Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 18, No. 1, Spring 2018, Pages 120-130

Effect of Curcumin on Bax, Bcl-2, Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation of Sperm after Freezing Procedure

Vafa TS[1], Emadi M[1], Sadoughi SD[2*]

1. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran
2. Young Researchers and Elite Club, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

[*]***Corresponding author.*** Tel: +985138683900, Fax: +985138683001, E-mail: damoon.sadoughi@mshdiau.ac.ir

Recieved: Oct 23, 2017 Accepted: Mar 11, 2018

ABSTRACT

Background & objectives: Curcumin has antioxidant properties. The aim of this study was to determine the effect of curcumin on bax, bcl-2, antioxidant enzymes and lipid peroxidation of sperm after freezing procedure.

Methods: In this experimental study, semen samples were collected from four mature Holstein bulls, twice a week in eight innings. Semen samples were divided into four groups. Zero (control), 10 (Experimental group one), 20 (Experimental group two) and 30 (Experimental group three) mg/ml of curcumin with diluents were added to the semen samples. After thawing, Bax, Bcl-2 and malondialdehyde levels as well as superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase enzymes were measured in sperm samples using ELISA.

Results: According to the results, Bcl-2, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase levels in sperm samples treated with 20 and 30 mg/ml curcumin significantly increased and Bax and malondialdehyde levels significantly decreased compared to control groups ($p<0.05$). This difference was not significant for sperm samples treated with 10 mg/ml curcumin.

Conclusion: Dose-dependent administration of curcumin decreased oxidative stress and lipid peroxidation and increased anti-apoptosis proteins in freeze-thawing sperms.

Keywords :Apoptosis; Antioxidant Enzymes; Sperm; Lipid Peroxidation; Curcumin

اثر کورکومین بر میزان Bax، Bcl-2، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم پس از فرایند انجماد

تکتم سادات وفا[1]، مژده عمادی[1]، سید دامون صدوقی[2]*

۱. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۵۱۳۸۶۸۳۹۰۰ فاکس: ۰۵۱۳۸۶۸۳۰۰۱ پست الکترونیک: damoon.sadoughi@mshdiau.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: کورکومین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است و هدف از مطالعه حاضر تعیین اثر کورکومین بر میزان Bax، Bcl-2، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم پس از فرایند انجماد می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی از چهار راس گاو بالغ نژاد هلشتاین، دو بار در هفته در هشت نوبت نمونه‌های اسپرم جمع‌آوری شد. نمونه‌های منی به چهار گروه تقسیم شدند. مقادیر صفر (شاهد)، ۱۰ (گروه تجربی یک)، ۲۰ (گروه تجربی دو) و ۳۰ (گروه تجربی سه) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کورکومین به همراه رقیق‌کننده به نمونه‌های منی اضافه شد. پس از فرایند ذوب، میزان Bax، Bcl-2، مالون‌دی‌آلدئید همچنین میزان آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در نمونه‌های اسپرم توسط روش الایزا سنجش شد.

یافته‌ها: با توجه به نتایج به‌دست آمده، میزان Bcl-2، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در نمونه‌های اسپرم تحت تیمار با غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کورکومین در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش و سطوح Bax و مالون‌دی‌آلدئید به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). این مقایسه برای نمونه اسپرم تحت تیمار با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کورکومین معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: مصرف وابسته به دوز کورکومین موجب کاهش استرس‌اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش پروتئین‌های ضدآپوپتوزیس در اسپرم منجمد- یخ گشایی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوزیس، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، اسپرم، پراکسیداسیون لیپیدی، کورکومین

دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۰۱ **پذیرش:** ۱۳۹۶/۱۲/۲۰

مقدمه

یکی از فناوری‌های مهم جهت نگهداری و افزایش ماندگاری اسپرم، حفاظت انجمادی است. علاوه بر مزایای این تکنیک گزارش‌های زیادی مبنی بر کاهش کیفیت اسپرم طی انجماد وجود دارد [۱]. انجماد اسپرم بیشتر پستانداران مستلزم گذراندن دو مرحله است. طی مرحله اول که دوره خنک کردن نامیده می‌شود، دمای مایع منی رقیق شده از ۳۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد به دمای تقریباً ۵ درجه سانتی‌گراد می‌رسد. در مرحله دوم که دوره منجمدکردن است، دمای مایع منی رقیق شده توسط نیتروژن مایع از ۵ درجه به ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد کاهش داده می‌شود که این کاهش درجه حرارت، سبب کاهش میزان متابولیسم و افزایش طول عمر باروری اسپرماتوزوا می‌شود [۲]. اسپرم‌ها طی فرایند انجماد- ذوب دچار ضایعات متعددی از قبیل مرگ، کاهش تحرک اسپرم، معیوب شدن آکروزوم، تخریب غشا و اختلال در ساختمان میتوکندری‌ها می‌شوند. این امر سبب کاهش

قدرت باروری اسپرم یخ‌گشایی شده می‌شود [۳]. تحقیقات نشان داده است سلول‌های سوماتیک دارای محافظ‌های آنزیمی سیتوپلاسمی مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز هستند، اما سلول‌های اسپرم طی فرایند بلوغ مقدار زیادی از سیتوپلاسم خود را از دست می‌دهند، در نتیجه از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی کمتر بهره می‌برند [٤،٥]. با توجه به اینکه سلول‌های اسپرم مقادیر زیادی اسیدهای چرب غیراشباع دارند همین امر غشای آن‌ها را نسبت به آسیب‌های اکسیداتیو مستعد می‌سازد [۶]. به‌عبارت دیگر در طول فرایند انجماد- ذوب در اثر پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع غشای پلاسمایی، مولکول‌های واکنش‌گر و رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایجاد می‌شوند که تحرک اسپرم، قابلیت زنده‌مانی، فعالیت آنزیمی درون‌سلولی، قدرت باروری و عملکرد اسپرم را مختل می‌کنند [۷،۸]. محققین درصد پراکسیداسیون لیپیدی غشا و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را در اسپرم گاو و بوفالو طی فرایند انجماد- ذوب مورد ارزیابی و مقایسه قرار دادند و گزارش شده است میزان مالون دی‌الدئید که شاخص پراکسیداسیون لیپیدی است افزایش می‌یابد ولی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مایع منی کاهش می‌یابد [۹].

فرایند آپوپتوزیس یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی تحت تاثیر ژن‌های خانواده Bcl-2 شامل Bcl-2، Bcl-xl، Bax، Bad و خانواده کاسپاز تنظیم می‌شود. خانواده Bcl-2 می‌توانند هم نقش القایی و هم نقش مهاری در فرایند آپوپتوزیس داشته باشد. برخی از اعضای این خانواده در مهار (Bcl-2 و Bcl-xl) و برخی دیگر در القاء فرایند آپوپتوزیس (Bad, Bax, Bax, Bcl-xs) نقش دارند [۱۰]. نسبت عوامل القاء کننده و مهار کننده، نقش مهمی در بقاء سلول و یا در شروع فرایند آپوپتوزیس بر عهده دارد. در صورت کاهش میزان بیان ژن Bcl-2، فرایند آپوپتوزیس به‌واسطه فعال شدن پروتئین p53 شروع می‌شود [۱۱،۱۲]. پروتئین Bax به‌عنوان القاء کننده فرایند آپوپتوزیس عمل می‌کند. پروتئین مذکور در شرایط طبیعی به میزان بسیار اندک در سیتوپلاسم قرار دارد ولی به هنگام القاء فرایند آپوپتوزیس بیان آن به‌صورت الیگومر در غشای خارجی میتوکندری افزایش می‌یابد. در این حالت کانال‌هایی را در غشای خارجی میتوکندری تشکیل می‌دهد که به دنبال آن از خلال این کانال‌ها سیتوکروم C از میتوکندری به درون سیتوپلاسم وارد می‌شود و به دنبال آن سیتوکروم C سبب تحریک آبشار کاسپازها می‌شود [۱۱،۱۲]. مطالعات نشان داده است شرایط استرس‌اکسیداتیو می‌تواند محرکی برای شروع فرایند آپوپتوزیس باشد. همچنین مشخص شده است افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن با القاء استرس‌اکسیداتیو و آسیب اکسیداتیو DNA می‌توانند موجب شروع فرایند آپوپتوزیس شود [۱۳].

طی تحقیقات انجام شده فرایند انجماد اسپرم با تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود. این امر از عوامل مهم در کاهش تحرک و باروری اسپرم پس از فرایند ذوب است [١٤]. طی فرایند انجماد مایع منی در معرض شوک سرمایی و فشار اسمزی قرار گرفته و در نتیجه میزان اکسیداسیون غشاء به واسطه درصد بیشتر واکنش‌های اکسیداتیو افزایش می‌یابد [۱۵]. از آنجایی که سلامت اسپرم بر میزان لقاح مؤثراست، لذا به‌نظر می‌رسد که آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش رادیکال‌های آزاد و کاهش اثرات منفی شوک اکسیداتیو و همچنین بهبود پارامترهای اسپرم از اهمیت کلینیکی بالایی برخوردار هستند [۱۶]. با توجه به نقش رادیکال‌های آزاد در القاء آپوپتوزیس و ایجاد شرایط استرس‌اکسیداتیو، ترکیباتی که بتوانند موجب مهار رادیکال‌های آزاد در مایع منی طی فرایند انجماد- ذوب شوند، از اهمیت بالایی برخوردار هستند. لازم به ذکر است آنتی‌اکسیدان‌های متنوعی در سال‌های اخیر جهت محافظت اسپرم در طول فرایند انجماد- ذوب

استفاده شده است. با این حال، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های صناعی دارای عوارض متنوعی است که اخیراً محققین و تولید کننده‌های اسپرم منجمد را به جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌های صناعی با آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی متمایل کرده است [۱۷]. از طرفی رقیق کردن مایع منی در زمان ذخیره‌سازی امری اجتناب‌ناپذیر است بنابراین افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به مایع منی در زمان ذخیره‌سازی می‌تواند مفید باشد.

زردچوبه با نام علمی *Curcuma longa* از خانواده Zingiberaceae می‌باشد. کورکومین ماده موثره ریزوم گیاه زردچوبه و یک پلی‌فنول است [۱۸]. مشخص شده است کورکومین می‌تواند عامل حفاظتی قدرتمندی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو سلولی باشد و نیز با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود موجب مهار رادیکال‌های آزاد شود. همچنین با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اثرات محافظتی خود را بر سلول‌ها اعمال می‌کند [۱۹]. تحقیقات نشان داد بخشی از آثار سودمند تجویز کورکومین به موش‌های صحرایی دیابتی از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی اعمال می‌شود [۲۰]. در پژوهشی مشخص شد کورکومین می‌تواند سبب کاهش آسیب اکسیداتیو DNA و کاهش سایتوکین‌های التهابی در موش‌های صحرایی دیابتی شود [۲۱]. با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی کورکومین، این پژوهش با هدف تعیین اثر کورکومین بر میزان Bax، Bcl-2، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم پس از فرایند انجماد-ذوب انجام شد.

روش‌کار

مطالعه تجربی حاضر تحت نظارت باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد در سال ۱۳۹۵ طراحی و اجرا شد. در این پژوهش از منی ٤ راس گاو هلشتاین با شرایط محیطی و تغذیه‌ای یکسان و سلامت عمومی و ویژگی‌های تولید مثلی مطلوب، استفاده شد. با استفاده از واژن مصنوعی و به تعداد دو بار در هفته اسپرم‌گیری انجام شد. سپس با هدف از میان برداشتن تأثیرات فردی دام‌ها، نمونه‌های منی هر دام به مقدار مساوی در هر تکرار آزمایشی با هم مخلوط شدند. لازم به ذکر است قبل از انجام اسپرم‌گیری، تمام اجزای واژن مصنوعی به‌مدت حداقل یک ساعت در دمای ٤۲-٤۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از جمع آوری مایع منی، به‌منظور بررسی‌های ابتدایی بی‌درنگ به آزمایشگاه منتقل و در حمام آب ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه‌های منی ابتدا از نظر رنگ، عدم آلودگی به ادرار و خون مورد بررسی قرار گرفتند و نمونه‌هایی که از نظر شاخص‌های WHO دارای رنگ شیری، حجم بین ۱۲-۵ میلی لیتر، غلظت بیشتر از ۱×۱۰^{۹} سلول اسپرم در هر میلی‌لیتر، درصد حرکت پیشرونده بیشتر از ۷۰ درصد و مورفولوژی کمتر از ۱۰ درصد غیرطبیعی در هر انزال بودند، به‌عنوان منی طبیعی در نظر گرفته شد [۲۲]. در غیر این‌صورت منی‌های جمع‌آوری شده حذف شدند. غلظت اسپرم‌ها توسط دستگاه فتومتر و درصد تحرک کل به کمک تکنیک CASA (Computer-Aided Sperm Analysis) تعیین شد. از نرم افزار آنالیز اسپرم شرکت فنی مهندسی فرادید پرداز پارس تهران برای تعیین درصد تحرک اسپرم استفاده شد. همچنین این سیستم مجهز به لپ تاپ (HP-Probook 450, China)، میکروسکوپ فاز کنتراست (Olympus, Japan) و دوربین دیجیتال (Cannon - Japan) بوده است.

در این تحقیق از رقیق‌کننده بر پایه سیترات-زرده تخم مرغ استفاده شد [۲۳]. بدین صورت که ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق‌کننده پایه دارای ۶۷ میلی‌لیتر محلول سیترات ۳ درصد، ۲۵ میلی‌لیتر زرده تخم مرغ، ۷ میلی‌لیتر گلیسرول، ۵ میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، ۰/۳ میلی‌لیتر لینکوپک، ۰/۰۲۵ میلی‌لیتر تایلوزین بوده است. همچنین pH رقیق‌کننده در

حدود ۶/۹ تنظیم شده است. در رقیق‌سازی اسپرم‌ها از روش دو مرحله‌ای استفاده شد، به‌نحوی که در مرحله اول محلول رقیق‌کننده با ۳ درصد گلیسرول (رقیق‌کننده A) و در مرحله دوم محلول رقیق‌کننده با ۱۱ درصد گلیسرول (رقیق‌کننده B) به مایع منی افزوده شد. لازم به ذکر است ترکیبات و حجم رقیق-کننده‌ها بجز درصد گلیسرول، کاملاً یکسان بوده است [۲٤]. کورکومین (Sigma-Aldrich, Germany) با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به محلول رقیق‌کننده A افزوده شد.

نمونه‌های منی به ٤ گروه مساوی تقسیم شدند (در هر گروه ۸ تکرار). گروه شاهد (غلظت صفر کورکومین) و سه گروه تحت تیمار با غلظت‌های ۱۰ (گروه تجربی یک)، ۲۰ (گروه تجربی دو) و ۳۰ (گروه تجربی سه) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کورکومین. پس از ارزیابی اولیه، نمونه‌های منی با غلظت ۵۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر از محلول رقیق‌کننده به لوله-های فالکون حاوی سطوح متفاوت کورکومین و رقیق-کننده A (رقیق‌کننده حاوی ۳ درصد گلیسرول) اضافه شدند. سپس فالکون‌ها به داخل ظرف آب ۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از سرد شدن و تعادل در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد رقیق‌کننده B (رقیق‌کننده حاوی ۱۱ درصد گلیسرول) با دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به فالکون‌ها اضافه شد تا غلظت نهایی گلیسرول به ۷ درصد برسد. نمونه‌های منی در پایوت‌های نیم میلی‌لیتری ریخته شد و توسط پودر پلی‌وینیل الکل بسته‌بندی شدند. نمونه‌ها توسط دستگاه انجماد (IMV-Digitcool, France) به ترتیب به دمای ٤-، ۲۰- و ۸۰-، درجه سانتی‌گراد رسیدند. سپس پایوت‌ها به تانک ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و به مدت ۳۰ روز در این دما نگهداری شدند [۲۵]. پس از ۳۰ روز پایوت‌های حاوی منی منجمد شده از تانک ازت خارج شدند و در داخل حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه ذوب شدند. سپس محتویات پایوت درون میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتر تخلیه شد. سپس میکروتیوپ‌ها با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه (RPM)، نیروی نسبی سانتریفیوژ ۱۲۳۵ g(RCF) و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس توسط بافر سیترات شستشو و سه مرتبه سانتریفوژ تکرار شد [۲۶]. در نهایت محلول سطحی حذف و اسپرم‌های باقی‌مانده به همراه بافر تریس (pH=۷/٤، ۱=Molarity) (Sigma-Aldrich, Germany) به مدت ۲ دقیقه توسط دستگاه هموژنایزر با ۵۰۰۰ دور در دقیقه هموژنیزه و در ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شدند. جهت جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پروتئین‌ها، تمامی مراحل در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد (سانتریفوژ یخچال‌دار) انجام شد و از محلول ۰/۵ میلی‌مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید به‌عنوان مهارکننده آنزیم‌های اسپرم استفاده شد [۲۷]. پارامترهای پژوهش حاضر توسط روش ELISA، کیت‌های ساخت شرکت فاین تست (Finetest, China) و دستگاه الایزاریدر (Stat Fax-2100, USA) سنجش شد. کیت Bcl-2 دارای حساسیت <۹/۳۷۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۱۰۰۰-۱۵/۶۲۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر، کیت Bax دارای حساسیت <۰/۱۸۸ نانوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۲۰-۰/۳۱۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر، کیت سوپر اکسید دیسموتاز دارای حساسیت <۹/۳۷۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۱۰۰۰-۱۵/۶ پیکوگرم بر میلی‌لیتر، کیت کاتالاز دارای حساسیت <۱۸/۷۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۲۰۰۰-۳۱/۲ پیکوگرم بر میلی‌لیتر ، کیت گلوتاتیون پراکسیداز دارای حساسیت <۱۸/۷۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۲۰۰۰-۳۱/۲۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و کیت مالون دی‌آلدئید دارای حساسیت <۱۸/۷۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۲۰۰۰-۳۱/۲۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

اطلاعات به‌دست آمده توسط نرم افزار آماری SPSS-20 تحلیل شد. با توجه به این‌که نتایج به‌دست‌آمده کمی است، توسط آزمون

کلوموگروف- اسمیرنوف فرض طبیعی بودن توزیع فراوانی داده‌ها بررسی شد ($p>۰/۰۵$). جهت مقایسه میانگین بین گروه‌های مورد آزمایش از آنالیز واریانس یک‌طرفه و جهت مقایسه زوج گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. همچنین نتایج به‌دست آمده به‌همراه محاسبات آماری مربوطه به‌صورت میانگین± خطای معیار میانگین گزارش شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تحلیل داده‌های این مطالعه نشان داد میزان Bcl-2 اسپرم در گروه‌های تحت تیمار با ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کورکومین در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). همچنین میزان Bax در گروه‌های تحت تیمار با ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کورکومین در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). میزان آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز اسپرم در گروه‌های تحت تیمار ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کورکومین در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). میزان مالون‌دی‌آلدئید اسپرم در گروه‌های تحت تیمار با ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کورکومین در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). در مقایسه زوج پارامترهای مورد بررسی پژوهش حاضر، اختلاف معنی‌داری بین گروه تحت تیمار با ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کورکومین و گروه شاهد مشاهده نشد. نتایج آماری نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین ۳ گروه تحت تیمار با کوکومین (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) است ($p<۰/۰۵$) و این امر گویای تاثیر وابسته دوز کورکومین در بهبود شاخص‌های مورد بررسی پژوهش حاضر می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱. اثر کورکومین بر میزان Bax، Bcl-2، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و مالون‌دی‌آلدئید در اسپرم گاو پس از فرایند انجماد- یخ‌گشایی

متغیر / گروه	Bax (نانوگرم بر میلی‌لیتر)	Bcl-2 (پیکوگرم بر میلی لیتر)	SOD (پیکوگرم بر میلی لیتر)	GPX (پیکوگرم بر میلی لیتر)	CAT (پیکوگرم بر میلی لیتر)	MDA (نانوگرم بر میلی‌لیتر)
شاهد	۲/۸۳±۰/۲۶	۲۳/۶۵±۰/۳۸	۱۹/۸۷±۱/۸۳	۳۹/۶٤±۲/۷۸	۳۱/۶۰±۲/۵٤	۹۹/۷۶±۳/۲۰
۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کورکومین	۲/۰۸±۰/۱۸	۳۱/۵۲±۲/۱٤	۲۳/۳۰±۲/٤۱	۵۷/۶۲±٤/۱۸	٤۷/۵۲±۳/۶۲	۸۵/۷۲±۳/٤۵
۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کورکومین	۱/۱۵±۰/۲۱^{ab}	۶٤/٤۸±٤/۷۵^{ab}	۳۶/۸٤±۳/۵۸^{ab}	۸۸/۳۲±۳/۷۵^{ab}	۹۸/۵۲±٤/۲۸^{ab}	۵۶/۰۷±٤/۷۶^{ab}
۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کورکومین	۰/۷۵±۰/۲۲^{abc}	۸۵/٤۳±۵/۱۷^{abc}	۵۶/۱۰±٤/۶۰^{abc}	۱۲۱/۶۰±٤/۷۲^{abc}	۱۳۶/۳۲±۲/۷۰^{abc}	۳٤/۸۲±۳/۱۰^{abc}
سطح معنی‌داری (One-way ANOVA)	۰/۰۰۲	۰/۰۰۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰۷	۰/۰۰۵	۰/۰۰۹

داده‌ها به صورت Mean±SD نشان داده شده است؛ a: $p<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه شاهد، b: $p<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه تحت تیمار با ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کورکومین، c: $p<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه تحت تیمار با ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کورکومین

بحث

در این پژوهش اثر کورکومین بر میزان Bax، Bcl-2، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم پس از فرایند انجماد مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه مشخص شد فرایند انجماد- ذوب سبب کاهش میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش پروتئین‌های دخیل در فرایند آپوپتوزیس در سلول‌های اسپرم می‌شود. نتایج مطالعات پیشین نشان داده است فرایند انجماد- ذوب با افزایش پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم و افزایش استرس‌اکسیداتیو همراه است. همچنین تحقیقات نشان داده است شوک سرمایی با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سبب تغییراتی در نفوذپذیری و ترکیبات لیپیدی غشاءِ سلول‌های اسپرم

می‌شود، به‌طوری که میزان سیالیت غشا و ترکیبات آن را تغییر می‌دهد. در واقع، تغییرات دمایی طی فرایند انجماد- ذوب، باعث وارد شدن آسیب‌های ساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی به سلول‌های اسپرم می‌شود و به‌دنبال آن، تعداد سلول‌های زنده و متحرک و در پی آن قدرت باروری کاهش پیدا می‌کند [۲۸،۲۹]. همسو با نتایج پژوهش حاضر محققین نشان دادند فرایند انجماد- ذوب سبب افزایش مالون دی‌آلدئید سلول‌های اسپرم می‌شود که گویای افزایش پراکسیداسیون لیپیدی است [۲۶]. محققین به بررسی شاخص‌های حرکتی، میزان گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم منجمد پرداختند و مشخص شده است فرایند انجماد- ذوب با تشکیل گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن و با تضعیف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی اسپرم، سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود، که از عوامل مهم در کاهش تحرک و باروری اسپرم پس از ذوب است [۳۰]. همچنین مشخص شده است فرایند انجماد- ذوب سبب کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اسپرم می‌شود که با نتایج پژوهش حاضر همسو است [۳۱]. محققین نشان دادند انجماد اسپرم با تغییر در متابولیت‌های درون سلولی و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سبب افزایش رادیکال‌های آزاد درون سلولی می‌شود و به دلیل حساسیت بالای سلول‌های اسپرم به تنش‌های اکسیداتیو، صدمه زیادی ازجمله پراکسیداسیون لیپیدی، آسیب DNA آپوپتوز و کاهش شاخص‌های باروری اسپرم می‌شود [۳۲].

با توجه به نتایج پژوهش حاضر، سطوح Bcl-2، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در نمونه‌های اسپرم تحت تیمار با غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کورکومین در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش و سطوح Bax و مالون‌دی‌آلدئید به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. نتایج تحقیقات پیشین نشان می‌دهد که آنتی‌اکسیدان‌ها در کاهش شرایط استرس‌اکسیداتیو اسپرم‌های یخ‌گشایی‌شده نقش موثری دارند [۳۳]. از آنجایی که شاخص‌های حیاتی اسپرم بر میزان لقاح موثرند، لذا به‌نظر می‌رسد که آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش رادیکال‌های آزاد و کاهش اثرات منفی تنش‌های اکسیداتیو، در نهایت سبب بهبود فراسنجه‌های کیفی و کمی اسپرم می‌شوند [۳۳]. محققین در مطالعه‌ای به بررسی اثر محافظتی کورکومین بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در کلیه موش صحرایی دریافت‌کننده استامینوفن پرداختند و مشخص شده است کورکومین می‌تواند با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز عامل حفاظتی قدرتمندی در برابر تغییرات بیوشیمیایی و آسیب اکسیداتیو ناشی از مواجهه با دوز حاد استامینوفن در کلیه موش‌های صحرایی باشد. این امر نشان‌دهنده خواص آنتی‌اکسیدانی کورکومین به‌عنوان مکمل در افزایش قدرت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی است [۳۴]. از سوی دیگر محققین نشان دادند کورکومین به دلیل دارابودن خواص آنتی‌اکسیدانی از طریق جمع‌آوری، خنثی‌سازی و از دسترس خارج نمودن رادیکال‌های آزاد برای واکنش‌های اکسیداتیو، تعامل با آبشارهای اکسیداتیو و ممانعت از به نتیجه رسیدن این واکنش‌ها عمل می‌کند [۳۵]. در پژوهشی مشخص شد عصاره اتانولی زردچوبه می‌تواند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز را در آسیب روده‌ای القاشده توسط متوترکسات افزایش دهد. همچنین عنوان شد زردچوبه می‌تواند بافت روده را در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از متوترکسات محافظت کند. این امر به کورکومین موجود در عصاره زردچوبه نسبت داده شد [۳۶]. همسو با مطالعات پیشین، در پژوهش حاضر اثرات آنتی‌اکسیدانی و افزاینده فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی توسط کورکومین به اثبات رسیده است و طی مطالعات پیشین مشخص شده است فعالیت

آنتی‌اکسیدانی و مهارکننده رادیکال‌های آزاد توسط کورکومین به‌دلیل ساختار فنوکسی و پیوندهای دوگانه کونژوگه آن می‌باشد که می‌تواند رادیکال‌های آزاد مانند رادیکال هیدروکسیل را به‌خوبی مهار و حذف نماید. کورکومین علاوه بر مکانیسم مولکولی بر پایه حذف مستقیم رادیکال‌های آزاد، می‌تواند فعالیت آنزیم‌های داخل سلولی مانند سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز که نقش آنتی‌اکسیدانی دارند را افزایش دهد [۳۷،۳۸]. نتایج پژوهشی نشان داده است کورکومین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی قادر است قابلیت حیات، تمامیت آکروزوم، تمامیت غشای پلاسمایی و تعداد اسپرم را در موش‌های آزمایشگاهی در معرض کادمیوم بهبود بخشد [۳۹]. همچنین در پژوهشی عنوان شده است تجویز کورکومین از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپیدی سبب کاهش شدت درد در دو مرحله حاد و مزمن آزمون فرمالین در موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود [۴۰]. از سوی دیگر محققین نشان دادند کورکومین می‌تواند موجب افزایش سطح سلولی آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی، و تشدید فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شود، این امر متعاقباً سبب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و استرس‌اکسیداتیو در بافت کلیه موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود [۴۱]. در تائید نتایج پژوهش حاضر مشخص شده است کورکومین می‌تواند سبب کاهش مالون دی‌آلدئید در بافت کبد موش‌های صحرایی دیابتی [۴۲] و بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی در معرض استات سرب شود [۴۳]. بنابراین کاهش پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از فرایند انجماد- یخ‌گشایی در نتیجه افزودن کورکومین به رقیق‌کننده اسپرم با نتایج سایر محققین همسو است.

نتایج پژوهشی نشان داده است کورکومین با مهار ترشح فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا و سایر سایتوکین‌های التهابی مانند اینترلوکین-۱ که یکی از عوامل نکروز بافتی است، از نکروز هپاتوسیت‌ها و التهاب موضعی ایجادشده توسط سیکلوفسفامید در بافت کبد جلوگیری می‌کنند. همچنین عنوان شده است کورکومین با مهار بیان ژن‌های فعال‌کننده آپوپتوزیس موجب مهار آن در سلول‌های هپاتوسیت مسمویت ناشی از سیکلوفسفامید می‌شود [۴۴]. نتایج تحقیقات انجام شده گویای این مطلب است که کورکومین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند نشانه‌های آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده نخاع مهار نماید، این امر احتمالاً به مهار استرس‌اکسیداتیو و یا افزایش سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی کورکومین نسبت داده شده است که سبب مهار فرایند آپوپتوزیس در سلول‌های نورونی می‌شود [۴۵]. در پژوهشی مشخص شده است کورکومین می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی، با مهار فرایند آپوپتوزیس سبب افزایش اسپرماتوژنز در بافت بیضه موش‌های صحرایی در معرض پرتوهای گاما شود. همچنین گزارش شده است کورکومین می‌تواند به عنوان یک عامل محافظ سبب کاهش شکستگی DNA ناشی از پرتو گاما شود [۴۶]. با توجه به این‌که استرس اکسیداتیو ناشی از فرایند انجماد- یخ‌گشایی می‌تواند به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های دخیل در القا آپوپتوزیس در اسپرم نقش داشته باشد. مشخص شده است کورکومین می‌تواند مشخصات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی آپوپتوزیس را در سلول‌های اسپرم مهار نمایند [۴۷].

در این مطالعه تنها به بررسی اثر کورکومین بر میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پراکسیداسیون لیپیدی و پروتئین‌های Bax و Bcl-2 پس از فرایند انجماد- ذوب اسپرم پرداخته شد. پیشنهاد می‌شود اثر کورکومین بر شاخص‌های حیاتی اسپرم پس از فرایند انجماد- یخ‌گشایی مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به این‌که این امر می‌تواند تکمیل‌کننده نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر باشد، عدم بررسی شاخص‌های حیاتی اسپرم مانند میزان تحرک اسپرم،

درصد زنده ماندن و یکپارچگی غشاءِ اسپرم و عدم بررسی مکانیسم دقیق اثر کورکومین درمورد نتایج به‌دست آمده ازجمله محدودیت‌های این مطالعه می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت افزودن کورکومین به‌عنوان مکمل به مایع رقیق‌کننده اسپرم می‌تواند تاثیر مثبتی بر کاهش استرس‌اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از فرایند انجماد- ذوب داشته باشد. همچنین کورکومین به‌صورت وابسته به دوز موجب افزایش پروتئین‌های ضد آپوپتوزیس در اسپرم‌های منجمد می‌شود. از این‌رو می‌توان به نقش آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در بهبود آسیب‌های ناشی از فرایند انجماد- ذوب اشاره کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله، مستخرج از پژوهشی است که با حمایت مالی دانشگاه پیام نور انجام شده است. همچنین نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد کمال تشکر و قدردانی را به عمل آورند.

References

1- Fraser L, Wysocki P, Ciereszko A, Plucienniczak G, Kotlowska M, Kordan W, et al. Application of biochemical markers for identification of biological properties of animal semen. Reprod Biol. 2006; 6(1): 5-20.
2- Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. Small Rumin Res. 2006 Jun; 63(3): 215-25.
3- Vilela CG, Marquez JM, Graham JK, Barfield JP. Cryopreservation of bison epididymal sperm: A strategy for improving post-thaw quality when collecting sperm in field conditions. Theriogenology. 2017 Feb; 89: 155-61.
4- Fang Y, Zhong R, Chen L, Feng C, Sun H, Zhou D. Effects of astaxanthin supplementation on the sperm quality and antioxidant capacity of ram semen during liquid storage. Small Rumin Res. 2015; 130 Sep: 178-82.
5- Sarıozkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Buyukleblebici S, Canturk F. Influence of various antioxidants added to TCM-199 on post-thaw bovine sperm parameters, DNA integrity and fertilizing ability. Cryobiology. 2014 Feb. 68(1): 129-33.
6- Sarıozkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Büyükleblebici S, Eken A, Akay C. Influence of fetuin and hyaluronan on the post-thaw quality and fertilizing ability of Holstein bull semen. Cryobiology. 2015 Aug; 71(1): 119-24.
7- Kim S, Agca C, Agca Y. Changes in rat spermatozoa function after cooling, cryopreservation and centrifugation processes. Cryobiology. 2012 Dec; 65(3): 215-23.
8- Zhao Y, Buhr MM. Cryopreservation extenders affect calcium flux in bovine spermatozoa during a temperature challenge. J Androl. 1995 Jun; 16(3): 278-85.
9- Nair SJ, Brar AS, Ahuja CS, Sangha SP, Chaudhary KC. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. Anim Reprod Sci. 2006 Nov; 96(1-2): 21-9.
10- Laulier C, Lopez BS. The secret life of Bcl-2: apoptosis-independent inhibition of DNA repair by Bcl-2 family members. Mutat Res. 2012 Oct-Dec; 751(2): 247-57.
11- Maes ME, Schlamp CL, Nickells RW. BAX to basics: How the BCL2 gene family controls the death of retinal ganglion cells. Prog Retin Eye Res. 2017 Mar; 57: 1-25.
12- Renault TT, Dejean LM, Manon S. A brewing understanding of the regulation of Bax function by Bcl-xL and Bcl-2. Mech Ageing Dev. 2017 Jan; 161(Pt B): 201-10.
13- Franco R, Sánchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: ménage à trois. Mutat Res. 2009 Mar; 674(1-2): 3-22.
14- Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. Mol Reprod Dev. 2001 Aug; 59(4): 451-8.

15- Yue HX, Li P, Jiang M, Lin L, Xu KH. Influence of cryopreservation with glycerol and freezing-thawing producer on the motility of human sperm. Natl J Androl. 2005 Mar; 11(3): 204-6.
16- Bandaya MN, Lonea FA, Rasoola F, Rashida M, Shikarib A. Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. Cryobiology. 2017 Feb; 74: 25-30.
17- Baiee FH, Wahid H, Rosnina Y, Ariff O, Yimer N, Jeber Z, et al. Impact of Eurycoma longifolia extract on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in chilled and cryopreserved bull sperm. Cryobiology. 2018 Feb; 80: 43-50.
18- Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin. Life Sci. 2006 Mar; 78(18): 2081-7.
19- Kant V, Gopal A, Pathak NN, Kumar P, Tandan SK, Kumar D. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. Int Immunopharmacol. 2014 Jun; 20(2): 322-30.
20- Roghani Dehkordi F, Roghani M, Baluchnejadmojarad T. The effect of curcumin on serum level of aspartate and alanine aminotransferase and cardiac level of oxidative stress markers in diabetic rats. pajoohande. 2012 Apr; 17(1): 18-25. [Full Text in Persian]
21- Kowluru RA, Kanwar M. Effects of curcumin on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes. Nutr Metab. 2007 Apr; 4: 8.
22- Gil J, Lundeheim N, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. Theriogenology. 2003 Mar; 59(5-6): 1241-55.
23- Ibănescu I, Leiding C, Ciornei ŞG, Roșca P, Sfartz I, Drugociu D. Differences in CASA output according to the chamber type when analyzing frozen-thawed bull sperm. Anim Reprod Sci. 2016 Mar; 166: 72-9.
24- Ashrafi I, Kohram H, Tayefi-Nasrabadi H. Antioxidant effects of bovine serum albumin on kinetics, microscopic and oxidative characters of cryopreserved bull spermatozoa. Span J Agric Res. 2013 Jul; 11(3): 695-701. [Full Text in Persian]
25- Shahbazzadeh R, Daghigh-Kia H, Moghaddam G, Dehghan G, Hosseinkhani A, Ashrafi I. Effect of different levels of Satureja sahendica alcoholic extract on the quality of freeze-thawed Holstein bull spermatozoa. J Anim Sci Res (Agric Sci). 2015 Spring; 25(1): 13-24. [Full Text in Persian]
26- Farhadi R, Daghigh-Kia H, Hosseinkhani A, Ghasemi Panahi B, Dehghan G, Ashrafi I. Effect of Origanum vulgare ethanol extract on quality parameters and malondialdehyde concentration of cryopreserved Holstein bull sperm. J Anim Sci Res (Agric Sci). 2015 Spring; 25(1): 1-11. [Full Text in Persian]
27- Malek-Mohammadi R, Roghani M, Salami M. The effect of aqueous extracts of Melissa officinalis on the oxidative stress indices in the midbrain tissue. Feyz. 2015 Apr; 19(1): 8-14. [Full Text in Persian]
28- Partyka A, Lukaszewicz E, Niżański W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. Theriogenology. 2012 May; 77(8): 1497-504.
29- Dhami AJ, Kodagali SB. Freezability, enzyme leakage and fertility of buffalo spermatozoa in relation to the quality of semen ejaculates and extenders. Theriogenology. 1990 Nov; 34(5): 853-63.
30- Liu T, Gao J, Zhou N, Mo M, Wang X, Zhang X, et al. The effect of two cryopreservation methods on human sperm DNA damage. Cryobiology. 2016 Jun; 72(3): 210-5.
31- Chen YK, Liu QH, Li J, Xiao ZZ, Xu SH, Shi XH, et al. 2010. Effect of long-term cryopreservation on physiological characteristics, antioxidant activities and lipid peroxidation of red seabream (Pagrus major) sperm. Cryobiology. 2010 Oct; 61(2): 189-93.
32- Guthrie HD, Welch GR. Effects of reactive oxygen species on sperm function. Theriogenology. 2012 Nov; 78(8): 1700-8.
33- Osipova VP, Berberova NT, Gazzaeva RA, Kudryavtsev KV. Application of new phenolic antioxidants for cryopreservation of sturgeon sperm. Cryobiology. 2016 Feb; 72(2):112-118.

34- Zargari M, Ahmadi S, Shabani S, Mahrooz A. Protective Effect of Curcumin on the Superoxide Dismutase and Catalase Activity in Kidney of Acetaminophen-exposed Rats. J Mazand Univ Med Sci. 2013 Feb; 22(97): 74-83. [Full Text in Persian]
35- Momeni H, Eskandari N. Effect of curcumin on kidney histopathological changes, lipid peroxidation and total antioxidant capacity of serum in sodium arsenite-treated mice. Exp Toxicol Pathol. 2016 Nov; 69(2): 93-7.
36- Mazani M, Tutunchi S, Shahi D, Manafi H, Yazdi M, Khajoie Najad M, et al. Prevention effect of turmeric extract on methotrexate-induced intestinal toxicity by alleviating oxidative stress in rats. J Urmia Univ Med Sci. 2014 Apr; 25(2): 119-28. [Full Text in Persian]
37- Calabrese V, Bates TE, Mancuso C, Cornelius C, Ventimiglia B, Cambria MT, et al. Curcumin and the cellular stress response in free radical-related diseases. Mol Nutr Food Res. 2008 Sep; 52(9): 1062-73.
38- Pari L, Tewas D, Eckel J. Role of curcumin in health and disease. Arch Physiol Biochem. 2008 Jan; 114(2): 127-49.
39- Momeni HR, Chehrei S, Atabaki Z, Eskandari N. Study of the effect of curcumin on sperm parameters dysfunction induced by cadmium in mice. Pejouhandeh. 2015 Jun; 20(2): 54-62. [Full Text in Persian]
40- Roghani M, Baluchnejadmojarad T. Antinociceptive Effect of Curcumin, an Effective Constituent of Turmeric, in Diabetic Rats and Evaluation of the Involvement of Lipid Peroxidation. Modares J Med Sci Pathol. 2012 Spring; 15(1): 23-32. [Full Text in Persian]
41- Soetikno V, Watanabe K, Sari FR, Harima M, Thandavarayan RA, Veeraveedu PT, et al. Curcumin attenuates diabetic nephropathy by inhibiting PKC-α and PKC-β1 activity in streptozotocin-induced type I diabetic rats. Mol Nutr Food Res. 2011 Nov; 55(11): 1655-65.
42- Amouoghli Tabrizi B, Mohajeri D. Protective effect of edible turmeric (Curcuma longa Linn.) powder on early hepatic injury in diabetic rats. Feyz. 2010 Jan; 14(3): 190-99. [Full Text in Persian]
43- Hosseinzadeh S, Dabidi Roshan V. Effects of Curcumin supplementation on BDNF and Oxidative/antioxidative process in rat's hippocampus which exposed to lead. J Gorgan Univ Med Sci. 2010 Summer; 13(2): 1-8. [Full Text in Persian]
44- Khodaparast Z, yousofi AR, khoshvagti A. Investigation of Curcumin effects on liver tissue in adult male rats treated with cyclophosphamide. J Fasa Univ Med Sci. 2014 Sep; 4(3): 344-52. [Full Text in Persian]
45- Momeni HR, Darbandi N, Hoseini N, Jamshidi R. Protective effect of Curcumin and Curcuma longa extract on apoptosis of motor neurons in cultured spinal cord slices of adult mouse. Physiol Pharmacol. 2014 Spring; 18(1): 72-81. [Full Text in Persian]
46- Hamzavi Jahromi Z, Zolghadri Jahromi S, Hemayatkhah Jahromi V, Kargar Jahromi H, Erfanian S. Protective effect of Curcumin agains gamma-radiation on testis of Rats. HMJ. 2014 Jun; 18(2): 121-131. [Full Text in Persian]
47- Tvrdáa E, Tušimováb E, Kováčika A, Paálc D, Greifováa H, Abdramanovd A, et al. Curcumin has protective and antioxidant properties on bull spermatozoa subjected to induced oxidative stress. Anim Reprod Sci. 2016 Sep; 172: 10-20 .