

## Research Paper

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

Vahid Lotfi vafa<sup>1</sup>, Khalil Mirzadeh<sup>2</sup>, Saleh Tabatabaei Vakili<sup>3</sup> and Amin Kazemizadeh<sup>4</sup>

1- M.Sc. Graduate, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Industry, Khuzestan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Ahvaz, 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](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) 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.

**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., Tabatabaei 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



## مقاله پژوهشی

## تأثیر نانو اکسیدروی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم بوقلمون در شرایط مایع

وحید لطفی وفا<sup>۱</sup>، خلیل میرزاده<sup>۲</sup>، صالح طباطبائی وکیلی<sup>۳</sup> و امین کاظمی‌زاده<sup>۴</sup>

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 پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۰۷

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۰۲

صفحه: ۱۵۵ تا ۱۶۶

## چکیده مسوط

**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 به دلیل خواص منحصر به فرد خود، نظرات قابل توجهی را در بیوتکنولوژی، پزشکی، تولیدمثل حیوانات و علوم دامپزشکی به خود جلب کرده‌اند. نانوذرات نسبت سطح به حجم بالایی دارند که باعث افزایش واکنش‌پذیری و توانایی نفوذ بیشتر در بافت‌های بیولوژیکی می‌شود. این ذرات از پایداری شیمیایی بالایی برخوردار هستند که می‌توانند در برابر شرایط محیطی مختلف پایداری خود را حفظ کنند و همچنین به دلیل داشتن اندازه نانووی 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 تاثیر می‌گذارد. اکثر آنزیم‌ها، از جمله 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 غلبه بر استرس اکسیداتیو ناشی از تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) توضیح داد. گونه‌های فعال اکسیژن مولکول‌های واکنشی با عمر کوتاه (۹-۱۰ 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 کنترل‌شده ROSها در اسپرم نقش فیزیولوژیکی مهمی 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-اوسیت را هدایت می‌کنند. از سوی دیگر اما، هنگامی که سطح ROS مایع منی از دفاع آنتی‌اکسیدانی فراتر رود، وضعیتی از استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود. استرس اکسیداتیو در منی منجر به 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 پرندها بسیار کوتاه‌تر از پستانداران است که تقریباً ۲۵ روز است. محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباع در غشای سلولی اسپرم پرندها، 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 پرندها 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 اعتقاد بر این است که علت اصلی از دست دادن ظرفیت باروری مشاهده شده در طول ذخیره‌سازی مایع منی پرندها 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 اکسیدروی 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 به مدت ۵ هفته انجام گرفت. 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 ذکر شده 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

## 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 به نام اکسیژن روبرو هستند یعنی از یک سو نیازمند به  $O_2$  مولکولی بوده و از سوی 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 دوکوزاترآنوییک 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 استفاده اسپرم طیور در روش تلقیح مصنوعی پس از ذخیره‌سازی منی به‌صورت سرد در دوره‌های کوتاه (۲۴-۱۵ ساعت) امکان‌پذیر است، ولی با افزایش دوره ذخیره‌سازی باروری اسپرم طیور دچار کاهش می‌شود (Blesbois et al., 2005). در فرایند ذخیره‌سازی اسپرم و مرحله‌های متفاوت انجاماد، 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 انجاماد 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 انجاماد 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 کاهش یافتن 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 آنتی‌اکسیدان‌ها 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 هسته 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 مایع منی 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، بلتوماسین، 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

سقف آویزان شده و با استفاده از هواکش سعی شد تا بقایای گاز فرمالین خارج شود.

### درجه حرارت نوردی و تهویه

در مدت زمان انجام آزمایش جهت خنک کردن سالن از سیستم پدکولینگ استفاده شد و دمای سالن بین ۱۹ تا ۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت سالن بین ۵۰ تا ۷۰ درصد بود. نوردی توسط لامپ‌های کم مصرف انجام شد و برنامه نوردی شامل ۱۰ ساعت تاریکی و ۱۴ ساعت روشنایی بود. تهویه سالن توسط ۲ فن در انتهای سالن انجام می‌شد.

### دان خوری‌ها و آب خوری‌ها

دان خوری و آب خوری از سقف آویزان و به صورت 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 شده است.

گرد آبیانو اکسیدروی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم بوقلمون در حالت مایع اثرگذار است یا خیر.

## مواد و روش‌ها محل انجام آزمایش

این پژوهش به مدت ۹ ماه در ایستگاه تحقیقاتی دام پروری و آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان واقع در ۳۶ کیلومتری شمال شرقی اهواز انجام گرفت.

### آماده‌سازی سالن

بعد از خالی کردن سالن ابتدا کف و دیوارهای سالن با مواد ضد عفونی کننده شستشو و دان خوری‌ها و آب خوری‌ها هم با مواد ضد عفونی کننده شستشو شدند. منافذ، در و پنجره‌ها به مدت ۴۸ ساعت مسدود و ضد عفونی سالن با فرمالین و پرمنگنات انجام شد. قبل از ورود بوقلمون‌ها دان خوری و آب خوری‌ها از

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	جوش شیرین 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 بین المللی ویتامین A، ۱۰۰ واحد بین المللی ویتامین E، ۴ میلی گرم ویتامین K<sub>3</sub>، ۲۵ میکروگرم ویتامین B<sub>12</sub>، ۳۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D<sub>3</sub>، ۷/۵ میلی گرم ویتامین B<sub>2</sub>، ۵۰ میلی گرم ویتامین B<sub>3</sub>، ۱۸ میلی گرم ویتامین B<sub>5</sub>، ۵/۵ میلی گرم B<sub>6</sub>، ۵۰ میکروگرم ویتامین B<sub>7</sub> بود. ۲-هر کیلوگرم جیره حاوی ۵۰ میلی گرم آهن، ۱۲۰ میلی گرم منگنز، ۱۱۰ میلی گرم روی، ۲ میلی گرم ید و ۰/۳ میلی گرم 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<sub>3</sub>, 25 mg of vitamin B<sub>12</sub>, 3,000 IU of vitamin D<sub>3</sub>, 7.5 mg of vitamin B<sub>2</sub>, 50 mg of vitamin B<sub>3</sub>, 18 mg of vitamin B<sub>5</sub>, 5.5 mg of vitamin B<sub>6</sub>, and 50 mg of vitamin B<sub>7</sub>. 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.

ابتدا تک تک مواد شیمیایی مورد نیاز برای ساخت رقیق کننده با استفاده از کاغذ مخصوص و ترازوی دیجیتال توزین، و سپس با آب مقطر دوبار تقطیر مخلوط و روی همزن قرار داده شد، تا مواد مورد نظر حل و همگن شوند. به این ترتیب، رقیق کننده رینگر اصلاح شده تهیه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگاه داری شد. مواد مورد استفاده در رقیق کننده در جدول ۲ آورده شده است.

### وسایل مورد استفاده در آزمایش

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

### ساخت رقیق کننده

جدول ۲- ترکیبات محلول رینگر اصلاح شده برای رقیق‌سازی منی بوقلمون (Tabatabaei vakili *et al.*, 2019)

Table 2. Modified Ringer's solution composition for dilution of turkey semen

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

### پرنده‌ها و نمونه‌گیری

طرح حاضر با استفاده از ۱۸ قطعه بوقلمون نژاد Bronze turkey در سن ۷ ماهگی انجام شد. بوقلمون‌ها در سطح بستر پرورش داده شده و به مدت ۲ هفته عادت‌دهی شدند. نمونه‌های منی ۲ بار در هفته و به مدت ۵ هفته با استفاده از روش ماساژ پشتی-شکمی جمع‌آوری شدند.

منی جمع‌آوری شده از بوقلمون‌ها به آزمایشگاه منتقل و پس از مخلوط کردن آن‌ها با هم به منظور 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) به صورت 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

#### جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده

برای ارزیابی فراسنجه‌های تحرک کل و تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها، پنج میکرولیتر از منی رقیق شده روی لام قرار داده شده و توسط لام پوشش داده شد. تحرک کل و تحرک پیش‌رونده با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی  $\times 400$  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 هاپیو اسموتیک (HOST) استفاده شد. اسپرم‌های زنده‌ای که دارای غشا پلاسمایی سالم هستند، حین قرارگیری در مایع هاپیو 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  $100 \times$  میکرولیتر محلول هاپیو اسموتیک (۱ گرم سدیم سترات در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب با فشار اسمزی معادل ۱۰۰ میلی‌اسمل در کیلوگرم، pH=7) مخلوط و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. سپس یک قطره از آن روی لام ریخته و با لامل پوشش داده شد و زیر میکروسکوپ نوری

با بزرگ‌نمایی  $\times 400$  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 به وسیله روش رنگ‌آمیزی ائوزین نیگروزین انجام شد که ترکیبات آن شامل رنگ ائوزین (۱/۶۷ گرم در لیتر)، رنگ نیگروزین (۱۰۰ گرم در لیتر) و سترات سدیم (۲۹ گرم در لیتر) است. برای ارزیابی، منی رقیق شده با نسبت یک‌به‌یک با رنگ ائوزین-نیگروزین آمیخته شد و سپس روی لام توسط لام دیگری با زاویه ۴۵ درجه گسترش داده شد، پس از خشک شدن، درصد اسپرم‌های زنده با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم در زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی  $\times 1000$  با استفاده از روغن اینرسی انجام شد. 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 رنگ‌آمیزی شده که شامل، اسپرم‌هایی با سر ناقص، سر جدا شده، سر دوتایی، دم پیچ‌خورده، دم دوتایی و دم جدا شده، 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 به کاررفته عبارت است از:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad (1) \text{ رابطه}$$

که در آن:

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

## نتایج و بحث

### تحرك كل و پیش‌رونده

تفاوت معنی‌داری بر جنبایی کل و پیش‌رونده اسپرم نسبت به تیمار شاهد می‌شود ( $p < 0.05$ ). در تمام ساعت‌های اندازه‌گیری شده 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. ( $p < 0.05$ ).

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

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 <sup>d</sup>	56.62 <sup>d</sup>	75.25	84.87	0
44.50 <sup>c</sup>	58.75 <sup>c</sup>	76.12	85.62	50
53.00 <sup>a</sup>	64.12 <sup>a</sup>	79.50	84.87	100
50.87 <sup>b</sup>	61.37 <sup>b</sup>	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 ( $p < 0.05$ ).

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 <sup>d</sup>	18.25 <sup>d</sup>	32.12	36.50	0
16.25 <sup>c</sup>	21.37 <sup>c</sup>	32.62	37.25	50
21.00 <sup>a</sup>	26.00 <sup>a</sup>	33.87	36.50	100
19.75 <sup>b</sup>	24.62 <sup>b</sup>	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 ( $p < 0.05$ ).

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

### زنده‌مانی

درصد زنده‌مانی اسپرم بوقلمون اثر معنی‌داری داشته‌است ( $p < 0.05$ ). 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 ( $p < 0.05$ ).

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

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 <sup>d</sup>	57.12 <sup>d</sup>	85.25	90.62	0
36.50 <sup>c</sup>	59.50 <sup>c</sup>	86.12	90.37	50
53.75 <sup>a</sup>	70.75 <sup>a</sup>	87.75	90.50	100
50.75 <sup>b</sup>	68.62 <sup>b</sup>	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 ( $p < 0.05$ ).

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

### سلامت غشای

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 ( $P < 0.05$ ).

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 پلاسمایی

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

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

میانگین‌های با حروف نامشابه در هر ستون دارای اختلاف آماری معنی‌داری هستند ( $p < 0.05$ ).

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

### ناهنجاری اسپرم

دهند. به‌طوری‌که در این زمان کمترین میزان ناهنجاری مربوط به سطح ۱۰۰ میکروگرم نانو اکسیدروی 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 ( $p < 0.05$ )

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

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

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

میانگین‌های با حروف نامشابه در هر ستون دارای اختلاف آماری معنی‌داری هستند ( $p < 0.05$ ).

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

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 پلاسما 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 به دلیل 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،

لقاح مصنوعی برای تولیدمثل موفق در بوقلمون‌ها حیاتی می‌باشد. تلقیح با مایع منی تازه بهترین نتایج را به‌همراه دارد، اما تکنیک‌های مدرن می‌توانند این کار را برای حفظ زنده ماندن مایع منی 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 قطعه‌قطعه شدن DNA است. آپوپتوز هم‌چنین می‌تواند توسط شکستگی‌های DNA دو رشته‌ای ناشی از ROS ایجاد 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 متعادل ROS دارند. با این حال، زمانی که میزان تولید ROS از دفاع آنتی‌اکسیدانی طبیعی سلول فراتر رود، اثر مضری به‌نام استرس اکسیداتیو ایجاد می‌کند. استرس اکسیداتیو منجر به اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها،

افزودن سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم نانواکسیدروی به محیط انجماد مایع‌منی خروس و سپس یخ‌گشایی 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 (Orzotek 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) انجام شد 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 آپوتوز را محدود کرد و مورفولوژی را بهبود بخشید. نشان داده شده است که دوز بهینه نانو اکسیدروی بین  $0.77/1.77$  میکروگرم در میلی‌لیتر است، در حالی که دوزهای بالاتر شاخص‌های کیفیت اسپرم پس از ذوب را به خطر انداختند. با این‌حال، سطوح بالای روی در پلاسمای منی می‌تواند فعالیت اسپرم را کاهش دهد. وقتی روی در پلاسمای منی وجود دارد، اسپرم‌ها در حالت نسبتاً ساکن ننگه داشته‌می‌شوند که باعث ذخیره انرژی قبل از لقاح می‌شود. در پژوهش الکساندرا اورزوتک و همکاران (Orzotek et al., 2021) بیان شد 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.

پاسخ‌های ایمنی، تکثیر DNA، ترمیم آسیب DNA، پیشرفت چرخه سلولی، آپوتوز 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 اعمال شده (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 ضد میکروبی 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 زیست‌فراهمی 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 گلووتاتیون 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 واکنشی شدن در اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی و فضاهای نامنظم بین سلول‌های اسپرماتوژن با اثر نانو اکسیدروی 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

<sup>1</sup> Mitochondrial membrane potential

## 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](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  $\alpha$ -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>

- Halo Jr, M., Buřka, K., Antos, P. A., Greń, A., Slanina, T., Ondruřka, L., 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., Tvrdá, 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., Zagloul, 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>

- 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](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., & Boscós, 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>