

ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ



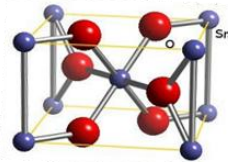
<https://www.ihu.gr/tmimata/geoponias/>

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών (ΠΜΣ)

«Καινοτόμα Συστήματα Αειφόρου Αγροτικής Παραγωγής»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΩΦΕΛΙΜΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ
ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΚΑΣΣΙΤΕΡΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΤΟΥ
ΤΑΥΡΟΥ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΑ ΦΑΡΔΟΥΛΗ

Κτηνίατρος

Επιβλέπων: Δρ Ιωάννης Α. Τσακμακίδης, Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής,
Σχολή Επιστημών Υγείας, Α.Π.Θ.

Συνεπιβλέπων καθηγητής: Δρ Αριστοτέλης Γ. Λυμπερόπουλος, Καθηγητής,
Τμήμα Γεωπονίας, Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών,
Δι.Πα.Ε

Θεσσαλονίκη 2023

ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
“ΚΑΙΝΟΤΟΜΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΕΙΦΟΡΟΥ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ”

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ

“ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ ΣΤΗ ΖΩΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ”

<http://agriculturaltechnology.teithe.gr/>

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΩΦΕΛΙΜΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ
ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΚΑΣΣΙΤΕΡΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΤΟΥ
ΤΑΥΡΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΑ ΦΑΡΔΟΥΛΗ

Κτηνίατρος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Δρ Ιωάννης Α. Τσακμακίδης, Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής,
Σχολή Επιστημών Υγείας, Α.Π.Θ.

ΜΕΛΟΣ: Δρ Αριστοτέλης Γ. Λυμπερόπουλος, Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας,
Σχολή Γεωτεχνικών, Διεθνές Πανεπιστήμιο της Ελλάδας

ΜΕΛΟΣ: Δρ Αθηνά Μπασιούρα, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Γεωπονίας,
Πανεπιστήμιο Δυτικής Μακεδονίας

Θεσσαλονίκη 2023

Στην οικογένεια μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Φτάνοντας στο τέλος μιας δύσκολης και επίπονης διαδρομής της συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας νιώθω την ανάγκη να εκφράσω τις ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες στον καθηγητή μου και επιβλέποντα της παρούσας εργασίας καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας, Α.Π.Θ κ. Τσακμακίδη Ιωάννη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής αλλά και την ουσιαστική συμβολή του με τη συνεχή επίβλεψη, την καθοδήγηση και τις καίριες επισημάνσεις του σε όλα τα στάδια εκπόνησης και συγγραφής της.

Ευχαριστώ τον κ. Θεόδωρο Σαμαρά, Καθηγητή, Τμήματος Φυσικής, Σχολής Θετικών Επιστημών Α.Π.Θ., για τη διάθεση των νανοσωματιδίων.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Κωνσταντίνο Συμεωνίδη, Χημικό Μηχανικό, Τμήματος Φυσικής, Σχολής Θετικών Επιστημών Α.Π.Θ. για την παρασκευή και διάθεση των νανοσωματιδίων, την κριτική μελέτη και τις υποδείξεις του για τη βελτίωση του κειμένου της διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον αγαπημένο Ομότιμο καθηγητή της Κτηνιατρικής Σχολής Α.Π.Θ. κ. Γεώργιο Χ. Παπαδόπουλο για την δύναμη που μου έδωσε όταν την χρειαζόμουνα, πιστεύοντάς σε μένα και πείθοντάς με να τολμήσω.

Δεν θα μπορούσα να μην αναφερθώ στη πολύτιμη συνδρομή της αγαπημένης μου φίλης και συναδέλφου Δρ. Κάτιας Παπαποστόλου για τη στήριξη της σε όλη τη διάρκεια της έρευνας, η οποία υπήρξε καταλυτική για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Την ευχαριστώ θερμά.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου και ιδιαίτερα στο σύζυγό μου Δημήτρη και στην αδερφή μου Κατερίνα για την υπομονή, την κατανόηση και τη στήριξη τους, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	6
ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	8
ΛΙΣΤΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	10
ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	12
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	13
SUMMARY	16
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	19
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	21
Εισαγωγή στη νανοτεχνολογία.....	21
Νανοϋλικά	22
Νανოსωματίδια στην τεχνολογία του σπέρματος	24
Σύνθεση νανოსωματιδίων	25
Ιδιότητες των νανοςωματιδίων	27
Τεχνητή σπερματέγχυση	29
Συλλογή αραίωση και συντήρηση του σπέρματος	29
Χρήση αντιβιοτικών	31
Προσθήκη εναλλακτικών αντιμικροβιακών ουσιών	33
Παράμετροι εκτίμησης των ποιοτικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών του σπέρματος	34
Κασσίτερος (Sn) και οξείδιο του κασσιτέρου	36
Κασσίτερος (Sn)	36
Οξείδιο του κασσιτέρου (II – δισθενής)	36
Οξείδιο του κασσιτέρου (IV-τετρασθενής)	37
ΣΚΟΠΟΣ 39	
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	40
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	40
Προέλευση βιολογικών υλικών	40
Αντιδραστήρια και υποστρώματα	40
Εργαστηριακά όργανα	41

Προετοιμασία διαλυμάτων νανοσωματιδίων κασσιτέρου	41
Πειραματικός σχεδιασμός	42
Εργαστηριακή εξέταση του σπέρματος	42
Εκτίμηση παραμέτρων της κινητικότητας και των επί μέρους κινήσεων των σπερματοζωαρίων	43
Εκτίμηση της ζωτικότητας και της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων	44
Εκτίμηση της λειτουργικής ικανότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων	46
Στατιστική ανάλυση των δεδομένων	46
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	88

ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Παρατηρούμενη τιμή στατιστικής σημαντικότητας p-value για τους παράγοντες “Μεταχείριση ” και “Χρόνος” και την αλληλεπίδραση “Χρόνος × Μεταχείριση.	48
Πίνακας 2. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “Συνολικής Κινητικότητα (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.	50
Πίνακας 3. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “Συνολικής Κινητικότητα (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.	51
Πίνακας 4. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “Προοδευτικής κινητικότητας (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.	53
Πίνακας 5. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “Προοδευτικής κινητικότητας (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.	54
Πίνακας 6. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων για το χαρακτηριστικό “Ταχέως κινούμενα σπερματοζώαρια (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.	56
Πίνακας 7. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων του χαρακτηριστικού “Ταχέως κινούμενα σπερματοζώαρια (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.	57
Πίνακας 8. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων για το χαρακτηριστικό “Μέσης ταχύτητας σπερματοζώαρια (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.	59
Πίνακας 9. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων του χαρακτηριστικού “Μέσης ταχύτητας σπερματοζώαρια (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.	60
Πίνακας 10. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων για το χαρακτηριστικό “Βραδέως κινούμενα σπερματοζώαρια (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.	61
Πίνακας 11. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων του χαρακτηριστικού “Βραδέως κινούμενα σπερματοζώαρια (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.	62
Πίνακας 12. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων για το χαρακτηριστικό “Ποσοστό ακίνητων σπερματοζώαρια (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.	64
Πίνακας 13. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων του “Ποσοστού ακίνητων σπερματοζωαρίων (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.	65
Πίνακας 14. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.	66
Πίνακας 15. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.	67

Πίνακας 16. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “VSL (μm/sec)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.	69
Πίνακας 17. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “VSL (μm/sec)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.	70
Πίνακας 18. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “VAP (μm/sec)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.	71
Πίνακας 19. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “VAP (μm/sec)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.	72
Πίνακας 20. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “LIN (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.	74
Πίνακας 21. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “STR (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.	75
Πίνακας 22. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “WOB (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.	77
Πίνακας 23. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “ALH (μm)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.	79
Πίνακας 24. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “ALH (μm)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.	80
Πίνακας 25. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “BCF (Hz)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.	81
Πίνακας 26. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “BCF (Hz)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.	82
Πίνακας 27. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων του αριθμού “Σπερματοζωαρίων σε υπερκινητικότητα (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.	84
Πίνακας 28. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων του αριθμού “Σπερματοζωαρίων σε υπερκινητικότητα (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.	85
Πίνακας 29. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων του αριθμού “Σπερματοζωαρίων με μορφολογικές ανωμαλίες (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.	86

ΛΙΣΤΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις στη συνολική κινητικότητα (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος τούρου.	52
Διάγραμμα 2. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στην προοδευτική κινητικότητα (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος τούρου, μετά την αναβίωση του.	55
Διάγραμμα 3. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στα Ταχέως κινούμενα σπερματοζώαρια (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος τούρου, μετά την αναβίωση του.	58
Διάγραμμα 4. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στα Μέσης ταχύτητας σπερματοζώαρια (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος τούρου, μετά την αναβίωση του.	60
Διάγραμμα 5. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στα Βραδέως κινούμενα σπερματοζώαρια (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος τούρου, μετά την αναβίωση του.	63
Διάγραμμα 6. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στο Ποσοστό των ακίνητων σπερματοζωαρίων (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος τούρου, μετά την αναβίωση του.	65
Διάγραμμα 7. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στην παράμετρο VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος τούρου, μετά την αναβίωσή του.	68
Διάγραμμα 8. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στην παράμετρο VSL ($\mu\text{m}/\text{sec}$) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος τούρου, μετά την αναβίωσή του.	70
Διάγραμμα 9. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στην παράμετρο VAP ($\mu\text{m}/\text{sec}$) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος τούρου, μετά την αναβίωσή του.	73
Διάγραμμα 10. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στην παράμετρο LIN (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος τούρου, μετά την αναβίωσή του.	74
Διάγραμμα 11. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στην παράμετρο STR (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος τούρου, μετά την αναβίωσή του.	76

Διάγραμμα 12. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στην παράμετρο WOB (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωσή του.....	78
Διάγραμμα 13. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στην παράμετρο ALH (μm) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωσή του.....	80
Διάγραμμα 14. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στην παράμετρο BCF (Hz) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωσή του.....	83
Διάγραμμα 15. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στα Σπερματοζώρια με υπερκινητικότητα (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωσή του.....	85
Διάγραμμα 16. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στα Σπερματοζώρια με μορφολογικές ανωμαλίες (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωσή του.	87

ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Βιολογικές οντότητες στην νανοκλίμακα (Τσολάκης 2020)	21
Εικόνα 2: Είδη νανοϋλικών διαφορετικών διαστάσεων (Saleem 2020)	23
Εικόνα 3: α) Μέθοδοι top-down και bottom-up σύνθεσης νανοϋλικών. β) Στάδια σύνθεσης bottom-up και έλεγχος των ιδιοτήτων των νανοϋλικών (Care και συν. 2015).	26
Εικόνα 4: Η δομή του κρυστάλλου του SnO	37
Εικόνα 5: Η δομή του κρυστάλλου του SnO ₂	37
Εικόνα 6: Πειραματικές φωτογραφίες που αποτυπώνουν την αντιβακτηριακή δραστηριότητα των νανοσωματιδίων του SnO ₂ σε (α) = E. coli, (β) = P. aeruginosa και (γ) = S. aureus (Haq, 2021)	38
Εικόνα 7: Η ζωτικότητα του σπέρματος αξιολογήθηκε με οπτικό μικροσκόπιο (×1000) μετά από χρώση εωσίνης-νιγροσίνης. Ζωντανά θεωρούνταν τα σπερματοζώαρια με μη χρωματισμένη κεφαλή (λευκά βέλη). Τα σπερματοζώαρια που είχαν χρωματισμένη κεφαλή (μαύρα βέλη) θεωρούνταν νεκρά (Buranaamnuay και συν., 2014)	45
Εικόνα 8: Δοκιμή HOST. Τα σπερματοζώαρια με διόγκωση της ουράς (βέλη) προσδιορίζονταν ως θετικά στη δοκιμή (Buranaamnuay και συν., 2014)	46

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νανοτεχνολογία αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο ερευνητικό τομέα με σημαντικές εφαρμογές σε πολλούς επιστημονικούς τομείς, μεταξύ των οποίων η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Συγκεκριμένα, οι επιδράσεις των νανοσωματιδίων (nanoparticles, NPs) σε κυτταρικό επίπεδο έχουν μελετηθεί σε πρωτόκολλα για τη διασφάλιση και βελτίωση της γονιμότητας του αρσενικού. Τα τελευταία χρόνια, έχει δοθεί μεγάλη προσοχή στα νανοσωματίδια του οξειδίου του κασσιτέρου λόγω των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων τους. Σε αυτό το πλαίσιο, το αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι ένα πρώτο διερευνητικό βήμα για τη μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων των νανοσωματιδίων κασσιτέρου (μητρικό διάλυμα NPs SnO₂: 0,25g / 100 mL απεσταγμένου νερού) στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του κρυσυντηρημένου σπέρματος του ταύρου.

Στην παρούσα μελέτη, συνολικά εκτιμήθηκαν 96 δείγματα/μικροσωληνάρια κρυσυντηρημένου σπέρματος ταύρου (12 πειραματισμοί, 4 πειραματικές ομάδες, 2 μικροσωληνάρια/ομάδα), τα οποία μετά την αναβίωση τους στους 37°C, για 30 δευτερόλεπτα διαχωρίστηκαν στις εξής πειραματικές ομάδες: ομάδα μάρτυρα, ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης NPs (προσθήκη 20 μLμητρικού διαλύματος NPs_{SnO₂}/ mL σπέρματος), ομάδα μέσης συγκέντρωσης NPs (προσθήκη 40 μLμητρικού διαλύματος NPs_{SnO₂}/ mL σπέρματος) και ομάδα υψηλής συγκέντρωσης NPs (προσθήκη 80 μLμητρικού διαλύματος NPs_{SnO₂}/ mL σπέρματος). Ακολούθησε αραίωση όλων των δειγμάτων με διπλάσιο όγκο προθερμασμένου (37°C) φωσφορικού διαλύματος έκπλυσης (1:2, v/v,) και δίωρη επώαση (37°C) σε υδατόλουτρο. Κατά την προσθήκη των NPs (ώρα 0) και τις ώρες 1 και 2 μετά από την επώαση σε όλες τις πειραματικές ομάδες εκτιμήθηκαν η κινητικότητα και οι επιμέρους μορφές κίνησης με τον αυτόματο αναλυτή σπέρματος υποβοηθούμενο από H/Y (Computer Assisted Sperm Analyzer, CASA), η ζωτικότητα (εωσίνη-νεγροσίνη), η μορφολογία (εωσίνη-νεγροσίνη) και η αντοχή των σπερματοζωαρίων έναντι της καταπόνησης σε υπό-ωσμωτικό διάλυμα (δοκιμή HOST).

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε στο μεθοδολογικό πλαίσιο των μικτών γραμμικών υποδειγμάτων (mixed linear models) και βασίστηκε στο πλήρως τυχαιοποιημένο σχέδιο με ομάδες (RCBD) με τη μέθοδο ομάδων με υποομάδες (Split plot) (Μενεξές, 2013). Το επίπεδο σημαντικότητας α των στατιστικών ελέγχων προκαθορίστηκε σε $\alpha=0,05$ ($p<0,05$). Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics (Version 28).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η χαμηλή συγκέντρωση NPs κασσιτέρου δεν επηρέασε αρνητικά καμία παράμετρο του σπέρματος μετά από 1 ώρα επώασης, εκτός από τις επιμέρους μορφές κίνησης BCF και VCL μετά από 2 ώρες επώασης. Η μέση συγκέντρωση NPs επηρέασε αρνητικά τις επιμέρους μορφές κίνησης VCL, VSL, BCF, και το ποσοστό των υπερκινητικών σπερματοζωαρίων, χωρίς όμως να παρατηρηθεί επιβλαβής δράση για τη συνολική κινητικότητα, τα προοδευτικά, ταχέως, μετρίως και βραδέως κινούμενα σπερματοζωάρια. Τέλος, η υψηλή συγκέντρωση NPs επηρέασε δυσμενώς όλες σχεδόν τις υπό εξέταση παραμέτρους του σπέρματος.

Συμπερασματικά, σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής η χαμηλή συγκέντρωση νανοσωματιδίων κασσιτέρου (20 μ LNPs/ml σπέρματος ταύρου) δεν είχε κύτταροτοξική δράση στο κρυοσυντηρημένο/αναθερμασμένο σπέρμα του ταύρου μετά από 1 ώρα συνεπώασης, ενώ η μεσαία (40 μ LNPs/ml σπέρματος ταύρου) και η υψηλή (80 μ LNPs/ml σπέρματος ταύρου) συγκέντρωση NPs παρουσιάζουν βλαπτική δράση με συνέπεια να μη συνιστάται η περαιτέρω διερεύνησή τους σε τεχνολογίες του σπέρματος του ταύρου. Επομένως, η χρήση νανοσωματιδίων κασσιτέρου κατά τους χειρισμούς του σπέρματος του ταύρου θεωρείται εφικτή υπό την προϋπόθεση να τηρούνται τα όρια συγκέντρωσης νανοσωματιδίων κασσιτέρου και ο κατάλληλος χρόνος αλληλεπίδρασης όπως προέκυψαν από την παρούσα μελέτη. Η ανεύρεση της μη κυτταροτοξικής συγκέντρωσής τους αναμένεται να ενισχύσει τον περαιτέρω έλεγχο για τη διαπίστωση πιθανής αντιμικροβιακής δράσης τους με τελικό στόχο την εναλλακτική χρήση τους ως υποκατάστατα των συμβατικών αντιβιοτικών.

Λέξεις ευρετηρίασης: αναπαραγωγή, ταύρος, σπέρμα, νανοσωματίδια οξειδίου του κασσιτέρου, νανοτεχνολογία, αντιβιοτικά, κρυοσυντήρηση.

SUMMARY

Nanotechnology has become one of the most promising fields of research with its significant application in all fields of science. The effects of nanoparticles (NPs) at the cellular and tissue level may be used in assisted reproduction to improve male fertility, and particularly enhance sperm quality under *in vivo* or *in vitro* conditions. In recent years, the tin oxide nanoparticles have received enormous attention due to their properties. In this aspect, the object of this study was as a first step to find the non-detrimental concentration of tin nanoparticles (stock solution: NPs SnO₂ 0,25g / 100 mL distilled water) in the qualitative characteristics of cryopreserved bull semen.

Ninety-six (96) straws of cryopreserved bull semen (12 replicates; 4 experimental groups; 2 straws/group) were thawed (37°C; 30 sec) and four experimental groups were processed: control group (no treatment), low concentration NPs (20 µL stock solution NPs SnO₂/ mL semen), medium concentration NPs (40 µL stock solution NPs SnO₂/ mL semen), and high concentration NPs (80 µL stock solution NPs SnO₂/ mL semen). All groups were further extended (1:2; v/v) with pre-warmed (37° C) phosphate-buffered saline and finally incubated (37°C; 2 hours). For all experimental groups, sperm motility and kinetics (CASA), viability (eosin-nigrosin), morphology (eosin-nigrosin) and functional integrity of sperm plasma membrane (Hypo-Osmotic Swelling Test; HOST) were evaluated at 0 (time of NPs supplementation), 1 and 2 hrs of incubation.

Data analysis was done in the methodological frame of mixed linear models and was based on the randomized completely block (RCBD) split plot design (subgroups within groups). The significance level α of the statistical tests was predetermined at $\alpha=0.05$ ($p<0.05$). Analyses were performed at statistical package IBM SPSS Statistics (Version 28).

The results of the study revealed that the low concentration of tin nanoparticles did not affect the examined semen variables after 1 h of incubation, but lower values were noticed for kinematics BCF and VCL after 2 hrs of incubation compared to the control group. The medium tin nanoparticles concentration negatively affected the

kinematics VCL, VSL, BCF, and the percentage of hyperactivated spermatozoa. However, it was not affected the total and progressive motility, rapid, medium, slow moving, spermatozoa). Finally, the high concentration of tin was detrimental to almost all sperm parameters.

In conclusion, the study revealed that the tin nanoparticles' concentration of 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of bull semen was non cytotoxic and, the safe time of nanoparticles' interaction with bull spermatozoa is 1 h. Moreover, it was proved that the medium and high tin nanoparticles' concentrations were partly and strong cytotoxic for cryopreserved bull semen, respectively. Therefore, bull semen handling and processing with tin nanoparticles is feasible, when the concentration limits of this study are taken in consideration. The determination of the non-cytotoxic concentration may guarantee further research about the possible antimicrobial action of tin oxide NPs and their potential use as alternative to conventional antibiotics.

Keywords: reproduction, bull, semen, tin oxide nanoparticles, nanotechnology, antibiotics, cryopreservation

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η προσβασιμότητα στο σπέρμα βοοειδών δεν εξαρτάται πλέον από τη γεωγραφική θέση ή το χρόνο, λόγω της επιτυχίας στην κρύο-συντήρηση του. Το κατεψυγμένο σπέρμα χρησιμοποιείται σε ποικίλες τεχνολογίες, όπως η τεχνητή σπερματέγχυση (ΤΣ) και η *in vitro* παραγωγή εμβρύων (Medeiros και συν., 2002), με κύριους στόχους τη γενετική βελτίωση και τη διατήρηση του γενετικού υλικού.

Έχει υπολογιστεί ότι το 95% των συνολικών δόσεων παραγόμενου σπέρματος ταύρου διατίθεται εμπορικά ως κρυσυντηρημένο (Thibier και Wages, 2002). Είναι γενικά αποδεκτό πως η διαδικασία της κρυσυντήρησης καταπονεί τα σπερματοζώαρια. Ωστόσο, παρά το αντίκτυπο που προκαλείται στη γονιμότητα του κρυσυντηρημένου σπέρματος σε σύγκριση με το νωπό, η εφαρμογή ΤΣ με κρυσυντηρημένο σπέρμα ταύρου στα βοοειδή χρησιμοποιείται παγκοσμίως επειδή είναι απλή, οικονομική και αποτελεσματική (Vishwanath, 2003). Σύμφωνα με τον Fricke (1999) το 50% των σπερματεγχύσεων με κατεψυγμένο σπέρμα επιτυγχάνει εγκυμοσύνη, ενώ η ποιότητά του επηρεάζεται από ένα ευρύ φάσμα γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων της ηλικίας του ταύρου, της συχνότητας συλλογής, και της εποχής του έτους (Fuerst-Waltl και συν., 2006, Fiaz και συν., 2010, Snoj και συν., 2013).

Λόγω της παγκόσμιας εμπορικής διακίνησης του καταψυγμένου σπέρματος ταύρου επιβάλλεται ο καθορισμός και η εφαρμογή αυστηρών υγειονομικών κριτηρίων για να διασφαλιστεί η γονιμοποιητική του ικανότητα και η αποφυγή μετάδοσης λοιμωδών νοσημάτων. Η οδηγία της Ευρωπαϊκής ένωσης 88/407 EEC (EC, 1993) καθορίζει τις κατευθυντήριες γραμμές για τον έλεγχο της υγείας των ταύρων στα κέντρα τεχνητής σπερματέγχυσης μέσω του ετήσιου ορολογικού ελέγχου για συγκεκριμένους λοιμώδεις παράγοντες.

Η ανεύρεση παθογόνων ή συχνότερα σαπροφυτικών μικροοργανισμών στο σπέρμα είναι πιθανή. Η βακτηριακή επιμόλυνση του σπέρματος μπορεί να συμβεί οποιαδήποτε στιγμή κατά την παραγωγή των δόσεων σπερματέγχυσης, ιδιαίτερα όταν

δεν ακολουθούνται με προσοχή οι κανόνες υγιεινής. Όταν το σπέρμα μολύνεται από βακτήρια που επιβιώνουν στη θερμοκρασία αποθήκευσης των $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε υγρό άζωτο, δημιουργούνται προϋποθέσεις μικροβιο-αντοχής στα αντιβιοτικά, φαινόμενο που απασχολεί έντονα την επιστημονική κοινότητα (Ranald και Prubhakar, 2001). Επιπλέον, προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι η διαδικασία της κρυοσυντήρησης δεν αποτρέπει την ανάπτυξη βακτηρίων μετά από την αναθέρμανση (Piasecka-Serafin, 1972).

Στο πλαίσιο της αντιμετώπισης της ανθεκτικότητας των μικροβίων του σπέρματος στα αντιβιοτικά, η επιστημονική κοινότητα διερευνά εναλλακτικές στρατηγικές, όπως η χρήση κολλοειδών διαλυμάτων για τη φυσική απομάκρυνση βακτηρίων με φυγοκέντρηση (Morrell και συν., 2014), η προσθήκη πεπτιδίων φυσικής ή συνθετικής προέλευσης στα αραιωτικά του σπέρματος (Schulze και συν., 2016, Speck και συν., 2014), η χρήση φυσικών προϊόντων με αντιβακτηριδιακή δράση, όπως το μέλι (Banday και συν., 2017) και η χρήση νανοσωματιδίων (Das και συν., 2013, Meena Kumari και συν., 2015). Ένας αριθμός νανοδομών μεταλλικών οξειδίων που παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση έχουν συντεθεί και χρησιμοποιηθεί πρόσφατα σε αρκετές ερευνητικές εργασίες (Saikia και συν., 2010, Das και συν., 2013, Meena Kumari και συν., 2015, Tsakmakidis και συν., 2020).

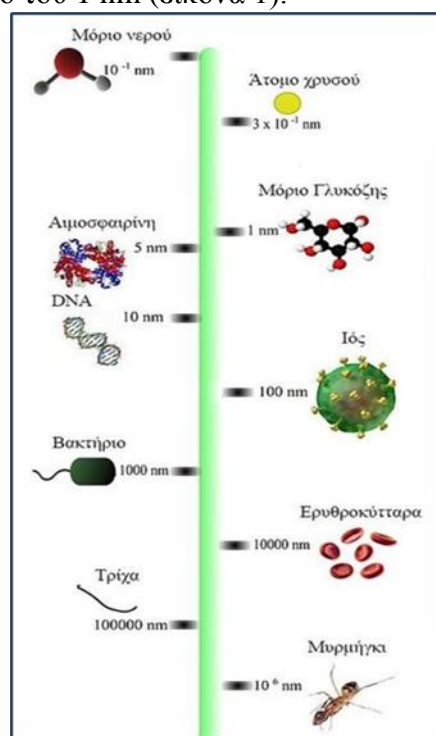
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή στη νανοτεχνολογία

Το πρόθεμα “νανο” προέρχεται από την ελληνική λέξη *νάνος* και χρησιμοποιείται στην επιστήμη και την τεχνολογία. Ένα νανόμετρο (nm) αντιστοιχεί σε ένα δισεκατομμυριοστό του μέτρου ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{m} = 0.000000001\text{m}$) και οι διαστάσεις του γίνονται πιο εύκολα αντιληπτές αν το συγκρίνουμε με το πάχος μιας ανθρώπινης τρίχας (1/80000) ή με το μήκος δέκα ατόμων υδρογόνου σε σειρά. Τα άτομα έχουν μέγεθος μικρότερο από 1nm, ενώ πολλά μόρια, συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων πρωτεϊνών, έχουν μέγεθος μεγαλύτερο του 1 nm (εικόνα 1).

Ο όρος *νανοεπιστήμη* αναφέρεται στις επιστήμες οι οποίες ασχολούνται με τη διερεύνηση, τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων, την παρατήρηση, την μέτρηση και τον έλεγχο της ύλης στην κλίμακα αυτή.

Ο όρος *νανοτεχνολογία* χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη δημιουργία και χρήση λειτουργικών δομών μεγέθους 1-100 nm (Jortner και συν., 2002).



Εικόνα 1: Βιολογικές οντότητες στην νανοκλίμακα (Τσολάκης 2020)

Η πρώτη επιστημονική αναφορά στη νανοτεχνολογία (χωρίς τη χρήση αυτού του όρου) έγινε από τον Αμερικανό θεωρητικό φυσικό Richard Feynman, το 1959, στην ομιλία του με τίτλο «Υπάρχει Πολύς Χώρος στον Πάτο» (There's plenty of room at the bottom), ο οποίος θεωρείται και ο πατέρας της νανοτεχνολογίας. Ο ίδιος επιστήμονας εισήγαγε την ιδέα της top-down (από πάνω προς τα κάτω) σύνθεσης και των διαφορετικών ιδιοτήτων που μπορεί να επιφέρει το μέγεθος της μικρότερης κλίμακας ύλης. Ταυτόχρονα, στο χώρο της ιατρικής, ο Paul Ehrlich, θεμελιωτής της χημειοθεραπείας, ενέπνευσε πολλούς πρωτοπόρους στον τομέα της νανοτεχνολογίας με τη σύλληψη της ιδέας ονόματι «μαγικής σφαίρας» (“magic bullet concept”) για

την επιλεκτική στόχευση κυττάρων στο ανθρώπινο σώμα. Επίσημα, ο όρος «Νανοτεχνολογία» αναφέρεται για πρώτη φορά από τον Ιάπωνα Norio Taniguchi το έτος 1974 στη διατριβή του με τίτλο «Σχετικά με τη βασική έννοια της Νανοτεχνολογίας», όπου περιγράφεται η ακρίβεια κατασκευής υλικών στη νανοκλίμακα. Ωστόσο, η επανάσταση της μοριακής νανοτεχνολογίας έγινε από τον Αμερικανό επιστήμονα και συγγραφέα Eric Drexler κατά τη δεκαετία του '80, ο οποίος επανάφερε τον όρο και διεύρυνε την έννοιά του, όπως χαρακτηριστικά αναλύεται στα βιβλία του με τίτλο «Μηχανές Δημιουργίας: Η επερχόμενη Εποχή της Νανοτεχνολογίας» και «Ξεδιπλώνοντας το Μέλλον: Η Επανάσταση της Νανοτεχνολογίας».

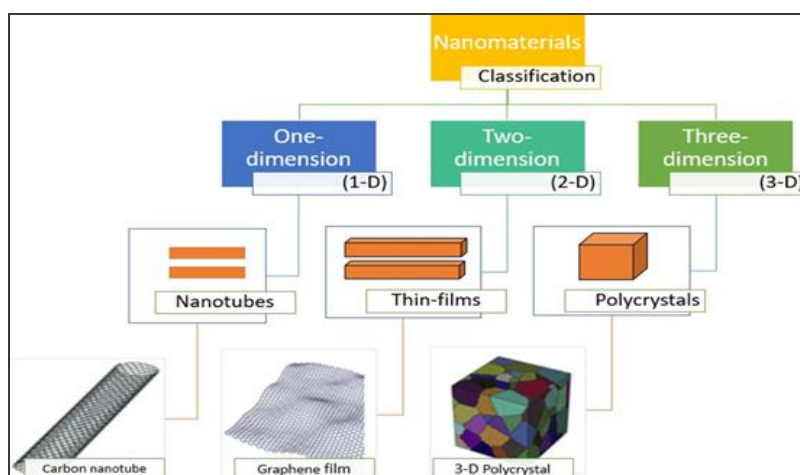
Τα νανοσωματίδια (nanoparticles, NPs) ταξινομούνται σε πολλές κατηγορίες με βάση τις ιδιότητες, το μέγεθος και το σχήμα τους. Τα νανοσωματίδια διαθέτουν συγκεκριμένες φυσικές και χημικές ιδιότητες λόγω της μεγάλης επιφάνειάς τους και του μεγέθους τους σε νανοκλίμακα, γεγονός που τα καθιστά χρήσιμα για εμπορικές, οικιακές (Khan και συν., 2017) και βιοαπεικονιστικές εφαρμογές (Dreaden και συν., 2012).

Νανοϋλικά

Τα νανοϋλικά είναι υλικά των οποίων τα φυσικά χαρακτηριστικά, καθορίζονται από τα νανοσωματίδια που περιέχουν (Gubin, 2009). Παρά το γεγονός ότι πρόκειται για ένα αρκετά ευρύ ορισμό, θεωρούμε ως νανοϋλικά, όλα τα υλικά με τουλάχιστον μία διάσταση μικρότερη από 100 nm (Buzea και συν., 2007). Δύο είναι οι παράγοντες που προσδίδουν τις ιδιότητες στα νανοϋλικά και τα διαφοροποιούν από τα υπόλοιπα υλικά: 1) η αυξημένη ειδική επιφάνεια και 2) οι κβαντικές αλληλεπιδράσεις (Roduner, 2006).

Τα νανοϋλικά κατηγοριοποιούνται με τρεις τρόπους ανάλογα με: τη μακροσκοπική τους σύσταση, τις διαστάσεις που έχουν αναπτυγμένες πέρα της νανοκλίμακας (>100 nm) και τη χημική τους σύσταση. Μακροσκοπικά, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, στα συμπαγή νανοϋλικά και στις νανοδιασπορές.

Ο διαχωρισμός των νανοϋλικών ανάλογα με τις διαστάσεις τους περιλαμβάνει τα υλικά δύο διαστάσεων (2D), μίας διάστασης (1D), και μηδενικών διαστάσεων (0D). Πιο αναλυτικά, ξεκινώντας από ένα συμπαγές (bulk) υλικό με τις τρεις του διαστάσεις στη μακροκλίμακα, είναι δυνατό με κατάλληλη επεξεργασία να μειωθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό ο όγκος του κατά μια συγκεκριμένη διάσταση, μέχρι το πάχος του να φτάσει κάτω από τα 100nm. Σε μια τέτοια περίπτωση το υλικό από τρισδιάστατο (3-D) θα μπορούσε να θεωρηθεί ως υλικό δύο διαστάσεων (2-D). Αν η σμίκρυνση συνεχιστεί και σε μια ακόμη διάσταση τότε μιλάμε για υλικά μονοδιάστατα (1-D), όπως είναι οι νανοσωλήνες άνθρακα, ενώ στην περίπτωση που και η τρίτη διάσταση φτάσει στη νανοκλίμακα το υλικό καθίσταται “αδιάστατο” (0-D), (εικόνα2).



Εικόνα 2: Είδη νανοϋλικών διαφορετικών διαστάσεων (Saleem 2020)

Τα νανοϋλικά με αναπτυγμένες και τις τρεις διαστάσεις τους στη νανοκλίμακα (0D) παρουσιάζουν σφαιρικό ή σφαιροειδές σχήμα και ονομάζονται NPs ή νανοκρυσταλλίτες. Τα νανοσωματίδια μπορεί να είναι συμπαγή ή όχι, όπως στην περίπτωση των κενών σφαιρών (hollow spheres), ή να αποτελούνται από δύο φάσεις (πυρήνα και περίβλημα), όπως στην περίπτωση των coreshell νανοσωματιδίων. Όταν η διεύθυνση των ατόμων (ή ιόντων) στα νανοϋλικά μηδενικών διαστάσεων είναι συγκεκριμένη, ονομάζονται νανοκρυσταλλίτες ή νανοκρύσταλλοι και σε αυτήν την περίπτωση μπορούν να εμφανίσουν διάφορα σχήματα. Στους σφαιρικούς νανοκρυστάλλους ανήκουν οι νανοκρύσταλλοι ημιαγωγών (quantum dots).

Τέλος, ως τρισδιάστατα (3-D) νανοϋλικά θεωρούνται εκείνα που είναι ορατά μακροσκοπικά αλλά τα συστατικά τους μέρη έχουν διαστάσεις στη νανοκλίμακα, όπως για παράδειγμα τα πορώδη υλικά. Καθώς ένα υλικό χάνει τη μία μετά την άλλη μακροσκοπική του διάσταση, αλλάζει δραματικά και η πυκνότητα των ενεργειακών καταστάσεων στις οποίες αυτό θα μπορεί να βρεθεί.

Τα ανόργανα νανοσωματίδια αποτελούν σημαντικό κεφάλαιο των νανοϋλικών γιατί παρουσιάζουν μοναδικές χημικές ή/και φυσικές ιδιότητες λόγω του μικρού μεγέθους και διαφοροποιούνται σημαντικά από τα μακροσκοπικά (bulk) ανάλογά τους. Η μεγάλη ποικιλία υλικών που μπορούν να παρασκευαστούν στη νανοκλίμακα, μαζί με τον έλεγχο του μεγέθους, του σχήματος και των ιδιοτήτων της επιφάνειας, δίνει τη δυνατότητα χρήσης σε μία πληθώρα εφαρμογών (Ferrari 2005). Η έρευνα των μεταλλικών νανοσωματιδίων εστιάζει στην εφαρμογή τους στα πεδία της βιοαπεικόνισης, της βιοφαρμακευτικής, της βιοτεχνολογίας, της κατάλυσης κ.α. (Francis και συν., 2014).

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια (MNPs), εξαιτίας της ικανότητας τους να ανταποκρίνονται σε ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, μπορούν να στοχεύσουν σε συγκεκριμένο σημείο-στόχο, και να χρησιμοποιηθούν στη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων, στη στοχευμένη επιμόλυνση (magnet of infection), στη μαγνητική υπερθερμία, στην απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (MRI monitoring), στον κυτταρικό έλεγχο ως μαγνητικοί διακόπτες και στη μηχανική ιστών (Zhao και συν., 2001).

Νανοσωματίδια στην τεχνολογία του σπέρματος

Τα νανοσωματίδια μπορούν να κατασκευαστούν με ένα ευρύ φάσμα υλικών από μέταλλα και ημιαγωγούς, που προσδίδουν χρήσιμες ιδιότητες, όπως φθορισμό και μαγνητική συμπεριφορά (Ferrari, 2005).

Τα NPs έχουν διάφορες εφαρμογές στον τομέα των ιατρικών και κτηνιατρικών επιστημών. Στην τεχνολογία του σπέρματος έχουν χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση νεκρών σπερματοζωαρίων από το εκσπερμάτισμα (νανοκαθαρισμός του σπέρματος), βιοαπεικόνιση γαμετών, φυλετικό διαχωρισμό των σπερματοζωαρίων, αξιολόγηση της υπογονιμότητας του αρσενικού με τη χρήση

διαφορετικών βιοδεικτών και τη μεταφορά γονιδίων μέσω σπερματοζωαρίων φορέων.

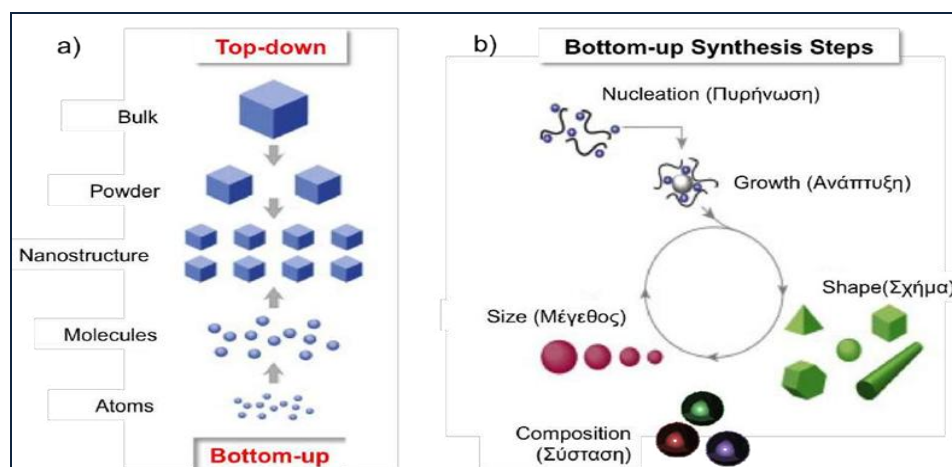
Τα αντιοξειδωτικά συστατικά του σπερματικού πλάσματος προστατεύουν τα σπερματοζωάρια από τη λιπιδική υπεροξειδωση (Zini και συν., 1993). Ωστόσο, τα πρωτόκολλα επεξεργασίας του σπέρματος υπό *in vitro* συνθήκες στα πλαίσια της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ή τεχνολογιών συντήρησης του σπέρματος επιβάλλουν την απομάκρυνση του σπερματικού πλάσματος αφήνοντας τα σπερματοζωάρια εκτεθειμένα στις δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS), (Sukcharoen και συν., 1995). Σε αυτό το πλαίσιο, τα NPs έχουν υπεισέρθει στη λειτουργική αξιολόγηση και στη βελτίωση της ποιότητας του σπέρματος λόγω των αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους. Τα NPs οξειδίου του δημητρίου (Cerium oxide) βελτίωσαν την ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης του πυρήνα των σπερματοζωαρίων του κριού μειώνοντας την οξειδωτική καταπόνηση (Falchi και συν., 2018), ενώ η προσθήκη νανοσεληνίου (Se NPs) και βιταμίνης E στο σπέρμα του κόκορα οδήγησε στη βελτίωση της ποιότητας του μετά από την απόψυξη (Safa και συν., 2016). Περαιτέρω, ο εμπλουτισμός του σπέρματος κριού με NPs οξειδίου του ψευδαργύρου βελτίωσε τόσο την ποιότητά του όσο και τη δράση των αντιοξειδωτικών συστατικών του σπερματικού πλάσματος (Zhang και συν., 2015). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν το σπέρμα του ταύρου εμπλουτίστηκε με NPs οξειδίου του ψευδαργύρου, με αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή μαλονδιαλδεύδης (malondialdehyde, MDA) και τη βελτιωμένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα (Yazdanshenas και συν., 2016).

Επιπλέον, τα NP Fe_3O_4 επέδειξαν αντιβακτηριακές ιδιότητες και ο συνδυασμός τους με συμβατικά αντιβιοτικά θα μπορούσε να ενισχύσει την αντιβακτηριδιακή τους δράση και να μειώσει την απαιτούμενη δόση προσθήκης αντιβιοτικών στο σπέρμα των παραγωγικών ζώων (Tsakmakidis και συν., 2020).

Σύνθεση νανοσωματιδίων

Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τρόποι σύνθεσης και επεξεργασίας νανοδομών. Αυτοί οι τρόποι-μέθοδοι μπορούν γενικά να κατηγοριοποιηθούν συνθετικά ως προσεγγίσεις “top-down” ή “bottom-up” (Εικόνα 3). Η σύνθεση “top-

down” στηρίζεται στη μείωση του μεγέθους για τη δημιουργία υλικών νανομετρικής διάστασης.



Εικόνα 3: α) Μέθοδοι top-down και bottom-up σύνθεσης νανοϋλικών. β) Στάδια σύνθεσης bottom-up και έλεγχος των ιδιοτήτων των νανοϋλικών (Care και συν. 2015).

Και οι δύο προσεγγίσεις παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη σύγχρονη βιομηχανία και στις διαδικασίες της νανοτεχνολογίας, ενώ εμφανίζουν αμφότερες πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Στη bottom-up μέθοδο οι νανοδομές δημιουργούνται μέσω “αυτοοργάνωσης” (self-assembly). Η αυτοοργάνωση αναφέρεται στην τάση ορισμένων υλικών να οργανώνονται και να αποκτούν συγκεκριμένες διατάξεις, χωρίς εξωτερική επίδραση ή καθοδήγηση. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει την αυθόρμητη διάταξη διαφορετικών ατόμων, μορίων ή νανοσωματιδίων μετά από την ανάμειξη τους υπό συγκεκριμένες συνθήκες και τον σχηματισμό σταθερών, καθορισμένων δομών, γεγονός που οφείλεται στις μοναδικές γεωμετρικές και ηλεκτρονικές δομές του. Από την άλλη η top-down μέθοδος αναφέρεται στην παρασκευή των νανοϋλικών με επιθυμητό μέγεθος ή σχήμα, μέσω διαδικασιών και μηχανισμών σμίκρυνσης συμπαγών υλικών.

Για την bottom-up σύνθεση ανόργανων νανοσωματιδίων χρησιμοποιείται κατά βάση η “υγρή χημεία” που συσπεριλαμβάνει μεθόδους όπως η συγκαταβύθιση, η θερμική διάσπαση, τα μικρογαλακτώματα, η sol-gel και η υδροθερμική – σολβοθερμική.

Όταν απαιτούνται υψηλής ποιότητας και λειτουργικότητας υλικά, οι μέθοδοι της “υγρής χημείας” επιτυγχάνουν υψηλή ομοιογένεια και έλεγχο της τελικής

μορφολογίας, γεγονός που τις καθιστά διεθνώς πιο διαδεδομένες για τη σύνθεση των μεταλλικών νανοσωματιδίων. Η έρευνα γύρω από το μηχανισμό σχηματισμού ομοιόμορφων κolloειδών σωματιδίων ξεκίνησε τη δεκαετία 1940 – 1950. Τα μοντέλα που προτάθηκαν για να εξηγήσουν τον τρόπο σχηματισμού των νανοσωματιδίων συμφωνούν ως προς το στάδιο της πυρήνωσης στο οποίο μικροσκοπικά σωματίδια (πυρήνες) καταβυθίζονται από ένα διάλυμα. Ωστόσο, υπάρχουν διαφορετικές απόψεις όσον αφορά το στάδιο της ανάπτυξης των πυρήνων, το οποίο μπορεί είτε να συμβαίνει ταυτόχρονα με την πυρήνωση είτε έπεται αυτής. Οι LaMer και Dinegar (1950) υποστήριξαν ότι για τη διαδικασία της σύνθεσης μονοδιασπαρμένων νανοκρυστάλλων απαιτείται ένα σύντομο στάδιο πυρηνοποίησης, που ακολουθείται από ένα αργό στάδιο ανάπτυξης. Όσο καλύτερα διαχωρίζονται τα παραπάνω στάδια τόσο πιο ομοιογενή σωματίδια παράγονται.

Οι διαλυόμενες ουσίες αποτελούν την πηγή σχηματισμού των σωματιδίων και δημιουργούνται μέσω μιας χημικής αντίδρασης (π.χ. υδρόλυση μεταλλικών αλάτων, διάσπαση ορφανικών ενώσεων κ.α.). Καθώς προχωράει η αντίδραση, η συγκέντρωση αυξάνεται, ξεπερνά τη συγκέντρωση του υπέρκορου διαλύματος και φτάνει σε μια κρίσιμη τιμή (super saturation) όπου γίνεται μια έκρηξη σχηματισμού πυρήνων (πυρήνωση ή πυρηνοποίηση, nucleation).

Ιδιότητες των νανοσωματιδίων

Τα νανοσωματίδια προσφέρουν αποδεδειγμένα μοναδικές ιδιότητες, οι οποίες μάλιστα από μεγάλο μέρος της επιστημονικής κοινότητας περιγράφονται και ως «κβαντικές ιδιότητες». Η διαφοροποίηση αυτών σχετίζεται τις περισσότερες φορές με επιφανειακά φαινόμενα, γεγονός το οποίο είναι άρρηκτα συνδεδεμένο και με μία σειρά άλλων ιδιοτήτων, όπως η αύξηση της χημικής δραστηριότητας, ανάλογα με το υλικό και τους μηχανισμούς δράσης στην επιφάνειά τους. Αδιαφανή υλικά που γίνονται διαφανή (χαλκός), αδρανή υλικά που μετατρέπονται σε εύφλεκτη ύλη (αλουμίνιο) ή εξάαιρετοι χημικοί καταλύτες (χρυσός), συμπαγείς ουσίες που εξελίσσονται σε υγρά με χαμηλότερες θερμοκρασίες τήξης (χρυσός), και μονωτικά που άγουν (πυρίτιο), αποτελούν μερικές από τις αλλαγές που έχουν παρατηρηθεί στις

ιδιότητες των υλικών κατά τη μεταφορά στη νανοκλίμακα (Chaturvedi και συν., 2012).

- **Επιφανειακές ιδιότητες:** Μία από τις πιο χαρακτηριστικές ιδιότητες που αποκτούν τα υλικά, όταν μειώνεται το μέγεθός τους, είναι η αύξηση της ειδικής επιφάνειας, δηλαδή ο λόγος της επιφάνειας προς τον όγκο του υλικού, η οποία ταυτόχρονα συνοδεύεται από μεταβολή της επιφανειακής τους δομής (Qi και συν., 2004).
- **Ηλεκτρονικές ιδιότητες:** Όσο κατεβαίνουμε σε κλίμακα, τόσο περισσότερο πλησιάζει η ηλεκτρονική διαμόρφωση των σωματιδίων την περίπτωση μεμονωμένων ατόμων, όπου η πυκνότητα ηλεκτρονιακών καταστάσεων είναι διακριτή και συμβάλλει σε οξείες κορυφές φάσματος. Στα μέταλλα, οι ηλεκτρονικές ιδιότητες καθορίζονται από τη μέση ελεύθερη διαδρομή των ηλεκτρονίων, που κυμαίνεται από 5 έως 50 nm στις περισσότερες περιπτώσεις. Όταν το μέγεθος του κρυστάλλου γίνεται συγκρίσιμο, τα ηλεκτρόνια σκεδάζονται και στην επιφάνεια, οπότε η αντίσταση αυξάνεται (Mulvaney, 2001).
- **Οπτικές ιδιότητες:** Οι αλλαγές που παρατηρούνται στην ηλεκτρονική διαμόρφωση ενός κρυστάλλου, όταν το μέγεθός του περνάει στη νανοκλίμακα, έχουν εξίσου ενδιαφέρουσες επιπτώσεις και στις οπτικές του ιδιότητες. Λαμβάνοντας υπόψη τις διαφορετικές μεταπτώσεις ανάμεσα στις διαφοροποιημένες ενεργειακές ζώνες, η απορρόφηση και η εκπομπή ακτινοβολίας μεταβάλλεται ανάλογα με το μέγεθος των νανοσωματιδίων (Kumbhakar, 2014).
- **Καταλυτικές ιδιότητες:** Οι καταλύτες θεωρούνται ως μία από τις πιο επιτυχημένες εφαρμογές της νανοτεχνολογίας στη σημερινή εποχή. Ως γνωστόν, ένας καταλύτης επιταχύνει μια συγκεκριμένη αντίδραση χωρίς τελικά να μεταβάλλεται ως προς τη μορφή και τις ιδιότητές του. Καθώς το μέγεθος ενός καταλύτη μειώνεται, περισσότερα άτομα βρίσκονται στην επιφάνεια και λειτουργούν ως ενεργά κέντρα για την ολοκλήρωση της αντίδρασης, αυξάνοντας τη δραστηριότητα του υλικού (Davis και Tilley, 2003).
- **Μαγνητικές ιδιότητες:** Οι μαγνητικές ιδιότητες των υλικών διαφοροποιούνται αρκετά ανάλογα με το μέγεθος του νανοσωματιδίου, και ιδιαίτερα με τον αριθμό των ατόμων που απαρτίζουν το νανοσωματίδιο. Η μεταβολή είναι πιο εμφανής

στα μέταλλα 3d (όπως Fe και Co) και εξαρτάται άμεσα από το μέγεθος, το υλικό διασποράς και το πιθανό περίβλημά τους (Billas και συν., 1993).

Τεχνητή σπερματέγχυση

Η τεχνητή σπερματέγχυση (ΤΣ) αποτελεί ευρέως διαδεδομένη μέθοδο γονιμοποίησης των αγελάδων στις εντατικού τύπου εκμεταλλεύσεις βοοειδών (De Alencar Mota και συν., 2016) και αποτελεί οικονομικά συμφέρουσα μεθοδολογία γενετικής βελτίωσης (Roca και συν., 2006). Τα βασικά πλεονεκτήματά της έναντι της φυσικής οχείας οδήγησαν στην εμπορική της διάδοση και αφορούν πέραν της γενετικής βελτίωσης την ελαχιστοποίηση του κινδύνου μετάδοσης ασθενειών (Givens, 2018).

Στην γαλακτοπαραγωγική βοοτροφία παράγονται και χρησιμοποιούνται ετησίως 253 εκατομμύρια δόσεις κρυοσυντηρημένου σπέρματος και 11,7 εκατομμύρια δόσεις νωπού σπέρματος ταύρου (Thibier και Wagner, 2002). Στις ΗΠΑ, το 60% των γαλακτοπαραγωγικών και το 8% των κρεοπαραγωγικών εκτροφών χρησιμοποιούν τη ΤΣ ως μέθοδο επιλογής για τη γονιμοποίηση των θηλυκών, αντίστοιχα (Zuidema και συν., 2021). Ακόμα μεγαλύτερη δημοτικότητα απέκτησε η τεχνητή σπερματέγχυση στην προσανατολισμένη αγελαδοτροφία για τη βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων της Βόρειας Ευρώπης, του Ισραήλ, της Ιαπωνίας και της Νέας Ζηλανδίας όπου αντιπροσωπεύει το 80 έως 90% των γονιμοποιήσεων.

Συλλογή αραίωση και συντήρηση του σπέρματος

Η κρυοσυντήρηση είναι ευρέως διαδεδομένη μέθοδος συντήρησης του σπέρματος σε πολλά είδη ζώων με κύρια εμπορική χρήση στα βοοειδή (Foote, 1996). Η διαδικασία κρυοσυντήρησης του σπέρματος περιλαμβάνει την αραίωση του εκσπερματίσματος (dilution/extension), τη μείωση της θερμοκρασίας του (cooling), την προσθήκη του αραιωτικού κρυοσυντήρησης το οποίο είναι εμπλουτισμένο με κρυοπροστατευτικές ουσίες (γλυκερόλη), την κατάψυξη (freezing), την αποθήκευση σε υγρό άζωτο θερμοκρασίας -196°C και τέλος την αναβίωση του πριν από τη χρήση του (Sathe και συν., 2014).

Η ορθή συλλογή και συντήρηση του σπέρματος αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη διαθεσιμότητα ενός ασφαλούς και κατάλληλου προϊόντος για την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης. Κατά τη διαδικασία συλλογής και επεξεργασίας του σπέρματος λαμβάνονται όλα τα απαραίτητα μέτρα υγιεινής προς αποτροπή επιμόλυνσης και παρουσίας αυξημένου μικροβιακού φορτίου.

Η χρήση των αραιωτικών κρυοσυντήρησης αποβλέπει στην ελαχιστοποίηση των αρνητικών επιπτώσεων της εν λόγω τεχνολογίας στα σπερματοζώαρια (Wu και συν. 2013), μέσω των κρυοπροστατευτικών, των λιποπρωτεϊνών, των ρυθμιστών παραγόντων του pH (buffer) και της ωσμωτικής πίεσης καθώς και των αντιβιοτικών που περιέχουν (Johnson και συν., 2000).

Τα αραιωτικά διαλύματα αποτελούνται συνήθως από τέσσερα βασικά συστατικά όπως:

- ιοντικές ή μη ιονικές ουσίες για τη διατήρηση της ωσμωτικότητας
- γλυκερόλη, προπανοδιόλη ή διμεθυλοσουλφοξειδίο (Dimethylsulfoxide-DMSO) για την παροχή κρυοπροστασίας
- πηγή λιποπρωτεΐνης ή υλικού υψηλού μοριακού βάρους για την πρόληψη της καταπληξίας του ψύχους, όπως ο κρόκος αυγού ή το γάλα
- γλυκόζη ή φρουκτόζη ως πηγή ενέργειας
- άλλα πρόσθετα όπως ένζυμα και αντιβιοτικά

Ο κρόκος του αυγού θεωρείται ο πιο σημαντικός παράγοντας έναντι της καταπληξίας του ψύχους (Bergeron και Manjunath, 2006). Αποτελεί βασικό συστατικό των αραιωτικών συντήρησης του σπέρματος του κάπρου, του ταύρου, του κριού, του τράγου, του επιβήτορα, του σκύλου και του ανθρώπου (νωπού ή κρυοσυντηρημένου). Οι λιποπρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους (low density lipoproteins, LDL), η χοληστερόλη και τα φωσφολιπίδια που περιέχει προστατεύουν την κυτταροπλασματική μεμβράνη έναντι της καταπληξίας του ψύχους (Bergeron και Manjunath, 2006).

Τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται διεθνής ζήτηση για τη χρήση υλικών φυσικής προέλευσης στα αραιωτικά σπέρματος διαφόρων ζωικών ειδών (Mehdipour και συν., 2017, Ahmed και συν., 2020) μεταξύ των οποίων είναι η φράουλα (El-Sheshtawy και El-Nattat, 2018), το πράσινο τσάι (Ahmed και συν., 2020), το παρθένο λάδι καρύδας

(Tarig και συν., 2017), το ρόδι (Mehdipour και συν., 2017) κ.α.. Οι θετικές επιδράσεις αρκετών φυτικών εκχυλισμάτων στη γονιμότητα έχουν αποδειχθεί σε πολλά είδη ζώων, λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους και της δέσμευσης των ελεύθερων ριζών (Sharma και συν., 2013).

Χρήση αντιβιοτικών

Παρά τα μέτρα που λαμβάνονται κατά τη συλλογή του σπέρματος δεν είναι δυνατό το τελικό προϊόν να είναι ελεύθερο από μικροοργανισμούς. Πλήθος εργασιών αναφέρουν ως πιθανές πηγές βακτηριακών μολύνσεων του σπέρματος που συλλέγεται για ΤΣ τον αέρα, τον εξοπλισμό που χρησιμοποιείται για τη συλλογή του (Althouse, 2008), τους μικροοργανισμούς της φυσιολογικής χλωρίδας του βλεννογόνου και του δέρματος του πέους και της ακροποσθίας (Malmgren, 1998), τα υλικά του εργαστηρίου και το εργαστηριακό περιβάλλον (Bhakat και συν., 1997, Perumal και συν., 2013, Sannat και συν., 2015). Οι πιο συνηθισμένοι μικροοργανισμοί που έχουν ανιχνευθεί στο σπέρμα του ταύρου ανήκουν στα είδη *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, και *Stenotrophomonas* (Najee και συν., 2012, Zampieri και συν., 2013, Mitra και συν., 2016). Βακτήρια, όμως, έχουν απομονωθεί και κατά την αποθήκευση του σπέρματος στους -196°C σε υγρό άζωτο (Ahmed και συν., 2001, Shukla 2005, Mitra και συν., 2016). Για την αποφυγή της περαιτέρω ανάπτυξης των μικροοργανισμών που ενδεχομένως υπάρχουν στο σπέρμα είναι απαραίτητη η προσθήκη αντιβιοτικών στα αραιωτικά μέσα.

Η δράση των αντιβιοτικών στηρίζεται στην αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και ειδικά στη φάση του πολλαπλασιασμού τους. Έτσι, αποφεύγονται οι βλάβες των σπερματοζωαρίων, η τοξικότητα των προϊόντων του μεταβολισμού τους και η μεταβολή της ωσμωτικής πίεσης.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός για την Υγεία των Ζώων (OIE) καθορίζει τρεις συνδυασμούς αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στο διεθνές εμπόριο σπέρματος βοοειδών: i) γενταμυκίνη (250 μg), τυλοσίνη (50 μg), λινκομυκίνη-σπεκτινομυκίνη (150/300 μg) (GTLS) ανά mL κατεψυγμένου σπέρματος ii) πενικιλίνη (500 IU),

στρεπτομυκίνη (500 µg), λινκομυκίνη-σπεκτινομυκίνη (150/300 µg) (PSLS) ή iii) αμικασίνη (75 µg), διβεκασίνη (25 µg). Η οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης 88/407/1993 περιλαμβάνει τη χρήση του προαναφερόμενου PSLS ή έναν εναλλακτικό συνδυασμό αντιβιοτικών με ισοδύναμη δράση κατά των καμπυλοβακτηρίων, των λεπτόσπειρων, και των μυκοπλασμάτων (Falchi και συν., 2018). Ωστόσο, αυτός ο συνδυασμός δεν έχει αποδειχθεί ικανός να εξαλείψει πλήρως το μυκόπλασμα μετά από πειραματική μόλυνση σε καταψυγμένο σπέρμα ταύρου (Shin και συν., 1988, Visser και συν., 1999).

Στη σημερινή εποχή τα αντιμικροβιακά είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα στην ιατρική πρακτική, στη γεωργία, στην κτηνοτροφία (Sarmah και συν., 2006) και στις ιχθυοκαλλιέργειες (Hoa και συν., 2011), ως ενισχυτές ανάπτυξης ή ως προστατευτικοί παράγοντες της ανάπτυξης (Cabello, 2006). Η ευρεία χρήση τους οδηγεί στη συνεχή απελευθέρωση τους στο φυσικό οικοσύστημα, η οποία αναπόφευκτα οδηγεί με τη σειρά της στην ανάπτυξη μικροβιακής αντοχής στα μικρόβια του περιβάλλοντος, λόγω της εξελικτικής πίεσης που ασκείται στο βακτηριακό πληθυσμό. Μικρόβια ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά φάρμακα μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο είτε άμεσα είτε έμμεσα γεγονός που καταδεικνύει ότι η κλινική αντοχή των μικροβίων σχετίζεται άμεσα και με την αντοχή των μικροβίων που βρίσκονται στο φυσικό περιβάλλον (Abriouel και συν., 2008, Grundmann και συν., 2011).

Η αντοχή στα αντιβιοτικά έχει οδηγήσει σε ανεπαρκείς θεραπευτικές προσεγγίσεις ορισμένων βακτηριακών λοιμώξεων (ιδιαίτερα σε ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού) αυξάνοντας, επίσης, τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα σε παγκόσμιο επίπεδο (Grundmann και συν., 2011). Ως εκ τούτου, η εν λόγω συνθήκη αποτελεί πλέον έναν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία και απαιτεί επαγρύπνηση και επιτήρηση τόσο στις ανεπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες, καθιστώντας κρίσιμη την ανάγκη για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών τεχνολογιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικές ή σε συνδυασμό με συμβατικές αντιμικροβιακές θεραπείες έναντι πλήθους νοσημάτων (Kaushik, 2019).

Προσθήκη εναλλακτικών αντιμικροβιακών ουσιών

Οι εναλλακτικές των αντιβιοτικών αντιμικροβιακές ουσίες πρέπει να πληρούν μια πληθώρα κριτηρίων για να θεωρηθούν συμπληρώματα για τα αραιωτικά του σπέρματος: 1) ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης, 2) απουσία τοξικότητας έναντι των σπερματοζωαρίων, 3) καμία δυσμενή παρέμβαση στη γονιμότητα, 4) υψηλή σταθερότητα, 5) υψηλή αντιμικροβιακή δραστηριότητα σε κοινές θερμοκρασίες σπέρματος, 6) χαμηλή δυνατότητα πρόκλησης ανοχής, 7) ευκολία εφαρμογής και 8) οικονομική σκοπιμότητα (Schulze και συν., 2016). Πολλά πρόσθετα έχουν μελετηθεί από διάφορες ερευνητικές ομάδες όπως παρατίθενται παρακάτω:

- **Αντιμικροβιακά πεπτίδια.** Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια (AMPs) αποτελούν μέρος του φυσικού αμυντικού συστήματος σχεδόν κάθε ζωντανού οργανισμού και μελετώνται όλο και περισσότερο τόσο ως εναλλακτικά όσο και ως συνεργικά των αντιβιοτικών. Τα AMPs αφενός, έχουν άμεση, ευρέως φάσματος δράση έναντι αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων, μυκήτων, ιών και παρασίτων και, αφετέρου, ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση μέσω διέγερσης της ανοσίας και μείωσης των δυνητικά επιβλαβών προφλεγμονωδών αντιδράσεων (Hancock και Sahl, 2006).
- **Βακτηριοσίνες.** Οι βακτηριοσίνες είναι μικρά πεπτίδια με αντιμικροβιακά χαρακτηριστικά που παράγονται από βακτήρια για να εξασφαλίσουν το πλεονέκτημα της ανάπτυξής τους έναντι ανταγωνιστικών βακτηρίων (Jack και συν., 1995). Η ερευνητική ομάδα των Shaoyong και συν.(2019a και 2019b) μελέτησε τις βακτηριοσίνες, ε-πολυλυσίνη και κοζικό οξύ ως προς τις επιπτώσεις στην ποιότητα του σπέρματος του κάπρου.
- **Φυτικά εκχυλίσματα.** Τα αιθέρια έλαια (essentials oils, EOs) είναι μεταβολίτες φυτών με κύριο συστατικό τα τερπενοειδή για την προστασία τους από βακτηριακές λοιμώξεις, ζυμομύκητες και άλλες απειλές (Nazzaro και συν., 2013). Οι μηχανισμοί της δραστηριότητάς τους είναι ευρείς με απλούς ή πολλαπλούς στόχους εξαρτώμενοι από τη συγκέντρωσή τους. Ο βαθμός δραστηριότητας συνδέεται με τη χημική δομή του EO, τις φαινολικές ενώσεις και τη δομή επιπρόσθετων ομάδων που καθορίζουν την έκταση του υδρόφοβου χαρακτήρα τους. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα λόγω της

δομής του κυτταρικού τους τοιχώματος που επιτρέπει στα υδρόφοβα ΕΟ να διεισδύσουν και να δρουν απευθείας στο κυτταρικό τοίχωμα, στο κυτταρόπλασμα ή στην εξάντληση της ενδοκυτταρικής παραγωγής ATP (Nazzaro και συν., 2013). Επίσης, φυτικά εκχυλίσματα, όπως το μορίνγκα (*Moringa oleifera*) και η πιπερόριζα (*Ginger*) επέδειξαν αντιβακτηριακή δράση στο σπέρμα του ταύρου και του κριού (Morrell και συν., 2018). Το έλαιο δέντρου τσαγιού άσκησε αντιβακτηριακή δράση στο σπέρμα του κάπρου (Morrell και συν., 2018) και τέλος το ρομάτζι (*Romaji*) βρέθηκε ότι είναι αποτελεσματικό έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων στο σπέρμα του ταύρου (Morrell και συν., 2018).

- **Φυσικά προϊόντα.** Σε μελέτες με διαφορετικούς στόχους, έχει αποδειχθεί ότι φυσικά προϊόντα, όπως το μέλι έχουν αντιβακτηριακή δράση . Το συγκεκριμένο φυσικό προϊόν έδρασε ως αντιοξειδωτικό, κρυσταλλοπροστατευτικό καθώς και ως πηγή ενέργειας βελτιώνοντας την ποιότητα του αποψυγμένου σπέρματος του ταύρου (Yimer και συν., 2015), του κριού (Jerez-Ebensperger και συν., 2015), του τράγου (Olayemi και Adeniji, 2011), βούβαλου (El-Nattat και συν., 2016) και του ανθρώπου (Fakhridin και Rana, 2014).

Παράμετροι εκτίμησης των ποιοτικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών του σπέρματος

Η γονιμοποιητική ικανότητα ενός εκσπερματίσματος σχετίζεται με την ποιότητά του. Η εξέταση του σπέρματος αποτελεί την πρώτη και κύρια εργασία μετά τη σπερματοληψία. Η πρόγνωση της γονιμότητας του σπέρματος καθίσταται εγκυρότερη με την εκτίμηση όσο το δυνατόν περισσότερων παραμέτρων. Στα κέντρα σπερματέγχυσης, οι βασικές παράμετροι που εκτιμώνται αφορούν στην πυκνότητα, στην κινητικότητα και στη ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων με τη χρήση απλών δοκιμών. Σε ερευνητικά εργαστήρια η εκτίμηση του σπέρματος περιλαμβάνει και άλλες εξειδικευμένες δοκιμές για τις οποίες απαιτείται ειδικός εξοπλισμός.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην πράξη για την εξέταση του σπέρματος έχουν ως σκοπό: α) την επιλογή των σπερματοδοτών ζώων που πληρούν τις προϋποθέσεις για την εισαγωγή τους σε προγράμματα τεχνητής σπερματέγχυσης, β) την επιλογή

του κατάλληλου εκσπερματίσματος για την περαιτέρω επεξεργασία του και την παραγωγή δόσεων ΤΣ και γ) τον υπολογισμό της αραιώσης των δόσεων σπέρματος.

Η κινητικότητα θεωρείται ως ένα από τα πλέον σημαντικά ποιοτικά χαρακτηριστικά πρόγνωσης της γονιμοποιητικής ικανότητας των σπερματοζωαρίων (López Rodríguez και συν., 2012). Συγκεκριμένα, καταγράφονται τα ποσοστά των σπερματοζωαρίων που επιδεικνύουν ισχυρή προοδευτική κίνηση, μη προοδευτική κίνηση ή είναι στατικά. Οι επιμέρους μορφές κίνησης που εκτιμώνται με τον υποβοηθούμενο από ηλεκτρονικό υπολογιστή αναλυτή σπέρματος CASA είναι οι εξής: α) η μέση ταχύτητα της ελικοειδούς πορείας των κινούμενων σπερματοζωαρίων (Curvilinear velocity, VCL, $\mu\text{m}/\text{sec}$), β) η μέση ταχύτητα της κίνησης των σπερματοζωαρίων σε ευθεία κατά τη μετάβαση τους από το σημείο εκκίνησης έως το σημείο τερματισμού (Straight-line velocity, VSL, $\mu\text{m}/\text{sec}$), γ) η μέση προωθητική ταχύτητα των σπερματοζωαρίων (Average path velocity, VAP, $\mu\text{m}/\text{sec}$), δ) το εύρος της προς τα πλάγια κίνησης των κεφαλών (Amplitude of lateral head displacement, ALH, μm), ε) η συχνότητα διασταύρωσης της κεφαλής με τη μέση νοητή γραμμή κίνησης (Beat cross frequency, BCF, Hz), στ) η αναλογία $VSL/VAP \times 100$, (straightness, STR), ζ) η αναλογία $VSL/VCL \times 100$, (linearity, LIN) και η) η αναλογία $VAP/VCL \times 100$, (wobble, WOB) (WHO, 2010).

Είθισται συχνά σε επίπεδο εκτροφής, η ζωτικότητα να εκτιμάται χωρίς την προηγούμενη χρώση των σπερματοζωαρίων με ειδικό πρωτόκολλο. Υπό αυτή τη συνθήκη, το ποσοστό των κινούμενων σπερματοζωαρίων ανά οπτικό πεδίο ταυτίζεται με το ποσοστό των ζωντανών σπερματοζωαρίων, δηλαδή αυτών που παρουσιάζουν ακέραιες μεμβράνες, σε αντίθεση με τα ακίνητα τα οποία κατηγοριοποιούνται ως νεκρά (ρήξη μεμβρανών). Η ζωτικότητα του αρχικού εκσπερματίσματος που χρησιμοποιείται για τεχνητή σπερματέγχυση, ως νωπό αραιωμένο ή κρυοσυντηρημένο, θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 70% και συνδέεται άρρηκτα με τη γονιμότητα (Januskauskas και συν., 2003). Υπολογίζεται ότι η ζωτικότητα του σπέρματος του ταύρου μετά τη διαδικασία της κατάψυξης/απόψυξης κυμαίνεται περίπου στο 50 % (Januskauskas και συν., 2003, Felipe-Perez και συν., 2008).

Η κλασική εκτίμηση των βασικών παραμέτρων του σπέρματος (πυκνότητα, κινητικότητα, μορφολογία) χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της γονιμότητάς του, ωστόσο είναι αποδεκτό πως η λειτουργική ακεραιότητα της κυτταροπλασματικής

μεμβράνης έχει συγκριτικά μεγαλύτερη διαγνωστική αξία. Η τελευταία εκτιμάται κυρίως με την εφαρμογή της βιοχημικής δοκιμής αντοχής των σπερματοζωαρίων έναντι της καταπόνησης σε υπόωσμωτικό διάλυμα (HOST, Hypo-Osmotic Swelling Test). Η δοκιμή HOST εφαρμόστηκε με επιτυχία για πρώτη φορά στον άνθρωπο (Jeyendran και συν., 1984) και στην πορεία, και σε άλλα είδη (Correa και Zavos, 1994). Τα σπερματοζωάρια με βιοχημικά ενεργή κυτταροπλασματική μεμβράνη που εκτίθενται σε υπο-ωσμωτικό διάλυμα καταπονούνται και λόγω της εισροής ύδατος παρουσιάζουν διόγκωση στο τμήμα της ουράς και όχι της κεφαλής (Vazquez και συν., 1997).

Κασσίτερος (Sn) και οξείδιο του κασσιτέρου

Κασσίτερος (Sn)

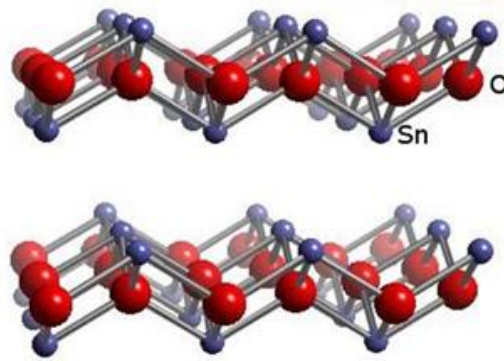
Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και χρήσεις του κασσιτέρου (Sn)

- Πυκνότητα: 7,29 kg/dm³
- Σημείο τήξης: 232 °C
- Αντοχή εφελκυσμού: 40-50 N/mm²
- Ειδική επιμήκυνση: 40%

Ο κασσίτερος έχει λευκό χρώμα και είναι μεταλλικό υλικό με χαμηλή αντοχή εφελκυσμού. Οι ιδιότητες του κασσιτέρου, στις οποίες οφείλονται οι βιομηχανικές του εφαρμογές, είναι η πολύ μεγάλη αντοχή στην οξείδωση και το χαμηλό σημείο τήξης. Το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής κασσιτέρου χρησιμοποιείται για την προστασία του χάλυβα από την οξείδωση (επικασσιτέρωση) και ως συστατικό στην παραγωγή κραμάτων (κράματα χαλκού).

Οξείδιο του κασσιτέρου (II – δισθενής)

Ο μοριακός τύπος του οξειδίου του κασσιτέρου είναι SnO, και έχει μοριακό βάρος 134,709. Το χρώμα του είναι μαύρο και έχει στερεή κρυσταλλική μορφή (Εικόνα 4). Το σημείο τήξης του βρίσκεται στους 1080°C και έχει πυκνότητα 6450 kg/m³.

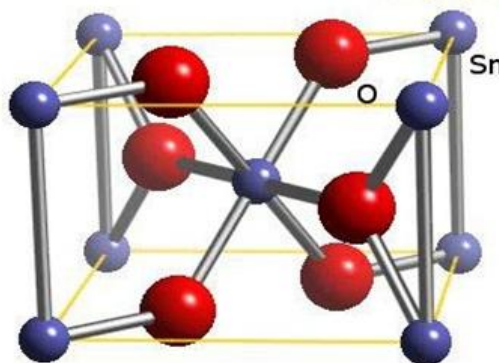


Εικόνα 4: Η δομή του κρυστάλλου του SnO

Στην περίπτωση αυτή το ποσοστό του οξυγόνου είναι 11,88% και έχει ηλεκτρονική διαμόρφωση [He].2s².2p⁶, ενώ ο κασσίτερος καταλαμβάνει ποσοστό που φτάνει το 88,12% και έχει ηλεκτρονική διαμόρφωση [Kr].4d¹⁰.5s².

Οξείδιο του κασσιτέρου (IV-τετρασθενής)

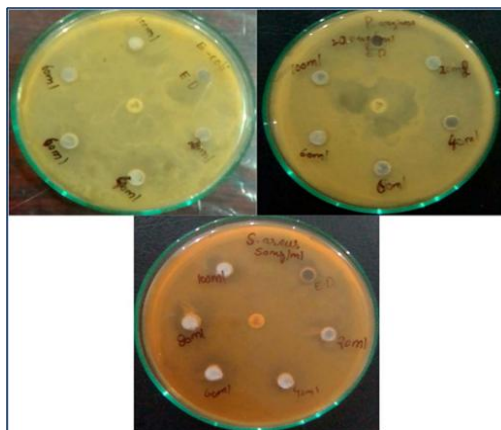
Ο μοριακός τύπος του οξειδίου του κασσιτέρου (IV) είναι SnO₂ και έχει μοριακό βάρος 150,709. Το χρώμα του είναι λευκό ή γκρι και έχει στερεή κρυσταλλική μορφή (Εικόνα 5). Το σημείο τήξης του, εκεί δηλαδή που αποσυντίθεται, βρίσκεται στους 1630°C, το σημείο βρασμού του στους 1900°C και έχει πυκνότητα 6900 kg/m³. Στην περίπτωση αυτή το ποσοστό του οξυγόνου είναι 21,23% και έχει ηλεκτρονική διαμόρφωση [He].2s².2p⁶, ενώ ο κασσίτερος καταλαμβάνει ποσοστό που φτάνει το 78,77% και έχει ηλεκτρονική διαμόρφωση [Kr].4d¹⁰.



Εικόνα 5: Η δομή του κρυστάλλου του SnO₂

Τα νανοσωματίδια του οξειδίου του κασσιτέρου SnO₂ έχουν αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριδιακές ιδιότητες. Πολλές χημικές και φυσικές προσεγγίσεις έχουν αναπτυχθεί από ερευνητές για τη σύνθεση νανοσωματιδίων SnO₂,

συμπεριλαμβανομένων των διεργασιών υδροθερμικής, συν-κατακρήμισης, κολλοειδούς πήγματος, χημικής εναπόθεσης ατμών, καρβοθερμικών και διαλυτοθερμικών διεργασιών (Din και συν., 2022). Ο ακριβής μηχανισμός της αντιβακτηριακής δράσης των SnO₂NPs δεν είναι ακόμη γνωστός. Ωστόσο, θεωρείται πιθανόν πως η απελευθέρωση κατιόντων Sn σε υδατικό διάλυμα τους προσδίδει την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη διαφόρων βακτηριακών ειδών (Haq και συν., 2021) (εικόνα 6).



Εικόνα 6: Πειραματικές φωτογραφίες που αποτυπώνουν την αντιβακτηριακή δραστηριότητα των νανοσωματιδίων του SnO₂ σε (α) = *E. coli*, (β) = *P. aeruginosa* και (γ) = *S. aureus* (Haq, 2021)

ΣΚΟΠΟΣ

Το αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν, ως πρώτο βήμα, η εύρεση της μη βλαπτικής συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων κασσιτέρου στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του κρυο-συντηρημένου σπέρματος του ταύρου. Ο προσδιορισμός της μη κυτταροτοξικής συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων κασσιτέρου θα προσδώσει τη δυνατότητα εκμετάλλευσης των αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους, ώστε να διερευνηθεί σε δεύτερο χρόνο η πιθανότητα εναλλακτικής των αντιβιοτικών χρήσης τους στα αραιωτικά μέσα του σπέρματος του ταύρου.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Προέλευση βιολογικών υλικών

Για την υλοποίηση της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν 96 δείγματα/μικροσωληνάρια (straws) εμπορικά διαθέσιμα δείγματα κρυοσυντηρημένου σπέρματος ταύρου (φυλής Holstein) από το Ινστιτούτο Αναπαραγωγής και Τεχνητής Σπερματέγχυσης Διαβατών. Τα δείγματα κρυοσυντηρημένου σπέρματος ταύρου μεταφέρονταν αποθηκευμένα σε τράπεζα συντήρησης σπέρματος με υγρό άζωτο (-196°C, GT40, Air Liquide, Paris, France) στη Μονάδα Βιοτεχνολογίας της Αναπαραγωγής, Κλινική Παραγωγικών Ζώων, Τμήμα Κτηνιατρικής Α.Π.Θ., όπου έγινε η διεξαγωγή των πειραμάτων.

Αντιδραστήρια και υποστρώματα

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια υψηλής καθαρότητας από αξιόπιστες εμπορικές εταιρείες:

- Εωσίνη (Eosin, 32617, Riedel-de Haen[®], Sigma Aldrich, Seelze, Germany)
- Νιγροσίνη (Nigrosin, 8005-03-6, Aldrich[®], Milwaukee, USA)
- Ως διάλυμα έκπλυσης του σπέρματος χρησιμοποιήθηκε φωσφορικό διάλυμα PBS (phosphate-bufferedsaline, PBS)
- Υπό-ωσμωτικό διάλυμα (hypo-osmotic swelling test, HOST)

Η σύνθεση του διαλύματος HOST, όγκου 1L ήταν η ακόλουθη: α) 13,51gr φρουκτόζη και β) 9,35gr κιτρικό νάτριο (sodium citrate) σε απεσταγμένο νερό (1 L). Η ωσμωτική πίεση του διαλύματος ρυθμιζόταν στα 150 mOsm/Kg με τη συσκευή μέτρησης ωσμωτικής πίεσης (Cryoscopic Osmometer, Osmomat[®] 030, Gonotec, Germany).

Για την παρασκευή του μητρικού διαλύματος νανοσωματιδίων κασσιτέρου, γινόταν διάλυση 0,25 gNPs κασσιτέρου σε 100 mL απεσταγμένου νερού.

Εργαστηριακά όργανα

Χρησιμοποιηθήκαν τα παρακάτω εργαστηριακά όργανα:

- Αναλυτής σπέρματος υποβοηθούμενος από ηλεκτρονικό υπολογιστή (Computer Assisted Semen Analysis CASA), Sperm Class Analyser[®] (MicropticS.L., Automatic Diagnostic Systems, Ισπανία), λογισμικό Sperm Class Analyzer software (SCA[®]v.5.2.0.0., Microptic S.L., Ισπανία).
- Μικροσκόπιο (AXIO Scope A1, Zeiss, Germany) με θερμαινόμενη τράπεζα και κάμερα (Baslersc A780 54fc, Basler vision technology, Γερμανία)
- Θάλαμος Makler (Sefi Medical Instruments, Ισραήλ)
- Υδατόλουτρο επώασης (37°C), (Memmert Waterbath WB 22, Γερμανία)
- Θερμαινόμενη τράπεζα (Leica HI 1220, Γερμανία)

Προετοιμασία διαλυμάτων νανοσωματιδίων κασσιτέρου

Η παραγωγή υδροξυ-οξειδίου του κασσιτέρου πραγματοποιήθηκε με καταβύθιση SnCl₂ ενώ το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 2 χωρίς ρύθμιση του οξειδωτικού δυναμικού. Πιο συγκεκριμένα, για τη σύνθεση του προσροφητικού υλικού, υδροξυ-οξειδίου του κασσιτέρου ζυγίστηκαν 0,75 g SnCl₂ και στη συνέχεια ακολούθησε διάλυση της ποσότητας σε περίπου 300 ml απεσταγμένου νερού με ταυτόχρονη προσθήκη πυκνού υδροχλωρικού οξέος έως ότου το διάλυμα γίνει διαυγές. Η ρύθμιση του pH κατά την σταδιακή εισαγωγή του διαλύματος SnCl₂ στον αντιδραστήρα έγινε με προσθήκη διαλύματος NaOH. Η αντίδραση περιγράφεται σύμφωνα με την αντίδραση: $3\text{SnCl}_2 + \text{NaOH} \rightarrow \text{Sn}_3\text{O}(\text{OH})_2\text{Cl}_2 + 4\text{NaCl} + \text{H}^+$

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό και πραγματοποιήθηκε δύο φορές πλύση του ιζήματος με απεσταγμένο νερό με στόχο την απομάκρυνση των υδατοδιαλυτών αλάτων και των παραπροϊόντων. Στη συνέχεια, ακολούθησε φυγοκέντρηση, ξήρανση στους 100°C, λειοτρίβιση σε γουδί και μορφοποίηση του στερεού προϊόντος σε κοκκομετρία < 63 μm.

Από το χαρακτηρισμό του υλικού διαπιστώθηκε ότι η σχηματιζόμενη φάση είναι υδροξυ-οξειδίου του κασσιτέρου με χημικό τύπο Sn₂₁Cl₁₆(OH)₁₄O₆ που αντιστοιχεί στην κρυσταλλική δομή του αμπχουρίτη.

Πειραματικός σχεδιασμός

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 12 πειραματισμοί και χρησιμοποιήθηκε το περιεχόμενο από 96 μικροσωληνάκια (straws). Σε κάθε πειραματισμό γινόταν αναθέρμανση 8 μικροσωληναρίων (2 μικροσωληνάκια/ομάδα, 0,5 ml έκαστο) και σχηματίζονταν οι ακόλουθες πειραματικές ομάδες:

1. Μάρτυρας σπέρματος (ομάδα ελέγχου): αναθερμασμένο σπέρμα ταύρου, χωρίς επιπλέον επεξεργασία.
2. Νανοδοματίδια κασσιτέρου χαμηλής συγκέντρωσης (ομάδα 20): αναθερμασμένο σπέρμα με την προσθήκη νανοδοματιδίων κασσιτέρου σε συγκέντρωση **20 μl** μητρικού διαλύματος NPs κασσιτέρου/ml αναθερμασμένου σπέρματος
3. Νανοδοματίδια κασσιτέρου μέσης συγκέντρωσης (ομάδα 40): αναθερμασμένο σπέρμα με την προσθήκη νανοδοματιδίων κασσιτέρου σε συγκέντρωση **40μl** μητρικού διαλύματος NPs κασσιτέρου /ml αναθερμασμένου σπέρματος.
4. Νανοδοματίδια κασσιτέρου υψηλής συγκέντρωσης (ομάδα 80): αναθερμασμένο σπέρμα με την προσθήκη νανοδοματιδίων κασσιτέρου σε συγκέντρωση **80μl** μητρικού διαλύματος NPs κασσιτέρου /ml αναθερμασμένου σπέρματος

Ακολούθως, τα δείγματα όλων των ομάδων αραιώνονταν με διπλάσιο όγκο (1:2, v/v) προθερμασμένου (37°C) φωσφορικού διαλύματος έκπλυσης (phosphate-buffered saline, PBS και τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο (37°C) για δίωρη επώαση.

Ως ώρα μηδέν (0h), ορίστηκε ο χρόνος προσθήκης των νανοδοματιδίων και η έναρξη της επώασης. Τις ώρες 0, 1 και 2 μετά από την προσθήκη των νανοδοματιδίων σε όλες τις πειραματικές ομάδες εκτιμήθηκαν οι παράμετροι: ζωτικότητα, κινητικότητα και οι επιμέρους μορφές κίνησης. Η δοκιμή HOST αξιολογήθηκε μόνο στις ώρες επώασης 1 και 2.

Εργαστηριακή εξέταση του σπέρματος

Αναβίωση του κρυοσυντηρημένου σπέρματος ταύρου

Η αναβίωση κάθε μικροσωληναρίου σπέρματος ταύρου γινόταν με την εμβάπτιση του σε υδατόλουτρο στους 37°C για 30 sec.

Εκτίμηση παραμέτρων της κινητικότητας και των επί μέρους κινήσεων των σπερματοζωαρίων

Για την εκτίμηση της κινητικότητας σε κάθε πειραματική ομάδα, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα CASA.

και ακολουθήθηκαν τα ακόλουθα βήματα:

- Ήπια ανάδευση του περιεχομένου κάθε φιαλιδίου (eppendorf) για την ομογενοποίηση του αραιωμένου σπέρματος
- Λήψη 10 μl δείγματος σπέρματος, τοποθέτησή του στο κέντρο της επιφάνειας προθερμασμένου (37 °C) θαλάμου Makler. Οι ρυθμίσεις του λογισμικού συστήματος CASA ορίστηκαν ως εξής: 8 πεδία και >500 σπερματοζωάρια, 25 εικόνες/δευτερόλεπτο, περιοχή ελέγχου σωματιδίων 10-80 microns, προοδευτική κίνηση >70% της παραμέτρου STR, κυκλωτερής κίνηση <50% LIN, βάθος πεδίου 10 μm και θερμοκρασία της τράπεζας του μικροσκοπίου 37°C. Η εκτίμηση της κινητικότητας κάθε δείγματος γινόταν κατόπιν λήψης εικόνων από τουλάχιστον 4 διαφορετικά πεδία ώστε να καταγραφούν οι κινήσεις 500 ή περισσότερων σπερματοζωαρίων.

Οι παράμετροι CASA που εκτιμήθηκαν ανά δείγμα ήταν οι ακόλουθες:

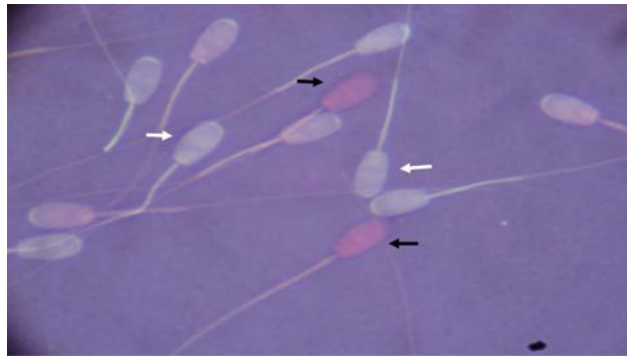
- Συνολική κινητικότητα (%)
- Μη-προοδευτική κινητικότητα (%)
- Προοδευτική κινητικότητα (%)
- Ταχέως κινούμενα σπερματοζωάρια (%)
- Μέσης ταχύτητας σπερματοζωάρια (%)
- Βραδέως κινούμενα σπερματοζωάρια (%)
- Ακίνητα σπερματοζωάρια (%)
- Η μέση ταχύτητα της ελικοειδούς πορείας των κινούμενων σπερματοζωαρίων (curvi linear velocity-VCL, μm/s)
- Η μέση ταχύτητα της κίνησης των σπερματοζωαρίων σε ευθεία, κατά τη μετάβαση τους από το σημείο εκκίνησης έως το σημείο τερματισμού (straight-line velocity-VSL, μm/s)

- Η μέση προωθητική ταχύτητα των σπερματοζωαρίων (average path velocity-VAP, $\mu\text{m/s}$)
- Το εύρος της προς τα πλάγια κίνησης των κεφαλών των σπερματοζωαρίων (amplitude of lateral head displacement-ALH, μm)
- Η συχνότητα διασταύρωσης των κεφαλών των σπερματοζωαρίων με τη μέση νοητή γραμμή κίνησης (beat cross frequency-BCF, Hz)
- Το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με υπερκινητικότητα (hyperactivation)
- Η αναλογία $\text{VSL/VAP} \times 100$ (straightness-STR)
- Η αναλογία $\text{VSL/VCL} \times 100$ (linearity-LIN)
- Η αναλογία $\text{VAP/VCL} \times 100$ (wobble-WOB)

Εκτίμηση της ζωτικότητας και της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων

Η εκτίμηση της ζωτικότητας και της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων σε κάθε πειραματική ομάδα γινόταν μετά από διπλή χρώση εωσίνης-νιγροσίνης σε ένα στάδιο με την ακόλουθη διαδικασία:

- Ανάμιξη 100 μl σπέρματος και 10 μl χρωστικής προθερμασμένων στους 37°C, σε φιαλίδιο eppendorf
- Επώαση του μίγματος για 5 λεπτά, σε υδατόλουτρο (37°C)
- Λήψη ποσότητας 10 μl και επίστρωσή της σε αντικειμενοφόρο πλάκα με τη βοήθεια καλυπτρίδας, υπό γωνία 45°
- Ξήρανση του επιχρίσματος στην επιφάνεια θερμαινόμενης τράπεζας



Εικόνα 7: Η ζωτικότητα του σπέρματος αξιολογήθηκε με οπτικό μικροσκόπιο ($\times 1000$) μετά από χρώση εωσίνης-νιγροσίνης. Ζωντανά θεωρούνταν τα σπερματοζώαρια με μη χρωματισμένη κεφαλή (λευκά βέλη). Τα σπερματοζώαρια που είχαν χρωματισμένη κεφαλή (μαύρα βέλη) θεωρούνταν νεκρά (Buranaamnuay και συν., 2014)

Τα σπερματοζώαρια καθίστανται ευδιάκριτα στο σκοτεινό υπόβαθρο που δημιουργείται από τη νιγροσίνη. Τα ζωντανά δεν χρωματίζονται, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται λευκά, ενώ τα νεκρά, εξαιτίας της απώλειας της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης τους και της διείσδυσης της χρωστικής χρωματίζονται ροζ-μωβ (εικόνα 7).

Με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου, σε μεγέθυνση $\times 1000$ γινόταν εκτίμηση και καταμέτρηση 200 σπερματοζωαρίων και τα αποτελέσματα εκφράζονταν σε ποσοστιαία αναλογία (%).

Αναφορικά με τη μορφολογία, κατόπιν μικροσκοπικής παρατήρησης ($\times 100$) κατηγοριοποιήθηκαν σε σπερματοζώαρια με φυσιολογική μορφολογία ή με παρουσία μορφολογικών ανωμαλιών (κεφαλής, ουράς, παραμένον πρωτοπλασματικό σταγονίδιο). Συνολικά, καταμετρήθηκαν 200 σπερματοζώαρια και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό (%).

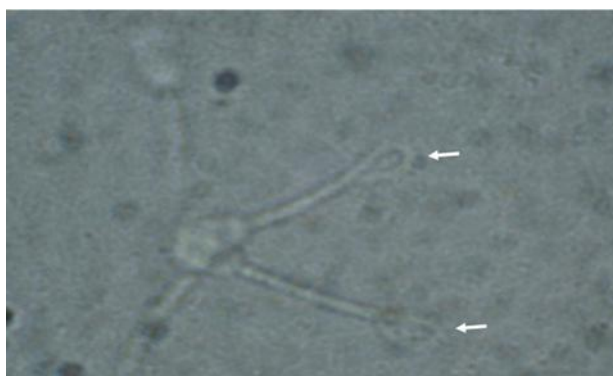
Εκτίμηση της λειτουργικής ικανότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων

Η εκτίμηση της λειτουργικής ικανότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων εφαρμόστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην εργασία των Lodhi, και συν., (2008) κατόπιν ορισμένων τροποποιήσεων.

Αναλυτικά, για τα δείγματα όλων πειραματικών ομάδων, τα στάδια της εν λόγω δοκιμής ήταν τα ακόλουθα:

- Ανάμιξη 100μl δείγματος σπέρματος με 1ml διαλύματος HOST (150 mOsm/Kg) και επώαση (37°C) για 1 ώρα.
- Εναπόθεση 20μl του επεξεργασμένου δείγματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα, παρασκευή επιχρίσματος με τη βοήθεια δεύτερης αντικειμενοφόρου πλάκας και ξήρανσή του στην επιφάνεια θερμαινόμενης τράπεζας.

Η εξέταση των δειγμάτων έγινε υπό μικροσκοπική παρατήρηση (x400). Διακόσια σπερματοζωάρια καταμετρούνταν και υπολογιζόταν το ποσοστό των σπερματοζωαρίων που έφερε εξοίδηση της ουράς (εικόνα 8).



Εικόνα 8: Δοκιμή HOST. Τα σπερματοζωάρια με διόγκωση της ουράς (βέλη) προσδιορίζονταν ως θετικά στη δοκιμή (Buranaamnuay και συν., 2014)

Στατιστική ανάλυση των δεδομένων

Για τη συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν δείκτες κεντρικής τάσης (μέσοι όροι και διάμεσες τιμές) και δείκτες διακύμανσης (ελάχιστες, μέγιστες τιμές, τυπικό σφάλμα στην εκτίμηση του μέσου όρου και τυπικές αποκλίσεις). Η ανάλυση των δεδομένων έγινε στο μεθοδολογικό πλαίσιο των μικτών γραμμικών υποδειγμάτων (mixed linear models) και βασίστηκε στο πλήρως τυχαιοποιημένο σχέδιο με ομάδες (RCBD) με τη μέθοδο ομάδων με υποομάδες (Split plot) (Μενεξές,

2013). Ειδικότερα, τα δεδομένα προσαρμόστηκαν στο μοντέλο που περιλαμβάνει τις επιδράσεις της επέμβασης και της χρονικής περιόδου καθώς και την αλληλεπίδραση αυτών. Για τις πολλαπλές συγκρίσεις μέσω των όρων χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο της Ελάχιστης Σημαντικής Διαφοράς. Επιπλέον υπολογίστηκαν οι συντελεστές παραλλακτικότητας (*CV-coefficient of variation*).

Το επίπεδο σημαντικότητας α των στατιστικών ελέγχων προκαθορίστηκε σε $\alpha=0,05$ ($p<0,05$). Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics (Version 28).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μελετήθηκε η επίδραση τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων νανοσωματιδίων οξειδίου του κασσιτέρου [ομάδα ελέγχου (0 μL), χαμηλής (20 μL), μέσης (40 μL) και υψηλής συγκέντρωσης (80 μL)] στο κρυο-συντηρημένο/αναθερμασμένο σπέρμα του ταύρου μετά από 0, 1, 2 ώρες επώασης(37°C) των δειγμάτων όλων των πειραματικών ομάδων.

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης-παραλλακτικότητας για τα χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν και πιο συγκεκριμένα η παρατηρούμενη τιμή στατιστικής σημαντικότητας (p -value).

Πίνακας 1. Παρατηρούμενη τιμή στατιστικής σημαντικότητας p -value για τους παράγοντες “Μεταχείριση ” και “Χρόνος” και την αλληλεπίδραση “Χρόνος \times Μεταχείριση.

Μεταβλητή	Μεταχείριση (p -value)	Χρόνος (p -value)	Χρόνος \times Μεταχείριση (p -value)
Συνολική κινητικότητα (%)	<0,001	<0,001	0,157
Μη-Προοδευτική κινητικότητα (%)	0,706	0,817	0,725
Προοδευτική κινητικότητα (%)	<0,001	<0,001	0,259
Ταχέως κινούμενα σπερματοζώαρια (%)	<0,001	<0,001	0,334
Μέσης ταχύτητας σπερματοζώαρια (%)	<0,001	<0,001	0,056
Βραδέως κινούμενα σπερματοζώαρια (%)	0,002	0,002	0,673
Ακίνητα σπερματοζώαρια (%)	<0,001	<0,001	0,157
VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	<0,001	<0,001	0,298
VSL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	<0,001	<0,001	0,234
VAP ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	<0,001	<0,001	0,191
LIN (%)	0,141	<0,001	0,961
STR (%)	0,074	0,001	0,898
WOB (%)	0,162	<0,001	0,941
ALH (μm)	<0,001	<0,001	0,275
BCF (Hz)	<0,001	<0,001	0,065
Υπερκινητικότητα (%)	<0,001	0,045	0,708
Συνολικά σπερματοζώαρια με μορφολογικές ανωμαλίες (%)	0,018	0,616	0,027
Μορφολογικές ανωμαλίες κεφαλής (%)	0,078	0,089	0,149
Πρωτοπλασματικά σταγονίδια (%)	0,851	0,962	0,093
Μορφολογικές ανωμαλίες ουράς (%)	0,157	0,157	0,098
Ζωτικότητα (%)	0,541	0,140	0,334
HOST + (%)	0,541	0,140	0,334

Με βάση τα στοιχεία του πίνακα 1 προκύπτει ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τη μεταχείριση για τα χαρακτηριστικά: “Συνολική κινητικότητα (%)” (p -value<0,001), “Προοδευτική κινητικότητα (%)” (p -value<0,001), “Ταχέως κινούμενα σπερματοζωάρια (%)” (p -value<0,001), “Μέσης ταχύτητας σπερματοζωάρια (%)” (p -value<0,001), “Βραδέως κινούμενα σπερματοζωάρια (%)” (p -value=0,002), “Ποσοστό ακίνητων σπερματοζωαρίων (%)” (p -value<0,001), “VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)” (p -value<0,001), “VSL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)” (p -value<0,001), “VAP ($\mu\text{m}/\text{sec}$)” (p -value<0,001), “ALH (μm)” (p -value<0,001), “BCF (Hz)” (p -value<0,001), “Σπερματοζωάρια σε υπερκινητικότητα (%)” (p -value<0,001) και “Συνολικά σπερματοζωάρια με μορφολογικές ανωμαλίες (%)” (p -value=0,018).

Επιπλέον, με βάση τα στοιχεία του πίνακα 1, διαπιστώνεται ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των χρόνων για τα χαρακτηριστικά: “Συνολική κινητικότητα (%)” (p -value<0,001), “Προοδευτική κινητικότητα (%)” (p -value<0,001), “Ταχέως κινούμενα σπερματοζωάρια (%)” (p -value<0,001), “Μέσης ταχύτητας σπερματοζωάρια (%)” (p -value<0,001), “Βραδέως κινούμενα σπερματοζωάρια (%)” (p -value=0,002), “Ποσοστό ακίνητων σπερματοζωαρίων (%)” (p -value<0,001), “VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)” (p -value<0,001), “VSL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)” (p -value<0,001), “VAP ($\mu\text{m}/\text{sec}$)” (p -value<0,001), “LIN (%)” (p -value<0,001), “STR (%)” (p -value=0,001), “WOB (%)” (p -value<0,001), “ALH (μm)” (p -value<0,001), “BCF (Hz)” (p -value<0,001) και “Σπερματοζωάρια σε υπερκινητικότητα (%)” (p -value=0,045).

Τέλος, με βάση τα στοιχεία του πίνακα 1, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά για την αλληλεπίδραση “Χρόνος \times Μεταχείριση” το χαρακτηριστικό “Συνολικά σπερματοζωάρια με μορφολογικές ανωμαλίες (%)” (p -value=0,027). Στη συνέχεια παρουσιάζονται πιο αναλυτικά οι διαφορές μέσων όρων.

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων της “Συνολικής Κινητικότητας (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση με βάση τα στοιχεία του Πίνακα 2 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 1):

- για την αρχική μέτρηση δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τέσσερις επεμβάσεις,
- για τη μέτρηση στην πρώτη ώρα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου, της ομάδας χαμηλής συγκέντρωσης

και της ομάδας μέτριας συγκέντρωσης με την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “Συνολικής Κινητικότητας (%)” και

- για την μέτρηση στις δύο ώρες παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας υψηλής συγκέντρωσης (μείωση συνολικής κινητικότητας).

Πίνακας 2. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “Συνολικής Κινητικότητας (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.

Χρόνος	Μεταχείριση	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
0 ώρες	Ελέγχου	89,79±3,49	
	20	85,99±3,49	
	40	80,72±3,49	
	80	83,20±3,49	
1 ώρα	Ελέγχου	87,12±3,49	80
	20	83,74±3,49	80
	40	82,35±3,49	80
	80	65,69±3,49	Ελέγχου, 20, 40
2 ώρες	Ελέγχου	81,48±3,49	80
	20	73,28±3,49	
	40	72,69±3,49	
	80	67,69±3,49	Ελέγχου
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=9,81			

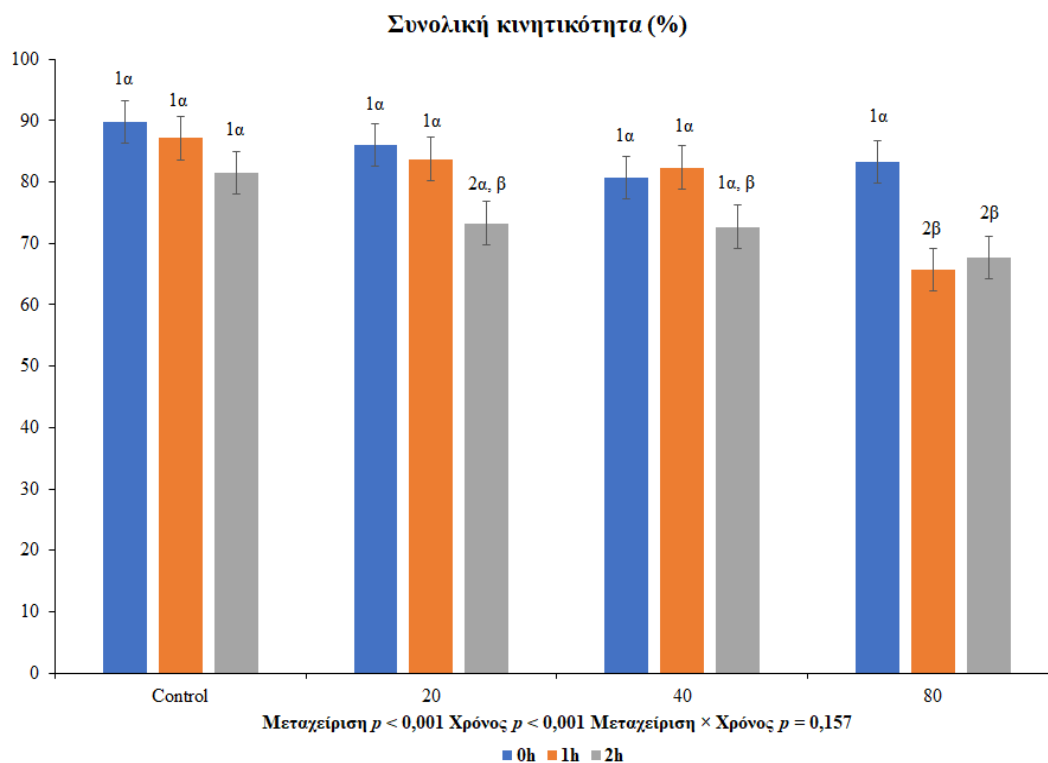
Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων της “Συνολικής Κινητικότητας (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο με βάση τα στοιχεία του πίνακα 3 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 1):

- για την ομάδα ελέγχου δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους τρεις χρόνους,
- για την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ την αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στις δύο ώρες καθώς και στη μέτρηση στην πρώτη ώρα με τη μέτρηση στις δύο ώρες και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “Συνολικής Κινητικότητας (%)”,
- για την ομάδα μέσης συγκέντρωσης δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές και
- για την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στη μία

ώρα (μείωση “Συνολικής Κινητικότητας (%)”) και της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στις δύο ώρες (μείωση συνολικής κινητικότητας).

Πίνακας 3. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “Συνολικής Κινητικότητας (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.

Μεταχείριση	Χρόνος	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
Ελέγχου	0 ώρες	89,79±3,49	
	1 ώρα	87,12±3,49	
	2 ώρες	81,48±3,49	
20	0 ώρες	85,99±3,49	2 ώρες
	1 ώρα	83,74±3,49	2 ώρες
	2 ώρες	73,28±3,49	0 ώρες, 1 ώρα
40	0 ώρες	80,72±3,49	
	1 ώρα	82,35±3,49	
	2 ώρες	72,69±3,49	
80	0 ώρες	83,20±3,49	1 ώρα, 2 ώρες
	1 ώρα	65,69±3,49	0 ώρες
	2 ώρες	67,70±3,49	0 ώρες
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=9,07			



Διάγραμμα 1. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις στη συνολική κινητικότητα (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος ταύρου.

Οι δείκτες α, β υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων εντός του κάθε χρόνου ελέγχου (p -value < 0,05).

Οι δείκτες 1, 2 υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των χρόνων ελέγχου για κάθε ομάδα (p -value < 0,05).

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων της “Προοδευτικής κινητικότητας (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση με βάση τα στοιχεία του πίνακα 4 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 2):

- για την αρχική μέτρηση παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ομάδων μέσης και υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “Προοδευτικής κινητικότητας (%)”,
- για τη μέτρηση στην πρώτη ώρα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου, της ομάδας χαμηλής συγκέντρωσης και της ομάδας μέτριας συγκέντρωσης σε σύγκριση με την ομάδα υψηλής

συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “Προοδευτικής κινητικότητας (%)” και

- για την μέτρηση στις δύο ώρες παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας υψηλής συγκέντρωσης (μείωση προοδευτικής κινητικότητας).

Πίνακας 4. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “Προοδευτικής κινητικότητας (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.

Χρόνος	Μεταχείριση	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
0 ώρες	Ελέγχου	37,05±3,26	40, 80
	20	30,88±3,26	
	40	22,95±3,26	Ελέγχου
	80	24,82±3,26	Ελέγχου
1 ώρα	Ελέγχου	30,99±3,26	80
	20	27,02±3,26	80
	40	25,11±3,26	80
	80	10,67±3,26	Ελέγχου, 20, 40
2 ώρες	Ελέγχου	24,52±3,26	80
	20	15,87±3,26	
	40	15,76±3,26	
	80	11,23±3,26	Ελέγχου
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=9,15			

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων της “Προοδευτικής κινητικότητας (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο με βάση τα στοιχεία του Πίνακα 5 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 2):

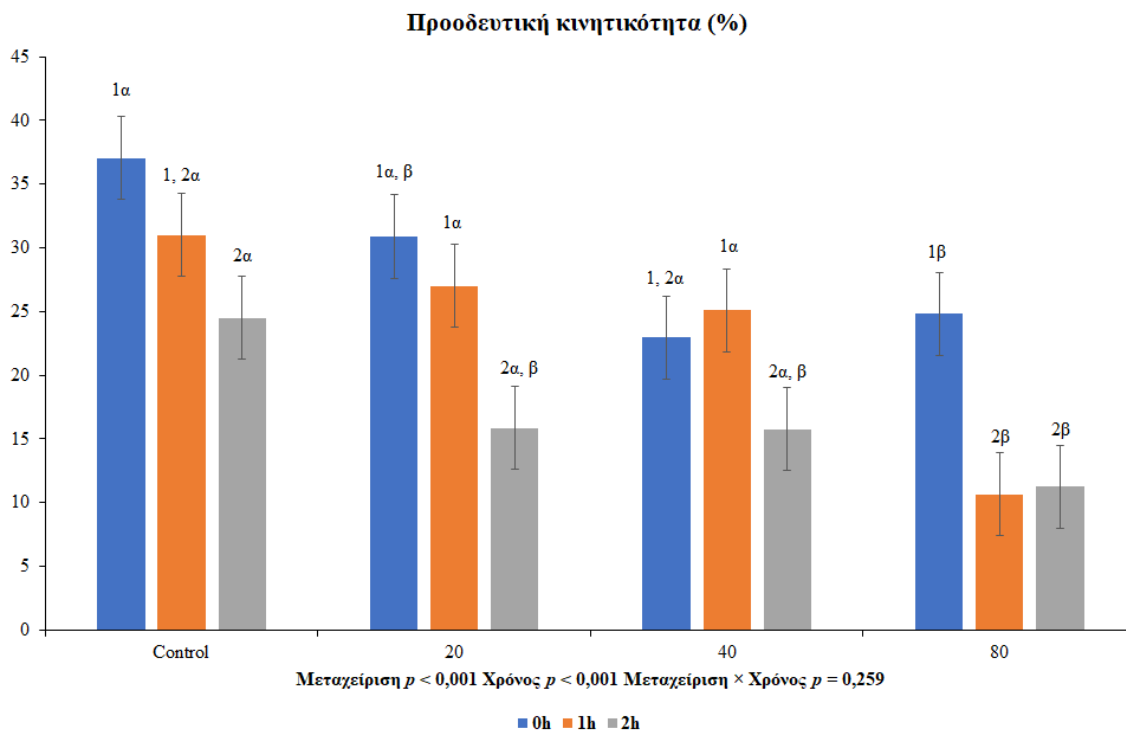
- για την ομάδα ελέγχου παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της αρχικής μέτρησης και της μέτρησης στις δύο ώρες με την “Προοδευτική κινητικότητα (%)” να μειώνεται,
- για την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ την αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στις δύο ώρες καθώς και στη μέτρηση στην πρώτη ώρα με τη μέτρηση στις δύο ώρες και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “Προοδευτικής κινητικότητας (%)”,
- για την ομάδα μέσης συγκέντρωσης παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της μέτρησης στην πρώτη ώρα με τη

μέτρηση στις δύο ώρες και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “Προοδευτικής κινητικότητας (%)” και

- για την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στη μία ώρα (μείωση “Προοδευτικής κινητικότητας (%)”) και της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στις δύο ώρες (μείωση προοδευτικής κινητικότητας).

Πίνακας 5. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “Προοδευτικής κινητικότητας (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.

Μεταχείριση	Χρόνος	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
Ελέγχου	0 ώρες	37,05±3,26	2 ώρες
	1 ώρα	30,99±3,26	
	2 ώρες	24,52±3,26	0 ώρες
20	0 ώρες	30,88±3,26	2 ώρες
	1 ώρα	27,02±3,26	2 ώρες
	2 ώρες	15,87±3,26	0 ώρες, 1 ώρα
40	0 ώρες	22,95±3,26	
	1 ώρα	25,11±3,26	2 ώρες
	2 ώρες	15,76±3,26	1 ώρα
80	0 ώρες	24,82±3,26	1 ώρα, 2 ώρες
	1 ώρα	10,67±3,26	0 ώρες
	2 ώρες	11,23±3,26	0 ώρες
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=9,12			



Διάγραμμα 2. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στην προοδευτική κινητικότητα (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωση του.

Οι δείκτες α, β υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων εντός του κάθε χρόνου ελέγχου (p -value<0,05).

Οι δείκτες 1, 2 υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των χρόνων ελέγχου για κάθε ομάδα (p -value<0,05).

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων για το χαρακτηριστικό “Ταχέως κινούμενα σπερματοζωάρια (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση με βάση τα στοιχεία του πίνακα 6 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 3):

- για την αρχική μέτρηση παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ομάδων μέσης και υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση του αριθμού των “Ταχέως κινούμενων σπερματοζωαρίων (%)”,
- για τη μέτρηση στην πρώτη ώρα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου, της ομάδας χαμηλής συγκέντρωσης και της ομάδας μέτριας συγκέντρωσης σε σύγκριση με την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση του αριθμού των “Ταχέως κινούμενων σπερματοζωαρίων (%)” και

- για τη μέτρηση στις δύο ώρες παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας υψηλής συγκέντρωσης (μείωση του αριθμού των ταχέως κινούμενων σπερματοζωαρίων).

Πίνακας 6. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων για το χαρακτηριστικό “Ταχέως κινούμενα σπερματοζωάρια (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.

Χρόνος	Μεταχείριση	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
0 ώρες	Ελέγχου	29,12±2,93	40, 80
	20	23,79±2,93	
	40	16,34±2,93	Ελέγχου
	80	17,91±2,93	Ελέγχου
1 ώρα	Ελέγχου	24,00±2,93	80
	20	20,27±2,93	80
	40	17,72±2,93	80
	80	6,24±2,93	Ελέγχου, 20, 40
2 ώρες	Ελέγχου	18,31±2,93	80
	20	10,37±2,93	
	40	10,50±2,93	
	80	7,05±2,93	Ελέγχου
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=8,25			

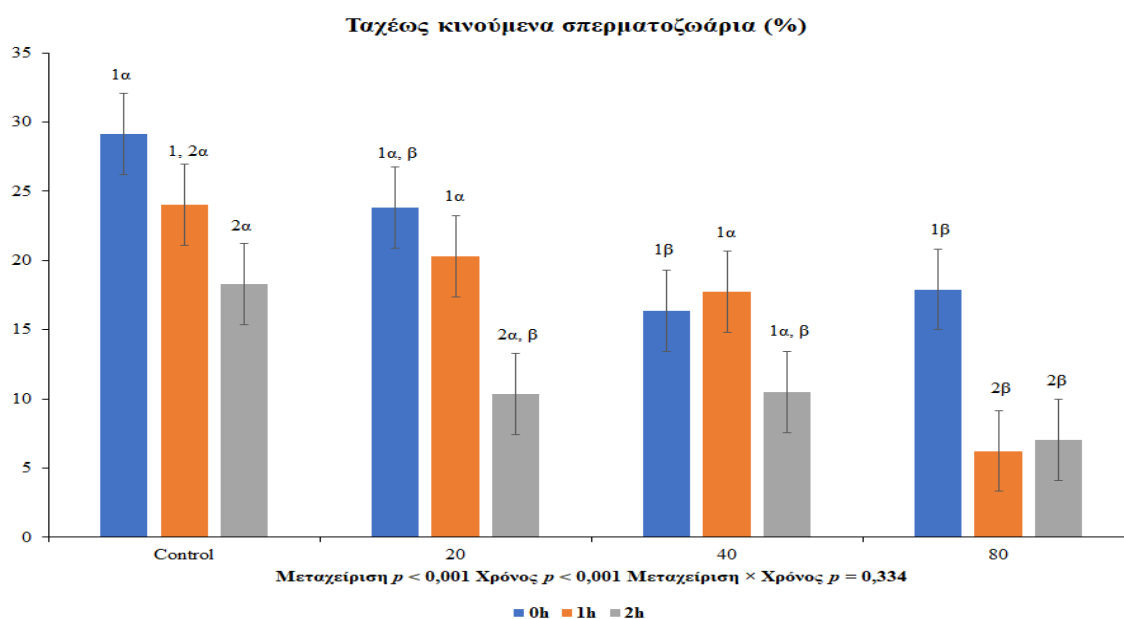
Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων του χαρακτηριστικού “Ταχέως κινούμενα σπερματοζωάρια (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο με βάση τα στοιχεία του πίνακα 7 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 3):

- για την ομάδα ελέγχου παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της αρχικής μέτρησης και της μέτρησης στις δύο ώρες με τον αριθμό των “Ταχέως κινούμενων σπερματοζωαρίων (%)” να μειώνεται,
- για την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με την μέτρηση στις δύο ώρες καθώς και στη μέτρηση στην πρώτη ώρα με τη μέτρηση στις δύο ώρες και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση του αριθμού των “Ταχέως κινούμενων σπερματοζωαρίων (%)”,
- για την ομάδα μέσης συγκέντρωσης δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές και
- για την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στη μία

ώρα (μείωση του αριθμού των “Ταχέως κινούμενων σπερματοζωαρίων (%)”) και της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στις δύο ώρες (μείωση του αριθμού των ταχέως κινούμενων σπερματοζωαρίων).

Πίνακας 7. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων του χαρακτηριστικού “Ταχέως κινούμενα σπερματοζωάρια (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.

Μεταχείριση	Χρόνος	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
Ελέγχου	0 ώρες	29,12±2,93	2 ώρες
	1 ώρα	24,00±2,93	
	2 ώρες	18,31±2,93	0 ώρες
20	0 ώρες	23,79±2,93	2 ώρες
	1 ώρα	20,27±2,93	2 ώρες
	2 ώρες	10,37±2,93	0 ώρες, 1 ώρα
40	0 ώρες	16,34±2,93	
	1 ώρα	17,72±2,93	
	2 ώρες	10,50±2,93	
80	0 ώρες	17,91±2,93	1 ώρα, 2 ώρες
	1 ώρα	6,24±2,93	0 ώρες
	2 ώρες	7,05±2,93	0 ώρες
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=8,23			



Διάγραμμα 3. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στα Ταχέως κινούμενα σπερματοζώαρια (%) του κρυοσυντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωση του.

Οι δείκτες α, β υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων εντός του κάθε χρόνου ελέγχου (p -value $<0,05$).

Οι δείκτες 1, 2 υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των χρόνων ελέγχου για κάθε ομάδα (p -value $<0,05$).

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων για το χαρακτηριστικό “Μέσης ταχύτητας σπερματοζώαρια (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση με βάση τα στοιχεία του πίνακα 8 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 4):

- για την αρχική μέτρηση δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές,
- για τη μέτρηση στην πρώτη ώρα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου, της ομάδας χαμηλής συγκέντρωσης και της ομάδας μέτριας συγκέντρωσης σε σύγκριση με την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση του αριθμού των “Σπερματοζωαρίων μέσης ταχύτητας (%)” και
- για τη μέτρηση στις δύο ώρες παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας υψηλής συγκέντρωσης (μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων μέσης ταχύτητας).

Πίνακας 8. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων για το χαρακτηριστικό “Μέσης ταχύτητας σπερματοζωάρια (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.

Χρόνος	Μεταχείριση	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
0 ώρες	Ελέγχου	27,71±2,18	
	20	26,00±2,18	
	40	22,58±2,18	
	80	26,18±2,18	
1 ώρα	Ελέγχου	28,13±2,18	80
	20	26,11±2,18	80
	40	24,98±2,18	80
	80	14,81±2,18	Ελέγχου, 20, 40
2 ώρες	Ελέγχου	23,54±2,18	80
	20	18,86±2,18	
	40	18,36±2,18	
	80	14,60±2,18	Ελέγχου
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=6,15			

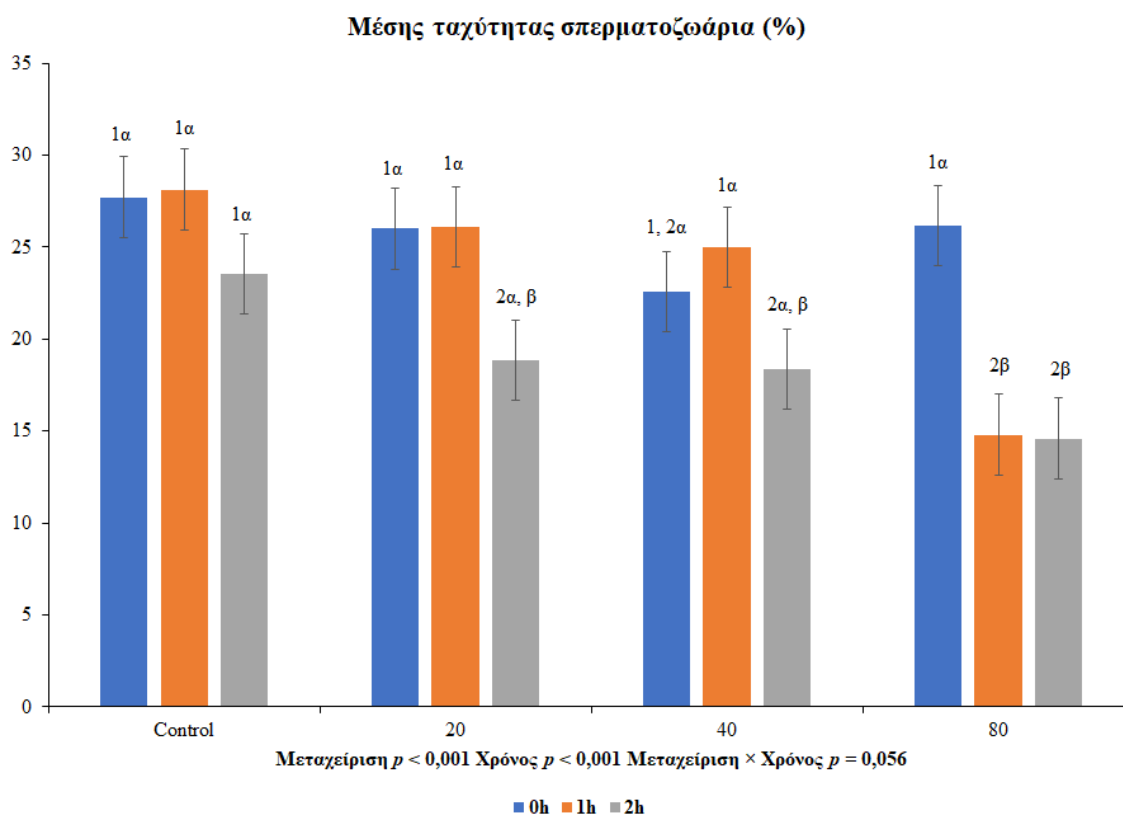
Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων του χαρακτηριστικού “Μέσης ταχύτητας σπερματοζωάρια (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο με βάση τα στοιχεία του πίνακα 9 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 4):

- για την ομάδα ελέγχου δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές,
- για την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στις δύο ώρες καθώς και στη μέτρηση στην πρώτη ώρα με τη μέτρηση στις δύο ώρες και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση του αριθμού των “Σπερματοζωαρίων μέσης ταχύτητας (%)”,
- για την ομάδα μέσης συγκέντρωσης παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της μέτρησης στην πρώτη ώρα με τη μέτρηση στις δύο ώρες και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση του αριθμού των “Σπερματοζωαρίων μέσης ταχύτητας (%)” και
- για την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στη μία ώρα (μείωση του αριθμού των “Σπερματοζωαρίων μέσης ταχύτητας(%)”) και της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στις δύο ώρες (μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων μέσης ταχύτητας) .

Πίνακας 9. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων του χαρακτηριστικού “Μέσης ταχύτητας σπερματοζώαρια (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.

Μεταχείριση	Χρόνος	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
Ελέγχου	0 ώρες	27,71±2,18	
	1 ώρα	28,13±2,18	
	2 ώρες	23,54±2,18	
20	0 ώρες	26,00±2,18	2 ώρες
	1 ώρα	26,11±2,18	2 ώρες
	2 ώρες	18,86±2,18	0 ώρες, 1 ώρα
40	0 ώρες	22,58±2,18	
	1 ώρα	24,98±2,18	2 ώρες
	2 ώρες	18,36±2,18	1 ώρα
80	0 ώρες	26,18±2,18	1 ώρα, 2 ώρες
	1 ώρα	14,81±2,18	0 ώρες
	2 ώρες	14,60±2,18	0 ώρες

Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=5,84



Διάγραμμα 4. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στα Μέσης ταχύτητας σπερματοζώαρια (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωση του.

Οι δείκτες α, β υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων εντός του κάθε χρόνου ελέγχου (p -value<0,05).

Οι δείκτες 1, 2 υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των χρόνων ελέγχου για κάθε ομάδα (p -value<0,05).

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων για το χαρακτηριστικό “Βραδέως κινούμενα σπερματοζωάρια (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση με βάση τα στοιχεία του πίνακα 10 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 5):

- για την αρχική μέτρηση παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας μέσης συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται αύξηση του αριθμού των “Βραδέως κινούμενων σπερματοζωαρίων (%)”,
- για τη μέτρηση στην πρώτη ώρα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας χαμηλής συγκέντρωσης σε σύγκριση με την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται αύξηση του αριθμού των “Βραδέως κινούμενων σπερματοζωαρίων (%)” και
- για τη μέτρηση στις δύο ώρες δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 10. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων για το χαρακτηριστικό “Βραδέως κινούμενα σπερματοζωάρια (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.

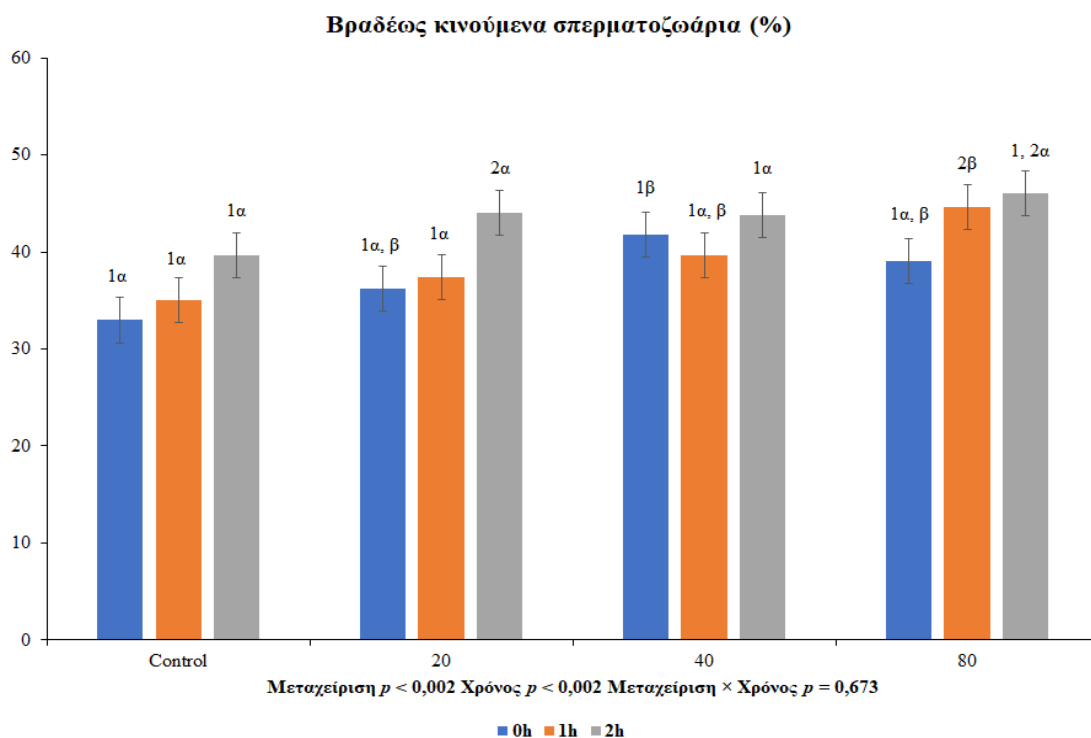
Χρόνος	Μεταχείριση	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
0 ώρες	Ελέγχου	32,96±2,31	40
	20	36,20±2,31	
	40	41,80±2,31	Ελέγχου
	80	39,11±2,31	
1 ώρα	Ελέγχου	34,99±2,31	80
	20	37,36±2,31	80
	40	39,65±2,31	
	80	44,64±2,31	Ελέγχου, 20
2 ώρες	Ελέγχου	39,63±2,31	
	20	44,05±2,31	
	40	43,82±2,31	
	80	46,05±2,31	
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=6,50			

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων του χαρακτηριστικού “Βραδέως κινούμενα σπερματοζωάρια (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο με βάση τα στοιχεία του πίνακα 11 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 5):

- για την ομάδα ελέγχου δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές,
- για την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στις δύο ώρες καθώς και στη μέτρηση στην πρώτη ώρα με τη μέτρηση στις δύο ώρες και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται αύξηση του αριθμού των “Βραδέως κινούμενων σπερματοζωαρίων (%)”,
- για την ομάδα μέσης συγκέντρωσης δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές και
- για την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στη μία ώρα (αύξηση του αριθμού των “Βραδέως κινούμενων σπερματοζωαρίων (%)”).

Πίνακας 11. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων του χαρακτηριστικού “Βραδέως κινούμενα σπερματοζωάρια (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.

Μεταχείριση	Χρόνος	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
Ελέγχου	0 ώρες	32,96±2,31	
	1 ώρα	34,99±2,31	
	2 ώρες	36,63±2,31	
20	0 ώρες	36,20±2,31	2 ώρες
	1 ώρα	37,36±2,31	2 ώρες
	2 ώρες	44,05±2,31	0 ώρες, 1 ώρα
40	0 ώρες	41,80±2,31	
	1 ώρα	39,65±2,31	
	2 ώρες	43,82±2,31	
80	0 ώρες	39,10±2,31	2 ώρες
	1 ώρα	44,64±2,31	
	2 ώρες	46,05±2,31	0 ώρες
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=6,50			



Διάγραμμα 5. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στα Βραδέως κινούμενα σπερματοζώαρια (%) του κρυοσυντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωση του.

Οι δείκτες α, β υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων εντός του κάθε χρόνου ελέγχου (p -value<0,05).

Οι δείκτες 1, 2 υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των χρόνων ελέγχου για κάθε ομάδα (p -value<0,05).

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων για το “Ποσοστό ακίνητων σπερματοζωαρίων (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση με βάση τα στοιχεία του πίνακα 12 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 6):

- για την αρχική μέτρηση δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές,
- για τη μέτρηση στην πρώτη ώρα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου, της ομάδας χαμηλής συγκέντρωσης και της ομάδας μέσης συγκέντρωσης σε σύγκριση με την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται αύξηση του “Ποσοστού ακίνητων σπερματοζωαρίων (%)” και
- για τη μέτρηση στις δύο ώρες παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου με την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται αύξηση του “Ποσοστού ακίνητων σπερματοζωαρίων (%)”.

Πίνακας 12. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων για το χαρακτηριστικό “Ποσοστό ακίνητων σπερματοζωάρια (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.

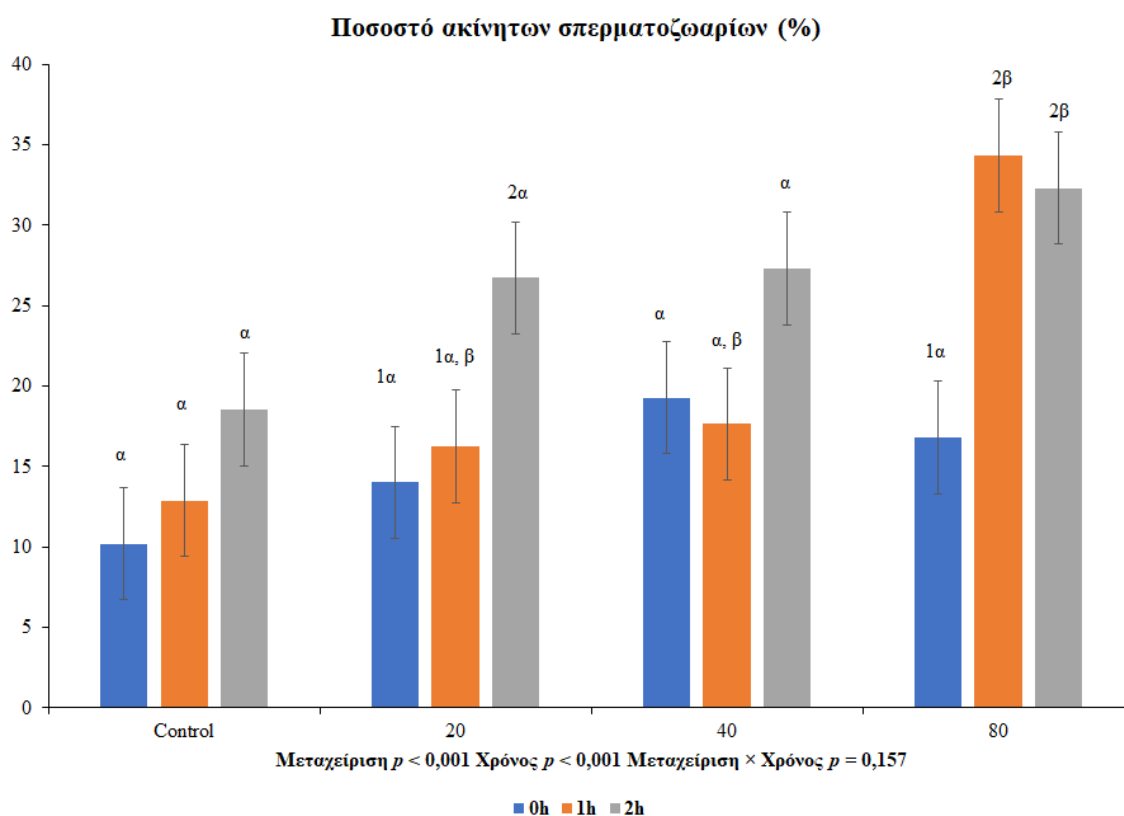
Χρόνος	Μεταχείριση	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
0 ώρες	Ελέγχου	10,21±3,49	
	20	14,01±3,49	
	40	19,29±3,49	
	80	16,80±3,49	
1 ώρα	Ελέγχου	12,88±3,49	80
	20	16,26±3,49	80
	40	17,65±3,49	80
	80	34,31±3,49	Ελέγχου, 20, 40
2 ώρες	Ελέγχου	18,52±3,49	80
	20	26,72±3,49	
	40	27,31±3,49	
	80	32,30±3,49	Ελέγχου
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=9,81			

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων του “Ποσοστού ακίνητων σπερματοζωαρίων (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο με βάση τα στοιχεία του πίνακα 13 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 6):

- για την ομάδα ελέγχου δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές,
- για την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στις δύο ώρες καθώς και στη μέτρηση στην πρώτη ώρα με τη μέτρηση στις δύο ώρες και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται αύξηση του “Ποσοστού ακινήτων σπερματοζωαρίων (%)”,
- για την ομάδα μέσης συγκέντρωσης δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές και
- για την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στη μία ώρα και τη μέτρηση στις δύο ώρες (αύξηση του ποσοστού ακίνητων σπερματοζωαρίων) .

Πίνακας 13. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων του “Ποσοστού ακίνητων σπερματοζωαρίων (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.

Μεταχείριση	Χρόνος	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
Ελέγχου	0 ώρες	10,21±3,49	
	1 ώρα	12,88±3,49	
	2 ώρες	18,52±3,49	
20	0 ώρες	14,01±3,49	2 ώρες
	1 ώρα	16,26±3,49	2 ώρες
	2 ώρες	26,72±3,49	0 ώρες, 1 ώρα
40	0 ώρες	19,29±3,49	
	1 ώρα	17,65±3,49	
	2 ώρες	27,31±3,49	
80	0 ώρες	16,80±3,49	1 ώρα, 2 ώρες
	1 ώρα	34,31±3,49	0 ώρες
	2 ώρες	32,30±3,49	0 ώρες
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=9,07			



Διάγραμμα 6. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στο Ποσοστό των ακίνητων σπερματοζωαρίων (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωση του.

Οι δείκτες α, β υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων εντός του κάθε χρόνου ελέγχου (p -value<0,05).

Οι δείκτες 1, 2 υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των χρόνων ελέγχου για κάθε ομάδα (p -value<0,05).

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων της “VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση με βάση τα στοιχεία του πίνακα 14 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 7):

- για την αρχική μέτρηση παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου με την ομάδα μέσης συγκέντρωσης και την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)”,
- για τη μέτρηση στην πρώτη ώρα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου, της ομάδας χαμηλής συγκέντρωσης και της ομάδας μέσης συγκέντρωσης σε σύγκριση με την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)” και
- για τη μέτρηση στις δύο ώρες παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου με την ομάδα χαμηλής (οριακά), την ομάδα μέσης και την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)”.

Πίνακας 14. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.

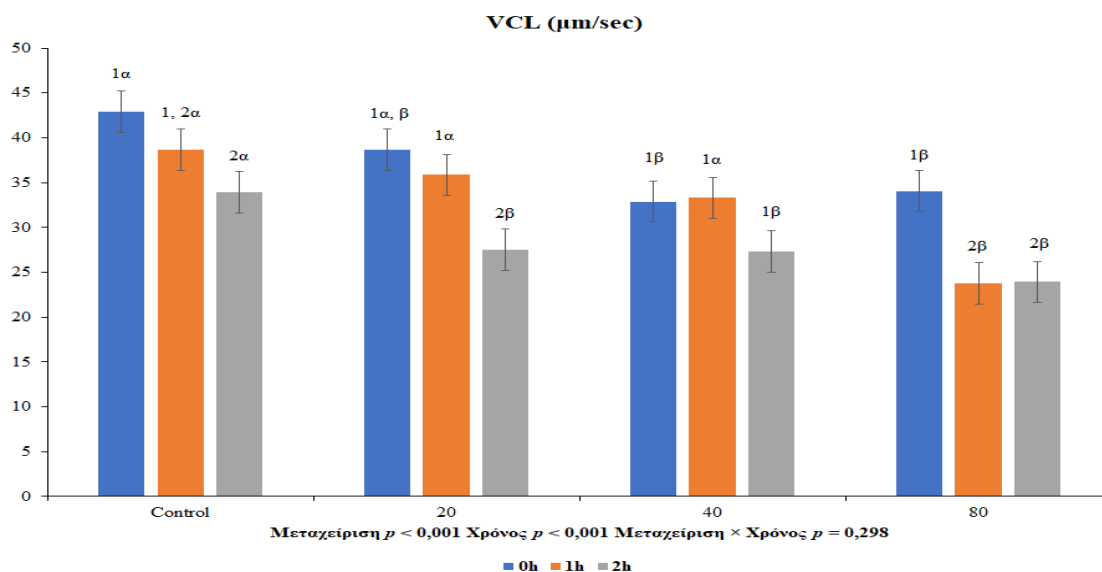
Χρόνος	Μεταχείριση	Μέσος όρος \pm SE μέσου όρου	Διαφέρει από
0 ώρες	Ελέγχου	42,89 \pm 2,29	40, 80
	20	38,66 \pm 2,29	
	40	32,89 \pm 2,29	Ελέγχου
	80	34,05 \pm 2,29	Ελέγχου
1 ώρα	Ελέγχου	38,67 \pm 2,29	80
	20	35,87 \pm 2,29	80
	40	33,31 \pm 2,29	80
	80	23,79 \pm 2,29	Ελέγχου, 20, 40
2 ώρες	Ελέγχου	33,95 \pm 2,29	20, 40, 80
	20	27,51 \pm 2,29	Ελέγχου
	40	27,33 \pm 2,29	Ελέγχου
	80	23,92 \pm 2,29	Ελέγχου
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=6,47			

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων της “VCL (μm/sec)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο με βάση τα στοιχεία του πίνακα 15 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 7):

- για την ομάδα ελέγχου παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της αρχικής μέτρησης και της μέτρησης στις δύο ώρες, πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση στη “VCL (μm/sec)”,
- για την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με την μέτρηση στις δύο ώρες καθώς και στην μέτρηση στην πρώτη ώρα με την μέτρηση στις δύο ώρες και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση στη “VCL (μm/sec)”,
- για την ομάδα μέσης συγκέντρωσης δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές και
- για την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στη μία ώρα και τη μέτρηση στις δύο ώρες (μείωση στη VCL).

Πίνακας 15. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “VCL (μm/sec)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.

Μεταχείριση	Χρόνος	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
Ελέγχου	0 ώρες	42,89±2,29	2 ώρες
	1 ώρα	38,67±2,29	
	2 ώρες	33,95±2,29	0 ώρες
20	0 ώρες	38,66±2,29	2 ώρες
	1 ώρα	35,87±2,29	2 ώρες
	2 ώρες	27,51±2,29	0 ώρες, 1 ώρα
40	0 ώρες	32,89±2,29	
	1 ώρα	33,31±2,29	
	2 ώρες	27,33±2,29	
80	0 ώρες	34,05±2,29	1 ώρα, 2 ώρες
	1 ώρα	23,79±2,29	0 ώρες
	2 ώρες	23,92±2,29	0 ώρες
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=6,44			



Διάγραμμα 7. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στην παράμετρο VCL (μm/sec) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωσή του.

Οι δείκτες α, β υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων εντός του κάθε χρόνου ελέγχου (p -value<0,05).

Οι δείκτες 1, 2 υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των χρόνων ελέγχου για κάθε ομάδα (p -value<0,05).

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων της “VSL (μm/sec)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση με βάση τα στοιχεία του πίνακα 16 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 8):

- για την αρχική μέτρηση παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου σε σύγκριση με την ομάδα μέσης συγκέντρωσης και την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “VSL (μm/sec)”,
- για τη μέτρηση στην πρώτη ώρα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου, της ομάδας χαμηλής συγκέντρωσης και της ομάδας μέσης συγκέντρωσης σε σχέση με την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “VSL (μm/sec)” και
- για τη μέτρηση στις δύο ώρες παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου με την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “VSL (μm/sec)”.

Πίνακας 16. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “VSL (μm/sec)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.

Χρόνος	Μεταχείριση	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
0 ώρες	Ελέγχου	13,14±0,67	40, 80
	20	11,71±0,67	
	40	10,58±0,67	Ελέγχου
	80	10,72±0,67	Ελέγχου
1 ώρα	Ελέγχου	11,04±0,67	80
	20	10,54±0,67	80
	40	10,36±0,67	80
	80	7,06±0,67	Ελέγχου, 20, 40
2 ώρες	Ελέγχου	9,69±0,67	80
	20	7,99±0,67	
	40	8,32±0,67	
	80	6,85±0,67	Ελέγχου
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=1,93			

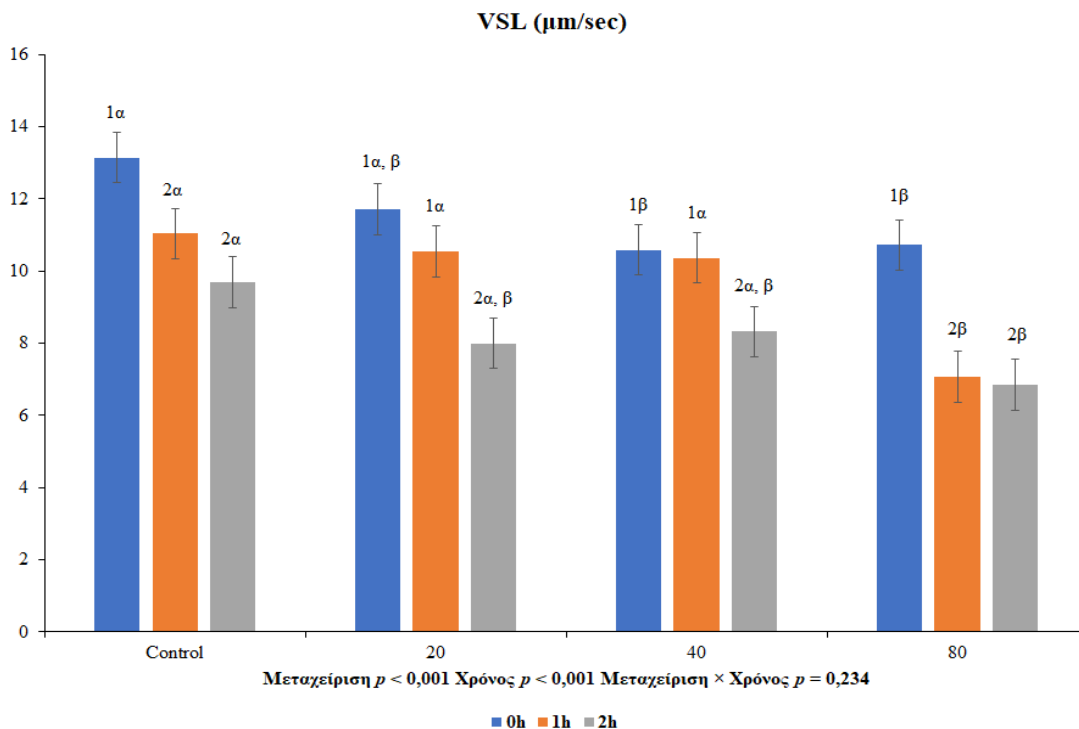
Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων της “VSL (μm/sec)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο με βάση τα στοιχεία του πίνακα 17 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 8):

- για την ομάδα ελέγχου παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της αρχικής μέτρησης και των μετρήσεων στη μία και τις δύο ώρες, πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση στη “VSL (μm/sec)”,
- για την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στις δύο ώρες καθώς και στη μέτρηση στην πρώτη ώρα με τη μέτρηση στις δύο ώρες και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση στη “VSL (μm/sec)”,
- για την ομάδα μέσης συγκέντρωσης παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στις δύο ώρες καθώς και στη μέτρηση στην πρώτη ώρα με τη μέτρηση στις δύο ώρες και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση στη “VSL (μm/sec)” και
- για την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης παρατηρούνται στατιστικές σημαντικές διαφορές, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης σε σχέση με τη μέτρηση στη μία ώρα και τη μέτρηση στις δύο ώρες (μείωση στη VSL).

Πίνακας 17. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “VSL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.

Μεταχείριση	Χρόνος	Μέσος όρος \pm SE μέσου όρου	Διαφέρει από
Ελέγχου	0 ώρες	13,14 \pm 0,67	1 ώρα, 2 ώρες
	1 ώρα	11,04 \pm 0,67	0 ώρες
	2 ώρες	9,69 \pm 0,67	0 ώρες
20	0 ώρες	11,71 \pm 0,67	2 ώρες
	1 ώρα	10,54 \pm 0,67	2 ώρες
	2 ώρες	7,99 \pm 0,67	0 ώρες, 1 ώρα
40	0 ώρες	10,58 \pm 0,67	2 ώρες
	1 ώρα	10,36 \pm 0,67	2 ώρες
	2 ώρες	8,32 \pm 0,67	0 ώρες, 1 ώρα
80	0 ώρες	10,72 \pm 0,67	1 ώρα, 2 ώρες
	1 ώρα	7,06 \pm 0,67	0 ώρες
	2 ώρες	6,85 \pm 0,67	0 ώρες

Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=1,88



Διάγραμμα 8. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στην παράμετρο VSL ($\mu\text{m}/\text{sec}$) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωσή του.

Οι δείκτες α , β υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων εντός του κάθε χρόνου ελέγχου (p -value $<$ 0,05).

Οι δείκτες 1, 2 υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των χρόνων ελέγχου για κάθε ομάδα (p -value $<$ 0,05).

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων της “VAP (μm/sec)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση με βάση τα στοιχεία του πίνακα 18 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 9):

- για την αρχική μέτρηση παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου με την ομάδα μέσης συγκέντρωσης και την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “VAP (μm/sec)”,
- για τη μέτρηση στην πρώτη ώρα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου, της ομάδας χαμηλής συγκέντρωσης και της ομάδας μέσης συγκέντρωσης σε σύγκριση με την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “VAP (μm/sec)” και
- για τη μέτρηση στις δύο ώρες παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου σε σύγκριση με την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “VAP (μm/sec)”.

Πίνακας 18. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “VAP (μm/sec)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.

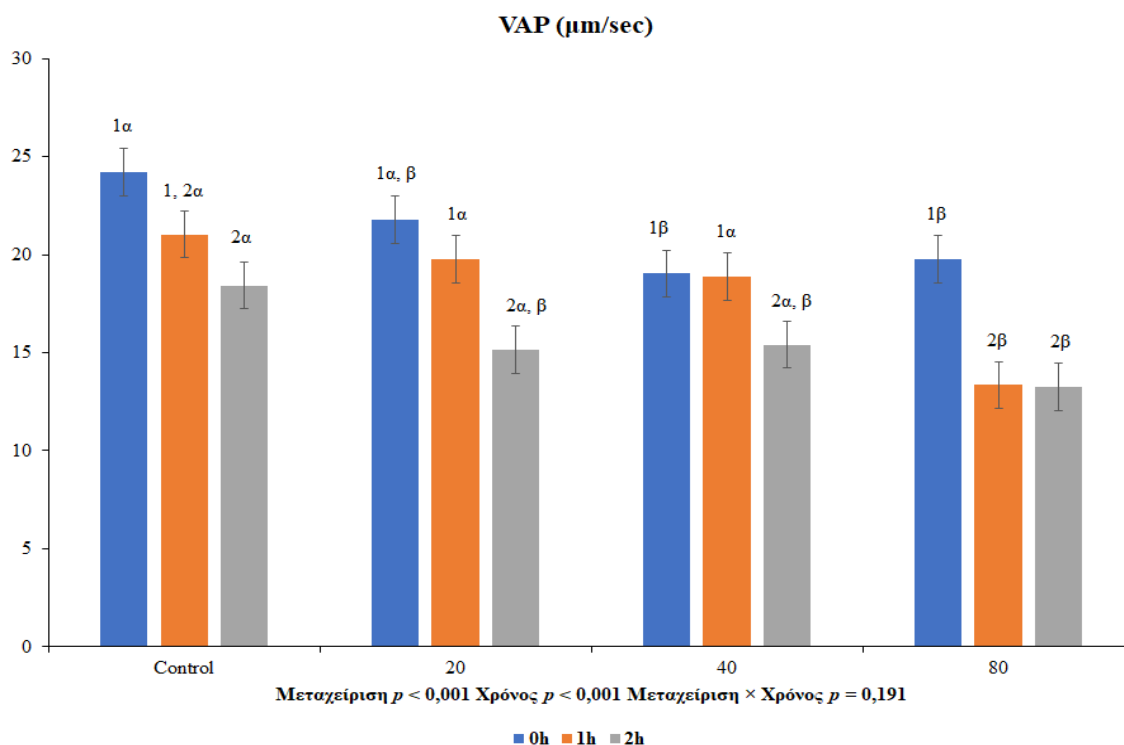
Χρόνος	Μεταχείριση	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
0 ώρες	Ελέγχου	24,19±1,18	40, 80
	20	21,79±1,18	
	40	19,03±1,18	Ελέγχου
	80	19,77±1,18	Ελέγχου
1 ώρα	Ελέγχου	21,03±1,18	80
	20	19,76±1,18	80
	40	18,86±1,18	80
	80	13,34±1,18	Ελέγχου, 20, 40
2 ώρες	Ελέγχου	18,43±1,18	80
	20	15,15±1,18	
	40	15,41±1,18	
	80	13,24±1,18	Ελέγχου
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=3,36			

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων της “VAP (μm/sec)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο με βάση τα στοιχεία του πίνακα 19 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 9):

- για την ομάδα ελέγχου παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της αρχικής μέτρησης και της μέτρησης τις δύο ώρες, πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση στη “VAP (μm/sec)”
- για την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στις δύο ώρες καθώς και στη μέτρηση στην πρώτη ώρα με τη μέτρηση στις δύο ώρες και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση στη “VAP (μm/sec)”
- για την ομάδα μέσης συγκέντρωσης παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στις δύο ώρες καθώς και στη μέτρηση στην πρώτη ώρα με τη μέτρηση στις δύο ώρες και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση στη “VAP (μm/sec)” και
- για την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στη μία ώρα και τη μέτρηση στις δύο ώρες (μείωση στη VAP).

Πίνακας 19. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “VAP (μm/sec)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.

Μεταχείριση	Χρόνος	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
Ελέγχου	0 ώρες	24,19±1,18	2 ώρες
	1 ώρα	21,03±1,18	
	2 ώρες	18,43±1,18	0 ώρες
20	0 ώρες	21,79±1,18	2 ώρες
	1 ώρα	19,76±1,18	2 ώρες
	2 ώρες	15,15±1,18	0 ώρες, 1 ώρα
40	0 ώρες	19,03±1,18	2 ώρες
	1 ώρα	18,86±1,18	2 ώρες
	2 ώρες	15,41±1,18	0 ώρες, 1 ώρα
80	0 ώρες	19,77±1,18	1 ώρα, 2 ώρες
	1 ώρα	13,34±1,18	0 ώρες
	2 ώρες	13,24±1,18	0 ώρες
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=3,33			



Διάγραμμα 9. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στην παράμετρο VAP ($\mu\text{m}/\text{sec}$) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωσή του.

Οι δείκτες α, β υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων εντός του κάθε χρόνου ελέγχου ($p\text{-value} < 0,05$).

Οι δείκτες 1, 2 υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των χρόνων ελέγχου για κάθε ομάδα ($p\text{-value} < 0,05$).

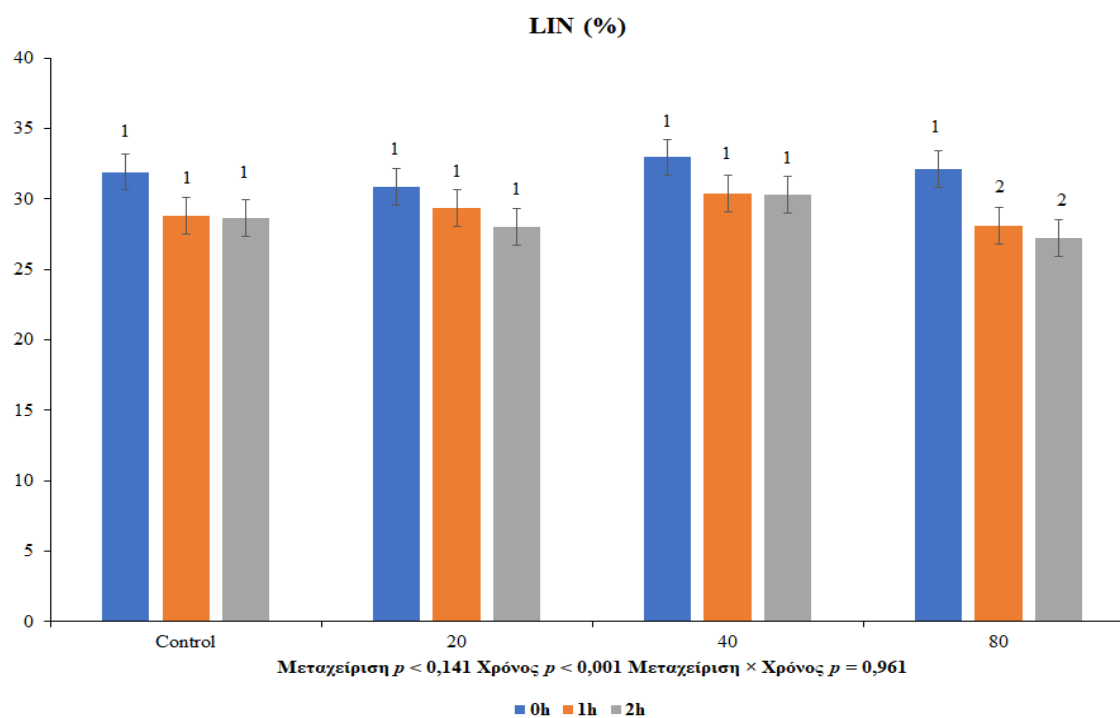
Όσον αφορά στο χαρακτηριστικό “LIN (%)” οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των ομάδων δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p\text{-value} = 0,141$, πίνακας 1).

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων της “LIN (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο με βάση τα στοιχεία του πίνακα 20 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 10):

- για την ομάδα ελέγχου δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές,
- για την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές,
- για την ομάδα μέσης συγκέντρωσης δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές και
- για την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στη μία ώρα και τη μέτρηση στις δύο ώρες (μείωση στη LIN)

Πίνακας 20. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “LIN (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.

Μεταχείριση	Χρόνος	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
Ελέγχου	0 ώρες	31,91±1,30	
	1 ώρα	28,81±1,30	
	2 ώρες	28,66±1,30	
20	0 ώρες	30,87±1,30	
	1 ώρα	29,35±1,30	
	2 ώρες	28,00±1,30	
40	0 ώρες	32,94±1,30	
	1 ώρα	30,41±1,30	
	2 ώρες	30,27±1,30	
80	0 ώρες	32,09±1,30	1 ώρα, 2 ώρες
	1 ώρα	28,07±1,30	0 ώρες
	2 ώρες	27,02±1,30	0 ώρες
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=3,64			



Διάγραμμα 10. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στην παράμετρο LIN (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωσή του.

Οι δείκτες 1, 2 υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των χρόνων ελέγχου για κάθε ομάδα (p -value<0,05).

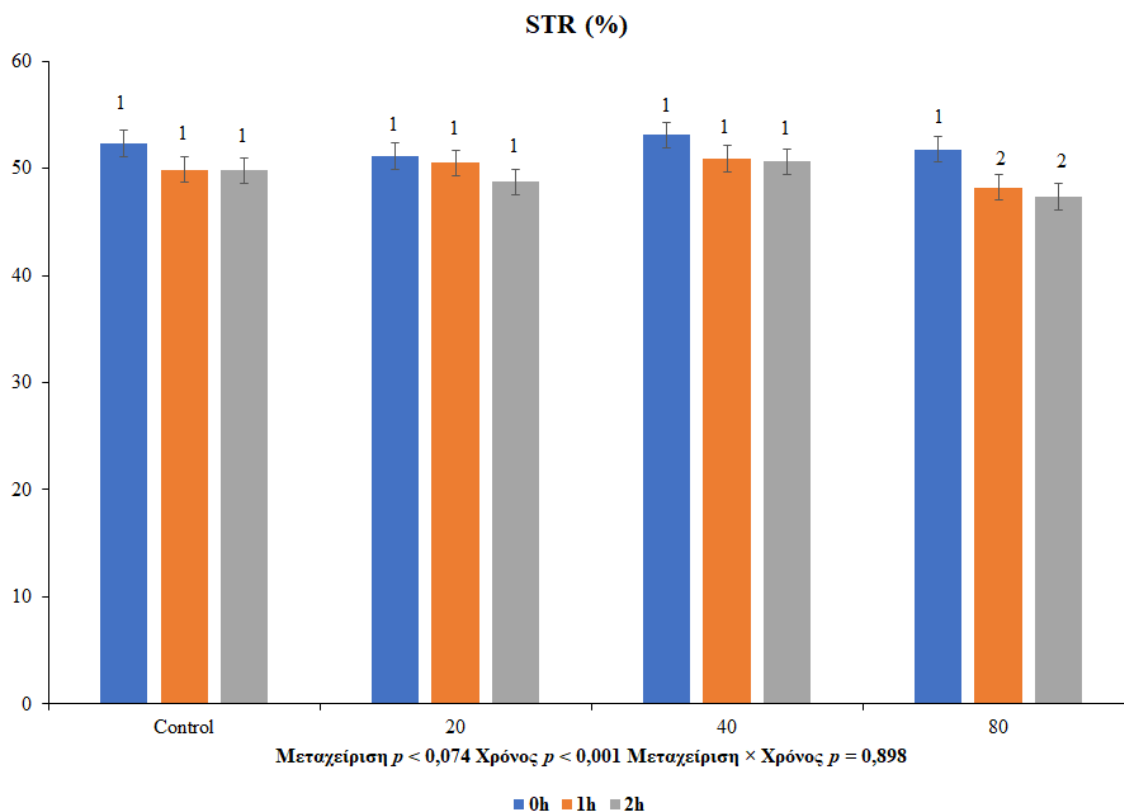
Όσον αφορά στο χαρακτηριστικό “STR (%)” οι μεταξύ των ομάδων διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (p -value=0,074, πίνακας 1).

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων της “STR (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο με βάση τα στοιχεία του πίνακα 21 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 11):

- για την ομάδα ελέγχου δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές,
- για την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές,
- για την ομάδα μέσης συγκέντρωσης δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές και
- για την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης σε σχέση με τη μέτρηση στη μία ώρα και τη μέτρηση στις δύο ώρες (μείωση στη STR) .

Πίνακας 21. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “STR (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.

Μεταχείριση	Χρόνος	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
Ελέγχου	0 ώρες	52,32±1,15	
	1 ώρα	49,87±1,15	
	2 ώρες	79,79±1,15	
20	0 ώρες	51,14±1,15	
	1 ώρα	50,49±1,15	
	2 ώρες	48,73±1,15	
40	0 ώρες	53,10±1,15	
	1 ώρα	50,90±1,15	
	2 ώρες	50,62±1,15	
80	0 ώρες	21,76±1,15	1 ώρα, 2 ώρες
	1 ώρα	48,21±1,15	0 ώρες
	2 ώρες	47,36±1,15	0 ώρες
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=3,24			



Διάγραμμα 11. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στην παράμετρο STR (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωσή του.

Οι δείκτες 1, 2 υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των χρόνων ελέγχου για κάθε ομάδα (p -value<0,05).

Όσον αφορά στο χαρακτηριστικό “WOB (%)” οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των ομάδων μεταχείρισης δεν είναι στατιστικά σημαντικές (p -value=0,162, πίνακας 1).

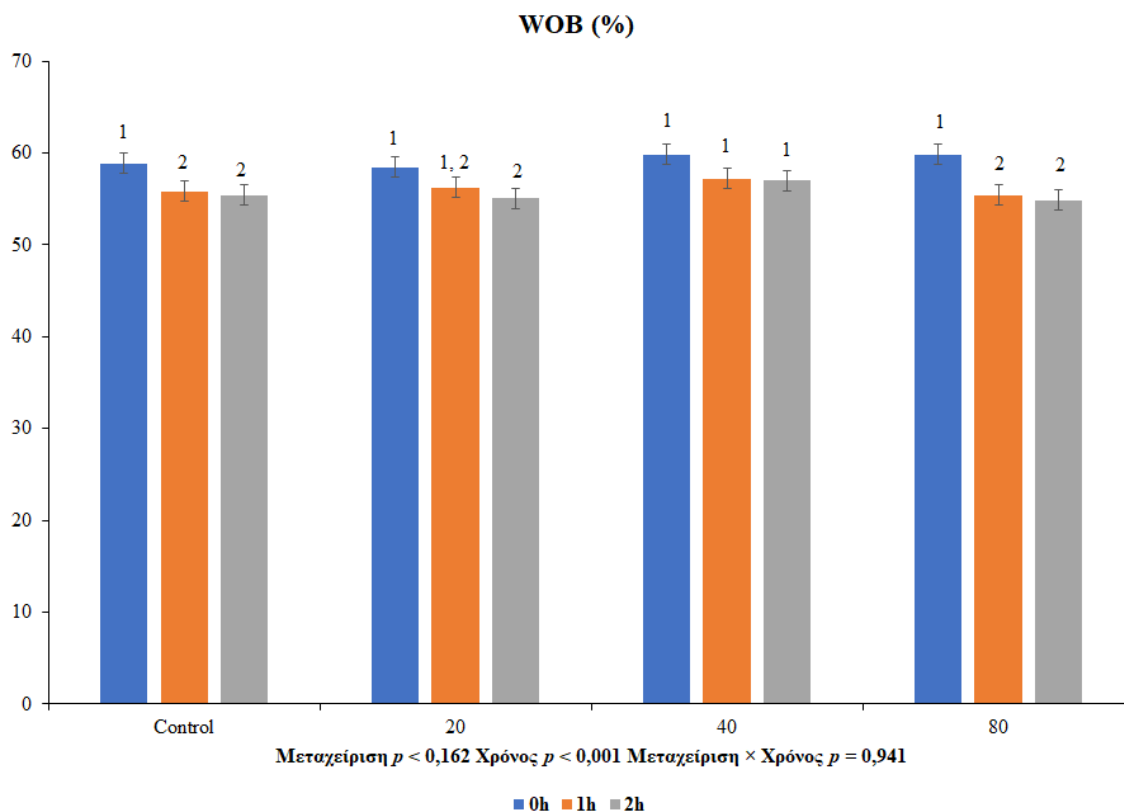
Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων της “WOB (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο με βάση τα στοιχεία του πίνακα 22 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 12):

- για την ομάδα ελέγχου παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης σε σύγκριση με τη μέτρηση στη μία ώρα και τη μέτρηση στις δύο ώρες (μείωση WOB)
- για την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης σε σχέση με τη μέτρηση στις δύο ώρες (μείωση WOB)

- για την ομάδα μέσης συγκέντρωσης δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές και
- για την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης σε σχέση με τη μέτρηση στη μία ώρα και τη μέτρηση στις δύο ώρες (μείωση WOB).

Πίνακας 22. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “WOB (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.

Μεταχείριση	Χρόνος	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
Ελέγχου	0 ώρες	58,87±1,05	1 ώρα, 2 ώρες
	1 ώρα	55,83±1,05	0 ώρες
	2 ώρες	55,38±1,05	0 ώρες
20	0 ώρες	58,47±1,05	2 ώρες
	1 ώρα	56,23±1,05	
	2 ώρες	55,07±1,05	0 ώρες
40	0 ώρες	58,47±1,05	
	1 ώρα	56,23±1,05	
	2 ώρες	55,07±1,05	
80	0 ώρες	59,84±1,05	1 ώρα, 2 ώρες
	1 ώρα	55,38±1,05	0 ώρες
	2 ώρες	54,86±1,05	0 ώρες
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=2,97			



Διάγραμμα 12. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στην παράμετρο WOB (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωσή του.

Οι δείκτες 1, 2 υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των χρόνων ελέγχου για κάθε ομάδα (p -value $<0,05$).

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων της “ALH (μm)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση με βάση τα στοιχεία του πίνακα 23 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 13):

- για την αρχική μέτρηση παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου σε σχέση με την ομάδα μέσης συγκέντρωσης και την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης καθώς επίσης και της ομάδας χαμηλής συγκέντρωσης σε σύγκριση με την ομάδα μέσης συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “ALH (μm)”,
- για τη μέτρηση στην πρώτη ώρα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου, της ομάδας χαμηλής συγκέντρωσης και της ομάδας μέσης συγκέντρωσης σε σύγκριση με την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “ALH (μm)” και

- για τη μέτρηση στις δύο ώρες παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου σε σύγκριση με την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “ALH (μm)”.

Πίνακας 23. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “ALH (μm)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.

Χρόνος	Μεταχείριση	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
0 ώρες	Ελέγχου	2,33±0,09	40, 80
	20	2,14±0,09	40
	40	1,88±0,09	20, Ελέγχου
	80	1,94±0,09	Ελέγχου
1 ώρα	Ελέγχου	2,16±0,09	80
	20	2,01±0,09	80
	40	1,91±0,09	80
	80	1,54±0,09	Ελέγχου, 20, 40
2 ώρες	Ελέγχου	1,94±0,09	80
	20	1,69±0,09	
	40	1,69±0,09	
	80	1,56±0,09	Ελέγχου
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=0,26			

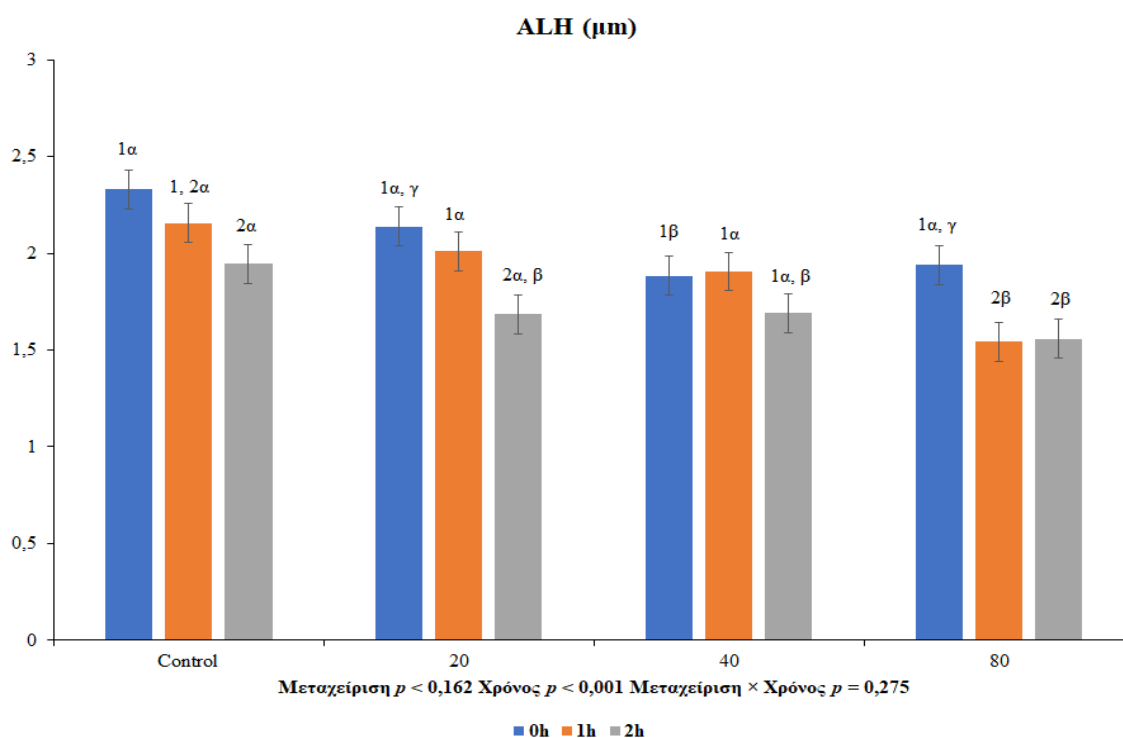
Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων της “ALH (μm)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο με βάση τα στοιχεία του πίνακα 24 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 13):

- για την ομάδα ελέγχου παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της αρχικής μέτρησης και της μέτρησης στις δύο ώρες, πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση ALH”,
- για την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης σε σχέση με τη μέτρηση στις δύο ώρες καθώς και στη μέτρηση στην πρώτη ώρα με τη μέτρηση στις δύο ώρες και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση ALH”,
- για την ομάδα μέσης συγκέντρωσης δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά και
- για την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης σε σύγκριση με τη μέτρηση στη μία ώρα και τη μέτρηση στις δύο ώρες (μείωση ALH).

Πίνακας 24. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “ALH (μm)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.

Μεταχείριση	Χρόνος	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
Ελέγχου	0 ώρες	2,33±0,09	2 ώρες
	1 ώρα	2,16±0,09	
	2 ώρες	1,94±0,09	0 ώρες
20	0 ώρες	2,14±0,09	2 ώρες
	1 ώρα	2,01±0,09	2 ώρες
	2 ώρες	1,69±0,09	0 ώρες, 1 ώρα
40	0 ώρες	1,88±0,09	
	1 ώρα	1,91±0,09	
	2 ώρες	1,69±0,09	
80	0 ώρες	1,94±0,09	1 ώρα, 2 ώρες
	1 ώρα	1,54±0,09	0 ώρες
	2 ώρες	1,56±0,09	0 ώρες

Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=0,25



Διάγραμμα 13. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στην παράμετρο ALH (μm) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωσή του.

Οι δείκτες α, β, γ υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων εντός του κάθε χρόνου ελέγχου (p -value<0,05).

Οι δείκτες 1, 2 υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των χρόνων ελέγχου για κάθε ομάδα (p -value<0,05).

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων της “BCF (Hz)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση με βάση τα στοιχεία του πίνακα 25 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 14):

- για την αρχική μέτρηση δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές,
- για τη μέτρηση στην πρώτη ώρα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου, της ομάδας χαμηλής συγκέντρωσης και της ομάδας μέσης συγκέντρωσης σε σύγκριση με την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “BCF” και
- για τη μέτρηση στις δύο ώρες παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου σε σύγκριση με την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης, την ομάδα μέσης συγκέντρωσης και την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση της “BCF”.

Πίνακας 25. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “BCF (Hz)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.

Χρόνος	Μεταχείριση	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
0 ώρες	Ελέγχου	4,07±0,22	
	20	3,84±0,22	
	40	3,53±0,22	
	80	3,74±0,22	
1 ώρα	Ελέγχου	3,79±0,22	80
	20	3,74±0,22	80
	40	3,52±0,22	80
	80	2,45±0,22	Ελέγχου, 20, 40
2 ώρες	Ελέγχου	3,47±0,22	20, 40, 80
	20	3,47±0,22	Ελέγχου
	40	2,84±0,22	Ελέγχου
	80	2,40±0,22	Ελέγχου
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=0,62			

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων της “BCF” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο με βάση τα στοιχεία του πίνακα 26 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 14):

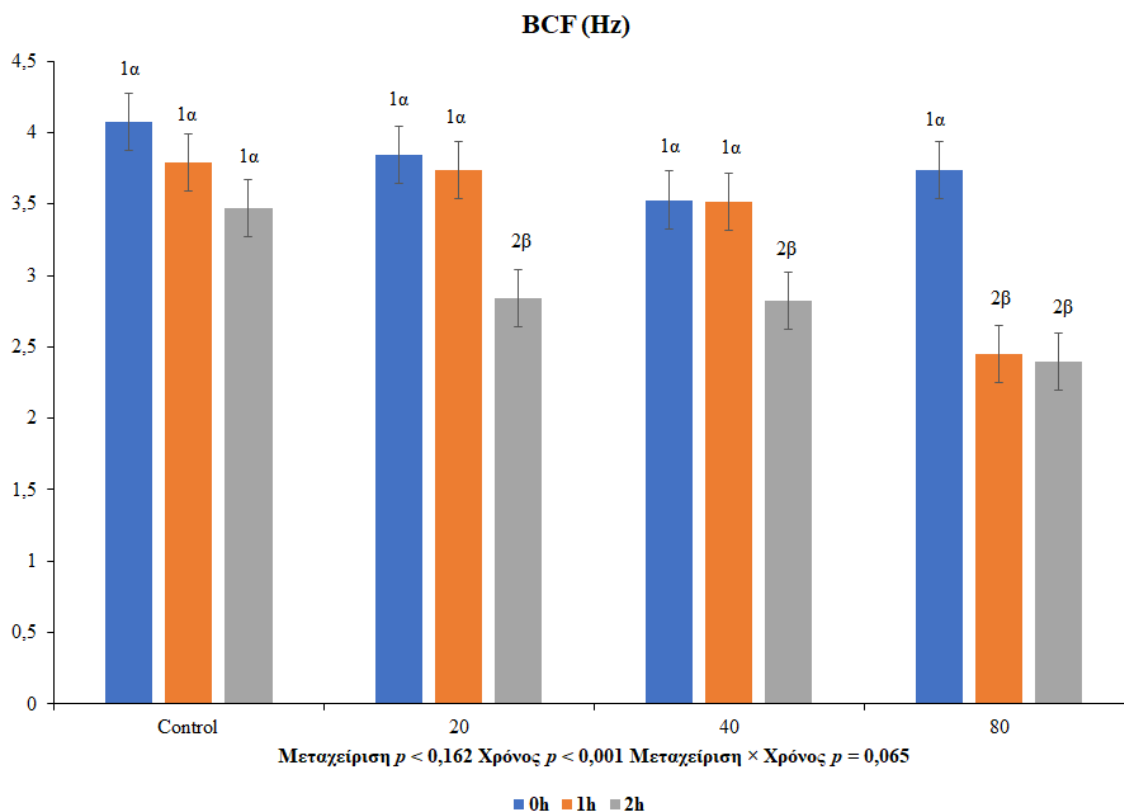
- για την ομάδα ελέγχου δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές,
- για την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης σε σύγκριση με τη μέτρηση στις δύο ώρες καθώς και στη μέτρηση στην πρώτη ώρα με τη

μέτρηση στις δύο ώρες και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση στη “BCF”,

- για την ομάδα μέσης συγκέντρωσης παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στις δύο ώρες καθώς και στη μέτρηση στην πρώτη ώρα με τη μέτρηση στις δύο ώρες και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση στη “BCF” και
- για την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης σε σχέση με τη μέτρηση στη μία ώρα και τη μέτρηση στις δύο ώρες (μείωση BCF).

Πίνακας 26. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων της “BCF (Hz)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.

Μεταχείριση	Χρόνος	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
Ελέγχου	0 ώρες	4,07±0,22	
	1 ώρα	3,79±0,22	
	2 ώρες	3,47±0,22	
20	0 ώρες	3,84±0,22	2 ώρες
	1 ώρα	3,74±0,22	2 ώρες
	2 ώρες	2,84±0,22	0 ώρες, 1 ώρα
40	0 ώρες	3,53±0,22	2 ώρες
	1 ώρα	3,52±0,22	2 ώρες
	2 ώρες	2,83±0,22	0 ώρες, 1 ώρα
80	0 ώρες	3,74±0,22	1 ώρα, 2 ώρες
	1 ώρα	2,45±0,22	0 ώρες
	2 ώρες	2,40±0,22	0 ώρες
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=0,62			



Διάγραμμα 14. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στην παράμετρο BCF (Hz) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωσή του.

Οι δείκτες α, β υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων εντός του κάθε χρόνου ελέγχου (p -value<0,05).

Οι δείκτες 1, 2 υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των χρόνων ελέγχου για κάθε ομάδα (p -value<0,05).

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων των “Σπερματοζωαρίων σε υπερκινητικότητα (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση με βάση τα στοιχεία του πίνακα 27 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 15):

- για την αρχική μέτρηση παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου, σε σύγκριση με την ομάδα μέσης συγκέντρωσης και την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση του αριθμού “Σπερματοζωαρίων σε υπερκινητικότητα”,
- για τη μέτρηση στην πρώτη ώρα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου με την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης, την ομάδα μέσης συγκέντρωσης και την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης καθώς και της ομάδας χαμηλής συγκέντρωσης με την ομάδα

υψηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση του αριθμού “Σπερματοζωαρίων σε υπερκινητικότητα” και

- για τη μέτρηση στις δύο ώρες παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της ομάδας ελέγχου σε σχέση με την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση του αριθμού “Σπερματοζωαρίων σε υπερκινητικότητα”.

Πίνακας 27. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων του αριθμού “Σπερματοζωαρίων σε υπερκινητικότητα (%)” μέσα στον παράγοντα χρόνο για κάθε μεταχείριση.

Χρόνος	Μεταχείριση	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
0 ώρες	Ελέγχου	43,50±7,08	40, 80
	20	30,42±7,08	
	40	18,42±7,08	Ελέγχου
	80	20,50±7,08	Ελέγχου
1 ώρα	Ελέγχου	45,08±7,08	20, 40, 80
	20	23,92±7,08	Ελέγχου, 80
	40	16,92±7,08	Ελέγχου
	80	4,67±7,08	Ελέγχου, 20
2 ώρες	Ελέγχου	30,33±7,08	20
	20	9,67±7,08	Ελέγχου
	40	11,58±7,08	
	80	10,67±7,08	
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=19,90			

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων του αριθμού “Σπερματοζωαρίων σε υπερκινητικότητα” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο με βάση τα στοιχεία του πίνακα 28 παρατηρείται ότι (Διάγραμμα 15):

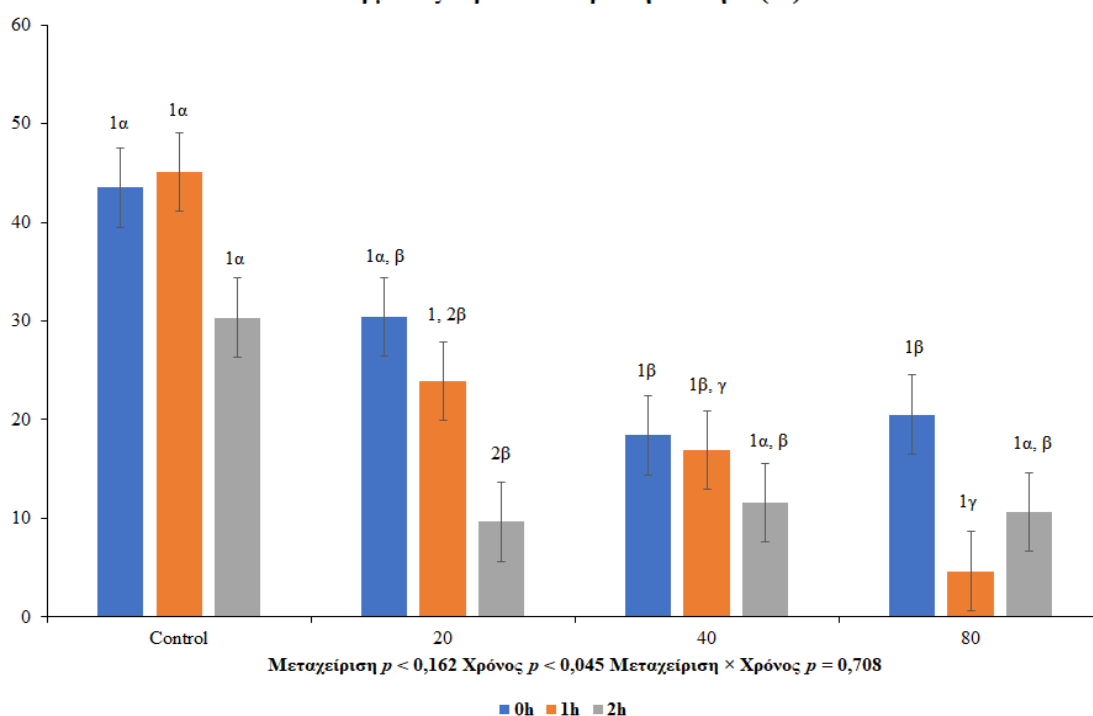
- για την ομάδα ελέγχου δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές,
- για την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στις δύο ώρες και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μείωση στον αριθμό των “Σπερματοζωαρίων σε υπερκινητικότητα”,
- για την ομάδα μέσης συγκέντρωσης δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές και
- για την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 28. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων του αριθμού “Σπερματοζωαρίων σε υπερκινητικότητα (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.

Μεταχείριση	Χρόνος	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
Ελέγχου	0 ώρες	43,50±7,08	
	1 ώρα	45,08±7,08	
	2 ώρες	30,33±7,08	
20	0 ώρες	30,42±7,08	2 ώρες
	1 ώρα	23,92±7,08	
	2 ώρες	9,67±7,08	0 ώρες
40	0 ώρες	18,42±7,08	
	1 ώρα	16,92±7,08	
	2 ώρες	11,58±7,08	
80	0 ώρες	20,50±7,08	
	1 ώρα	4,67±7,08	
	2 ώρες	10,67±7,08	

Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=19,80

Σπερματοζωάρια σε υπερκινητικότητα (%)



Διάγραμμα 15. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στα Σπερματοζωάρια με υπερκινητικότητα (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωσή του.

Οι δείκτες α, β, γ υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων εντός του κάθε χρόνου ελέγχου (p -value<0,05).

Οι δείκτες 1, 2 υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των χρόνων ελέγχου για κάθε ομάδα (p -value<0,05).

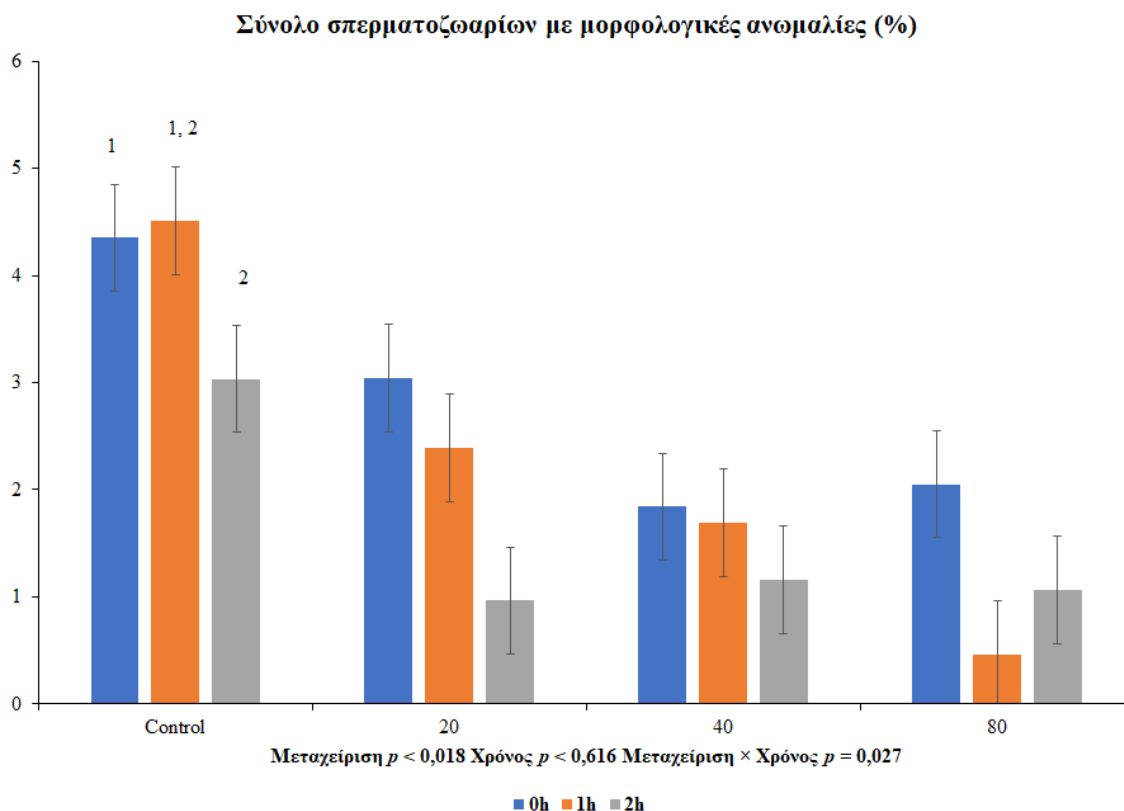
Όσον αφορά στο χαρακτηριστικό “Συνολικά σπερματοζωάρια με μορφολογικές ανωμαλίες (%)” οι διαφορές που παρατηρούνται ως προς την επίδραση του χρόνου δεν είναι στατιστικά σημαντικές (p -value=0,616, πίνακας 1).

Για την ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων του αριθμού “Σπερματοζωαρίων με μορφολογικές ανωμαλίες (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο με βάση τα στοιχεία του Πίνακα 29 παρατηρείται ότι (Σχήμα 16):

- για την ομάδα ελέγχου παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά, κατά μέσο όρο, μεταξύ της αρχικής μέτρησης με τη μέτρηση στις δύο ώρες και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται αύξηση στον αριθμό των “Σπερματοζωαρίων με μορφολογικές ανωμαλίες”,
- για την ομάδα χαμηλής συγκέντρωσης δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές,
- για την ομάδα μέσης συγκέντρωσης δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές και
- για την ομάδα υψηλής συγκέντρωσης δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές

Πίνακας 29. Δείκτης κεντρικής τάσης (μέσος όρος) και στατιστική διαφορά μεταξύ των απλών κύριων επιδράσεων του αριθμού “Σπερματοζωαρίων με μορφολογικές ανωμαλίες (%)” μέσα στον παράγοντα μεταχείριση για κάθε χρόνο.

Μεταχείριση	Χρόνος	Μέσος όρος±SE μέσου όρου	Διαφέρει από
Ελέγχου	0 ώρες	3,75±0,52	2 ώρες
	1 ώρα	4,58±0,52	
	2 ώρες	5,92±0,52	0 ώρες
20	0 ώρες	6,00±0,52	
	1 ώρα	5,75±0,52	
	2 ώρες	5,33±0,52	
40	0 ώρες	6,08±0,52	
	1 ώρα	5,33±0,52	
	2 ώρες	6,75±0,52	
80	0 ώρες	6,17±0,52	
	1 ώρα	6,33±0,52	
	2 ώρες	5,25±0,52	
Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά=1,46			



Διάγραμμα 16. Επίδραση του χρόνου και της προσθήκης νανοσωματιδίων σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις στα Σπερματοζώαρια με μορφολογικές ανωμαλίες (%) του κρυο-συντηρημένου σπέρματος ταύρου, μετά την αναβίωσή του.

Οι δείκτες 1, 2 υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των χρόνων ελέγχου για κάθε ομάδα (p -value<0,05).

Όσον αφορά στο χαρακτηριστικό “Μορφολογικές ανωμαλίες κεφαλής (%)” οι διαφορές που παρατηρούνται τόσο μεταξύ των ομάδων όσο και μεταξύ των χρόνων ελέγχου δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (p -value=0,078 και p -value=0,089, αντίστοιχα, πίνακας 1). Παρόμοια αποτελέσματα χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν για τα σπερματοζώαρια με “Πρωτοπλασματικά σταγονίδια (%)” (p -value=0,851, p -value=0,962, πίνακας 1), τα σπερματοζώαρια με “Μορφολογικές ανωμαλίες ουράς (%)” (p -value=0,157, p -value=0,157, πίνακας 1), τη “Ζωτικότητα (%)” (p -value=0,541, p -value=0,140, πίνακας 1) και τα σπερματοζώαρια “HOST + (%)” (p -value=0,541, p -value=0,140, πίνακας 1).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα NP SnO₂ θεωρούνται ως ένα από τα πιο σημαντικά νανοϋλικά, λόγω των αντιοξειδωτικών και αντιβακτηριακών ιδιοτήτων τους, της βιοσυμβατότητας, των ισχυρών φυσικών και χημικών αλληλεπιδράσεων με τα είδη φορείς τους, καθώς και του υψηλού βαθμού διαφάνειας στο ορατό φάσμα (Rehman και συν., 2019).

Οι εφαρμογές νανοσωματιδίων σε διάφορους τομείς της σύγχρονης ζωής έχουν αυξηθεί. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι πιθανές παρενέργειες προκαλούνται από την έκθεση σε NPs και η εκτεταμένη χρήση τους έχει εγείρει ανησυχία για την ασφάλειά τους ως προς την υγεία των ανθρώπων και των ζώων (Johnson και συν., 2010). Σε δοκιμές *in vivo*, έχει τεκμηριωθεί ότι τα νανοσωματίδια μπορούν να διέλθουν μέσω του αιματο-ορχικού φραγμού (Lan and Yang, 2012) και υπό *in vitro* συνθήκες μπορεί να προκαλέσουν στα κύτταρα του όρχη νέκρωση, απόπτωση και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Braydich-Stolle και συν., 2005).

Η τοξικότητα των NPs στο αναπαραγωγικό σύστημα είναι καλά τεκμηριωμένη στη βιβλιογραφία (Ema και συν., 2010). Μελέτες με NPs οξειδίου του σιδήρου (Özgür και συν., 2018), αργύρου (Asare και συν., 2012), χρυσού (Moretti και συν., 2013) και οξειδίου του ψευδαργύρου (Barkhordari και συν., 2013) υπό *in vitro* ή *in vivo* συνθήκες αναφέρουν αντιφατικά αποτελέσματα και συμπεράσματα σχετικά με τοξική (Braydich-Stolle και συν., 2005) ή ευεργετική (Durfey και συν., 2019; Özgür και συν., 2018) επίδρασή τους στο σπέρμα. Ωστόσο, χάρη στις αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητές τους, η χρήση τους θα μπορούσε να αποδειχθεί πολύτιμη για τις λειτουργίες του σπέρματος και τη γονιμότητα του αρσενικού, ειδικά σε τεχνολογίες όπως η ψύξη και η κρυοσυντήρηση, που συσχετίζονται με την πρόκληση οξειδωτικής καταπόνησης και βλάπτουν τη γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων (Khalil και συν., 2018).

Δεν υπάρχουν δημοσιευμένα ερευνητικά δεδομένα αναφορικά με τις επιμέρους αντιβακτηριακές ή/και κυτταροτοξικές επιδράσεις νανοσωματιδίων κασσιτέρου στο σπέρμα των παραγωγικών ζώων. Επιπροσθέτως, δεν υπάρχουν δημοσιευμένα στοιχεία για την επίδραση νανοσωματιδίων κασσιτέρου στην γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος των παραγωγικών ζώων. Με την εκπόνηση της παρούσας μελέτης επιδιώκεται να καλυφθεί το εν λόγω κενό γνώσης, αρχής γενομένης από τον προσδιορισμό της μη τοξικής συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων

κασσιτέρου στο σπέρμα του ταύρου. Επιπλέον, κρίθηκε αναγκαίο να μελετηθεί ο χρόνος συνεπώασης ως πιθανός παράγοντας επίδρασης αλληλεπίδρασης των σπερματοζωαρίων με τα υπό μελέτη NPs.

Σύμφωνα με τα διαθέσιμα δεδομένα, η προτεινόμενη χρήση των κρυοσυντηρημένων/αναθερμασμένων σπερματοζωαρίων για τεχνητή σπερματέγχυση περιορίζεται στα 90 λεπτά μετά την αναβίωση (Pawshé και συν., 2017). Στην μελέτη μας οι χρόνοι εκτίμησης των παραμέτρων του κατεψυγμένου σπέρματος μετά την αναβίωση (μετά από επώαση 60 και 120 λεπτών) επιλέχθηκαν ώστε να προσομοιάζουν με τους αναμενόμενους χρόνους ζωής των κρυοσυντηρημένων/αναθερμασμένων σπερματοζωαρίων στο γεννητικό σύστημα του θηλυκού. Η ανάλυση των πειραματικών δεδομένων ενισχύει την περαιτέρω μελέτη και πιθανή χρήση των NPsSnO₂ στους χειρισμούς του σπέρματος του ταύρου χωρίς τοξικότητα. Η έλλειψη σχετικών βιβλιογραφικών δεδομένων καθιστά τα ευρήματα της παρούσας διατριβής ενδιαφέροντα και πρωτότυπα. Αναλυτικότερα, τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ισχυρή και ελαφρά σπερματοτοξική επίδραση των συγκεντρώσεων 80 και 40 μl νανοσωματιδίων /ml σπέρματος, αντίστοιχα. Όλες οι υπό εξέταση παράμετροι του σπέρματος επηρεάστηκαν αρνητικά από τη μεγάλη συγκέντρωση νανοσωματιδίων (80 μl/ml) που κρίθηκε εμφανέστατα τοξική. Η μέση συγκέντρωση (40 μl/ml) εμφάνισε βλαπτική επίδραση έναντι κάποιων επιμέρους μορφών κίνησης (VCL, VSL, BCF), και του ποσοστού των υπερκινητικών σπερματοζωαρίων, χωρίς όμως να επηρεάσει τη συνολική και προοδευτική κινητικότητα, τα ταχέως, μετρίως, βραδέως κινούμενα και ακίνητα σπερματοζωάρια. Βάσει των αποτελεσμάτων, η μέση συγκέντρωση νανοσωματιδίων κασσιτέρου πιθανόν θα μπορούσε να αξιοποιηθεί, αν πρωτίτερα ελεγχθεί η αντιμικροβιακή της δράση σε χρόνο αλληλεπίδρασης με τα σπερματοζωάρια μικρότερο της 1 ώρας, όπως εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη. Το πιο ενδιαφέρον είναι η καταλληλότητα της μικρής συγκέντρωσης (20 μl/ml), η οποία υπό τις συνθήκες του συγκεκριμένου πειραματισμού δεν είχε κάποια δυσμενή επίδραση στις παραμέτρους του σπέρματος. Εξαιρέση αποτέλεσαν οι παράμετροι BCF και VCL για τις οποίες σημειώθηκαν μικρότερες τιμές σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου μετά από 2 ώρες συνεπώασης. Το γεγονός τούτο υποδεικνύει την 1 ώρα συνεπώασης ως καταλληλότερο χρόνο για την αξιοποίηση της ευεργετικής δράσης των νανοσωματιδίων χωρίς καμία απώλεια της ποιότητας του σπέρματος του ταύρου. Οι Tsakmakidis και συν., (2020) σε

ανάλογη μελέτη, απομάκρυναν τα νανοσωματίδια Fe_3O_4 από το σπέρμα του κάπρου μετά από κάποιο χρόνο συνεπώσεως, με τη βοήθεια μαγνήτη. Η ίδια μεθοδολογία θα μπορούσε να δοκιμαστεί και στο σπέρμα του ταύρου μετά από 1 ώρα συνεπώσεως, καθιστώντας την ωφέλιμη συγκέντρωση των 20 μ l απολύτως ασφαλή.

Η μη τοξική δράση NPs κασσιτέρου στη συνολική και προοδευτική κίνηση των σπερματοζωαρίων είναι υψηλής σημασίας καθώς είναι κοινά αποδεκτό πως σχετίζονται απόλυτα με την *in vivo* και την *in vitro* γονιμότητα (Oliveira και συν., 2013). Επιπλέον, οι Kathiravan και συν., (2011) αναφέρουν ότι οι επιμέρους μορφές κίνησης VCL, VSL και VAP, παράμετροι που δεν επηρεάστηκαν από την προσθήκη νανοσωματιδίων (20 μ l/ml) στους πειραματισμούς της παρούσας μελέτης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της *in vivo* γονιμότητας. Η συνδυαστική εκτίμηση και αξιολόγηση πολλαπλών παραμέτρων του σπέρματος συσχετίζεται ισχυρότερα με τη γονιμότητα. Συγκεκριμένα οι Farell και συν., (1998), απέδειξαν ότι η συνδυαστική αξιολόγηση της προοδευτικής κίνησης με τις ALH, BCF και VSL έχουν μεγαλύτερη προγνωστική αξία για την *in vivo* γονιμότητα συγκριτικά με τη μεμονωμένη εκτίμηση της συνολικής κινητικότητας. Τα προαναφερθέντα ενισχύουν την αξία των ευρημάτων της παρούσας μελέτης, διότι η επεξεργασία του κρυσταλλωμένου αναθερμασμένου σπέρματος του ταύρου με τη χαμηλή συγκέντρωση NPs SnO_2 φαίνεται να μην επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα και τη γονιμοποιητική του ικανότητα.

Η αποκάλυψη της μη τοξικής συγκέντρωσης NPs SnO_2 αποτελεί έναυσμα για περαιτέρω έρευνα σχετικά με την αντιμικροβιακή δράση τους. Οι Dobrucka και συν., (2018), χρησιμοποίησαν NPs SnO_2 έναντι μυκήτων και βακτηρίων και διαπίστωσαν τη βιοκτόνο δράση τους με τους μύκητες να εκδηλώνουν μεγαλύτερη ευαισθησία. Στη μελέτη αυτή η συγκέντρωση των NPs SnO_2 ήταν 0.3125% έως 30% του όγκου του διαλύματος μικροοργανισμών σε δοκιμαστικό σωλήνα. Αν και η αρχική συγκέντρωση δεν αναφέρεται και οι ακριβείς συγκρίσεις δεν είναι εφικτές, απλώς σημειώνεται ότι η προαναφερθείσα αναλογία εμπίπτει σε αυτή που χρησιμοποιήθηκε και στη δική μας έρευνα, όπου η ωφέλιμη συγκέντρωση νανοσωματιδίων αντιστοιχούσε στο 2% του τελικού όγκου. Επίσης, ενδιαφέροντα συμπεράσματα προέκυψαν από την εργασία των Amininezhad και συν., (2015), όπου τα νανοσωματίδια κασσιτέρου σε συγκέντρωση 20 ppm εμφάνισαν ικανοποιητική αντιβακτηριακή δράση τόσο κατά των θετικών, όσο και κατά των αρνητικών κατά

Gram βακτηρίων που εξετάστηκαν. Στην προσβάσιμη σε εμάς βιβλιογραφία δεν ανευρεθήκαν άλλα άρθρα σχετικά με την αντιμικροβιακή δράση των NPs SnO₂. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι η αποσαφήνιση του μηχανισμού της βακτηριοκτόνου δράσης των νανοσωματιδίων είναι υπό εξέλιξη. Είναι δύσκολο να γίνει διάκριση μεταξύ της βακτηριοκτόνου δράσης των νανοσωματιδίων από εκείνη των ιόντων που απελευθερώνονται από τα νανοσωματίδια (Todaka και συν., 2003). Γενικά είναι αποδεκτό ότι τα θεραπευτικά υποστρώματα διευκολύνουν την απελευθέρωση ιόντων Sn⁴⁺. Η παρουσία νανοσωματιδίων στο διάλυμα θα εξασφάλιζε τη συνεχή απελευθέρωση ιόντων Sn⁴⁺, τα οποία μπορούν να προσκολλώνται στο αρνητικά φορτισμένο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα και να το ωθούν σε ρήξη, οδηγώντας έτσι σε μετουσίωση πρωτεϊνών και κυτταρικό θάνατο (Khanoma και συν., 2018). Ως μηχανισμοί δράσης κατά των βακτηρίων έχουν προταθεί για τα νανοσωματίδια οξειδίων μετάλλων, η αποσύνθεση τους, η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση τους με το κυτταρικό τοίχωμα μικροοργανισμών, ο σχηματισμός δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) (Lin και συν., 2014) και η φωτοκαταλυτική ενεργοποίηση τους (Chávees-Calderón και συν., 2016). Οι Subbiahdoss και συν., (2012) αναφέρουν τη συσσώρευση των NPs SnO₂ στην επιφάνεια της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης ως πιθανή αιτιολογία της αντιβακτηριακής τους δράσης. Σε συμφωνία με αυτό αναφέρεται από τους Vidhu και συν., (2015) ότι οι ROS που παράγονται λόγω της παρουσίας νανοσωματιδίων SnO₂ αλληλοεπιδρούν με τις μεμβράνες του βακτηρίου και επιτρέπουν τη διείσδυση των νανοσωματιδίων σε αυτό. Οι Khanom και συν., (2018) διαπίστωσαν ότι η επιφάνεια των κυτταρικών τοιχωμάτων της *E.coli* που υποβλήθηκε σε επεξεργασία με νανοσωματίδια SnO₂ υπέστη σοβαρή βλάβη σε σύγκριση με την *E.coli* που δεν υπέστη αυτή την επεξεργασία. Συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια προκάλεσαν αποσταθεροποίηση της εξωτερικής μεμβράνης και ρήξη της πλασματικής μεμβράνης, προκαλώντας έτσι εξάντληση του ενδοκυτταρικού ATP. Σύμφωνα με αυτή την έρευνα, ο τρόπος δράσης των νανοσωματιδίων SnO₂ και των ιόντων Sn⁴⁺ είναι παρόμοιος, αν και τα νανοσωματίδια φαίνεται να είναι αποτελεσματικά σε σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις από αυτές των ιόντων (Khanom και συν., 2018). Ωστόσο, ο Morones και συν., (2005) πρότειναν ότι ο βακτηριοκτόνος μηχανισμός των νανοσωματιδίων SnO₂ και των ιόντων Sn⁴⁺ είναι σαφώς διαφορετικοί. Η δραστηριότητα βιοκαταλυτών όπως το κolloειδές SnO₂ είναι ευθέως ανάλογη με την ισχύ προσρόφησής τους σε μια βιολογική επιφάνεια. Για την *E.coli* τα νανοσωματίδια

SnO₂ επέδειξαν μεγαλύτερη βακτηριοκτόνο αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με τα συμβατικά αντιβιοτικά όπως η γενταμικίνη, το ναλιξιδικό οξύ κ.λπ. (Khanom και συν., 2018). Όλα τα προ-αναφερθέντα, το δεδομένο ότι η βακτηριοκτόνος ισχύς αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων (Sagadevan και συν., 2021), καθώς και τα ευρήματα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης θα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν σε μελλοντική έρευνα για τη διερεύνηση της επάρκειας των νανοσωματιδίων κασσιτέρου ως εναλλακτικά των αντιβιοτικών.

Τέλος, είναι γνωστό ότι η διεργασία της ψύξης και ιδιαίτερα της κατάψυξης, καθιστά τα σπερματοζώαρια πιο ευαίσθητα λόγω μεταβολών στην αρχιτεκτονική της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που επηρεάζει το ποσοστό και την κατανομή των λιπιδίων της (Holt, 2000). Βάσει αυτού, σε αντίστοιχη επεξεργασία του νωπού σπέρματος του ταύρου, το οποίο δεν υφίσταται την ανωτέρω καταπόνηση και όπου απαιτούνται εξίσου αυξημένες συνθήκες υγιεινής, είναι πιθανό να μπορεί να γίνει χρήση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων NPs SnO₂ από την αντίστοιχη ωφέλιμη συγκέντρωση για το κρυο-συντηρημένο σπέρμα ταύρου. Η θεωρία αυτή βασίζεται σε ισχυρές ενδείξεις και θα είχε ενδιαφέρον να αποδειχτεί και πειραματικά.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Η προσθήκη νανοσωματιδίων κασσιτέρου σε συγκέντρωση των 20 $\mu\text{l/ml}$ σπέρματος (μητρικό διάλυμα NPsSnO_2 0,25g / 100 ml απεσταγμένου νερού) είναι μη κύτταρο-τοξική για το κρυοσυντηρημένο/αναθερμασμένο σπέρμα του ταύρου και ενισχύει περαιτέρω πειραματισμούς αναφορικά με την αντιμικροβιακή δράση τους και την πιθανή χρήση τους σε αραιωτικά μέσα ως εναλλακτικά των αντιβιοτικών ή ως παράγοντες με αντιοξειδωτική δράση για τη διατήρηση και βελτίωση της γονιμοποιητικής ικανότητας των σπερματοζωαρίων του ταύρου
- Ο χρόνος της καθ' όλα ασφαλούς αλληλεπίδρασης των νανοσωματιδίων κασσιτέρου στη συγκέντρωση των 20 $\mu\text{l/ml}$ σπέρματος με τα σπερματοζωάρια του ταύρου προσδιορίστηκε στη 1 ώρα, διότι η 2ωρη αλληλεπίδραση φάνηκε να επηρεάζει αρνητικά τις παραμέτρους BCF και VCL.
- Η συγκέντρωση 80 μl νανοσωματιδίων κασσιτέρου /ml σπέρματος είναι ισχυρά κυτταροτοξική για τα σπερματοζωάρια του ταύρου καθιστώντας απαγορευτική την εφαρμογή της σε πρωτόκολλα επεξεργασίας του σπέρματος του ταύρου.
- Η συγκέντρωση 40 μl νανοσωματιδίων κασσιτέρου /ml σπέρματος είναι κυτταροτοξική για τα σπερματοζωάρια του ταύρου, διότι επηρεάζει αρνητικά τις επιμέρους μορφές κίνησης VCL, VSL, BCF, και το ποσοστό των υπερκινητικών σπερματοζωαρίων.
- Η συγκέντρωση 40 μl νανοσωματιδίων κασσιτέρου / ml σπέρματος δεν επηρεάζει τις βασικές κινητικές παραμέτρους (συνολική κινητικότητα, προοδευτικά, ταχέως, μετρίως, βραδέως κινούμενα και ακίνητα σπερματοζωάρια) του σπέρματος του ταύρου σε σχέση με το μάρτυρα, διεγείροντας περαιτέρω διερεύνηση με μικρότερους χρόνους αλληλεπίδρασης NPs / σπερματοζωαρίων από αυτούς που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη.
- Η χρήση νανοσωματιδίων κασσιτέρου κατά τους χειρισμούς του σπέρματος του ταύρου είναι εφικτή υπό προϋποθέσεις. Ο σεβασμός και η τήρηση των ορίων της συγκέντρωσης νανοσωματιδίων κασσιτέρου που προέκυψαν από αυτή τη μελέτη μπορεί να ενισχύσει και να ωφελήσει την ερευνητική δραστηριότητα στο συγκεκριμένο ερευνητικό πεδίο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abriouel, H., Omar N.B., Molinos A.C., López R.L., Grande M.J. Martínez-Viedma P., Ortega E., Cañamero M.M., Galvez A. «Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples » *Int J Food Microbiol*, 2008: 123(1-2): 38-4.

Ahmed, H., Jahan S., Khan A., Khan L., Khan B.T., Ullah H. and Ullah K. «Capacity and in vivo fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. » *Theriogenology*, 2020: 145(3): 190-197.

Ahmed, K., Kumar A.A., Mohan G. «Bacterial flora of preputial washing and semen of Murrah buffalo bulls and then antibiotic sensitivity pattern. » *Ind J Com Microbiol Immuno Infect Disease*, 2001: 22: 63-64.

Althouse, G.C. «Sanitary procedures for the production of extended semen. » *Reprod Domest Anim*, 2008: 43:374–8.

Andrabi, S.M., Maxwell W.M. «A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. » *Anim Reprod Sci*, 2007: 99:223-43.

Asare, N., Instanes C., Sandberg W.J., Refences M., Schwarze P., Kruszewski M., Brunborg G. «Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. » *Toxicology*, 2012: 291:6572

Banday, M.N., Lone F.A., Rasool F., Rashid M., & Shikari A. «Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. » *Cryobiology*, 2017: 74, 25–30.

Barkhordari, A., Hekmatimoghaddam S., Jebali A., Khalili M.A., Talebi A., Noorani M. «Effect of zinc oxide nanoparticles on viability of human spermatozoa. » *Iran J Reprod Med*, 2013: 11,767-771

Bergeron, A., Manjunath P. «New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk» *Mol Reprod Dev*, 2006: 73 (10), 1338-1344.

Bhakat, C., Raina V.S. and Nagpaul P.K. «Assessment of bacterial load in accessories used in artificial insemination. » *Indian J Anim Prod Manage*, 199: 13: 223-224.

Billas, I.M., Becker J. A., Chatelains A., & de Heer W. A. «Magnetic moments of iron clusters with 25 to 700 atoms and their dependence on temperature.» *Phys Rev Lett*, 1993: 71(24), 4067.

Blood, D.C., Henderson J.A., Radostits O.M. *Veterinary Medicine*. 5th. London: Bailliere Tindall, 1979.

Braydich-Stolle, L., Hussain S., Schlager J.J. «In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. » *Toxicol Sci*, 2005, 88:412–19.

Buranaamnuay, K., Sangsuwan P., Changsangfa C., Faisaikarm T. and Kaeoket K. «Influence of Discontinuous Pure Sperm and Opti Prep Gradient Centrifugations on Bovine Sperm Quality and the Sex Ratio of in vitro Produced Embryos. » Chiang Mai J Sci, 2014: 41(X): 1-12.

Buzea, C., Pacheco I.I., Robbie K. «Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. » *Biointerphases*, 2007: 2:17-71.

Cabello, F.C. «Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. » *Environ Microbiol*, 2006, 8(7):1137-1144.

Care, A., Bergquist P. L., & Sunna A. «Solid-binding peptides: smart tools for nanobiotechnology. » *Trends Biotechnol*, 2015, 33(5), 259–268.

Chaturvedi, S., Dave P. N., & Shah N. K. «Applications of nano-catalyst in new era. » *J Saudi Chem Soc*, 2012: 16(3), 307-325.

Chávez-Calderón, A., Paraguay-Delgado F., Orrantia-Borunda E., Luna-Velasco A. «Size effect of SnO₂ nanoparticles on bacteria toxicity and their membrane damage. » *Chemosphere*, 2016: 165, 33–40.

Collins, W.J., Braton R.W., and Henderson C.R. «The relationship of semen production to sexual excitement of dairy bulls, » *J Dairy Sci*, 1951: 34: 224.

Das, D., Nath B.C., Philon, P., & Dolui S.K. «Synthesis and evaluation of antioxidant and antibacterial behavior of CuO nanoparticles. » *Colloids Surf B*, 2013: 101, 430–433.

Davis, M. E. and Tilley D. «Future directions in catalysis: Structures that function at the nanoscale. » [Online]., 2003.

De Alencar Mota, A. L. A., Ferreira, F., Ferreira Neto J. S., Dias, R. A., Amaku, M., Hildebrand Grisi-Filho, J. H., Picão Gonçalves, V. S. «Large-scale study of herd-level risk factors for bovine brucellosis in Brazil. » *Acta Trop*, 2016: 164, 226–2.

Din, S.Ud, Sabah Hanif Kiani, S. Haq, Ahmad P., Hardaker M. U., Iqbal Faruque M.R., Idris A.M., M.I. Sayyed. «Bio-Synthesized Tin Oxide Nanoparticles: Structural, Optical, and Biological Studies. » *Crystals*, 2022: 12, 614.

Dobrucka, R., Dlugaszewska J., & Kaczmarek M. «Cytotoxic and antimicrobial effect of biosynthesized SnO₂ nanoparticles using *Pruni spinosae* flos extract. » *Inor Nano-Met Chem*, 2018: 48(7), 367-376.

Dreaden, E.C., Alkilany A.M., Huang X., Murphy C.J. and El-Sayed MA. «The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. » *Chem. Soc. Rev*, 2012: 41: 2740–2779.

El-Sheshtawy, R.I. and El-Nattat WS., «Effect of tris-extender supplemented with various concentrations of strawberry (*Fragaria* spp.) on bull semen preservability. » *Asian Pac J Reprod*, 2018: 7(2): 93-96.

El-Nattat, W.S., El-Sheshtawy R.I., El-Batawy K.A., Shahba M.I. and El-Seadawy I.E. «Preservability of buffalo bull semen in tris-citrate extender enriched with bee's honey. » JIPBS., 2016: 3: 180-185.

Ema, M., Kobayashi N., Naya M.«Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. » *Reprod.Toxicol*,2010: 30:343–52

Fakhrildin, M.B., Alsaadi M.R., RanaA.R. «Honey supplementation to semen-freezing medium improves human sperm parameters post-thawing. » *J Fam Plann Reprod Health*, 2014: 8: 27-31.

Falchi, L., Khalil W.A., Hassan M., & Marei W.F. «Perspectives of nanotechnology in male fertility and sperm function» *Int J Vet Sci. Med*, 2018: 265-269.

Farrel, P.B., Presicce G.A., Brockett C.C., Foote R.H.«Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility » *Theriogenology*, 1998, 49:871–879.

Felipe-Perez, Y.E., Juarez M.L, Hernandez E.O., Valencia J.J. «Viability of fresh and frozen bull sperm compared by two staining techniques. » *Acta Vet Bras*, 2008: 2: 123-130.

Ferrari, M. «Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges» *Nat Rev Cancer*, 2005: 5:161-171.

Fiaz, M., Usmani R.,Abdullah M., and Ahmad T. «Evaluation of semen quality of Holstein Friesian and Jersey bulls maintained under subtropical environment. » *Pak. Vet J*, 2010: 30:75–78

Foote, R.H. «Review: dairy cattle reproductive physiology research and management-past progress and future prospects. » *J Dairy Sci*, 1996: 79 (6), 980-990.

Francis, R., Joy N., Aparna E.P., Vijayan R. «Polymer Grafted Inorganic Nanoparticles, Preparation, Properties, and Applications: A Review. » *Polym Rev*, 2014: 54, 268-347.

Fricke, «Management strategies for improving reproductive efficiency in lactating dairy cows. » *Dairy Sci Techno*, 1999: 11:107-120.

Fuerst-Waltl, B., Schwarzenbacher H., Perner C., and J. Sölkner. «Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. » *Anim Reprod Sci*, 2006: 95:27–37.

Givens, M. D. «Review: Risks of disease transmission through semen in cattle. » *Animal*, 2018: 12(s1), s165–s171.

Grundmann, H., Klugman K.P., Walsh T., Ramon-Pardo P., Sigauque B., Khan W., Laxminarayan R., Heddini A., Stelling J. «A framework for global surveillance of antibiotic resistance. » *Drug Resist*, 2011: 14(2): 79-87.

Gubin, S. P., «Magnetic Nanoparticles» Ed. S. P. Gubin, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2009.

Gupta, H. C, Nair M. S., Naik S.G. and Srivastava R. K. « Effect of age and season on certain seminal characteristics of Surti buffalo bulls. » *Ind J. Dairy Sci.*, 1978: 31: 245-252.

Hancock, R.E.W., & Sahl H.-G. «Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. » *Nat. Biotechnol.*, 2006: 24(12), 1551–1557.

Haq, Sirajul, Pervaiz A., Mayeen U., Khandaker, Faruque M. R. I. Rehman W., Waseem M., and Salah Ud. Din. «Antibacterial, antioxidant and physicochemical investigations of tin dioxide nanoparticles synthesized via microemulsion method. » *Mater. Res. Express*, 2021: 8:035013.

Hoa, P.T., Managaki S., Nakada N., Takada H., Shimizu A., Anh D., Viet P.H., Suzuki S. «Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. » *Sci Total Environ*, 2011: 409(15): 2894-2901.

Holt, W.V. « Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. » *Theriogenology* 2000,53, 47–58.

Jack, R.W., Tagg J.R. and Ray B. «Bacteriocins of gram-positive bacteria. » *Microbiol Rev.*, 1995: 59(2): 171–200.

Januskauskas, A., Johannisson A., Rodriguez-Martinez H. «Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. » *Theriogenology*, 2003: 60: 743-758.

Jensen, R. & Swift B.L. *Jensen and Swift's Diseases of Sheep*. 3rd. Cleon V. Kimberling, 1988.

Jerez-Ebensperger, R.A., Luno V., Olaciregui M., Gonzalez N., Gil I., and de Blas L. «Effect of pasteurized egg yolk and rosemary honey supplementation on quality of cryopreserved ram semen. » *Small Rumin Res*, 2015: 130: 153-156.

Johnson, L.A., Weitze K.F., Fixer P., Maxwell W.M. «Storage of boar semen. » *Anim Reprod Sci*, 2000: 62 (1-3), 143-172.

Jortner, J., Rao C.N.R. «Nanostructured advanced materials. Perspectives and directions. » *Pure Appl. Chem*, 2002: 74:1491-1506.

Kathiravan, P., Kalatharan J., Karthikeya G., Rengarajan K., Kadirvel G. «Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system—a review. » *Reprod Domest Anim* 2011, 46:165-172.

Khalil, W.A., El-Harairy M.A., Zeidan A.E.B., Hassan M.A.E., Mohey-Elsaeed O. « Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. » *Int J Vet Sci Med*, 2018;6: S49–S56

Kaushik, A. «Biomedical Nanotechnology Related Grand Challenges and Perspectives. » *Front nanotechnol.* 2019: 1, 1.

Khan, I., Saeed K., and Khan I. «Nanoparticles: Properties, applications and toxicities» *Arab J Chem*, 2017: 10:203-222.

Khanom, R., Sahana P., Mahfujul H. «Antimicrobial Activity of SnO₂ Nanoparticles against *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus* and Conventional Antibiotics. » *ASRJETS*, 2018: 46, 1:111-121.

Kumar, D., Kumar P., Singh P., Yadav S.P. and Yadav P.S. «Assessment of sperm damages during different stages of cryopreservation in water buffalo by fluorescent probes. » *Cytotechnology*, 2016: 68: 451-458.

Kumbhakar, P., Ray S. S., & Stepano A. L. «Optical Properties of Nanoparticles and Nanocomposites. » *J Nanomater*, 2014: 1–2.

Lan, Z., Yang W.X. «Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood–testis barrier. » *Nanomed*, 2012: 7:579–96.

La Mer, V. K, Dinegar R. H. «Theory, Production, and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. » *J. Am. Chem. Soc.*, 1950: 72, 4847-4854.

Lin, X., Li J., Ma S., Liu G., Yang K., Tong M., Lin D. «Toxicity of TiO₂ nanoparticles to *Escherichia coli*: effects of particle size, crystal phase and water chemistry. » *LoS One*, 2014: 9, e110247

López Rodríguez, A., Rijsselaere T., Beek J., Vyt P., Van Soos A., & Maes D. «Boar seminal plasma components and their relationship with semen quality. » *Syst Biol Reprod Med*, 2012: 59(1), 5–12.

Mackness, G. «The immunological basis of acquired cellular resistance. » *J. Exp. Med*, 1964: 105-120.

Malhotra B. D, & Ali M. A. «Nanomaterials for Biosensors. » *Nanomaterials in Biosensors*, 2018: 1–74.

Malmgren, Olsson E.E, Engvall A., Albihn A. «Aerobic bacterial flora of semen and stallion reproductive tract and its relationship to fertility under field conditions. » *Acta Vet Scand*, 1998: 39:173–82.

Medeiros, C.M., Fogell F., Oliveira A.T., Rodrigues J.L. «Current status of sperm cryopreservation: why ‘isn’t, it, better?» *Theriogenology*, 2002: 57:327-44.

Meena Kumari M., & Philip D. «Synthesis of biogenic SnO₂ nanoparticles and evaluation of thermal, rheological, antibacterial and antioxidant activities. » *Powder Technol*, 2015: 270, 312–319.

Mehdi pour, Kia H.D., Nazari M. and Najafi A. «Effect of lecithin nanoliposome or soybean lecithin supplemented by pomegranate extract on post-thaw

flow cytometric, microscopic and oxidative parameters in ram semen. » *Cryobiology*, 2017: 78(10): 34-40.

Mitra, J., Chowdhury S., Panda S., Chakraborty M., and Singha A. «Microbiological evaluation of bovine frozen semen samples in West Bengal, India» *Explor Anim Medical Res*, 2016: 6,185–191.

Morones, J. R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramirez J.T. and Yacaman M.J.«The bactericidal effect of silver nanoparticles. » *Nanotechnology*, 2005:16, 2346–53.

Morrell, J.M., Valeanu A.S., Lundeheim N., Jóhannsson A. «Alternatives to Antibiotics in Semen Extenders Used in Artificial Insemination. » *The Global Antimicrobial Resistance Epidemic – Innovative Approaches and Cutting-Edge Solutions*, Ed. G. Tellez-Isaias, 2018.

Morrell, J. M., Stuhmann G., Meurling S., Lundgren A., Winblad C., Macias Garcia B., & Johannisson A. «Sperm yield after single layer centrifugation with Androcoll-E is related to the potential fertility of the original ejaculate. » *Theriogenology*, 2014: 81(8),1005-1011.

Moretti, E., Terzuoli G., Renieri T. «In vitro effect of gold and silver nanoparticles on human spermatozoa. » *Andrologia*,2012,45:392–6.

Mulvaney, P. «Metal nanoparticles: double layers, optical properties, and electrochemistry. » *Nanoscale Materials in Chemistry*, 2001: 121-167.

Najee, H. B., Al-Shawii, A.M. and Abd-Al Rahman L.Y. «Bacterial contamination of imported bulls frozen semen. » *AJVS*, 2012: 5,1.

Nazarov, F., Frattini F., De Martino L., Coppola R., & De Feo V. «Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. » *Pharmaceuticals*, 2013: 6(12), 1451–1474.

Ola Yemi, F.O., Oyeyemi D.A, Adeniji M.O. «Evaluation of sperm motility and viability in honey-included egg yolk-based extenders» *Global Vet*, 2011: 7: 19-21.

Oliveira, L.Z., Arruda R., Andrade A., Callaghan E., Reel P., Martins J., Santos R., Beletti M., Pèrè R., Monteiro F., Lima V. «Assessment of in vitro characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program» *Anim Reprod Sci*,2013,137:145-155.

Özgür, M., Ulu A., Balcıoğlu S., Özcan İ., Köytepe S., Ateş B., Özgür M.E., Ulu A., Balcıoğlu S., Özcan İ., Köytepe S., Ateş B. «The Toxicity Assessment of Iron Oxide (Fe₃O₄) Nanoparticles on Physical and Biochemical Quality of Rainbow Trout Spermatozoon. » *Toxics*,2018, 6:62.

Pawshe, M., Beca B., Unnikrishnan M., Harshan H., & Ghosh K. A. «Bovine semen thawed at 28°C or 37°C can be used for all till 90 min post-thaw. » *Indian J Anim Reprod*, 2017, 38: 2.

Perumal, P., Kumar K.T. and Srivastava S.K. «Infectious causes of infertility in Buffalo bull (*Bubalus bubalis*). » *Buffalo Bull*, 2013: 32(2): 71-82, 96.

Piasecka-Serafin, M. «The effect of the sediment accumulation in containers under experimental conditions on the infection of semen stored directly in liquid nitrogen (-196°C). » *Bull Acad Polon Sci Ser SciBiol*, 1972: 20:263-267.

Qi, W. H., & Wang M. P. «Size and shape dependent melting temperature of metallic nanoparticles. » *Mater Chem Phys*, 2004: 88(2-3), 280-284.

Ranold, B.S.M., Prabhakar T.G. « Bacterial analysis of semen and their antibiogram. » *Indian J Anim Sci*, 2001.: 71, 829-831.

Rajka, E., SándorM.D., Korossy C.Sc. «Allergic Responses to Infectious Agents. » *Immunological aspects of allergy and allergic diseases*, Springer-Science+ Business media, B.V., 1976.

Rehman, S., Asiri S. M., KhanF. A., JemmyB. R., Khan H., Akhtar S., Qurashi, A. «Biocompatible Tin Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antibacterial, Anticandidal and Cytotoxic Activities. » *ChemistrySelect*, 2019:4(14), 4013–4017.

Roduner, E. «Size matters: why nanomaterials are different. » *Chem Soc Rev*, 2006: 35: 583-592.

Roca V., Gil M., Cuello C., Parrilla I., Martinez E. «Challenges in pig artificial insemination.» *Reprod Domest Anim*, 2006: 41 Suppl 2 43-53.

Roitt, C.& Brostoff J., Male D., Cell-mediated immune reaction. 5th. London: Mosby International, 1998.

Safa, S., Moghaddam G., Jozani R.J., Daghigh Kia H., Janmohammadi H. «Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. » *Anim Reprod Sci*, 2016: 174:100106.

Saikia, J. P, Paul S., Konwar B. K., &Samdarshi S. K. «Nickel oxide nanoparticles: A novel antioxidant. » *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010: 78(1), 146–148.

Saleem, H., & Zaidi S. J. «Recent Developments in the Application of Nanomaterials in Agroecosystems. » *Nanomaterials*, 2020: 10(12), 2411.

Sagadevan, S., Anita Lett J., Fatimah Is., Lokanathan Y., Léonard E., Won Chun Oh, Motalib Hossain M. A. and Johan M.R. «Current trends in the green syntheses of tin oxide nanoparticles and their biomedical applications. » *Mater. Res. Express* 8 (2021) 082001.

Sannat, C., Nair A., Sahu S. B., Sahasrabudhe S. A., Kumar A., Gupta A. K., & Shende R. K. «Critical sources of bacterial contamination and adoption of standard sanitary protocol during semen collection and processing in Semen Station. » *Vet World*, 2015: 8(5), 631–635.

Sarmah, A.K., Meyer M.T. «A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. » *Chemosphere*, 2006: 65(5): 725-759.

Sathe, S., & Shipley C. F. «Cryopreservation of Semen. » *Bovine Reproduction*, 2014: 662–670.

Schulze, M., Dathe M., Waberski D., Muller K. «Liquid storage of boar semen: current and future perspectives on the use of cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders. » *Theriogenology*, 2016: 85:39–46.

Shaoyong, W., Li Q., Ren Z., Wei C., Chu G., DongW., Pang W. «Evaluation of ϵ -polylysine as antimicrobial alternative for liquid-stored boar semen. » *Theriogenology*, 2019: 130, 146–156.

Shaoyong, W., Li Q., Ren Z., Xiao J., Diao Z., Yang G., &Pang. «Effects of kojic acid on boar sperm quality and anti-bacterial activity during liquid preservation at 17 °C.» *Theriogenology*., 2019: 140:124-135.

Sharma, R.K., Goyal A.K. and Bhat R.A. «Antifertility activity of plant extracts on female reproduction: A review. » *Int J Pharm Biol Sci*, 2013: 3(3): 493-514.

Shin, S. J., LeinD. H., PattenV. H. and RuhnkeH. L. «A new antibiotic combination for frozen bovine semen. 1. Control of Mycoplasmas, Ureaplasmas, Campylobacter fetus subsp. venerealis and Haemophilussomnus. » *Theriogenology*, 1988.

Shukla, M.K. and Misra A. K. «Correlation between seminal characteristics in Murrah buffaloes. » *Indian J Anim Sci*, 2005: 75: 263-266.

Shukla, M.K. «Correlation of microbial load of cryopreserved semen with quality of neat and cryopreserved murrah buffalo bull semen. » *Buffalo Bull*, 2005: 24: 84-87.

Singh, G. and Prabhu S. S. «Effect of frequency of ejaculation upon the reaction time and semen quality of Haryana bulls. » *Indian J. Vet. Sci.*, 1983: 33: 230.

Snoj, T, KomalS., and MajdicG. «Effects of season, age, and breed on semen characteristics in different bos taurus breeds in a 31-year retrospective study. » *Theriogenology*, 2013: 79:847–852.

Speck, S., Courtiol A., Junkes C., Dathe M., Muller K., Schulze M. « Cationic synthetic peptides: assessment of their antimicrobial potency in liquid preserved boar semen. » *PLoS One*, 2014: 9: e105949.

Subbiahdoss, G., Sharifi S., Grijpma D. W., Laurent S., Van der Mei H. C., Mahmoudi M., and Busscher H.J. «Magnetic targeting of surface-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles yields antibacterial efficacy against biofilms of gentamicin-resistant staphylococci. » *Acta Biomater*, 2012:8 2047–55

Sukcharoen, N., Keith J., Irvine D.S., Aitken R.J. «Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in vitro: importance of sperm morphology and leukocyte contamination. » *Fertil Steril*, 1995: 63 (6), 1293-1300.

Tarig, A.A., Wahid H., Rosnina Y., Aimer N., Goh Y.M., Baiee F.H. and Ebrahimi M. «Effect of different concentrations of soybean lecithin and virgin coconut oil in Tris-based extender on the quality of chilled and frozen-thawed bull semen. » *Vet World*, 2017: 10(6): 672-678.

Todaka, Y., Nakamura M., Hattori S., Tsuchiya K., and Umemoto M. «Synthesis of ferrite nanoparticles by mechanochemical processing using a ball mill. » *Mat Trans*, 2003: 44, 277–284.

Thibier, M., Wagner H.G. «World statistics for artificial insemination in cattle. » *Divest Prod Sci*, 2002: 74 203-212.

Tibayrenc, Michel. «Encyclopedia of infectious diseases» *Modern Methodologies*. New: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2007.

Tsakmakidis, I. A., Samaras T., Anastasiadou S., Basioura A., Ntemka A., Michos I., Boscoc C. M. « Iron Oxide Nanoparticles as an Alternative to Antibiotics Additive on Extended Boar Semen. » *Nanomaterials*, 2020: 10(8), 1568.

Vidhu, V.K., Philip D. «Biogenic synthesis of SnO₂ nanoparticles: Evaluation of antibacterial and antioxidant activities. » *Spectrochim Acta A Mol*, 2015: 134, 372–379.

Vishwanath, R. «Artificial insemination: the state of the art.» *Theriogenology*, 2003: 59(2), 571–584.

Vishwanath, R., & Shannon P. «Storage of bovine semen in liquid and frozen state. » *Anim Reprod Sci*, 2000: 62(1-3), 23–53.

Visser, I.J., ter Leak E.A., Jansen H.B. «Failure of antibiotics gentamycin, tylosin, lincomycin and spectinomycin to eliminate *Mycoplasma bovis* in artificially infected frozen bovine semen. » *Theriogenology*, 1999: 51:689-697.

WHO, World Health Organization «Laboratory manual for the Examination and processing of human semen » *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*, 2010.

Wu, T.W., Cheng F.P., Chen I.H., Yang C.H., Tsai M.Y., Chang M.H., Wang J.H., Wu J.T. «The combinatorial effect of different equine semen paste concentrations, cryoprotectants and the straw-freezing methods cryoprotectants and the straw-freezing methods on the post-thaw boar semen quality» *Reprod Domest Anim*, 2013: 48 (1), 53-58.

Yang, D., Standley N., Xu Z. «Application of liquid semen technology under the seasonal dairy production system in New Zealand. » *Anim Reprod Sci*, 2018: 194, 2–10.

Yaniz, J.L., Marco-Aguado M.A., Mateos J.A., Santolaria P. «Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C.» *Anim Reprod Sci*, 2010: 122,142-149.

Yazdanshenas, P., Jahanbin R., Mohammadi S.A., Aminafshar M., Vaseghi D.H., Varnaseri H. «Effect of zinc nano-complex on bull semen quality and pregnancy outcome.» *J Animal Prod*, 2016: 18:173–81.

Yimer, N., Muhamma K., Sarsaifi Y., Rosnina H., Wahid A.M., Kaka A., Kuman A. «Effect of honey supplementation into Tris extender on cryopreservation of bull spermatozoa.» *MJAS*, 2015: 18: 47-54.

Zampieri, D., Santos V. G., Braga P. A. C. «Microorganisms in cryopreserved semen and culture media used in the in vitro production (IVP) of bovine embryo identified by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS).» *Theriogenology*, 2013: vol. 80, pp. 337–345.

Zhang, L., Wang H. «Multiple mechanisms of anti-cancer effects exerted by astaxanthin.» *Mar Drugs*, 2015: 13 (7), 4310-4330.

Zhao, Beauregard D.A., Loizou L., Davletov B., Brindle K.M. «Non-invasive detection of apoptosis using magnetic resonance imaging and a targeted contrast agent.» *Nat Med*, 2001: 7:1241-1244.

Zini, A., Lamirande E., & Gagnon C. «Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa.» *Int J Androl*, 1993: 16(3), 183–188.

Zuidema, D., Kerns K. and Sutovsky P. «An Exploration of Current and Perspective Semen Analysis and Sperm Selection for Livestock Artificial Insemination.» *Animals*, 2021: 11(12), 3563.

Μενεξές, Γ. (2013), Ανάλυση Παραλλακτικότητας Δεδομένων Γεωργικών Πειραμάτων με Στατιστικά Πακέτα. Διαθέσιμο στο <https://users.auth.gr/~gmenexes/>

Τσολάκης Α. Σύνθεση και Μελέτη Μαγνητικών Νανοφορέων με Δυνατότητα Πρόσδεσης σε Βήτα Αμυλοειδές: Υπερπαραμαγνητικά Νανοσωματίδια Οξειδίου του Σιδήρου με Επικάλυση Πυριτίας και Θειοφλαβίνη Τ. Πολυτεχνική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 2020.