



Long-term Effects of Polyethylene Terephthalate Nanoplastics on Heart Tissue in Male Wistar Rats

Babaei M^{a,d}, Uroomiye S S^{a,d}, Karami K^{b,d}, Ranjbar A^{c,d,*}

^a Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Hamadan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

^b Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran

^c Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Hamadan University of Medical Sciences, Hamedan 6517838678, Iran.

^d Student Research Committee, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Babaei M, Uroomiye S S, Karami K, Ranjbar A. Long-term Effects of Polyethylene Terephthalate Nanoplastics on Heart Tissue in Male Wistar Rats. *Journal of Cell and Tissue*. 2024; 15(2):97-112.

<https://doi.org/10.61186/JCT.15.2.176>

KEYWORDS

Nanoplastic
Polyethylene terephthalate
Heart
Creatine kinase
Oxidative stress

ABSTRACT

Aim: Plastics, as diverse polymeric materials, have become an integral part of modern life due to their unique properties, including high resistance to various chemicals, a high strength-to-weight ratio, ease of preparation, and low cost. Millions of tons of these materials are produced annually; however, only a small portion is recycled or reused. By leaving single-use plastics in the environment, these plastics are worn out and fragmented into smaller sizes due to various factors such as UV irradiation and oxidation and finally enter the aquatic and terrestrial ecosystems and based on their size are called Micro and Nanoplastics and may be uptaken by aquatic organisms such as fishes and also shrimps and accumulate in their tissues. They can also be absorbed by the roots of plants and enter the food chain of us humans. Although various in vitro and in vivo studies have been conducted to investigate the different effects of various nanoplastics, and various mechanisms such as oxidative stress and inflammation have been reported for their effects, but subchronic studies have been conducted to investigate the effects of polyethylene terephthalate nanoparticles. It is very important on the tissue of the heart in the body. As a result, it seems important to investigate their toxic effects in vital tissues such as heart tissue.

Material and methods: In this experimental study, polyethylene terephthalate Nanoplastics were prepared using aqueous solution and then characterized using Dynamic Light Scattering and Scanning Electronic Microscopy. Four weeks old 12 male wistar rats (Average weight=250 gr) were randomly divided into two groups. Animals in the treatment group received 200 ppm of polyethylene Terephthalate Nanoplastics by gavage daily for 90 days and Control group received only Phosphate Buffer Saline (pH=7.4). After this period, the rats were anesthetized and after collecting the serum, Lactate Dehydrogenase and Creatine Kinase activity levels were measured using commercial colorimetric kit. The level of Lipid Peroxidation was analyzed using Thiobarbituric acid reactive substance formation colorimetric assay, Total Antioxidant Capacity was assessed using Ferric reducing antioxidant power and Catalase Enzyme Activity were also measured in the heart tissue homogenate using specific kit, the results data were analyzed by one-way analysis of variance. Histopathological studies were also performed by hematoxylin and eosin staining using light microscopy.

Results: The results demonstrated that long term exposure to polyethylene Terephthalate

* Corresponding author. Tel.: 08138381675; Fax: 08138381675

E-mail address: akranjbar2015@gmail.com, a.ranjbar@umsha.ac

DOI: <https://doi.org/10.61186/JCT.15.2.176>

Received: 15 Apr. 2024; Received in revised form: 27 Jun. 2024; Accepted: 3 Aug. 2024

Original Article

© Author



Nanoplastics caused a significant increase in the levels of Lactate Dehydrogenase and Creatine Kinase. Also, an increase in Lipid Peroxidation, and a decrement in Total Antioxidant Capacity, Catalase Activity were observed in the heart tissue of treatment group animals compared to the control group (P value < 0.05). In histological studies, intermuscular edema and degeneration of myofibrils were evident in the group that received Nanoplastics.

Conclusion: Long-term exposure to polyethylene terephthalate nanoplastics causes a change in the redox state of the heart tissue of male Wistar rats, these nanoparticles cause the cardiac antioxidant enzymatic and non-enzymatic defense mechanisms to be overwhelmed, such as reducing the total antioxidant capacity and catalase. which has finally led to irreversible damage to the cardiac tissue, which was confirmed by increasing serum levels of creatine kinase and lactate dehydrogenase enzymes and intramuscular edema and degeneration of myofibrils.



اثرات بلند مدت نانوپلاستیک‌های پلی‌اتیلن ترفتالات در بافت قلب در موش‌های صحرائی نر نژاد ویستار

میلاذ بابایی^{۴،۱}، سید سپهر ارومیه‌ء^{۴،۱}، کیانوش کرمی^{۴،۲}، اکرم رنجبر^{۴،۳*}

^۱گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
^۲گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور شرق تهران، تهران
^۳گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان ۶۵۱۷۸۳۸۶۷۸، ایران.
^۴کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

واژگان کلیدی	چکیده
نانوپلاستیک، پلی‌اتیلن ترفتالات، قلب، کراتین کیناز، استرس اکسیداتیو	<p>هدف: با رها کردن پلاستیک‌های یکبار مصرف در محیط زیست، این پلاستیک‌ها فرسوده شده و در اثر عوامل مختلف در اندازه‌های کوچک‌تر می‌شکنند و تحت عنوان میکرو و نانوپلاستیک‌ها وارد اکوسیستم آبی و خاکی شده و ممکن است توسط موجودات آبی بلعیده شوند و در بدن آن‌ها تجمع یابند. همچنین می‌توانند توسط ریشه‌ی گیاهان جذب شوند و وارد زنجیره غذایی ما انسان‌ها شوند. در نتیجه بررسی اثرات سمی آن‌ها در بافت‌های حیاتی از قبیل بافت قلب مهم به‌نظر می‌رسد. مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی ۱۲ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار با سن ۴ هفته ای (۲۵۰ گرم) به‌طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. حیوانات گروه آزمایش به‌مدت ۹۰ روز و روزانه ۲۰۰ ppm نانوپلاستیک‌های پلی‌اتیلن ترفتالات به‌صورت گاوآژ دریافت کردند و به‌شکل هم‌زمان گروه کنترل نیز محلول نمکی بافر فسفات (pH=7.4) دریافت کردند. بعد از این مدت موش‌ها بی‌هوش شدند و پس از جداسازی سرم، سطوح لاکتات دهیدروژناز و کراتین کیناز سنجیده شد. میزان پراکسیداسیون لیپیدی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل و فعالیت آنزیم کاتالاز نیز در بافت قلب سنجیده شد، نتایج با گروه کنترل مقایسه شد. مطالعات آسیب شناسی بافتی نیز با میکروسکوپ نوری بررسی شد. نتایج: نتایج نشان داد نانوپلاستیک‌های پلی‌اتیلن ترفتالات باعث افزایش معنی‌داری در سطوح لاکتات دهیدروژناز و کراتین کیناز می‌شوند. همچنین افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل و کاهش فعالیت کاتالاز در بافت قلب حیوانات گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. در مطالعات بافت شناسی، ادم بین عضلانی و انحطاط میوفیبریل‌ها در گروهی که نانوپلاستیک دریافت کرده بودند مشهود بود. نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد نانوپلاستیک‌های پلی‌اتیلن ترفتالات در بلند مدت توانایی آسیب زدن به بافت قلب را دارند.</p>
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۲۷	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۴/۰۷	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۱۳	

۱- مقدمه

پلاستیک‌ها امروزه به یکی از مهم‌ترین مواد در جهان هستند که جز جدایی ناپذیر زندگی بشر شده‌اند. پلاستیک‌ها دسته‌ای از مواد مصنوعی هستند که از فرآیند پلیمریزاسیون به‌دست می‌آیند که در صنایع بسیاری کاربرد دارند. طبق آمار جهانی سالانه ۳۶۸ میلیون تن پلاستیک در جهان تولید می‌شود که تنها ۹ درصد از آن باز یافت می‌شود و بیشتر آن در محیط زیست رها می‌شوند (۱). در چند دهه‌ی اخیر مهم‌ترین معضل، تجزیه ناپذیر بودن این پلیمرهای مصنوعی در محیط زیست بود. اما تحقیقات بعدی نشان داد که این پلیمرهای مصنوعی قابلیت شکستن به ذرات کوچک‌تر را دارند. عوامل فیزیکی و مکانیکی مختلفی منجر به شکستن این پلاستیک‌های رها شده در محیط به قطعات کوچکی در اندازه میکرو و سپس نانو می‌شوند. اشعه‌ی ماورا بنفش خورشید، امواج آتشفشانی زیر اقیانوس‌ها و عوامل مکانیکی باعث فرسوده شدن پلاستیک‌ها و شکستن آن‌ها در اندازه‌های کوچک‌تر می‌شوند (۲، ۳). اهمیت این پدیده از آن‌جا شروع شد که امکان بلعیده شدن این میکرو و نانوپلاستیک‌ها توسط موجودات کوچک آبری مطرح شد (۴، ۵). تحقیقات نشان داد که ماهی‌های کوچک، میگوها و پلانکتون‌ها می‌توانند میکرو و نانوپلاستیک‌ها بلعند و به آن‌ها آسیب بزنند (۶، ۷). آسیب به ماده‌ی ژنتیکی سلول، القای استرس اکسیداتیو، تغییرات در سطح هورمون‌ها و پاسخ‌های التهابی از این قبیل اختلالات بودند (۸، ۹). اغلب پلاستیک‌ها دارای اسکلت کربنی هستند و به‌همین علت خاصیت لیپوفیلیسیته یا چربی دوستی بالایی از خود نشان می‌دهند در نتیجه میکرو و نانوپلاستیک‌های ایجاد شده از آن‌ها نیز همین ویژگی را دارند به‌طوری‌که نانوپلاستیک‌های بلعیده شده توسط موجودات کوچک‌تر توانایی ذخیره شدن در بافت چربی آن‌ها را دارند (۱۰، ۱۱). با ذخیره شدن این نانوپلاستیک‌ها در بدن موجودات آبری کوچک‌تر، نانوپلاستیک‌ها توانستند خود را وارد زنجیره غذایی کنند (۱۲). در یک مطالعه مشخص شد که حتی نانوپلاستیک‌ها توانسته‌اند خود را به بدن ما انسان‌ها برسانند (۱۳). حتی آب و خاک نیز آلوده به این پلاستیک‌های کوچک شده‌اند. کوچک نانوپلاستیک‌ها باعث می‌شود که گیاهان بتوانند آن‌ها را از ریشه خود در خاک‌های آلوده به نانوپلاستیک‌ها جذب کنند و در بافت‌های مختلف خود تغلیظ کنند و این عامل دیگری در انتقال نانوپلاستیک‌ها به زنجیره‌ی غذایی است (۱۴، ۱۵). بسیاری از مکانیسم‌های سمیت نانوپلاستیک‌ها در موجودات آبری مشخص شده است، به‌طوری‌که مشخص شد آن‌ها می‌توانند باعث القای استرس اکسیداتیو در گورخر ماهی و میگوی آب شور شوند (۱۶). حتی اثرات سمی آن‌ها در رده‌های سلولی در مطالعات برون تنی نیز بررسی شده است. القای استرس اکسیداتیو، اختلال در بیان بعضی از ژن‌ها و پاسخ‌های التهابی در سلول‌های تحت درمان با این نانوپلاستیک‌ها مشاهده شده است (۱۷، ۱۸). از علت‌هایی که در سمیت بلقوه‌ی نانوپلاستیک‌ها نقش دارد اندازه کوچک آن‌ها است. به‌طوری‌که در مطالعات متعدد مشخص شد که نانوپلاستیک‌های کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر به مراتب سمیت بیشتری در مقایسه با نانوپلاستیک‌هایی در اندازه بزرگ‌تر از خود نشان می‌دهد که این می‌تواند به‌دلیل ورود راحت‌تر ذرات کوچک‌تر به درون بدن و حتی سلول باشد (۹۱، ۹۲). پلاستیک‌ها انواع مختلفی دارند، پلی استایرن، پلی اتیلن، پلی وینیل کلراید، پلی پروپیلن و پلی اتیلن ترفتالات از این قبیل هستند. روزانه ما با پلاستیک‌ها سر و کار داریم از ظروف یکبار مصرف گرفته تا مواد پلاستیکی مورد استفاده در صنعت بسته بندی از کاربردهای مورد استفاده‌ی آن‌هاست. اما ما به یک میزان با انواع پلاستیک‌ها سر و کار نداریم، رایج‌ترین پلاستیک پلی اتیلن ترفتالات است که در بطری‌های آب معدنی و نوشیدنی از آن استفاده می‌شود و امکان ورود نانوپلاستیک از بدنه‌ی اصلی بطری به‌داخل نوشیدنی در شرایط مختلف از نظر دمایی و نگهداری وجود دارد (۱۲، ۲۲). پس یکی از نانوپلاستیک‌های رایج که احتمال ورود مستقیم به بدن ما انسان را دارند، نانوپلاستیک‌های پلی اتیلن ترفتالات است (۳۲). نانوپلاستیک‌های پلی اتیلن ترفتالات که وارد دستگاه گوارش می‌شوند با خاصیت چربی دوستی بالای خود از دیواره‌ی روده‌ها جذب می‌شوند، و وارد جریان خون می‌شود. بررسی اثرات سمی مختلف این نانوپلاستیک در بیشتر موجودات آبری و در شرایط برون‌تنی بر روی رده‌های سلولی بررسی شده است اما بررسی اثرات احتمالی آن‌ها در پستانداران مهم به‌نظر می‌رسد. این مطالعه با هدف بررسی تحت مزمن اثرات هیستوپاتولوژیک نانوپلاستیک‌های پلی اتیلن ترفتالات و سایر پارامترها در بافت قلب در موش صحرایی نر انجام شد.

۲- مواد و روش‌ها

در این پژوهش تجربی ۱۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن ۴ هفته ای (۲۵۰g = وزن میانگین) به‌طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. موش‌ها از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات دانشگاه علوم پزشکی همدان تهیه شدند. حیوانات با رژیم غذایی مناسب و استاندارد تغذیه شدند. شرایط نگهداری آن‌ها ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود و دمای محیط نگهداری ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. قبل از شروع تیمار موش‌ها به‌مدت ۷ روز به‌منظور سازگاری در شرایط محیط قرار گرفتند.

گروه بندی حیوانات: موش‌ها بعد از یک هفته انطباق با محیط به‌طور تصادفی به دو گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه اول که به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شدند با آب و غذای معمولی و تیمار شدند. گروه دوم که به‌عنوان گروه درمان در نظر گرفته شد که روزانه (قسمت در میلیون) ۲۰۰ppm نانوبلاستیک پلی اتیلن ترفتالات به‌صورت خوراکی (گاواژ) دریافت کردند. این کار به‌مدت ۹۰ روز و در ساعت مشخصی از روز انجام شد. بعد از پایان تیمار موش‌ها به‌وسیله‌ی کتامین (۰۹ میلی‌گرم به‌ازای کیلوگرم وزن بدن)-زایلازین (۰۱ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به‌صورت تزریق داخل صفاقی بی‌هوش شدند.

بعد از بی‌هوش شدن موش‌ها، شکم حیوانات باز شد و سریعاً خون‌گیری از بطن چپ قلب انجام گرفت. خون بلافاصله در لوله‌های مخصوص نمونه‌گیری وارد شد و بلافاصله سانتریفیوژ شد، سانتریفیوژ در دور ۲۵۰۰ و به‌مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. سرم حاصل از خون تا زمان اندازه‌گیری سطوح لاکتات دهیدروژناز و کراتین کیناز MB در فریز -۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بافت قلب نیز سریعاً جدا شد. نیمی از هر بافت از هر گروه به‌طور تصادفی برای مطالعات بافت شناسی در محلول ۱۰ درصد فرمالدهید فیکس شدند و بخش دیگر بافت‌ها بلافاصله درون فویل‌های الومینیومی قرار داده شد و فوراً داخل مخزن نیتروژن قرار گرفت. بافت‌های فریز شده‌ی حاصل در دمای -۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌منظور سنجش مالون دی‌آلدئید (MDA)، کاتالاز (CAT) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل (TAC) قرار داده شد. به این منظور ۱۰۰ mg از بافت‌ها جدا شده و در ۱ ml بافر فسفات pH=۴/۷ هموزن شد. سپس هموزنات بافتی در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد محلول رویی برای آنالیزهای مربوطه در دمای -۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

سنجش سطوح سرمی آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز و کراتین کیناز: ایزوآنزیم کراتین کیناز MB به‌طور اختصاصی برای تشخیص فعالیت آنزیم کراتین کیناز در قلب به‌کار می‌رود. میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز و ایزوآنزیم کراتین کیناز MB با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی و طبق دستورالعمل شرکت سازنده و به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. برای تعیین میزان فعالیت آنزیم کراتین کیناز از کیت ایزوفرم کراتین کیناز MB (پارس آزمون، ایران) استفاده شد و نتایج به‌صورت واحد بر لیتر (U/L) گزارش شد. میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز نیز طبق دستورالعمل کیت انجام شد. طبق دستورالعمل کیت فعالیت لاکتات دهیدروژناز با تغییر غلظت نیکوتین‌آمید آدنین دی‌نوکلئوتید (NADH) تعیین می‌شود. میزان این آنزیم نیز بر حسب (IU/L) بیان شد.

سنجش مالون دی‌آلدئید (MDA): درجه‌ی پراکسیداسیون لیپیدی بر مبنای میزان تشکیل مالون دی‌آلدئید تعیین می‌شود. مالون دی‌آلدئید (MDA) محصول نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب است که بر اثر رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شود. MDA ایجاد شده با روش TBARS و با تیوباربیتوریک اسید وارد واکنش شده و تشکیل کمپلکس رنگی می‌دهد. اساس اندازه‌گیری، خوانش رنگ ایجاد شده در طول موج ۵۳۵ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر است. به این منظور نمونه بافت قلب وزن شد و در بافر لیزکننده هموزن شده و سپس به‌مدت ۵ دقیقه و در دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از تیوباربیتوریک اسید ۶۷ درصد به آن اضافه شد و به‌مدت ۲۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد.

رنگ صورتی حاصل از واکنش با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۵ خوانده شد. میزان مالون دی الدئید به کمک ضریب جذبی محاسبه و به صورت نانومول بر گرم بافت (nmol/gr tissue) بیان شد (۲۴).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): فعالیت کاتالاز براساس توانایی آن در تجزیه ی پراکسید هیدروژن تعیین شد. سنجش فعالیت CAT بر اساس پروتکل کیت شرکت کیازیست ایران انجام شد. به این منظور بافت قلب وزن شده و بعد از هموژن کردن در بافر لیز کننده، در دور ۲۰۰۰ و به مدت ۵ دقیقه سانتر فیوژ شد. ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول رویی برداشته شد سپس ۲/۸ میلی لیتر بافر فسفات به آن اضافه شد و پس از افزودن ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول آب اکسیژنه، جذب آن در طول موج ۲۴۰ نانومتر خوانده شد. در پایان مقادیر توسط پروتکل کیت کیازیست بر حسب میکرومول بر گرم بافت (umol/gr tissue) بیان شد (۲۵).

سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانسی کل (TAC): ظرفیت آنتی اکسیدانسی تام توسط تست FRAP بررسی شد. این روش بر مبنای احیای یون آهن می باشد و رنگ ایجاد شده در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد. در این روش برای تهیه ی هموژنات بافت قلب مقدار ۱۰ درصد از کل بافت وزن شده و هموژن شد. سپس هموژنات ایجاد شده در سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. از محلول رویی ۲۰۰ میکرو لیتر بر داشته شد و به لوله ی آزمایش منتقل شد. سپس ۳ میلی لیتر معرف FRAP به آن اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. جذب کمپلکس آبی رنگ در طول موج ۵۹۳ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقادیر بر حسب میلی مول بر لیتر (mmol/lit gr tissue) بیان شد (۲۶).

مطالعات بافت شناسی: بافت قلب در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد. سپس بافت ها تثبیت و به وسیله ی الکل ۹۶ درصد آب گیری شد. به منظور شفاف سازی از گزبلول استفاده شد. مقاطعی به قطر ۶ میکرون از بافت ها توسط پارافین بلوک زنی شد و بعد از رنگ آمیزی توسط هماتوکسیلین-آئوزین بر روی لام میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت.

تهیه نانوپلاستیک های پلی اتیلن ترفتالات: گرانول پلی اتیلن ترفتالات با خلوص ۹۹ درصد از شرکت پتروشیمی هگمتان خریداری شد. سپس ۱ گرم از گرانول های فوق در ۱۰ میلی لیتر تری فلئورواستیک اسید ۹۰ درصد حل شد. محلول به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به شدت هم زده شد. هنگامی که گرانول ها به طور کامل حل شدند، ۱۰ میلی لیتر محلول ۲۰ درصد تری فلئورواستیک اسید به محلول اضافه شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت دیگر در دمای اتاق قرار داده شد. محلول حاصل با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی دور ریخته شد. برای حذف هر گونه تری فلورواستیک اسید باقیمانده از نانوپلاستیک ها، ۵۰ میلی لیتر آب مقطر به رسوب اضافه شد. محلول به مدت ۲۰ دقیقه تحت سونیکاسیون قرار گرفت و دوباره در ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی حذف شد و رسوب حاوی نانوپلاستیک ها باقی ماند. برای اطمینان از پایداری نانوذرات پلاستیکی در آب مقطر، از محلول ۱ درصد سدیم دودسیل سولفات، به عنوان سورفکتانت پراکنده کننده، استفاده شد. سوسپانسیون نانوپلاستیک ها در محلول ۱ درصد سدیم دودسیل سولفات پراکنده شد. در نهایت سوسپانسیون نانوپلاستیک ها برای حذف سدیم دودسیل سولفات اضافه در غشای دیالیز قرار داده شد و به مدت ۴۸ ساعت باقی ماند و نانوپلاستیک های پایدار، آماده شد (۲۷). بعد از سنتز نانوپلاستیک ها و شستشوی حلال های مورد استفاده در سنتز، نانوپلاستیک ها سانتریفیوژ شده و در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت رطوبت زدایی شدند سپس برای ساخت سوسپانسیونی با غلظت ۲۰۰ ppm، میزان ۲۰ میلی گرم از پودر نانوپلاستیک ها توزین شده و در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر دیسپرس و یکنواخت شد.

خصوصیات مورفولوژی و اندازه نانوپلاستیک‌ها

پراکندگی دینامیک نور (DLS): برای ارزیابی اندازه و بار سطحی زتا نانوپلاستیک‌های سنتز شده از دستگاه پراکندگی نور پویا (DLS) استفاده شد. DLS یک تکنیک پرکاربرد برای تعیین توزیع اندازه‌ی نانوذرات در مایعات با تکیه بر تجزیه و تحلیل حرکت براونی آن‌ها است. در این مطالعه، نانوپلاستیک‌ها در غلظت ۲۰۰۰ قسمت در میلیون (ppm) تهیه شد. برای سنجش اندازه، مقدار ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون نانوپلاستیک‌ها برداشته و به نسبت یک در هزار رقیق شد. قبل از هر اندازه‌گیری، نانوپلاستیک‌ها به مدت ۱۰ دقیقه تحت سونیکه با فرکانس بالا قرار گرفتند تا از پراکندگی یکنواخت تر اطمینان حاصل شود. سپس سوسپانسیون رقیق شده که در آب مقطر پراکنده شده بود، برای تعیین توزیع اندازه نانوپلاستیک‌ها تحت آنالیز DLS قرار گرفت. با توجه به این‌که از DLS به منظور تایید بررسی اندازه نانوذرات استفاده شد نتایج DLS نشان داد که میانگین اندازه نانوذرات کم‌تر از ۵۰۰ نانومتر است و $PDI = ۰/۴۱۲$ بود که نشان داد همگونی نانوذرات مناسب است.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM): در تجزیه و تحلیل SEM، یک پرتو الکترونی سطح نمونه را جارو می‌کند. این الکترون‌ها توسط یک منبع الکترونی به نام تفنگ الکترونی تولید می‌شوند و سپس در یک شتاب دهنده الکترونی که ولتاژ آن بین ۱ تا ۳۰ کیلو ولت است، شتاب می‌گیرند. همان‌طور که در بالا ذکر شد، هر چه شتاب الکترون بیشتر باشد، سرعت الکترون‌ها بیشتر و طول موج الکترون‌ها کوتاه‌تر می‌شود و در نتیجه جزئیات بیشتری در تصویر نمایان می‌شود. الکترون‌های شتاب گرفته قبل از برخورد با سطح نمونه از عدسی‌های الکترومغناطیسی مختلف عبور می‌کنند. وظیفه این عدسی‌ها تمرکز پرتو الکترونی روی سطح نمونه است. پس از برخورد الکترون به هر نقطه نمونه، سیگنالی منتشر می‌شود. برخی از سیگنال‌هایی که از برخورد الکترون بر روی نمونه ساطع می‌شوند، الکترون‌های ثانویه، الکترون‌های پس پراکنده، پرتوهای X مشخصه و پرتوهای کاندولومینسانس هستند. این سیگنال‌ها به آشکارسازها می‌روند که پس از پردازش کامپیوتری به تصاویر تبدیل می‌شوند (۲۸). مقدار ۵ میلی‌گرم از نانوپلاستیک‌های خشک آماده شده با نانوذرات طلا پوشش داده شده و در روی سطح تثبیت کننده، قرار داده شد سپس تصویر نمونه ثبت شد.

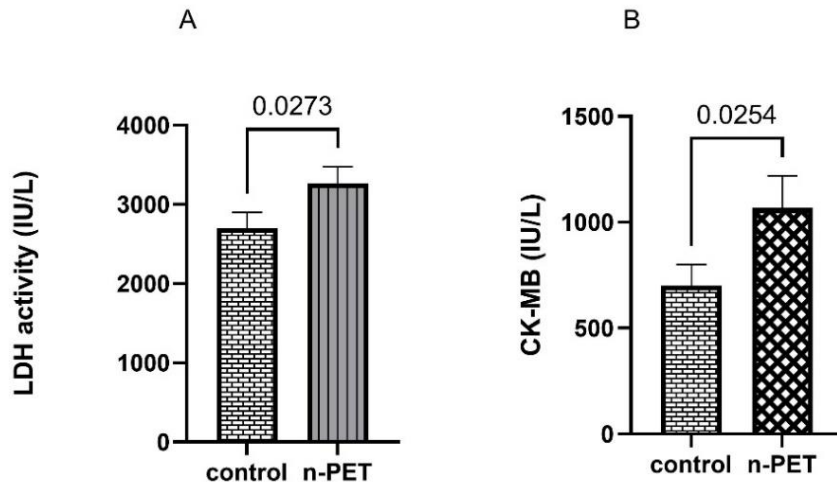
۳- آنالیز آماری

حاصل نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون‌های آماری شاپیرو ویلک برای تعیین نرمالیتی داده‌ها، آزمون لوین برای تعیین همگنی واریانس و تی تست مستقل جهت بررسی تفاوت بین گروه‌ها انجام شد. سطح آماری معنی‌داری $p < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

۴- نتایج

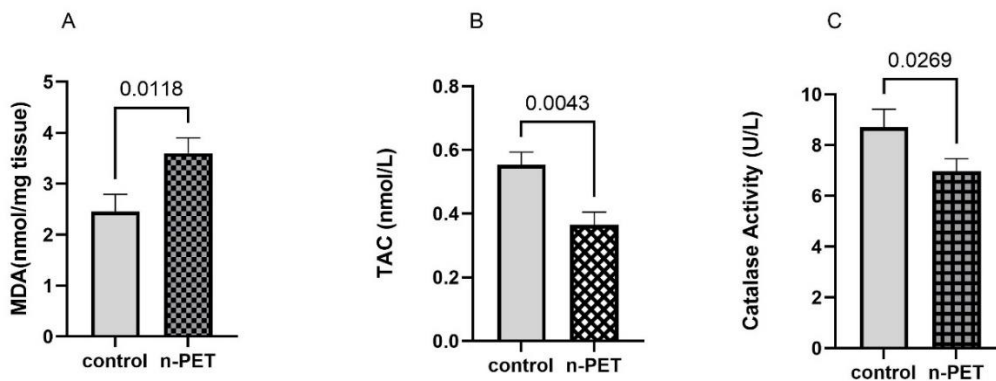
سنجش آنزیم لاکتات دهیدروژناز و ایزو آنزیم کراتین کیناز

نتایج سنجش آنزیم لاکتات دهیدروژناز و ایزو آنزیم کراتین کیناز نشان داد که میزان آن‌ها در گروهی که نانوپلاستیک دریافت کرده بودند نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت (شکل ۱).



شکل ۱: میانگین سطوح آنزیم لاکتات دهیدروژناز (A) و ایزو آنزیم کراتین کیناز (B) در دو گروه کنترل و نانوپلاستیک‌های پلی اتیلن ترفتالات (n-PET) با یک دیگر مقایسه شد. سطح معنی‌داری ($p < 0.05$) در نظر گرفته شد.

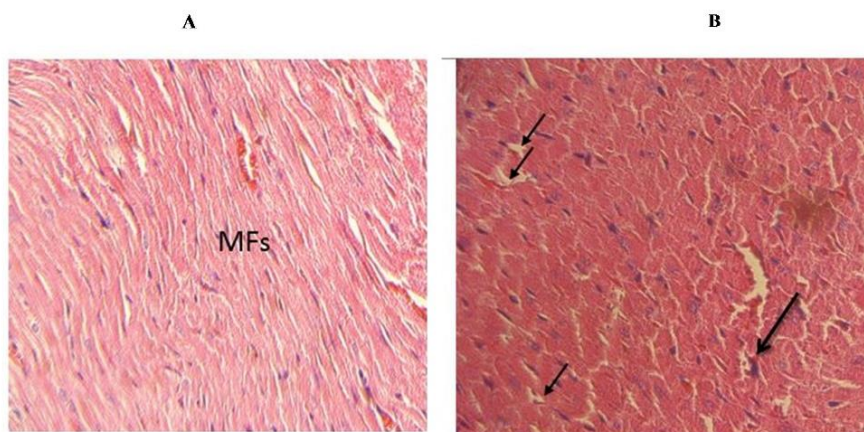
سنجش شاخص پراکسیداسون لیپیدی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانسی کل و آنزیم کاتالاز: نتایج سنجش شاخص پراکسیداسون لیپیدی (MDA) نیز نشان داد که میزان مالون دی‌الدئید در گروه‌های مورد آزمایش افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشتند. ظرفیت آنتی‌اکسیدانسی کل (TAC) در گروه‌های دریافت‌کننده نانوپلاستیک‌ها نیز کاهش معنی‌داری داشت همچنین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در گروه‌های مورد آزمایش کاهش یافت (شکل ۲).



شکل ۲: میانگین سطوح مالون دی‌الدئید (MDA) (A)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانسی کل (TAC) (B) و فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) (C) در بافت قلب در گروه‌های کنترل و گروهی که نانوپلاستیک پلی اتیلن ترفتالات (n-PET) دریافت کردند اندازه‌گیری شد و با گروه کنترل مقایسه شد. سطح معنی‌داری ($p < 0.05$) در نظر گرفته شد.

مطالعات آسیب شناسی بافتی

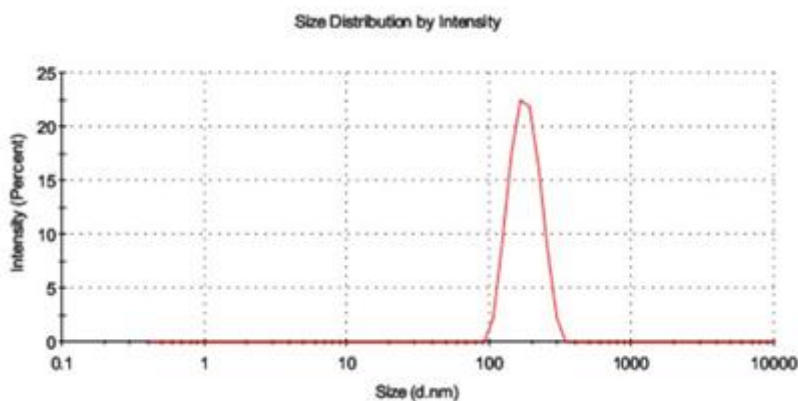
در مطالعات بافت‌شناسی که با میکروسکوپ نوری صورت گرفت، مشخص شد که بافت قلب در گروه‌هایی که نانوپلاستیک دریافت کرده بود دچار آسیب شده بود. انحطاط دانه‌ای و واکولی میوفیبریل‌ها و نکروزهای پراکنده همراه با ادم بین عضلانی از جمله آسیب‌های ایجاد شده در مطالعات هیستوپاتولوژیک بود (شکل ۳).



شکل ۳: مطالعات آسیب شناسی بافت قلب با میکروسکوپ نوری انجام شد. بافت قلب در گروه کنترل کاملاً سالم بود (A). اما انحطاط دانه‌ای و واکولی میوفیبریل‌ها و نکروزهای پراکنده همراه با ادم بین عضلانی در بافت قلب گروهی که نانوپلاستیک پلی‌اتیلن ترفتالات دریافت کرده بود مشاهده شد، که با فلش‌های مشکی رنگ مشخص شده است (B).

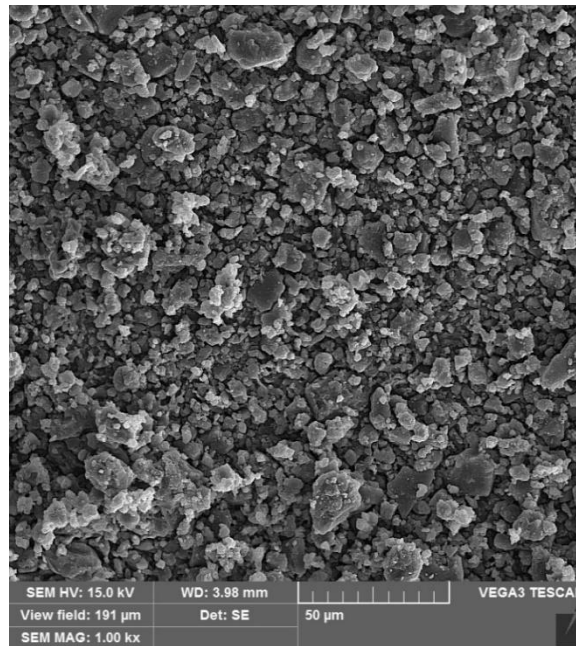
خصوصیات مورفولوژی و اندازه نانوپلاستیک‌ها

نتایج اندازه‌گیری اندازه نانوپلاستیک‌ها با دستگاه DLS نشان داد که میانگین اندازه نانوپلاستیک‌ها ۱۶۰ نانومتر بود. زتای بار سطحی نانوپلاستیک‌های پلی‌اتیلن ترفتالات (۲۹,۵ mV-) بود. میانگین همبستگی اندازه ذرات نیز ۰/۴ بود (شکل ۴).



شکل ۴: نمودار DLS مربوط به نانوپلاستیک‌های پلی‌اتیلن ترفتالات.

در بررسی مورفولوژی نانوپلاستیک ها با SEM نیز مشخص شد که اندازه نانوذرات کم تر از ۵۰۰ نانومتر می باشد (شکل ۵).



شکل ۵: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوپلاستیک‌های پلی اتیلن ترفتالات. (بزرگ‌نمایی $\times 10000$)

۵- بحث

یافته‌های پژوهش حاضر، افزایش آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز و ایزوآنزیم کراتین‌کیناز در موش‌های صحرائی که نانوپلاستیک‌های پلی اتیلن ترفتالات دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه کنترل را نشان داد. همچنین افزایش سطح شاخص پراکسیداسیون لیپیدی، کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانسی کل و کاهش سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در هموژنات بافتی قلب در گروه دریافت کننده نانوپلاستیک مشاهده شد. آسیب‌های بافتی همچون انحطاط دانه‌ای و واکولی میوفیبریل‌ها و نکروزهای پراکنده همراه با ادم بین عضلانی در مطالعات آسیب‌شناسی بافتی در بین گروه مورد مطالعه به‌وضوح قابل مشاهده بود.

در راستای این نتایج Babaei و همکاران (۲۹) نشان دادند که نانوپلاستیک‌های پلی استایرن سبب القای استرس اکسیداتیو در موش‌های مورد مطالعه شدند. در مطالعه ای دیگر که Ding Y (۳۰) بر روی نانوپلاستیک‌ها انجام شده بود آسیب‌های بافتی مختلف مشاهده شده بود. اما انتقال نانوپلاستیک‌های پلی اتیلن ترفتالات از بطری‌های نوشیدنی به‌داخل بدن ما انسان‌ها در چند سال گذشته به یک معضل مهم در سم‌شناسی تبدیل شده است. مطالعات گسترده‌ای در کوتاه مدت بر روی سمیت نانوپلاستیک‌ها انجام شده است اما کم‌تر مطالعه‌ای اثرات آن‌ها را در بلند مدت بررسی کرده است. سازوکارهایی که در سمیت نانوپلاستیک‌ها دخیل هستند پیچیده و چند عاملی بوده و شامل تغییر در بیان ژن، آسیب به AND، القای استرس اکسیداتیو و تغییر در میزان بعضی از هورمون‌ها می‌باشد. به‌نظر می‌رسد در تمام این سازوکارها شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد در اثرات آسیب‌زای نانوپلاستیک‌ها نقش داشته باشد (۱۳). بنابراین منطقی به‌نظر می‌رسد که با وجود انتقال نانوپلاستیک‌ها به جریان خون، اثرات آن‌ها در بافت قلب به‌عنوان یک بافت بسیار حیاتی در بلند مدت بررسی شود. لاکتات دهیدروژناز آنزیمی از گروه اکسیدوردوکتاز هاست که در بیشتر بافت‌های بدن یافت می‌شود اما نوع یک آن مختص بافت قلب است. این آنزیم به‌هنگام آسیب دیدن قلب وارد جریان خون می‌شود و سنجش آن موید آسیب و صدمات بافت قلب است (۲۳). همچنین ایزوآنزیم

کراتین کیناز BM از دیگر آنزیم‌هایی است که سنجش آن در آسیب‌های قلبی سنجیده می‌شود تا میزان آسیب بررسی شود. در مطالعه‌ی حاضر نیز سنجش این دو آنزیم در نمونه‌های سرم انجام شد، که افزایش در میزان آن‌ها در مقایسه با گروه کنترل نشان دهنده‌ی آسیب سلولی و از بین رفتن یکپارچگی عمل‌کردی و یا نفوذپذیری غشای سلول‌های بافت قلب که ناشی از نانوپلاستیک پلی‌اتیلن ترفتالات است. القای استرس اکسیداتیو یکی از مکانیسم‌های اصلی در ایجاد سمیت توسط نانوپلاستیک‌ها است. با القای استرس اکسیداتیو سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن بالا می‌رود. رادیکال‌های آزاد اکسیژن رابطه‌ی مستقیمی با بیماری‌هایی از قبیل آلزایمر، پارکینسون و مشکلات قلبی - عروقی دارند (۳۳، ۴۳). رادیکال‌های آزاد با اکسیداسیون تری‌گلیسریدها سبب بیماری‌های قلبی و عروقی مختلفی می‌شود در نتیجه سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی که توسط نانوپلاستیک‌ها در بلند مدت ایجاد می‌شود مهم به نظر می‌رسید. با سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی مشخص شد که نانوپلاستیک‌ها در بلند مدت می‌توانند باعث افزایش میزان اکسیداسیون در لیپیدها شوند که این می‌تواند یکی از دلایل آسیب‌های وارد شده به قلب در حیوانات مورد مطالعه باشد. یکی از آنزیم‌هایی که در خشنی‌سازی رادیکال‌های آزاد در بدن نقش دارد آنزیم کاتالاز است. با سنجش این آنزیم مشخص شد که میزان آن در موش‌هایی که نانوپلاستیک دریافت کرده بودند کاهش معنی‌داری داشت که این مسئله موید القای استرس اکسیداتیو و افزایش سطح رادیکال‌های آزاد به‌وسیله‌ی نانوپلاستیک‌ها بود. کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانسی در موش‌های مورد مطالعه در مقایسه با گروه کنترل نقش نانوپلاستیک‌ها در القای استرس اکسیداتیو در بافت قلب را نشان داد.

همسو با نتایج پژوهش حاضر، Nnoruka و همکاران (۳۵) نشان دادند که نانوپلاستیک‌ها می‌توانند میزان پراکسیداسیون لیپیدی را افزایش دهند. همچنین کاهش سطح فعالیت در میزان آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز به‌عنوان عوامل خشنی‌کننده‌ی رادیکال‌های آزاد از نانوپلاستیک‌ها گزارش شده است. در مطالعات آسیب‌شناسی بافتی که توسط میکروسکوپ نوری انجام شد، آسیب‌هایی از قبیل انحطاط دانه‌ای و واکوئلی میوفیبریل‌ها و نکروزهای پراکنده همراه با ادم بین‌عضلانی مشاهده شد که نشان دهنده‌ی آسیب‌های جدی در بافت قلب بود. نکروزهای پراکنده در بافت قلب می‌تواند باعث نارسایی‌های حاد یا مزمن در بلند مدت شود. همچنین ادم بین‌عضلانی در بافت قلب می‌تواند باعث اختلال در عمل‌کرد صحیح قلب شود. واکوئلی شدن و انحطاط میوفیبریل‌های بافت قلب که توسط نانوپلاستیک‌ها در موش‌های مورد مطالعه ایجاد شده بود، می‌تواند باعث کاهش قدرت قلب در خون‌رسانی می‌شود. القای استرس اکسیداتیو توسط نانوپلاستیک‌های پلی‌اتیلن ترفتالات که در بلند مدت ایجاد شده است، می‌تواند عامل اصلی در آسیب‌های وارد شده بر بافت قلب در موش‌های صحرایی باشد.

۶- نتیجه‌گیری

به‌طور کلی مشخص شد نانوپلاستیک‌های پلی‌اتیلن ترفتالات موجب افزایش سطوح سرمی آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز و ایزوآنزیم کراتین کیناز در موش‌های صحرایی نر شد. همچنین نانوپلاستیک‌ها باعث کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز، کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانسی کل و افزایش میزان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در بافت قلب شدند که این نشان دهنده‌ی القای استرس اکسیداتیو در موش‌ها بود. همچنین ادم بین‌عضلانی و انحطاط میوفیبریل‌های بافت قلب در مطالعات آسیب‌شناسی بافتی در قلب موش‌ها مشاهده شد. می‌توان مطالعات بعدی را در مدت زمان‌های طولانی‌تر، نژادهای متفاوت از نظر ژنتیکی و همچنین به هدف مکانیسم‌های مولکولی سمیت ایجاد شده انجام داد.

۷- تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان (شماره گزنت: ۱۴۰۲۰۴۰۶۲۶۶۶) انجام شد و ضمن تشکر از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان از تمامی افرادی که در این پژوهش مشارکت داشتند تشکر و قدردانی می‌شود.

۸- منابع

1. Materić D, Kjær HA, Vallelonga P, Tison J-L, Röckmann T, Holzinger R. Nanoplastics measurements in Northern and Southern polar ice. *Environmental research*. 2022;208:112741.
2. Mattsson K, Jovic S, Doverbratt I, Hansson L-A. Nanoplastics in the aquatic environment. *Microplastic contamination in aquatic environments*. 2018:379-99.
3. Ekvall MT, Lundqvist M, Kelpsiene E, Šileikis E, Gunnarsson SB, Cedervall T. Nanoplastics formed during the mechanical breakdown of daily-use polystyrene products. *Nanoscale Advances*. 2019;1(3):1055-61.
4. Al-Thawadi S. Microplastics and Nanoplastics in aquatic environments: challenges and threats to aquatic organisms. *Arabian Journal for Science and Engineering*. 2020;45(6):4419-40.
5. Shen M, Zhang Y, Zhu Y, Song B, Zeng G, Hu D, et al. Recent advances in toxicological research of Nanoplastics in the environment: A review. *Environmental pollution*. 2019;252:511-21.
6. Cole M, Galloway TS. Ingestion of Nanoplastics and microplastics by Pacific oyster larvae. *Environmental science & technology*. 2015;49(24):14625-32.
7. Rist S, Baun A, Hartmann NB. Ingestion of micro-and Nanoplastics in *Daphnia magna*—Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. *Environmental pollution*. 2017;228:398-407.
8. Sökmen TÖ, Sulukan E, Türkoğlu M, Baran A, Özkaraca M, Ceyhun SB. Polystyrene Nanoplastics (20 nm) are able to bioaccumulate and cause oxidative DNA damages in the brain tissue of zebrafish embryo (*Danio rerio*). *Neurotoxicology*. 2020;77:51-9.
9. Zheng T, Yuan D, Liu C. Molecular toxicity of Nanoplastics involving in oxidative stress and desoxyribonucleic acid damage. *Journal of Molecular Recognition*. 2019;32(11):e2804.
10. Li Z, Feng C, Wu Y, Guo X. Impacts of Nanoplastics on bivalve: Fluorescence tracing of organ accumulation, oxidative stress and damage. *Journal of hazardous materials*. 2020;392:122418.
11. Guerrera MC, Aragona M, Porcino C, Fazio F, Laurà R, Levanti M, et al. Micro and nano plastics distribution in fish as model organisms: histopathology, blood response and bioaccumulation in different organs. *Applied Sciences*. 2021;11(13):5768.
12. Toussaint B, Raffael B, Angers-Loustau A, Gilliland D, Kestens V, Petrillo M, et al. Review of micro-and Nanoplastic contamination in the food chain. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2019;36(5):639-73.
13. Bouwmeester H, Hollman PC, Peters RJ. Potential health impact of environmentally released micro-and Nanoplastics in the human food production chain: experiences from nanotoxicology. *Environmental science & technology*. 2015;49(15):8932-47.
14. Hua Z, Ma S, Ouyang Z, Liu P, Qiang H, Guo X. The review of Nanoplastics in plants: Detection, analysis, uptake, migration and risk. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2023;158:116889.

15. Yin L, Wen X, Huang D, Du C, Deng R, Zhou Z, et al. Interactions between microplastics/Nanoplastics and vascular plants. *Environmental pollution*. 2021;290:117999.
16. Bhagat J, Zang L, Nishimura N, Shimada Y. Zebrafish: An emerging model to study microplastic and Nanoplastic toxicity. *Science of The Total Environment*. 2020;728:138707.
17. Domenech J, Hernández A, Rubio L, Marcos R, Cortés C. Interactions of polystyrene Nanoplastics with in vitro models of the human intestinal barrier. *Archives of Toxicology*. 2020;94:2997-3012.
18. Yang S, Cheng Y, Chen Z, Liu T, Yin L, Pu Y, et al. In vitro evaluation of Nanoplastics using human lung epithelial cells, microarray analysis and co-culture model. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2021;226:112837.
19. Paul MB, Stock V, Cara-Carmona J, Lisicki E, Shopova S, Fessard V, et al. Micro-and Nanoplastics—current state of knowledge with the focus on oral uptake and toxicity. *Nanoscale Advances*. 2020;2(10):4350-67.
20. Liu H, Tian L, Wang S, Wang D. Size-dependent transgenerational toxicity induced by Nanoplastics in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science of the Total Environment*. 2021;790:148217.
21. Kaseke T, Lujic T, Cirkovic Velickovic T. Nano-and microplastics migration from plastic food packaging into dairy products: impact on nutrient digestion, absorption, and metabolism. *Foods*. 2023;12(16):3043.
22. Chen Y, Xu H, Luo Y, Ding Y, Huang J, Wu H, et al. Plastic bottles for chilled carbonated beverages as a source of microplastics and Nanoplastics. *Water Research*. 2023;242:120243.
23. Zhang J, Peng M, Lian E, Xia L, Asimakopoulos AG, Luo S, et al. Identification of poly (ethylene terephthalate) Nanoplastics in commercially bottled drinking water using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Environmental Science & Technology*. 2023;57(22):8365-72.
24. Lovrić J, Mesić M, Macan M, Koprivanac M, Kelava M, Bradamante V. Measurement of malondialdehyde (MDA) level in rat plasma after simvastatin treatment using two different analytical methods. *Periodicum biologorum*. 2008;110(1):63-8.
25. Shangari N, O'Brien PJ. Catalase activity assays. *Current protocols in toxicology*. 2006;27(1):7.. 1-7.. 16.
26. Gupta S, Kunti S, Mondal R, Basu P, Chowdhury KM, Gayen R. Determination of reference limit and evaluation of precision to measure Total Antioxidant Capacity (TAC) by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) method. *Indian Journal of Basic and Applied Medical Research*. 2014;3(4):308-13.
27. Rodríguez-Hernández AG, Muñoz-Tabares JA, Aguilar-Guzmán JC, Vazquez-Duhalt R. A novel and simple method for polyethylene terephthalate (PET) nanoparticle production. *Environmental Science: Nano*. 2019;6(7):2031-6.
28. Mohammed A, Abdullah A, editors. Scanning electron microscopy (SEM): A review. *Proceedings of the 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatics—HERVEX, Băile Govora, Romania*; 2018.
29. Babaei AA, Rafiee M, Khodaghali F, Ahmadpour E, Amereh F. Nanoplastics-induced oxidative stress, antioxidant defense, and physiological response in exposed Wistar albino rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 2022:1-13.

30. Ding Y, Zhang R, Li B, Du Y, Li J, Tong X, et al. Tissue distribution of polystyrene Nanoplastics in mice and their entry, transport, and cytotoxicity to GES-1 cells. *Environmental Pollution*. 2021;280:116974.
31. Hu M, Palić D. Micro-and nano-plastics activation of oxidative and inflammatory adverse outcome pathways. *Redox biology*. 2020;37:101620.
32. Jaffe AS, Landt Y, Parvin CA, Abendschein DR, Geltman EM, Ladenson JH. Comparative sensitivity of cardiac troponin I and lactate dehydrogenase isoenzymes for diagnosing acute myocardial infarction. *Clinical chemistry*. 1996;42(11):1770-6.
33. Peña-Bautista C, Baquero M, Vento M, Cháfer-Pericás C. Free radicals in Alzheimer's disease: Lipid peroxidation biomarkers. *Clinica Chimica Acta*. 2019;491:85-90.
34. Bhattacharya S, Ahmed KM, Chakraborty S. Free radicals cardiovascular diseases: An update. Elsevier; 2011.
35. Nnoruka UC, Okonkwo CJ, Ilechukwu I, Okonkwo CJ, Belonwu DC. Impact of polystyrene microplastic exposure on lipid profile and oxidative stress status of male and female Wistar rats. *Environmental Analysis, Health and Toxicology*. 2022;37(3).