



# Investigating the toxicity of zinc oxide nanoparticles compared to its different ions on biochemical parameters and damage to the spleen and testis of male mice

Mohammad Reza Yazdanshenas<sup>1</sup> | Mohammad Reza Rezaei<sup>2✉</sup> | Javad Kharkan<sup>3</sup>

1. Department of Environmental Engineering, Faculty of Natural Resources and Environment, University of Birjand, Birjand, Iran. E-mail: [mohammadrz\\_yazdanshenas@birjand.ac.ir](mailto:mohammadrz_yazdanshenas@birjand.ac.ir)

2. Corresponding Author, Department of Environmental Engineering, Faculty of Natural Resources and Environment, University of Birjand, Birjand, Iran. E-mail: [mrrezaei@birjand.ac.ir](mailto:mrrezaei@birjand.ac.ir)

3. Department of Environmental Engineering, Faculty of Natural Resources and Environment, University of Birjand, Birjand, Iran. E-mail: [javad.kh9191@birjand.ac.ir](mailto:javad.kh9191@birjand.ac.ir)

| Article Info                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | ABSTRACT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Article type:</b><br/>Research Article</p> <p><b>Article history:</b><br/>Received 17 June 2024<br/>Received in revised form 06 October 2024<br/>Accepted 31 October 2024<br/>Published online 01 July 2025</p> <p><b>Keywords:</b><br/><i>Apoptosis,</i><br/><i>Creatinine,</i><br/><i>Leydig cells,</i><br/><i>Serum,</i><br/><i>Zinc Chloride.</i></p> | <p>Despite the wide application of nano materials, there is very little information about the impact of different nanoparticles on human health and the environment. Therefore, the purpose of this study is to investigate the toxicity of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) compared to its different ions on biochemical parameters and damage to the spleen and testis of male mice. Mice were randomly exposed to ZnO NPs and its various ions in 5 groups of 5 (one control group). After the end of the test period (28 days), blood serum was collected and histological studies of mice spleen and testis were performed. Based on the obtained results, the serum creatinine level of all studied groups increased compared to the control group, while zinc nitrate (<math>Zn(NO_3)_2</math>) and zinc chloride (<math>ZnCl_2</math>) caused a significant increase in the creatinine level (<math>P&lt;0.05</math>) compared to the control group. Also, the level of serum bilirubin exposed to ZnO NPs and zinc sulfate (<math>ZnSO_4</math>) did not change compared to the control group, while <math>Zn(NO_3)_2</math> and <math>ZnCl_2</math> caused a significant increase (<math>P&lt;0.05</math>) in the level of blood serum bilirubin compared to the control group. Among the histological damages of the mouse testis, we can mention the change in the shape of the spermatogenic tubes, the increase in the number of leydig cells and the decrease in the population of spermatozoid cells and in the spleen tissue, it includes oedema and infiltration of inflammatory cells, arterial congestion, hemosiderin increase and spleen bleeding. Based on the obtained results, the severity of these injuries when mice are exposed to <math>ZnCl_2</math> is much higher than when they are exposed to ZnO NPs, <math>ZnSO_4</math>, and <math>Zn(NO_3)_2</math>.</p> |

**Cite this article:** Yazdanshenas, M.R., Rezaei, M.R., & Kharkan, J. (2025). Investigating the toxicity of zinc oxide nanoparticles compared to its different ions on biochemical parameters and damage to the spleen and testis of male mice. *Journal of Natural Environment*, 78 (Monitoring and Management of Natural Environmental Pollutants), 113-125. DOI: <http://doi.org/10.22059/jne.2024.378169.2687>



## بررسی سمیت نانوذرات اکسید روی در مقایسه با یون‌های مختلف آن بر روی پارامترهای بیوشیمیایی و آسیب‌های طحال و بیضه موش سوری نر

محمد رضا یزدان شناس<sup>۱</sup> | محمدرضا رضایی<sup>۲</sup> | جواد خارکن<sup>۳</sup>

۱. گروه محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران. رایانامه: [mohammadrz\\_yazdanshenas@birjana.ac.ir](mailto:mohammadrz_yazdanshenas@birjana.ac.ir)

۲. نویسنده مسئول، گروه محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران. رایانامه: [mrrezaei@birjand.ac.ir](mailto:mrrezaei@birjand.ac.ir)

۳. گروه محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران. رایانامه: [javad.kh9191@birjand.ac.ir](mailto:javad.kh9191@birjand.ac.ir)

| اطلاعات مقاله                                                                   | چکیده                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| نوع مقاله: مقاله پژوهشی                                                         | با وجود کاربرد گسترده نانومواد، اطلاعات بسیار اندکی در مورد تأثیر نانوذرات مختلف بر روی سلامت انسان و محیط‌زیست وجود دارد. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی سمیت نانوذرات اکسید روی در مقایسه با یون‌های مختلف آن بر روی پارامترهای بیوشیمیایی و آسیب‌های طحال و بیضه موش سوری نر می‌باشد. موش‌ها به‌طور تصادفی در ۵ گروه ۵ تایی (یک گروه کنترل) در معرض نانوذرات اکسید روی و یون‌های مختلف آن قرار گرفتند. پس از پایان دوره آزمایش (۲۸ روز) سرم خون جمع‌آوری شده و مطالعات بافت‌شناسی طحال و بیضه موش انجام شد. براساس نتایج به‌دست آمده سطح کراتینین سرم تمامی گروه‌های مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است در حالی که نیتрат و کلرید روی سبب افزایش معنی‌دار سطح کراتینین ( $P < 0.05$ ) نسبت به گروه کنترل شده است همچنین سطح بیلی‌روبین سرم در معرض نانوذرات اکسید روی و سولفات روی نسبت به گروه کنترل هیچ گونه تغییری نداشته است در حالی که نیترات و کلرید سبب افزایش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) سطح بیلی‌روبین سرم خون نسبت به گروه کنترل شده است. از جمله آسیب‌های بافت‌شناسی بیضه موش می‌توان به تغییر شکل لوله‌های اسپرم‌ساز، افزایش تعداد سلول‌های لایدیگ و کاهش جمعیت سلول‌های اسپرماتوزوئید اشاره نمود و در بافت طحال شامل اودما و آنفیلتراسیون سلول‌های التهابی، احتقان شریان، افزایش هموسیدرین و خونریزی طحال می‌باشد. براساس نتایج به‌دست آمده شدت این آسیب‌ها زمانی که موش در معرض کلرید روی قرار دارد بسیار بیشتر از زمانی است که در معرض نانوذرات اکسید روی، سولفات و نیترات روی قرار می‌گیرد. نتایج نشان داد که نانوذرات اکسید روی و یون‌های مختلف آن سبب تغییر در پارامترهای بیوشیمیایی سرم و آسیب‌های بافت‌شناسی گوناگون در بافت طحال و بیضه موش می‌شود با این حال، مطالعات بیشتری جهت پیش‌بینی اثرات ترکیبات مختلف روی به‌ویژه کلرید روی و استفاده ایمن از این ترکیبات پیشنهاد می‌شود. |
| تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۸                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۱۵                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۰                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۴/۱۰                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| کلیدواژه‌ها:<br>آپوپتوز،<br>سرم،<br>سلول‌های لایدیگ،<br>کراتینین،<br>کلرید روی. |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

استناد: یزدان شناس، محمدرضا؛ رضایی، محمدرضا؛ و خارکن، جواد (۱۴۰۴). بررسی سمیت نانوذرات اکسید روی در مقایسه با یون‌های مختلف آن بر روی پارامترهای بیوشیمیایی و آسیب‌های طحال و بیضه موش سوری نر. محیط زیست طبیعی، ۷۸ (ویژه‌نامه پایش و مدیریت آلاینده‌های محیط‌زیست طبیعی)، ۱۲۵-۱۱۳.



DOI: <http://doi.org/10.22059/jne.2024.378169.2687>

© نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

## مقدمه

فلزات سنگین به واسطه سمیت، ماندگاری طولانی در محیط زیست و توانایی تجمع در بدن انسان از طریق تجمع زیستی، آلاینده‌های محیطی شناخته شده‌ای هستند. آلودگی اکوسیستم‌های خشکی و آبی با فلزات سنگین یک نگرانی عمده محیط‌زیستی است که پیامدهایی برای سلامت عمومی دارد. فلزات سنگین می‌توانند در اثر ترکیب شدن با عناصر مختلف محیطی مانند آب، خاک و هوا به شدت سمی شوند و موجودات زنده از طریق زنجیره غذایی در معرض آنها قرار گیرند (Kharkan et al., 2019). فلزات سنگین بیشتر در بیوسفر مانند خاک، آب، و سنگ‌ها یافت می‌شوند و همچنین توسط انسان‌ها عمدتاً از طریق صنعت به محیط اطراف رها می‌شوند (Engwa et al., 2019). از جمله فلزات سنگین، عنصر روی می‌باشد که به صورت یون‌های مختلف پس از ورود به محیط زیست می‌تواند خطرات جدی را ایجاد کند (Velusamy et al., 2021).

نانوتکنولوژی یک علم جدید است و در حال حاضر دارای کاربردهای متعددی از جمله تولید کالاهای مصرفی تا تولید انواع دارو را دارد. با وجود کاربرد گسترده نانومواد، اطلاعات بسیار اندکی در مورد تأثیر نانوذرات مختلف بر روی سلامت انسان و محیط زیست وجود دارد (Elsharkawy et al., 2019). نانوذرات در سطوح نانومقیاس (۱ تا ۱۰۰ نانومتر) ساخته و استفاده می‌شوند و به دلیل نسبت سطح به حجم زیادی که دارند واکنش پذیری آنها نسبت به سایر مواد بیشتر می‌باشد (Radi et al., 2021). نانوذرات مختلف بر اساس ماهیت شیمیایی، اندازه ذرات و مورفولوژی، می‌توانند سبب آسیب‌های مختلف در موجودات شوند (Thakur et al., 2014). امروزه نانوذرات اکسید روی به دلیل نیمه‌هادی و مغناطیسی بودن به طور گسترده در صنعت‌های مختلفی از قبیل لوازم آرایشی بهداشتی، آشکارسازها، پزشکی و سلول‌های خورشیدی استفاده می‌شود (Rahdar et al., 2020). برخی از محققان بر این باورند که نانوذرات اکسید روی دارای سمیت کمی برای موجودات زنده می‌باشد زیرا فلز روی یک ماده معدنی ضروری و بخش مهمی برای بسیاری از آنزیم‌ها است و نقش اساسی در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها دارد (Sayadi et al., 2021). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که مکانیسم اصلی سمیت نانوذرات اکسید روی برای موجودات مختلف مربوط به انتشار کاتیون‌های فلزی یون روی می‌باشد (Heggelund et al., 2014) بنابراین مقایسه سمیت نانوذرات اکسید روی نسبت به یون‌های مختلف روی در مطالعات سم‌شناسی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. امروزه نانوذرات اکسید روی و یون‌های مختلف آن می‌توانند سلامت انسان و سایر موجودات را به روش‌های گوناگونی از قبیل تنفس، جذب پوستی و خوراکی تحت تأثیر قرار دهد. ورود نانوذرات از طریق دستگاه گوارش به بدن موجودات یکی از مهم‌ترین مسیرها می‌باشد (De Matteis, 2017; Sayadi et al., 2022). نانوذرات اکسید روی پس از ورود به دستگاه گوارش با چربی و پروتئین‌ها واکنش داده و توسط مایعات میان‌بافتی بین سلولی و خون به قسمت‌های مختلف بدن منتقل می‌شود و می‌توانند آسیب‌های بسیار شدیدی در بافت‌های مختلف ایجاد کند (Sayadi et al., 2024; Fujihara and Nishimoto, 2021). از طرفی، یون‌های مختلف روی این توانایی را دارند که از طریق انتقال و کانال‌های دریچه‌دار ولتاژ-یون وارد سلول‌های مختلف بافت شوند و آسیب‌های سلولی را ایجاد کنند (Nel et al., 2009). به عنوان مثال Almansour و همکاران (۲۰۱۷) بیان کردند که نانوذرات اکسید روی سبب آسیب‌های بافت‌شناسی از قبیل هپاتوکسی، آپوپتوز، اتساع سینوسی و نکروز در بافت کبد موش ویستار پس از ۲۱ روز می‌شود. همچنین Ramadan و همکاران (۲۰۲۲) بیان کردند که نانوذرات اکسید روی سبب واکنش‌های کبدی، دژنراسیون و احتقان سلولی در بافت کبد موش می‌شود. Lee و همکاران (۲۰۱۶) گزارش دادند که نانوذرات اکسید روی سبب انفیلتراسیون و ترومبوز سلولی چند کانونی در بافت ریه و اتساع لوله‌ای در کلیه موش می‌شود. Sakr و Steenkamp (۲۰۲۱) بیان کردند که نانوذرات اکسید روی سبب انحطاط سلول‌های کبدی، واکنش‌های سیتوپلاسم و نکروز در بافت کبد موش می‌شوند. مطالعات مختلف ثابت می‌کنند که نانوذرات اکسید روی توانایی عبور از سد خونی-مغزی و سد خونی-بیضه‌ای را دارند و سبب ایجاد استرس اکسیداتیو در موجودات مختلف می‌شوند. این نانوذرات در بافت بیضه توسط سلول‌های لایدیگ جذب می‌شوند و از طریق افزایش رادیکال‌های آزاد و از بین بردن غشای میتوکندری سبب آپوپتوز در سلول‌ها می‌شوند (Shen et al., 2019). طحال یک عضو مهم در سیستم ایمنی و لنفاوی بدن است و به دلیل وجود تعداد زیاد سلول فاگوسیتی نقش دفاعی بسیار مهمی در مقابل آنتی‌ژن‌های موجود در خون بر عهده دارد. طحال در ساخت گلبول‌های سفید خون نقش دارد که لنفوسیت نامیده می‌شوند تا سبب تقویت سیستم ایمنی بدن در مقابل آلاینده‌های مختلف شود. نانوذرات اکسید روی در بافت طحال با از بین بردن غشای سیتوپلاسمی سبب آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شوند (Lewis et al.,

(2019). با توجه به اینکه مطالعات اندکی در مورد مقایسه سمیت نانوذرات اکسید روی و یون های مختلف آن بر روی موجودات مختلف وجود دارد بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی سمیت نانوذرات اکسید روی در مقایسه با یون های مختلف آن بر روی پارامترهای بیوشیمیایی و آسیب های طحال و بیضه موش سوری نر است.

### روش شناسی پژوهش

**مواد مورد نیاز:** نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) و یون های مختلف روی (کلرید روی  $(\text{ZnCl}_2)$ )، سولفات روی  $(\text{ZnSO}_4)$  و نیترات روی  $(\text{Zn}(\text{NO}_3)_2)$  به صورت پودر از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. از کتامین\_زیلازین برای بیهوشی موش ها استفاده شد. برای اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیایی از کیت های تجاری (شرکت پارس آزمون، کد ثبت ۳۴۹۹۸، ایران) و دستگاه اتوانالایزر (Hitachi 917, Hitachi Company, Japan) استفاده شد. به منظور آزمایشات بافت شناسی از پارافین ۱۰٪ برای تثبیت بافت های تشریح شده و جهت آگیری بافت ها از الکل های ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد و الکل بوتیلیک استفاده شد. برش بافت ها توسط دستگاه میکروتوم انجام شد

**تهیه موش سوری نر:** در این پژوهش پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه بیرجند با کد IR. BIRJAND.REC.1402.010، ۲۵ سر موش سوری نر در دامنه وزنی ۲۸-۳۰ گرم از دانشگاه علوم پزشکی بیرجند تهیه شدند. موش ها با رژیم غذایی استاندارد (غذای پلیت استاندارد و دسترسی آزاد به آب و غذا در شرایط اتاق، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی) نگهداری شدند. قبل از شروع آزمایش، موش ها به مدت ۱۰ روز به منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند.

**گروه بندی موش ها:** موش ها بعد از ۱۰ روز سازگاری با شرایط آزمایشگاه به طور تصادفی در ۵ گروه ۵ تایی به شرح زیر تقسیم بندی شدند. در این مطالعه نانوذرات اکسید روی و یون های مختلف روی (کلرید روی، سولفات روی و نیترات روی) به صورت پودر از شرکت مرک آلمان خریداری شدند و بعد از مخلوط شدن با آب دیونیزه و تهیه محلول ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر به مدت ۲۰ دقیقه سونوکیست شدند. تمام گروه ها به مدت ۲۸ روز و در ساعت مشخص (۸ صبح هر روز) به صورت گاوژ دهانی نانوذرات اکسید روی و یون های مختلف روی را دریافت کردند.

گروه اول (کنترل): دریافت کننده آب و غذای معمولی

گروه دوم: دریافت کننده ۲۵۰ mg/kg/bw نانوذرات اکسید روی (Noori et al., 2014)

گروه سوم: دریافت کننده ۲۰۰ mg/kg/bw سولفات روی (Wang et al., 2017)

گروه چهارم: دریافت کننده ۱۰ mg/kg/bw کلرید روی (Ineu et al., 2013; Bayram et al., 2023)

گروه پنجم: دریافت کننده ۱۱۰ mg/kg/bw نیترات روی (Tekuri et al., 2021)

**اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون:** موش ها پس از پایان دوره آزمایش (۲۸ روز) به مدت ۴۸ ساعت تغذیه نشدند و خونگیری از از ۲ موش در هر گروه که توسط کتامین\_زیلازین به صورت تزریق داخل صفاقی بیهوش شده اند بلافاصله از بافت قلب انجام شد. برای جمع آوری سرم، نمونه خون در ویال های اپندورف بدون ضد انعقاد به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد پس از لخته شدن خون، نمونه ها با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد سپس سرم جمع آوری شده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد برای آنالیزهای بیوشیمیایی فریز شدند. محاسبه پارامترهای بیوشیمیایی (تری گلیسیرید، گلوکز، کراتینین و بیلی روبین) به وسیله دستگاه اتوانالایزر (Hitachi 917, Hitachi Company, Japan) انجام شد. برای اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیایی از کیت های تجاری (شرکت پارس آزمون، کد ثبت ۳۴۹۹۸، ایران) استفاده شد.

**آزمایش های بافت شناسی:** بافت های طحال و بیضه از هر ۵ گروه با ۳ تکرار به صورت تصادفی پس از ۲۸ روز جدا شدند و در محلول بافر فرمالین ۱۰٪ به مدت ۲۴ ساعت فیکس شدند. جهت آگیری در الکل های ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد و نهایتاً با الکل بوتیلیک قرار گرفتند و بعد از ۹ ساعت نگهداری درون پارافین مایع (در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد) قالب گیری شدند و با استفاده از میکروتوم برش های ۵ میکرومتری از آنها تهیه شد. برش ها بر روی لام چسبانده و برای مطالعه بافت شناسی نمونه ها بعد

از پارافین‌زدائی و آگیری با استفاده از هماتوکسیلین‌ائوزین رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری معمولی (Nikon, eclips-E200) مطالعه و عکس‌برداری شدند.

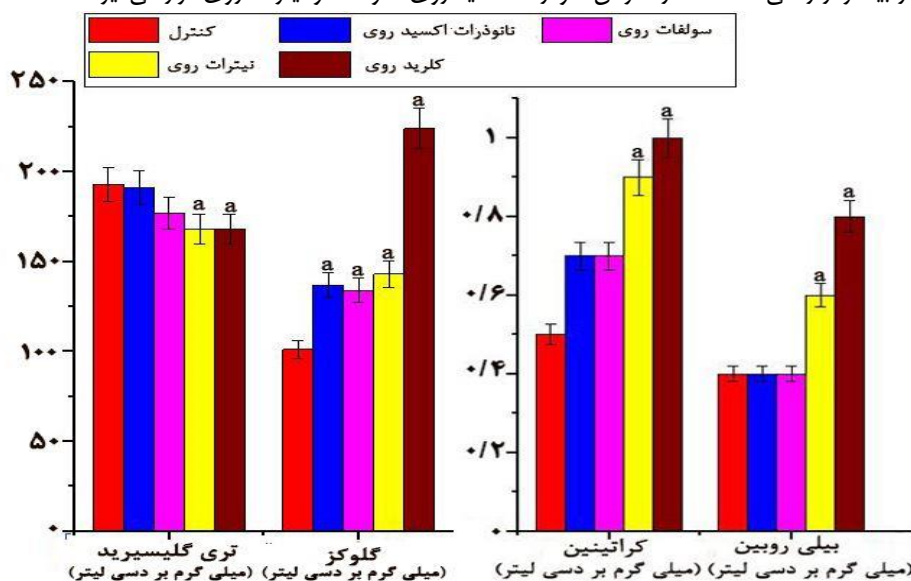
**تجزیه و تحلیل آماری:** برای بررسی نرمال بودن داده‌های بیوشیمیایی از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد. با توجه به نرمال نبودن داده‌ها از آزمون‌های ناپارامتریک Kruskal-wallis Test برای تعیین اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های تیمار شده در سطح احتمال ۰/۰۵ ( $P < 0/05$ ) استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد.

### یافته‌های پژوهش

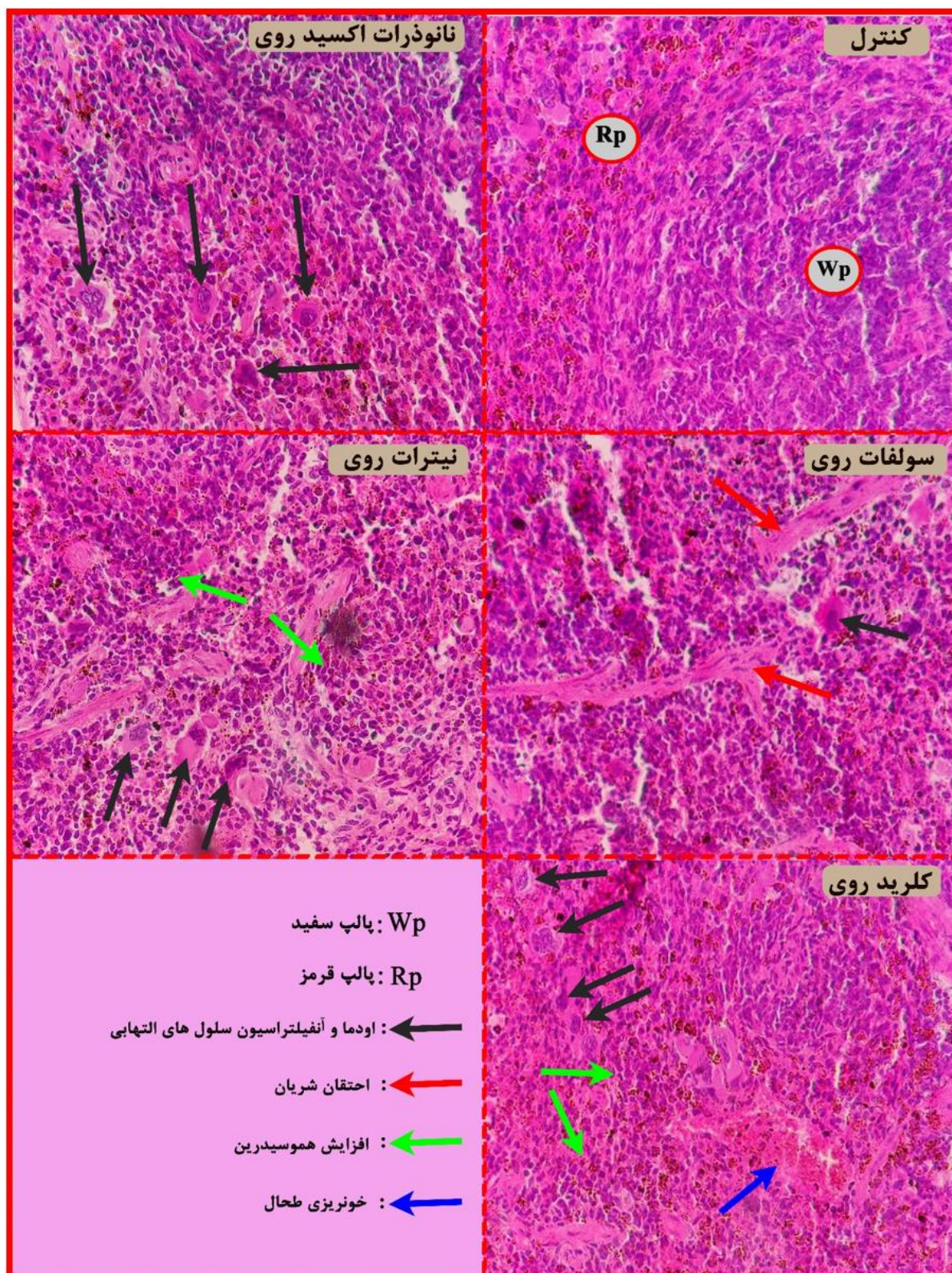
**بررسی پارامترهای بیوشیمیایی سرم گروه‌های مختلف مورد مطالعه:** تغییرات پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون گروه‌های مختلف مورد مطالعه در شکل ۱ نشان داده شده است. براساس نتایج، سطح تری‌گلیسیرید تمامی گروه‌های مورد مطالعه کمتر از گروه کنترل می‌باشد اما نیترا و کلرید روی به‌طور معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) سطح تری‌گلیسیرید سرم را نسبت به گروه کنترل کاهش داده است. از طرفی سطح گلوکز تمامی گروه‌های مورد مطالعه به‌طور معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) بیشتر از گروه کنترل می‌باشد. سطح کراتینین سرم تمامی گروه‌های مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است در حالی که نیترا و کلرید روی سبب افزایش معنی‌دار سطح کراتینین ( $P < 0/05$ ) نسبت به گروه کنترل شده است. همچنین سطح بیلی‌روبین سرم در معرض نانوذرات اکسید روی و سولفات روی نسبت به گروه کنترل هیچ گونه تغییری نداشته است در حالی که نیترا و کلرید سبب افزایش معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) سطح بیلی‌روبین سرم خون نسبت به گروه کنترل شده است.

**آسیب‌های بافت‌شناسی طحال در معرض نانوذرات اکسید روی و یون‌های مختلف آن:** برخی از آسیب‌های بافت‌شناسی در بافت طحال موش پس از ۲۸ روز قرار گرفتن در معرض نانوذرات اکسید روی و یون‌های مختلف آن در شکل ۲ نشان داده شده است. از جمله این آسیب‌ها می‌توان به اودما و آنفیلتراسیون سلول‌های التهابی، احتقان شریان، افزایش هموسیدرین و خونریزی طحال اشاره نمود. شدت این آسیب‌ها زمانی که بافت طحال در معرض کلرید روی قرار دارد بسیار بیشتر از زمانی است که در معرض نانوذرات اکسید روی، سولفات و نیترا روی قرار دارد.

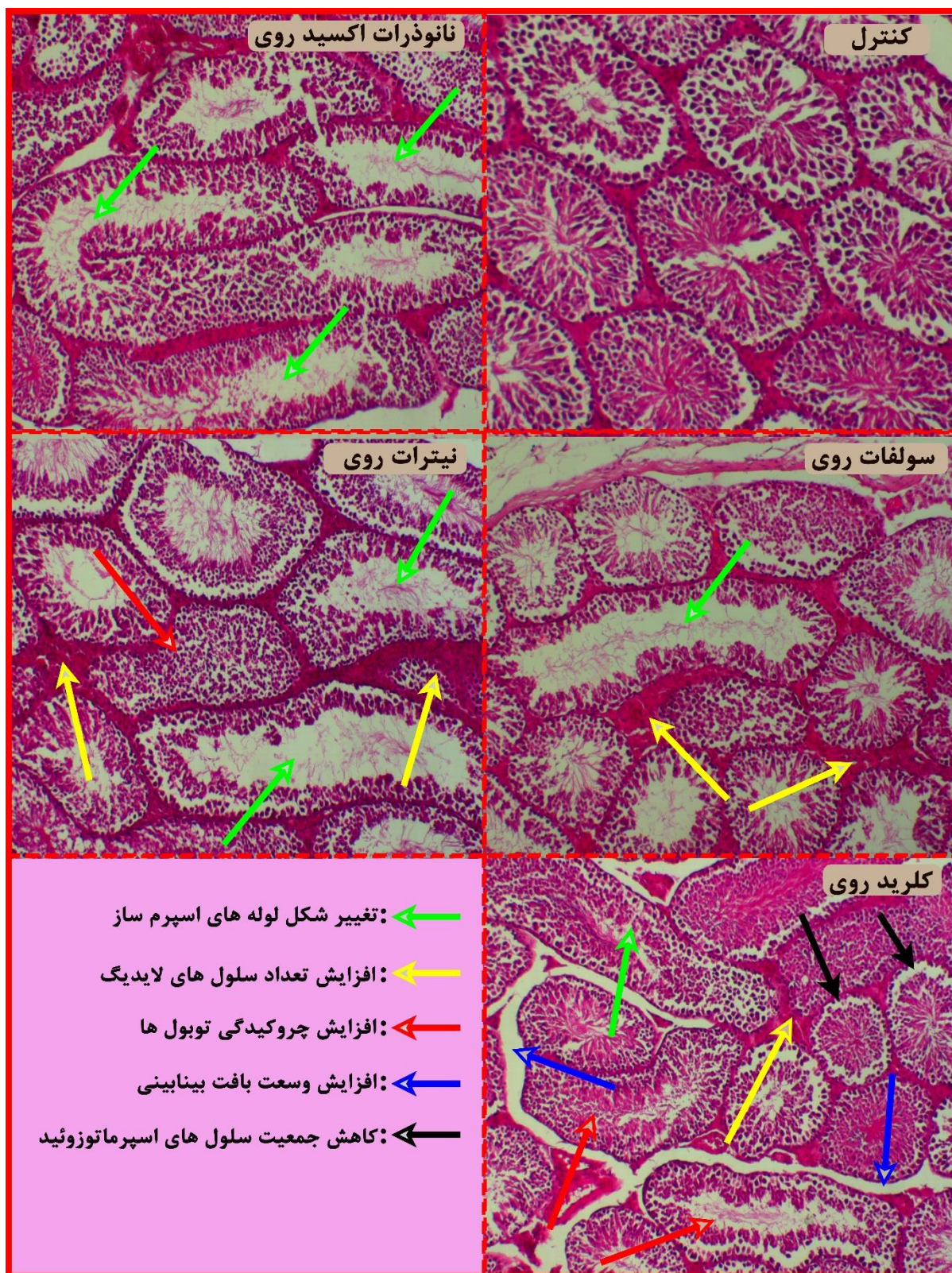
**آسیب‌های بافت‌شناسی بیضه در معرض نانوذرات اکسید روی و یون‌های مختلف آن:** مجموعه‌ای از آسیب‌های بافت‌شناسی در بافت بیضه موش پس از ۲۸ روز قرار گرفتن در معرض نانوذرات اکسید روی و یون‌های مختلف آن در شکل ۳ نشان داده شده است. از جمله این آسیب‌ها می‌توان به تغییر شکل لوله‌های اسپرم‌ساز، افزایش تعداد سلول‌های لایدیگ، افزایش چروکیدگی توبول‌ها، افزایش وسعت بافت بینابینی و کاهش جمعیت سلول‌های اسپرماتوزوئید اشاره نمود. براساس نتایج، شدت این آسیب‌ها زمانی که بیضه موش در معرض کلرید روی قرار دارد بسیار بیشتر از زمانی است که در معرض نانوذرات اکسید روی، سولفات و نیترا روی قرار می‌گیرد.



شکل ۱- تغییرات پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون موش سوری در معرض نانوذرات اکسید روی و یون‌های مختلف آن پس از ۲۸ روز (a: اختلاف معنی‌داری در سطح  $P < 0/05$  با گروه کنترل دارد)



شکل ۲- آسیب های بافت شناسی بافت طحال موش در معرض نانو ذرات اکسید روی و یون های مختلف آن پس از ۲۸ روز



شکل ۳- آسیب‌های بافت‌شناسی بافت بیضهٔ موش در معرض نانوذرات اکسید روی و یون‌های مختلف آن پس از ۲۸ روز

### بحث و نتیجه‌گیری

بررسی پارامترهای بیوشیمیایی سرم گروه‌های مختلف مورد مطالعه: در سال‌های اخیر، سمیت ترکیبات مختلف روی مورد توجه محققان قرار گرفته است. نانوذرات اکسید روی در نهایت به‌دلیل استفادهٔ گسترده در صنایع مختلفی از قبیل لوازم آرایشی

بهداشتی، آشکارسازها، پزشکی و سلول های خورشیدی وارد محیط زیست می شوند (Hosseini et al., 2020)، از طرفی وجود یون های مختلف روی در مواد غذایی کنسرو شده یا نگهداری شده در ظروف گالوانیزه می تواند منجر به سمیت طولانی مدت و سرطان زایی شود. علاوه بر این، غلظت روی ممکن است در جریان آب از طریق لوله های گالوانیزه، مسی یا پلاستیکی افزایش یابد و سبب سمیت های گوناگون برای انسان و سایر موجودات شود (Hosseini et al., 2020). اثرات مخربی بر اندام ها و سیستم های مختلف می تواند در اثر مواجهه کوتاه مدت و طولانی مدت با نانوذرات اکسید روی و یون های مختلف آن ایجاد شود. نانوذرات اکسید روی به دلیل اندازه بسیار کوچکی که دارند قادرند به سرعت از طریق سیستم تنفسی وارد بدن موجودات شوند و توسط سیستم گردش خون به اندام های مختلف بدن منتقل شوند (Lopes et al., 2014). این نانوذرات به طور مستقیم بر روی مولکول های زیستی مانند غشای لیپیدی اثر می گذارد و منجر به تولید رادیکال های سوپراکسید می شود. قرار گرفتن در معرض این نانوذرات منجر به از بین رفتن غشای میتوکندری و فعال شدن مسیرهای پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن می شود که در نهایت منجر به آپوپتوز می شود (Sruthi et al., 2018).

ایجاد تغییر در پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون به عنوان شاخص های بیولوژیک اغلب به تغییرات فیزیولوژیکی و محیطی وابسته است بنابراین هنگامی که موجودات مختلف در معرض تنش های محیطی همچون آلاینده های مختلف قرار می گیرند ایجاد تغییرات در پارامترهای بیوشیمیایی سرم قابل انتظار است (Matouke et al., 2021; Kharkan et al., 2023). براساس نتایج به دست آمده، سطح تری گلیسیرید تمامی گروه های مورد مطالعه کمتر از گروه کنترل می باشد اما نیترا و کلرید روی به طور معنی داری سطح تری گلیسیرید سرم را نسبت به گروه کنترل کاهش داده است (شکل ۱). کاهش سطح تری گلیسیرید در سرم خون موش هایی که در معرض ترکیبات مختلف روی قرار داشته اند ممکن است به دلیل اختلال در جذب تری گلیسیرید در روده یا اختلال در سنتز آنها در کبد باشد (Ugwu et al., 2020). در مطالعات مشابه Hosseini و همکاران (۲۰۲۰) بیان کردند که غلظت های مختلف نانوذرات اکسید روی سبب کاهش قابل توجهی در سطح تری گلیسیرید سرم موش می شود. از طرفی، Ghafarifarsani و همکاران (۲۰۲۴) بیان کردند که نانوذرات اکسید روی سبب افزایش سطح تری گلیسیرید در سرم خون ماهی می شود که علت آن را ایجاد اختلال در سنتز تری گلیسیرید در کبد بیان کردند. Ashouri و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند که نانوذرات سلنیوم سبب کاهش سطح تری گلیسیرید در سرم خون ماهی کپور معمولی می شود. Magaye و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که نانوذرات نیکل سطح تری گلیسیرید سرم موش را افزایش می دهد. Sayadi و Kharkan (۲۰۲۲) بیان کردند که فلزات سنگین مختلف سبب کاهش قابل توجه سطح تری گلیسیرید سرم خون سیاه ماهی نسبت به گروه کنترل می شود و بیان کردند که از تری گلیسیرید برای تأمین انرژی مورد نیاز بدن استفاده می شود.

سطح گلوکز به عنوان یک ابزار تشخیصی قابل اعتماد برای پایش وضعیت سلامت و تغذیه موجودات در نظر گرفته می شود (Rashmeei et al., 2020) و به طور گسترده به عنوان یک پاسخ استرس استفاده می شود (Gheytasi et al., 2021). نتایج نشان می دهد که، سطح گلوکز تمامی گروه های مورد مطالعه به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل می باشد (شکل ۱). مطالعات ثابت می کنند که تنش های محیطی به عنوان فرآیندهایی که نیاز به انرژی دارند، باعث تجزیه گلیکوژن کبدی و در نتیجه افزایش سطح گلوکز سرم می شود (Nematdoost Haghi and Banaee, 2017) بنابراین در این مطالعه افزایش سطح گلوکز سرم در معرض نانوذرات اکسید روی و یون های مختلف آن به ویژه کلرید روی پس از ۲۸ روز مشاهده شده است (شکل ۱). در مطالعات مشابه Lee و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که نانوذرات اکسید روی سطح گلوکز سرم را در خون کپور معمولی را به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش می دهد. همچنین Abouzeinab و همکاران (۲۰۲۳) بیان کردند که نانوذرات اکسید روی سبب افزایش گلوکز سرم در موش می شود. از طرفی، Amara و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که نانوذرات اکسید روی و کلرید روی سبب کاهش سطح گلوکز سرم در موش می شود. Hosseini و همکاران (۲۰۲۰) بیان کردند که با افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی سطح گلوکز سرم نسبت به گروه کنترل کاهش می یابد. Shaban و همکاران (۲۰۲۱) بیان کردند که نانوذرات اکسید روی باعث کاهش سطح گلوکز در سرم موش می شود.

سطح کراتینین و بیلیروبین سرم به عنوان یک شاخص تقریبی از میزان فیلتراسیون گلومرولی و نشان دهنده اختلال عملکرد

کلیه می‌باشد. افزایش کراتینین در سرم ممکن است بیانگر اختلال عملکرد کلیه به دلیل قرار گرفتن در معرض غلظت بالای نانوذرات اکسید روی و یون‌های مختلف آن باشد (Samim and Vaseem, 2021). براساس نتایج به‌دست آمده، سطح کراتینین سرم تمامی گروه‌های مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است در حالی که نیترا و کلرید روی سبب افزایش سطح کراتینین نسبت به گروه کنترل شده است. همچنین سطح بیلی‌روبین سرم در معرض نانوذرات اکسید روی و سولفات روی نسبت به گروه کنترل هیچ گونه تغییری نداشته است در حالی که نیترا و کلرید روی سبب افزایش سطح بیلی‌روبین سرم خون نسبت به گروه کنترل شده است. در مطالعات مشابه Hosseini و همکاران (۲۰۲۰) بیان کردند که نانوذرات اکسید روی سبب افزایش سطح بیلی‌روبین سرم در موش نسبت به گروه کنترل می‌شود. Ezealisiji و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند که نانوذرات اکسید روی سبب افزایش قابل توجهی از سطح کراتینین سرم در خون موش نسبت به گروه کنترل می‌شود. از طرفی، Noori و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند نانوذرات اکسید روی سبب کاهش معنی‌دار سطح کراتینین سرم در موش می‌شود. El-behairy و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند که نانوذرات دی اکسید تیتانیوم سبب افزایش سطح کراتینین سرم در خون موش می‌شود. Magaye و همکاران (۲۰۱۴) در پژوهش خود نانوذرات نیکل را عامل افزایش سطح بیلی‌روبین سرم در موش بیان کردند.

**آسیب‌های بافت‌شناسی طحال در معرض نانوذرات اکسید روی و یون‌های مختلف آن:** بافت‌شناسی یکی از شاخه‌های اصلی ریخت‌شناسی است که هدف اصلی آن شناخت و تشخیص بیماری‌ها از طریق تغییرات عرضی ایجاد شده در بافت‌ها می‌باشد. داده‌های بافت‌شناسی اهمیت فراوانی در تشخیص، آسیب‌شناسی و پیشگیری از بیماری‌ها دارد (Kandel and Castelli, 2020). بافت طحال یکی از مهم‌ترین اندام‌های لنفاوی بدن و یک بافت کاملاً پرخون محسوب می‌شود که ارتباط بسیار نزدیکی با گلبول‌های قرمز دارد از طرفی تصفیه خون را نیز برعهده دارد بنابراین می‌تواند در معرض آلاینده‌های مختلف قرار گیرد (Junqueira and Carneiro, 2002). مطالعات نشان می‌دهند که تغییرات در برخی پارامترهای طحال از قبیل اندازه و تراکم سلول‌های خونی، پالپ قرمز و سفید و سایر آسیب‌های بافت‌شناسی بیانگر تغییر در عملکرد بافتی آن تحت تأثیر آلاینده‌های مختلف است (Kuper et al., 2000). براساس نتایج به‌دست آمده، مجموعه‌ای از آسیب‌های بافت‌شناسی مشاهده شده در بافت طحال می‌توان به اودما و آنفیلتراسیون سلول‌های التهابی، احتقان شریان، افزایش هموسیدرین و خونریزی طحال اشاره نمود. شدت این آسیب‌ها زمانی که بافت طحال در معرض کلرید روی قرار دارد بسیار بیشتر از زمانی است که در معرض نانوذرات اکسید روی، سولفات و نیترا روی قرار دارد. نانوذرات اکسید روی و یون‌های مختلف آن توانایی عبور از غشای سیتوپلاسمی سلول را دارند و در عین حال می‌توانند در میتوکندری سلول ذخیره شوند بنابراین باعث ایجاد آپوپتوز در سلول می‌شوند (Shen et al., 2019). در مطالعات مشابه Abass و همکاران (۲۰۱۷) بیان کردند که نانوذرات اکسید روی سبب ترابکول‌های ضخیم شده، رگ‌های خونی بزرگ متراکم و سلول‌های پر از هموسیدرین در بافت طحال موش می‌شود همچنین Li و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سبب احتقان و تکثیر گره‌های لنفاوی در بافت طحال موش می‌شود و عنوان کردند که ذخیره نانوذرات در میتوکندری سلول سبب القا آپوپتوز و کاهش ایمنی در موش می‌شود. Ansari و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی خود گزارش کردند که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم باعث افزایش مگاکاریوسیت‌ها در بافت طحال موش می‌شود. Mazen و همکاران (۲۰۱۷) بیان کردند که نانوذرات نقره سبب کاهش لنفوسیت‌ها، دژنراسیون و آپوپتوز در بافت طحال موش می‌شود و عنوان کردند با افزایش غلظت نانوذرات شدت آسیب‌ها بیشتر می‌شود. Ajdari و Ziaee Ghahnavieh (۲۰۱۴) نانوذرات نیکل را عامل افزایش شدید تعداد ماکروفاژها و احتقان شدید در پالپ قرمز طحال موش عنوان کردند.

**آسیب‌های بافت‌شناسی بیضه در معرض نانوذرات اکسید روی و یون‌های مختلف آن:** از آسیب‌های بافت‌شناسی مشاهده در بیضه موش‌های در معرض نانوذرات اکسید روی و یون‌های مختلف آن می‌توان به تغییر شکل لوله‌های اسپرم‌ساز، افزایش تعداد سلول‌های لایدیگ، افزایش چروکیدگی توبول‌ها، افزایش وسعت بافت بینابینی و کاهش جمعیت سلول‌های اسپرماتوزوئید اشاره نمود. بر اساس نتایج به‌دست آمده، شدت این آسیب‌ها زمانی که موش در معرض کلرید روی قرار دارد بسیار بیشتر از زمانی است که در معرض نانوذرات اکسید روی، سولفات و نیترا روی قرار می‌گیرد. مطالعات مختلف ثابت می‌کنند که نانوذرات اکسید روی توانایی عبور از سد خونی-مغزی و سد خونی-بیضه‌ای را دارند و سبب ایجاد استرس اکسیداتیو در موجودات مختلف می‌شوند. این نانوذرات در بافت بیضه توسط سلول‌های لایدیگ جذب می‌شوند و از طریق افزایش رادیکال‌های آزاد و از بین بردن غشای

میتوکندری سبب آپوپتوز در سلول ها می شوند (Shen et al., 2019). از طرفی، فلز روی می تواند بر روی سلول های لایدیگ اثر بگذارد و در روند اسپرماتوژنز اختلال ایجاد کند (Shen et al., 2019) همچنین بیان شده است که روی منجر به کاهش بیان پروتئین ها و از بین بردن غشای خارجی میتوکندری در سلول های سرتولی می شود بنابراین یکپارچگی سد خونی-بیضه ای تخریب می شود (Liu et al., 2016). مطالعات ثابت می کند ترکیبات مختلف روی سبب تغییرات ساختاری و دژنراسیون سلول های اسپرم ساز می شوند (Mozaffari et al., 2015). در مطالعات مشابه Mozaffari و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند که نانوذرات اکسید روی سبب واکتوله شدن سلول ها و جداسدن اپیتلیوم ژرمینال در لوله های اسپرم ساز می شود. Dkhil و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که نانوذرات سلنیوم سبب افزایش تعداد سلول های اسپرماتوژن در لوله های اسپرم ساز بیضه می شود. Ahmed و همکاران (۲۰۱۷) نانوذرات نقره را عامل کاهش ضخامت اپیتلیوم ژرمینال پوششی برخی از لوله های اسپرم ساز در موش عنوان کردند. Sundarraj و همکاران (۲۰۱۷) بیان کردند که نانوذرات اکسید آهن سبب واکتولاسیون، جداسدگی و کاهش اسپرم در لوله های اسپرم ساز بیضه موش می شود. Mesallam و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند که نانوذرات اکسید روی سبب واکتوله شدن سلول و ایجاد رگ های خونی متراکم در بافت بیضه خواهد شد. نتایج نشان داد که نانوذرات اکسید روی و یون های مختلف آن سبب تغییر در پارامترهای بیوشیمیایی سرم و آسیب های بافت شناسی گوناگون در بافت طحال و بیضه موش می شود. از میان ترکیبات مورد مطالعه، کلرید روی نسبت به سایر ترکیبات دیگر آسیب بیشتری در پارامترهای بیوشیمیایی و بافتی ایجاد می کند. با توجه به این یافته ها ضرورت پیدا می کند که مکان های آلوده شده به نانوذرات روی و نمک های آن شناسایی و پاکسازی شود و اقداماتی فوری جهت محدودیت بیشتر برای استفاده از این ترکیبات صورت گیرد. همچنین پیشنهاد می شود که مطالعات بیشتری جهت پیش بینی اثرات ترکیبات مختلف روی به ویژه کلرید روی و استفاده ایمن از این ترکیبات انجام گیرد.

## References

- Abass, M.A., Selim, S.A., Selim, A.O., El-Shal, A.S., Gouda, Z.A., 2017. Effect of orally administered zinc oxide nanoparticles on albino rat thymus and spleen. *IUBMB Life* 69(7), 528-539.
- Abouzeinab, N.S., Kahil, N., Fakhruddin, N., Awad, R., Khalil, M.I., 2023. Intraperitoneal hepato-renal toxicity of zinc oxide and nickel oxide nanoparticles in male rats: biochemical, hematological and histopathological studies. *EXCLI Journal* 22, 619.
- Ajdari, M., Ziaee Ghahnavieh, M., 2014. Histopathology effects of nickel nanoparticles on lungs, liver, and spleen tissues in male mice. *International Nano Letters* 4, 1-4.
- Almansour, M.I., Alferah, M.A., Shraideh, Z.A., Jarrar, B.M., 2017. Zinc oxide nanoparticles hepatotoxicity: histological and histochemical study. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 51, 124-130.
- Amara, S., Slama, I. B., Mrad, I., Rihane, N., Khemissi, W., El Mir, L., Sakly, M., 2014. Effects of zinc oxide nanoparticles and/or zinc chloride on biochemical parameters and mineral levels in rat liver and kidney. *Human and Experimental Toxicology* 33(11), 1150-1157.
- Ansari, M.A., Shukla, A.K., Oves, M., Khan, H.M., 2016. Electron microscopic ultrastructural study on the toxicological effects of AgNPs on the liver, kidney and spleen tissues of albino mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 44, 30-43.
- Ashouri, S., Keyvanshokoo, S., Salati, A.P., Johari, S.A., Pasha-Zanoosi, H., 2015. Effects of different levels of dietary selenium nanoparticles on growth performance, muscle composition, blood biochemical profiles and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 446, 25-29.
- Bayram, E.N., Al-Bakri, N.A., Al-Shmgani, H.S., 2023. Zinc Chloride Can Mitigate the Alterations in Metallothionein and Some Apoptotic Proteins Induced by Cadmium Chloride in Mice Hepatocytes: A Histological and Immunohistochemical Study. *Journal of Toxicology* 1-8.
- De Matteis, V., 2017. Exposure to inorganic nanoparticles: routes of entry, immune response, biodistribution and in vitro/in vivo toxicity evaluation. *Toxics* 5(4), 29.
- Dkhil, M.A., Zrieq, R., Al-Quraishy, S., Abdel Moneim, A.E., 2016. Selenium nanoparticles attenuate oxidative stress and testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecules* 21(11), 1517.

- El-behairy, D.S., Diao Eldin, N.H., Elbadry, E.E., Mohamed, A.A., Farrag, I.M., 2019. Hepato-renal toxicity of titanium dioxide nanoparticles and the protective effects of *Moringa oleifera* leaves extract and vitamin E in male albino rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine* 75(2), 2261-2271.
- Elsharkawy, E. E., Abd El-Nasser, M., Kamaly, H. F., 2019. Silver nanoparticles testicular toxicity in rat. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 70, 103194.
- Engwa, G., Azeh, P., Udoka Ferdinand, F., Nweke, N., Marian, N. 2019 Mechanism and health effects of heavy metal toxicity in humans. *Poisoning in the Modern World-new Tricks for an Old Dog* 10, 70-90.
- Ezealisiji, K.M., Siwe-Noundou, X., Maduelosi, B., Nwachukwu, N., Krause, R.W.M., 2019. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Solanum torvum* (L) leaf extract and evaluation of the toxicological profile of the ZnO nanoparticles-hydrogel composite in Wistar albino rats. *International Nano Letters* 9, 99-107.
- Fujihara, J., Nishimoto, N., 2024. Review of zinc oxide nanoparticles: toxicokinetics, tissue distribution for various exposure routes, toxicological effects, toxicity mechanism in mammals, and an approach for toxicity reduction. *Biological Trace Element Research* 202(1), 9-23.
- Ghafarifarsani, H., Hoseinifar, S.H., Raeesadeh, M., Vijayaram, S., Rohani, M.F., Van Doan, H., Sun, Y.Z., 2024. Comparative effect of chemical and green zinc nanoparticles on the growth, hematology, serum biochemical, antioxidant parameters, and immunity in serum and mucus of goldfish, *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758). *Biological Trace Element Research* 202(3), 1264-1278.
- Gheytasi, A., Hosseini Shekarabi, S.P., Islami, H.R., Mehrgan, M. S., 2021. Feeding rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, with lemon essential oil loaded in chitosan nanoparticles: Effect on growth performance, serum hemato-immunological parameters, and body composition. *Aquaculture International* 29(5), 2207-2221.
- Heggelund, L.R., Diez-Ortiz, M., Lofts, S., Lahive, E., Jurkschat, K., Wojnarowicz, J., Svendsen, C., 2014. Soil pH effects on the comparative toxicity of dissolved zinc, non-nano and nano ZnO to the earthworm *Eisenia fetida*. *Nanotoxicology* 8(5), 559-572.
- Hosseini, S.M., Amani, R., Moshrefi, A.H., Razavimehr, S.V., Aghajanihah, M.H., Sokouti, Z., 2020. Chronic zinc oxide nanoparticles exposure produces hepatic and pancreatic impairment in female rats. *Iranian Journal of Toxicology* 14(3), 145-154.
- Ineu, R.P., Oliveira, C.S., Oliveira, V.A., Moraes-Silva, L., da Luz, S.C.A., Pereira, M.E., 2013. Antioxidant effect of zinc chloride against ethanol-induced gastrointestinal lesions in rats. *Food and Chemical Toxicology* 58, 522-529.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., 2002 *Kelley Rom Basic Histology* Appleton and Lange. New York 8, 112-137.
- Kandel, I., Castelli, M., 2020. A novel architecture to classify histopathology images using convolutional neural networks. *Applied Sciences* 10(8), 2929.
- Kharkan, J., Sayadi, M.H., Hajiani, M., Rezaei, M.R. Savabieasfahani, M., 2023. Toxicity of nickel oxide nanoparticles in *Capoeta fusca*, using bioaccumulation, depuration, and histopathological changes. *Global Journal of Environmental Science and Management* 9(3), 427-444.
- Kharkan, J., Sayadi, M. H., Rezaei, M. R. (2019). Investigation of heavy metals accumulation in the soil and pine trees. *Environmental Health Engineering and Management Journal* 6(1), 17-25.
- Kuper, C.F., Harleman, J.H., Richter-Reichelm, H.B., Vos, J.G., 2000. Histopathologic approaches to detect changes indicative of immunotoxicity. *Toxicologic Pathology* 28(3), 454-466.
- Lee, J.W., Kim, J.E., Shin, Y.J., Ryu, J. S., Eom, I.C., Lee, J.S., Lee, B.C., 2014. Serum and ultrastructure responses of common carp (*Cyprinus carpio* L.) during long-term exposure to zinc oxide nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 104, 9-17.
- Lee, J., Yu, W.J., Song, J., Sung, C., Jeong, E.J., Han, J.S., Park, K., 2016. Developmental toxicity of intravenously injected zinc oxide nanoparticles in rats. *Archives of Pharmacal Research* 39, 1682-1692.
- Lewis, S.M., Williams, A., Eisenbarth, S.C., 2019. Structure and function of the immune system in the spleen. *Science Immunology* 4(33), eaau6085.
- Li, N., Duan, Y., Hong, M., Zheng, L., Fei, M., Zhao, X., Hong, F., 2010. Spleen injury and apoptotic pathway in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology Letters* 195(2-3), 161-168.
- Liu, Q., Xu, C., Ji, G., Liu, H., Mo, Y., Tollerud, D.J., Zhang, Q., 2016. Sublethal effects of zinc oxide

- nanoparticles on male reproductive cells. *Toxicology in Vitro* 35, 131-138.
- Lopes, S., Ribeiro, F., Wojnarowicz, J., Łojkowski, W., Jurkschat, K., Crossley, A., Loureiro, S., 2014. Zinc oxide nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*: size-dependent effects and dissolution. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33(1), 190-198.
- Magaye, R.R., Yue, X., Zou, B., Shi, H., Yu, H., Liu, K., Zhao, J., 2014. Acute toxicity of nickel nanoparticles in rats after intravenous injection. *International Journal of Nanomedicine* 1393-1402.
- Matouke, M.M., Sanusi, H.M., Enejo, A.S., 2021. Interaction of copper with titanium dioxide nanoparticles induced hematological and biochemical effects in *Clarias gariepinus*. *Environmental Science and Pollution Research* 28, 67646-67656.
- Mazen, N.F., Saleh, E.Z., Mahmoud, A.A., Shaalan, A.A., 2017. Histological and immunohistochemical study on the potential toxicity of silver nanoparticles on the structure of the spleen in adult male albino rats. *Egyptian Journal of Histology* 40(3), 374-387.
- Mesallam, D.I., Deraz, R.H., Aal, S.M.A., Ahmed, S.M., 2019. Toxicity of subacute oral zinc oxide nanoparticles on testes and prostate of adult albino rats and role of recovery. *Journal of Histology and Histopathology* 6(2).
- Mozaffari, Z., Parivar, K., Roodbari, N. H., Irani, S., 2015. Histopathological evaluation of the toxic effects of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on testicular tissue of NMRI adult mice. *Advanced Studies in Biology* 7(6), 275-91.
- Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M., Somasundaran, P., Thompson, M., 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials* 8(7), 543-557.
- Nematdoost Haghi, B., Banaee, M., 2017. Effects of micro-plastic particles on paraquat toxicity to common carp (*Cyprinus carpio*): biochemical changes. *International Journal of Environmental Science and Technology* 14(3), 521-530.
- Noori, A., Karimi, F., Fatahian, S., Yazdani, F., 2014. Effects of zinc oxide nanoparticles on renal function in mice. *International Journal of Biosciences* 5(9), 140-146.
- Radi, A.M., Abdel Azeem, N.M., El-Nahass, E.S., 2021. Comparative effects of zinc oxide and zinc oxide nanoparticle as feed additives on growth, feed choice test, tissue residues, and histopathological changes in broiler chickens. *Environmental Science and Pollution Research* 28, 5158-5167.
- Rahdar, A., Hajinezhad, M. R., Bilal, M., Askari, F., Kyzas, G. Z., 2020. Behavioral effects of zinc oxide nanoparticles on the brain of rats. *Inorganic Chemistry Communications* 119, 108131.
- Ramadan, A.G., Yassein, A.A., Eissa, E.A., Mahmoud, M.S., Hassan, G.M., 2022. Biochemical and histopathological alterations induced by subchronic exposure to zinc oxide nanoparticle in male rats and assessment of its genotoxicity. *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences* 8(1), 41-49.
- Rashmei, M., Shekarabi, S. P. H., Mehrgan, M. S., Paknejad, H., 2020. Stimulatory effect of dietary chasteberry (*Vitex agnus-castus*) extract on immunity, some immune-related gene expression, and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish (*Carassius auratus*). *Fish & Shellfish Immunology* 107, 129-136.
- Sakr, S., Steenkamp, V., 2021. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative stress and histopathological toxicity in the thyroid gland and liver of rats. *Toxicological and Environmental Chemistry* 103(4), 399-422.
- Samim, A. R., Vaseem, H., 2021. Assessment of the potential threat of nickel (II) oxide nanoparticles to fish *Heteropneustes fossilis* associated with the changes in haematological, biochemical and enzymological parameters. *Environmental Science and Pollution Research* 28(39), 54630-54646.
- Sayadi, M. H., Kharkan, J., 2022. Investigating the toxicity potential of heavy metals on blood and biochemical indices of desert scraper (*Capoeta fusca*). *Journal of Natural Environment* 76(2), 365-378.
- Sayadi, M.H., Pavlaki, M.D., Martins, R., Mansouri, B., Tyler, C.R., Kharkan, J. Shekari, H., 2021. Bioaccumulation and toxicokinetics of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) co-exposed with graphene nanosheets (GNs) in the blackfish (*Capoeta fusca*). *Chemosphere* 269, 128689.
- Sayadi, M.H., Pavlaki, M.D., Loureiro, S., Martins, R., Tyler, C.R., Mansouri, B., Kharkan, J. Shekari, H., 2022. Co-exposure of zinc oxide nanoparticles and multi-layer graphenes in blackfish (*Capoeta*

- fusca*): evaluation of lethal, behavioural, and histopathological effects. *Ecotoxicology* 31(3), 425-439.
- Shaban, E., Salaheldin, K., El-Aziz, A., Essam, M., Desouky, M., F Elbakry, H., 2021. Evaluation of acute oral toxicity of zinc oxide nanoparticles in rats. *Egyptian Journal of Chemistry* 64(8), 4591-4600.
- Shen, J., Yang, D., Zhou, X., Wang, Y., Tang, S., Yin, H., Chen, J., 2019. Role of autophagy in zinc oxide nanoparticles-induced apoptosis of mouse LEYDIG cells. *International Journal of Molecular Sciences* 20(16), 4042.
- Sruthi, S., Ashtami, J., Mohanan, P.V., 2018. Biomedical application and hidden toxicity of Zinc oxide nanoparticles. *Materials Today Chemistry* 10, 175-186.
- Sundarraj, K., Manickam, V., Raghunath, A., Periyasamy, M., Viswanathan, M. P., Perumal, E., 2017. Repeated exposure to iron oxide nanoparticles causes testicular toxicity in mice. *Environmental Toxicology* 32(2), 594-608.
- Tekuri, S.K., Bassaiahgari, P., Gali, Y., Amuru, S.R., Pabbaraju, N., 2021. Determination of median lethal dose of zinc chloride in wistar rat. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 9(3), 393-399.
- Thakur, M., Gupta, H., Singh, D., Mohanty, I. R., Maheswari, U., Vanage, G., Joshi, D. S., 2014. Histopathological and ultra structural effects of nanoparticles on rat testis following 90 days (Chronic study) of repeated oral administration. *Journal of Nanobiotechnology* 12, 1-13
- Ugwuja, E.I., Vincent, N., Ikaraoha, I.C., Ohayi, S.R., 2020. Zinc ameliorates lead toxicity by reducing body Pb burden and restoring Pb-induced haematological and biochemical derangements. *Toxicology Research and Application* 4, 2397847320956562.
- Velusamy, S., Roy, A., Sundaram, S., Kumar Mallick, T. (2021). A review on heavy metal ions and containing dyes removal through graphene oxide-based adsorption strategies for textile wastewater treatment. *The Chemical Record* 21(7), 1570-1610.
- Wang, C., Cheng, K., Zhou, L., He, J., Zheng, X., Zhang, L., Wang, T., 2017. Evaluation of long-term toxicity of oral zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate in mice. *Biological Trace Element Research* 178, 276-282.