

The Effect of Thymoquinone on Liver Function and Inflammatory Gene Expression in an Animal Model of Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease

F. Koohpeyma (MD)¹, M. R. Koohpeyma (MD)², M. Kaviani (MD)³,
N. Montazeri-Najafabady (PhD)^{*1}, S. Dastghaib (PhD)¹, M. Shams (MD)¹

1.Endocrinology and Metabolism Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, I.R.Iran.

2.Student Research Committee, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, I.R.Iran.

3.Student Research Committee, Faculty of Nursing and Midwifery, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, I.R.Iran.

*Corresponding Author: N. Montazeri-Najafabady (PhD)

Address: Endocrinology and Metabolism Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, I.R.Iran.

Tel: +98 (71) 32262745. E-mail: montazerin898@gmail.com

Article Type ABSTRACT

Research Paper

Background and Objective: Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD) is now widely recognized as the hepatic presentation of the metabolic syndrome. Owing to the well-established anti-inflammatory and antioxidant properties of thymoquinone, the current study was conducted to assess the effect of thymoquinone on serum liver enzyme activities, lipid profile parameters, as well as the transcriptional expression of key genes involved in inflammatory and antioxidant signaling pathways, using an animal model of MAFLD.

Methods: In this interventional-experimental animal study, 18 rats were randomly divided into 3 groups of 6: healthy control, experimental 1, and experimental 2. With the exception of the healthy control group, all animals were subjected to a high-fat diet over an eight-week period. Experimental group 2 received oral administration of thymoquinone at a dose of 10 mg/kg body weight for 35 days, while experimental group 1 received no therapeutic intervention. At the end of the experiment, tissue and serum samples were collected for colorimetric biochemical analyses (ALT, AST, cholesterol, triglyceride, LDL, HDL), RT-PCR measurement of NRF2, VCAM, ICAM, and NFκB gene expression, and histological examination.

Findings: The results of study demonstrated that thymoquinone treatment significantly decreased serum levels of ALT (94.5 ± 10.85) and AST (202.16 ± 32.12) compared to the MAFLD group ($p < 0.001$). Thymoquinone also reduced cholesterol (257 ± 50.37 , $p < 0.003$), triglycerides (90.16 ± 12.73 , $p < 0.007$), and LDL (51.26 ± 15.19 , $p < 0.001$), and increased HDL (48.83 ± 6.5 , $p < 0.001$). Gene expression analysis revealed significant downregulation of VCAM (1.02 ± 0.49 , $p < 0.001$), ICAM (0.89 ± 0.16 , $p < 0.001$), and NFκB (1.44 ± 0.44 , $p < 0.003$), and significant upregulation of NRF2 (0.99 ± 0.22 , $p < 0.001$) following thymoquinone treatment compared to the MAFLD group. Histological assessments showed considerable improvement in tissue damage.

Conclusion: Based on the results of this study, thymoquinone can exert protective effects in MAFLD through the amelioration of lipid profile and hepatic enzyme levels.

Keywords: Thymoquinone, Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease (MAFLD), Inflammatory Proteins, Cell Adhesion Molecules, Oxidative Stress, Gene Expression, Lipid Profile.

Received:

Oct 15th 2024

Revised:

Dec 7th 2024

Accepted:

Feb 3rd 2025

Cite this article: Koohpeyma F, Koohpeyma MR, Kaviani M, Montazeri-Najafabady N, Dastghaib S, Shams M. The Effect of Thymoquinone on Liver Function and Inflammatory Gene Expression in an Animal Model of Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2026; 28: e23.

تأثیر تیموکینون بر عملکرد کبد و بیان ژن‌های التهابی در مدل حیوانی بیماری کبد چرب متابولیک

فرهاد کوه پیمایا (MD)^۱، محمد رضا کوه پیمایا (MD)^۲، محبوبه کاویانی (MD)^۳،
نیما منتظری نجف آبادی (PhD)^{۱*}، ساناز دستغیب (PhD)^۱، مصباح شمس (MD)^۱

۱. مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۲. کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۳. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

نوع مقاله	چکیده
مقاله پژوهشی	سابقه و هدف: بیماری کبد چرب مرتبط با اختلال متابولیک (MAFLD) امروزه به عنوان تظاهرات کبدی سندرم متابولیک در نظر گرفته می‌شود. از آنجا که تیموکینون دارای خواص ضد التهابی و آنتی اکسیدانی می‌باشد، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات تیموکینون بر سطوح آنزیم‌های کبدی، پروفایل لیپیدی و بیان ژن‌های مسیرهای التهابی و آنتی اکسیدانی در مدل حیوانی MAFLD انجام شد. مواد و روش‌ها: در این مطالعه مداخله‌ای-تجربی حیوانی تعداد ۱۸ سر موش به صورت تصادفی به ۳ گروه ۶ تایی (کنترل، تجربی ۱ و تجربی ۲) تقسیم شدند. همگی به جز گروه کنترل سالم طی مدت ۸ هفته تحت رژیم پرچرب قرار گرفتند. گروه تجربی ۲ تحت درمان خوراکی با تیموکینون (۱۰ mg/kg) به مدت ۳۵ روز قرار گرفتند. در گروه تجربی ۱ هیچ گونه درمانی انجام نشد. در انتهای آزمایش نمونه‌های بافتی و سرمی موش‌ها برای انجام آنالیزهای بیوشیمیایی (آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST)، کلسترول، تری‌گلیسرید، LDL و HDL) با روش کالریمتری، سنجش میزان بیان ژن‌های NFκB، ICAM، VCAM، NRF2 و RT-PCR و مطالعات بافت شناسی جمع آوری شد. یافته‌ها: نتایج نشان داد درمان با تیموکینون سطح آنزیم‌های ALT (۱۰/۸۵±۹۴/۵) و AST (۳۲/۱۲±۲۰۲/۱۶) را به طور قابل ملاحظه‌ای (p<۰/۰۰۱) در مقایسه با گروه MAFLD کاهش داد. تیموکینون موجب کاهش سطح کلسترول (۵۰/۳۷±۲۵۷) (p<۰/۰۰۳)، تری گلیسرید (۹۰/۱۶±۱۲/۷۳) (p<۰/۰۰۷) و LDL (۱۵/۱۹±۵۱/۲۶) (p<۰/۰۰۱) و افزایش سطح HDL (۶/۵±۴۸/۸۳) (p<۰/۰۰۱) شد. کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های VCAM (۰/۴۹±۱/۰۲) (p<۰/۰۰۱)، ICAM (۰/۱۶±۰/۸۹) (p<۰/۰۰۱) و NFκB (۱/۴۴±۰/۴۴) (p<۰/۰۰۳) و افزایش معنی‌دار بیان ژن NRF2 (۰/۲۲±۰/۹۹) (p<۰/۰۰۱) بعد از درمان با تیموکینون در مقایسه با گروه MAFLD مشاهده شد. در بررسی‌های هیستولوژیکی، آسیب‌های بافتی به میزان قابل توجهی بهبود یافته بود. نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه، تیموکینون می‌تواند با بهبود پروفایل لیپیدی و آنزیم‌های کبدی نقش محافظتی در بیماری کبد چرب متابولیک ایجاد کند. واژه‌های کلیدی: تیموکینون، بیماری کبد چرب متابولیک، پروتئین‌های التهابی، پروتئین‌های چسبندگی سلولی، استرس اکسیداتیو، بیان ژن، پروفایل لیپیدی.

استناد: فرهاد کوه پیمایا، محمد رضا کوه پیمایا، محبوبه کاویانی، نیما منتظری نجف آبادی، ساناز دستغیب، مصباح شمس. تأثیر تیموکینون بر عملکرد کبد و بیان ژن‌های التهابی در مدل حیوانی بیماری کبد چرب متابولیک. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل. ۱۴۰۵؛ ۲۸: ۵۲۳.

مقدمه

بیماری کبد چرب مرتبط با اختلال متابولیک (Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease= MAFLD) در سال ۲۰۲۰ برای اشاره به بیماری کبد چرب مرتبط با اختلال در تنظیم متابولیک سیستمیک پیشنهاد شد. از زمان معرفی این اصطلاح، زمینه‌های کلیدی وجود داشته است که در آن‌ها برتری MAFLD نسبت به اصطلاحات سنتی (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)، از جمله برای خطر مرگ و میر کبدی و خارج کبدی، ارتباط بیماری‌ها و برای شناسایی افراد در معرض خطر نشان داده شده است (۱). MAFLD امروزه به عنوان تظاهرات کبدی سندرم متابولیک در نظر گرفته می‌شود. به موازات همه گیری دیابت و چاقی، شیوع آن در سراسر جهان در حال افزایش است (۲).

طیف MAFLD از استئاتوز ساده که با تجمع لیپیدها در بیش از ۵٪ سلول‌های کبدی مشخص می‌شود، تا فنوتیپ تهاجمی‌تر، استئاتوهپاتیت غیرالکلی (Non-Alcoholic Steatohepatitis= NASH)، که از نظر بافت‌شناسی با وجود استئاتوز، آسیب سلول‌های کبدی (بالون شدن) و التهاب مشخص می‌شود، متغیر است (۳).

تا به امروز هیچ داروی تایید شده‌ای برای NASH وجود ندارد، بنابراین درمان فعلی شامل کاهش وزن بدن از طریق مداخلات سبک زندگی است. توسعه داروی جدید بر ترمیم اختلالات متابولیک و توقف مسیرهای التهابی و فیبروزیک تمرکز دارد (۴). در ۱۰ سال گذشته، بیش از ۲۰ مولکول برای درمان NASH آزمایش شده است. اکثر داروها پس از آزمایش‌های بالینی ناموفق دور ریخته شدند، برخی دیگر هنوز در مراحل اولیه توسعه بالینی هستند (مرحله ۱ و ۲ کارآزمایی بالینی) و تعداد کمی از آن‌ها به کارآزمایی‌های فاز ۳ رسیده‌اند. تاکنون، پیشرفت‌های دارویی برای این بیماری شامل داروهای ضد دیابت، آگونیست‌های FXR، آگونیست‌های Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) و آگونیست‌های گیرنده هورمون تیروئید هستند (۲).

سیاهدانه (*Nigella sativa*)، متعلق به خانواده Ranunculaceae به عنوان سیاه دانه یا زیره شناخته می‌شود (۵). تیموکینون (۲-ایزوپروپیل-۵-متیل بنزو-۱،۴-کینون)، جزء شیمیایی فعال سیاه دانه، دارای مجموعه وسیعی از اثرات بیولوژیکی است. تعداد فزاینده‌ای از فعالیت‌های دارویی تیموکینون از جمله خواص آنتی اکسیدانی، ضد توموری، ضد دیابتی، ضد التهابی و همچنین اثرات کاهش دهنده چربی مورد بررسی قرار گرفته است (۶). اخیراً، اثرات محافظتی تیموکینون بر آسیب‌های کبدی به صورت تجربی نشان داده شده است. این ترکیب استئاتوز کبدی را بهبود می‌بخشد، از فیروز کبدی جلوگیری می‌کند و به عنوان یک مهار کننده شروع NAFLD در موش‌های مبتلا به این بیماری استفاده می‌شود (۷). علاوه بر این، مقدار زیادی از داده‌ها نشان می‌دهد که تیموکینون دارای اثرات نامطلوب بسیار کم و درجه سمیت پایینی است (۶).

مطالعات مختلفی جهت بررسی اثر تیموکینون روی انواع اختلالات کبدی انجام شده است. Asgharzadeh و همکاران نشان دادند که درمان با تیموکینون فیروز کبدی ناشی از التهاب را احتمالاً از طریق تأثیر بر وضعیت استرس اکسیداتیو بازمی‌کند (۷). نشان داده شده است که تیموکینون آسیب کبدی را در مدل‌های مختلف مانند بیماری‌های کبدی کلستاتیک (۸)، سمیت کبدی تتراکلرید کرین (۹) و استئاتوهپاتیت غیر الکلی (NAFLD) از طریق بازگرداندن وضعیت اکسیدان، تعدیل پاسخ التهابی و افزایش فعالیت آنزیم‌های کبدی (۱۰) بهبود می‌بخشد. تیموکینون دارای خاصیت محافظت کبدی امیدوارکننده‌ای است، همانطور که با پتانسیل آن برای سرکوب موثر فیروز کبدی ناشی از تیواستامید در موش‌ها با مهار استرس اکسیداتیو و التهاب از طریق سیگنال دهی TGF- β /Smad نشان داده می‌شود (۱۱). مطالعه دیگری نشان داد که روغن خام دانه سیاهدانه می‌تواند به طور بالقوه به عنوان مکمل غذایی برای پیشگیری از التهاب کبد چرب استفاده شود (۱۲). همچنین Yildiz و همکاران نشان دادند که درمان با سیاهدانه از کبد موش در برابر آسیب ایسکمی - خونرسانی مجدد کبدی محافظت می‌کند (۱۳). Sayed-Ahmed و همکاران بیان کردند، تیموکینون تأثیر دی اتیل نیتروزامین را در القای سرطان کبد را از طریق سیگنال دهی آنتی اکسیدانی کاهش می‌دهد (۱۴). تیموکینون از طریق سرکوب استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز، بیماری کبد چرب غیرالکلی را در موش‌ها کاهش می‌دهد (۱۵). علاوه بر این تیموکینون بیماری کبد چرب غیرالکلی مرتبط با کم کاری تیروئید تجربی را معکوس می‌کند (۱۶).

بر اساس تحقیقات ما، تا کنون هیچ آزمایشی برای بررسی تأثیر تیموکینون روی MAFLD انجام نشده است. شواهد تحقیقاتی اخیر نیز به شدت به استفاده از داروهای طبیعی برای درمان شرایط پاتولوژیک در مقایسه با داروهای مصنوعی حمایت می‌کند. مزیت افزوده داروهای گیاهی سهولت دسترسی، تجویز، ارزان و ایمن بودن آن‌ها از نظر عوارض جانبی است. با توجه به خواص ضد التهابی و ضد اکسیدانی تیموکینون در انواع مختلف بیماری‌ها و همین طور اختلالات کبدی در مطالعات گذشته و همینطور عدم انجام مطالعه‌ای در گذشته روی تأثیر تیموکینون در MAFLD، این مطالعه با هدف ارزیابی تأثیر تیموکینون بر پروفایل لیپیدی (کلسترول، تری گلیسرید، LDL و HDL)، آنزیم‌های عملکرد کبدی (AST، ALT)، بیان ژن‌های مسیرهای التهابی و آنتی اکسیدانی (Nf κ B و ICAM، VCAM، NRF2) و همچنین بافت‌شناسی کبد انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مداخله‌ای-تجربی حیوانی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز با کد IR.SUMS.AEC.1402.066 و راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی NIH انجام شده است. حیوانات مورد آزمایش در این تحقیق شامل ۱۸ سر موش سوری نر با نژاد C57BL/6 با میانگین وزن ۲۵ گرم و سن تقریبی ۱۲ هفته بودند، که به طور کاملاً تصادفی انتخاب و قبل از شروع آزمایش به مدت ۲ هفته جهت سازگاری در شرایط استاندارد نگهداری شدند. حجم نمونه بر اساس روش Resource Equation با احتساب ۲۰٪ ریزش انتخاب گردید. اتاق حیوانات با دمای تقریباً بین ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی هوا بین ۴۰٪ تا ۵۵٪ برای آن‌ها فراهم شد. موش‌ها در قفس‌هایی از جنس پلی‌کربنات با سقف مشبک از جنس استیل نگهداری شدند. در این مطالعه موش‌ها به صورت تصادفی به ۳ گروه ۶ تایی تقسیم شد. سپس گروه بندی به شرح ذیل صورت گرفت:

گروه کنترل: در این گروه هیچ تیماری برای حیوانات انجام نگرفت و حیوانات فقط از آب و غذای معمولی استفاده کردند.

گروه تجربی ۱: این گروه رژیم غذایی پرچرب را به مدت ۸ هفته دریافت کردند. رژیم غذایی پرچرب حاوی ۲۰٪ کربوهیدرات، ۲۰٪ پروتئین و ۶۰٪ چربی بود.

گروه تجربی ۲: این گروه نیز رژیم غذایی پرچرب را به مدت ۸ هفته دریافت کردند. سپس به مدت ۳۵ روز تیموکینون ساخت شرکت سیگما آلدريج، آمریکا با (کت نامبر ۲۷۴۶۶۶) ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم محلول در ۱ سی سی نرمال سالین را به صورت گاوژ دریافت کردند. پس از پایان دوره تیمار، حیوانات با مخلوط کتامین ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (شرکت آلفاسان- هلند) و زایلایین ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (شرکت آلفاسان- هلند) بیهوش و از آن‌ها خونگیری و نمونه خون آن‌ها درون لوله‌های سانتریفیوژ استریل جمع‌آوری و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد تا منعقد شود، سپس ۱۵ دقیقه در سرعت ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ و سرم آن‌ها جهت سنجش پارامترهای بیوشیمیایی جداسازی شد. لازم به ذکر است که نحوه قربانی کردن موش‌ها به وسیله قرار دادن حیوانات در محفظه CO₂ دار یا با توجه به دیگر دستورالعمل‌های مربوطه انجام گرفت.

روش ایجاد مدل کبد چرب: برای ایجاد کبد چرب غیر الکلی، رژیم غذایی پرچرب به مدت ۸ هفته به کلیه موش‌ها (غیر از گروه کنترل سالم) داده شد. این رژیم حاوی ۵/۲ کالری بر گرم انرژی می‌باشد و از نظر محتوای درشت مغذی‌ها حاوی ۲۰٪ پروتئین، ۲۰٪ کربوهیدرات و ۶۰٪ چربی می‌باشد (۱۷). جزییات رژیم غذایی در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. جزییات فرمول رژیم غذایی

توضیحات کلاس	مواد تشکیل دهنده	گرم
پروتئین	Casein, Lactic, 30 Mesh	۲۰۰
پروتئین	Cystine, L	۳
کربوهیدرات	Lodex 10	۱۲۵
کربوهیدرات	Sucrose, Fine Granulated	۷۲/۸۰
فیبر	Solka Floc, FCC200	۵۰
چربی	Lard	۲۴۵
چربی	Soybean Oil, USP	۲۵
مواد معدنی	S10026B	۵۰
ویتامین	Choline Bitartrate	۲
ویتامین	V10001C	۱
رنگ	Dye, Blue FD&C #1, Alum. Lake 35-42%	۰/۰۵
مجموع		۷۷۳/۸۵

روش سنجش پارامترهای بیوشیمیایی: اندازه گیری میزان غلظت پارامترهای بیوشیمیایی نظیر آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارات آمینو ترانسفراز، کلسترول، تری گلیسرید، LDL و HDL با استفاده از روش کالریمتری و دستگاه اسپکتروفوتومتری vis (مدل S2150 ساخت شرکت UNICO آمریکا) انجام گرفت.

بررسی‌های مولکولی و سنجش میزان بیان ژن‌های ICAM، VCAM، NRF2 و NFkB: قسمتی از کبد آئورت و قلب به منظور بررسی‌های مولکولی و سنجش میزان بیان ژن‌های ICAM، VCAM، NRF2 و NFkB با استفاده از روش RT-PCR در نیتروژن مایع قرار گرفت. RNA کل از نمونه‌های کبد موش‌ها با استفاده از معرف TRIZol (Invitrogen) به دنبال دستورالعمل‌های سازنده جدا شد. سنتز cDNA با استفاده از یک ماکروگرم RNA بر اساس دستورالعمل‌های سازنده (Prime Script™ RT reagent Kit, Takara) انجام شد.

بازده و کیفیت RNA ها با استفاده از نانودراپ ۱۰۰۰ (NanoDrop Technologies, Montchanin, DE) بررسی شد. بیان mRNA با استفاده از رونویسی معکوس (RT-PCR) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه Applied Biosystems (SYBR Premix EX Taq™ II,) (Takara, Cat. #R820L) تعیین شد.

StepOnePlus™ Real-Time PCR System (شرکت ترموفیشر- آمریکا) انجام شد. مجموعه‌های پرایمر برای هر ژن در جدول ۲ فهرست شده است. تفاوت‌های نسبی در بیان بین گروه‌ها با استفاده از مقادیر Ct بیان شد. مقادیر Ct ژن‌ها ابتدا با β -اکتین و گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) همان نمونه نرمال شد. بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام گرفت.

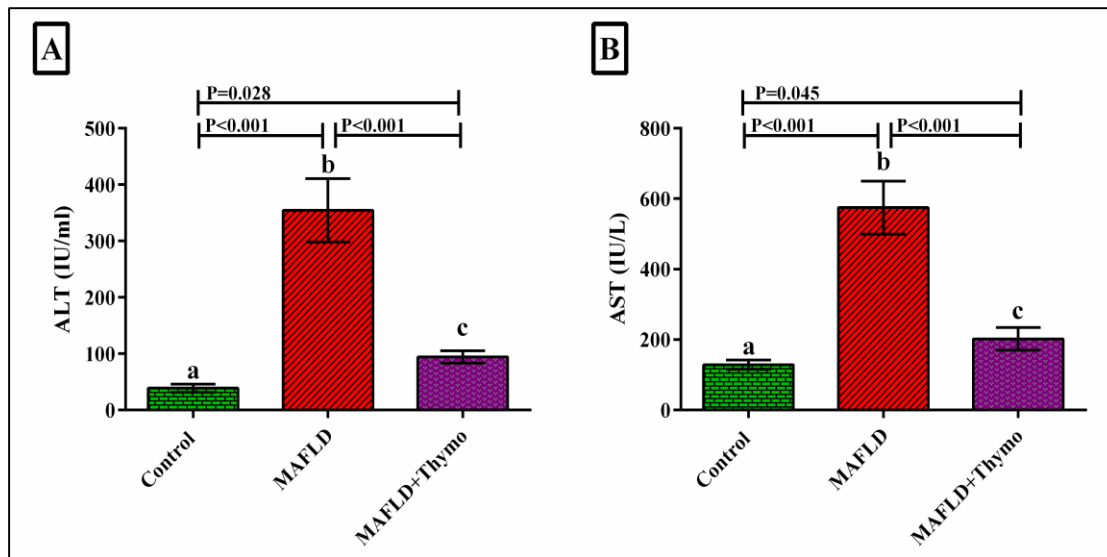
جدول ۲. فهرست پرایمرهای الیگونوکلوئیدی مورد استفاده برای RT-PCR	
ژن	توالی‌ها (5'≥3')
NFkB: Sense primer	TAGATGACCATGAGTCGCTTGC
NFkB: Anti-sense primer	GCCAAACTTGCTCCATGTCC
NRF-2: Sense primer	TGCCAAAGAAGGACACGACA
NRF-2: Anti-sense primer	GCAGGCTATTGCTCATCACAG
ICAM-1: Sense primer	CAATTTCTCATGCCGCACAG
ICAM-1: Anti-sense primer	AGCTGGAAGATCGAAAGTCCG
VCAM-1: Sense primer	TGAACCCAAACAGAGGCAGAGT
VCAM-1: Anti-sense primer	GGTATCCCATCACTTGAGCAGG
GAPDH: Sense primer	AAAGAGATGCTGAACGGGCA
GAPDH: Anti-sense primer	ACAAGGGAACTTGTCCACGA

مطالعات بافت شناسی: پس از خون گیری، حیوانات، مورد کالبد شکافی قرار گرفتند، سپس کبد، قلب و آئورت آن‌ها جدا و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی، درون محلول بافر فرمالین ۱۰٪ به منظور انجام مطالعات پاتولوژی قرار گرفت. رنگ آمیزی نمونه‌های بافتی با هماتوکسیلین و اتوژین انجام شد و برش‌های بافتی در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند.

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۳ (SPSS Inc., Chicago, USA) استفاده شد. برای بررسی نرمال بودن داده‌ها ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف دیتاها مورد آزمایش قرار گرفت. با توجه به این که داده‌ها دارای توزیع نرمال و همگنی واریانس بودند، بنابراین آزمون‌های پارامتریک انجام شد. برای مقایسه میانگین پارامترهای مورد بررسی در گروه‌ها، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-way-ANOVA) و تست تعقیبی توکی استفاده شد. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد و $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۹.۵.۰ تهیه شد.

یافته ها

تأثیر تیموکینون روی آنزیم‌های کبدی در مدل MAFLD: القای مدل MAFLD به طور معنی‌داری ($p < 0.001$) سطح آنزیم‌های کبدی (ALT و AST) را نسبت به گروه کنترل افزایش داد. در مقابل درمان با تیموکینون سطح این آنزیم‌ها را به طور قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با گروه MAFLD کاهش داد ($p < 0.001$). سطح آنزیم‌های ALT و AST در گروه تیموکینون در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری پایین‌تر بود. این معنی‌داری برای ALT، 0.028 و برای AST، 0.045 بود (نمودار ۱).



نمودار ۱. مقایسه تأثیر تیموکینون بر روی آنزیم‌های کبدی در مدل MAFLD

تأثیر تیموکینون روی پارامترهای بیوشیمیایی در مدل MAFLD: تأثیر تیموکینون روی کلسترول، تری گلیسرید، HDL و LDL در مدل MAFLD در جدول ۳ نشان داده شده است. MAFLD به طور معنی‌داری ($p < 0.001$) باعث کاهش سطح HDL و همین‌طور افزایش سطح کلسترول ($p < 0.001$)، تری گلیسرید ($p < 0.001$) و LDL ($p < 0.001$) در مقایسه با گروه کنترل شده است. استفاده از تیموکینون در موش‌های با کبد چرب باعث تأثیرات مثبتی گردیده است. تیموکینون موجب کاهش سطح کلسترول ($p < 0.003$)، تری گلیسرید ($p < 0.007$) و LDL ($p < 0.001$) شده است. علاوه بر این تیموکینون باعث افزایش سطح HDL ($p < 0.001$) نیز شده است. با این وجود سطح کلسترول ($p < 0.001$)، تری گلیسرید ($p < 0.008$) و LDL ($p < 0.002$) در گروه تیموکینون هنوز نسبت به گروه کنترل سالم اختلاف معنی‌داری داشت.

جدول ۳. تأثیر تیموکینون روی پارامترهای بیوشیمیایی در مدل MAFLD

پروفایل لیپیدی				گروه‌ها
LDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)	Cholesterol (mg/dl)	TG (mg/dl)	
Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	
۹۰/۲۵±۱۴ ^a	۵۰/۵۰±۳/۷۸ ^a	۱۰۴/۳۳±۶/۰۲ ^a	۶۶/۱۷±۱۳/۲۴ ^a	کنترل
۱۳۴/۶۷±۲۵/۸۷ ^b	۳۴/۰۰±۱/۲۶ ^b	۳۶۱/۷۱±۵۹/۸۸ ^b	۱۱۴/۳۳±۸/۶۶ ^b	MAFLD
۵۱/۲۷±۱۵/۲۰ ^c	۴۸/۸۳±۶/۵۵ ^a	۲۵۷/۰۰±۵۰/۳۷ ^c	۹۰/۱۷±۱۲/۲۳ ^c	MAFLD+Thymo

داده‌ها به صورت Mean±SD نشان داده شده است. ^{a, b, c} وجود حداقل یک حرف مشابه بر روی ستون‌ها نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار، در بین گروه‌های مورد بررسی می‌باشد، اما اگر حرف مشابهی بر روی ستون‌ها مشاهده نشد، وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ را نشان می‌دهد.

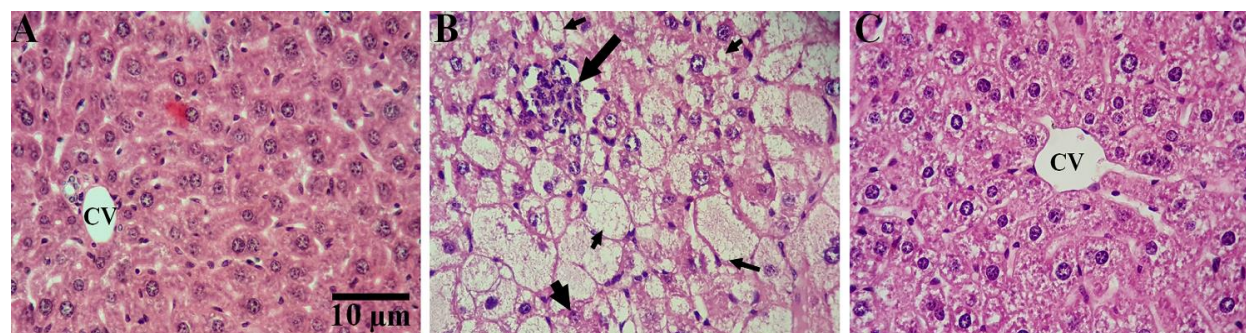
تاثیر تیموکینون روی میزان بیان ژن های NFκB، VCAM، ICAM، و NFκB در مدل MAFLD: در این مطالعه تاثیر تیموکینون روی میزان بیان ژن های NFκB، VCAM، ICAM، و NFκB در کبد چرب در جدول ۴ نشان داده شده است. میزان بیان ژن های VCAM، ICAM، و NFκB بعد از القای مدل MAFLD در مقایسه با گروه کنترل افزایش و میزان بیان ژن NFκB به طور معنی داری کاهش داشت. این تغییرات معنی دار برای VCAM برابر با $p < 0.001$ ، برای ICAM برابر با $p < 0.001$ ، برای NFκB برابر با $p = 0.002$ و برای NFκB برابر با $p < 0.001$ بود. میزان بیان ژن های VCAM، ICAM، و NFκB بعد از درمان با تیموکینون در مقایسه با گروه MAFLD کاهش و میزان بیان ژن NFκB به طور معنی داری افزایش داشت. این تغییرات معنی دار برای VCAM برابر با $p < 0.001$ ، برای ICAM برابر با $p < 0.001$ ، برای NFκB برابر با $p = 0.003$ و برای NFκB برابر با $p < 0.001$ بود. با وجود تاثیرات مثبت تیموکینون روی بیان ژن های فوق اما همچنان اختلاف معنی داری بین این گروه و گروه کنترل وجود ندارد.

جدول ۴. تاثیر تیموکینون روی میزان بیان ژن های NFκB، VCAM، ICAM، و NFκB در مدل MAFLD

گروه ها	NRF-2 Mean±SD	NFκB Mean±SD	ICAM-1 Mean±SD	VCAM-1 Mean±SD
Control	۰/۹۸±۰/۰۲۷ ^a	۰/۹۹۷±۰/۰۲۴ ^a	۱/۰۶±۰/۰۴۶ ^a	۱/۰۱±۰/۰۰۴ ^a
MAFLD	۰/۳۰±۰/۰۲۳ ^b	۲/۴۹±۰/۰۹۹	۱/۸۳±۰/۰۴۱ ^b	۲/۶۱±۰/۰۷۸ ^b
MAFLD+Tymo	۰/۹۹±۰/۰۲۲ ^a	۱/۰۴۶±۰/۰۴۵ ^a	۰/۸۹±۰/۰۱۸ ^a	۱/۰۳±۰/۰۴۹ ^a

داده ها به صورت Mean±SD نشان داده شده است. ^{a, b, c} وجود حداقل یک حرف مشابه بر روی ستون ها نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار، در بین گروه های مورد بررسی می باشد، اما اگر حرف مشابهی بر روی ستون ها مشاهده نشد، وجود اختلاف معنی دار در سطح $p < 0.05$ را نشان می دهد.

اثرات تیموکینون بر روی تغییرات بافتی کبد: در گروه دریافت کننده رژیم غذایی پرچرب حضور واکوئل های چربی و هیپرتروفی هپاتوسیت ها، بیانگر القاء صحیح کبد چرب غیر الکلی می باشد. در گروه دریافت کننده تیموکینون تظاهرات کبدی تا حد زیادی بهبود یافت. به طوری که، تجمع واکوئل های چربی در بافت کبد در گروه تحت درمان کاهش قابل توجهی نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱. اثرات تیموکینون بر روی تغییرات بافتی کبد

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، پس از چرب کردن کبد، نتایج به دست آمده حکایت از افزایش معنی دار سطح کلسترول، تری گلیسیرید و LDL و نیز کاهش معنی دار سطح HDL-C در گروه MAFLD نسبت به گروه کنترل سالم دارد. بررسی های انجام شده در مورد تاثیر تیموکینون پس از تیمار به مدت ۳۵ روز با غلظت (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) روی پروفایل لیپیدی در رت در این تحقیق نشان داد که این ترکیب می تواند باعث کاهش سطح کلسترول، تری گلیسیرید و LDL و افزایش سطح HDL شود. این نتایج با نتایج به دست آمده توسط Kolbus و همکاران مطابقت دارد (۱۸). نتایج این تحقیق با گزارش های قبلی که اثرات مفید تیموکینون را بر اختلال چربی نشان می داد، مطابقت داشت (۱۹). در مطالعه دیگری که توسط Pei و همکاران انجام شد نشان داد که تیموکینون با کاهش سطح کلسترول، تری گلیسیرید و LDL می تواند اثر محافظتی روی قلب و عروق داشته باشد (۲۰).

نتایج این تحقیق نشان داد که ALT و AST در گروه MAFLD نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت. تجویز تیموکینون سطح آنزیم‌های ALT و AST را در گروه درمانی در مقایسه با گروه MAFLD به طور معنی‌داری کاهش داد. این نتایج توسط Ahmad و همکاران پشتیبانی می‌شود که بیان کردند تیموکینون در دوز ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۳۰ روز با تغییرات سودمند در فعالیت آنزیم‌های کبدی مرتبط است که اثرات بالقوه ضد هیپرگلیسمی آن را توضیح می‌دهد (۲۱). به طور مشابه، مطالعات دیگر نشان دادند که استفاده از تیموکینون اثرات محافظتی و درمانی کبدی را در برابر مدل‌های مختلف آسیب کبدی ایجاد می‌کند (۲۳ و ۲۲). در مطالعه‌ای دیگر به این نتیجه رسیدند که تیموکینون به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی باعث کاهش القای سرطان کبد شده و این اثر را از طریق تثبیت غشای سلولی در نتیجه نشت کمتر آنزیم‌های کبدی (ALT, AST, ALP) به خون اعمال می‌کند (۲۴). در مطالعه مشابهی که در کشور ایران انجام شده است، Jafari Nia و همکاران نشان دادند که تیمار ۳۰ روزه با تیموکینون در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم باعث کاهش سطح تری‌گلیسرید، کلسترول تام، فسفولیپید، توتال بیلیروبین، گلوکز، انسولین، VLDL و LDL در مدل حیوانی کبد چرب شد (۲۵).

در این مطالعه بررسی‌های ملکولی نشان داد که غلظت ژن‌های مورد آزمایش در مدل کبد چرب تحت تأثیر درمان با تیموکینون قرار می‌گیرد. تیموکینون به طور معنی‌داری میزان بیان ژن NF- κ B را که بر اثر القای کبد چرب افزایش پیدا کرده بود را کاهش داد. یافته‌های Salah و همکاران نشان داد که ژن NF- κ B با افزایش غلظت تیموکینون کاهش می‌یابد (۲۶). اثر مهارى مستقیم درمان تیموکینون بر فعال سازی NF- κ B، که در موارد متعددی نیز دیده شده است، ممکن است مسئول کاهش واسطه‌های پیش التهابی پس از تجویز تیموکینون باشد (۲۷). علاوه بر این تجویز تیموکینون میزان بیان ژن‌های ICAM و VCAM را کاهش داد. مشابه این مطالعه، کاهش بیان VCAM-1 در سطح بیان mRNA و عملکرد پس از درمان تیموکینون در مطالعات قبلی گزارش شده است (۲۸). مطالعه دیگری نشان داد که پیش درمان تیموکینون باعث مهار تولید اینترلوکین ۶ و ۸ و بیان VCAM-1، ICAM-1 ناشی از TNF- α می‌شود (۲۹). VCAM-1 یک پروتئین سطحی است که باعث چسبیدن و خارج شدن مونوسیت‌ها به رگ‌های خونی می‌شود. تحقیقات نشان می‌دهد که مهار VCAM-1 در مدل NASH بیان VCAM-1، ماکروفاژهای نفوذی و فیبروز را کاهش می‌دهد (۳۰).

در مطالعه حاضر تیموکینون میزان بیان ژن NRF2 را نیز در بافت کبد افزایش داد. Elsherbiny و همکاران گزارش کرده‌اند که تیموکینون سطح بیان NRF2 را افزایش می‌دهد. NRF2 به عنوان یک فعال کننده رونویسی شناخته شده است که به عنوان یک نقش کلیدی در پاسخ سلولی به استرس اکسیداتیو و مسمومیت با فلزات سنگین با القای بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و متالوتئینین‌ها عمل می‌کند (۳۱). از نظر مکانیسمی تیموکینون بیان NRF2 را افزایش می‌دهد، که به نوبه خود SOD و GSH را تقویت می‌کند بنابراین تعادل اکسیداسیون و کاهش را حفظ می‌کند (۳۲). پیشنهاد می‌شود که اثرات محافظتی کبدی تیموکینون از طریق مهار تولید گونه‌های اکسیژن فعال و سیگنال‌دهی NF- κ B، تغییر سطح ایکوزانویدهای مختلف و کاهش رویدادهای فیبروزیک عمل می‌کند (۳۳).

در مطالعات هیستولوژیکی، هیچ گونه حالت غیرطبیعی در بافت کبد موش‌های گروه شاهد سالم مشاهده نشد، در حالی که در موش‌های گروه حلال، استئاتوز شدید بافت کبد به صورت تغییر چربی میکروویکولار و گاهی ماکروویکولار همراه با تورم هیپاتوسیت‌ها ایجاد شده است. بررسی‌های هیستولوژیکی مطالعه کنونی در گروه‌های تجربی پس از، ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تیمار ۸ هفته با تیموکینون نشان داد که از میزان آسیب سلول‌های کبدی به میزان قابل توجهی کاسته شده است. در تحقیقات قبلی نشان داده شده است که تیموکینون آسیب کبدی را در مدل‌های مختلف، مانند بیماری‌های کبدی کلاسیک (۸)، سمیت کبدی تتراکلرید کربن (۹) و استئاتوهپاتیت غیر الکلی (NAFLD) از طریق بازگرداندن وضعیت اکسیدان، تعدیل پاسخ التهابی و افزایش فعالیت آنزیم‌های کبدی بهبود می‌بخشد (۱۰).

در ارتباط با محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به تعداد کم نمونه‌ها، عدم بررسی فاکتورهای التهابی و لیپیدی دیگر، عدم بررسی تمام ژن‌های دخیل در فرایند ایجاد کبد چرب و همینطور عدم انجام کارآزمایی انسانی اشاره کرد. در نتیجه پیشنهاد می‌شود که کارآزمایی انسانی با تعداد و نوع فاکتورهای بیشتر و همچنین حجم نمونه بالا که می‌تواند نتایج دقیق‌تری در مورد تأثیر تیموکیمون در درمان MAFLD به ما بدهد، انجام شود.

نتایج این تحقیق نشان داد که تیموکینون در دوز مورد بررسی و بعد از گذشت ۳۵ روز از درمان، باعث کاهش سطح پروفایل لیپیدی، کاهش سطح ALT و AST، همینطور کاهش بیان ژن‌های مسیرهای اکسیداتیو و التهابی از جمله NRF2، VCAM، ICAM، NF κ B شده و در نهایت با بهبود خصوصیات بافتی کبد مانند کاهش تجمع واکوئل‌های چربی در بافت کبد و جلوگیری از هاپرتروفی هیپاتوسیت‌ها اثر محافظتی خود را روی کبد در مدل حیوانی MAFLD نشان داد.

این مطالعه به صورت واضح نشان داد که تیموکینون با کاهش سطح پروفایل لیپیدی، کاهش سطح آنزیم‌های عملکردی کبد، کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب ناشی از بیماری کبد چرب مرتبط با اختلال متابولیک از طریق افزایش بیان ژن NRF2 و کاهش بیان فاکتورالتهابی NF- κ B و همینطور معانیت از ایجاد آسیب به بافت کبد می‌تواند به صورت بالقوه نقش مهمی در درمان بیماری کبد چرب مرتبط با اختلال متابولیک ایفا کند. با توجه به یافته‌های این مطالعه

و عوارض جانبی ناچیز گیاهان دارویی می‌توان به کمک طب سنتی و با استفاده از خواص گیاهان دارویی از جمله سیاهدانه (*Nigella sativa*) به تولید داروهای جدیدی امید داشت که به وسیله آن به راحتی بتوان کبد چرب را درمان کرد. در حقیقت از تیموکینون می‌توان به عنوان یک گزینه مناسب برای درمان انواع مختلف کبد چرب در کارآزمایی‌های بالینی استفاده کرد. البته مطالعات بیشتری با جمعیت انسانی باید انجام شود تا نتایج این مطالعه مورد تایید قرار بگیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز بابت حمایت مالی از این تحقیق قدردانی می‌گردد.

References

1. Gofton C, Upendran Y, Zheng MH, George J. MAFLD: How is it different from NAFLD?. Clin Mol Hepatol. 2023;29(Suppl):S17-31.
2. Sangro P, de la Torre Aláez M, Sangro B, D'Avola D. Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD): an update of the recent advances in pharmacological treatment. J Physiol Biochem. 2023;79(4):869-79.
3. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. Hepatology. 2012;55(6):2005-23.
4. Romero-Gómez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. J Hepatol. 2017;67(4):829-46.
5. Hannan MA, Rahman MA, Sohag AAM, Uddin MJ, Dash R, Sikder MH, et al. Black Cumin (*Nigella sativa* L.): A Comprehensive Review on Phytochemistry, Health Benefits, Molecular Pharmacology, and Safety. Nutrients. 2021;13(6):1784.
6. Darakhshan S, Bidmeshki Pour A, Hosseinzadeh Colagar A, Sisakhtnezhad S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. Pharmacol Res. 2015;95-96:138-58.
7. Asgharzadeh F, Bargi R, Beheshti F, Hosseini M, Farzadnia M, Khazaei M. Thymoquinone restores liver fibrosis and improves oxidative stress status in a lipopolysaccharide-induced inflammation model in rats. Avicenna J Phytomed. 2017;7(6):502-10.
8. Oguz S, Kanter M, Erboğa M, Erenoglu C. Protective effects of thymoquinone against cholestatic oxidative stress and hepatic damage after biliary obstruction in rats. J Mol Histol. 2012;43(2):151-9.
9. Hassanein KM, Al-Emam A, Radad K. Prophylactic effects of thymoquinone against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in Sprague-Dawley rats. J Appl Pharm Sci. 2016;6(2):167-71.
10. Beheshti F, Hosseini M, Shafei MN, Soukhtanloo M, Ghasemi S, Vafaei F, et al. The effects of *Nigella sativa* extract on hypothyroidism-associated learning and memory impairment during neonatal and juvenile growth in rats. Nutr Neurosci. 2017;20(1):49-59.
11. Raghunandhakumar S, Ezhilarasan D, Shree Harini K. Thymoquinone protects thioacetamide-induced chronic liver injury by inhibiting TGF- β 1/Smad3 axis in rats. J Biochem Mol Toxicol. 2024;38(4):e23694.
12. Al-Okbi SY, Mohamed DA, Hamed TE, Edris AE. Potential protective effect of *Nigella sativa* crude oils towards fatty liver in rats. Eur J Lipid Sci Technol. 2013;115(7):774-82.
13. Yildiz F, Coban S, Terzi A, Ates M, Aksoy N, Cakir H, et al. *Nigella sativa* relieves the deleterious effects of ischemia reperfusion injury on liver. World J Gastroenterol. 2008;14(33):5204-9.
14. Sayed-Ahmed MM, Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Al-Yahya AA, Al-Shabanah OA, Hafez MM, et al. Thymoquinone attenuates diethylnitrosamine induction of hepatic carcinogenesis through antioxidant signaling. Oxid Med Cell Longev. 2010;3(4):254-61.
15. Awad AS, Abd Al Haleem EN, El-Bakly WM, Sherief MA. Thymoquinone alleviates nonalcoholic fatty liver disease in rats via suppression of oxidative stress, inflammation, apoptosis. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2016;389(4):381-91.
16. Ayuob NN, Abdel-Hamid AAHM, Helal GMM, Mubarak WA. Thymoquinone reverses nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) associated with experimental hypothyroidism. Rom J Morphol Embryol. 2019;60(2):479-86.

17. Cho J, Lee I, Kim D, Koh Y, Kong J, Lee S, et al. Effect of aerobic exercise training on non-alcoholic fatty liver disease induced by a high fat diet in C57BL/6 mice. *J Exerc Nutrition Biochem*. 2014;18(4):339-46.
18. Kolbus D, Ramos OH, Berg KE, Persson J, Wigren M, Björkbacka H, et al. CD8⁺ T cell activation predominate early immune responses to hypercholesterolemia in Apoe^{-/-} mice. *BMC Immunol*. 2010;11:58.
19. Asgary S, Sahebkar A, Goli-Malekabadi N. Ameliorative effects of *Nigella sativa* on dyslipidemia. *J Endocrinol Invest*. 2015;38(10):1039-46.
20. Pei ZW, Guo Y, Zhu HL, Dong M, Zhang Q, Wang F. Thymoquinone Protects against Hyperlipidemia-Induced Cardiac Damage in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient (LDL-R^{-/-}) Mice via Its Anti-inflammatory and Antipyroptotic Effects. *Biomed Res Int*. 2020;2020:4878704.
21. Ahmad S, Beg ZH. Elucidation of mechanisms of actions of thymoquinone-enriched methanolic and volatile oil extracts from *Nigella sativa* against cardiovascular risk parameters in experimental hyperlipidemia. *Lipids Health Dis*. 2013;12:86.
22. Rahmani AH, Almatroudi A, Babiker AY, Khan AA, Alsahli MA. Thymoquinone, an Active Constituent of Black Seed Attenuates CCl₄ Induced Liver Injury in Mice via Modulation of Antioxidant Enzymes, PTEN, P53 and VEGF Protein. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(3):311-7.
23. Galaly SR, Ahmed OM, Mahmoud AM. Thymoquinone and curcumin prevent gentamicin-induced liver injury by attenuating oxidative stress, inflammation and apoptosis. *J Physiol Pharmacol*. 2014;65(6):823-32.
24. Yki-Järvinen H. Nutritional Modulation of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance. *Nutrients*. 2015;7(11):9127-38.
25. Jafari Nia L, Haeri Rouhani A, Yaghmaei P. Effect of thymoquinone on improvement of lipid profile and liver enzymes in fatty liver-induced NMRI mice. *Iran J Med Aromat Plants*. 2018;34(2):193-205.
26. Salah A, Sleem R, Abd-Elaziz A, Khalil H. Regulation of NF-κB Expression by Thymoquinone; A Role in Regulating Pro-Inflammatory Cytokines and Programmed Cell Death in Hepatic Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2023;24(11):3739-48.
27. Zhang L, Bai Y, Yang Y. Thymoquinone chemosensitizes colon cancer cells through inhibition of NF-κB. *Oncol Lett*. 2016;12(4):2840-5.
28. Abbasnezhad A, Niazmand S, Mahmoudabady M, Rezaee SA, Soukhtanloo M, Mosallanejad R, et al. *Nigella sativa* L. seed regulated eNOS, VCAM-1 and LOX-1 genes expression and improved vasoreactivity in aorta of diabetic rat. *J Ethnopharmacol*. 2019;228:142-7.
29. Umar S, Hedaya O, Singh AK, Ahmed S. Thymoquinone inhibits TNF-α-induced inflammation and cell adhesion in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by ASK1 regulation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015;287(3):299-305.
30. Carr RM. VCAM-1: closing the gap between lipotoxicity and endothelial dysfunction in nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest*. 2021;131(6):e147556.
31. Elsherbiny NM, El-Sherbiny M. Thymoquinone attenuates Doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats: Role of Nrf2 and NOX4. *Chem Biol Interact*. 2014;223:102-8.
32. Sabir S, Saleem U, Akash MSH, Qasim M, Chauhdary Z. Thymoquinone Induces Nrf2 Mediated Adaptive Homeostasis: Implication for Mercuric Chloride-Induced Nephrotoxicity. *ACS Omega*. 2022;7(8):7370-9.
33. Bai T, Lian LH, Wu YL, Wan Y, Nan JX. Thymoquinone attenuates liver fibrosis via PI3K and TLR4 signaling pathways in activated hepatic stellate cells. *Int Immunopharmacol*. 2013;15(2):275-81.