نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۸ شماره ۱/ سال۱۳۹۷/ صفحات ۶۵ تا ۷۶

اثرات سطوح مختلف آنتی‌اکسیدان کورکومین در رقیق کننده اصلاح شده بلتسویل بر کیفیت اسپرم خروس بعد از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی

طاهره مرویی میلان[۱]، حسین دقیق‌کیا[۲]* و غلامعلی مقدم[۲]

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۲۳

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
[۲] استاد گروه علوم دامی دانشگاه تبریز
*مسئول مکاتبه: Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی :آسیب غشایی به عنوان یکی از دلایل کاهش تحرک و باروری اسپرم خروس مطرح می‌باشد. تاکنون آنتی اکسیدان‌های مختلفی جهت کاهش یا جلوگیری از آسیب های غشایی در حین انجماد مورد استفاده قرار گرفته است. **هدف**: این پژوهش به منظور بررسی اثرات افزودن سطوح مختلف کورکومین (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار) در رقیق کننده اصلاح شده بلتسویل بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس بعد از یخ‌گشایی انجام گرفت. **روش کار**: اسپرم‌گیری سه بار در هفته از طریق مالش پشتی- شکمی، از ۸ خروس بالغ نژاد راس صورت گرفت. نمونه‌ها پس از ارزیابی اولیه با هم مخلوط شده سپس تیمارهای مختلف اعمال گردید. سردسازی به مدت سه ساعت در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. درصد تحرک کل، تحرک پیش‌رونده و فراسنجه‌های حرکتی اسپرم با استفاده از سیستم آنالیز کامپیوتری اسپرم CASA و زنده‌مانی و یکپارچگی غشاء با استفاده از روش رنگ آمیزی ائوزین نیگروزین و آزمون هاست و میزان اسپرم‌های نابهنجار با استفاده از محیط هانکوک بعد از یخ‌گشایی اندازه‌گیری شدند. **نتایج**: کورکومین در سطح ۲۰۰ میکرومولار از لحاظ تحرک کل و تحرک پیش‌رونده توانست بهترین عملکرد را در بین سایر سطوح کورکومین و گروه کنترل داشته باشد و تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد ($p<0/05$). غلظت ۲۰۰ میکرومولار کورکومین توانست زنده‌مانی اسپرم را بهبود بخشد ($p<0/05$). کورکومین در غلظت ۳۰۰ میکرومولار بیشترین سلامت غشاء و کمترین ناهنجاری‌ها را نسبت به بقیه تیمارها داشت و با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان داد ($p<0/05$). **نتیجه گیری نهایی**: مطالعه حاضر نشان داد افزودن کوروکومین در غلظت ۲۰۰ میکرومولار می‌تواند از نظر زنده‌مانی و فراسنجه‌های تحرک، اثرات مطلوبی بر اسپرم خروس بعد از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی داشته باشد.

واژگان کلیدی: اسپرم خروس، انجماد-یخ‌گشایی، آنتی اکسیدان کورکومین، رادیکال‌های آزاد

مقدمه

انجماد اسپرم راهکار مؤثری برای انجام تلقیح مصنوعی و انتقال ژن‌های برتر در گله و همچنین حفظ گونه‌های نادر است. انجماد اسپرم و نگهداری آن در ازت مایع، به منظور توقف واکنش‌های متابولیکی آنها بوده که با هدف حفظ باروری اسپرم انجام می‌گیرد (بلسبویس

۲۰۰۷). آسیب‌های پیش آمده طی فرایند انجماد-یخ-گشایی عمدتاً غشای پلاسمایی و در بدترین حالت هسته اسپرم را تحت تأثیر قرار می‌دهند. چنین آسیب‌هائی بر باروری و مدت زمان زنده‌مانی آن تاثیر می‌گذارد (باکست و همکاران ۱۹۹٤). در طول فرآیند انجماد، منی در برابر شوک سرمایی و اکسیژن اتمسفر قرار می‌گیرد که موجب افزایش تولید ROS[1] و افزایش حساسیت سلول به پراکسیداسیون لیپیدی است (بوکاک و همکاران ۲۰۰۸). از طرفی نیز غشای پلاسمایی اسپرم پرندگان سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع و فسفولیپیدها است (اسکات ۱۹۷۳). برخلاف پستانداران که جزء اصلی فسفولیپید اسپرم، اسیدچرب دوکوزاهگزانوییک اسید است (لین و همکاران ۱۹۹۳)، فسفولیپیدهای اسپرم پرندگان حاوی مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع، مانند آراشیدونیک اسید و دوکوزاتترانوییک اسید هستند (سورایی و همکاران ۱۹۹۸[a]). مقادیر زیاد اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه (PUFAs) موجب افزایش حساسیت اسپرم به پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود که با کاهش باروری جنس نر همبستگی مثبت دارد (فوجیهارا و هووارت ۱۹۷۸) رادیکال‌های آزاد تولید شده باعث اختلال در عملکرد غشایی اسپرم و کاهش کیفیت آن می‌شوند (پارتیکا و همکاران ۲۰۱۲، امینی و همکاران ۲۰۱۵). اسپرماتوزوآها از سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی برای مقابله با اثرات مخرب پراکسیداسیون لیپیدی و رادیکال‌های آزاد برخوردار هستند اما مقدار آن کافی نبوده و نیاز به افزودن آنتی-اکسیدان‌هایی با منشأ خارجی بعنوان یک سازوکار دفاعی خارجی لازم بنظر می‌رسد (بانسال و بیلاسپوری ۲۰۱۱).

کورکومین، ۱و۷- بیس (٤-هیدروکسی-۳- متوکسی فنیل)-۱-٦- هپتادین-۳ و ٥- دییون که اغلب با نام دی فرولوئیل متان شناخته می‌شود (پری یادارسینی ۲۰۱۳، ناز ۲۰۱٤)، ماده موثره موجود در زردچوبه است که یک گیاه چندساله از خانواده زنجبیلیان است (آمون و وهل ۱۹۹۱). کورکومین از ریزوم گیاه زردچوبه بدست می‌آید و یک پلی‌فنل چربی دوست است که غیرقابل حل در آب بوده (رابی و همکاران ۱۹۹۵) اما به آسانی در حلال‌های قطبی مانند DMSO، متانول، اتانول، کلروفرم و اتیل ستات قابل حل است (جایاپراکاشا و همکاران ۲۰۰٦).

مطالعات اخیر نشان داده است که کورکومین بر عملکرد اسپرم (تحرک، ظرفیت پذیرشدن و واکنش آکروزومی) در شرایط آزمایشگاهی و باروری آن تأثیر می‌گذارد (ناز ۲۰۱٤). این ماده بدلیل دو حلقه فنولی در مولکول خود، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد (کلری ۲۰۰٤). کورکومین هم دارای حلقه فنولی و هم بخش β-دی‌کتونی بر روی یک مولکول می‌باشد، این ویژگی ساختاری باعث افزایش قابلیت فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن می‌شود. کورکومین بعنوان یک آنتی‌اکسیدان شکننده زنجیره، با ساختاری که دارد قادر است رادیکال‌های آزاد را به دام بیندازد (مسودا و همکاران ۲۰۰۱). همچنین بعنوان جاروب‌کننده و خنثی‌کننده رادیکال آزاد آنیون سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل عمل می‌کند (خوپده و همکاران ۱۹۹۹). مطالعات نشان داده است که افزودن کورکومین بطور قابل توجهی بعد از ذوب، تعداد اسپرم‌های حاوی گلوتاتیون (GSH) را افزایش می‌دهد (بوکاک و همکاران ۲۰۱۲).

امروزه استفاده از آنتی اکسیدان‌ها بعنوان یک روش دفاعی همراه با تغییر در محیط رقیق‌کننده‌ها جهت کاهش اثرات فرایند انجماد مورد استفاده قرار می‌گیرد (شهبازاده و همکاران ۱۳۹٤، زارع قلعه جیق و همکاران ۱۳۹٥). تغییر در محیط پایه رقیق‌کننده بلتسویل با استفاده از لستین در انجماد اسپرم طیور به تازگی مورد مطالعه قرار گرفته است (امینی و همکاران ۲۰۱٥). تاکنون مطالعه‌ای که اثرات آنتی‌اکسیدان کورکومین را

[1] ROS: Reactive oxygen species

برای بهبود کیفیت اسپرم خروس نشان دهد وجود ندارد. هدف از پژوهش حاضر تعیین اثرات آنتی اکسیدانی کورکومین بر فراسنجه‌های عملکردی اسپرم خروس در یک رقیق‌کننده اصلاح شده بلتسویل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از ۸ خروس نژاد راس با سن ۳۰ هفتگی استفاده شد. خروس‌ها در سالن تحقیقاتی خلعت پوشان واقع در جاده باسمنج شهر تبریز در شرایط نوردهی ۱۵ ساعت نور و ۹ ساعت تاریکی در قفس‌های انفرادی نگهداری شدند. دمای سالن در محدوده ۱۸ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد بود. تمام خروس‌ها با جیره‌ای که بر اساس کاتالوگ راس تهیه شده بود، تغذیه شدند. آب بصورت آزاد در اختیار پرنده‌ها قرار گرفت.

جمع‌آوری منی و اندازه‌گیری فراسنجه‌ها پیش از انجماد

خروس‌ها به مدت ۳ هفته برای اسپرم‌گیری عادت‌دهی شدند. نمونه‌های منی ۳ بار در هفته با استفاده از روش ماساژ پشتی- شکمی جمع‌آوری گردیدند. بلافاصله بعد از جمع‌آوری منی، نمونه‌های در آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. ارزیابی اولیه نمونه‌ها از نظر حجم، رنگ، مورفولوژی و غلظت اسپرم بلافاصله پس از اسپرم‌گیری انجام شد. برای از بین بردن اثرات فردی، نمونه‌ها با هم مخلوط شدند. نمونه‌های با حداقل ۷۵ درصد تحرک و ۸۰ درصد زنده‌مانی برای ادامه آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

آماده سازی رقیق‌کننده پایه و رقیق سازی نمونه‌ها

مواد شیمیایی مورد استفاده در مطالعه حاضر از شرکت مرک و آنتی اکسیدان از شرکت سیگما-آلدریچ آلمان تهیه شدند. ترکیبات رقیق‌کننده استفاده شده عبارت بودند از: پتاسیم دی فسفات ۰/۷۵۸ گرم، سدیم گلوتامات ۰/۸٦٦ گرم، پتاسیم سیترات ۰/۰٦٤ گرم، پتاسیم منوفسفات ۰/۰۷ گرم، سدیم استات ۰/۳۱، منیزیم کلراید ۰/۰۳٤، تریس ۰/۲۷ گرم، فروکتوز ۰/۵ گرم، لستین ۱ درصد و گلیسرول ۲۰ درصد در نظر گرفته شد.

بمنظور آماده‌سازی رقیق‌کننده، ابتدا تک‌تک مواد شیمیایی مورد نظر با استفاده از ترازوی دیجیتال توزین شده و سپس با آب دوبار تقطیر مخلوط گردید. سپس حجم محلول را به ۱۰۰ سی‌سی رسانده و روی همزن قرار داده شد تا مواد مورد نظر حل و همگن شوند. فشار اسمزی و pH به ترتیب در ۳۱۰ mOsm/L و ۷ تنظیم شد. رقیق‌کننده پایه به دو قسمت مساوی تقسیم و به یکی از آنها یک چهارم گلیسرول و به دیگری سه چهارم گلیسرول افزوده شد. سپس رقیق‌کننده حاوی یک چهارم گلیسرول در٤ فالکون ریخته شده و کورکومین در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار به آن اضافه گردید. یکی از فالکون‌ها نیز بعنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. بلافاصله بعد از ارزیابی اولیه و مخلوط نمودن نمونه‌ها، منی در رقیق‌کننده حاوی آنتی‌اکسیدان یا بدون آنتی‌اکسیدان (فالکون‌های حاوی یک چهارم گلیسرول) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد رقیق شد (با نسبت ۱:۳۰) بطوریکه غلظت نهایی ۱۰۰×۱۰^{۶} اسپرم در میلی لیتر بود.

مراحل انجماد و ذوب

فرآیند انجماد بصورت دو مرحله‌ای انجام گرفت. تمام نمونه‌ها (فالکون‌های حاوی یک چهارم گلیسرول و فالکون‌های حاوی سه چهارم گلیسرول، به مدت ۲ ساعت در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از ۲ ساعت، رقیق‌کننده حاوی سه چهارم گلیسرول به هرکدام از فالکون‌ها افزوده شد و ۱ ساعت دیگر نیز در یخچال نگهداری شدند. سپس نمونه‌های مورد نظر در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده و در ٦ سانتیمتر بالاتر از سطح ازت مایع، به مدت ۱۲ دقیقه قرار گرفتند. پس از انجماد، نمونه‌ها به داخل تانک ازت (۱۹٦- درجه سانتیگراد) انتقال داده شدند. برای ذوب منی، پس از

خارج کردن پایوت‌ها از نیتروژن مایع، به مدت ۳۰ ثانیه در داخل حمام آب گرم ۳۷°C قرار داده شد.

ارزیابی اسپرم

ارزیابی تحرک اسپرم توسط CASA

پس از یخ‌گشایی فراسنجه‌های تحرک کل (TM) ، تحرک پیش‌رونده (PM)، سرعت در مسیر منحنی (VCL)، سرعت در مسیرمستقیم (VSL)، سرعت در مسیرمیانگین (VAP)، جنبانی خطی (LIN) و حرکت مستقیم اسپرم (STR) با استفاده از سیستم CASA مورد ارزیابی قرار گرفتند. به این منظور، تعداد سه پایوت از هر تیمار بطور تصادفی انتخاب شده و ۵ میکرولیتر از اسپرم ذوب شده روی لام قرار داده شده و فراسنجه‌های فوق الذکر مورد بررسی قرار گرفتند.

زنده‌مانی اسپرم

بررسی اسپرماتوزوئیدهای زنده و مرده با استفاده از روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین انجام گرفت (اخلاقی و همکاران، ۲۰۱٤). تعداد دو نمونه از هر تیمار انتخاب شدند. ابتدا ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی را روی لام قرار داده و ۲۰ میکرولیتر رنگ ائوزین- نیگروزین به آن افزوده و مخلوط گردیده و سپس گسترش تهیه شد. بعد از خشک‌کردن، میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها با شمارش ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤۰۰× مورد ارزیابی قرار گرفتند. اسپرم‌هایی که رنگ را به خود جذب کرده بودند، اسپرم مرده و اسپرم‌هایی که رنگ نگرفته بودند بعنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شدند.

ارزیابی یکپارچگی غشاء پلاسمایی (HOST)

برای ارزیابی سلامت غشاء اسپرم از محیط هاست (فروکتوز ۹ گرم در لیتر، سیترات سدیم ٤/۹ گرم در لیتر، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی لیتر) استفاده شد. بدین منظور ۳۰ میکرولیتر از مایع منی رقیق شده با ۳۰۰ میکرولیتر محلول هایپواسموتیک ۱۰۰ mOsm/L مخلوط گردید. مخلوط بمدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۰/۲ میلی‌لیتر از نمونه مخلوط شده روی لام قرار داده شد و با لامل پوشانده و بلافاصله با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست، مورد بررسی قرار گرفت (٤۰۰× بزرگنمایی). در نهایت، ۲۰۰ اسپرم با دم متورم و غیرمتورم شمارش گردید. اسپرماتوزوئید-های با دم متورم و تاب خورده بعنوان اسپرم با غشاء پلاسمایی سالم در نظر گرفته شدند.

ارزیابی مورفولوژی اسپرم (تست هانکوک)

برای ارزیابی اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی، حداقل سه قطره از هر نمونه ذوب شده به میکروتیوب‌های حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول هانکوک (فرمالین ۳۷ درصد (٦۲/٥ میلی‌لیتر)، محلول سالین (۱٥۰ میلی‌لیتر)، محلول بافرفسفات (۱٥۰ میلی‌لیتر) و آب دو بار تقطیر (٥۰۰ میلی‌لیتر)) افزوده شد (اسکافر و هولزمان ۲۰۰۰). سپس یک قطره از این محلول را بر روی لام قرار داده و توسط یک لامل پوشانده شد. با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فازکنتراست (بزرگنمایی ۱۰۰۰×، روغن ایمرسون) درصد اسپرماتوزوئیدهای با مورفولوژی غیرطبیعی محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

این مطالعه مشتمل بر ٤ تیمار آنتی‌اکسیدان کورکومین (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار) بود. آزمایش در ٥ تکرار انجام گرفت. داده‌ها با کمک نرم افزار SAS (۹/۱) و با استفاده از رویه GLM آنالیز شدند. نتایج بصورت LSM ± SEM نمایش داده شدند. مدل آماری بکار رفته عبارت است از: $Y_{ij}=\mu+T_i+e_{ij}$ که در آن Y_{ij} مشاهدات، μ میانگین مشاهدات، Ti اثرتیمارها و e_{ij} اثر اشتباه آزمایشی را نشان می‌دهد.

نتایج

تحرک اسپرم

تاثیر کورکومین بر فراسنجه‌های تحرک اسپرم خروس در جدول ۱ نشان داده شده است. تحرک کل اسپرماتوزوئیدها در نمونه‌های رقیق شده حاوی ۲۰۰ میکرومولار آنتی‌اکسیدان کورکومین نسبت به سایر

گروه‌های تیماری بهترین بود (p<۰/۰۵). همچنین استفاده از غلظت ۲۰۰ میکرومولار کورکومین سبب بهبود تحرک پیش‌رونده اسپرم نسبت به سایر غلظت-های کورکومین و گروه کنترل شد (p<۰/۰۵). هرچند افزودن تمام سطوح کورکومین، میزان تحرک کل و تحرک پیش‌رونده اسپرم را نسبت به گروه کنترل بهبود بخشید. سرعت اسپرم در مسیر میانگین در نمونه‌های رقیق‌شده حاوی ۲۰۰ میکرومولار کورکومین بطور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بالاتر بود (p<۰/۰۵). سرعت در مسیر مستقیم، در رقیق‌کننده حاوی کورکومین با غلظت ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار عملکرد بهتری نسبت به غلظت ۱۰۰ و کنترل داشت (p<۰/۰۵). هرچند تمام سطوح کورکومین، بطور معنی‌داری سبب بهبود سرعت در مسیر منحنی اسپرم نسبت به گروه کنترل شد (p<۰/۰۵) اما بهترین عملکرد برای اسپرم-های رقیق شده حاوی کورکومین ۲۰۰ بود. حرکت خطی اسپرماتوزوئیدها در کورکومین با غلظت ۲۰۰ میکرومولار بهترین عملکرد را بین سایر غلظت‌های کورکومین و گروه کنترل داشت و تفاوت معنی داری با گروه کنترل و غلظت ۱۰۰ کورکومین داشت (p<۰/۰۵). این درحالی بود که از نظر راستی مسیر طی شده، اسپرماتوزوئیدهای رقیق شده با سطح ۲۰۰ میکرومولار کورکومین هرچند عملکرد بهتری نسبت به سایر گروه-ها داشته اما تفاوت معنی‌داری نداشت که نشان می‌دهد، آنتی‌اکسیدان کورکومین اثری بر راستی مسیر طی شده اسپرم نداشت.

جدول۱- اثر سطوح مختلف کورکومین بر ویژگی‌های حرکتی اسپرم منجمد شده خروس (بر اساس میکرومولار)

Table 1- Effect of different levels of Curcumin on the motility parameters of post thawed rooster sperm (based on µmolar)

صفات Traits	TM (%)	PM (%)	VAP (µm.sec)	VSL (µm.sec)	VCL (µm.sec)	STR (%)	LIN (%)
کنترل Control	47.20^{c}±1.88	23.40^{c}±1.23	31.07^{b}±0.77	16.30^{c}±0.25	48.50^{b}±0.54	52.50±1.78	33.61^{c}±0.54
100	56.00^{b}±1.88	31.00^{b}±1.23	31.78^{ab}±0.77	17.27^{b}±0.25	50.77^{a}±0.54	54.54±1.78	34.03^{bc}±0.54
200	65.20^{a}±1.88	38.40^{a}±1.23	33.70^{a}±0.77	18.53^{a}±0.25	51.63^{a}±0.54	55.09±1.78	37.56^{a}±0.54
300	58.80^{b}±1.88	33.60^{b}±1.23	33.08^{ab}±0.77	18.09^{a}±0.25	50.91^{a}±0.54	54.92±1.78	35.91^{ab}±0.54

TM: تحرک کل؛ PM: تحرک پیشرونده؛ VAP: سرعت در مسیرمیانگین؛ VSL: سرعت در مسیرمستقیم؛ VCL: سرعت در مسیرمنحنی؛ STR: مسیرصاف؛ LIN: خطی بودن تحرک

Total Motility (TM); Progressive Motility (PM); Average path velocity (VAP); Straight line velocity (VSL); Curvilinear velocity (VCL);Sperm track straightness (STR); Linearity (LIN)

*داده‌ها شامل میانگین ±خطای استاندارد می‌باشند. $^{a, b,c}$ میانگین های هر ستون با حروف غیرمشابه اختلاف معنی‌داری به لحاظ آماری دارند (p<۰/۰۵).

*Data are included means ± standard error. $^{a, b, c}$ Means within the same column with different superscripts differ significantly (p<0.05).

زنده‌مانی، سلامت غشا و ناهنجارهای اسپرم

زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم بعد از یخ‌گشایی در تمام تیمارها نسبت به گروه شاهد افزایش یافت(p<۰/۰۵). نمونه های منی رقیق شده با آنتی اکسیدان کورکومین با غلظت ۲۰۰ میکرومولار، بهترین میزان زنده‌مانی اسپرم را بین سایر سطوح کورکومین و گروه کنترل داشتند (p<۰/۰۵). سلامت و یکپارچگی غشاء اسپرم‌های رقیق شده با آنتی‌اکسیدان کورکومین با غلظت ۳۰۰ میکرومولار بهترین عملکرد را بین سایر غلظت‌های کورکومین و گروه کنترل داشته است و

تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل و ÷غلظت ۱۰۰ میکرو مولار کورکومین مشاهده شد (p<۰/۰۵). همچنین، کمترین ناهنجاری اسپرماتوزئیدها، در رقیق‌کننده حاوی سطح ۳۰۰ میکرومولار کورکومین مشاهده شد و بیشترین ناهنجاری اسپرم در گروه کنترل بود که تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه مشاهده شد (p<۰/۰۵) (جدول۳).

جدول۲- مقایسه صفات زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و میزان اسپرم غیرطبیعی اسپرم منجمد شده خروس در بین سطوح مختلف کورکومین (بر اساس میکرومولار)

Table 2- Comparison of viability, plasma membrane integrity and abnormal sperm traits in post thawed rooster sperm between different levels of Curcumin (based on µmolar)

صفات Traits	زنده‌مانی(٪) Viability (%)	یکپارچگی غشاء پلاسمایی (٪) Plasma membrane integrity (%)	اسپرم غیرطبیعی(٪) Abnormality (%)
Control کنترل	52.20^{c}±1.53	44.40^{c}±1.66	29.00^{a}±1.13
100	61.00^{b}±1.53	52.00^{b}±1.66	24.40^{b}±1.13
200	70.28^{a}±1.53	55.70^{ab}±1.66	22.20^{bc}±1.13
300	64.00^{b}±1.53	60.20^{a}±1.66	20.40^{c}±1.13

*داده‌ها شامل میانگین ±خطای استاندارد می‌باشند. $^{a, b,c}$ میانگین های هر ستون با حروف غیرمشابه اختلاف معنی‌داری به لحاظ آماری دارند (p<۰/۰۵).

*Data are included means ± standard error. $^{a, b, c}$ Means within the same column with different superscripts differ significantly (p<0.05).

بحث

پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع غشای اسپرم، باعث اختلال در عملکرد سلول‌ها همراه با از دست دادن عملکرد غشاء و فرآیندهای غشایی می‌شود (پارتیکا و همکاران ۲۰۱۲، امینی و همکاران ۲۰۱۵). برای جلوگیری از آسیب‌هایی مانند شوک سرمایی، تولید گونه‌های اکسیژن فعال، پراکسیداسیون لیپیدی (بوکاک و همکاران ۲۰۰۸) و در نتیجه، آسیب‌های جبران ناپذیر غشای اسپرم (آمان و پیکت ۱۹۸۷)، علاوه بر آنتیاکسیدانهایی که در مایع منی بطور طبیعی وجود دارند بهتر است از آنتیاکسیدانهایی با منشا خارجی استفاده شود (بانسال و بیلاسپوری ۲۰۱۱) زیرا سیستم آنتی‌اکسیدانی موجود در پلاسمای منی تاثیر کوتاه مدتی دارد. یکی از این آنتی‌اکسیدانها که بصورت سنتتیک تولید شده و ما در این تحقیق از آن استفاده کردیم کورکومین میباشد. کورکومین آنتیاکسیدانی است با خاصیت ضدآپوپتوز و ضدالتهاب که یک پلی فنول لیپوفیلیک است و باعث نابودی رادیکال‌های آزاد و مهار تولید ROS میشود (پتروسکا و همکاران ۲۰۱٤، بوکاک و همکاران ۲۰۱۰).

داده‌های گذشته در مورد اثر کورکومین در میزان باروری جنس نر هنوز بحث برانگیز است. هر چند اثر کورکومین بر برخی فراسنجه‌های اسپرم بعضی گونه-ها، طی سال‌های اخیر بررسی شده است اما تاکنون هیچ پژوهشی اثر این ماده را بر اسپرم خروس بررسی نکرده است و این پژوهش اولین بار است که اثر آن را در غلظت‌های مختلف، مورد مطالعه قرار داده است.

مطالعاتی که در گذشته اثر کورکومین را بر اسپرم موش (سلیمانزاده و صابریوند (۲۰۱۳))، بز (بوکاک و همکاران (۲۰۱۰))، قوچ (عمر و همکاران (۲۰۱٤)) و گاو (توردا و همکاران (۲۰۱۵)) مورد بررسی قرار داده بودند، گزارش کردند که کورکومین سبب بهبود تحرک اسپرم می‌شود. در پژوهش حاضر نیز، تحرک اسپرماتوزوئیدها در گروه‌های آزمایشی بطور معنی-داری بیشتر از گروه شاهد بود. همچنین نتایج ما با نتایج مطالعه بررسی اثر بهبود دهندگی کورکومین بر

تحرک اسپرم موش‌هایی دریافت کننده مترونیدازول مطابقت داشت (کربلایی دوست و نور افشان ۲۰۱۱). کورکومین باعث متوقف شدن تغییرات پراکسیداتیو در اسپرم و غشای بیضه می‌شود، که منجر به افزایش تحرک اسپرم و کاهش اسپرم معیوب می‌شود (نور افشان و اشکانی- اصفهانی ۲۰۱۳). ناز (۲۰۱٤) پس از استفاده غلظت‌های مختلف کورکومین بر روی موش و انسان، با اینکه غلظت‌های کورکومین مشابه با پژوهش حاضر بود، اما مشاهده کرد که غلظت ۵۰ میکرومولار هیچ تاثیر آشکاری بر روی تحرک پیش‌رونده نداشت و غلظت ۱۰۰ میکرومولار باعث کاهش تحرک پیش‌رونده شد درحالیکه غلظت ۲۰۰ و بالاتر از ۲۰۰ میکرومولار بطور کامل تحرک پیش‌رونده را متوقف کرد و نتایج متفاوت با نتایج طرح حاضر بود. این تفاوت ممکن است به این دلیل باشد که، انکوباسیون اسپرم موش یا انسان همراه با کورکومین بسته به غلظت بکار برده شده آن، باعث کاهش تحرک پیش‌رونده، ظرفیت‌پذیر شدن و واکنش آکروزومی اسپرم می‌شود (ناز ۲۰۱۱). مکانیسم مولکولی احتمالی نشان میدهد که کورکومین ممکن است فسفوریلاسیون تیروزین را که از زیر مجموعه پروتئین سطح اسپرم و کانال‌های Ca^{+2} است، مهار کند. نشان داده شده است که فسفوریلاسیون تیروزین در تحرک، ظرفیت‌پذیری یا واکنش آکروزومی و عملکرد اسپرم دخیل می‌باشد (ناز و راجش ۲۰۰٤). در پژوهش ناز (۲۰۱٤) یافته‌ها نشان می‌دهد که کورکومین باعث اسیدی شدن داخل سلول و هایپرپلاریزاسیون غشای اسپرم می‌شود که ممکن است در مهار تحرک پیش-رونده موثر باشند (ناز ۲۰۱٤). دلیل دیگر کاهش تحرک اسپرم در آزمایش ناز و همکاران، شاید استفاده از DMSO بجای گلیسرول، تفاوت گونه‌ها و همچنین متفاوت بودن رقیق‌کننده باشد. از آنجائیکه میتوکندری-ها برای تولید انرژی بسیار ضروری هستند، در صورت آسیب دیدن آنها، در استفاده از انرژی اختلال ایجاد می‌شود؛ بنابر این جلوگیری از آسیب‌های اکسیداتیو و نیز تولید انرژی و در دسترس قرار دادن آن برای حفظ تحرک اسپرم موثر است (دووارد و همکاران ۲۰۰۰)

علاوه بر تحرک، زنده‌مانی اسپرم نیز بعد از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی در مقایسه با گروه شاهد بهبود یافت، بطوریکه در تیمار حاوی ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار کورکومین به ترتیب ٦۱، ۷۰/۲۸ و ٦٤ درصد زنده‌مانی حاصل شد این درحالی است که میانگین زنده‌مانی اسپرماتوزوئیدها در گروه شاهد، ۵۲/۲ درصد بود. می‌توان گفت که کورکومین با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، اسپرم را از آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت کرده و اثر مثبتی داشته است. داده‌های حاصل از مطالعه سلیمانزاده و صابری-وند (۲۰۱۳) در خصوص تاثیر بکارگیری کورکومین بر روی صفت زنده‌مانی اسپرماتوزوئیدها با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همخوانی داشت. یکی از مکانیسم احتمالی که در آن کورکومین باعث بهبود پارامترهای تحرک و زنده‌مانی می‌شود، جاروب‌کردن رادیکال‌های آزاد، کاهش استرس اکسیداتیو و در نتیجه خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن است (توردا و همکاران ۲۰۱۵، ایقبال و همکاران ۲۰۰۳).

مطالعه حاضر نشان داد که افزودن ۳۰۰ میکرومولار کورکومین موجب بهبود یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرماتوزوئیدها شده و غشاء پلاسمایی اسپرماتوزوئیدها را از آسیب‌های ناشی از فرآیند انجماد حفظ کرد و تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل و غلظت ۱۰۰ میکرومولار کورکومین داشت. مطالعاتی نیز در گذشته اثر کورکومین را بر گونه‌های مختلف بررسی کردند و مشاهده کردند که سلامت و یکپارچگی غشا اسپرم پس از استفاده کورکومین، بهبود یافت (بوکاک و همکاران(۲۰۱۲) ، عمر و همکاران (۲۰۱٤).

میزان ناهنجاری اسپرم نیز به‌تدریج از دوز ۱۰۰ تا ۳۰۰ میکرومولار کورکومین، کاهش پیدا کرده بود. از نظر مورفولوژی اسپرم، مطالعه ما همانند کارهای بوکاک و

همکاران (۲۰۱۰ و ۲۰۱۲) سبب کاهش ناهنجاری‌های اسپرم شد زیرا طی انجماد، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و مهار رادیکال‌های آزاد از خواص کورکومین است که در سلول‌های مختلف مستند شده است. از آنجائیکه استفاده از کورکومین مانع از تشکیل یا جاروب کردن ROSهای ناشی از انجماد می‌شود بنابر این منجر به بهبود نرمال بودن مورفولوژی اسپرم بعد از ذوب می‌شود (کانیتکار و بونده ۲۰۰۸).

پژوهش‌های انجام یافته در خصوص تاثیر آنتی اکسیدان کورکومین بر فراسنجه‌های اسپرم گونه‌های مختلف حاکی از اثرات مفید کورکومین (بوکاک و همکاران ۲۰۰۸) بر تحرک، مورفولوژی و فعالیت آنتی-اکسیدانی اسپرم سرد و منجمد شده قوچ است. بوکاک و همکاران در سال ۲۰۱۰ به بررسی تأثیر سه آنتی-اکسیدان کورکومین، اینوزیتول و کارنیتین در سطوح مختلف ۲/۵، ۵ و۱۰ میلی مولار بر روی ویژگی‌های منی، پراکسیداسیون چربی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم بز آنقوره طی فرآیند انجماد-یخ‌گشایی پرداختند. آنها مشاهده کردند که از میان سطوح مختلف کورکومین، رقیق‌کننده‌ای که حاوی ۲/۵ میلی‌مولار کورکومین بوده بر تحرک اسپرم تاثیر مثبت گذاشته و بالاترین درصد تحرک را نشان داده است. این در حالی است که هیچکدام از سطوح کورکومین، نسبت به گروه کنترل، تاثیر قابل توجهی برروی تحرک پیش‌رونده و فراسنجه‌های تحرک (VSL,VAP,LIN,ALH) اعمال نکرده است در حالیکه در پژوهش حاضر تاثیری که کورکومین برروی VSL، VAP و LIN گذاشته بود، مشهود بود. هر چند که در حالت کلی، هر دو پژوهش باعث بهبود تحرک شدند. همه مقادیر منجر به کاهش درصد ناهنجاری‌های کل اسپرم نسبت به کنترل شد. در مطالعه دیگری کورکومین و دی تیواریتریتول بر اسپرم گاو مورد استفاده قرار گرفت و تاثیر آنها بر فراسنجه-های اسپرم، پراکسیداسیون لیپیدی، گلوتاتیون کل و سطح پتانسیل آنتیاکسیدانی اسپرم گاو نر بدنبال فرآیند انجماد و ذوب ارزیابی گردید. نتایج حاکی از آن بود که استفاده از ۰/۵ میلی‌مولار کورکومین در رقیق‌کننده طی فرآیند انجماد- یخ‌گشایی، منجر به پایینترین درصد اسپرم غیرطبیعی و بیشترین اثر محافظتی در بهبود عملکرد غشا شد و همچنین سطح گلوتاتیون در ۰/۵ میلی‌مولار کورکومین در مقایسه با گروه شاهد بیشتر بود (بوکاک و همکاران ۲۰۱۲). عمر و همکاران (۲۰۱٤) با اضافه کردن ۱ و ۲ میلی‌مولار کورکومین به رقیق-کننده محیط انجمادی اسپرم قوچ بالاترین درصد اسپرم با غشاء سالم را مشاهده کردند. در کل اضافه کردن کورکومین باعث افزایش تحرک اسپرم، سلامت و یکپارچگی غشا، سالم ماندن آکروزوم و بهبود عملکرد میتوکندری در مقایسه با گروه شاهد شد. سلیمان زاده و صابری‌وند (۲۰۱۳) از غلظت ۲/۵ میلی‌مولار کورکومین استفاده کردند و تاثیر آن را بر روی اسپرم موش مورد بررسی قرار دادند. تحرک اسپرم بطور قابل توجهی در رقیق‌کننده حاوی کورکومین نسبت به کنترل حفظ شد. رقیق‌کننده حاوی کورکومین نسبت به کنترل از لحاظ مورفولوژی اسپرم تاثیر معنی‌داری نداشت برخلاف پژوهش ما که همه دوزها نسبت به کنترل معنی‌دار بود و این احتمالا مربوط به گونه، نوع رقیق کننده و غلظت به کار رفته می‌باشد.

براساس نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر، رقیق‌کننده حاوی کورکومین ۲۰۰ میکرومولار، فراسنجه‌های کلی مربوط به کیفیت منی خروس مخصوصا زنده‌مانی اسپرم را بعد از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی بهبود بخشید. باتوجه به یافته‌های این آزمایش به نظر می‌رسد که افزودن کورکومین در رقیق‌کننده اسپرم خروس، تاثیر شایان توجهی بر ویژگی‌های اسپرم آنها داشته باشد.

منابع مورد استفاده

Akhlaghi A, Ahangari YJ, Zhandi M and Peebles E, 2014. Reproductive performance, semen quality, and fatty acid profile of spermatozoa in senescent broiler breeder roosters as enhanced by the long-term feeding of dried apple pomace. Animal Reproduction Science 147: 64-73.

Amann RP and Pickett BW, 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. Journal of Equine Veterinary Science 7(3): 145-173.

Amini MR, Kohram H, Zare-Shahaneh A, Zhandi M, Sharideh H and Nabi MM, 2015. The effects of different levels of catalase and superoxide dismutase in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. Cryobiology 70(3): 226-232.

Ammon HP and Wahl MA, 1991. Pharmacology of Curcuma longa. Planta Medica, 57(1): 1–7.

Bakst, M.R. 1980. Fertilizing capacity and morphology of fowl and turkey spermatozoa in hypotonic extender. Journal of Reproduction and Fertility 60(1): 121-127.

Bansal AK and Bilaspuri GS, 2011. Impacts of oxidative stress and Antioxidants on semen functions. Veterinary Medicine international 686137: 1-7.

Bucak MN, Ates A, Ahin S and Y¨uce A, 2008. Effect of antioxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. Small Ruminant Research 75: 128-134.

Bucak MN, Başpınar N, Tuncer PB, Coyan K, Sarıözkan S, Akalın PP, Büyükleblebici S and Küçükgünay S, 2012. Effects of curcumin and dithioerythritol on frozen-thawed bovine semen. Andrologia 44. Suppl: 1. 102-109.

Bucak MN, Sarıözkan S, Tuncer PB, Sakin F, Ateşşahin A, Kulaksız R and 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: 24-30.

Cerolini S, Kelso KA, Noble RC, Speake BK, Pizzi F and Cavalchini LG, 1997. Relationship between Spermatozoan Lipid Composition and Fertility during Aging of Chickens. Biology of Reproduction 57: 976-980.

Chatterjee S and Gagnon C, 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. Molecular Reproduction and Development 59(4): 451–8.

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

Douard V, Hermier D and Blesbois E 2000. Changes in turkey semen lipids during liquid in vitro storage. Biology of Reproduction 63(5): 1450–1456.

Fujihara N and Howarth B, 1978. Lipid peroxidation in fowl spermatozoa. Poultry Science 57(6): 1766-1768.

Igbal M, Sharma SD, Okazaki Y, Fujisawa M and Okada S, 2003. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: Possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. Pharmacology and Toxicology 92(1): 33-38.

Jayaprakasha GK, Jaganmohan Rao L and Sakariah KK, 2006. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. Food Chemistry 98(4):720-724.

Kanitkar M and Bhonde RR, 2008. Curcumin treatment enhances islet recovery by induction of heat shock response proteins, Hsp70 and heme oxygenase-1, during crypreservation. Life Sciences 82(3-4): 182-189.

Karbalay-Doust S and Noorafshan A, 2011. Ameliorative effects of curcumin on the spermatozoon tail length, count, motility and testosterone serum level in metronidazole treated mice. Prague Medical Report 112(4): 288-297.

Khopde M, Priyadarsini KI, Venkatesan P and Rao MN, 1999. Free radical scavenging ability and antioxidant efficiency of curcumin and its substituted analogue. Biophysical Chemistry 80(2): 85-91.

Lin DS, Connor WE, Wolf DP, Neuringer M and Hachey DL, 1993. Unique lipids of primate spermatozoa desmosterol and DHA. Journal of Lipid Research 34(3): 491-499.

Masuda T, Maekawa T, Hidaka K, Bando H, Takeda Y and Yamaguchi H, 2001. Chemical studies on antioxidant mechanism of curcumin: analysis of oxidative coupling products from curcumin and linoleate. Journal of Agriculture and Food Chemistry 49(5): 2539– 2547.

NAZ RK, 2011. Can curcumin provide an ideal contraceptive? Molecular. Reproduction and Development 78: 116-123.

Naz RK, 2014. The Effect of Curcumin on Intracellular pH (pHi), Membrane Hyperpolarization and Sperm Motility. Journal of Reproduction and Infertility 15(2): 62-70.

Naz RK and Rajesh PB, 2004. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. Reproductive Biology and Endocrinology 2:75.

Noorafshan A and Ashkani-Esfahani S, 2013. A review of therapeutic effects of curcumin. Current Pharmaceutical Design 19(11): 2032-46.

Omur A, Coyan K, Ozturk C, Gungor S and Bucak M 2014. The effect of curcumin, ellagic acid and methionine on post-thawed Merino rams sperm parameters. The Faseb Journal 28:1-759.1.

Partyka A, Lukaszewicz E and Nizanski W, 2012. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in avian semen. Animal Reproduction Science 134: 184–190.

Petruska P, Capcarova M and Sutovsky P, 2014. Antioxidant supplementation and purification of semen for improved artificial insemination in livestock species. Turkish Journal of Veterinary Animal Science 38: 643-652.

Priyadarsini KI, 2013. Chemical and structural features influencing the biological activity of curcumin. Current Pharmaceutical Design 19(11): 2093–2100.

Ruby AJ, Kuttan G, Babu KD, Rajasekharan KN and Kuttan R, 1995. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. Cancer Letters 94(1): 79–83.

Salahshoor MR, Jalili C, Khazaei M and Khani F, 2012. Effects of curcumin on reproductive parameters in male mice. Journal of Clinical Research in Paramedical Sciences 1: 1-3.

Schäfer S and Holzmann A, 2000. The use of transmigration and Spermac™ stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. Animal Reproduction Science 59: 201-211.

Scott TW, 1973. Lipid metabolism of spermatozoa. Journal of Reproduction and Fertility 18: 65-76.

Shahbazzadeh R, Daghigh Kia H, Moghaddam Gh, Dehghan Gh, Hosseinkhani A and Ashrafi I, 2015. Effect of different levels of Satureja sahendica alcoholic extract on the quality of freeze-thawed Holstein bull spermatozoa. Animal Science Researches 25: 1-199.

Shi YC, Shang XJ and Wang XL, 2006. Correlation of total antioxidant capacity in seminal plasma with sperm motility of infertile men. National Journal of Andrology 12(8):703-705.

Soleimanzadeh A and Saberivand A, 2013. Effect of curcumin on rat sperm morphology after the freeze-thawing process. Veterinary Research Forum 4: 185 – 189.

Surai PF, Blesbois E, Grasseau I, Chalah T, Brillard JP, Wishart GJ, Cerolini S. and Sparks NHC, 1998. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. Comparative Biochemistry and Physiology 120(3): 527-533.

Tsukunaga S, 1987. Morphological evidence of osmotic and thermal shock of fowl sperm in relation to infertility of sperm Bull. Hiroshima. Agric. Coll 8: 257-303.

Tvrdá E, Lukáč N, Jambor T, Lukáčová J and Massányi P, 2015. Curcumin in male fertility: effects on spermatozoa vitality and oxidative balance. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science 4: 120-124.

Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ and Loughlin KR, 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. Urology 49: 921–925.

Zareh Ghaleh Jig F, Daghigh Kia H, Moghaddam Gh and Alijani S, 2017. Effect of adding Butylated hydroxytoluene as a synthetic antioxidant on freezing/thawing process of ram semen. Animal Science Researches 26: 37-47.

Effects of different levels of Curcumin antioxidant in Beltsville modified diluent on rooster sperm quality after freeze-thawing process

T Maroei Millan[1], H Daghigh Kia[2*] and Gh Moghaddam[2]

Received: November 26, 2016 Accepted: March 13, 2017
[1]MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[*]Corresponding Author Email: daghighkia@tabrizu.ac.ir

Introduction: The most worthwhile technique for preservation and management of bird genetic resources is semen cryopreservation, which has been studied in domestic birds like chicken. Despite years of intensive investigations, still more work should be done in order to perform successful cryopreservation of poultry sperm. The lower quality of frozen-thawed poultry sperm and consequently the poor fertilization rates compared to mammalian species are due to the exceptional morphological properties of poultry sperm, which cause freeze damages because of their vulnerable structure to low temperatures. During sperm cryopreservation, it is exposed to cold and osmotic shock, and resulted in increasing oxidation due to raise in oxidative reactions. It reduces sperm motility, viability, and ultimately reduces fertility. Oxidative stress occurs when oxidants are more potent than antioxidants. Hence, increased production of reactive oxygen species (ROS) caused by oxidative stress leads to lipid peroxidation (LPO), apoptosis, and DNA damage. Generally, the most important effect of lipid peroxidation on cells is the disruption of membrane structure and function. Plasma membrane damage is considered as one of the reasons for decreasing motility and fertility of rooster sperm. The aim of this study was to investigate the effects of different levels of curcumin antioxidants (0, 100, 200 and 300 µM) in Beltsville modified diluents for the cryopreservation of rooster semen. The present hypothesis was that curcumin antioxidants would be effective during cryopreserving of rooster sperm. Several parameters such as sperm motility, abnormalities, membrane integrity, viability and abnormality were assessed in this study to find the best level of curcumin antioxidants for cryopreservation of rooster sperm.

Material and methods: Semen samples were collected from eight Ross 308 rooster three times a week by massaging along the backbone and abdomen .The criteria in normal quality of sperm was as follows: the volume between 0.2 and 0.6 ml (semen volume was measured visually using a graduated collection tube); the concentration of sperm $\geq 3\times10^9$ sperm/ml (ejaculate concentration was evaluated by haemocytometer); total motility ≥80% and abnormal morphology (Hancock method [17]) ≤ 10%. Then, the semen samples were pooled to remove individual variations and obtain sufficient sperm for analysis. Different levels of curcumin were added to semen samples and followed by freezing. After thawing following sperm parameters were evaluated: total motility (TM, %), progressive motility (PM, %), average path velocity (VAP, µm/s), curvilinear velocity (VCL, µm/s), straight linear velocity (VSL, µm/s), amplitude of lateral head displacement (ALH, µm), beat cross frequency (BCF, Hz), straightness (STR, %), and linearity (LIN, %) using CASA software, viability by Eosin-Nigrosine Staining, membrane integrity by HOST test, and sperm abnormality by Hancock test. .

Results and discussion: The freezing extender supplemented with 200 µM of curcumin resulted in higher percentages of total and progressive motilities in comparison with other groups and control group following the freeze-thawing process ($P < 0.05$). Group receiving 200 µM of curcumin had better performances in terms of VAP, VSL, VCL, and LIN. The analysis demonstrated that the samples supplemented with 200 µM of curcumin could improve sperm viability percentage ($P < 0.05$). It can be concluded that curcumin, having antioxidant properties, protects sperm from oxidative stress damage and has a positive effect on sperm viability. Samples with 300 µM

curcumin had the highest amount of plasma membrane integrity and lowest amount of abnormality compared to other treatments and the control group ($P< 0.05$). Since the use of curcumin prevents the formation of ROSs during freezing, it therefore improves the normal morphology of sperm after thawing. One of the possible mechanisms in which curcumin improves motility and survival parameters is its antioxidant properties in preventing the formation of free radicals or scavenging it and reducing oxidative stress. No significant effect was noted on the STR parameter between different groups.

Conclusion: The results of this study showed that adding 200 µM curcumin can have favorable effects on post-thawed rooster sperm motility parameters, viability, plasma membrane integrity, and abnormality.

Keywords: Roster sperm, Freeze-thawing, Curcumin antioxidant, Free radical