و منجمد یخ‌گشایی شده با استفاده از نرم‌افزار CASA (هوشمند فناور، تهران، ایران) تعیین شد. به‌منظور یخ‌گشایی منی منجمد، پایت‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در آب ۳۸ °C قرار داده می‌شدند. پارامترهای تحرک اسپرم از قبیل درصد تحرک پیش‌رونده (PM)، سرعت واقعی اسپرم‌ها در مسیر واقعی طی شده (VCL)، سرعت مستقیم‌الخط اسپرم‌ها (VSL)، سرعت در مسیر منحنی

میانگین (VAP)، متوسط زاویه چرخشی (MAD)، حداکثر دامنه حرکات جانبی (ALH)، فرکانس حرکات جانبی (BCF)، خطی‌بودن (LIN که برابر است با خارج‌قسمت VSL به VCL)، حرکات لرزشی (WOB که برابر است با خارج‌قسمت VAP به VCL) و معیار مستقیم‌الخط بودن (STR که برابر است با خارج‌قسمت VSL به VAP) ارزیابی شد. همه آنالیزها با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به صفحه‌گرم که نمونه‌ها را در دمای ۳۸ °C نگه‌داری می‌کرد و حاوی یک محفظه برای جلوگیری از کاهش تحرک اسپرم در طول تجزیه‌وتحلیل بود، انجام گرفت (Sperm meter, Depth 10 micron, Surface Graticule, 100x 0.1 SQMM).

به‌منظور بررسی درصد اسپرماتوزوئیدهای زندهٔ هر انزال، از رنگ‌آمیزی ائوزین نیگروزین (ائوزین جی ۲٪، ۱۵۴۰۵/۰۰۲۵ – نیگروزین ۴٪، ۱۵۴۰۵/۰۰۲۹، مینی‌تیوب، آلمان) استفاده شد. روش کار به‌طور خلاصه به شرح ذیل است؛ پس از این‌که اسپرم‌ها در رقیق‌کنندهٔ نهایی قرار گرفتند، یک قطره از اسپرم‌های ترکیب شده با رقیق‌کنندهٔ نهایی با یک قطره ائوزین ۲٪ و دو قطره نیگروزین ۴٪ به‌آرامی با سمپلر ترکیب شده و بر روی لام شیشه‌ای قرار گرفته و از آن گسترش تهیه شد. گسترش‌های تهیه شده بر روی صفحه‌گرم خشک شده و پس از آن حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ بررسی شدند. اسپرم‌های مرده به علت نفوذپذیری بالای غشای سلولی خود، رنگ ائوزین را به خود گرفته و قرمزرنگ می‌شوند و از اسپرم‌های زنده که این رنگ را به خود نمی‌گیرند کاملاً متمایز هستند و به‌این‌ترتیب درصد اسپرماتوزوئیدهای زنده به‌دست آمد. جهت بررسی درصد اسپرماتوزوئیدهای غیرطبیعی قبل و بعد از انجماد نیز از رنگ‌آمیزی ائوزین نیگروزین استفاده شد. حداقل ۲۰۰ اسپرم از هر لام از لحاظ شکل‌شناسی اسپرم‌ها در موارد غیرطبیعی در قسمت‌های سر، قسمت میانی، دم و حضور قطره سیتوپلاسمی قرار گرفتند.

به‌منظور ارزیابی سلامت غشای اسپرم از تست تورم هیپواسموتیک (HOST) استفاده شد. محلول هیپواسموتیک بر اساس فشار اسمزی محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند و اسپرم با قرارگرفتن در این محیط به‌سرعت واکنش نشان می‌دهد. واکنش اسپرم به محیط هیپواسموتیک به‌صورت تورم دم است. در این حالت اسپرم‌هایی که غشای پلاسمایی سالمی دارند به محلول واکنش داده؛ ولی اسپرم‌های ناسالم بدون واکنش باقی می‌مانند. در واقع پس از انجام این تست، اسپرم‌های با دم گره‌خورده به‌عنوان اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم و اسپرم‌های که دم آن‌ها صاف است به‌عنوان اسپرم‌های با غشای پلاسمایی آسیب‌دیده تلقی می‌شوند. بدین ترتیب، ۱۰ میکرولیتر از منی تازه و منجمد یخ‌گشایی شده با ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هیپواسموتیک که حاوی فروکتوز (۹ گرم در لیتر) و سیترات سدیم (۴/۹ گرم در لیتر) بود مخلوط و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد. در نهایت حداقل ۳ قطره از نمونه انکوبه‌شده با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست بررسی شد. بررسی میکروسکوپی برروی صفحه‌گرم تنظیم‌شده در دمای ۳۸ °C و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر صورت گرفت. در هر لام حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های با غشای سالم محاسبه شد.

جهت انجام تجزیه‌وتحلیل آماری ابتدا تحلیل آماری توصیفی برای به‌دست‌آوردن میانگین و انحراف‌معیار در خصوص هر یک از متغیرهای آزمایش‌شده، انجام شد. سپس منطبق بودن داده‌های مرتبط با ویژگی‌های کیفی اسپرم‌های تازه و منجمد یخ‌گشایی شده با توزیع نرمال توسط آزمون آماری شاپیرو ویلک (Shapiro-Wilk test) بررسی گردید. جهت تعیین ویژگی‌های کیفی اسپرم بین گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون آماری کروسکال والیس (Kruskal Wallis) و مقایسه دوبه‌دو بین گروه‌ها با استفاده از آزمون یومن-ویتنی با تصحیح بونفرونی انجام شد. در تمام آزمون‌ها سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری IBM SPSS نسخه ۲۶ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) تحلیل شدند.

نتایج

پارامترهای کیفی اسپرم در منی تازه و منجمد یخ‌گشایی شده در گروه‌های کنترل، غلظت‌های نانوکورکومین ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در جداول دو و سه نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول شماره دو مشاهده می‌گردد، در مایع منی تازه در گروه نانوکورکومین ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر از نظر متغیرهای VCL، VSL، VAP، MAD، ALH، BCF، Viab و Tail کمتر از سایر گروه‌های مطالعه‌شده و از نظر شاخص‌های Morph، Head، Cy.D عدد بیشتری را نشان می‌دهد که دارای اختلاف آماری معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$). سایر شاخص‌های بررسی‌شده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مطالعه‌شده نشان ندادند. از نظر شاخص‌های VCL، VSL، VAP، MAD، ALH، BCF، Morph، Head و Cy.D گروه نانوکورکومین ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و نانوکورکومین ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بود ($p<۰/۰۵$) و بین گروه کنترل و گروه نانوکورکومین ۵۰ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. از نظر شاخص Viab بین گروه نانوکورکومین با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌دار دیده شد ($p<۰/۰۵$) ولی با گروه کنترل اختلافی وجود نداشت. همچنین از نظر شاخص Tail گروه کنترل با هر دو گروه نانوکورکومین اختلاف معنی‌دار نشان داد ($p<۰/۰۵$) ولی بین دو گروه نانوکورکومین اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد.

جدول ۲- میانگین ± انحراف‌معیار ویژگی‌های کیفی اسپرم‌های تازه رقیق‌شده در گروه‌های کنترل و نانوکورکومین

پارامتر	کنترل	نانوکورکومین ۵۰		P-value*
		۵۰ میلی‌گرم در لیتر	۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر	
PM (%)	۷۵/۲۹ ± ۶/۱۵^{a}	۷۴/۴۳ ± ۸/۱۳^{a}	۷۶/۱۹ ± ۴/۴۲^{a}	۰/۸۹
VCL (µm/S)	۶۴/۳۷ ± ۱۵/۵۲^{a}	۶۳/۸۸ ± ۱۶/۷۲^{a}	۴۷/۴۸ ± ۱۲/۲۶^{b}	۰/۰۰۱
VSL (µm/S)	۳۰/۲۸ ± ۹/۵۰^{a}	۳۰/۱۷ ± ۹/۳۶^{a}	۲۱/۹۵ ± ۴/۵۰^{b}	۰/۰۰۱
VAP (µm/S)	۴۰/۶۷ ± ۱۰/۵۷^{a}	۴۰/۵۳ ± ۱۰/۸۶^{a}	۲۹/۰۴ ± ۶/۱۴^{b}	۰/۰۰۱
MAD	۳۳/۸۷ ± ۹/۱۵^{a}	۳۲/۵۰ ± ۹/۸۶^{a}	۲۳/۶۸ ± ۹/۶۶^{b}	۰/۰۰۱
ALH (µm)	۴/۵۲ ± ۶/۲۷^{a}	۵/۱۲ ± ۹/۵۷^{a}	۲/۴۴ ± ۰/۶۴^{b}	۰/۰۰۱
BCF (Hz)	۲/۸۵ ± ۰/۶۳^{a}	۲/۷۷ ± ۰/۶۶^{a}	۰/۷۸ ± ۰/۹۲^{b}	۰/۰۰۱
LIN (%)	۴۳/۵۱ ± ۵/۸۵^{a}	۴۳/۳۸ ± ۶/۹۲^{a}	۴۴/۹۰ ± ۳/۷۰^{a}	۰/۵۸
WOB (%)	۶۱/۵۰ ± ۴/۸۰^{a}	۶۱/۲۲ ± ۵/۹۷^{a}	۵۹/۷۳ ± ۳/۵۹^{a}	۰/۱۰
STR (%)	۶۳/۹۱ ± ۶/۵۱^{a}	۶۱/۴۶ ± ۱۱/۸۵^{a}	۶۵/۷۹ ± ۴/۲۸^{a}	۰/۲۶
Viab (%)	۸۲/۱۴ ± ۷/۲۱^{ab}	۸۴/۰۶ ± ۴/۶۲^{a}	۸۰/۴۴ ± ۴/۸۰^{b}	۰/۰۲
Morph (%)	۸/۶۰ ± ۷/۳۶^{b}	۱۳/۵۵ ± ۱۰/۸۵^{b}	۱۷/۰۰ ± ۱۴/۳۴^{a}	۰/۰۰۳
Head (%)	۳/۷۱ ± ۵/۹۰^{b}	۵/۲۴ ± ۸/۴۰^{b}	۸/۵۰ ± ۱۱/۷۸^{a}	۰/۰۲
Mid.P (%)	۱/۱۵ ± ۱/۳۲^{a}	۱/۱۶ ± ۰/۸۱^{a}	۱/۴۵ ± ۱/۲۴^{a}	۰/۳۵
Cy.D (%)	۰/۰۸ ± ۰/۲۰^{b}	۰/۲۲ ± ۰/۴۹^{b}	۱/۰۵ ± ۱/۰۲^{a}	۰/۰۰۱
Tail (%)	۳/۶۴ ± ۲/۰۶^{b}	۶/۹۱ ± ۵/۷۷^{a}	۵/۹۹ ± ۳/۲۵^{a}	۰/۰۰۱
HOST (%)	۵۱/۲۱ ± ۱۲/۶۷^{a}	۴۶/۹۱ ± ۱۴/۸۵^{a}	۴۹/۴۶ ± ۹/۷۰^{a}	۰/۵۹

$^{a-b}$ حروف الفبای متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌ها است. * ($p<۰/۰۵$) از نظر آماری معنی‌دار است. اختصارات؛ PM: تحرک پیش‌رونده اسپرم، VCL: سرعت واقعی اسپرم‌ها در مسیر واقعی طی‌شده، VSL: سرعت مستقیم‌الخط اسپرم‌ها، VAP: سرعت در مسیر منحنی میانگین، MAD: متوسط زاویه چرخشی، ALH: حداکثر دامنه حرکات جانبی، BCF: فرکانس حرکات جانبی، LIN: خطی‌بودن، WOB: حرکات لرزشی، STR: معیار مستقیم‌الخط بودن، Viab: اسپرماتوزوئیدهای زنده، Morph: کل اسپرماتوزوئیدهای غیرطبیعی، Head: اسپرماتوزوئیدهای غیرطبیعی در قسمت سر، Mid.P: اسپرماتوزوئیدهای غیرطبیعی در قسمت میانی، Cy.D: قطره سیتوپلاسمی، Tail: اسپرماتوزوئیدهای غیرطبیعی در قسمت دم.

همان‌طور که در جدول شماره سه مشاهده می‌شود، خصوصیات کیفی اسپرم منجمد یخ‌گشایی شده از نظر شاخص‌های PM، VCL، VSL، VAP، MAD، LIN، WOB و STR در گروه نانوکورکومین ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشتر از سایر گروه‌ها و از نظر شاخص‌های BCF و Cy.D کمتر از سایر گروه‌ها بود که دارای اختلاف آماری معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$). سایر شاخص‌های بررسی‌شده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مطالعه‌شده نشان ندادند. از نظر شاخص‌های PM، VCL، VSL، LIN، WOB و STR گروه نانوکورکومین ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و نانوکورکومین ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بود ($p<۰/۰۵$) و بین گروه کنترل و گروه نانوکورکومین ۵۰ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. شاخص‌های VAP و MAD گروه نانوکورکومین ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر با گروه ۵۰ اختلاف معنی‌دار دارد ($p<۰/۰۵$) ولی با گروه کنترل این اختلاف معنی‌دار نیست. شاخص BCF گروه کنترل با هر دو گروه اختلاف معنی‌دار نشان داد؛ ولی بین دو گروه نانوکورکومین از این نظر تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده نشد. شاخص Cy.D هم بیشترین میزان در گروه نانوکورکومین ۵۰ میلی‌گرم در لیتر دیده شد که هر سه گروه با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند ($p<۰/۰۵$).

جدول ۳- میانگین ± انحراف معیار ویژگی‌های کیفی اسپرم‌های منجمد یخ‌گشایی شده در گروه‌های کنترل و نانوکورکومین ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر

پارامتر	کنترل	نانوکورکومین		P-value*
		۵۰ میلی‌گرم در لیتر	۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر	
PM (%)	۵۷/۴۷ ± ۱۰/۱۷^{b}	۵۶/۲۷ ± ۱۲/۱۴^{b}	۶۵/۴۰ ± ۷/۱۹^{a}	۰/۰۰۱
VCL (µm/S)	۳۷/۹۸ ± ۱۳/۹۷^{b}	۳۵/۴۵ ± ۱۵/۰۱^{b}	۴۳/۷۰ ± ۱۲/۸۴^{a}	۰/۰۲
VSL (µm/S)	۱۶/۵۱ ± ۵/۴۸^{b}	۱۵/۴۳ ± ۷/۱۲^{b}	۱۹/۶۳ ± ۶/۴۶^{a}	۰/۰۰۸
VAP (µm/S)	۲۳/۸۶ ± ۷/۲۷^{ab}	۲۱/۹۰ ± ۹/۲۳^{b}	۲۶/۳۴ ± ۷/۶۳^{a}	۰/۰۴
MAD	۱۹/۲۶ ± ۸/۳۵^{ab}	۱۶/۹۷ ± ۸/۹۶^{b}	۲۲/۳۹ ± ۸/۸۹^{a}	۰/۰۱
ALH (µm)	۲/۵۷ ± ۰/۶۸^{a}	۲/۲۲ ± ۰/۸۱^{a}	۲/۳۱ ± ۰/۵۷^{a}	۰/۰۷
BCF (Hz)	۱/۷۶ ± ۰/۶۷^{a}	۱/۲۵ ± ۰/۹۷^{b}	۰/۸۷ ± ۰/۹۸^{b}	۰/۰۰۱
LIN (%)	۳۳/۰۶ ± ۶/۰۴^{b}	۳۳/۵۷ ± ۷/۹۸^{b}	۴۱/۰۲ ± ۶/۲۷^{a}	۰/۰۰۱
WOB (%)	۵۰/۱۴ ± ۸/۳۹^{b}	۴۹/۳۴ ± ۱۰/۰۶^{b}	۵۶/۵۰ ± ۵/۹۲^{a}	۰/۰۰۱
STR (%)	۴۹/۰۸ ± ۹/۰۱^{b}	۴۸/۶۵ ± ۱۱/۱۷^{b}	۶۰/۵۸ ± ۸/۵۴^{a}	۰/۰۰۱
Viab (%)	۶۷/۱۵ ± ۱۰/۵۶^{a}	۷۰/۵۵ ± ۸/۲۸^{a}	۶۹/۰۱ ± ۱۳/۸۸^{a}	۰/۴۱
Morph (%)	۱۲/۴۶ ± ۸/۵۷^{a}	۱۷/۰۸ ± ۱۱/۲۸^{a}	۱۴/۲۸ ± ۱۰/۱۵^{a}	۰/۱۰
Head (%)	۵/۱۲ ± ۷/۷۸^{a}	۶/۴۵ ± ۱۰/۵۷^{a}	۶/۸۲ ± ۷/۸۳^{a}	۰/۱۳
Mid.P (%)	۱/۴۳ ± ۰/۹۰^{a}	۱/۸۷ ± ۱/۲۹^{a}	۱/۵۱ ± ۱/۱۴^{a}	۰/۳۳
Cy.D (%)	۰/۰۱ ± ۰/۰۷^{c}	۱/۳۱ ± ۲/۳۱^{a}	۰/۴۴ ± ۱/۰۷^{b}	۰/۰۰۱
Tail (%)	۵/۸۹ ± ۳/۹۳^{a}	۷/۴۴ ± ۶/۲۹^{a}	۵/۴۹ ± ۳/۳۲^{a}	۰/۶۰
HOST (%)	۳۴/۰۹ ± ۸/۹۲^{a}	۳۰/۸۷ ± ۱۲/۳۹^{a}	۳۱/۱۴ ± ۱۱/۷۷^{a}	۰/۵۹

a-cحروف الفبای متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌ها است. * ($p<۰/۰۵$) از نظر آماری معنی‌دار است.

بحث

در این مطالعه به بررسی اثرات اضافه کردن نانوکورکومین به رقیق‌کننده انجماد اسپرم گاو بر پارامترهای کیفی اسپرم در منی تازه و منجمد یخ‌گشایی شده پرداخته شد. غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم نانوکورکومین در منی تازه کیفیت اسپرم‌ها را افزایش نداده و گروه ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر در برخی از پارامترهای تحرک، زنده‌مانی و همچنین درصد کل اسپرم‌های غیرطبیعی نسبت به گروه کنترل، به‌طور معنی‌داری ضعیف‌تر بود. اما تحرک و پارامترهای کیفی آن در اسپرم‌های منجمد یخ‌گشایی شده گروه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوکورکومین به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل و نانوکورکومین ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بود و سایر پارامترهای کیفی اسپرم از قبیل زنده‌مانی، شکل‌شناسی و یک‌پارچگی غشای اسپرم در گروه‌های مطالعه‌شده اختلاف چشمگیری با یکدیگر نداشتند.

Kazemizadeh و همکاران در سال ۲۰۱۹ پژوهشی را در زمینه بررسی اثرات مکمل کورکومین (با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در جیره غذایی) بر کیفیت مایع منی و باروری در خروس‌های گوشتی انجام دادند. آنها گزارش کردند که غلظت مایع منی، تولید کل اسپرم، تحرک پیش‌رونده و یکپارچگی غشاء‌ی پلاسمایی به صورت خطی با افزایش سطوح مکمل کورکومین بهبود یافت و میزان MDA منی و درصد اسپرم غیرطبیعی در گروه‌های تیمار شده با کورکومین کمتر بود. علاوه براین، با افزایش دوز کورکومین، نرخ باروری به صورت خطی بهبود یافت (۱۹). بررسی‌ای در رابطه با اثرات مکمل کورکومین بر تعداد کل اسپرم، تحرک، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، شکل‌شناسی، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و یکپارچگی DNA در سگ انجام و مشاهده شد که اضافه کردن کورکومین به میزان ۲/۵ میلی‌مول به جیره غذایی سبب افزایش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و اثر محافظتی بیشتر بر یکپارچگی DNA در مقایسه با گروه‌های ۵ میلی‌مول و کنترل گردید (۶). Solymazadeh و Saberivand در سال ۲۰۱۳ پژوهشی را در خصوص بررسی اثرات کورکومین بر کیفیت اسپرم رت‌ها در طی فرایند انجماد و یخ‌گشایی منی انجام دادند. تحرک، زنده‌مانی و یکپارچگی DNA اسپرم در رت‌هایی که ۲/۵ میکرومول کورکومین به جیره غذایی آن‌ها اضافه شد، به‌طور چشمگیری در مقایسه با گروه شاهد پس از یخ‌گشایی بیشتر بود (۳۰).

در پژوهشی اثرات افزودن ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوکورکومین به رقیق‌کننده منی در بز بر کیفیت اسپرم بررسی شد. یافته‌های آن‌ها نشان داد، اضافه کردن نانوکوکومین به‌ویژه به میزان ۱۰۰ میکروگرم به رقیق‌کننده اسپرم در بز سبب بهبود شاخص‌های اسپرم از قبیل درصد تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، یک‌پارچگی غشای اسپرم و درصد اسپرماتوزوئیدهای غیرطبیعی در طول پروسه انجماد و یخ‌گشایی شده بود (۱۳). یافته‌های آن‌ها در خصوص اسپرم تازه با نتایج مطالعه ما در تناقض است که می‌تواند به‌دلیل تفاوت در گونه مطالعه‌شده و میزان نانوکورکومین اضافه‌شده در مطالعه آن‌ها باشد. همچنین آن‌ها پس از انجماد شاخص‌های زنده‌مانی، آپوپتوز و نکروز اسپرماتوزوئیدها را بررسی کردند که درصد اسپرماتوزوییدهای زنده در گروه‌های تحت تیمار با نانوکورکومین به‌طور چشمگیری بیشتر از گروه کنترل بود. اگرچه در پژوهش ما زنده‌مانی اسپرم در گروه‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوکورکومین بیشتر از گروه کنترل بود، اما این اختلاف معنی‌دار نبود.

Bucak و همکاران در سال ۲۰۱۱ مطالعه‌ای را در خصوص اثرات کورکومین بر منی منجمد / یخ‌گشایی‌شده گاو نر انجام دادند. آن‌ها نشان دادند که رقیق‌کننده غنی شده با دوز ۰/۵ میلی‌مول کورکومین منجربه درصد کمتری از ناهنجاری اسپرم در مقایسه با گروه کنترل شد و همچنین اثر محافظتی بیشتری در یکپارچگی عملکرد غشاء در مقایسه با کنترل دارد (۹) که با نتایج یافته‌های پژوهش ما در تناقض است.

افزودن ۲۰ میکرومول کورکومین به رقیق‌کننده انجماد اسپرم باعث افزایش تحرک پیش‌رونده و غیرپیش‌رونده و کاهش چشمگیری در ROS داخل سلولی و تکه‌تکه شدن DNA در سلول‌های اسپرم منجمد انسان شد. پس از انجماد، بیان mRNA ژن GPX4 در مایع منی یخ‌گشایی‌شده حاوی ۲۰ میکرومول کورکومین در مقایسه با گروه شاهد به‌طور چشمگیری بیشتر بود و پیشنهاد شد که افزودن کورکومین به رقیق‌کننده‌های انجماد اسپرم انسان می‌تواند شاخص‌های کیفی اسپرم را بهبود بخشد و با آسیب اکسیداتیو ناشی از فرایند انجماد / ذوب مقابله

کند (۲۸). نتایج یافته‌های این پژوهش در شاخص افزایش تحرک پیش‌رونده پس از انجماد با نتایج یافته‌ها همخوانی دارد. نشان داده شده است که اضافه کردن ۱۰ میکرومول کورکومین به رقیق‌کننده انجماد اسپرم مردان سبب افزایش تحرک پیش‌رونده، تراکم کروماتین و یکپارچگی DNA اسپرم پس از یخ‌گشایی در مقایسه با گروه کنترل شد (۱۷) که این پژوهش نیز در شاخص تحرک پیش‌رونده اسپرم پس از یخ‌گشایی با یافته‌های پژوهش ما همخوانی دارد.

Salman و همکاران در سال ۲۰۲۱ پژوهشی را در درخصوص اضافه کردن غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌مول کورکومین به رقیق‌کننده تجاری بایوکسل انجماد اسپرم گاو به‌منظور بررسی شاخص‌های کیفی اسپرم پس از انجماد انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که اضافه کردن کورکومین تأثیر چشمگیری بر اسپرم‌های منجمد یخ‌گشایی شده ندارد (۲۷) که با نتایج یافته‌های ما در خصوص تحرک پیش‌رونده و پارامترهای تحرک CASA در تناقض است. این تناقض می‌تواند به دلیل نوع رقیق‌کننده استفاده‌شده در این دو پژوهش باشد. Salman و همکاران در سال ۲۰۲۱ از رقیق‌کننده بایوکسل استفاده کردند که بر پایه پروتئین گیاهی بوده در صورتیکه در این پژوهش از رقیق‌کننده استریدیل استفاده شده است که بر پایه پروتئین حیوانی ساخته شده است.

پژوهشی دیگر که اثر افزودن نانوکورکومین به رقیق‌کننده انجماد اسپرم بر کیفیت اسپرم‌های منجمد یخ‌گشایی شده را بررسی کرده است، مطالعه Abdelnour و همکاران در سال ۲۰۲۰ در خرگوش است. نتایج یافته‌های آن‌ها نشان داد که افزودن ۱/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات کورکومین به رقیق‌کننده منی به‌طور چشمگیری بر تحرک پیش‌رونده اسپرم، زنده‌مانی و یکپارچگی غشا پس از ذوب تأثیر مثبت داشت و درصد اسپرم مرده، ناهنجاری‌ها، آپوپتوز زودرس و نکروز اسپرم‌ها کاهش یافت و به‌طور چشمگیری ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی را بهبود بخشید، درحالی‌که میزان MDA را کاهش دادند. آن‌ها پیشنهاد کردند که افزودن کورکومین و نانوذرات آن به رقیق‌کننده‌های منی می‌تواند کیفیت اسپرم خرگوش را پس از یخ‌گشایی از طریق سیگنال‌دهی ردوکس بهبود بخشد و فرایند آپوپتوز را کاهش دهد (۱). یافته‌های پژوهش آن‌ها در شاخص تحرک پیش‌رونده اسپرم پس از انجماد با نتایج ما همخوانی دارد، اما در پارامترهای درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و یکپارچگی غشای اسپرم با نتایج یافته‌های ما تناقض دارد که می‌تواند به دلیل اختلاف در گونه بررسی‌شده باشد. باتوجه‌به مطالب بیان‌شده و یافته‌های پژوهش ما می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزودن ۱۰۰ میلی‌گرم نانوکورکومین به رقیق‌کننده اسپرم گاوهای نر سیمنتال سبب بهبود تحرک اسپرم‌ها پس از انجماد می‌شود. ازآنجایی‌که تحرک پیش‌رونده پس از انجماد از مهم‌ترین شاخص‌های تخمین کیفیت اسپرم است، پیشنهاد می‌شود نانوکورکومین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم به رقیق‌کننده اسپرم گاوهای نر اضافه شود. پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های برون‌تنی و درون‌تنی جهت تعیین میزان باروری و نرخ آبستنی در تخمک‌های بارورشده و گاوهای ماده لقاح یافته با اسپرم‌های منجمد یخ‌گشایی شده که با نانوکورکومین غنی شده‌اند، انجام شود.

منابع

1. Abdelnour, S.A; Hassan, M.A; Mohammed, A.K; Alhimaidi, A.R; Al-Gabri, N; Al-Khaldi, K.O. and Swelum, A.A; The effect of adding different levels of curcumin and its nanoparticles to extender on post-thaw quality of cryopreserved rabbit sperm. Animals; 2020;10(9):1508.
2. Akomolafe, S.F. and Aluko, B.T; Protective effect of curcumin on fertility in cyclophosphamide exposed rats: Involvement of multiple pathways. J. Food Biochem; 2020;44(1):e13095.
3. Aksu, E.H; Kandemir, F.M; Yıldırım, S; Küçükler, S; Dörtbudak, M.B; Çağlayan, C. and Benzer, F; Palliative effect of curcumin on doxorubicin-induced testicular damage in male rats. J. Biochem. Mol. Toxicol; 2019;33(10):e22384.
4. Alizadeh, F; Javadi, M; Karami, A.A; Gholaminejad, F; Kavianpour, M. and Haghighian, H.K; Curcumin

nanomicelle improves semen parameters, oxidative stress, inflammatory biomarkers, and reproductive hormones in infertile men: A randomized clinical trial. Phytother. Res; 2018;32(3):514-521.
5. Anand, P; Kunnumakkara, A.B; Newman, R.A. and Aggarwal, B.B; Bioavailability of curcumin: problems and promises. Mol. Pharmaceutics; 2007;4(6):807-818.
6. Aparnak, P. and Saberivand, A; Effects of curcumin on canine semen parameters and expression of NOX5 gene in cryopreserved spermatozoa. Vet. Res. Forum; 2019;10(3):221-226.
7. Araujo, C.A. and Leon, L.L; Biological activities of Curcuma longa L. Mem. Inst. Oswaldo Cruz; 2001; 96: 723-728.
8. Belhan, S; Yıldırım, S; Huyut, Z; Özdek, U; Oto, G. and Algül, S; Effects of curcumin on sperm quality, lipid profile, antioxidant activity and histopathological changes in streptozotocin-induced diabetes in rats. Andrologia; 2020;52(6):e13584.
9. Bucak, M.N; Başpınar, N; Tuncer, P.B; Coyan, K; Sarıözkan, S; Akalın, P.P; Büyükleblebici, S. and Küçükgünay, S; Effects of curcumin and dithioerythritol on frozen-thawed bovine semen. Andrologia; 2012; 44:102-109.
10. Chandra, A.K; Chatterjee, A; Ghosh, R. and Sarkar, M; Effect of curcumin on chromium-induced oxidative damage in male reproductive system. Environ. Toxicol. Pharmacol; 2007;24(2):160-166.
11. Cheraghi, E; Golkar, A; Roshanaei, K. and Alani, B; Aluminium-induced oxidative stress, apoptosis and alterations in testicular tissue and sperm quality in Wistar rats: ameliorative effects of curcumin. Int. J. Fertil. Steril; 2017;11(3):166-175.
12. El-Maddawy, Z.K. and El-Sayed, Y.S; Comparative analysis of the protective effects of curcumin and N-acetyl cysteine against paracetamol-induced hepatic, renal, and testicular toxicity in Wistar rats. Environ. Sci. Pollut. Res; 2018;25: 3468-3479.
13. Ismail, A.A; Abdel-Khalek, A.K; Khalil, W.A; Yousif, A.I; Saadeldin, I.M; Abomughaid, M.M. and El-Harairy, M.A; Effects of mint, thyme, and curcumin extract nanoformulations on the sperm quality, apoptosis, chromatin decondensation, enzyme activity, and oxidative status of cryopreserved goat semen. Cryobiology; 2020; 97: 144-152.
14. Izadpanah, M; Alizadeh, R; Minaee, M.B; Heydari, L; Babatunde, A. and Abbasi, M; The effects of curcumin on sperm parameters and nitric oxide production in varicocelized rats. Int. J. Morphol; 2015;33(4):1530-1535.
15. Jalili, C; Khani, F; Salahshoor, M.R. and Roshankhah, S.H; Protective effect of curcumin against nicotine-induced damage on reproductive parameters in male mice. Int. J. Morphol; 2014;32(3):844-849.
16. Jurenka, J.S; Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of Curcuma longa: a review of preclinical and clinical research. Altern. Med. Rev; 2009;14(2):141-153.
17. Karakus, F.N; Kuran, S.B. and Solakoglu, S; Effect of curcumin on sperm parameters after the cryopreservation. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol; 2021; 267: 161-166.
18. Karimi, S; Khorsandi, L. and Nejaddehbashi, F; Protective effects of Curcumin on testicular toxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in mice. JBRA. Assist. Reprod; 2019;23(4):344-351.
19. Kazemizadeh, A; Zare, Shahneh, A; Zeinoaldini, S; Yousefi, A.R; Mehrabani-Yeganeh, H; Ansari-Pirsaraei, Z. and Akhlaghi, A; Effects of dietary curcumin supplementation on seminal quality indices and fertility

rats. Glob. J. Pharmacol; 2013;7(4):416-422.
27. Salman, A; Caamaño, J.N; Fernandez-Alegre, E; Hidalgo, C.O; Nadri, T; Tamargo, C; Fueyo, C; Fernandez, A; Merino, M.J. and Martínez-Pastor, F; Supplementation of the BIOXcell extender with the antioxidants crocin, curcumin and GSH for freezing bull semen. Res. Vet. Sci; 2021; 136: 444-452.
28. Santonastaso, M; Mottola, F; Iovine, C; Colacurci, N. and Rocco, L; Protective effects of curcumin on the outcome of cryopreservation in human sperm. Reprod. Sci; 202; 28: 2895-2905.
29. Shahedi, A; Talebi, A.R; Mirjalili, A. and Pourentezari, M; Protective effects of curcumin on chromatin quality, sperm parameters, and apoptosis following testicular torsion-detorsion in mice. Clin. Exp. Reprod. Med; 2021;48(1):27-33.
30. Soleimanzadeh, A. and Saberivand, A; Effect of curcumin on rat sperm morphology after the freeze-thawing process. Vet. Res. Forum; 2013;4(3):185-189.
31. Sudjarwo, S.A. and Sudjarwo, G.W; Protective effect of curcumin on lead acetate-induced testicular toxicity in Wistar rats. J. Pharm. Sci. Res; 2017;12(5):381-390.
32. Yousefi, M; Mohammadi, S; Jalali, M. and Beheshti, F; Effect of different doses of curcumin on sperm parameters and oxidative stress in testis of d-galactose induced aging mice model. J. Babol Univ. Medical Sci; 2019;21(1):53-60.
33. Zhang, L; Diao, R.Y; Duan, Y.G; Yi, T.H. and Cai, Z.M; In vitro antioxidant effect of curcumin on human sperm quality in leucocytospermia. Andrologia; 2017; 49(10): e12760.

rate in broiler breeder roosters. Br. Poult. Sci; 2019;60(3):256-264.
20. Khalaji, N; Namyari, M; Rasmi, Y; Pourjabali, M. and Chodari, L; Protective effect of curcumin on fertility of rats after exposure to compact fluorescent lamps: An experimental study. Int. J. Reprod. Biomed; 2018;16(7):447-454.
21. Ma, Z; Shayeganpour, A; Brocks, D.R; Lavasanifar, A. and Samuel, J; High-performance liquid chromatography analysis of curcumin in rat plasma: application to pharmacokinetics of polymeric micellar formulation of curcumin. Biomed. Chromatogr; 2007;21(5):546-552.
22. Nabavi, S.F; Daglia, M; Moghaddam, A.H; Habtemariam, S. and Nabavi, S.M; Curcumin and liver disease: from chemistry to medicine. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf; 2014;13(1):62-77.
23. Oguzturk, H; Ciftci, OS; Aydin, M; Timurkaan, N; Beytur, A. and Yilmaz, F; Ameliorative effects of curcumin against acute cadmium toxicity on male reproductive system in rats. Andrologia; 2012;44(4):243-249.
24. Roshankhah, S.H; Salahshoor, M.R; Aryanfar, S; Jalili, F; Sohrabil, M. and Jalili, C; Effects of curcumin on sperm parameters abnormalities induced by morphine in rat. J. Medical Biomed. Sci; 2017;6(2):1-10.
25. Sadoughi, D; Edalatmanesh, M.A. and Rahbarian, R; Protective effect of curcumin on quality parameters of sperm and testicular tissue alterations in alloxan-induced diabetic rats as animal model. Indones. Biomed. J; 2019;11(3):240-246.
26. Sakr, S.A. and Badawy, G.M; Protective effect of curcumin on monosodium glutamate-induced reproductive toxicity in male albino

Vol18/No.1
Winter & Summer 2024

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2024; 18(1): 13-23.
http://doi.org/10.22034/ijvcs.2024.14469.1056

Comparison of CASA parameters in Simmental bull semen samples treated with different concentrations of nanocurcumin

Amir Khaki[1]*; Shohreh Alian Samakkhah[2]; Amir Afshnag[3]

1. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol- Iran.
2. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol- Iran.
3. Student of Laboratory Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol- Iran.

Received: 23 July 2023 ***Accepted:*** 4 April 2024

Summary

Turmeric (*Curcuma longa*) is a perennial plant belonging to the ginger family. Poor bioavailability of curcumin due to low absorption, fast metabolism and systemic removal as well as low solubility are important problems in optimal use of curcumin. One of the suggestions to improve the bioavailability of curcumin is to use its nanoparticles. It has been found that curcumin has significant antioxidant effects and can improve male reproductive activity. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of adding nanocurcumin to semen extender on the semen quality in fresh and frozen-thawed spermatozoa in dual purpose Simmental bulls (Fleckvieh). Ejaculates were collected from 12 bulls in three repetitions in a period of three months. Each ejaculate was equally divided into three parts for experimental groups (control, nanocurcumin 50 mg/L and nanocurcumin 100 mg/L). Semen was frozen in a two-step dilution method. Sperm parameters including motility, viability, morphology, and membrane integrity were investigated before and after freezing. The results showed that nanocurcumin did not have a positive effect on the quality of fresh sperms while, caused an increase in sperm motility parameters in the 100 mg/L group in thawed semen. Since sperm progressive motility of thawed semen is one of the most important indicators of sperm quality prediction, it is suggested to add 100 mg/L of nanocurcumin to the bull semen extenders and conduct *in vitro* and *in vivo* studies to determine the fertility and conception rate in fertilized oocytes and cows inseminated with thawed semen enriched with nanocurcumin.

Keywords: nanocurcomin, semen quality, Simmental.

***Corresponding author:** a.khaki@ausmt.ac.ir