



Investigating the Effect of Curcumin on Human Sperm Parameters After Freezing and Thawing

Nila Pourfouladchi ¹, Shabnam Movassaghi ², Shabnam Abdi ³, Mohammad Mahdi Nazarnejad ⁴, Zahra Nadia Sharifi ⁵

1. Department of Anatomical Sciences & Cognitive Neuroscience, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.
E-mail: nilapourfouladchi@yahoo.com
2. Department of Anatomical Sciences & Cognitive Neuroscience, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran; Herbal pharmacology research center, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran Iran.
E-mail: shmovasaghi@iautmu.ac.ir
3. Department of Anatomical Sciences & Cognitive Neuroscience, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.
E-mail: shabnam.abdi62@yahoo.com
4. Department of Anatomical Sciences & Cognitive Neuroscience, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.
E-mail: nazarnejad2001@gmail.com
5. **Corresponding Author**, Department of Anatomical Sciences & Cognitive Neuroscience, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran; Herbal pharmacology research center, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran Iran.
E-mail: zsharifi@iautmu.ac.ir

Article Info

Article type:

Research

Article history:

Received:

09 Oct 2025

Received in revised form:

20 Nov 2025

Accepted:

31 Dec 2025

Published online:

19 May 2026

Keywords:

Curcumin,
Sperm Parameters,
Antioxidant Effect.

ABSTRACT

Introduction: In this study, the effect of curcumin, a well-known strong antioxidant, on the parameters of human sperm after freezing and thawing was investigated.

Methods: In this interventional study, the semen of 10 men referred to Tehran infertility center who had normal sperm parameters according to international health standards were used. The samples were analyzed and monitored according to the standard of the World Health Organization. Each seminal fluid sample was further divided into three parts. The control group was frozen without any intervention. The toxicity test group was mixed with 10 μ M curcumin and the experimental group was mixed with 10 μ M curcumin and then frozen and thawed, then, the findings were analyzed in SPSS software version 25.

Results: Based on the obtained findings from this study, it was found that in the curcumin freezing group, the viability is significantly more favorable than the control group. ($P < 0.05$) The results also showed that the progressive sperm motility in the freezing group with Curcumin increased significantly and non-progressive motility of sperm significantly decreased. On the other hand, the normal morphology of sperms in the curcumin frozen group did not show a significant difference compared to the control group ($P\text{-Value} < 0.05$). the amount of ROS production in the control group after thawing is significantly increased compared to the toxicity and curcumin test group ($P < 0.001$), the amount of lipid peroxidation in the control group after thawing compared to the toxicity and curcumin test group as has increased significantly.

Conclusion: Based on the findings of this study, it can be said that curcumin at a dose of 10 μ M can effectively improve the parameters of human sperm after freezing and thawing.

Cite this article: Pourfouladchi N, Movassaghi Sh, Abdi Sh, Nazarnejad MM, Nadia Sharifi Z. Investigating the Effect of Curcumin on Human Sperm Parameters After Freezing and Thawing. Journal of Modern Approaches in Education Management and Health Sciences. 2026; 03 (01): 45-56. [Doi: 10.22034/edus.2025.568031.1081](https://doi.org/10.22034/edus.2025.568031.1081)

Journal of Modern Approaches in Education Management and Health Sciences is licensed under CC BY-NC 4.0.

| Web site: <https://www.eduhealthsci.ir> | Email: eduhealthsci@gmail.com.

© The Author(s).

| Publisher: Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Mazandaran Branch, Mazandaran, Iran.





Extended Abstract

Introduction

Male fertility preservation has become an essential component of assisted reproductive technologies (ART), particularly in cases of cancer treatment, infertility management, and fertility planning prior to medical or surgical interventions. Cryopreservation of human sperm is widely used to preserve male reproductive potential; however, despite significant technical advances, the freezing and thawing process remains associated with considerable cellular and molecular damage. One of the main limitations of sperm cryopreservation is the decline in post-thaw sperm quality, including reduced motility, viability, membrane integrity, and increased DNA fragmentation. Oxidative stress is recognized as a major contributor to cryodamage during sperm freezing and thawing. During this process, sperm cells are exposed to cold shock, osmotic stress, and ice crystal formation, all of which promote excessive production of reactive oxygen species (ROS). Although low levels of ROS are necessary for normal sperm function, excessive ROS generation leads to lipid peroxidation of sperm membranes, mitochondrial dysfunction, protein oxidation, and impairment of sperm motility and survival. Given that spermatozoa possess limited cytoplasmic antioxidant defenses, they are particularly vulnerable to oxidative damage. To address this challenge, the use of exogenous antioxidants has been proposed as a protective strategy to improve post-thaw sperm quality. Antioxidants can neutralize free radicals, enhance endogenous antioxidant systems, and reduce oxidative stress-induced cellular injury. Among various antioxidants, curcumin has attracted increasing attention due to its potent antioxidant, anti-inflammatory, and cytoprotective properties. Curcumin is a natural polyphenolic compound derived from the rhizome of *Curcuma longa* (turmeric) and has been extensively studied in biomedical research. Curcumin exerts its antioxidant activity through multiple mechanisms, including direct scavenging of ROS, inhibition of lipid peroxidation, upregulation of antioxidant enzymes, and modulation of intracellular signaling pathways involved in oxidative stress. Several experimental studies, particularly in animal models, have demonstrated the beneficial effects of curcumin on sperm parameters such as motility, viability, DNA integrity, and membrane stability. However, the effects of curcumin on human sperm during cryopreservation remain insufficiently explored, and available data are limited and sometimes inconsistent. Therefore, the present study aimed to investigate the effect of curcumin supplementation at a concentration of 10 μ M on human sperm parameters following freezing and thawing. Specifically, this study evaluated sperm viability, motility patterns, morphology, oxidative stress markers, lipid peroxidation, and antioxidant status. By focusing on human semen samples and standardized cryopreservation protocols, this research seeks to provide clinically relevant evidence regarding the potential role of curcumin as a protective antioxidant in sperm cryopreservation.

Methods

In this interventional study, the semen of 10 men referred to Tehran infertility center who had normal sperm parameters according to international health standards were used. The samples were analyzed and monitored according to the standard of the World Health Organization. Each seminal fluid sample was further divided into three parts. The control group was frozen without any intervention. The toxicity test group was mixed with 10 μ M curcumin and the experimental group was mixed with 10 μ M curcumin and then frozen and thawed, then, the findings were analyzed in SPSS software version 25.

Results

Based on the obtained findings from this study, it was found that in the curcumin freezing group, the viability is significantly more favorable than the control group. ($P < 0.05$) The results also showed that the progressive sperm motility in the freezing group with Curcumin increased significantly and non-progressive motility of sperm significantly decreased. On the other hand, the normal morphology of sperms in the curcumin frozen group did not show a significant difference compared to the control group ($P\text{-Value} < 0.05$). the amount of ROS production in the control group after thawing is significantly increased compared to the toxicity and curcumin test group ($P < 0.001$), the amount of lipid peroxidation in the control group after thawing compared to the toxicity and curcumin test group as has increased significantly.

Conclusion

The findings of the present study demonstrate that curcumin supplementation at a concentration of 10 μ M exerts a protective effect on human sperm parameters following freezing and thawing. Notably, sperm viability and progressive motility were significantly improved in the curcumin-treated freezing group compared to the control group, while the percentage of non-progressive and immotile sperm was reduced. These results suggest that curcumin can effectively mitigate cryopreservation-induced damage and enhance post-thaw sperm quality. One of the most important mechanisms underlying sperm cryodamage is oxidative stress, which is characterized by excessive production of reactive oxygen



species. In the current study, ROS levels were significantly elevated in the control group after thawing, whereas curcumin-treated samples exhibited markedly lower ROS production. This finding is consistent with previous reports indicating that curcumin acts as a potent free radical scavenger and suppresses oxidative stress during cellular injury. Reduced ROS levels contribute directly to the preservation of sperm motility and viability, as oxidative stress negatively affects mitochondrial activity and flagellar movement. In addition to ROS reduction, curcumin significantly influenced intracellular antioxidant balance. The control group showed increased levels of oxidized glutathione (GSSG) and decreased levels of reduced glutathione (GSH) after thawing, indicating oxidative imbalance. In contrast, curcumin treatment preserved GSH levels and limited GSSG accumulation, suggesting that curcumin supports endogenous antioxidant defense mechanisms. Since glutathione plays a central role in cellular redox homeostasis, maintaining an optimal GSH/GSSG ratio is critical for sperm survival under cryogenic stress. Lipid peroxidation, measured via malondialdehyde (MDA) levels, was also significantly higher in the control group after thawing, reflecting severe oxidative damage to sperm membranes. Curcumin treatment significantly reduced lipid peroxidation, indicating effective protection of membrane lipids. Preservation of membrane fluidity is essential for sperm motility, acrosome reaction, and fertilization capability; therefore, the observed reduction in lipid peroxidation further supports the beneficial role of curcumin in sperm cryopreservation. Interestingly, sperm morphology did not differ significantly between the curcumin-treated and control groups. This finding suggests that while curcumin effectively protects functional and biochemical sperm parameters, it may have limited influence on structural abnormalities induced during cryopreservation. In conclusion, the results of this study indicate that curcumin at a dose of 10 μ M can significantly improve post-thaw human sperm viability, motility, and antioxidant status while reducing oxidative stress and lipid peroxidation. These findings support the potential use of curcumin as a safe and effective antioxidant supplement in sperm cryopreservation media. Nevertheless, further studies with larger sample sizes and clinical fertility outcomes are recommended to confirm these results and establish standardized protocols for clinical application.

Ethical Considerations

The present study was approved by the Human Research Ethics Committee of Tehran Islamic Azad University of Medical Sciences with the ethical code IR.IAU.PS.REC.1400.366.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency.

Authors' contribution

Conceptualization, Zahra Nadia Sharifi; Methodology, Nila Pourfouladchi; Analysis, Shabnam Abdi; Investigation, Mohammad Mahdi Nazarnejad; Data Curation, Shabnam Abdi; Writing - Original Draft Preparation, Shabnam Movassaghi; Supervision, Nila Pourfouladchi; Project Administration, Zahra Nadia Sharifi.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding this article.

Acknowledgments

The authors express their appreciation and thanks to all the participants who participated in the exercises and cooperated with great patience in all stages of the study.



بررسی تأثیر کورکومین بر پارامترهای اسپرم انسانی پس از انجماد و ذوب

نیلا پورفولادچی^۱، شبنم موثقی^۲، شبنم عبدی^۳، محمد مهدی نظر نژاد^۴، زهرا نادیا شریفی^۵

۱. گروه علوم تشریح و علوم اعصاب شناختی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران ایران. رایانامه: nilapourfouladchi@yahoo.com

۲. گروه علوم تشریح و علوم اعصاب شناختی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران ایران؛ مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه: shmovasaghi@iautmu.ac.ir

۳. گروه علوم تشریح و علوم اعصاب شناختی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران ایران. رایانامه: shabnam.abdi62@yahoo.com

۴. گروه علوم تشریح و علوم اعصاب شناختی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران ایران. رایانامه: nazarnejad2001@gmail.com

۵. نویسنده مسئول، گروه علوم تشریح و علوم اعصاب شناختی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران ایران؛ مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه: zsharifi@iautmu.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	مقدمه: در این مطالعه، تأثیر کورکومین، به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی و شناخته شده، بر پارامترهای اسپرم انسانی پس از فرآیند انجماد و ذوب مورد بررسی قرار گرفت.
تاریخ دریافت:	روش پژوهش: در این مطالعه مداخله ای، از مابین ۱۰ مرد مراجعه کننده به مرکز غلباروری تهران که بر اساس استانداردهای بین المللی سلامت دارای پارامترهای طبیعی اسپرم بودند، استفاده شد. نمونه ها مطابق با استانداردهای سازمان جهانی بهداشت آنالیز و پایش شدند. هر نمونه مابین ۳ به سه بخش تقسیم گردید. گروه کنترل بدون هیچ گونه مداخله ای منجمد شد. گروه آزمون سمیت با ۱۰ میکرومولار کورکومین مخلوط شد و گروه تجربی با ۱۰ میکرومولار کورکومین مخلوط شده و سپس تحت فرآیند انجماد و ذوب قرار گرفت. در نهایت، داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۵ تحلیل شدند.
تاریخ بازنگری:	یافته ها: بر اساس یافته های حاصل از این مطالعه، مشخص شد که در گروه انجماد همراه با کورکومین، زنده ماندی اسپرم ها به طور معنی داری مطلوب تر از گروه کنترل است. همچنین نتایج نشان داد که تحرک پیش رونده اسپرم در گروه انجماد با کورکومین به طور معنی داری افزایش یافته و تحرک غیر پیش رونده اسپرم به طور معنی داری کاهش یافته است.
تاریخ پذیرش:	از سوی دیگر، مورفولوژی طبیعی اسپرم ها در گروه منجمد شده با کورکومین در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی داری نشان نداد ($P > 0.05$). میزان تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) در گروه کنترل پس از ذوب به طور معنی داری نسبت به گروه آزمون سمیت و گروه کورکومین افزایش یافت. همچنین میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گروه کنترل پس از ذوب در مقایسه با گروه آزمون سمیت و گروه کورکومین به طور معنی داری افزایش داشت.
تاریخ انتشار:	نتیجه گیری: بر اساس یافته های این مطالعه می توان بیان کرد که کورکومین با دوز ۱۰ میکرومولار می تواند به طور مؤثری پارامترهای اسپرم انسانی را پس از فرآیند انجماد و ذوب بهبود بخشد.
کلیدواژه ها:	کورکومین، پارامترهای اسپرم، اثر آنتی اکسیدانی.

استناد: استناد: پورفولادچی، نیلا؛ موثقی، شبنم؛ عبدی، شبنم؛ نظر نژاد، محمد مهدی؛ نادیا شریفی، زهرا. بررسی تأثیر کورکومین بر پارامترهای اسپرم انسانی پس از انجماد و ذوب. نشریه رویکردهای نوین در مدیریت آموزش و علوم سلامت. ۱۴۰۵؛ ۳ (۰۱): ۱۲-۲۳. Doi: 10.22034/edus.2025.568031.1081



دسترسی به این نشریه علمی، رایگان است و حق مالکیت فکری خود را بر اساس لایسنس کپیو کامنز (CC BY-NC 4.0) به نویسندگان واگذار کرده است.

| آدرس نشریه: <https://www.eduhealthsci.ir/> | ایمیل: eduhealthsci@gmail.com

ناشر: جهاد دانشگاهی واحد استان مازندران.

مقدمه

انجماد روشی برای حفظ باروری در مردان و زنان است (۱). انجماد اسپرم به‌طور گسترده در آزمایشگاه‌های درمان ناباروری برای افزایش شانس باروری در آینده مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲). محیط‌های رایجی که بیشتر در انجماد اسپرم استفاده می‌شوند شامل حاوی آلبومین سرم انسانی و گلیسرول (HSPM: Containing Human Serum Albumin And Glycerol)، حاوی زرده تخم‌مرغ و گلیسرول (TYBG: Containing Egg Yolk And Glycerol) و حاوی زرده تخم‌مرغ و گلیسرول (GEYC: Containing Egg Yolk And Glycerol) هستند (۳). به‌طور کلی، دو روش برای انجماد اسپرم مورد استفاده قرار می‌گیرد: روش آزمایشگاهی (انجماد به روش برنامه‌ریزی‌شده آهسته) و روش بدون دستگاه (انجماد در فاز بخار نیتروژن مایع). انجماد اسپرم به‌طور گسترده در فناوری‌های کمک‌باروری (ART: assisted reproductive technology) به کار گرفته شده و منجر به تولد میلیون‌ها نوزاد زنده شده است (۴). دو رویکرد اصلی در این زمینه شامل انجماد متداول (آهسته) و شیشه‌ای‌سازی (ویتریفیکاسیون) است. روش اول با موفقیت در کلینیک‌های ART مورد استفاده قرار گرفته است، در حالی که روش دوم که فرآیندی برای تبدیل مایع به حالت آمورف یا شیشه‌ای است، می‌تواند به‌عنوان یک روش جایگزین سریع‌تر برای انجماد اسپرم مطرح شود و مزایای قابل‌توجهی از نظر سادگی تجهیزات و قابلیت کاربرد در مراکز انجماد اسپرم داشته باشد (۵). یکی از راه‌های بررسی برتری یا عدم برتری انجماد شیشه‌ای نسبت به انجماد متداول، مقایسه مستقیم این دو روش با استفاده از نمونه‌های یکسان مایع منی در یک مطالعه است (۶).

با وجود پیشرفت‌های فراوانی که در زمینه انجماد اسپرم حاصل شده است، تحرک و بقای اسپرم پس از فرآیند انجماد کاهش می‌یابد؛ بنابراین، نیاز به راهکاری مناسب برای حفظ کیفیت اسپرم وجود دارد که یکی از این روش‌ها استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها است (۷). در طی فرآیند انجماد اسپرم، این سلول‌ها تحت تأثیر شوک‌های سرمایی و فشار اسمزی قرار می‌گیرند، در نتیجه احتمال افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و واکنش‌های اکسیداتیو وجود دارد که موجب کاهش تحرک و طول عمر اسپرم می‌شود (۸). از این‌رو، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها برای کاهش تولید رادیکال‌های آزاد توصیه می‌شود. یکی از آنتی‌اکسیدان‌های پیشنهادی در این حوزه کورکومین است (۹) که طیف وسیعی از فعالیت‌های فارماکولوژیک از جمله اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدسرطانی و ضد میکروبی را نشان می‌دهد (۱۰). کورکومین یک ترکیب پلی‌فنولی زردرنگ است که از ریزوم گیاه زردچوبه به دست می‌آید (۱۱) و دارای خواص درمانی گسترده‌ای نظیر آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد میکروبی و ضدسرطانی است (۱۲). خاصیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیب به حضور گروه‌های عاملی متعددی مانند گروه بتا-دی-کتو، پیوند دوگانه کربن-کربن و حلقه فنیل حاوی چندین گروه هیدروکسی و متوکسی وابسته است (۱۳). در خصوص این ترکیب، مطالعات متعددی به‌ویژه بر روی نمونه‌های حیوانی انجام شده است، اما بررسی نمونه‌های انسانی می‌تواند به دستیابی به یافته‌های مفیدتر منجر شود (۱۴).

روش‌شناسی

مطالعه حاضر با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1400.366 در کمیته اخلاق پژوهش انسانی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران به تصویب رسید. در این مطالعه از مایع منی ۱۰ مرد مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری تهران که بر اساس استانداردهای بین‌المللی سلامت دارای پارامترهای طبیعی اسپرم بودند، استفاده شد. تمامی اهداکنندگان شرکت‌کننده در این پژوهش دارای اندام‌های جنسی سالم بوده و میانگین سنی آن‌ها ۳۰ سال بود. نمونه‌های مایع منی این افراد پس از ۲ تا ۷ روز پرهیز از نزدیکی جنسی، از طریق خودارضایی و در ظروف استریل جمع‌آوری شد. به‌منظور مایع‌شدن، نمونه‌ها به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه

در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس مطابق با استانداردهای سازمان جهانی بهداشت مورد آنالیز قرار گرفتند. هر نمونه مایع منی به سه گروه تقسیم شد. گروه کنترل بدون هیچ‌گونه مداخله‌ای منجمد گردید. گروه آزمون سمیت با ۱۰ میکرومولار کورکومین مخلوط شد و گروه تجربی با ۱۰ میکرومولار کورکومین مخلوط شده و سپس تحت فرآیند انجماد و ذوب قرار گرفت.

انجماد اسپرم

انجماد مایع منی به روش انجماد شیشه‌ای انجام شد. بدین صورت که یک میلی‌لیتر از مایع منی با حجم مساوی از محلول انجماد (Sweden Vitrolife; Sperm Freeze) به آرامی مخلوط شده و به کرایوویال‌ها منتقل گردید و به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. سپس کرایوویال‌ها به مدت یک هفته در تانک‌های نیتروژن با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ذوب مجدد اسپرم

پس از یک هفته انجماد، نمونه‌ها از نیتروژن مایع خارج شده و پس از ۱۰ ثانیه، به مدت ۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس برای حذف ماده ضدیخ، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با محیط کشت هامز (Hams) سانتریفیوژ شدند. پس از آن، پارامترهای اسپرم در انکوباتور مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز اسپرم

در این مرحله، تعداد، میزان تحرک، مورفولوژی و بقای اسپرم‌ها قبل و بعد از انجماد و ذوب در گروه‌های مختلف بررسی شد.

شمارش اسپرم

برای شمارش اسپرم‌ها از لام هموسیتومتر نتوبائر استفاده شد. نمونه‌ها از انکوباتور خارج شده و سپس با کمک سمپلر، ۱۰ میکرولیتر از محلول PBS به همراه اسپرم در یک میکروپیوژ ریخته و با ۹۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول تهیه‌شده زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ قرار داده شد و اسپرم‌ها شمارش شدند. در نهایت، تعداد اسپرم در هر میلی‌لیتر محاسبه گردید.

نرخ تحرک اسپرم

به‌منظور برآورد نرخ تحرک اسپرم، ۱۰ میکرولیتر از نمونه روی لام قرار داده شد و درصد تحرک اسپرم‌ها ارزیابی گردید. برای تعیین درصد تحرک، ۱۰ میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی $\times 1000$ بررسی شد و میانگین تعداد اسپرم‌های متحرک در این ۱۰ میدان به‌عنوان تحرک واقعی در نظر گرفته شد. ۵۰ میکرولیتر از اسپرم روی لام ریخته و ۲۰ میکرولیتر اینوزین به آن افزوده شد. پس از ۵ ثانیه، ۵۰ میکرولیتر رنگ نیگروزین افزوده‌شده به‌طور کامل مخلوط گردید و سپس اسمیر تهیه شد. اسپرم‌های بی‌رنگ به‌عنوان سالم و اسپرم‌های رنگ‌گرفته به‌عنوان مرده در نظر گرفته شدند.

توان تحرک اسپرم

تحرک اسپرم‌ها بر اساس معیارهای سازمان جهانی بهداشت ارزیابی شد؛ به این صورت که ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم به محفظه ماکلر که از پیش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم شده بود منتقل شد و حرکات اسپرم‌ها برای هر نمونه زیر میکروسکوپ نوری بررسی گردید. در مجموع ۲۰۰ اسپرم مورد بررسی قرار گرفت و درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده، حرکت درجا و بدون حرکت برآورد شد.

تعیین درصد زنده‌مانی اسپرم

برای ارزیابی درصد اسپرم‌های زنده و همچنین تفکیک اسپرم‌های زنده از مرده، از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد.

تعیین درصد مورفولوژی طبیعی اسپرم

در این پژوهش، به منظور بررسی شکل اسپرم‌ها، از رنگ‌آمیزی دیف-کوئیک (Diff-Quick) استفاده شد. اسپرم‌های طبیعی فاقد هرگونه مشکل در ناحیه سر، گردن و دم بودند، در حالی که اسپرم‌های غیرطبیعی شامل اسپرم‌های با دم پیچ‌خورده، ماکروسفالیک، میکروسفالیک، دو سر، یا بدون سر شناسایی شدند. برای تعیین درصد اسپرم‌های طبیعی، ۵ میدان دید میکروسکوپی در نظر گرفته شد و تعداد اسپرم‌های طبیعی و غیرطبیعی شمارش گردید و سپس درصد اسپرم‌های طبیعی از نظر مورفولوژی محاسبه شد.

بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدی در مایع منی

به منظور بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدی، از کیت Lipid Peroxidation Assay Kit Colorimetric/Fluorometric ab118970 استفاده شد. این کیت قادر به شناسایی مالون‌دی‌آلدئید (MDA: Malondialdehyde) است که محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی محسوب می‌شود.

مکانیسم عملکرد کیت به این صورت است که اسید تیوباربیتوریک (TBA: Thiobarbituric) با MDA ترکیب شده و کمپلکس حاصل دارای خاصیت جذب نور است؛ میزان این جذب نوری در طول موج 532 nm $OD =$ نانومتر قابل اندازه‌گیری می‌باشد.

بررسی میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS: Reactive Oxygen Species) در مایع منی

به منظور بررسی میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، از کیت DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit ab113851 استفاده شد. برای انجام آزمون، ابتدا (5×10^6) سلول جداسازی شد، سپس ۲۰ میکرولیتر DCFDA به سلول‌ها و نمونه کنترل مثبت افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از این مرحله، بدون شست‌وشوی سلول‌ها، نمونه‌ها بلافاصله در کانال FL1 دستگاه فلوسایتومتری قرائت شدند.

بررسی میزان گلوتاتیون احیاشده (GSH: Reduced Glutathione) و گلوتاتیون اکسیدشده (Oxidized)

GSSG: Glutathione در مایع منی

برای بررسی میزان گلوتاتیون احیاشده (GSH) و گلوتاتیون اکسیدشده (GSSG)، از کیت GSH/GSSG Ratio Detection Assay Kit ab138881 فلورومتريک-سبز استفاده شد. این کیت حاوی رنگی غیر فلورسنت و حساس برای شناسایی GSH است. پس از اتصال رنگ به GSH، این رنگ با طول موج تحریک/انتشار $Ex/Em = 490/520 \text{ nm}$ نانومتر خاصیت فلورسانس از خود نشان می‌دهد. برای شناسایی مقدار GSSG، لازم است GSSG طی یک واکنش آنزیمی به GSH تبدیل شود. یافته‌های به دست آمده از آزمایش‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شدند. داده‌های حاصل با استفاده از آزمون ANOVA و آزمون تکمیلی پس‌آزمون LSD تحلیل شدند. در تمامی موارد، سطح معنی‌داری $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ارزیابی پارامترهای اسپرم

حجم انزال در نمونه‌ها به طور میانگین ۴ میلی‌لیتر با انحراف معیار 0.5 میلی‌لیتر گزارش شد. میانگین تعداد اسپرم نیز $4 \times 10^6 \pm 85 \times 10^6$ میلیون برآورد گردید. مورفولوژی طبیعی در افراد مورد مطالعه ۱۵٪ با انحراف معیار ۱/۰٪ بود. زنده‌مانی اسپرم‌ها ۷۲٪ با انحراف معیار ۹/۱٪ گزارش شد. تحرک اسپرم به صورت پیش‌رونده و غیرپیش‌رونده به ترتیب $26 \pm 1/4$ ٪ و $22 \pm 1/3$ ٪ برآورد شد. درصد اسپرم‌های بدون تحرک نیز $38 \pm 1/2$ ٪ گزارش گردید (جدول ۱).

جدول ۱- پارامترهای نمونه‌های مایع منی مورد ارزیابی (تعداد = ۱۰ نفر)

پارامترهای اسپرم	انحراف معیار $\pm$ میانگین
حجم	4 ± 0.5
تعداد اسپرم	$85 \times 10^6 \pm 4 \times 10^6$
مورفولوژی طبیعی	15 ± 0.1
زنده‌مانی	72 ± 9.1
تحرک پیش‌رونده اسپرم	26 ± 1.4
تحرک غیرپیش‌رونده اسپرم	22 ± 1.3
اسپرم‌های بدون تحرک	38 ± 1.2

بررسی زنده‌مانی اسپرم در گروه‌های مورد مطالعه

زنده‌مانی اسپرم در گروه قبل از انجماد، گروه انجماد و ذوب، گروه آزمون سمیت با کورکومین و گروه انجماد همراه با کورکومین به ترتیب 80 ± 3 ، 58 ± 4.1 ، 75 ± 5.8 ، 68 ± 5.8 گزارش شد. زنده‌مانی اسپرم در گروه انجماد همراه با کورکومین به طور معنی‌داری مطلوب‌تر از گروه کنترل بود ($P < 0.05$) (جدول ۲).

بررسی تحرک اسپرم به صورت پیش‌رونده و غیرپیش‌رونده در گروه‌های مورد بررسی

تحرک پیش‌رونده اسپرم در گروه قبل از انجماد، گروه کنترل، گروه آزمون سمیت با کورکومین و گروه انجماد با کورکومین به ترتیب 35.8 ± 1.6 ، 30.8 ± 2.89 ، 25.8 ± 4.6 و 22.7 ± 4.4 گزارش شد. این مقادیر برای تحرک غیرپیش‌رونده اسپرم نیز به همان ترتیب به صورت 28.2 ± 2.9 ، 35.5 ± 5.5 ، 27.7 ± 4.4 و 22.2 ± 4.9 برآورد گردید. نتایج نشان داد که تحرک پیش‌رونده اسپرم در گروه انجماد همراه با کورکومین به طور معنی‌داری افزایش یافته و تحرک غیرپیش‌رونده اسپرم به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($P < 0.05$).

بررسی اسپرم‌های بدون تحرک در گروه‌های مورد مطالعه

درصد اسپرم‌های بدون تحرک در گروه قبل از انجماد 36.2 ± 4.1 ، در گروه انجماد و ذوب 49.6 ± 6.9 ، در گروه آزمون سمیت با کورکومین 35.3 ± 7.1 و در گروه انجماد همراه با کورکومین 40.2 ± 3 گزارش شد. درصد اسپرم‌های بدون تحرک در گروه انجماد همراه با کورکومین به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود ($P < 0.05$).

بررسی مورفولوژی اسپرم در گروه‌های مورد مطالعه

درصد مورفولوژی طبیعی اسپرم‌ها در گروه قبل از انجماد 15.6 ، در گروه انجماد و ذوب 13.2 ± 4 ، در گروه آزمون سمیت با کورکومین 14.1 ± 0.6 و در گروه انجماد همراه با کورکومین 13.8 ± 3.5 گزارش شد. مقایسه مورفولوژی طبیعی اسپرم‌ها در گروه انجماد همراه با کورکومین با گروه کنترل نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها وجود ندارد ($P > 0.05$).

میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)

همان‌گونه که در **جدول شماره ۲** مشاهده می‌شود، میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، گلووتاتیون اکسیدشده (GSSG) و گلووتاتیون احیاشده (GSH) در مایع منی قبل و بعد از انجماد با استفاده از فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد. میزان ROS در گروه‌های قبل از انجماد، کنترل، آزمون سمیت با کورکومین و انجماد همراه با کورکومین به ترتیب 1800 ± 100 ، 1600 ± 247 و 1760 ± 490 میلی‌واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر برآورد گردید. داده‌های به دست آمده نشان داد که میزان تولید ROS در گروه کنترل پس از ذوب در مقایسه با گروه آزمون سمیت و گروه کورکومین به طور معنی‌داری افزایش یافته است ($P < 0.001$).

میزان تولید گلوتاتیون اکسیدشده (GSSG) و گلوتاتیون احیاشده (GSH)

با توجه به نقش مهم متابولیسم تیول در دفاع سلولی در برابر استرس اکسیداتیو، در این مطالعه میزان گلوتاتیون احیاشده (GSH) و گلوتاتیون اکسیدشده (GSSG) اندازه‌گیری شد. میزان گلوتاتیون اکسیدشده در گروه‌های قبل از انجماد، انجماد و ذوب، آزمون سمیت با کورکومین و انجماد همراه با کورکومین به ترتیب 0.04 ± 0.01 ، 0.04 ± 0.027 ، 0.04 ± 0.009 و 0.07 ± 0.009 و 0.08 ± 0.003 میکروگرم بر میلی‌گرم گزارش شد. مقدار گلوتاتیون احیاشده (GSH) نیز به ترتیب 2.9 ± 0.2 ، 5.0 ± 0.1 و 4.4 ± 0.187 میکروگرم بر میلی‌گرم برآورد گردید. داده‌ها نشان داد که میزان گلوتاتیون اکسیدشده در گروه کنترل پس از ذوب در مقایسه با گروه آزمون سمیت با کورکومین به‌طور معنی‌داری افزایش یافته و به‌طور هم‌زمان میزان گلوتاتیون احیاشده کاهش یافته است ($P < 0.001$).

میزان پراکسیداسیون لیپیدی

میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گروه‌های قبل از انجماد، کنترل، آزمون سمیت با کورکومین و انجماد همراه با کورکومین به ترتیب 0.22 ± 0.07 ، 0.45 ± 0.06 ، 0.20 ± 0.01 و 0.31 ± 0.03 میکروگرم بر میلی‌گرم گزارش شد. داده‌ها نشان داد که میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گروه کنترل پس از ذوب در مقایسه با گروه آزمون سمیت و گروه کورکومین به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است ($P < 0.001$).

جدول ۲- پارامترهای اسپرم قبل و بعد از انجماد و ذوب در گروه‌های مختلف

پارامترهای اسپرم	قبل از انجماد	انجماد و ذوب	آزمون سمیت با کورکومین	انجماد همراه با کورکومین
زنده‌مانی	80 ± 3	$58 \pm 4/1$	$75 \pm 5/8$	$68 \pm 5/8$
تحرك پيش‌رونده اسپرم	$35/8 \pm 1/6$	$15/4 \pm 4/7$	$30/8 \pm 2/89$	$25/8 \pm 4/6$
تحرك غيرپيش‌رونده اسپرم	$28 \pm 2/9$	$35 \pm 5/5$	$27/7 \pm 4/4$	$22 \pm 4/9$
اسپرم‌های بدون تحرك	$36/2 \pm 7/1$	$39/6 \pm 6/9$	$35/3 \pm 7/1$	$40/2 \pm 3$
مورفولوژی	$15/6$	$13/2 \pm 4$	$14/1 \pm 0/6$	$13/8 \pm 3/5$
گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)	1800 ± 100	2600 ± 120	1600 ± 247	1760 ± 490
گلوتاتیون اکسیدشده (GSSG) ($\mu\text{g}/\text{mg}$ پروتئین)	0.04 ± 0.001	0.04 ± 0.037	0.07 ± 0.009	0.08 ± 0.003
گلوتاتیون احیاشده (GSH) ($\mu\text{g}/\text{mg}$ پروتئین)	$2/9 \pm 0/2$	$5/5 \pm 0/1$	$4/4 \pm 0/187$	$4/9 \pm 0/15$
پراکسیداسیون لیپیدی ($\mu\text{g}/\text{mg}$ پروتئین)	0.22 ± 0.07	0.45 ± 0.06	0.20 ± 0.01	0.31 ± 0.03

بحث

در سال‌های اخیر، کورکومین به‌عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان و ضدالتهاب، مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است. در همین راستا، در این پژوهش ویژگی‌ها و توان آنتاگونیستی کورکومین بر پارامترهای اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌ها نشان داد که پارامترهای اسپرم از جمله زنده‌مانی و تحرك اسپرم بهبود یافته و درصد اسپرم‌های بدون تحرك کاهش یافته است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که کورکومین می‌تواند به‌عنوان یک عامل محافظتی مورد استفاده قرار گیرد و در طول دوره آزمایش، اثرات تخریبی فرآیند انجماد بر پارامترهای اسپرم را کاهش دهد. در مطالعه خالاجی (Khalaji) و همکاران (۲۰۱۸) که بر روی ۲۴ نمونه اسپرم موش صحرایی انجام شد، کورکومین توانست پارامترهای اسپرم را بهبود بخشد (۶). در مطالعه گلوببیک (Glombik) و همکاران (۲۰۱۴)، با بررسی نمونه‌های اسپرم موش مشخص شد که دوز ۱ تا ۵۰ میکرومولار کورکومین اثر محافظتی داشته و موجب بهبود تحرك و کاهش آسیب لوله‌های منی‌ساز می‌شود، در حالی که دوز ۱۰۰ میکرومولار کورکومین سبب کاهش زنده‌مانی و تحرك اسپرم می‌گردد (۷). در مطالعه حاضر، اثر محافظتی کورکومین در دوز ۱۰ میکرومولار مورد بررسی و تأیید قرار گرفت. در مطالعه حیوانی سلیمان‌زاده و همکاران (۲۰۱۳) نیز اثر محافظتی کورکومین

بر زنده‌مانی، یکپارچگی DNA و تحرک اسپرم مشاهده شد و پس از ذوب، میزان آسیب اکسیداتیو در گروه کورکومین کمتر بود (۸). در پژوهش حاضر، میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در مایع منی قبل و بعد از انجماد با استفاده از فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد. داده‌های حاصل نشان داد که میزان تولید ROS در گروه کنترل پس از ذوب در مقایسه با گروه آزمون سمیت و گروه کورکومین به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. همچنین نتایج نشان داد که میزان گلووتاتیون اکسیدشده در گروه کنترل پس از ذوب در مقایسه با گروه آزمون سمیت با کورکومین به‌طور معنی‌داری افزایش یافته و به‌طور هم‌زمان میزان گلووتاتیون احیاشده کاهش یافته است.

نتایج همچنین نشان داد که میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گروه کنترل پس از ذوب در مقایسه با گروه آزمون سمیت و گروه کورکومین به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. بر اساس نتایج حاصل از آزمون MDA در این پژوهش، به نظر می‌رسد کورکومین با جلوگیری از کاهش گلووتاتیون سلولی و افزایش فعالیت آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی درون‌زاد، از پراکسیداسیون لیپیدی و تولید ROS جلوگیری می‌کند (۱۶). اثرات محافظتی سلولی کورکومین وابسته به خواص آنتی‌اکسیدانی آن و مهار رادیکال‌های آزاد است که از بروز هرگونه اختلال در ترکیب لیپیدهای مسئول حفظ سیالیت طبیعی غشا جلوگیری کرده و در نتیجه، توان باروری حفظ می‌شود. از این‌رو، نتایج MDA اثر آنتی‌اکسیدانی کورکومین را تأیید می‌کند. در مطالعه گلندر (Glander) و همکاران (۲۰۰۰)، کورکومین توانست به‌طور معنی‌داری تحرک اسپرم را در بیماران مبتلا به پیوسپرمی در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از پراکسید هیدروژن بهبود بخشد (۹). ماسودا (Masuda) و همکاران (۲۰۰۱) به نتایج مشابهی دست یافتند که با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی داشت (۱۰). در مطالعه تجربی آپارناک (Aparnak) و همکاران (۲۰۱۹) مشخص شد که بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی و کاهش گونه‌های فعال اکسیژن مربوط به اسپرم‌هایی است که در معرض دوز ۲/۵ میکرومولار کورکومین قرار گرفته‌اند (۱۱). در مطالعه حاضر، کورکومین با دوز ۱۰ میکرومولار توانست به‌طور مؤثری پارامترهای اسپرم را بهبود بخشد. بررسی‌های کوتا (Kotha) و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که به‌جز وزن بدن و حجم انزال، سایر ویژگی‌ها از جمله غلظت مایع منی، تولید کل اسپرم، تحرک پیش‌رونده و یکپارچگی غشای پلازما با افزایش سطوح مکمل کورکومین در جوجه‌های گوشتی به‌صورت خطی بهبود می‌یابد (۱۲). در مطالعه حاضر نیز کورکومین توانست پارامترهای اسپرم را به‌طور مؤثری بهبود دهد. کانگ (Kang) و همکاران نیز (۲۰۰۵) نشان دادند که کورکومین با کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن، از اسپرم محافظت کرده و بیان ژن NOX5 را افزایش می‌دهد (۱۴). در مطالعه تجربی مینکولد (Menkveld) و همکاران (۲۰۰۱)، کورکومین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانست آسیب‌های ناشی از فرمالدهید به بیضه‌ها و پارامترهای اسپرم نمونه‌های موشی مورد بررسی را کاهش دهد (۱۵).

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این مطالعه می‌توان بیان کرد که کورکومین با دوز ۱۰ میکرومولار می‌تواند به‌طور مؤثری پارامترهای اسپرم انسانی را پس از فرآیند انجماد و ذوب بهبود بخشد.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1400.366 در کمیته اخلاق پژوهش انسانی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران به تصویب رسید.

حامی مالی

این تحقیق هیچ بودجه‌ای دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم سازی زهرا نادیا شریفی؛ روش شناسی، نیلا پور فولادچی؛ تحلیل، شبنم عبدی؛ تحقیق، محمدمهدی نظر نژاد؛ مدیریت داده‌ها، شبنم عبدی؛ نگارش-تهیه پیش‌نویس، شبنم موثقی؛ نظارت، نیلا پور فولادچی؛ مدیریت پروژه، زهرا نادیا شریفی.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسنده، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از تمام شرکت کنندگانی که در این تحقیق شرکت کرده و همچنین تمامی افرادی که در تمام مراحل مطالعه همکاری داشتند، تقدیر و تشکر می‌کنند.

References

1. Larsen U. Research on infertility: which definition should we use? *Fertil Steril*. 2005;83(4):846-52. doi: [10.1016/j.fertnstert.2004.11.033](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.033)
2. Masoumi SZ, Parsa P, Darvish N, Mokhtari S, Yavangi M, Roshanaei G. An epidemiologic survey on the causes of infertility in patients referred to infertility center in Fatemeh Hospital in Hamadan. *Iran J Reprod Med*. 2015; 13(8):513-6. doi: [PMC4637117](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.033)
3. Wilkes S, Chinn DJ, Murdoch A, Rubin G. Epidemiology and management of infertility: a population-based study in UK primary care. *Fam Pract*. 2009;26(4):269-74. doi: [10.1093/fampra/cmp029](https://doi.org/10.1093/fampra/cmp029)
4. Rooney KL, Domar AD. The relationship between stress and infertility. *Dialogues Clin Neurosci*. 2018;20(1):41-47. doi: [10.31887/DCNS.2018.20.1/klrooney](https://doi.org/10.31887/DCNS.2018.20.1/klrooney)
5. Mahdireji HA, Peeri M, Azarbayjani MA, Fattahi Masrour F. Fluoxetine combined with swimming exercise synergistically reduces lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior by normalizing the HPA axis and brain inflammation in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2023;232:173640. doi: [10.1016/j.pbb.2023.173640](https://doi.org/10.1016/j.pbb.2023.173640)
6. Khalaji N, Namyari M, Rasmi Y, Pourjabali M, 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. doi: [PMC6129376](https://doi.org/10.1016/j.pbb.2023.173640)
7. Głombik K, Basta-Kaim A, Sikora-Polaczek M, Kubera M, Starowicz G, Stryna J. Curcumin influences semen quality parameters and reverses the di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)-induced testicular damage in mice. *Pharmacol Rep*. 2014; 66(5):782-7. doi: [10.1016/j.pharep.2014.04.010](https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.04.010)
8. Soleimanzadeh A, Saberivand A. Effect of curcumin on rat sperm morphology after the freeze-thawing process. *Vet Res Forum*. 2013; 4(3):185-9. doi: [PMC4312379](https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.04.010)
9. Glander HJ, Schaller J. Hidden effects of cryopreservation on quality of human spermatozoa. *Cell Tissue Bank*. 2000;1(2):133-142. doi: [10.1023/A:1010122800157](https://doi.org/10.1023/A:1010122800157)
10. Masuda T, Maekawa T, Hidaka K, et al. Chemical studies on antioxidant mechanisms of curcumin: analysis of oxidative coupling products from curcumin and linoleate. *J Agric Food Chem*. 2001;49:2539-2547. doi: [10.1021/jf001442x](https://doi.org/10.1021/jf001442x)
11. Aparnak P, 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. doi: [10.30466/vrf.2019.76137.2015](https://doi.org/10.30466/vrf.2019.76137.2015)
12. Kotha RR, Luthria DL. Curcumin: biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. *Molecules*. 2019;24(16):E2930. doi: [10.3390/molecules24162930](https://doi.org/10.3390/molecules24162930)
13. Amouzad Mahdireji H, Peeri M, Azarbayjani MA, Masrour FF. Diazepam and exercise training combination synergistically reduces lipopolysaccharide-induced anxiety-like behavior and oxidative stress in the prefrontal cortex of mice. *Neurotoxicology*. 2023;97:101-108. doi: [10.1016/j.neuro.2023.06.004](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2023.06.004)
14. Kang J, Chen J, Shi Y, Jia J, Zhang Y. Curcumin-induced histone hypoacetylation: the role of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol*. 2005;69(8):1205-1213. doi: [10.1016/j.bcp.2005.01.014](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.01.014)
15. Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod*. 2001;16(6):1165-71. doi: [10.1093/humrep/16.6.1165](https://doi.org/10.1093/humrep/16.6.1165)

16. Barratt CLR, Björndahl L, De Jonge CJ, Lamb DJ, Osorio Martini F, McLachlan R, et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. Hum Reprod Update. 2017;23(6):660-680. doi: [10.1093/humupd/dmx021](https://doi.org/10.1093/humupd/dmx021)

