



The effects of different doses of nano zinc oxide on the level of oxidative stress and histopathological changes in the kidneys of rats

Mirzaei F ^{a*}, Mirzaei A ^b, Soleimani asl S ^c

^a Research Center for Molecular Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

^b Researcher, Hazegh medical laboratory, Tehran, Iran.

^c Department of Anatomy, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Mirzaei F, Mirzaei A, Soleimani asl S. The effects of different doses of nano zinc oxide on the level of oxidative stress and histopathological changes in the kidneys of rats. Journal of Cell and Tissue . 2024; 15(3):190.

<https://10.61186/JCT.15.3.231>.

KEYWORDS

Zinc oxide Nanoparticle
Oxidative Stress
Histopathological Changes

ABSTRACT

Aim: Zinc nanoparticles have gained significant attention due to their wide-ranging applications in various fields, including industries, medicine, and nutrition. These nanoparticles are characterized by their small size, which allows for easy absorption into biological systems, enabling them to interact with different tissues effectively. One of the critical areas of concern regarding the use of zinc nanoparticles is their potential impact on kidney health. The kidneys are vital organs responsible for filtering blood, excreting waste, and regulating essential bodily functions. Due to their high blood flow and the capacity to excrete various compounds, kidneys may be particularly vulnerable to the effects of toxins, including nanoparticles. Therefore, this study aims to investigate the effects of nano zinc oxide on antioxidant activity and histological changes in the kidneys of rats. Understanding these effects is crucial for assessing the safety and potential therapeutic applications of zinc nanoparticles in medical and nutritional contexts.

Material and Methods: In this research, male Wistar rats were utilized as the experimental model. The rats were randomly divided into six groups, with seven rats in each group to ensure statistical validity. Group 1 served as the normal control group, while the remaining groups received varying doses of nano zinc oxide. Specifically, group 2 received 5 mg/kg of nano zinc, group 3 received 10 mg/kg, group 4 received 25 mg/kg, group 5 received 50 mg/kg, and group 6 received 100 mg/kg of nano zinc. The administration of these doses continued for one month to observe both short-term and potential cumulative effects. After this period, the rats were sacrificed, and their kidneys were isolated for further analysis. Various biochemical assays were conducted to assess total antioxidant capacity (TAC), total oxidant capacity (TOS), glutathione levels, and malondialdehyde (MDA) concentration. Additionally, liver enzymes were measured, and kidney histopathology was examined to evaluate any structural changes resulting from nano zinc exposure.

Results: The findings revealed significant alterations in antioxidant activity among the groups that received nano zinc. Specifically, total antioxidant capacity (TAC) and glutathione levels decreased markedly in the rats that received higher doses of nano zinc, particularly at 10, 25, 50, and 100 mg/kg. In contrast, there was a sharp increase in malondialdehyde (MDA) concentrations and total oxidant capacity (TOS) in these groups, indicating heightened oxidative stress. Interestingly, the group that received the lowest dose of 5 mg/kg of nano zinc exhibited no harmful effects on tissue changes or antioxidant capacity, suggesting a threshold below which nano zinc may not pose significant risks. Conversely, in the groups receiving higher doses, observable tissue damage was

* Corresponding author. Tel.: +989199837693

E-mail address: Fatemehmirzaei1990@gmail.com

DOI: : <https://10.61186/JCT.15.3.231>

Received:3 Sep. 2024; Received in revised form: 22 Sep. 2024; Accepted: 25 Sep. 2024

Original Article

© Author



noted, and these changes appeared to be dose-dependent, emphasizing the importance of dosage in determining the safety and efficacy of nano zinc.

Conclusion: The results of this study underscore the potential harmful effects of nano zinc, particularly at elevated doses, on kidney function and histopathology. The observed increase in oxidative stress markers and accompanying tissue changes highlight the need for caution in the use of zinc nanoparticles, especially in medical and nutritional applications. While nano zinc in low concentrations may offer beneficial effects, such as potential therapeutic properties, the risks associated with higher doses cannot be overlooked. Further research is warranted to explore the mechanisms underlying these effects and to establish safe dosage guidelines for the use of zinc nanoparticles in various applications. Overall, this study contributes valuable insights into the safety profile of nano zinc, particularly concerning kidney health, and emphasizes the need for careful consideration of dosage in therapeutic contexts.



اثر دوزهای مختلف نانواکسید روی بر میزان استرس اکسیداتیو و تغییرات هیستولوژی کلیه در رت

فاطمه میرزایی^{۱*}، امیر میرزایی^۲، سارا سلیمانی اصل^۳

^۱ استادیار گروه علوم تشریح، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
^۲ پژوهشگر، آزمایشگاه تشخیص طبی حاذق، تهران، ایران.
^۳ استاد گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

واژگان کلیدی	چکیده
نانواکسید روی استرس اکسیداتیو تغییرات هیستوپاتولوژی	هدف: نانواکسید دارای کاربردهای گسترده ای در صنایع، پزشکی و تغذیه است. این نانوذرات به راحتی جذب می شوند و می توانند بر بافت های مختلف تاثیر بگذارند. کلیه ها به دلیل جریان خون بالا ممکن است در برابر سموم آسیب پذیر باشند. هدف این مطالعه بررسی تاثیرات نانواکسید روی بر فعالیت آنتی اکسیدانتی و تغییرات بافت شناسی کلیه در رت ها است. مواد و روش ها: ۴۲ رت نر نژاد ویستار به طور تصادفی به شش گروه (هر گروه ۷) تقسیم شدند: گروه ۱ (نرمال)، گروه ۲ (۵ mg/kg نانواکسید روی)، گروه ۳ (۱۰ mg/kg نانواکسید روی)، گروه ۴ (۲۵ mg/kg نانواکسید روی)، گروه ۵ (۵۰ mg/kg نانواکسید روی) و گروه ۶ (۱۰۰ mg/kg نانواکسید روی). ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام (TAC)، ظرفیت اکسیدانتی تام (TOS)، گلووتاتیون، مالون دی آلدئید (MDA)، آنزیم های کبدی و هیستوپاتولوژی کلیه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج: دوزهای بالاتر از ۱۰ mg/kg نانواکسید روی به طور معنی داری TAC و گلووتاتیون را کاهش داد و آسیب بافتی و غلظت MDA و TOS را به طور قابل توجهی افزایش داد. دوز ۵ mg/kg نانواکسید روی تاثیر منفی بر تغییرات بافتی و ظرفیت آنتی اکسیدانتی نداشت. نتیجه گیری: مصرف نانواکسید روی، به ویژه در دوزهای بالا، موجب افزایش استرس اکسیداتیو و تغییرات بافتی می شود، در حالی که در حالی که در غلظت های کم ممکن است اثرات مفیدی داشته باشد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۳	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۰۱	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۰۴	

۱- مقدمه

نانوذرات به ذراتی با ابعاد یک تا صد نانومتر اطلاق می شود. افزایش نسبت سطح به حجم، سبب افزایش سطح تماس و در نتیجه بهبود عملکرد آن ها می شود. از سوی دیگر، اندازه کوچک نانوذرات، افزایش نفوذپذیری و فعالیت شیمیایی آن ها را به همراه دارد (۱).

در سال های اخیر پیشرفت های عظیمی در زمینه فناوری نانو صورت گرفته است، ساختارهای نانوی فراوانی به دست آمده اند که در غلظت های بسیار کم، باکتری ها را از بین می برند و دارای خواص پزشکی مفیدی می باشند. مکانیسم اصلی تاثیر نانوذرات بر

روی باکتری‌ها از طریق آسیب به DNA و پروتئین و تخریب دیواره سلولی می‌باشد. کاربرد نانوذرات مانند شمشیر دو لبه است که از یک سو نقش مفید آن‌ها در پزشکی و از طرف دیگر سمیت ناشی از استفاده این ذرات مطرح است (۲).

تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که نانوذرات سولفیدی و اکسید فلزات، دارای خواص آنتی‌باکتریایی، آنتی‌اکسیداتیو و ضدالتهابی بسیار قوی هستند. برخی از نانوذره‌های ساخته شده از اکسیدهای فلزی، در شرایط فرآوری بسیار پایدار بوده و به‌جز خاصیت مفید، اثر سمی بسیار کمی بر روی سلول‌های انسان و حیوان دارند. نانوآکسید زینک، یک نانوذره غیرسمی و زیست‌سازگار است. این ماده در حامل‌های مواد دارویی، آرایشی و مواد پرکننده در دندانپزشکی استفاده می‌شود (۲، ۳).

نانوذرات قادرند از طرق مختلفی همچون تنفس، پوست و مصرف خوراکی وارد بدن شوند و از طریق جریان خون به اعضای حیاتی بدن از جمله کبد، کلیه، مغز و سایر نقاط دسترسی پیدا کنند (۴، ۵). لذا با توجه به گستردگی مصرف آن‌ها، ممکن است سبب آسیب این بافت‌ها شوند.

استرس اکسیداتیو که به عدم تعادل میان تولید رادیکال‌های آزاد و دفاع آنتی‌اکسیداتیو اطلاق می‌شود. در طی فرآیندهای طبیعی و نرمال سلول رادیکال‌های آزاد تولید می‌شوند. در سلول، مهم‌ترین رادیکال آزاد، گونه‌های فعال اکسیژن هستند که می‌توانند موجب تخریب DNA و سایر مولکول‌ها شده و باعث آسیب سلول در مواجهه با ترکیبات دیگر شود (۶). بعضی از نانوذرات باعث پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب پروتئین‌های موجود در دیواره سلول‌های بدن می‌شوند و در نهایت منجر به التهاب، استرس اکسیداتیو و آسیب بافتی می‌شوند. برخی از محصولات استرس اکسیداتیو مانند مالون‌دی‌آلدهید می‌توانند با بیومولکول‌ها واکنش نشان داده و سبب تغییر در بیان ژن و فعالیت آنزیمی و نیز آسیب یا مرگ سلولی شوند (۷). بدن جهت حفظ و کنترل غلظت نرمال رادیکال‌های آزاد، از سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان استفاده می‌کند. کاهش قدرت دفاعی این سیستم نیز منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود (۶).

عنصر روی سلول‌ها را در برابر عوامل اکسیدان محافظت می‌کند و با طیف گسترده‌ای از عملکردهای بیولوژیکی بدن در ارتباط است. این عنصر کاتیونی دو ظرفیتی است و برای فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها ضروری است و در فرآیندهای رونویسی، همانندسازی، سنتز نوکلئیک اسید و پروتئین نقش ایفا می‌کند. این عنصر در ساختمان برخی از آنزیم‌ها حضور داشته و در فرآیندهای متابولیکی متنوع نقش دارند. روی برای تولید ترانسفرازها، کینازها، فسفاتازها، ردوکتازها و سایر آنزیم‌ها ضروری است (۸، ۹).

تحقیقات گذشته نشان داده‌اند که برخی مواد شیمیایی و نانوذرات باعث کاهش گلوکاتایون و در نتیجه سمیت سلولی می‌شوند. اگرچه مکانیسم دقیق آسیب ایجاد شده توسط نانوذرات هنوز به‌درستی مشخص نشده است، اما به نظر می‌رسد التهاب و استرس اکسیداتیو نقش مهمی در این رابطه ایفا می‌کنند (۱۰).

مطالعات مختلفی گزارش کرده‌اند که نانوآکسید روی عوارض جانبی متنوعی بر سلامتی انسان و سایر حیوانات بر جای می‌گذارد و در واقع ایمنی زیستی نانوآکسید روی هنوز مورد بحث است. برخی اثرات نامطلوب نانوآکسید روی بر بدن را گزارش کرده‌اند. این اثرات شامل افزایش فاکتورهای التهابی، سمیت سلولی و القای استرس اکسیداتیو است. با این حال، سمیت نانوذرات به عوامل فیزیکی و شیمیایی مانند شکل ذرات، اندازه، پایداری، ترکیب، شیمی و بار سطحی و نیز دوز مصرفی نانوذره بستگی دارد (۱۱، ۱۲). کلیه، یکی از اندام‌های حیاتی بدن است که جریان خون بالایی دارند و مسئول فیلتراسیون و دفع مواد زائد و سموم از خون هستند. در طی فرایند فیلتراسیون، غلظت برخی مواد در بافت کلیه بسیار بالا می‌رود و این غلظت بالا می‌تواند به آسیب

سلول‌های کلیوی منجر شود. نانوذرات می‌توانند به میتوکندری سلول‌های کلیوی آسیب رسانده و تولید انرژی را مختل کنند که در نهایت این امر به آپوپتوزیس و نکروزیس سلولی منجر می‌شود. نانوذرات ممکن است توسط کلیه دفع شوند، اما در برخی موارد دفع ناکارآمد آن‌ها باعث تجمع در کلیه و آسیب بافتی می‌شود (۱۳). با وجود افزایش استفاده از اکسید روی در صنعت، داده‌های مربوط به سمیت آن متناقض است. اگرچه در برخی تحقیقات، اثر غیر سمی بودن ذرات اکسید روی تایید شده است، اما در مطالعات دیگر، نتیجه عکس آن مشاهده شده و نشان داده‌اند که این ماده دارای عوارض جانبی زیادی در مدل‌های حیوانی است (۱۴، ۱۵). بنابراین به دلیل گزارشات متناقض و استفاده روزافزون از این ماده، مشخص کردن اثرات آن بر بافت‌های بدن خصوصاً بافت کلیه ضروری است.

۲- مواد و روش‌ها

این پژوهش از نوع تجربی است که بر روی رت‌های نر با میانگین وزنی ۲۰۰ گرم انجام شد. تمامی مراحل با تأیید کمیته اخلاق دانشگاه انجام شد ابتدا رت‌ها در لانه حیوانات به مدت دو هفته جهت سازگاری با محیط جدید در دمای 1 ± 22 درجه سانتی‌گراد با غذا و شرایط یکسان، ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و تهویه مناسب نگه داری شدند و از یک رنج غلظتی جهت بررسی اثرات نانواکسید روی استفاده شد. سپس به‌طور تصادفی به‌شرح زیر تقسیم شدند (هر گروه ۷ رت): گروه ۱ (نرمال)، گروه ۲ (دریافت کننده ۵ mg/kg نانواکسید روی)، گروه ۳ (دریافت کننده ۱۰ mg/kg نانواکسید روی)، گروه ۴ (دریافت کننده ۲۵ mg/kg نانواکسید روی)، گروه ۵ (دریافت کننده ۵۰ mg/kg نانواکسید روی) و گروه ۶ (دریافت کننده ۱۰۰ mg/kg نانواکسید روی). از یک رنج غلظتی جهت بررسی اثرات نانواکسید روی استفاده شد (۱۶-۱۸). نانوذرات از شرکت نانوسان مشهد خریداری شد. بعد از اتمام دوره درمان با نانواکسید روی به‌صورت گاوژ برای مدت یک ماه، رت‌ها یک شب گرسنه نگه داشته شده و بعد از بی‌هوشی موش‌ها توسط ایزوفلوران ۲/۵-۲ درصد، کلیه رت‌ها جدا شده و توسط بافر فسفات سالین شسته شد. تعدادی از نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد جهت بررسی هیستوپاتولوژی و تعدادی دیگر در نیتروژن مایع فریز شده و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و در نهایت جهت بررسی دیگر تست‌ها استفاده شد. سرم خون جهت بررسی سطح اوره، اوریک و کراتینین جدا شد و تست‌ها در آزمایشگاه تشخیص طبی انجام شد. نمونه‌ها در بافر فسفات حاوی مهارکننده پروتئاز هموژنیزه شدند و سپس با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سوپرناتانت جدا شده و برای ارزیابی وضعیت آنتی‌اکسیدانتی استفاده شد (۱۹). با استفاده از ترازوی آنالیتیکال، حدود ۶۰ میلی‌گرم از بافت کلیه وزن شد و با استفاده از ازت مایع و هاون به‌صورت پودر درآورده شد. سپس آن‌ها را با بافر لیزکننده PBS هموژن شدند. نمونه‌های حاصل با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند و سوپرناتانت جهت بررسی مارکرهای استرس اکسیداتیو تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد فریز شد.

اندازه‌گیری تونال پروتئین تام: اندازه‌گیری پروتئین به‌روش برادفورد یک روش رنگ‌سنجی ساده، سریع، حساس و دقیق است که برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین بافتی استفاده شد.

وضعیت تام/اکسیدان (TOS): در این آزمایش، ترکیبات آهن دو ظرفیتی (Fe^{2+}) در حضور اکسیدانت‌ها به آهن سه ظرفیتی (Fe^{3+}) اکسید می‌شوند. آهن سه ظرفیتی در حضور یک کروموژن مناسب، رنگ تولید می‌کند. کروموژن گزلیل اورنج در محدوده طول موج ۵۵۰ تا ۵۸۰ نانومتر جذب دارد و میزان جذب نوری متناسب با غلظت اکسیدان است. این روش به صورت دستی انجام

شد و با استفاده از هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و منحنی استاندارد رسم شد (۲۰).

سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام (TAC): در این آزمایش، ترکیبات مس دوظرفیتی (Cu^{+2}) در حضور آنتی اکسیدانت‌ها به مس تک‌ظرفیتی (Cu^+) احیا می‌شوند. در حضور یک کروموژن مناسب، این ترکیبات مس تک‌ظرفیتی رنگ تولید می‌کنند. این رنگ در طول موج ۴۵۰ نانومتر جذب داشته و قابل اندازه‌گیری است. مزیت این روش آن است که آنتی اکسیدانت‌هایی همچون ترکیبات تیولی را نیز می‌تواند اندازه‌گیری کند، در حالی که روش‌هایی مانند FRAP که بر پایه آهن هستند، قادر به شناسایی این ترکیبات نیستند. میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر متناسب با غلظت آنتی اکسیدانت‌ها است (۲۰).

سنجش پراکسیداسیون لیپید (مالون دی آلدئید): در این آزمایش، مالون دی آلدئید (MDA) به‌عنوان یکی از فرآورده‌های اصلی پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب مستقیم اکسیدان‌ها به اسیدهای چرب غیراشباع (PUFA) سلولی، مورد بررسی قرار گرفت. مالون دی آلدئید در حضور تیوباربتوریک اسید کمپلکسی را تشکیل می‌دهد که در طول موج ۵۴۰ نانومتر جذب نوری نمونه‌ها به صورت دستی بررسی شد (۲۰).

رنگ آمیزی هیستوپاتولوژی: جهت انجام مطالعات بافت شناسی پس از بیهوشی حیوانات و بازکردن ناحیه شکم، نمونه برداری از کلیه به سرعت انجام شد. پس از شست‌وشوی نمونه‌ها در نرمال سالین، نمونه‌های بافتی در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شدند. سپس، نمونه‌ها فرآیند شفاف‌سازی در زایلول و آبگیری در الکل‌های صعودی را طی کردند. پس از آن، نمونه‌ها در پارافین قالب‌گیری شدند. از هر بلوک پارافینی، برش‌های ۱۰ میکرومتری تهیه و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین بر روی اسلایدها انجام شد. از لام‌های تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری ناحیه کورتکس و مدولا بررسی شد. از ناحیه مدولا و نیز ناحیه کورتکس هر کلیه چند میدان دید تصادفی غیرهمپوشان انتخاب شد و در بزرگنمایی ۴۰ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در نهایت، بررسی تغییرات هیستوپاتولوژی با استفاده از میکروسکوپ نوری (echo LAB CMOS 16004DSDW21) و دوربین دیجیتال Motic Moticam⁺ 3 و نرم افزار Image-J انجام شد (۲۱).

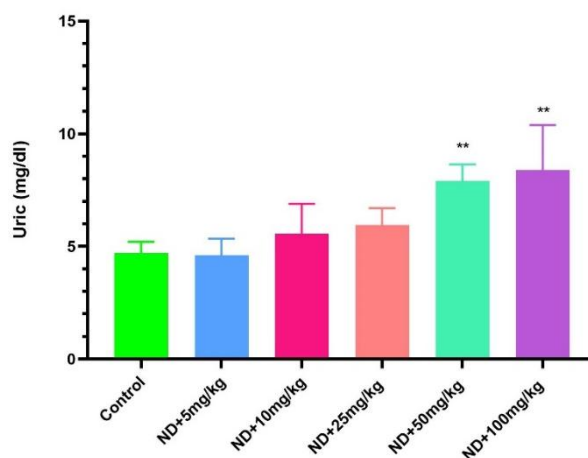
۳- آنالیز آماری

آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد و نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار (Mean \pm SD) گزارش گردید. برای مقایسه اختلاف میانگین بین گروه‌ها، از آزمون تعقیبی توکی (Tukey) استفاده شد.

۴- نتایج

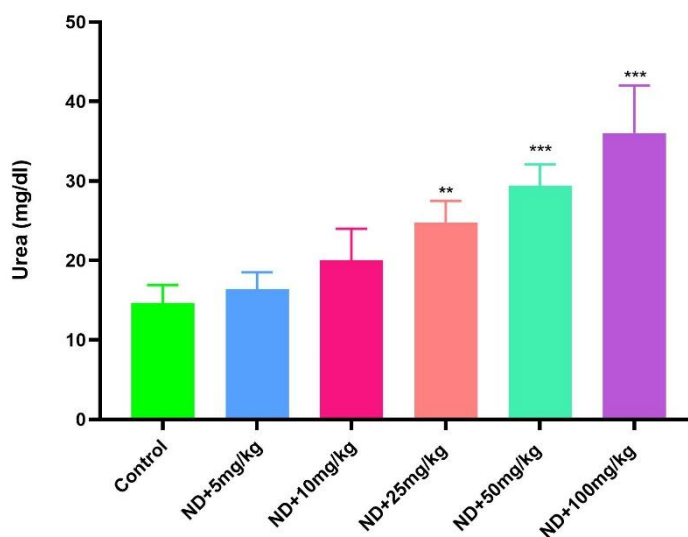
سنجش اوریک، اوره و کراتنین

بررسی داده‌ها نشان دهنده افزایش معنی‌دار میزان اوریک در گروه‌های دریافت‌کننده دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ نانو اکسید روی بود ($p < 0.05$) (شکل ۱).



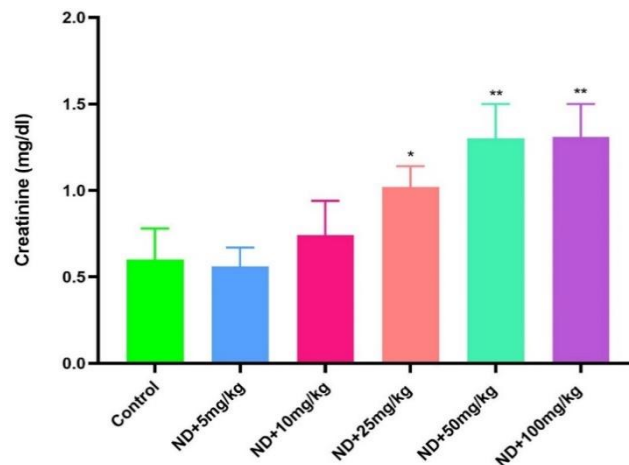
شکل ۱: تغییرات میزان اوریک در گروه‌های مختلف درمانی. داده‌ها به صورت Mean \pm SD نشان داده شده‌اند. معنی‌داری به صورت $p < 0.05$ * و $p < 0.01$ ** و $p < 0.001$ *** در مقایسه با گروه کنترل درمان نشده نمایش داده شده است. (ND: Normal Diet)

در حالی که افزایش معنی‌دار میزان اوره علاوه بر دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ نانواکسید روی ($p < 0.001$)، در دوز ۲۵ نیز مشهود بود ($p < 0.05$) (شکل ۲).



شکل ۲: تغییرات میزان اوره در گروه‌های مختلف درمانی. داده‌ها به صورت Mean \pm SD نشان داده شده‌اند. معنی‌داری به صورت $p < 0.05$ * و $p < 0.01$ ** و $p < 0.001$ *** در مقایسه با گروه کنترل درمان نشده نمایش داده شده است. (ND: Normal Diet)

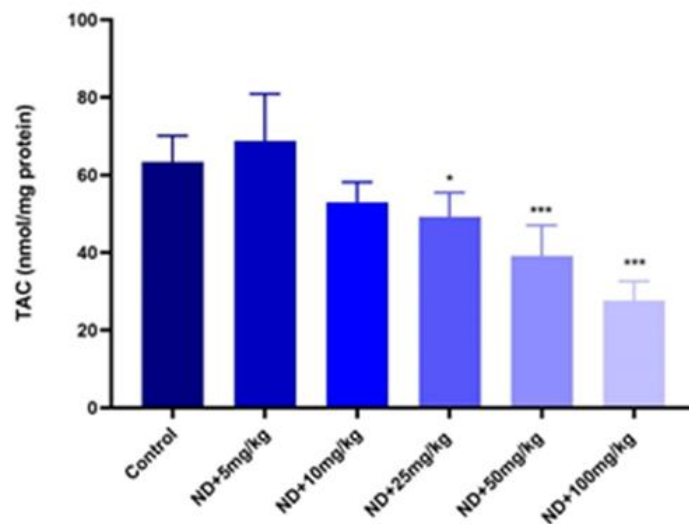
تغییرات معنی‌دار کراتینین نیز در دوزهای ۲۵ ($p < 0.05$) و ۵۰ و ۱۰۰ نانواکسید روی ($p < 0.01$) مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳: تغییرات میزان کراتینین در گروه های مختلف درمانی. داده ها به صورت Mean \pm SD نشان داده شده اند. معنی داری به صورت $p < 0.05$ * و $p < 0.01$ ** و $p < 0.001$ *** در مقایسه با گروه کنترل درمان نشده نمایش داده شده است. (ND: Normal Diet)

سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام (TAC)

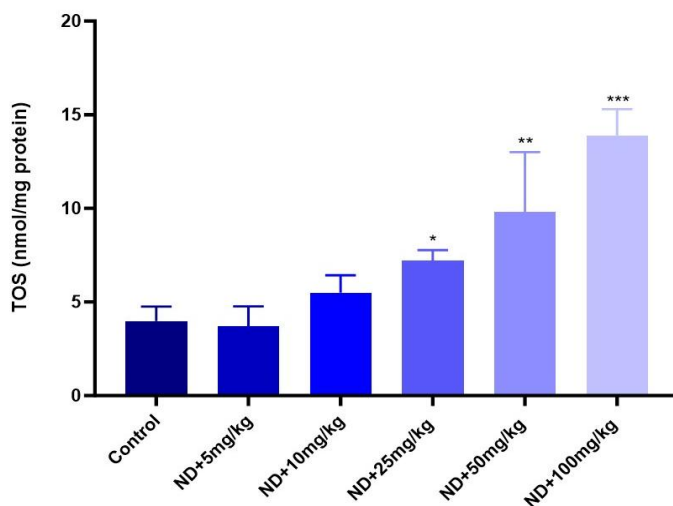
در گروه دریافت کننده نانوآکسید روی با غلظت ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل میزان TAC به صورت وابسته به دوز کاهش یافت به طوری که سطح معنی داری دوز ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم ($p < 0.05$) و دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ($p < 0.001$) بود. اختلاف ایجاد شده در مقدار این فاکتور توسط دوز ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود (شکل ۴).



شکل ۴: تغییرات میزان ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام در گروه های مختلف درمانی. داده ها به صورت Mean \pm SD نشان داده شده اند. معنی داری به صورت $p < 0.05$ * و $p < 0.01$ ** و $p < 0.001$ *** در مقایسه با گروه کنترل درمان نشده نمایش داده شده است. (ND: Normal Diet)

سنجش وضعیت تام اکسیدانت (TOS)

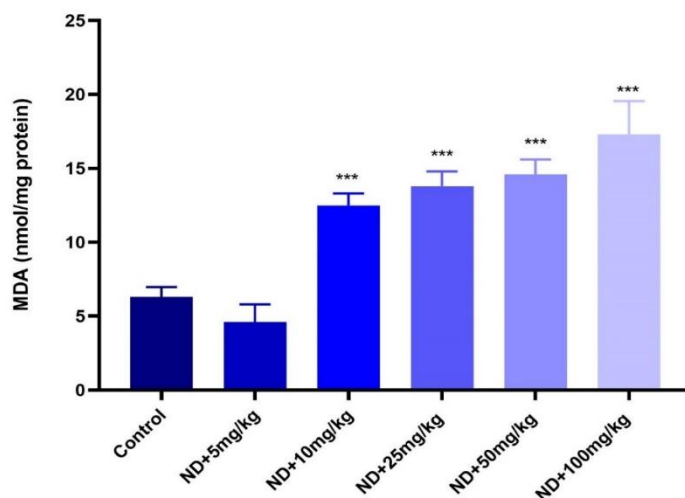
بررسی نتایج نشان می‌دهد دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوآکسید روی به‌طور معنی‌دار افزایش TOS شدند ($p < 0.001$) و این افزایش در وضعیت تام اکسیدانتی در دوز ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز با سطح معنی‌داری ($p < 0.05$) قابل مشاهده بود. دوز کمتر از ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر میزان افزایش TOS تاثیر معنی‌دار نداشتند (شکل ۵).



شکل ۵: تغییرات وضعیت اکسیدانتی تام در گروه‌های مختلف درمانی. داده‌ها به‌صورت Mean \pm SD نشان داده شده‌اند. معنی‌داری به‌صورت $p < 0.05$ * و $p < 0.01$ ** و $p < 0.001$ *** در مقایسه با گروه کنترل درمان نشده نمایش داده شده است. (ND: Normal Diet)

سنجش مالون دی‌آلدئید (MDA)

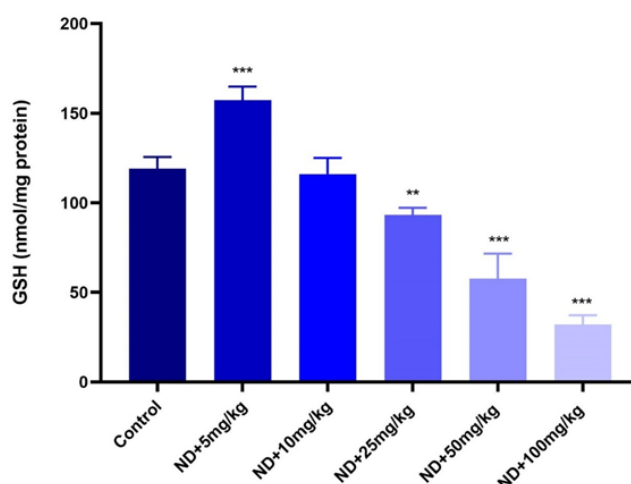
دوزهای ۱۰ و ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوآکسید روی به‌طور معنی‌دار ($p < 0.001$) و به‌صورت وابسته به دوز سبب افزایش MDA شدند. میزان MDA تحت تاثیر معنی‌دار دوز میلی‌گرم بر کیلوگرم قرار گرفت هرچند دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب تغییرات معنی‌دار آماری در این شاخصه نشد (شکل ۶).



شکل ۶: تغییرات میزان مالون دآلدئید در گروه های مختلف درمانی. داده ها به صورت $Mean \pm SD$ نشان داده شده اند. معنی داری به صورت $p < 0.05$ * و $p < 0.01$ ** و $p < 0.001$ *** در مقایسه با گروه کنترل درمان نشده نمایش داده شده است. (ND: Normal Diet)

سنجش گلوتاتیون

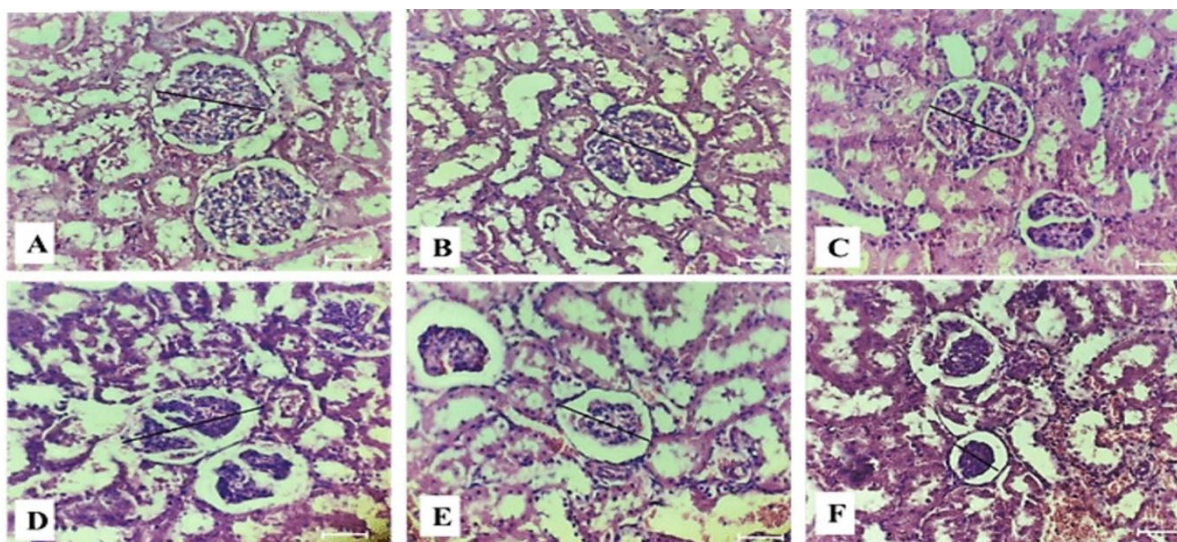
بررسی داده‌های آماری نشان می‌دهد سطح گلوتاتیون به دوز نانوآکسید روی تجویزی وابسته بوده به‌طوری که دوزهای ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($p < 0.01$) و ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($p < 0.001$) به‌طور وابسته به دوز سبب کاهش سطح گلوتاتیون شده، دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نتوانست میزان گلوتاتیون را نسبت به گروه کنترل، به‌طور معنی‌دار تغییر دهد، در صورتی که دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت آنتی‌اکسیدانت عمل کرده و میزان افزایش سطح گلوتاتیون در گروه دریافت‌کننده دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم با گروه کنترل معنی‌دار بود (شکل ۷).



شکل ۷: تغییرات میزان گلوتاتیون در گروه‌های مختلف درمانی. داده‌ها به‌صورت Mean \pm SD نشان داده شده‌اند. معنی‌داری به‌صورت $p < 0.05$ و $p < 0.01$ و $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل درمان نشده نمایش داده شده است. (ND: Normal Diet)

بررسی تغییرات هیستوپاتولوژی

یافته‌های بافت‌شناسی نشان‌دهنده آتروفی گلوبمرول‌ها و نیز تغییرات دژنراتیو و کاهش تعداد سلول‌ها در لایه جداری کپسول بومن در گروه‌های دریافت‌کننده دوز ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و بالاتر نانوآکسید روی بود. به‌طور کلی سایز گلوبمرول‌ها در این گروه‌ها کاهش داشته و فضای کلیوی نیز کوچک‌تر شده بود. همچنین دژنره شدن و مرگ سلولی در اپی‌تلیوم لوله‌ها مشاهده شد و در نتیجه لومن لوله‌ها در برخی قسمت‌ها حالت دیلاته و وسیع‌تر دیده شد. از دیگر تغییرات این ناحیه از دست دادن و تغییرات آتروفیک در حاشیه مسواکی لوله خمیده نزدیک بود. نکروز سلولی در لوله‌ها وجود داشت و هسته‌ها به‌حالت پیکنوتیک دیده شدند. خونریزی در فضای بین لوله‌های کورتکس و مدولا به‌طور متوسط قابل مشاهده بود. در فاصله بین لوله‌های ناحیه مدولا ارتشاح سلول‌های لنفاوی وجود داشت. دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز سبب تغییرات بافتی کمی در کلیه شد (شکل ۸).



Kidney histological changes	Cell infiltration	Necrosis	Cellular detachment	Swelling of tubular cells	Haemorrhage	Glomerular fibrosis	Total grade
Control(ND)	0	0	0	0	0	0	0
ND + 5mg/kg NPs	0	0	0	0	0	0	0
ND + 10mg/kg NPs	1	1	1	1	1	0	5**
ND + 25mg/kg NPs	1	1	2	1	1	1	7***
ND + 50mg/kg NPs	2	1	2	2	1	1	9***
ND + 100mg/kg NPs	2	2	2	2	3	2	13***

شکل ۸: تغییرات بافت شناسی کلیه در گروه های مختلف درمانی با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین. (A) کنترل بدون مداخله. (B) دریافت کننده دوز 5 mg/kg NPs. (C) دریافت کننده دوز 10 mg/kg NPs. (D) دریافت کننده دوز 25 mg/kg NPs. (E) دریافت کننده دوز 50 mg/kg NPs. (F) دریافت کننده دوز 100 mg/kg NPs. عکس ها به عنوان نمونه از هر میدان دید انتخاب شده اند. بزرگنمایی تصاویر: $\times 400$. معنی داری به صورت $P < 0.05$ * و $P < 0.01$ ** و $P < 0.001$ *** در مقایسه با گروه کنترل درمان نشده نمایش داده شده است.

۴- بحث

نانو اکسید روی به دلیل ویژگی منحصر به فرد و شکل های متنوع به طور گسترده ای در لوازم آرایشی و بهداشتی، کاتالیزورها، سرامیک ها، رنگ ها و کشاورزی و پزشکی استفاده می شوند. مطالعات گذشته نشان می دهند که نانو اکسید روی دارای ایمنی زیستی بالا هستند و قادرند در مواد پزشکی مورد استفاده قرار گیرند. با وجود این مطالعات توکسیکوکینیتیک گزارش کرده اند که نانو اکسید روی دارای عوارض جانبی بر روی انسان و سایر حیوانات هستند. ایمنی زیستی نانو اکسید روی هنوز مورد بحث می باشد زیرا بطور عمده ای وابسته به نحوه سنتز آن است (۹، ۲۲).

مطالعه حاضر به بررسی اثر نانو اکسید روی بر شاخص های استرس اکسیداتیو و آسیب بافتی در کلیه موش های آزمایشگاهی پرداخته است. نتایج این بررسی به وضوح نشان می دهد که با افزایش غلظت نانو اکسید زینک، شاهد تغییرات قابل توجهی در میزان این شاخص ها هستیم.

در گروه های دریافت کننده نانو اکسید روی با غلظت های ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، میزان MDA و TOS به طور چشم گیری افزایش یافت، در حالی که میزان TAC کاهش پیدا کرد. این تغییرات در پارامترهای استرس اکسیداتیو همچنین منجر به ایجاد آسیب های بافتی در کلیه شده است.

هم راستا با مطالعه حاضر مطالعه حجازی و همکاران (۲۳) به بررسی اثر نانوذرات روی در سه دوز مختلف بر شاخص های استرس اکسیداتیو اشاره می کند. این مطالعه نشان داده است که دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن نانوذرات زینک، باعث افزایش

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت SOD و Gaps، افزایش میزان TBARS (که معادل MDA است) و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل پلاسما شده است. این یافته‌ها هم‌سو با نتایج مطالعه حاضر مبنی بر افزایش استرس اکسیداتیو در پی افزایش غلظت نانوذرات روی است.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که نانوذرات روی به صورت وابسته به دوز، موجب القای استرس اکسیداتیو می‌شوند. احتمالاً مکانیسم‌های مختلفی از جمله افزایش تولید ROS، اختلال در سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی و تغییر در مسیرهای سیگنالینگ درون‌سلولی در این اثرات نقش دارند. بنابراین، در استفاده از نانوآکسید روی در کاربردهای زیست‌پزشکی، باید به غلظت و دوز مناسب آن توجه ویژه‌ای داشت تا از بروز اثرات سمی آن جلوگیری شود. در واقع، هر دو مطالعه نشان می‌دهند که نانوذرات روی به صورت وابسته به دوز، موجب القای استرس اکسیداتیو می‌شوند. احتمالاً مکانیسم‌های مختلفی از جمله افزایش تولید ROS، اختلال در سیستم‌های آنتی‌اکسیدانتی و تغییر در مسیرهای سیگنالینگ درون‌سلولی در این اثرات نقش دارند. بنابراین، در استفاده از نانوآکسید روی در کاربردهای زیست‌پزشکی، باید به غلظت و دوز مناسب آن توجه ویژه‌ای داشت تا از بروز اثرات سمی آن جلوگیری شود.

همچنین مطالعه رفیعی راد و همکاران در سال ۲۰۱۸ که بر روی اثرات نانوآکسید روی در ترکیب با ویتامین C در موش‌های صحرایی انجام شده است نشان داده می‌دهد در گروه دریافت‌کننده دوز ۵ mg/kg نانوآکسید روی، میزان MDA کاهش یافته است و در گروه‌هایی که دوزهای مختلف ویتامین C را دریافت کرده بودند، میزان این شاخص کاهش پیدا کرده است. این نتایج نشان می‌دهد که در دوز ۵ mg/kg، نانوآکسید روی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است و می‌تواند از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی، از آسیب سلولی جلوگیری کند. (۲۴). در مطالعه حاضر نیز دوز ۵ mg/kg نانوذرات اکسید روی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بوده و تاثیرات مثبتی بر شرایط استرس اکسیداتیو و نیز مطالعات هیستوپاتولوژی نمونه‌ها داشت. به نظر می‌رسد دوزهای بالای نانوذرات روی می‌توانند باعث تحریک رادیکال‌های آزاد شوند و یا گلووتاتیون را که مسئول غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد است، از کار بیاندازند (۲۵). تجمع این رادیکال‌های آزاد، به طور مستقیم یا غیرمستقیم، باعث اختلال در فعالیت آنزیم‌ها، آسیب به DNA و پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود. این امر در نهایت منجر به آسیب به سلول‌های بدن می‌گردد (۲۶). برخی آزمایش‌ها نشان می‌دهند که غلظت‌های پایین نانوذرات دارای برخی خصوصیات مفید هستند. از آنجایی که روی به‌عنوان ماده مغذی ضروری برای عملکرد بسیاری از آنزیم‌ها لازم است، نانوآکسید روی نیز ممکن است باعث بهبود وضعیت عملکردی و ساختاری بافت‌ها شود (۲۷، ۲۸).

المغربی و همکاران در سال ۲۰۱۵، با تجویز نانوآکسید روی با دوز ۱۰ mg/kg به رت‌های دیابتی، نشان دادند که این ترکیب باعث افزایش قابل توجهی در فعالیت و بیان ژن‌های SOD، CAT، Gaps، GRD و GST می‌شود. این موضوع نشان‌دهنده کاهش سطح استرس اکسیداتیو در بیضه در گروه‌های دریافت‌کننده دوز پایین نانوآکسید روی در حیوانات دیابتی است. آنها همچنین نشان دادند که نانوآکسید روی به تنهایی یا در ترکیب با انسولین، باعث افزایش تعداد و تحرک اسپرم و محافظت از بافت بیضه در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت در رت می‌شود (۲۹). در مطالعه‌ای دیگر، اثبات شده است که تجویز خوراکی نانوآکسید روی به میزان ۴۰ و ۱۰۰ mg/kg، سبب افزایش معنی‌دار سطح نیتریت در ریه رت‌های تحت درمان شده است. همچنین، سطح TNF- α در ریه پس از ۲۴ ساعت در دوز ۱۰۰ mg/kg و بعد از ۱ هفته در دوز ۴۰ mg/kg، به میزان قابل توجهی بالاتر از گروه کنترل بود. علاوه بر این، سطح اینترلوکین- β ۱ افزایش و سطح پاراکسوناز-۱ کاهش یافت. محققان نشان دادند که تجویز خوراکی نانوآکسید روی، احتمالاً از طریق استرس اکسیداتیو، پاسخ التهابی و آسیب DNA، باعث آسیب ریه می‌شود (۳۰). نانوآکسید روی احتمالاً با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، می‌تواند سبب آسیب اکسیداتیو DNA و آسیب کروموزومی، و در نهایت، آسیب

بافتی گردد. این خاصیت را می‌توان از طریق فعال‌سازی رادیکال‌های آزاد و/یا غیرفعال‌سازی گلوکوتیون که نقش خنثی‌سازی این رادیکال‌ها را به عهده دارد، توسط نانوذره توجیه کرد. پس از این فرآیند، افزایش رادیکال‌های آزاد سبب آسیب DNA و اختلال در فعالیت آنزیم‌ها می‌شود. تولید ROS توسط نانواکسید روی باعث تخریب پروتئین‌ها، آسیب DNA و پراکسیداسیون لیپیدها می‌گردد. این فرآیندها در نهایت سبب آسیب غشای سلولی و افزایش مواد مضر مانند MDA می‌شود. بررسی MDA به دلیل سادگی، تکنیک مفیدی برای بررسی افزایش پراکسیداسیون لیپید است. در این مطالعه، در گروه‌های دریافت‌کننده غلظت‌های بالاتر از ۲۵ mg/kg نانواکسید روی، غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA) در مقایسه با گروه کنترل افزایش چشمگیری داشت. افزایش معنی‌دار غلظت MDA در رت‌های دریافت‌کننده نانواکسید روی ممکن است در پیشرفت عوارض آن نقش داشته باشد، زیرا افزایش سطح مالون دی‌آلدئید و کاهش سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی در بدن می‌تواند سبب تخریب سلولی شود (۳۱). نانواکسید روی در دوزهای بالاتر از ۱۰ mg/kg باعث تغییرات بافت‌شناسی در رت‌ها شد که احتمالاً در راستای تغییرات استرس اکسیداتیو می‌باشد. افزایش استرس اکسیداتیو می‌تواند یکی از عوامل اصلی بینظمی سلولی، التهاب بافتی و در نهایت مرگ سلولی باشد. در حالی که دوز ۵ mg/kg سبب ایجاد تغییرات پاتولوژیکی در بافت نشد. این اطلاعات می‌تواند در استفاده مناسب و ایمن از نانوذرات روی در کاربردهای پزشکی و زیست‌پزشکی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین، بررسی مکانیسم‌های دقیق این اثرات و پیدا کردن راهکارهایی برای کاهش آسیب‌های احتمالی، محور مطالعات آینده در این زمینه خواهد بود.

۵- نتیجه‌گیری

نتایج این طرح به وضوح نشان داد که دوزهای بالای نانواکسید روی، شامل ۱۰ mg/kg، ۲۵ mg/kg و ۵۰ mg/kg، ۱۰۰ تأثیرات منفی قابل توجهی بر روی بافت کلیه دارند. این دوزهای بالا باعث کاهش شدید فعالیت آنتی‌اکسیدانی بافتی شده‌اند، که نشان‌دهنده اختلال در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی کلیه است. کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به تجمع رادیکال‌های آزاد در بافت منجر شود و در نتیجه، خطر آسیب اکسیداتیو را افزایش دهد. علاوه بر این، این دوزهای بالا موجب ایجاد تغییرات تخریبی در ساختار بافت کلیه گردیده‌اند. این تغییرات می‌توانند شامل آسیب به سلول‌های کلیوی، اختلال در عملکرد نرمال بافت و حتی مرگ سلولی باشند. این وضعیت به ویژه در شرایطی که بافت کلیه تحت فشار است، می‌تواند عواقب جدی برای سلامت عمومی ایجاد کند.

۶- تشکر و قدردانی

این طرح توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد اخلاق IR.UMSHA.REC.1400.457 تأیید و شماره طرح ۱۴۰۰۷۲۰۵۸۱۶ حمایت شد.

۷- منابع

1. Arukalam IO, Uzochukwu IN, Tüzün B, Dagdag O, Oguzie EE. Influence of ZnO Nanoparticle Size on Barrier Performance and Corrosion Protection of Poly (dimethylsiloxane)-Coated Q235 Steel in Chloride Environment: Bode and Computational Simulation Investigations. *Chemistry Africa*. 2024;7(2):853-63.
2. Hamada AM, Radi AA, Al-Kahtany FA, Farghaly FA. A review: Zinc oxide nanoparticles: advantages and disadvantages. *Journal of Plant Nutrition*. 2024;47(4):656-79.
3. Nair GM, Sajini T, Mathew B. Advanced green approaches for metal and metal oxide nanoparticles synthesis and their environmental applications. *Talanta Open*. 2022;5:100080.

4. Kumar M, Kulkarni P, Liu S, Chemuturi N, Shah DK. Nanoparticle biodistribution coefficients: A quantitative approach for understanding the tissue distribution of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2023;194:114708.
5. Zhang A, Meng K, Liu Y, Pan Y, Qu W, Chen D, et al. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of nanocarriers in vivo and their influences. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2020;284:102261.
6. Demirci-Cekic S, Özkan G, Avan AN, Uzunboy S, Çapanoğlu E, Apak R. Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2022;209:114477.
7. Horie M, Tabei Y. Role of oxidative stress in nanoparticles toxicity. *Free radical research*. 2021;55(4):331-42.
8. Muhamed PK, Vadstrup S. Zinc is the most important trace element. *Ugeskrift for laeger*. 2014;176(5):V11120654-V.
9. Maywald M, Rink L. Zinc in human health and infectious diseases. *Biomolecules*. 2022;12(12):1748.
10. Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 2006;160(1):1-40.
11. Sharma V, Anderson D, Dhawan A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative stress and genotoxicity in human liver cells (HepG2). *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2011;7(1):98-9.
12. Ghosh M, Sinha S, Jothiramajayam M, Jana A, Nag A, Mukherjee A. Cyto-genotoxicity and oxidative stress induced by zinc oxide nanoparticle in human lymphocyte cells in vitro and Swiss albino male mice in vivo. *Food and Chemical Toxicology*. 2016;97:286-96.
13. Zhao H, Li L, Zhan H, Chu Y, Sun B. Mechanistic Understanding of the Engineered Nanomaterial- Induced Toxicity on Kidney. *Journal of Nanomaterials*. 2019;2019(1):2954853.
14. González-Esquivel AE, Charles-Niño CL, Pacheco-Moisés FP, Ortiz GG, Jaramillo-Juárez F, Rincón-Sánchez AR. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress in liver and kidney induced by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in rats. *Toxicology mechanisms and methods*. 2015;25(3):166-75.
15. De Angelis I, Barone F, Zijno A, Bizzarri L, Russo MT, Pozzi R, et al. Comparative study of ZnO and TiO₂ nanoparticles: physicochemical characterisation and toxicological effects on human colon carcinoma cells. *Nanotoxicology*. 2013;7(8):1361-72.
16. Chimienti F, Aouffen M, Favier A, Seve M. Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate. *Current drug targets*. 2003;4(4):323-38.
17. Rafieirad M, Valipour-Chahardah-Charic S. Evaluation of the simultaneous effect of zinc oxide nanoparticles and vitamin C on oxidative stress in rat cerebellum. *Feyz Medical Sciences Journal*. 2018;22(3):274-82.
18. Habib S, Rashid F, Tahir H, Liaqat I, Latif AA, Naseem S, et al. Antibacterial and cytotoxic effects of biosynthesized zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles. *Microorganisms*. 2023;11(6):1363.
19. Ghalehkandi JG. Garlic (*Allium sativum*) juice protects from semen oxidative stress in male rats exposed to chromium chloride. *Animal Reproduction (AR)*. 2018;11(4):526-32.
20. Salehi I, Zarrinkalam E, Mirzaei F, Oshaghi EA, Ranjbar K, Asl SS. Effects of resistance, endurance, and concurrent exercise on oxidative stress markers and the histological changes of intestine after morphine withdrawal in rats. *Avicenna Journal of Medical Biochemistry*. 2018;6(2):44-9.
21. Azmoonfar R, Mirzaei F, Najafi M, Varkeshi M, Ghazikhanlousani K, Momeni S, et al. Radiation-induced Testicular Damage in Mice: Protective Effects of Apigenin Revealed by Histopathological Evaluation. *Current Radiopharmaceuticals*. 2024;17(3):238-46.

22. Mandal AK, Katuwal S, Tettey F, Gupta A, Bhattarai S, Jaisi S, et al. Current research on zinc oxide nanoparticles: synthesis, characterization, and biomedical applications. *Nanomaterials*. 2022;12(17):3066.
23. Hejazy M, Koochi MK. Effect of subacute exposure of nano Zinc particles on oxidative stress parameters in rats. 2017.
24. Rafieirad M, Valipour-Chahardah-Charic S. Evaluation of the simultaneous effect of zinc oxide nanoparticles and vitamin C on oxidative stress in rat cerebellum. *Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences*. 2018;22(3):274-82.
25. Rahman HS, Othman HH, Abdullah R, Edin HYAS, AL- Haj NA. Beneficial and toxicological aspects of zinc oxide nanoparticles in animals. *Veterinary Medicine and Science*. 2022;8(4):1769-79.
26. Abbasalipourkabir R, Moradi H, Zarei S, Asadi S, Salehzadeh A, Ghafourikhosroshahi A, et al. Toxicity of zinc oxide nanoparticles on adult male Wistar rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2015;84:154-60.
27. Chimienti F, Aouffen M, Favier A, Seve M. Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate. *Current drug targets*. 2003;4(4):323-38.
28. Clegg MS, Hanna LA, Niles BJ, Momma TY, Keen CL. Zinc deficiency-induced cell death. *IUBMB life*. 2005;57(10):661-9.
29. Afifi M, Almaghrabi OA, Kadasa NM. Ameliorative Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Antioxidants and Sperm Characteristics in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Testes. *BioMed research international*. 2015;2015:153573.
30. Attia H, Nounou H, Shalaby M. Zinc Oxide Nanoparticles Induced Oxidative DNA Damage, Inflammation and Apoptosis in Rat's Brain after Oral Exposure. *Toxics*. 2018;6(2).
31. Ismail M, Al-Naqeep G, Chan KW. Nigella sativa thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010;48(5):664-72.