

## 동결보존액에 울금에서 추출한 Curcumin의 첨가가 정자의 운동성과 활성산소 생성에 미치는 영향

이은주, 김대영<sup>†</sup>  
가천대학교 바이오나노대학 생명과학과

## Effects of Curcumin from Turmeric Supplementation in Freezing Buffer on Sperm Motilities and Reactive Oxygen Species Generation

Eun-Joo Lee and Dae-Young Kim<sup>†</sup>

Department of Life Sciences, College of Bio-Nano Technology, Gachon University Seongnam 13120, Republic of Korea

### ABSTRACT

In this experiment, we determined the effect of curcumin supplementation in freezing buffer for miniature pig sperm cryopreservation. Each ejaculate was diluted with modified Modena B extender and mixed with lactose-egg yolk (LEY extender, 80% v/v lactose solution [310 mM], 20% v/v egg yolk, and 100 µg/mL kanamycin sulfate) and LEY-glycerol Orvus ES Paste (LEYGO, 89.5% v/v LEY, 5% v/v glycerol, 1.5% v/v Orvus ES Paste), 100 mM trehalose supplemented with 0, 10, 50, 100, and 500 µM of curcumin from turmeric, respectively. Following equilibration, the 0.5 mL French straws were frozen and plunged into LN<sub>2</sub> tank for 7 days at least. Sperm parameter and oxidative byproducts were determined by the computer assisted sperm motility analysis (CASA) and fluorescence-activated cell sorting (FACS) as compared with each groups. Supplementation of curcumin had no effect on sperm motility, progressive motility and curvilinear velocity. However, average-path velocity and straight-line velocity were significantly higher in 10 µM curcumin group (100.9±8.8 µm/s, 61.7±2.9 µm/s, respectively) than control group (77.8±3.9 µm/s, 46.4±3.0 µm/s, respectively) (p < 0.05). In addition, the level of the O<sub>2</sub> radical and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were comparatively decreased in curcumin groups by evaluation of ethidium and DCF fluorescence. According to the results, curcumin can improve sperm kinetic variables and alleviate ROS induced cryoinjury to pig sperm.

(Keywords: Antioxidant; Curcumin; Miniature pig sperm; Reactive oxygen species; Sperm parameter)

### 서론

돼지 정자의 동결보존법은 우수혈통의 보급과 유전자원의 확보란 측면에서 매우 유용한 방법으로 알려져 있다. 생명공학 산업 중 이종장기 이식용 미니돼지의 대량생산을 위한 인공수정 방법은 성공적 동결정액의 생산, 자궁 심부 내 수정기법 (DIUI, deep intr-uterine insemination) 등 여러 가지 방법으로 시도되고 있는 실정이다. 하지만, 대부분의 미니돼지는 자연교미를 통해 생산되어 종모축의 확보와 산자 생산에 어려움을 겪고 있으며, 우량 종모축을 이용하여 생산성 증가하기 위해 액상정액을 이용한 인공수정이 이용되고 있으나 단기간 보존되는 한계가 있다.

돼지정액은 다른 축종에 비하여 정자의 세포막에 불포화 지방산이 높은 비율로 포함되어 정자 세포막의 지질 산화가 일어나기 쉬우며, 정자의 운동성과 생존성을 급격히 감소시키는 것으로 보고되어 있다 (Alvarez 와 Storey, 1992). 동결보존 방법이 채취한 정액의 체외보존 한계성을 보완하지만 급격한 온도변화 시 저온충격으로 세포막의 손상, DNA 손상 그리고 효소 활성의 이상을 초래한다 (Kaneko 등, 2006; Fraser 와 Strzeczek, 2007; Rosato와 Iaffaldano, 2013). 또한, 급격한 온도 변화에 의해 발생하는 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)의 증가로 동결 용해 후 정자의 운동성, 생존성, 수정능력 및 정자의 기능을 저하 시킨다 (Aitken 등, 2012).

최근에는 다양한 항산화제를 첨가한 동결보존액을 이용하

<sup>†</sup> Correspondence: Dae-Young Kim  
Phone: +82-31-750-4761; Fax: +82-32-821-2734  
E-mail: davekim@gachon.ac.kr

는 동결방법이 개발되고 있다 (Amidi 등, 2016). 항산화제는 정자의 산화 물질을 제거하고, 정자의 세포막에 지질 산화를 억제하여 정자의 형태와 기능을 유지할 수 있도록 한다 (Mortazavi 등, 2014). 이 중 Curcumin ( $C_{21}H_{20}O_6$ , MW368.38)은 생강과 식물인 강황이나 울금에서 추출한 성분으로 항산화 물질, 항염증, 항암제, 항바이러스제로 많이 이용된다 (Duvoix 등, 2005). 또한 산화에 의한 DNA 손상을 억제하며, free-radical소거능력이 뛰어나다 (Joe 등, 2004). 그리고 산화 스트레스에 노출된 소 정자도 curcumin의 항산화 효과로 정자손상을 막을 수 있다는 연구도 보고된 바 있다 (Tvrda 등, 2016).

따라서 본 연구에서는 미니돼지 정자의 동결보존액 제조 시 항산화제로서 curcumin의 첨가가 용해 후 정자의 생존성과 산화물질의 생성에 미치는 영향에 대하여 알아보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 사용 시약

Equex STM (Nova Chemical Sales, Inc. Scituate, MA, USA)을 제외하고, Sigma-Aldrich Chemical company (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

### 2. 정액의 채취

본 실험에 이용한 정액은 10세 PWG미니돼지를 음경 수압하여 주 1회 채취하였다. 정장액을 걸러낸 정액은 기본 희석제로 1:1 비율로 희석한 뒤, 17°C로 보관 운반하였다. 실험실로 운반된 정액은 정자분석장비 (CASA, Hamilton Thorne, Inc., HTM-HELOS, Beverly, MA, USA)를 이용하여 정자의 운동성은 80% 이상과 전진성 운동 70% 이상의 정액만을 선별하여 본 실험에 사용하였다.

### 3. 희석제와 동결보존액

기본 희석제인 modified Modena B (mMB: 6 g glucose, 0.45 g EDTA, 1.38 g sodium citrate, 0.2 g sodium bicarbonate, 1 g Tris base, 0.5 g citric acid, 0.01 g cysteine, 0.8 g BSA and 0.06 g kanamycin sulfate; pH 7)를 사용하였으며, 1차 동결액 lactose-egg yolk (LEY extender: 80% v/v lactose solution [310 mM] and 20% v/v egg yolk, 100 µg/mL kanamycin sulfate)와 2차 동결액 LEY-glycerol-Orvus-ES-Paste (LEYGO: 89.5% v/v LEY; 5% v/v glycerol; 1.5% v/v OrvusESPate [OEP]; 100 mM trehalose; and 0, 10, 50, 100, 500 µM of curcumin)을 사용하였다. Curcumin은 분리, 정제 및 추출은 기존의 논문 방식을 따랐다 (Lee 등, 2014).

### 4. 돼지 정자 동결보존

우선 1차 희석된 미니돼지 정액은 다시 mMB 용액에 1:3비율로 희석하여 하였고, 24°C로 준비된 원심분리기를 이용하여 400 × g로 10분간 원심분리 하였다. 부유물의 양에 따라 mMB 희석액으로 많게는 4-5회까지 세정하였으며, 세정 후 정자 수가  $1 \times 10^9$ /mL이 되도록 정자를 LEY용액에 희석하였다. 정자-LEY용액은 얼음물에서 점차적으로 온도를 낮추어 4°C가 되도록 냉각시켰다. 그리고 curcumin을 0, 10, 50, 100, 500 µM의 농도로 각각 첨가한 LEYGO와 1:1 비율로 혼합하였다. 정자-LEYGO혼합용액을 0.5 mL 정자 straw (FHK, Fujihira Industry Co., Japan)에 넣어, 액체질소로부터 약 5 cm 위에서 액체질소의 냉기로 5분간 식빙한 후, 1시간 뒤 LN<sub>2</sub>탱크에 넣어 장기보관하였다. 이후 정자운동성 검사는 최소 일주일 이상 지난 뒤 시행하였다.

### 5. 동결 돼지 정액의 용해와 정자의 운동성 검사

정자의 운동성 검사는 CASA로 측정하였다. 해동을 위해 동결보존된 정자straw는 50°C 항온수조에 담가 10초동안 급속 용해 후, 15 mL Falcon튜브로 옮겼다. 37°C로 미리 데워진 10 mL mMB에 희석하여 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 이후 정자는 mMB를 첨가하여 최종 정자농도가  $5 \times 10^7$ /mL이 되도록 희석하였다. 37°C로 예열한 Leja슬라이드(Leja Products BV., Nieuw Vennepe, Netherlands)에 정자 희석액 2 µL를 떨어뜨린 후 1분간 정치 후, CASA분석기를 이용해 운동성 (motility), 정자두부의 이동속도(VAP, average path velocity), 전진성 운동 정자의 비율(progressive motility), 정자 두부의 직선거리 이동속도(VSL, straight-line velocity), 정자 두부의 이동에 따른 좌우 진폭 평균거리(ALH, lateral amplitude), 정자두부의 이동경로의 이동속도(VCL, curvilinear velocity), 그리고 직진성(LIN, linearity)를 관찰하였다.

### 6. 돼지 정자 내 산화물질과 유세포 분석

동결 시 농도 별로 처리한 curcumin은 2가지 형광염색방법을 이용하여 유세포 분석기(FACS, 500 series, Beckman, Coulter, Inc., FL, USA)로 사멸한 정자의 수와 정자 내 산화 물질의 양을 측정하였다. 농도별로 Yo-Pro-1 iodide (Yo-Pro-1; Molecular Probes Inc.) 0.05 µM와 Hydroethidine (HE; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA)는 4 µM 첨가하여 25°C에서 40분 동안 반응을 시켜 정자 내 O<sub>2</sub> radical의 양을 측정하는데 사용하였고, Propidium Iodide (PI; Sigma-Aldrich) 0.75 µM와 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA; Molecular Probes Inc.)은 200 µM 첨가해 37°C에서 10분 동안 반응시켜 정자 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 양을 측정하는데 사용하였다.

## 7. 통계처리

본 실험에서 사용된 모든 자료의 통계는 R 통계 프로그램 (R Development Core Team)을 이용해 분산 분석을 실시하여 얻었으며, 통계를 통해 얻은 자료 값의 유의차는  $P < 0.05$ 이다.

## 결 과

### 1. CASA를 이용한 미니돼지 정자의 운동성 검사

돼지 정액의 동결보존액 제조 시 curcumin의 첨가가 정자의 운동성에 미치는 영향은 Table 1과 Fig. 1에서 정자의 운동

성 (Motility)은 대조군  $40.0 \pm 4.2\%$ 보다 curcumin  $10 \mu\text{M}$  ( $50.4 \pm 3.5\%$ ), curcumin  $100 \mu\text{M}$  ( $47.0 \pm 4.2\%$ )에서 높은 운동성을 보였다. 전진성 운동 정자의 비율 (progressive motility)은 대조군 ( $22.0 \pm 2.8\%$ )보다 curcumin  $10 \mu\text{M}$  ( $31.7 \pm 4.9\%$ )과 curcumin  $100 \mu\text{M}$  ( $30.5 \pm 4.9\%$ )에서 높은 운동성을 보였다. 또한 정자두부의 이동속도 (VAP, average-path velocity), 정자 두부의 직선거리 이동속도 (VSL, straight-line velocity), 정자두부의 이동경로의 이동속도 (VCL, curvilinear velocity)의 경우, 대조군 ( $77.8 \pm 3.9 \mu\text{m/s}$ ,  $46.4 \pm 3.0 \mu\text{m/s}$ ,  $153.3 \pm 8.8 \mu\text{m/s}$ )보다 curcumin  $10 \mu\text{M}$  ( $100.9 \pm 8.8 \mu\text{m/s}$ ,  $61.7 \pm 2.9 \mu\text{m/s}$ ,  $185.7 \pm 12.5 \mu\text{m/s}$ )에서 유의적으로 빠른 것으로 조사되었다 ( $p < 0.05$ ).

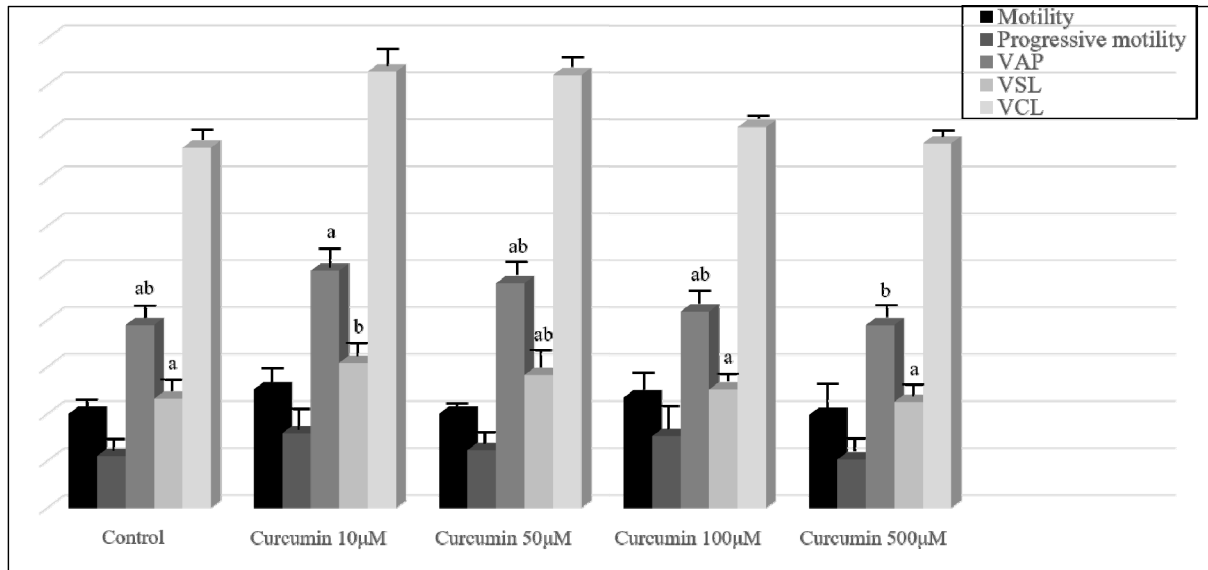


Fig. 1. Effects of curcumin supplementation in freezing buffer on miniature pig sperm motility and kinetic variables (means  $\pm$  S.E.).  
<sup>a,b</sup>Means within a same group with no superscript letter in common differ ( $p < 0.05$ ).

VAP (Average-path velocity), VSL (Straight-line velocity) and VCL (Curvilinear velocity).

Table 1. Mean ( $\pm$  S.E.) sperm motility and kinetic variables of miniature pig sperm supplemented with different concentration of curcumin for cryopreservation at  $-196^\circ\text{C}$ .

Sperm Treatment	Motility (%)	Progressive motility (%)	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )
Control	40.0 $\pm$ 4.2	22.0 $\pm$ 2.8	77.8 $\pm$ 3.9 <sup>ab</sup>	46.4 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>	153.3 $\pm$ 8.8
Curcumin 10µM	50.4 $\pm$ 3.5	31.7 $\pm$ 4.9	100.9 $\pm$ 8.8 <sup>a</sup>	61.7 $\pm$ 2.9 <sup>b</sup>	185.7 $\pm$ 12.5
Curcumin 50µM	40.0 $\pm$ 2.8	24.5 $\pm$ 3.5	95.6 $\pm$ 4.2 <sup>ab</sup>	56.5 $\pm$ 4.5 <sup>ab</sup>	184.2 $\pm$ 4.7
Curcumin 100µM	47.0 $\pm$ 4.2	30.5 $\pm$ 4.9	83.6 $\pm$ 4.2 <sup>ab</sup>	50.4 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	162.1 $\pm$ 2.5
Curcumin 500µM	39.5 $\pm$ 6.4	20.5 $\pm$ 3.5	77.8 $\pm$ 4.2 <sup>b</sup>	45.1 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	155.2 $\pm$ 2.6
<i>p</i> Value	-	-	0.0257	0.00197	-

<sup>ab</sup> Different superscripts within the same column demonstrate significant differences ( $p < 0.05$ )

- : No significant difference.

VAP (Average-path velocity), VSL (Straight-line velocity) and VCL (Curvilinear velocity).

## 2. 유세포 분석기를 이용한 미니돼지 정자 내 산화물질 분석

Curcumin을 첨가한 돼지 정액을 Yo-Pro-1과 HE으로 염색하여 유세포 분석기로  $O_2^-$  양을 확인하였다 (Table 2, Fig. 2). 세포 내의  $O_2^-$  수치는 V2영역에 위치한 세포 비율로 알 수 있다. V2영역에 있는 세포의 비율은 대조군 (45.8±1.0%), curcumin 10  $\mu$ M (43.5±0.9%), curcumin 50  $\mu$ M (43.7±2.1%), curcumin 100  $\mu$ M (45.0±1.1%), curcumin 500  $\mu$ M (45.7±0.7%)로 curcumin을 첨가한 실험군이 전체적으로 대조군보다 낮은 수치를 보였다.

또한 curcumin을 첨가한 돼지 정액을 PI와  $H_2DCFDA$ 로 염색하여 유세포분석기로 세포 내의  $H_2O_2$ 양을 확인하였다 (Fig. 3, Table 2).  $H_2O_2$ 가 많이 포함된 세포들은 주로 V3 영역에 위치해 있다. V3 영역의 세포 비율은 대조군 (4.1±1.01%), curcumin 10  $\mu$ M (2.7±0.5%), curcumin 50  $\mu$ M (3.0±0.6%), curcumin 100  $\mu$ M (3.2±1.02%), curcumin 500  $\mu$ M (3.2±0.2%)로 curcumin을 첨가한 실험군이 대조군보다 낮은 수치를 나타냈으며, 특히 curcumin을 10  $\mu$ M 첨가한 실험군이 2.7±0.5%로 제일 낮은 수치를 보였다.

## 고 찰

본 연구에서는 울금에서 추출한 curcumin의 첨가가 미니돼지 정자 동결보존에 미치는 효과를 실험하였다.

정자는 동결 용해 과정 동안에 큰 손상을 입게 되며 정자의 운동성을 감소시키게 된다 (Liu 등, 2004; Aisen 등, 2005). 동결 용해 과정 동안 생성되는 활성산소에 의해 정자가 손상된다는 것은 잘 알려져 있다 (Gadea 등, 2004; Amidi 등, 2016). 항산화물질은 정자 세포막에 지질 산화가 발생하는 것을 막아 정자의 대사 활성과 기능을 유지한다 (Bucak 등, 2007). 이는 동결 용해 후 정자의 생존율을 높이고, 정자의 운동성 또

한 유지시켜 동결정액의 효용성을 높인다 (Chatterjee 와 Gagnon, 2001; Fraser 와Strzezek, 2007).

최근에는 정자의 동결 용해 후 기능을 개선시키고자 동결 정액 제조 시 항산화제를 첨가하는 연구가 진행되고 있다 (Joe 등, 2004; Duvoix 등, 2005; Mortazavi 등, 2014). 정자 세포막에 산화작용을 일으키는 ROS를 완화시켜주는 항산화제로는  $\alpha$ -tocopherol, taurine, hypotaurine 및 trehalose 등이 알려져 있다 (Bucak 등, 2007). 그리고 천연 항산화물질인 curcumin이 바이오산업 전반에서 큰 주목을 받고 있다. Curcumin 은 항암작용, 항균작용, 및 항산화작용 등 다양한 효능을 가지고 있으며 (Leu 와Maa, 2002), 산화에 의한 세포막 손상, DNA 손상을 억제하며 free-radical의 생성을 억제하는 작용이 확인되었다 (Joe 등, 2004; Duvoix 등, 2005).

본 연구 실험에서CASA를 통한 돼지정자의 운동성 검사에 있어서는 curcumin을 첨가한 실험군에서 대조군과 비교하여 운동성 및 전진성이 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높게 나타났다 (Table 1). 유세포 분석기를 이용해 돼지정자 내 산화물질 분석 결과는 curcumin을 첨가한 실험군에서는 대조군과 비교하여  $O_2^-$  와  $H_2O_2$  (Table 2) 수치가 낮게 나타나 curcumin이 free-radical을 제거하는데 효과가 있다는 것을 보여준다.

Curcumin을 첨가한 실험군에서 활성산소의 발생양상에 있어서  $H_2O_2$ 의 발생이 완화되었던 결과를 보면, 돼지 정자의 동결시 미치는 유해성에 있어서  $O_2^-$ 보다는  $H_2O_2$ 의 영향이 더 주요한 것으로 보여진다. 사람의 정자에서 $H_2O_2$ 는 정자의 운동성과 침체반응 그리고 세포기능을 억제한다고 하였다 (Aitken 등, 1993; Griveau 등, 1995).

본 실험 결과 미니돼지정자의 동결 정액 제조에 있어 항산화제로서 curcumin을 동결보존액에 첨가하여 손상되는 정자를 동결 용해 과정에서 보호하고 정자의 운동성, 지질산화를 방지하여 정자의 대사 활성과 기능을 개선시켰음을 확인하였다.

Table 2. ROS evaluation of ethidium and DCF fluorescence in frozen-thawed boar sperm of control and curcumin.

Sperm Treatment	Viable sperm with a high $O_2^-$ (%)	MFI of ethidium/total sperm	MFI of ethidium/viable sperm	Viable sperm with a high $H_2O_2$ (%)	MFI of DCF/total sperm	MFI of DCF/viable sperm
Control	45.8 ± 0.6	139.7 ± 15.2	162.5 ± 19.2	4.1 ± 0.6	74.1 ± 5.9	91.4 ± 6.0
Curcumin 10 $\mu$ M	43.5 ± 0.5	151.3 ± 23.4	169.0 ± 27.4	2.7 ± 0.3	66.3 ± 2.0	82.5 ± 2.1
Curcumin 50 $\mu$ M	43.7 ± 1.2	106.3 ± 9.2	115.9 ± 13.1	3.0 ± 0.3	69.2 ± 3.8	84.8 ± 4.2
Curcumin 100 $\mu$ M	45.0 ± 0.6	144.3 ± 12.5	159.6 ± 16.6	3.2 ± 0.6	87.8 ± 11.5	104.6 ± 11.1
Curcumin 500 $\mu$ M	45.7 ± 0.4	152.0 ± 3.5	172.4 ± 9.7	3.3 ± 0.1	68.5 ± 0.8	85.0 ± 1.4
<i>p</i> Value	-	-	-	-	-	-

- : No significant difference.

MFI: mean fluorescence intensity.

DCF: 2', 7'-dichlorofluorescein.

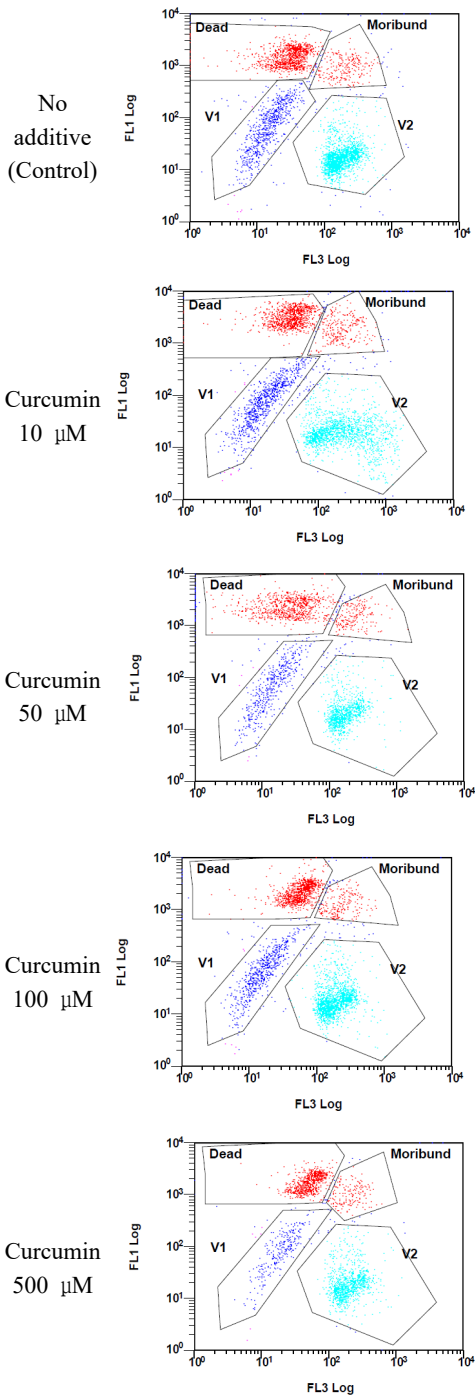


Fig. 2. Effect of ROS on  $O_2^-$  content of miniature pig sperm. Flow cytometric 2-D dot plots of sperm labeled with Yo-Pro-1/HE fluorescence in control and curcumin treated groups. V1 region represents viable sperm with a low intracellular  $O_2^-$  radical, V2 region represents viable sperm with a high intracellular  $O_2^-$  radical and the upper quadrants Dead and Moribund region represent dead sperm, in the process of programmed cell death of sperm. Yo-Pro-1/HE fluorescence – measure  $O_2^-$  radical of sperm, Yo-Pro-1: FL1Log, HE: FL3 Log

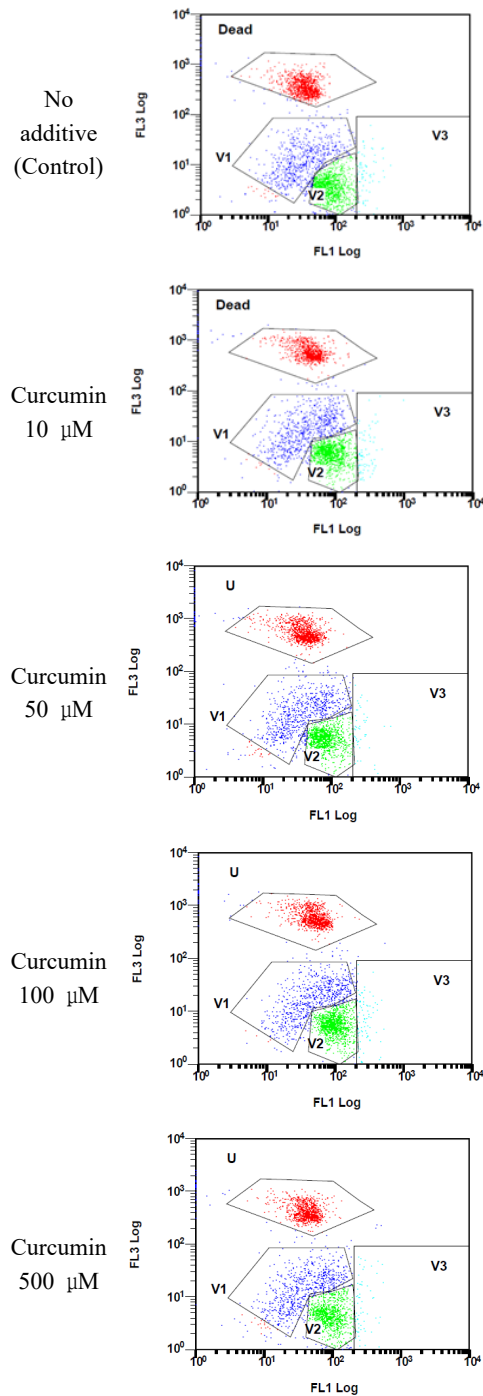


Fig. 3. Effect of ROS on intracellular  $H_2O_2$  radical content of miniature pig sperm. Flow cytometric 2-D dot plots of sperm labeled with PI/ $H_2$ DCFDA fluorescence in control and curcumin treated groups. V1 and V2 region represent viable sperm with a low intracellular  $H_2O_2$  radical, V3 region represents viable sperm with a high intracellular  $H_2O_2$  radical and the upper quadrants Dead region represents dead sperm. PI/ $H_2$ DCFDA fluorescence – measure  $H_2O_2$  of sperm, PI: FL1Log,  $H_2$ DCFDA: FL3 Log

## 결론

동결보존 방법이 효율성이 높지만 급격한 온도변화와 활성 산소의 생성을 초래한다. 동결 용해과정 동안 정자는 손상을 입게 되며 정자의 운동성을 감소시키게 된다. 최근에는 정자의 손상을 억제하기 위해 동결보존액에 다양한 항산화제를 첨가하는 방법이 개발되고 있다

미니돼지의 동결정액 제조 시 동결보존액에 첨가한 curcumin은 정자의 운동성과 항산화 효과를 개선시키는 것을 알 수 있었다. Curcumin를 첨가한 실험군에서는 대조군에 비하여 유의적으로 높은 운동성을 보였다. 특히, curcumin을 10  $\mu$ M의 농도로 첨가한 실험군은 정자두부의 이동속도 (VAP, average-path velocity)가  $100.9 \pm 8.8 \mu\text{m/s}$ , 정자 두부의 직선거리 이동속도 (VSL, straight-line velocity)가  $61.7 \pm 2.9 \mu\text{m/s}$ 로 유의적인 차이를 나타냈다 ( $p < 0.05$ ). 또한 free-radical 소거 능력은 curcumin을 10  $\mu$ M의 농도로 첨가한 실험군에서 비교적 효율이 높게 나타났다.

본 연구결과는 이종장기 이식용 미니돼지의 대량생산에 이용될 수 있는 동결정액 제조에 중요하게 이용될 것이며, 정자의 동결 용해 후 기능 개선에 다양한 첨가제 및 항산화제를 활용한 연구에 기초 자료를 제공할 것으로 생각된다.

## ACKNOWLEDGEMENT

This study results are part of a master's thesis, Eun-Joo Lee. The authors would like to gratefully thank Prof. Jae-Kweon Park, Gachon university, for providing the curcumin samples and Prof. Choon-Keun Park, Kangwon national University, for semen supply. "This work was supported by a grant from National Research Foundation of Korea (NRF) (Grant No. NRF-2012-0001770)"

## REFERENCES

- Aisen E, Quintana M, Medina V, Morello H and Venturino A. 2005. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology* 50:239-249.
- Aitken RJ, Buckingham D and Harkiss D. 1993. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 97:441-450.
- Aitken RJ, Jones KT and Robertson SA. 2012. Reactive oxygen species and sperm function--in sickness and in health. *J. Androl.* 33:1096-1106.
- Alvarez JG and Storey BT. 1992. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J. Androl.* 13:232-241.
- Amidi F, Pazhohan A, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M and Nekoonam S. 2016. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank* 17:745-756.
- Bucak MN, Atessahin A, Varisli O, Yuce A, Tekin N and Akcay A. 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology* 67:1060-1067.
- Chatterjee S and Gagnon C. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* 59:451-458.
- Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schneckeburger M, Morceau F, Henry E, Dicato M and Diederich M. 2005. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett.* 223:181-190.
- Fraser L and Strzezek J. 2007. Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing-thawing? *Theriogenology* 68:248-257.
- Gadea J, Sellés E, Marco MA, Coy P, Matás C, Romar R and Ruiz S. 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 62:690-701.
- Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP and Le Lannou D. 1995. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 103:17-26.
- Joe B, Vijaykumar M and Lokesh BR. 2004. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44:97-111.
- Kaneko T, Yamamura A, Ide Y, Ogi M, Yanagita T and Nakagata N. 2006. Long-term cryopreservation of mouse sperm. *Theriogenology* 66:1098-1101.
- Lee ES, Hwang YJ and Park JK. 2014. Purification of Curcumin from Turmeric by using Chitosan. *J. Chitin Chitosan* 19:270-276.

- Leu TH and Maa MC. 2002. The molecular mechanisms for the antitumorigenic effect of curcumin. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 2:357-370.
- Liu JL, Kusakabe H, Chang CC, Suzuki H, Schmidt DW, Julian M, Pfeffer R, Bormann CL, Tian XC, Yanagimachi R and Yang X. 2004. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol. Reprod.* 70:1776-1781.
- Mortazavi M, Salehi I., Alizadeh Z, Vahabian M and Roushandeh AM. 2014. Protective Effects of Antioxidants on Sperm Parameters and Seminiferous Tubules Epithelium in High Fat-fed Rats. *J. Reprod. Infertil.* 15:22-28.
- Rosato MP and Iaffaldano N. 2013. Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology* 79:508-516.
- Tvrđá E, Tušimová E, Kováčik A, Paál D, Greifová H, Abdramanov A and Lukáč N. 2016. Curcumin has protective and antioxidant properties on bull spermatozoa subjected to induced oxidative stress. *Anim. Reprod. Sci.* 172:10-20.

---

Received September 21 2017, Revised September 26, 2017,  
Accepted September 27, 2017