Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Research on Animal Production, Vol. 16, Issue 1, 2025 p: 155-166

OPEN ACCESS

Research Paper

Effect of Zinc Nano Oxide on the Quality of Turkey Sperm in Liquid State

Vahid Lotfi vafa[1], Khalil Mirzadeh[2], Saleh Tabatabaei Vakili[3] and Amin Kazemizadeh[4]

1- M.Sc. Graduate, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Industry, Khuzestan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Ahvsz, Iran
2- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Industry, Khuzestan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Ahvaz, Iran,
(Corresponding author: mirzadeh2019@gmail.com)
3- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Industry, Khuzestan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Ahvaz, Iran
4- Ph.D. Graduated, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Ahvaz, Iran

Received: 23 July, 2024 Revised: 19 September, 2024 Accepted: 28 October, 2024

Extended Abstract

Background: Over the past two decades, there has been a growing body of research on the effects of nanoparticles on semen parameters. Nanoparticles are molecules with dimensions ranging from 1 to 100 nanometers. Due to their unique properties, nanoparticles have attracted significant attention in biotechnology, medicine, animal reproduction, and veterinary sciences. Their high surface area-to-volume ratio increases reactivity and enhances their ability to penetrate biological tissues. These particles possess high chemical stability, allowing them to remain stable under various environmental conditions, and their nanoscale size enables them to cross biological cell membranes, enhancing cellular efficacy. Zinc is one of the essential elements influencing sperm health. It plays a critical role in sperm viability and motility and affects protein metabolism, nucleic acid synthesis, and sperm membrane stabilization. Most enzymes, including carbonic anhydrase, carboxypeptidase, and superoxide dismutase, require zinc as a cofactor. Zinc's positive effects on semen quality are attributed to its ability to enhance sperm antioxidant capacity, thereby mitigating oxidative stress caused by excessive reactive oxygen species (ROS). ROS are highly reactive, short-lived molecules (10^-9 seconds) derived from oxygen and characterized by one or more unpaired electrons. Due to their unstable chemical nature, they react with nearby organic molecules such as lipids, proteins, and DNA to achieve stability. While controlled ROS production plays a physiological role in key sperm processes—such as motility activation, transient adhesion to the uterine tube, capacitation, increased sperm activity, acrosome reaction, and sperm-oocyte fusion—excessive ROS levels lead to oxidative stress. This stress can cause lipid peroxidation of the sperm's cytoplasmic membrane, acrosomal membrane damage, DNA oxidation and fragmentation, and ultimately chromosomal abnormalities. Zinc helps prevent ROS production and defective sperm and leukocytes. It also exhibits antioxidant effects by inhibiting lipid peroxidation and reducing antisperm antibody levels. Oxidative stress in sperm is associated with accelerated oxidation of cellular components and excessive ROS production. Spermatogenesis occurs in three sequential stages (spermatocytogenesis, spermiogenesis, and spermiation) in the seminiferous tubules. In birds, the duration of spermatogenesis is significantly shorter than in mammals—approximately 25 days. The high content of polyunsaturated fatty acids in avian sperm cell membranes renders them particularly vulnerable to lipid peroxidation. Therefore, maintaining a balance between ROS production and the protective function of the antioxidant system is essential for proper cell function. The predominant polyunsaturated fatty acids in avian sperm membrane phospholipids include arachidonic acid (C20) and docosatetraenoic acid (C22), making the sperm highly susceptible to oxidative damage, which can impair sperm morphology and reduce motility. It is believed that this is a major cause of fertility loss during semen storage in birds. Some metalloenzymes (such as lactate dehydrogenase and sorbitol dehydrogenase), which are important for sperm motility, may contain zinc in their structure. Zinc oxide nanoparticles improve acrosomal membrane integrity, preserve membrane health, enhance acrosomal function, and positively affect mitochondrial performance and its functional integrity.

Copyright ©2025 Lotfi vafa. et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License which allows users to read, copy, distribute and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-04]

[DOI: 10.61186/rap.16.1.155]

Methods: Semen samples were collected twice weekly for five weeks from 18 Bronze turkeys. After pooling the samples to eliminate individual variation, they were divided into four groups. Different concentrations of zinc oxide nanoparticles (0, 50, 100, and 200 µg/mL) were added to the semen extender, and sperm quality parameters (total motility, progressive motility, viability, membrane integrity, and abnormality) were evaluated at 0, 12, 24, and 48 hours of storage at 4°C.
Results: Significant improvements in sperm quality parameters were observed at 24 and 48 hours in groups treated with 50, 100, and 200 µg/mL of nano-zinc oxide. The 100 µg/mL treatment showed the best overall performance in maintaining sperm quality over time, while the control group exhibited the lowest performance. The addition of zinc oxide nanoparticles led to statistically significant improvements in sperm quality parameters compared to the control group.
Conclusion: The addition of zinc oxide nanoparticles to turkey semen extender improved sperm quality during liquid storage at 4°C. Among the tested concentrations, 100 µg/mL demonstrated the most effective performance in enhancing sperm quality parameters.

Keywords: Antioxidant, Oxidative stress, Qualitative parameters, Reactive Oxygen Species, Storage times

How to Cite This Article: Lotfi vafa, V., Mirzadeh, Kh., Tabatabei Vakili, S., & Kazemizadeh, A. (2025). Effect of Zinc Nano Oxide on the Quality of Turkey Sperm in Liquid State. *Res Anim Prod,* 16(1), 155-166. DOI: 10.61186/rap.16.1.155

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-04]
[DOI: 10.61186/rap.16.1.155]

مقاله پژوهشی

تأثیر نانو اکسیدروی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم بوقلمون در شرایط مایع

وحید لطفی وفا[۱]، خلیل میرزاده[۲]، صالح طباطبائی وکیلی[۳] و امین کاظمی‌زاده[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران
۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران،
(نویسنده مسوول: mirzadeh2019@gmail.com)
۳- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران
۴- دانش‌آموخته دکتری گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۰۲ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۰۷
صفحه: ۱۵۵ تا ۱۶۶

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: در دو دهه گذشته شاهد حجم فزاینده‌ای از تحقیقات در مورد اثرات نانوذرات بر پارامترهای مایع منی بوده‌ایم. نانوذرات مولکول‌هایی با اندازه ۱ تا ۱۰۰ نانومتر هستند. نانوذرات به‌دلیل خواص منحصربه فرد خود، نظرات قابل توجهی را در بیوتکنولوژی، پزشکی، تولیدمثل حیوانات و علوم دامپزشکی به‌خود جلب کرده‌اند . نانوذرات نسبت سطح به حجم بالایی دارند که باعث افزایش واکنش‌پذیری و توانایی نفوذ بیشتر در بافت‌های بیولوژیک می‌شود. این ذرات از پایداری شیمیایی بالایی برخوردار هستند که می‌توانند در برابر شرایط محیطی مختلف پایداری خود را حفظ کنند و همچنین به‌دلیل داشتن اندازه نانوی خود می‌توانند از غشای سلول‌های بیولوژیکی عبور کرده و اثرگذاری بهتر در سلول شوند. یکی از عناصر مهم و تاثیرگذار در سلامت اسپرم عنصر روی است. عنصر روی نقش مهمی در زنده ماندن و تحرک اسپرم دارد و بر متابولیسم پروتئین، سنتز اسید نوکلئیک و تثبیت غشای اسپرم تأثیر می‌گذارد. اکثر آنزیم‌ها، ازجمله کربنیک انیدراز، کربوکسی پپتیداز و سوپراکسید دیسموتاز، به روی به‌عنوان کوفاکتور نیاز دارند. اثر مثبت روی بر کیفیت منی را می‌توان با توانایی آن در افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم برای غلبه‌بر استرس اکسیداتیو ناشی از تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) توضیح داد. گونه‌های فعال اکسیژن مولکول‌های واکنشی با عمر کوتاه (۱۰-۹ ثانیه) متعلق به دسته رادیکال‌های آزاد هستند که از اکسیژن مشتق شده‌اند و با وجود یک یا چند الکترون جفت نشده در آخرین لایه الکترونی خود مشخص می‌شوند. به دلیل ساختار شیمیایی ناپایدارشان، برای رسیدن به حالت متعادل به مولکول‌های آلی مجاور مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA حمله می‌کنند. در واقع، تولید کنترل‌شده‌ی ROSها در اسپرم نقش فیزیولوژیکی مهم در رویدادهای اساسی در اسپرم مانند فعال‌سازی تحرک، چسبندگی گذرای اسپرم به لوله رحم، ظرفیت‌دار شدن، افزایش در فعالیت اسپرم، واکنش آکروزومی و ادغام اسپرم-اووسیت را هدایت می‌کنند. از سوی دیگر اما، هنگامی که سطح ROS مایع‌منی از دفاع آنتی‌اکسیدانی فراتر رود، وضعیتی از استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود. استرس اکسیداتیو در منی منجربه پراکسیداسیون لیپیدی غشای سیتوپلاسمی اسپرم، آسیب غشای آکروزومی، اکسیداسیون و تجزیه DNA و در نهایت ناهنجاری‌های کروموزومی در اسپرم می‌شود. عنصر روی از تولید گونه‌های فعال اکسیژن، اسپرم‌ها و لکوسیت‌های معیوب جلوگیری می‌کند. هم‌چنین با مهار پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش سطح آنتی‌بادی‌های ضد اسپرم، دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی است. استرس اکسیداتیو در اسپرم پدیده‌ای است که با افزایش سرعت اکسیداسیون اجزای سلولی و تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن مرتبط است. اسپرماتوژنز طی سه مرحله متوالی (اسپرماتوسیتوژنز، اسپرمیوژنز و اسپرماسیون) در مجاری اسپرم‌ساز بیضه رخ می‌دهد. مدت زمان اسپرماتوژنز در پرندگان بسیار کوتاه‌تر از پستانداران است که تقریباً ۲۵ روز است. محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباع در غشای سلولی اسپرم پرندگان، این سلول‌ها را به‌ویژه در برابر پراکسیداسیون لیپیدی حساس می‌کند. بنابراین، برای اطمینان از عملکرد صحیح سلول‌ها، لازم است بین تشکیل ROSها و عملکرد محافظتی سیستم آنتی‌اکسیدانی تعادل وجود داشته باشد. محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباع در فسفولیپیدهای غشای سلولی اسپرم پرندگان عمدتاً اسیدهای آراشیدونیک (۲۰ کربنه) و دوکوزاترانوئیک اسید (۲۲ کربنه) هستند. که این عامل سلول‌ها را به‌ویژه در برابر پراکسیداسیون لیپیدی حساس می‌کند، آسیب پراکسیداتیو مورفولوژی اسپرم را تحت تأثیر قرار می‌دهد و تحرک اسپرم را کاهش می‌دهد. بنابراین اعتقادبر این است که علت اصلی از دست دادن ظرفیت باروری مشاهده شده در طول ذخیره‌سازی مایع‌منی پرندگان است. گزارش شده‌است که برخی از متالو آنزیم‌ها (مانند لاکتات دهیدروژناز و سوربیتول دهیدروژناز) که نقش مهمی در افزایش تحرک اسپرم دارند، ممکن است حاوی روی در ساختار خود باشند. نانو اکسیروی سبب افزایش یکپارچگی غشا اسپرم آکروزوم شده و سبب حفظ سلامت غشا و بهبود عملکرد در آکروزوم می‌شود هم‌چنین این نانو اکسید بر عملکرد میتوکندری سلول اثر گذار بوده و سبب یکپارچگی عملکرد آن می‌شود.

مواد و روش‌ها: نمونه‌گیری از ۱۸ قطعه بوقلمون نژاد Bronze turkey دو بار در هفته و به‌مدت ۵ هفته انجام‌گرفت. نمونه‌ها پس از مخلوط شدن با یکدیگر به‌منظور از بین رفتن اثرات فردی به ۴ گروه تقسیم شده و مقادیر مختلف نانو اکسیدروی (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به رقیق‌کننده افزوده شد و تحت دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد فراسنجه‌های کیفی اسپرم (درصد جنبایی کل، درصد جنبایی پیش‌رونده، درصد زنده‌مانی، درصد سلامت غشا و درصد ناهنجاری) در زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی (صفر، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) بررسی شدند.

یافته‌ها: این نتایج با استفاده از سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانو اکسیدروی حاصل شد. در ارتباط با درصد تحرک کل، پیش‌رونده، زنده‌مانی، سلامت غشا و ناهنجاری، بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت نانو اکسیدروی اثر معنی‌داری بر فراسنجه‌های ذکرشده داشت. تیمار ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بهترین عملکرد را در طی افزایش در زمان ذخیره‌سازی از خود بر روی فراسنجه‌های کیفی اسپرم بوقلمون نشان داد و تیمار شاهد دارای پایین‌ترین عملکرد از این نظر بود. نتایج نشان دادند که افزودن سطوح مختلف نانو اکسیدروی در رقیق‌کننده اسپرم بوقلمون بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت باعث تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد شد و سبب بهبود در فراسنجه‌های کیفی اسپرم بوقلمون در مقایسه با تیمار شاهد شد.

نتیجه‌گیری: افزودن نانو اکسیدروی، فراسنجه‌های کیفی اسپرم بوقلمون را در حالت مایع (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) بهبود بخشید و اضافه کردن مقدار ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو اکسیدروی در رقیق‌کننده اسپرم بهترین عملکرد را بین سطوح مختلف (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اضافه‌شده داشت.

واژه‌های کلیدی: آنتی اکسیدان، استرس اکسیداتیو، زمان‌های ذخیره‌سازی، فراسنجه‌های کیفی، گونه‌های فعال اکسیژن

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-04]

[DOI: 10.61186/rap.16.1.155]

مقدمه

یکی از عوامل مهم و اثرگذار در ایجاد ناباروری در پرندگان، گونه‌های اکسیژن فعال است (Kazemizadeh *et al*., 2019). تمامی موجودات زنده هوازی با پارادوکسی به‌نام اکسیژن روبرو هستند یعنی ازیک‌سو نیازمند به O_2 مولکولی بوده و از سویی دیگر با وجود ضروری بودن اکسیژن، متابولیت‌های آن همانند رادیکال هیدروکسیل (OH) آنیون سوپراکسید (O_2-) و یا هیدروژن پراکسید (H_2O_2) بر عملکرد و ساختار سلول‌ها تأثیر منفی نهاده و بقاء موجود زنده را در معرض خطر قرار می‌دهند (Najafi *et al*., 2022) غشای اسپرم پرندگان به نسبت پستانداران، دارای مقادیر زیادتری از اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه می‌باشد که بیشتر فسفولیپیدهای آن را اسیدهای چرب سیرنشده‌ای مانند اسید آراشیدونیک و اسید دوکوزاتترااانوییک تشکیل می‌دهند (Cerolini *et al*., 2007). اسپرم پرندگان نسبت به پراکسیداسیون که از نشانه‌های تنش اکسیداتیو در سلول‌ها است، حساس‌تر می‌باشد. پراکسیداسیون چربی‌های غشایی باعث تخریب غشای، کم‌شدن تحرک، مهارشدن فعالیت‌های آنزیمی و ایجاد شکستگی در DNA سلول‌های اسپرم شده و در آخر باعث کم‌شدن توان باروری می‌شود (Rosenstrauch & Friedlander, 2007). ذخیره‌کردن اسپرم دام و طیور برای مدت طولانی برای به‌دست‌آوردن مزایای تلقیح مصنوعی امری است ضروری که این کار با ذخیره‌کردن اسپرم در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و منجمدکردن آن میسر می‌شود که باعث می‌شود فعالیت‌های متابولیکی اسپرم‌ها متوقف شده و باعث ذخیره‌شدن آن شود (Bailey *et al*., 2000). بررسی‌ها نشان می‌دهد که امکان استفادهٔ اسپرم طیور در روش تلقیح مصنوعی پس از ذخیره‌سازی منی به‌صورت سرد در دوره‌های کوتاه (۲۴–۱۵ ساعت) امکان‌پذیر است، ولی با افزایش دورهٔ ذخیره‌سازی باروری اسپرم طیور دچار کاهش می‌شود (Blesbois *et al*., 2005). در فرایند ذخیره‌سازی اسپرم و مرحله‌های متفاوت انجماد، عمل‌آوری و نگه‌داری گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS) تولید می‌شوند که موجب ایجاد تنش‌های شیمیایی و فیزیولوژیک در سطح غشای اسپرم می‌شود و زنده‌مانی، کیفیت و قدرت باروری اسپرم در شرایط مایع و انجماد کاهش یابد. ROSها ترکیباتی هستند واکنش‌پذیر که به‌علت وجود یک یا چند الکترون جفت نشده‌است که می‌توانند با انواع مختلفی از ماکرومولکول‌های زیستی به‌خصوص قندها، لیپیدها و DNA واکنش داده و با اکسید نمودن این ماکرومولکول‌ها موجب تنش اکسیداتیو در سلول و در آخر مرگ آن‌ها شود. ایجادکردن تعادل بین ROSها و پاک‌سازی آن‌ها به‌وسیله آنتی‌اکسیدان‌ها یک عامل مهم در زنده‌مانی سلول اسپرم و عملکرد طبیعی آن در مدت‌زمان ذخیره‌شدن و منجمدشدن آن می‌باشد. آسیب‌های حاصل از ذخیره‌سازی و انجماد روی ساختار و عملکرد سلول‌های اسپرم می‌تواند به‌دلیل آسیب رسیدن مستقیم بیشتر با شوک سرمایی مرتبط بوده که مدت کوتاهی بعد از افت دما اتفاق می‌افتد؛ ولی آسیب غیرمستقیم به‌سرعت سردسازی و نگه‌داری وابسته نبوده و تعیین مقدار آن سخت است (Bilodeau *et al*., 2000). یون سوپراکسید، هیدروکسیل، رادیکال پراکسیل، هیدروژن پراکسید و یون هیپوکلریت از ROSهاست که به‌حد زیادی واکنش‌پذیر هستند و موجب آسیب دیدن سلول‌های اسپرم می‌شود (Sikka *et al*., 1996). سلول اسپرم دارای اسیدهای چرب غیراشباع در غلظت زیاد می‌باشد که باعث پراکسیداسیون (LPO) و در آخر کاهش‌یافتن تحرک، باروری، یکپارچگی و تغییرات متابولیکی اسپرم را به‌همراه دارد. فراوری‌کردن اسپرم نیاز به اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌هایی که منشأ خارجی دارند (Bansal & Bilaspuri, 2010). در واقع آنتی اکسیدان‌ها باعث کاهش، حذف و غیر فعال‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌شوند، شرایط سلولی را به‌گونه‌ای عوض می‌کنند که حرکت و کیفیت اسپرم حفظ شود (Nazari *et al*., 2022). فناوری نانو ابزاری است که می‌تواند کمک مفیدی به بقای اسپرم در طول پردازش آن‌ها باشد. اگرچه که آن‌ها می‌توانند علاوه‌بر داشتن اثرات ضدباکتریایی برای اسپرم سمی نیز باشند (Tsakmakidis *et al*., 2021). روی یک عنصر باخاصیت آنتی‌اکسیدانی است که نقش محافظت‌کننده مهمی در برابر رادیکال‌های آزاد دارد. این عنصر در پلاسمای منی نقش بسیار مهمی در میزان تراکم و ثبات کروماتین اسپرم دارد (Powell *et al*., 2000). در بین عناصر کمیاب روی بیشترین تأثیر و ارتباط مستقیم باکیفیت منی دارد و همچنین نقش مهمی در تثبیت اجزای مختلف غشای بیولوژیکی دارد؛ همچنین عنصر روی به حفاظت مواد ژنتیکی یا کروماتین DNA موجود در هستهٔ سلول اسپرم کمک می‌کند که وجود این ساختارها برای ایجاد باروری مناسب توسط اسپرم ضروری است (Balasubramanian *et al*., 2010). نانو اکسیدروی موجب افزایش رشد و همین‌طور به‌عنوان یک عامل ضدباکتریایی و تعدیل‌کننده ایمنی سلول و تولیدمثل شناخته می‌شود (Swian *et al*., 2016). در زیست‌شناسی تولیدمثل گزارش شده‌است که نانوذرات باعث افزایش عمر اسپرم و بهبود باروری مردانه می‌شود (Falchi *et al*., 2016). نانوذرات اکسید روی بیشترین استفاده برای کاربردهای زیست‌پزشکی با سمیت کم و توانایی عبور از موانع باعث هدف‌گیری مؤثر سلول‌ها در بسیاری از بیماری‌ها را دارد (Torabi *et al*., 2017). نانوذرات در مقایسه با ذرات با اندازه معمولی اثرات بهبودیافته‌ای را نشان می‌دهند (Nel *et al*., 2006) و به نظر می‌رسد که پتانسیل نفوذ بالایی در موانع بیولوژیکی دارند (Suri et al., 2007). نانوذرات اکسید روی از جمله نانوذراتی هستند که می‌توان به مایع‌منی اضافه کرد و اثر مثبت و مفید آن در چندین مطالعه که روی اسپرم انسان (Barkhordari *et al*., 2013; Isaac *et al*., 2017)، گاو (Jahanbin *et al*., 2021)، شتر (Shahin *et al*., 2020) و گوسفند (Heidari *et al*., 2019) مشاهده شده است. مطالعات اخیر اثر محافظت‌کننده شیمیایی روی در برابر سمیت بیضه ناشی از چندین داروی ضدسرطان مانند سیکلوفسفامید، بلئومایسین، اتوپوزید و سیس پلاتین توسط خاصیت آنتی‌اکسیدانی روی و هدف قراردادن ROSها را نشان داده‌است (Razavi *et al*., 2019; Hajjar *et al*., 2020). برطبق مطالعات انجام‌شده، پژوهش حاضر صورت گرفت تا مشخص

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-04]
[DOI: 10.61186/rap.16.1.155]

گردد آیا نانو اکسیدروی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم بوقلمون در حالت مایع اثرگذار است یا خیر.

مواد و روش‌ها

محل انجام آزمایش

این پژوهش به‌مدت ۹ ماه در ایستگاه تحقیقاتی دام‌پروری و آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان واقع در ۳۶ کیلومتری شمال شرقی اهواز انجام‌گرفت.

آماده‌سازی سالن

بعد از خالی‌کردن سالن ابتدا کف و دیواره‌های سالن با مواد ضدعفونی‌کننده شستشو و دان‌خوری‌ها و آب‌خوری‌ها هم با مواد ضدعفونی‌کننده شستشو شدند. منافذ، در و پنجره‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت مسدود و ضدعفونی سالن با فرمالین و پرمنگنات انجام شد. قبل از ورود بوقلمون‌ها دان‌خوری و آب‌خوری‌ها از سقف آویزان شده و با استفاده از هواکش سعی شد تا بقایای گاز فرمالین خارج شود.

درجه حرارت نوردهی و تهویه

در مدت‌زمان انجام آزمایش جهت خنک‌کردن سالن از سیستم پدکولینگ استفاده شد و دمای سالن بین ۱۹ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت سالن بین ۵۰ تا ۷۰ درصد بود. نوردهی توسط لامپ‌های کم‌مصرف انجام شد و برنامه نوردهی شامل ۱۰ ساعت تاریکی و ۱۴ ساعت روشنایی بود. تهویه سالن توسط ۲ فن در انتهای سالن انجام می‌شد.

دان‌خوری‌ها و آب‌خوری‌ها

دان‌خوری و آب‌خوری از سقف آویزان و به‌صورت دستی پر می‌شدند. بوقلمون‌ها یک نوبت، در اول صبح و به شیوه دستی خوراک دریافت می‌کردند. ترکیب جیره قرار گرفته در اختیار پرنده در جدول ۱ آورده شده‌است.

جدول ۱- مواد خوراکی و ترکیبات شیمیایی جیره پایه

Table 1. Ingredients and composition of the base diet

مقدار Value	ترکیب شیمیایی Chemical compounds	درصد Percentage	مواد خوراکی Foods
2855	انرژی (کیلوکالری در کیلوگرم) Energy (Kcal/Kg)	61	ذرت Corn
12	پروتئین خام (درصد) Crude Protein (Percent)	11	سبوس Bran
0.83	کلسیم (درصد) Calcium (Percent)	3	یونجه Alfalfa
0.36	فسفر (درصد) Phosphorus (Percent)	9	جو Barleycorn
0.18	کلر (درصد) Chlorine (Percent)	11	سویا Soybean
0.13	سدیم (درصد) Sodium	1.3	صدف oysters
		1.2	فسفات Phosphate
		0.1	جوش‌شیرین Baking soda
		0.25	نمک Salt
		0.15	متیونین Methionine
		0.25	مکمل ویتامینی ۱ Vitamin supplement 1
		0.25	مکمل معدنی ۲ Vitamin supplement 2
		1.5	روغن Oil

۱-هر کیلوگرم جیره حاوی ۱۵۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۴ میلی‌گرم ویتامین K_3، ۲۵ میکروگرم ویتامین B_{12}، ۳۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D_3، ۷/۵ میلی‌گرم ویتامین B_2، ۵۰ میلی‌گرم ویتامین B_3، ۱۸ میلی‌گرم ویتامین B_5، ۵/۵ میلی‌گرم B_6، ۵۰ میکروگرم ویتامین B_7 بود. ۲-هر کیلوگرم جیره حاوی ۵۰ میلی‌گرم آهن، ۱۲۰ میلی‌گرم منگنز، ۱۱۰ میلی‌گرم روی، ۲ میلی‌گرم ید و ۰/۳ میلی‌گرم سلنیوم بود.

1-Each kilogram of the diet contained 1,500 international units (IU) of vitamin A, 100 IU of vitamin E, 4 mg of vitamin K_3, 25 mg of vitamin B_{12}, 3,000 IU of vitamin D_3, 7.5 mg of vitamin B_2, 50 mg of vitamin B_3, 18 mg of vitamin B_5, 5.5 mg of vitamin B_6, and 50 mg of vitamin B_7. 2- of the diet provided 50 mg of iron, 120 mg of manganese, 110 mg of zinc, 2 mg of iodine, and 0.3 mg of selenium.

وسایل مورد استفاده در آزمایش

لام، لامل، فالکون ۱۵ میلی‌لیتر، فالکون ۵۰ میلی‌لیتر، میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتر، سمپلر آبی و زرد و سفید، سرسمپلر آبی و زرد و سفید، برگه صافی، بشر، رک، ترازو ۴ صفر، میکروسکوپ، دستگاه CASA، یخچال، آب‌مقطر، سرنگ انسولین.

ساخت رقیق کننده

ابتدا تک‌تک مواد شیمیایی مورد نیاز برای ساخت رقیق‌کننده با استفاده از کاغذ مخصوص و ترازوی دیجیتال توزین، و سپس با آب‌مقطر دوبار تقطیر مخلوط و روی همزن قرار داده‌شد، تا مواد موردنظر حل و همگن شوند. به این ترتیب، رقیق‌کننده رینگر اصلاح‌شده تهیه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. مواد مورد استفاده در رقیق کننده در جدول ۲ آورده شده‌است.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-04]
[DOI: 10.61186/rap.16.1.155]

جدول ۲- ترکیبات محلول رینگر اصلاح‌شده برای رقیق‌سازی منی بوقلمون (Tabatabaei vakili *et al*., 2019)
Table 2. Modified Ringer's solution composition for dilution of turkey semen

اجزای رقیق‌کننده Diluting components	مقدار اجزا Amount of components
کلرید سدیم Sodium chloride	6.8 gr
کلرید پتاسیم Potassium chloride	1.73 gr
کلرید کلسیم Calcium chloride	0.64 gr
سولفات منیزیم Magnesium sulphate	0.25 gr
بی‌کربنات سدیم Sodium bicarbonate	2.45 gr
اب مقطر Distilled water	1000 gr

پرنده‌ها و نمونه‌گیری

طرح حاضر با استفاده از ۱۸ قطعه بوقلمون نژاد Bronze turkey در سن ۷ ماهگی انجام‌شد. بوقلمون‌ها در سطح بستر پرورش داده‌شده و به‌مدت ۲ هفته عادت‌دهی شدند. نمونه‌های منی ۲ بار در هفته و به‌مدت ۵ هفته با استفاده از روش ماساژ پشتی-شکمی جمع‌آوری شدند.

منی جمع‌آوری شده از بوقلمون‌ها به آزمایشگاه منتقل و پس از مخلوط‌کردن آن‌ها باهم به‌منظور از بین بردن اثرات فردی، رقیق‌سازی شده و به ۴ گروه تیماری تقسیم شدند و مقادیر مختلف نانو اکسیدروی (صفر، ۵۰ میکروگرم، ۱۰۰ میکروگرم و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به رقیق‌کننده‌ها اضافه شد. در زمان‌های مختلف نگه‌داری منی رقیق شده حاوی تیمارهای آزمایشی (صفر، ۱۲، ۲۴، ۴۸ ساعت) به‌صورت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، فراسنجه‌های کیفی منی بررسی شد. ارزیابی فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل (درصد اسپرم‌های با تحرک کل و پیش‌رونده، درصد زنده‌مانی، درصد ناهنجاری مورفولوژی و سلامت غشای سلول) انجام شد.

ارزیابی فراسنجه‌های کیفی اسپرم

جنبایی‌کل و جنبایی پیش‌رونده

برای ارزیابی فراسنجه‌های تحرک کل و تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها، پنج میکرولیتر از منی رقیق‌شده روی لام قرار داده‌شده و توسط لامل پوشش داده شد. تحرک کل و تحرک پیش‌رونده با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی x۴۰۰ به شیوه چشمی ارزیابی شد و در هر اسلاید تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش شدند (Tabatabaei vakili *et al*., 2019).

ارزیابی سلامت غشاء پلاسمایی اسپرم‌ها

برای ارزیابی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم‌ها از آزمون تورم هایپو اسموتیک (HOST) استفاده شد. اسپرم‌های زنده‌ای که دارای غشا پلاسمایی سالم هستند، حین قرارگیری در مایع هایپو اسموتیک (HOST) در اثر انتشار آب به داخل سیتوپلاسم متورم می‌شود. اسپرم‌هایی با غشای پلاسمایی آسیب‌دیده توانایی نگه‌داری شیب اسمزی را در اطراف غشا ندارند. برای انجام این آزمون، ۱۰ میکرولیتر نمونه‌های منی با ۱۰۰ میکرولیتر محلول هایپو اسموتیک (۱ گرم سدیم سیترات در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب با فشار اسمزی معادل ۱۰۰ میلی‌اسمل در کیلوگرم، pH=۷) مخلوط و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه نگه‌داری شد. سپس یک قطره از آن روی لام ریخته و با لامل پوشش داده‌شد و زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی x۴۰۰ مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت درصد اسپرم‌های با دم و ناحیه میانی پیچ‌خورده یا متورم به‌عنوان غشایی پلاسمایی سالم تعیین شد (Tabatabaei vakili *et al*., 2019).

ارزیابی زنده‌مانی اسپرم‌ها

این ارزیابی به‌وسیله روش رنگ‌آمیزی ائوزین نیگروزین انجام‌شد که ترکیبات آن شامل رنگ ائوزین (۱/۶۷ گرم در لیتر)، رنگ نیگروزین (۱۰۰ گرم در لیتر) و سیترات سدیم (۲۹ گرم در لیتر) است. برای ارزیابی، منی رقیق‌شده با نسبت یک‌به‌یک با رنگ ائوزین-نیگروزین آمیخته‌شد و سپس روی لام توسط لام دیگری با زاویه ۴۵ درجه گسترش داده‌شد، پس از خشک‌شدن، درصد اسپرم‌های زنده با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم در زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی x۱۰۰۰ با استفاده از روغن اینرسی انجام‌شد. اسپرم‌هایی که رنگ نگرفته بودند، به‌عنوان اسپرم‌های زنده و اسپرم‌هایی که رنگ را جذب کرده بودند، به‌عنوان اسپرم مرده در نظر گرفته شدند (Tabatabaei vakili *et al*., 2019).

ناهنجاری مورفولوژیکی اسپرم

برای بررسی درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم‌ها، با شمردن حداقل ۲۰۰ عدد اسپرم در هر اسلاید رنگ‌آمیزی‌شده که شامل، اسپرم‌هایی با سر ناقص، سر جدا شده، سر دوتایی، دم پیچ‌خورده، دم دوتایی و دم جداشده، به‌عنوان اسپرم‌های دارای ناهنجاری در نظر گرفته می‌شوند (Tabatabaei vakili *et al*., 2019).

آنالیز آماری

داده‌ها با کمک نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۴) و با استفاده از رویه GLM آنالیز شدند. پیش از انجام آنالیز، نرمال بودن توزیع داده‌های آزمایشی با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk و رویه UNIVARIATE مورد آزمون قرار گرفته شدند.

مدل آماری به‌کاررفته عبارت است از:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$ رابطه (۱)

که در آن:

Y_{ij}= مقدار هر مشاهده، μ= اثر میانگین، T_i= اثر تیمارهای آزمایشی، e_{ij}= اثرات باقیمانده

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-04]
[DOI: 10.61186/rap.16.1.155]

نتایج و بحث

تحرک کل و پیش‌رونده

نتایج مربوط به اثر سطوح مختلف نانو اکسیدروی بر درصد تحرک کل و پیش‌رونده در طی زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی در جدول ۳ و ۴ گزارش شده‌است. نتایج پژوهش نشان می‌دهند افزودن سطوح مختلف (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم) نانو اکسیدروی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت باعث تفاوت معنی‌داری بر جنبایی کل و پیش‌رونده اسپرم نسبت به تیمار شاهد می‌شود (p<۰/۰۵). در تمام ساعت‌های اندازه‌گیری‌شده بالاترین میزان تحرک اسپرم در سطح ۱۰۰ میکروگرم نانو اکسیدروی و کمترین میزان در تیمار شاهد مشاهده شد. در کل نتایج نشان می‌دهند با افزایش طول زمان میزان تحرک اسپرم به‌صورت خطی در تمام تیمارها کاهش می‌یابد. (p<۰/۰۵).

جدول ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف نانو اکسیدروی بر درصد تحرک کل اسپرم بوقلمون طی نگهداری منی به‌حالت مایع

Table 3. Effect of different concentrations of zinc nano oxide extract on total motility percent of turkey spermatozoa during liquid storage of semen

ساعت‌های ذخیره‌سازی Hours of storage				غلظت‌های نانو اکسیدروی (میکروگرم در میلی‌لیتر) concentrations of zinc nano oxide (µg/ml)
48	24	12	0	
41.25[d]	56.62[d]	75.25	84.87	0
44.50[c]	58.75[c]	76.12	85.62	50
53.00[a]	64.12[a]	79.50	84.87	100
50.87[b]	61.37[b]	77.75	85.00	200
1.066	1.624	0.937	0.179	SEM
0.0001	0.0001	0.1376	0.1614	P-value

میانگین‌های با حروف نامشابه در هر ستون دارای اختلاف آماری معنی‌داری هستند (p<۰/۰۵).

Means with different letters in each column are significantly different (p < 0.05).

جدول ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف نانو اکسیدروی بر درصد تحرک پیش‌رونده اسپرم بوقلمون طی نگهداری منی به‌حالت مایع

Table 4. Effect of different concentrations of zinc nano oxide extract on progressive motility percent of turkey spermatozoa during liquid storage of semen

ساعت‌های ذخیره‌سازی Hours of storage				غلظت‌های نانو اکسیدروی (میکروگرم در میلی‌لیتر) concentrations of zinc nano oxide (µg/ml)
48	24	12	0	
14.12[d]	18.25[d]	32.12	36.50	0
16.25[c]	21.37[c]	32.62	37.25	50
21.00[a]	26.00[a]	33.87	36.50	100
19.75[b]	24.62[b]	33.12	36.62	200
0.899	0.173	0.373	0.179	SEM
0.0001	0.0001	0.1649	0.1978	P-value

میانگین‌های با حروف نامشابه در هر ستون دارای اختلاف آماری معنی‌داری هستند (p<۰/۰۵).

Means with different letters in each column are significantly different (p < 0.05).

زنده‌مانی

نتایج مربوط به اثر سطوح مختلف نانو اکسیدروی بر زنده‌مانی طی زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی در جدول ۵ گزارش شده‌است. نتایج پژوهش نشان می‌دهند که افزودن سطوح مختلف (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم) نانو اکسیدروی بر درصد زنده‌مانی اسپرم بوقلمون اثر معنی‌داری داشته‌است (p<۰/۰۵). به‌طوری‌که در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت سطوح مختلف نانو اکسیدروی موجب بهبود میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها نسبت به تیمار شاهد شد و با سپری شدن زمان درصد زنده‌مانی اسپرم نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت (p<۰/۰۵).

جدول ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف نانو اکسیدروی بر درصد زنده‌مانی اسپرم بوقلمون طی نگهداری منی به‌حالت مایع

Table 5. Effect of different concentrations of zinc nano oxide extract on viability percent of turkey spermatozoa during liquid storage of semen

ساعت‌های ذخیره‌سازی Hours of storage				غلظت‌های نانو اکسیدروی (میکروگرم در میلی‌لیتر) concentrations of zinc nano oxide (µg/ml)
48	24	12	0	
33.87[d]	57.12[d]	85.25	90.62	0
36.50[c]	59.50[c]	86.12	90.37	50
53.75[a]	70.75[a]	87.75	90.50	100
50.75[b]	68.62[b]	86.75	90.50	200
4.950	3.347	0.526	0.050	SEM
0.0001	0.0001	0.7830	0.8243	P-value

میانگین‌های با حروف نامشابه در هر ستون دارای اختلاف آماری معنی‌داری هستند (p<۰/۰۵).

Means with different letter
s in each column are significantly different (p < 0.05).

سلامت غشای

نتایج مربوط به اثر سطوح مختلف نانو اکسیدروی بر سلامت غشای اسپرم طی زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی در جدول ۶ گزارش شده‌است. تا ۱۲ ساعت پس از نگهداری منی در بوقلمون به‌حالت مایع، درصد اسپرم‌های با غشای پلاسمای سالم تحت تاثیر تیمارهای آزمایشگاهی قرار نگرفتند. اما با گذشت زمان یعنی ۲۴ و ۴۸ ساعت، هر سه سطح از تیمارهای آزمایشگاهی به‌طور معنی‌داری موجب حفظ سلامت غشای پلاسمایی اسپرم‌ها نسبت به تیمار شاهد شدند (P<۰/۰۵).

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-04]
[DOI: 10.61186/rap.16.1.155]

جدول ۶- تأثیر غلظت‌های مختلف نانو اکسیدروی بر درصد سلامت غشای اسپرم بوقلمون طی نگهداری منی به‌حالت مایع
Table 6. Effect of different concentrations of zinc nano oxide extract on membrane integrity percent of turkey spermatozoa during liquid storage of semen

غلظت‌های نانو اکسیدروی (میکروگرم در میلی‌لیتر) concentrations of zinc nano oxide (µg/ml)	ساعت‌های ذخیره‌سازی Hours of storage			
	0	12	24	48
0	90.50	85.25	61.87[c]	40.12[d]
50	90.62	86.25	65.87[b]	43.75[c]
100	90.25	88.50	74.37[a]	55.62[a]
200	90.75	87.25	73.12[a]	52.87[b]
SEM	0.106	0.695	2.976	3.673
P-value	0.2401	0.2640	0.0001	0.0001

میانگین‌های با حروف نامشابه در هر ستون دارای اختلاف آماری معنی‌داری هستند (p<۰/۰۵).
Means with different letters in each column are significantly different ($p < 0.05$).

ناهنجاری اسپرم

نتایج مربوط به اثر سطوح مختلف نانو اکسیدروی بر درصد ناهنجاری اسپرم طی زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی در جدول ۷ گزارش شده‌است. سطوح مختلف نانو اکسیدروی بعد از گذشت ۲۴ ساعت از فرآیند سردسازی منی به‌حالت مایع توانستند اثرات خود را بر درصد ناهنجاری‌های اسپرم‌ها نشان دهند. به‌طوری‌که در این زمان کمترین میزان ناهنجاری مربوط به سطح ۱۰۰ میکروگرم نانواکسیدروی بود. با سپری شدن زمان و در ۴۸ ساعت سطوح ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰ میکروگرم نانو اکسیدروی به ترتیب درصد اسپرم‌هایی با ناهنجاری کمتری نسبت به تیمار شاهد داشتند (p<۰/۰۵)

جدول ۷- تأثیر غلظت‌های مختلف نانو اکسید روی بر درصد ناهنجاری اسپرم بوقلمون طی نگهداری منی به‌حالت مایع
Table 7. Effect of different concentrations of zinc nano oxide extract on morphological defect percent of turkey spermatozoa during liquid storage of semen

غلظت‌های نانو اکسیدروی (میکروگرم در میلی‌لیتر) concentrations of zinc nano oxide (µg/ml)	ساعت‌های ذخیره‌سازی Hours of storage			
	0	12	24	48
0	9.62	13.75	20.37[a]	25.37[a]
50	9.37	13.12	18.87[b]	24.62[a]
100	10.00	12.25	17.37[c]	22.37[c]
200	10.00	12.75	18.00[c]	23.62[b]
SEM	0.153	0.316	0.627	0.649
P-value	0.2834	0.2930	0.0001	0.0001

میانگین‌های با حروف نامشابه در هر ستون دارای اختلاف آماری معنی‌داری هستند (p<۰/۰۵).
Means with different letters in each column are significantly different ($p < 0.05$).

لقاح مصنوعی برای تولیدمثل موفق در بوقلمون‌ها حیاتی می‌باشد. تلقیح با مایع‌منی تازه بهترین نتایج را به‌همراه دارد، اما تکنیک‌های مدرن می‌توانند این کار را برای حفظ زنده ماندن مایع‌منی تا ۴۸ ساعت انجام دهند (Laffaldano *et al.*, 2016). رادیکال‌های آزاد گونه‌های شیمیایی (اتم‌ها، مولکول‌ها یا یون‌ها) هستند که حاوی یک یا چند الکترون جفت‌نشده در اوربیتال‌های خارجی خود هستند و عموماً واکنش‌پذیری قابل توجهی از خود نشان می‌دهند. رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌آسانی با همه ماکرومولکول‌های بیولوژیکی واکنش می‌دهند و باعث اکسیداسیون و از دست دادن عملکرد آن‌ها می‌شوند (Di meo *et al.*, 2020). مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده فیزیولوژیکی که به‌عنوان آپوپتوز شناخته می‌شود، از طریق مسیرهای سیگنال‌دهی و تنظیمی مختلف رخ می‌دهد. این فرآیند شامل قطعه‌قطعه‌شدن DNA است. آپوپتوز هم‌چنین می‌تواند توسط شکستگی‌های DNA دو رشته‌ای ناشی از ROSایجاد شود. ROSها می‌توانند غشاهای میتوکندری را مختل کنند و باعث آزاد شدن سیتوکروم C در آن‌ها شوند که کاسپازهای آپوپتوز را فعال می‌کنند (Kuroda *et al.*, 2020). برخی از واکنش‌ها، مانند ظرفیت‌دار شدن اسپرم و واکنش‌های آکروزومی نیاز به سطوح متعادلROS دارند. با این‌حال، زمانی که میزان تولید ROS از دفاع آنتی‌اکسیدانی طبیعی سلول فراتر رود، اثر مضری به‌نام استرس اکسیداتیو ایجاد می‌کند. استرس اکسیداتیو منجربه اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و نوکلئوتیدها می‌شود. تولید ROS با عوامل مختلفی از جمله وجود لکوسیت‌ها، اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی و نابالغ، سانتریفیوژ نمونه‌ها و تغییرات غلظت اکسیژن، pH و دما افزایش می‌یابد. آنتی‌اکسیدان‌ها با تنظیم آنزیم‌های مرتبط با ROS و حفظ سلامتی، از سلول‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند (Sundaram *et al.*, 2021). روی نقش مهمی در زنده ماندن و تحرک اسپرم دارد. روی بر متابولیسم پروتئین، سنتز اسید نوکلئیک و تثبیت غشای اسپرم تأثیر می‌گذارد. این ریزعنصر با جلوگیری از تولید گونه‌های اکسیژن فعال از اسپرم‌ها و لکوسیت‌های معیوب و مهار پراکسیداسیون لیپیدی، اثرات آنتی‌اکسیدانی را ارائه می‌کند. و سطح آنتی‌بادی‌های ضد اسپرم را کاهش می‌دهد (Mahboub *et al.*, 2020). کروماتین اسپرم انسان حاوی یک یون روی در هر مولکول پروتامین در هر چرخش DNA است. بنابراین، یون‌های روی احتمالاً به تثبیت کروماتین اسپرم کمک می‌کنند. سطوح پایین روی در پلاسمای منی به‌طور قابل توجهی پتانسیل تولیدمثلی را به خطر می‌اندازد و به تکه‌تکه شدن DNA اسپرم کمک می‌کند (Isaac *et al.*, 2017). این عنصر در عملکردهای بیولوژیکی متعددی نقش دارد و به‌دلیل قابلیت اتصال به بیش از ۳۰۰ آنزیم و بیش از ۲۰۰۰ عامل رونویسی، به‌عنوان یک عنصر کمیاب چندمنظوره در نظر گرفته می‌شود. نقش آن در مسیرهای بیوشیمیایی و عملکردهای سلولی، مانند پاسخ به استرس اکسیداتیو، هموستاز،

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-04]
[DOI: 10.61186/rap.16.1.155]

پاسخ‌های ایمنی، تکثیر DNA، ترمیم آسیب DNA، پیشرفت چرخه سلولی، آپوپتوز و پیری قابل توجه است (Ackland *et al*., 2016). مقدار بیشتر روی در پروستات و میزان کمتر آن در غده سمینال وزیکول منشاء می‌گیرد. تحقیقات نشان می‌دهد آلبومین و روی از پروستات ترشح شده و سبب حفاظت اسپرم و سایر سلول‌ها می‌گردند. عنصر روی در مایع پلاسمای منی نیز وجود دارد (Saleem *et al*., 2020). برخی تحقیقات نشان دادند که عنصر روی برای عملکرد طبیعی محور گنادی هیپوتالاموس-هیپوفیزی نیاز است و نقش مهمی در پتانسیل تولیدمثلی مردان دارد (Fallah *et al*., 2018). نانوذرات اثرات مشابهی با آنتی‌بیوتیک‌ها دارند از اسپرم در برابر باکتری‌ها محافظت می‌کنند و تحرک و زنده ماندن اسپرم را به‌روشی وابسته به دوز بهبود می‌بخشند (Hill *et al*., 2017). به‌دلیل سمیت کم و زیست‌فراهمی بالا، نانوذرات می‌توانند به‌طور مؤثر برای حفظ مایع‌منی استفاده شوند. تأثیر نانوذرات توسط خواص شیمیایی ترکیب اعمال‌شده (اندازه، بارسطحی، پوشش) و همچنین ویژگی سیستم بیولوژیکی (گونه‌های جانوری، بافت و تنوع سلولی) تعیین می‌شود (Falchi *et al*., 2018). اندازه‌ی کوچک و مساحت سطحی بالای نانوذرات سبب افزایش فعالیت شیمیایی آن‌ها شده و به آن‌ها اجازه می‌دهد که به‌عنوان یک کاتالیست با کارایی بالا عمل نمایند (Fallah *et al*., 2018). مطالعات، خواص تعدیل‌کننده ایمنی، محرک رشد و ضدمیکروبی کارآمد نانوذرات روی را در پرندگان نشان داده‌است. مطالعات نشان داده‌اند که نانوذرات اثرات آنتی‌اکسیدانی روی مایع‌منی گونه‌های حیوانی منتخب از جمله قوچ، گاو نر، موش صحرایی و خروس دارند (Basioura *et al*., 2020). در مقایسه با روی زیست فراهمی بیشتری ارائه می‌دهند و نتایج بهتری را از نظر بهره‌وری و رفاه و در نتیجه کاهش آسیب‌های زیست‌محیطی در بخش طیور ایجاد می‌کنند (Fatima *et al*., 2023). نانوذرات اکسیدروی قادر به محافظت و تثبیت یکپارچگی غشای سلولی در برابر آسیب اکسیداتیو با کاهش سطح مالون دی‌آلدئید هستند. افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز و کاهش غلظت مالون دی‌آلدئید در بافت بیضه موش‌های آزمایش شده با اکسیدروی نشان داده شده‌است (Anan *et al*., 2018). نانوذرات اکسیدروی اثر محافظتی در تغییرات ساختاری بیضه و ناهنجاری‌های اسپرم دارند (Mohamed *et al*., 2019). نتایج نشان دادند که واکوئلی شدن در اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی و فضاهای نامنظم بین سلول‌های اسپرماتوژن با اثر نانواکسیدروی ضعیف شدند (Erfani *et al*., 2021). ایزاک و همکاران (Isaac *et al*., 2017) دریافتند نانو اکسیدروی (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) نوعی لایه محافظ در اطراف غشای پلاسمایی اسپرم یخ‌زده انسان تشکیل می‌دهد. طبق مشاهدات ما سطوح مختلف نانواکسیدروی موجب افزایش جنبایی کل و پیش‌رونده، درصد زنده‌مانی و سلامت غشای و تفاوت معنی‌دار در کاهش ناهنجاری نسبت به تیمار شاهد شد. خدایی مطلق و همکاران (Khdoaei-Motlagh *et al*., 2021) گزارش کردند افزودن سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم نانواکسیدروی به محیط انجماد مایع‌منی خروس و سپس یخ گشایی آن باعث افزایش جنبایی کل و پیش‌رونده شد. حضور نانوذرات اکسیدروی در محیط به‌طور مستقیم با تحرک اسپرم در ارتباط می‌باشد. حضور نانوذرات اکسید روی باعث کاهش همزمان MMP[1] و فعالیت میتوکندری می‌شود (Orzołek *et al*., 2021). همچنین آن‌ها هنگام افزودن نانوذرات اکسیدروی به رقیق‌کننده مایع‌منی مشاهده کردند که اسپرم‌ها زنده بودند اما «غیرفعال» و متحرک نبودند؛ که تأیید می‌کند روی از تحرک اسپرم بوقلمون با سرکوب جذب اکسیژن جلوگیری می‌کند. امان فایز و همکاران (Fayez *et al*., 2022) نیز گزارش کردند افزودن سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم نانواکسید روی به محیط انجماد اسپرم اپیدیدیم سگ و یخ‌گشایی آن سبب افزایش جنبایی کل اسپرم نسبت به تیمار شاهد شد. پژوهش هالو و همکاران (Halo *et al*., 2021) اثرات قابل توجه نانوذرات اکسیدروی بر تحرک کل، زنده ماندن و یکپارچگی غشای سلولی اسپرم خرگوش ذخیره‌شده را نشان داد. با این‌حال، آن‌ها هم‌چنین نشان دادند که سمیت اسپرم اکسیدروی به‌شدت وابسته به دوز و زمان است. تیمار نانوذرات روی یکپارچگی غشای پلاسمایی و فعالیت میتوکندری را بهبود می‌بخشد و به‌طور همزمان سطح مالون دی‌آلدئید را در اسپرم گاو تحت فرآیندهای انجماد-ذوب کاهش می‌دهد. یک بررسی جالب توسط شاهین و همکاران (Shahin *et al*., 2020) انجام‌شد که متوجه شدند نانوذرات افزوده‌شده به رقیق‌کننده مایع‌منی، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و یکپارچگی غشاء، در هر دو اسپرم سرد سده و منجمد شده اسپرم اپیدیدیم شتر را بهبود می‌بخشد. در مورد منی منجمدشده، روی نیز به‌شدت درجه آپوپتوز را محدود کرد و مورفولوژی را بهبود بخشید. نشان داده شده است که دوز بهینه نانو اکسیدروی بین ۰/۷۷_۱/۲۷ میکروگرم در میلی‌لیتر است، در حالی‌که دوزهای بالاتر شاخص‌های کیفیت اسپرم پس از ذوب را به خطر انداختند. با این‌حال، سطوح بالای روی در پلاسمای‌منی می‌تواند فعالیت اسپرم را کاهش دهد. وقتی روی در پلاسمای منی وجود دارد، اسپرم‌ها در حالت نسبتاً ساکن نگه داشته‌می‌شوند که باعث ذخیره انرژی قبل از لقاح می‌شود. در پژوهش الکساندرا اورزوتک و همکاران (Orzołek *et al*., 2021) بیان‌شد تحرک اسپرم می‌تواند به‌طور غیرمستقیم مرتبط باشد با مقدار اکسیدنیتریک تولیدشده، که وجود نانوذرات روی در محیط باعث تولید اکسیدنیتریک در مدت‌زمان طولانی، و سبب تحرک اسپرم شد.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه مشاهده شد افزودن نانو اکسیدروی به اسپرم رقیق‌سازی شده به‌مدت ۴۸ ساعت ذخیره‌سازی باعث بهبود در فراسنجه‌های کیفی اسپرم بوقلمون شد. نانو اکسیدروی سبب بهبود در جنبایی کل و پیش‌رونده و همچنین درصد سلامت غشا اسپرم و درصد زنده‌مانی نسبت به تیمار شاهد شد.

[1] Mitochondrial membrane potential

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-04]
[DOI: 10.61186/rap.16.1.155]

References

Ackland, M. L., & Michalczyk, A. A. (2016). Zinc and infant nutrition. Archives of Biochemistry and *Biophysics*, 611, 51–57. https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.06.011

Anan, H. H., Zidan, R. A., Abd EL-Baset, S. A., & Ali, M. M. (2018). Ameliorative effect of zinc oxide nanoparticles on cyclophosphamide induced testicular injury in adult rat. *Tissue and Cell*, 54, 80–93. https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.08.006

Bailey, J. L., Blodeau, J., & Cormier, N. (2000). Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon Minireview. *Journal of Andrology*, 21(1), 1–7. Portico. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03268.x

Balasubramanian, S. K., Jittiwat, J., Manikandan, J., Ong, C.-N., Yu, L. E., & Ong, W.-Y. (2010). Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials*, 31(8), 2034–2042. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.079

Bansal, A. K., & Bilaspuri, G. S. (2011). Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International*, 2011, 1–7. https://doi.org/10.4061/2011/686137

Barkhordari, A., Hekmatimoghaddam, S., Jebal, I.A., Khalili, M.A., Talebi, A. and Noorani, M. (2013). Effect of zinc oxide nanoparticles on viability of human spermatozoa. Iran. *Journal. of Reprod*, Med. 11, 767–771. https://civilica.com/doc/488932

Basioura, A., Tsakmakidis, I. A., Martinez, E. A., Roca, J., Li, J., Molina, M. F., Theodoridis, A., Boscos, C. M., & Parrilla, I. (2020). Effect of astaxanthin in extenders on sperm quality and functional variables of frozen-thawed boar semen. *Animal Reproduction Science*, 218, 106478. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106478

Bilodeau, J. F., Chatterjee, S., Sirard, M.A. and Gagnon, C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, 55(3): 282–288. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3%3C282::AID-MRD6%3E3.0.CO;2-7

Blesbois, E., Grasseau, I., & Seigneurin, F. (2005). Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction*, 129(3), 371–378. https://doi.org/10.1530/rep.1.00454

Cerolini, S., Zaniboni, L., Maldjian, A., & Gliozzi, T. (2006). Effect of docosahexaenoic acid and α-tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Theriogenology*, 66(4), 877–886. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.022

Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. Oxidative *Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–32. https://doi.org/10.1155/2020/9829176

Erfani Majd, N., Hajirahimi, A., Tabandeh, M. R., & Molaei, R. (2021). Protective effects of green and chemical zinc oxide nanoparticles on testis histology, sperm parameters, oxidative stress markers and androgen production in rats treated with cisplatin. *Cell and Tissue Research*, 384(2), 561–575. https://doi.org/10.1007/s00441-020-03350-2

Falchi, L., Bogliolo, L., Galleri, G., Ariu, F., Zedda, M. T., Pinna, A., Malfatti, L., Innocenzi, P., & Ledda, S. (2016). Cerium dioxide nanoparticles did not alter the functional and morphologic characteristics of ram sperm during short-term exposure. *Theriogenology*, 85(7), 1274-1281.e3. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.011

Falchi, L., Khalil, W. A., Hassan, M., & Marei, W. F. A. (2018). Perspectives of nanotechnology in male fertility and sperm function. International *Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(2), 265–269. https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.09.001

Fallah A, Mohammad-Hasani A, Colagar AH. (2018). Zinc is an essential element for male fertility: a review of Zn roles in men's health, germination, sperm quality, and fertilization. *Journal of Reproduction & Infertility*, 19(2):69-81. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc6010824/

Fatima, A., Zaheer, T., Pal, K., Abbas, R. Z., Akhtar, T., Ali, S., & Mahmood, M. S. (2023). Zinc Oxide Nanoparticles Significant Role in Poultry and Novel Toxicological Mechanisms. Biological *Trace Element Research*, 202(1), 268–290. https://doi.org/10.1007/s12011-023-03651-x

Fayez, E., El Sayed, M., Rawash, Z. M., & Salama, A. (2023). Influence of the Addition of Zinc Oxide Nanoparticles to Cryopreservation Medium for Dog Epididymal Spermatozoa. *Topics in Companion Animal Medicine*, 52, 100736. https://doi.org/10.1016/j.tcam.2022.100736

Hajjar, T., Soleymani, F. and Vatanchian, M. (2020). Protective Effect of Vitamin C and Zinc as an Antioxidant Against Chemotherapy-Induced Male Reproductive Toxicity. *Journal of Medicine and Life*, 13 (2), 138–143. https://doi.org/10.25122%2Fjml-2019-0107

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-04]

[DOI: 10.61186/rap.16.1.155]

Halo Jr, M., Bułka, K., Antos, P. A., Greń, A., Slanina, T., Ondruška, Ľ., Tokárová, K., Massányi, M., Formicki, G., Halo, M., & Massányi, P. (2021). The effect of ZnO nanoparticles on rabbit spermatozoa motility and viability parameters in vitro. Saudi *Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7450–7454. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.045

Heidari, J., Seifdavati, J., Mohebodini, H., Sharifi, R.S., Benemar, H.A., (2019). Effect of nano zinc oxide on post-thaw variables and oxidative status of Moghani ram semen. *Kafkas Univ*, Vet. Fak. Derg. 25, 71–76. https://doi.org/10.9775/kvfd.2018.20349

Hill, E. K., & Li, J. (2017). Current and future prospects for nanotechnology in animal production. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1). https://doi.org/10.1186/s40104-017-0157-5

Isaac, A. V., Kumari, S., Nair, R., Urs, D. R., Salian, S. R., Kalthur, G., Adiga, S. K., Manikkath, J., Mutalik, S., Sachdev, D., & Pasricha, R. (2017). Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation medium minimizes the freeze-thaw-induced damage to spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 494(3–4), 656–662. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.112

Isaac, M., Raibaut, L., Cepeda, C., Roux, A., Boturyn, D., Eliseeva, S. V., Petoud, S., & Sénèque, O. (2017). Luminescent Zinc Fingers: Zn-Responsive Neodymium Near-Infrared Emission in Water. Chemistry – *A European Journal*, 23(46), 10992–10996. Portico. https://doi.org/10.1002/chem.201703089

Jahanbin, R., Yazdanshenas, P., Rahimi, M., Hajarizadeh, A., Tvrda, E., Nazari, S. A., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., & Ghanem, N. (2020). In Vivo and In Vitro Evaluation of Bull Semen Processed with Zinc (Zn) Nanoparticles. *Biological Trace Element Research*, 199(1), 126–135. https://doi.org/10.1007/s12011-020-02153-4

Kazemizadeh, A., Zare Shahneh, A., Zeinoaldini, S., Yousefi, A. R., Mehrabani Yeganeh, H., Ansari Pirsaraei, Z., & Akhlaghi, A. (2019). Effects of dietary curcumin supplementation on seminal quality indices and fertility rate in broiler breeder roosters. *British Poultry Science*, 60(3), 256–264. https://doi.org/10.1080/00071668.2019.1571165

Khodaei-Motlagh, M., Masoudi, R., Karimi-Sabet, M. J., & Hatefi, A. (2022). Supplementation of sperm cooling medium with Zinc and Zinc oxide nanoparticles preserves rooster sperm quality and fertility potential. *Theriogenology*, 183, 36–40. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.02.015

Kuroda, S., Takeshima, T., Takeshima, K., Usui, K., Yasuda, K., Sanjo, H., Kawahara, T., Uemura, H., Murase, M., & Yumura, Y. (2020). Early and late paternal effects of reactive oxygen species in semen on embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 66(2), 122–128. https://doi.org/10.1080/19396368.2020.1720865

Iaffaldano, N., Di Iorio, M., Miranda, M., Zaniboni, L., Manchisi, A., & Cerolini, S. (2016). Cryopreserving turkey semen in straws and nitrogen vapour using DMSO or DMA: effects of cryoprotectant concentration, freezing rate and thawing rate on post-thaw semen quality. *British Poultry Science*, 57(2), 264–270. https://doi.org/10.1080/00071668.2016.1148261

Mahboub, H., Shahin, K., Zaglool, A., Roushdy, E., & Ahmed, S. (2020). Efficacy of nano zinc oxide dietary supplements on growth performance, immunomodulation and disease resistance of African catfish Clarias gariepinus. Diseases of *Aquatic Organisms*, 142, 147–160. https://doi.org/10.3354/dao03531

Mohamed, M.Y., Abd El-Hafeez, A.M. and Shaarawy, A.M. (2019). Influence of adding different energy sources to the bull and ram spermatozoa exposed to different refrigerating times. Egypt. *Journal of. Sheep Goats Sciences*., 14(2): 1-18. https://dx.doi.org/10.21608/ejsgs.2019.56661

Najafi, abouzar, Daghigh Kia, H., Mehdipour, M., & Mohammadi, H. (2022). Improving the Quality of Rooster Sperm during Storage at 4 °C by adding Quercetin in the form of nano-Liposomes and NLC in a Diluting Medium. *Research on Animal Production*, 13(36), 104–113. http://dx.doi.org/10.52547/rap.13.36.104

Nazari, M., Daghigh Kia, H., & Najafi, A. (2022). The Effect of using Different Levels of Luteolin on Reducing Malondialdehyde Content and Increasing the Motility and Viability of Ross 308 Rooster Sperm during Cryopreservation and Thawing Process. *Research on Animal Production*, 13(35), 100–108. http://dx.doi.org/10.52547/rap.13.35.100

Nel, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N. (2006). Toxic *Potential of Materials at the Nanolevel. Science*, 311(5761), 622–627. https://doi.org/10.1126/science.1114397

Orzołek, A., Rafalska, K. T., Otowska, W. A., Kordan, W., Korzekwa, A. J., & Kozłowski, K. (2021). Influence of Zinc and Manganese Nanoparticles on Selected Parameters of Turkey Spermatozoa Stored in a Liquid State at 4 °C. *Animals*, 11(11), 3289. https://doi.org/10.3390/ani11113289

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-04]

[DOI: 10.61186/rap.16.1.155]

Powell, S. R. (2000). The Antioxidant Properties of Zinc. The *Journal of Nutrition*, 130(5), 1447S-1454S. https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1447S

Razavi, S.R., Khadivi, F., Hashemi, F. and Bakhtiari, A. (2019). Effect of zinc on spermatogenesis and sperm chromatin condensation in bleomycin, etoposide, cisplatin treated rats. *Cell Journal* (*Yakhteh*), 20 (4), 521. https://doi.org/10.22074%2Fcellj.2019.5522

Rosenstrauch, A., Allan Degen, A., & Friedländer, M. (1994). Spermatozoa Retention by Sertoli Cells during the Decline in Fertility in Aging Roosters1. *Biology of Reproduction*, 50(1), 129–136. https://doi.org/10.1095/biolreprod50.1.129

Saleem, T. H., Okasha, M., Ibrahim, H. M., Abu El-Hamd, M., Fayed, H. M., & Hassan, M. H. (2020). Biochemical Assessments of Seminal Plasma Zinc, Testis-Expressed Sequence 101 and Free Amino Acids and Their Correlations with Reproductive Hormones in Male Infertility. *Biological Trace Element Research*, 199(5), 1729–1742. https://doi.org/10.1007/s12011-020-02310-9

Shahin, M. A., Khalil, W. A., Saadeldin, I. M., Swelum, A. A.-A., & El-Harairy, M. A. (2020). Comparison between the Effects of Adding Vitamins, Trace Elements, and Nanoparticles to SHOTOR Extender on the Cryopreservation of *Dromedary Camel Epididymal Spermatozoa*. *Animals*, 10(1), 78. https://doi.org/10.3390/ani10010078

Sikka, S. C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience*, 1(5), e78-86. https://doi.org/10.2741/a146

Sundaram Sanjay, S., & Shukla, A. K. (2021). Free Radicals Versus Antioxidants. Potential Therapeutic *Applications of Nano-Antioxidants*, 1–17. https://doi.org/10.1007/978-981-16-1143-8_1

Suri, S. S., Fenniri, H., & Singh, B. (2007). Nanotechnology-based drug delivery systems. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 2(1). https://doi.org/10.1186/1745-6673-2-16

Swain, P. S., Rao, S. B. N., Rajendran, D., Dominic, G., & Selvaraju, S. (2016). Nano zinc, an alternative to conventional zinc as animal feed supplement: *A review*. *Animal Nutrition*, 2(3), 134–141. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.06.003

Tabatabaei Vakili, S., Aghaei, A., & Kazemizadeh, A. (2020). Effect of Different Concentrations of Lavandula Angustifolia Extract On Semen Quality of Rooster during Storage in Liquid Condition. *Research on Animal Production*, 11(27), 74–81. http://dx.doi.org/10.29252/rap.11.27.74 [in persian]

Torabi, F., Shafaroudi, M.M. and Rezaei, N. (2017). Combined protective effect of zinc oxide nanoparticles and melatonin on cyclophosphamide-induced toxicity in testicular histology and sperm parameters in adult Wistar rats. International *Journal of Reproductive BioMedicine*, 15 (7), 403. https://civilica.com/doc/719708

Tsakmakidis, I. A., Samaras, T., Anastasiadou, S., Basioura, A., Ntemka, A., Michos, I., Simeonidis, K., Karagiannis, I., Tsousis, G., Angelakeris, M., & Boscos, C. M. (2021). Toxic and Microbiological Effects of Iron Oxide and Silver Nanoparticles as *Additives on Extended Ram Semen*. *Animals*, 11(4), 1011. https://doi.org/10.3390/ani11041011

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-04]

[DOI: 10.61186/rap.16.1.155]