وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری

عنوان:

بررسی امکان استفاده از خواص آنتی اکسیدانت پلی فنلی طبیعی کورکومین (Curcumin) همراه با مواد ضدیخ برای القاء افزایش تحرک و زنده مانی اسپرم گونه فیل ماهی (*Huso huso*) پرورشی پس از انجمادزدایی

مجری:
شیرین جمشیدی

شماره ثبت
٦٥٦٢٠

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری

عنوان طرح/پروژه: بررسی امکان استفاده از خواص آنتی اکسیدانت پلی فنلی طبیعی کورکومین (Curcumin) همراه با مواد ضدیخ برای القاء افزایش تحرک و زنده مانی اسپرم گونه فیل ماهی (*Huso huso*) پرورشی پس از انجمادزدایی
کد مصوب: ۹۸۰٤٦۱-۹۸۰۰۱-۰۱۲-۱۲-۳۲-۱۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: شیرین جمشیدی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری: شیرین جمشیدی
نام و نام خانوادگی همکار(ان): ایوب یوسفی جوردهی، محمد حسن زاده صابر، مریم منصف شکری، علیرضا علیپور جورشری، محمد پوردهقانی پیشکناری، مجید پورصفر طبالوندانی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان): سیدمحمدهادی علوی
محل اجرا: استان گیلان
تاریخ شروع: ۱۳۹۸/۰٦/۰۱
مدت اجرا: ۲ سال و ۹ ماه
ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار: سال ۱٤۰۳
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه: بررسی امکان استفاده از خواص آنتی اکسیدانت پلی فنلی طبیعی کورکومین (Curcumin) همراه با مواد ضدیخ برای القاء افزایش تحرک و زنده مانی اسپرم گونه فیل ماهی (*Huso huso*) پرورشی پس از انجمادزدایی

کد مصوب: ۹۸۰٤٦۱-۹۸۰۰۱-۰۱۲-۱۲-۳۲-۱۲

شماره ثبت (فروست): ٦٥٦۲۰ تاریخ: ۱٤۰۳/٥/۲۸

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم شیرین جمشیدی دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته شیلات است.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست‌فناوری و فراوری آبزیان در تاریخ ۱۴۰۳/۴/۲۴ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ☐ پژوهشکده ☐ مرکز ■ ایستگاه ☐

با سمت عضو هیئت علمی در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

چکیده ۱

۱-مقدمه ۳

۱-۱-مشخصات ظاهری عمومی تیره تاسماهیان ۴

۱-۱-۱-فیل‌ماهی (*Huso huso*) ۵

۱-۲-سیستم تولیدمثلی ۶

۱-۳-اهمیت حفظ مواد وراثتی(اسپرم) فیل ماهی ۹

۱-۴- رادیکال های آزاد ۱۰

۱-۴-۱- ویژگی های رادیکال های آزاد ۱۰

۱-۴-۲- آسیب های سلولی ناشی از رادیکال های آزاد ۱۰

۱-۵- استرس اکسیداتیو و گونه های فعال اکسیژن ۱۱

۱-۵-۱- اسیدهای چرب ۱۱

۱-۵-۲-تعریف اکسیداسیون ۱۲

۱-۵-۲-۱- اکسیداسیون لیپیدها ۱۲

۱-۵-۲-۲- فرایند پراکسیداسیون لیپید ۱۳

۱-۶- اثرپراکسیداسیون لیپیدی بر آسیب به اسپرم ماهیان مولد ۱۴

۱-۶-۱-شکست DNA ۱٤

۱-۶-۱-۱-ساختار DNA ۱۴

۱-۶-۲-DNA اسپرم ۱۵

۱-۶-۲-۱-آسیب به DNA اسپرم ۱۵

۱-۶-۲-۲- علل ایجادشکستDNA اسپرم ۱۶

۱-۶-۲-۳-آسیب DNAتوسط استرس اکسیداتیو ۱۷

۱-۶-۲-۴-ترمیم آسیب‌های وارد شده به DNA اسپرم ۱۸

۱-۷-آنتی اکسیدان‌ها و نقش آن ها در بدن ۱۸

۱-۷-۱-کورکومین و ساختار شیمیایی ۲۰

۱-۷-۲-آنالوگ‌ها و مشتقات کورکومین ۲۰

۱-۷-۳-خواص فیزیکوشیمیایی کورکومین ۲۱

۱-۸-سیستم‌های سم زدایی بدن ماهی ۲۲
۱-۸-۱-فعالیت آنتی اکسیدانی کورکومین ۲۲
۱-۹- اهداف تحقیق ۲۳
۲-مواد و روش ها ۲۵
۲-۱-فهرست تجهیزات آزمایشگاهی ۲۵
۲-۲- فهرست مواد آزمایشگاهی ۳۲
۲-۲-۱-مواد مصرفی و غیرمصرفی ۳٤
۲-۳- گونه ماهی مورد آزمایش ۳۵
۲-۴-استفاده از ماده توسعه دهنده، منجمدکردن و یخ زدایی اسپرم: ۳۵
۲-۴-۱-اندازه گیری انواع شاخص های سنجش کیفیت و کمیت اسپرم ۳۸
۲-۴-۱-۱-جمع آوری اسپرم و تعیین یکپارچگی ریختی،حرکت و زنده مانی اسپرم ۳۸
۲-۴-۱-۲- بررسی مورفولوژي اسپرم(تعیین کیفیت) ۳۹
۲-۴-۲- بررسی وضعیت بیوشیمیایی اسپرم: ٤۰
۲-۴-۲-۱-بررسی تعادل عوامل بیوشیمیایی کیفیت اسپرم: ۴۰
۲-۴-۲-۲-بررسی پراکسیداسیون لیپیدی ۴۱
۲-۴-۲-۳- بررسی آنزیم های آنتی اکسیداسیونی ۴۱
۲-۴-۳- اندازه گیری میزان شکست اسپرم با استفاده از comet assay ٤۳
۲-۴-۳-۱- مواد و روش مورد استفاده Comet Assay: ۴۳
۲-۴-۴- بررسي بیان ژن های هدف با استفاده از تکنیک Real-time PCR ٤۷
۲-۴-۴-۱- استخراج RNA از سلول اسپرم ۴۷
۲-۴-۴-۲-اندازه گیری مقدار RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ ۴۸
۲-۴-۴-۳-سنتز (cDNA) از RNA استخراج شده ۴۸
۲-۴-۴-۴- ردیابی و طراحی آغازگر برای بررسی بیان ژن‌هاي *hsp70* و *hsp90* ۵۰
۲-۴-۴-۵- مراحل عملی انجام تکنیک qRT-PCR (Quantitive Real time PCR) یا SYBR green qRT-PCR ۵۱
۲-۴-۴-۶-تعیین کارآیی برای هر جفت آغازگر ۵۲
۲-۴-۴-۷- آنالیز کمی داده ها ۵۳
۲-۴-۴-۸-تجزیه و تحلیل آماری ۵۳

۳-نتایج ۵۴
۳-۱- نتایج حاصل از بررسی وضعیت ریختی(مورفولوژي)، حرکت اسپرم و زنده مانی اسپرم های ذوب شده پس از انجماد ۵۴
۳-۱-۱- نتایج رنگ آمیزی اسپرم برای بررسی یکپارچگی سلول اسپرم ٥٤
۳-۱-۲- نتایج بررسی وضعیت تحرک اسپرم(motility) ٥٥
۳-۱-۳-نتایج بررسی وضعیت زنده مانی اسپرم(viability) ٥٥
۳-۲-نتایج بررسی وضعیت بیوشیمیایی اسپرم: ۵۶
۳-۲-۱-نتایج بررسی وضعیت آنتی اکسیدانی کل در اسپرم(TAC): ٥٦
۳-۲-۱-۱-منحنی استاندارد به دست آمده برای آنتی اکسیدانت کل در اسپرم(TAC): ۵۶
۳-۲-۱-۲- میزان ظرفیت آنتی اکسیدان کل در اسپرم ذوب شده فیل ماهی پس از انجماد(TAC) ۵۷
۳-۳-نتایج بررسی میزان پر اکسیداسیون چربی ذوب شده فیل ماهی پس از انجماد (اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید) ۵۷
۳-۳-۱- منحنی استاندارد به دست آمده برای مالون دی آلدئید ۵۷
۳-۳-۲-میزان پراکسیداسیون چربی(بر اساس جذب مالون دی آلدئید در اسپرم ذوب شده فیل ماهی پس از انجماد ۵۸
۳-۴- نتایج اندازه گیری آنزیم های بیوشیمیایی در اسپرم ۵۸
۳-۴-۱-نتایج اندازه گیری آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز(SOD) ۵۸
۳-۴-۲-نتایج اندازه گیری آنزیم کاتالاز(CAT) در اسپرم ۵۹
۳-۴-۳- نتایج اندازه گیری آنزیم گلوتاتیون احیا(GSH) ۵۹
۳-۴-۳-۱-منحنی استاندارد به دست آمده برای آنزیم گلوتاتیون احیا(GSH) ۵۹
۳-۴-۳-۲- نتایج اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون احیا(GSH) ۶۰
۳-۵-بررسی وضعیت شکست اسپرم ۶۰
۳-۵-۱-بررسی اثر دنباله کشیدگی اسپرم ٦٠
۳-۶- بررسی میزان بیان ژن های *hsp70* و *hsp90* در اسپرم ۶۱
۳-۶-۱-رسم منحنی استاندار برای آغازگرهای *hsp70* و *hsp90* ٦١
۳-۶-۱-۱-رسم منحنی استاندار برای آغازگر*hsp70* ۶۱
۳-۶-۱-۲- رسم منحنی استاندار برای آغازگر *hsp90* ۶۲

۳-۶-۲-تغییرات بیان ژن*hsp70* و *hsp90* ٦٢
۴-بحث ۶۴
۴-۱- تاثیرات غلظت های مختلف کورکومین به کار رفته در تغییرات شاخص های یکپارچگی غشاسلول،تحرک و زنده مانی اسپرم ۶۴
۴-۲-تاثیرات غلظت های مختلف کورکومین به کار رفته در تغییرات شاخص های بیوشیمیایی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل ،پر اکسیداسیون لپیدها و آنزیم های بیوشیمیایی سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون احیا .. ۶۵
۴-۳-تاثیرات غلظت های مختلف کورکومین به کار رفته در شکست اسپرم و بیان ژن*hsp70* و *hsp90* ۶۷
۵- نتیجه گیری نهایی ۶۹
منابع ۷۰
چکیده انگلیسی ۷۴

چکیده

هدف از این تحقیق تاثیر غلظت های مختلف آنتی اکسیدان کورکومین بر روی وضعیت تحرک اسپرم، یکپارچگی غشا سلول اسپرم، زنده مانی اسپرم و شاخص های بیوشیمایی مثل ظرفیت آنتی اکسیداسیون کل، آنزیم های آنتی اکسیداسیونی مثل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون احیا و همین طور بررسی شکست DNAاسپرم و تغییرات ترانسکریپتومی محتویات اسپرم می باشد. نگهداری اسپرم در محیط سرما و انجماد به جهت کاهش دمای محیط باعث می شود تا فعالیت متابولیکی اسپرم کاهش یابد اما از طرفی تشکیل کریستال های یخ سوزنی و گونه های فعال اکسیژن(ROS) در محیط انجماد بالاتر رفته و همین امر باعث بوجود آمدن شرایط اکسیداسیون (تولید رادیکال های آزاد) هم برای اسپرم شود که برای سلول از جهت آسیب به پروتئین ها و چربی های غیر اشباع و دیواره سلولی خطرناک است و موجبات تخریب سلول اسپرم فراهم می آورد. در نگهداری طولانی مدت باید سعی شود شرایط اکسیداسیون کمتر برای سلول بوجود آید که با استفاده از مواد آنتی اکسیداسیون متفاوت می توان به این هدف نزدیک شد. هدف از تحقیق حاضر بررسی افزایش بازماندگی و تحرک اسپرم با مصرف ماده آنتی اکسیدان کورکومین با غلظت های ۵،۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومول بر لیتر پس از انجمادزدایی در اسپرم فیل ماهی می باشد و میزان شاخص های تحرک و زنده مانی اسپرم، یکپارچگی غشا سلول اسپرم، ظرفیت آنتی کل اسپرم،شاخص پر اکسیداسیونی لیپیدها، آنزیم های اکسیداسیونی مثل کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون احیا و بررسی شکست DNA اسپرم و تغییرات بیان ژن های نشانگر مورد آزمون قرار گرفت. نتایج نشان داد که همگی تیمارهای کورکومین تاثیر در افزایش تحرک اسپرم و شاخص زنده مانی اسپرم به صورت معنی داری داشته اند($p\leq0/05$) و یکپارچگی اسپرم تغییری نسبت به تیمار کنترل نداشته است. ظرفیت آنتی اکسیدانت کل در تمامی تیمارهای کورکومین افزایش نشان داد اما افزایش این شاخص در تیمار ۱۰ میکرومول بر لیتر افزایش معنی داری بوده است. شاخص پر اکسیداسیون لیپیدها که نشان دهنده شرایط اکسیداسیون چربی می باشد تغییراتی در تیمارهای کورکومین در جهت افزایش نداشت. از بین سه آنزیم های اکسیداسیونی که مورد بررسی قرار گرفتند آنزیم سوپر اکسیددیسموتاز تغییر افزایشی در تیمارهای کورکومین نشان داد اما این تغییرات معنی دار نبودند اما از طرفی آنزیم های کاتالاز و اکسیداسیون احیا افزایش معنی داری در تیمارهای کورکومین به صورت افزایشی با افزایش غلظت کورکومین نشان داد که همگی تیمارها نسبت به هم تغییرات معنی داری نشان دادند($p\leq0/05$). نتایج بررسی شکست اسپرم حاکی از این بود که تغییرات معنی داری در جهت افزایش شکست اسپرم با افزایش غلظت کورکومین دیده نشد($p\geq0/05$) و تغییرات بیان ژن *hsp70* و *hsp90* در سلول های اسپرمی نشان داد که بیان این ژن ها که نشان دهنده شرایط استرسی می باشند؛ رخ نداده است. نتیجه گیری کلی نشان می دهد که استفاده از تیمارهای ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰

کورکومین باعث افزایش تحرک اسپرم، زنده مانی اسپرم، افزایش ظرفیت آنتی اکسیداسیونی کل، افزایش آنزیم های اکسیداسیونی و عدم شکست اسپرم و عدم تغییرات بیان ژن های استرس شده است.

کلمات کلیدی: کورکومین، فیل ماهی، اسپرم، آنتی اکسیدانت