

Effect of Sumac (*Rhus coriaria L.*) Aqueous Extract on Liver Enzymes and Anxious Behavior Caused by Lead Poisoning in Rat

Mahdieh Raeeszadeh¹,
Reza Heidari²,
Nadia Khademi²

¹ Department. of Basic Sciences, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

² Doctor of Veterinary Medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

(Received June 15, 2020 ; Accepted January 20, 2021)

Abstract

Background and purpose: Controlling the toxic effects of lead in biological systems is highly important. This study investigated the effect of sumac (*Rhus coriaria L.*) aqueous extract on liver enzymes in lead poisoning and behavioral changes in rats.

Materials and methods: This interventional study was performed in 7 groups of rats: control, drinking lead acetate at 500, 1000 and 1500 ppm, sumac aqueous extract 250 mg/kg and lead acetate in drinking water for 29 days. On the last day, after weighing, elevated plus-maze (EPM) test was performed. The serum was separated to measure Total Antioxidant Capacity (TAC), Alkaline Phosphatase (ALP), Alanine Aminotransferase (ALT), and Aspartate transaminase (AST). Malondialdehyde (MDA) concentrations in liver and brain tissues were also determined.

Results: The highest average weight at the end, was seen in the group that received 1500 ppm lead acetate. The highest concentrations of liver and brain MDA were observed also in this group (18.0 ± 6.766 and $15.43 \pm 0.432 \mu\text{mol} / \text{ml}$, respectively) which was higher compared to the control group, 500ppm lead group, and the extract group ($P < 0.01$). The greatest and lowest TAC were found in the control group ($333.00 \pm 22.204 \mu\text{mol}/\text{ml}$) and the 1500 ppm lead group ($96.96 \pm 6.669 \mu\text{mol}/\text{ml}$), respectively ($P < 0.01$). The ALT and AST concentrations were low in the control group and high in the 1500 ppm lead group. The minimum time passed in the open arm in the 1500 ppm lead group was $14.42\% \pm 8.247$ which was lower compared to the control group ($P < 0.01$).

Conclusion: In current study, sumac aqueous extract reduced the concentrations of liver enzymes in lead poisoning conditions. However, it had no significant effect on controlling lead induced anxiety.

Keywords: lead, sumac, liver, anxious behavior

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (196): 136-142 (Persian).

* **Corresponding Author: Mahdieh Raeeszadeh** - Department of Basic Sciences, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran (E-mail: mraes@iausdj.ac.ir)

تأثیر عصاره آبی سماق (*Rhus coriaria L.*) بر آنزیم های کبد و رفتارهای اضطرابی ناشی از مسمومیت با سرب در موش صحرایی

مهديه رئيس زاده¹

رضا حيدري²

ناديا خادمي²

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به اهمیت کنترل اثرات سمی سرب در سیستم‌های بیولوژیک، در این مطالعه به عصاره آبی سماق در آسیب وابسته به سرب در کبد و رفتار اضطرابی موش صحرایی پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مداخله‌ای در 7 گروه شامل کنترل، استات سرب آشامیدنی در دوز 500، 1000 و 1500 ppm، عصاره آبی سماق 250mg/kg به همراه استات سرب در آب آشامیدنی، به مدت 29 روز انجام شد. در روز آخر بعد از وزن گیری، تست رفتاری ماز بعلاوه ارتفاع گرفته شد. سپس سرم برای اندازه گیری TAC (ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام) و آنزیم ALP (آلکالین فسفاتاز)، ALT (آلانین آمینوترانسفراز)، AST (آسپارات ترانسفراز) جدا شد. غلظت MDA (مالون دی آلدئید) در بافت کبد و مغز نیز سنجش شد.

یافته‌ها: بیشترین متوسط وزن آخر دوره مربوط به گروه استات سرب 1500ppm بود. بیشترین غلظت MDA کبد و مغز در گروه سرب 1500ppm، $18/66 \pm 0/766$ و $15/43 \pm 0/432$ میکرومول بر میلی‌لیتر که با گروه کنترل و سرب 500 و عصاره معنی‌دار شد ($P < 0/01$). بیشترین مقدار TAC در گروه کنترل برابر با $333/00 \pm 22/204$ و کمترین در گروه سرب 1500ppm، $96/96 \pm 6/669$ میکرومول بر میلی‌لیتر در سطح $P < 0/01$ معنی‌دار شد. غلظت آنزیم‌های ALT، AST در گروه کنترل کمترین و در گروه سرب 1500ppm بیشترین مقدار شد. کمترین زمان حضور در بازوی باز گروه سرب 1500ppm برابر $14/42 \pm 8/247$ درصد و با کنترل معنی‌دار بود ($P < 0/01$).

استنتاج: عصاره آبی سماق توانست سبب کاهش غلظت آنزیم‌های کبدی در شرایط مسمومیت با سرب شود. در صورتی که تغییر معنی‌داری در کنترل اضطراب القا شده سرب نداشت.

واژه های کلیدی: سرب، سماق، کبد، رفتار اضطرابی

مقدمه

مطالعات اخیر نشان داده است استرس اکسیداتیو ناشی از سرب ممکن است به مکانیزم مولکولی در سطح سلولی آسیب برساند (2).

با القا گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، کاهش ظرفیت

سرب یکی از فلزات سنگین و به عنوان یک مشکل بهداشت عمومی در بسیاری از کشورها در سراسر جهان مطرح می‌باشد. سرب می‌تواند عوارض جانبی متعدد و وسیعی را در انسان و حیوانات به وجود آورد (1).

E-mail: mraes@iausdj.ac.ir

مؤلف مسئول: مهديه رئيس زاده - استندج: دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، گروه علوم پایه

1. گروه علوم پایه، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

2 دانش آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

تاریخ دریافت: 1399/3/26 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/4/1 تاریخ تصویب: 1399/11/1

خون گیری از قلب حیوانات و جداسازی سرم برای اندازه گیری غلظت آنتی اکسیدانی و آنزیم های کبدی شامل ALP (آلکالین فسفاتاز)، ALT (آلانین آمینوترانسفراز) و AST (آسپارات ترانسفراز) با استفاده از کیت پارس آمون و اندازه گیری TCA (ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سرم) با روش FRAP انجام شد. بعد از آسان کشتی حیوان بافت کبد و مغز تعدادی از آن ها برای اندازه گیری MDA (مالون دی آلدئید) جداسازی شد. برای بررسی اثرات اضطرابی تست ماز به علاوه ارتفاع گرفته شد (8).

روش عصاره گیری سماق

میوه سماق از بخش دینور در استان کرمانشاه جمع آوری و با شماره هر بار یوم 1523 مورد تایید قرار گرفت. بعد از آسیاب کردن با استفاده از حلال آب، عصاره گیری آن با دستگاه سوکسله انجام شد. به ازای هر 10 گرم پودر سماق، 150 میلی لیتر آب مقطر به عنوان حلال اضافه شد. عصاره گیری به مدت 12 ساعت تحت فشار کاهشی انجام گرفت. سپس با روتاری تحت خلاء عصاره تغلیظ و از هر 10 گرم، 2 گرم عصاره تغلیظ شده (چسبناک) به دست آمد. سپس با استفاده از آب مقطر عصاره رقیق شده و با دوز 250 میلی گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی گاواژ روزانه انجام گرفت (6).

روش اندازه گیری MDA

از نمونه کبد و مغز برای تعیین سنجش میزان MDA که محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدهاست، با روش Satoh استفاده شد (9).

روش اندازه گیری TAC

سنجش ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سبط Benzi و همکاران با نام روش FRAP استفاده شد، در این روش توانایی پلازما در احیای یون فریک اندازگی می شود، در PH اسیدی زمانی که کمپلکس FeIII-TPTZ به

آنتی اکسیدانی و افزایش سطوح پراکسیداسیون لیپید اثرات اکسیداتیو سرب در بدن اعمال می شود (3). بنابراین یکی از استراتژی های درمانی مهم در برابر اثرات اکسیدان قوی و چندگانه سرب، بالا بردن دفاع آنتی اکسیدانی بدن است (5،4).

سماق *Rhus coriaria L.* درختچه ای است که سابقه طولانی در طب سنتی دارد. میوه آن به دلیل داشتن ترکیبات فنلی نظیر تانن، فلاونوئیدها از جمله گالیک اسید و متیل گالات و آنتوسیانین ها، کوئرستین و میریستین می تواند به عنوان یک منبع غنی از آنتی اکسیدان ها عمل کند (6). مطالعات بسیاری بر روی انسان و حیوانات در خصوص خواص آنتی دیابتیک، کاهنده چربی خون، کنترل بیماری های قلبی و عروقی سماق انجام شده است (7) با توجه به کاربردهای وسیع سماق در طب سنتی و عدم انجام مطالعات کافی تجربی بر روی خواص منحصر به فرد آن، هدف از این مطالعه تعیین اثرات آنتی اکسیدانی عصاره آبی سماق در آسیب اکسیداتیو وابسته به دوز سرب در کبد و کلیه بود.

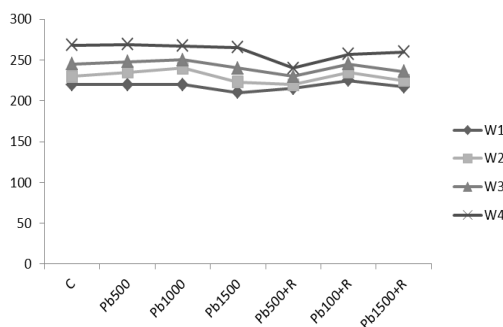
مواد و روش ها

مطالعه مداخله ای حاضر بر روی 42 سر موش صحرایی از جنس نر، نژاد Wistar (ویستار) با وزن 200 ± 20 گرم در حیوان خانه دانشکده دامپزشکی انجام شد. حیوانات به صورت تصادفی در 7 گروه 6 تایی تقسیم شدند. تمامی مراحل کار با حیوانات بر اساس پروتکل های استاندارد و تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کردستان با کد IR.MUK.RES.1397/5001 انجام شد. 7 گروه شامل گروه کنترل بدون تیمار، گروه های دریافت استات سرب با دوزهای 500، 1000 و 1500 ppm به صورت آشامیدنی در آب و گروه های مشابه به همراه دریافت عصاره آبی سماق با دوز 250 میلی گرم بر کیلوگرم به صورت گاواژ خوراکی بود. در ابتدا، در هفته دوم، سوم و چهارم حیوانات وزن گیری شدند. در روز 29 مطالعه

در گروه Pb1500 بود (نمودار شماره A-2). با توجه به افزایش تجمع سرب در کبد نسبت به مغز آسیب توکسیک سرب در کبد بیش تر از مغز و در شاخص مالون دی آلدئید عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در کبد بیش تر از مغز و به صورت وابسته به دوز نشان داده شد.

ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سرم در گروه کنترل 333/00±22/204 و در گروه Pb1500 این میزان به 96/96±6/669 میکرومول بر میلی لیتر رسید و با همه گروه ها به جز گروه Pb500±R معنی دار شد ($P < 0/001$). کم ترین میزان آنزیم ALT و AST کبد در گروه کنترل بود که با سایر گروه ها به جز گروه Pb500 اختلاف آماری معنی دار داشت. آنزیم ALP بیش ترین میزان را در گروه Pb1500 نشان داد که این اختلاف به صورت معنی دار با سایر گروه های آزمایش معنی دار شد ($P < 0/001$) (جدول شماره 1).

مطالعه محمدی و همکاران در سال 1392 نشان دهنده ارتباط مستقیم فعالیت آنزیم های کبدی با غلظت سرب سرم داشت. تغییرات بافتی به صورت آماس، ارتشاح لنفوسیت ها به بافت کبد و نکروز سلول های کبدی مشاهده شد. به نحوی که قرار گیری در معرض سرب به مدت طولانی منجر به آسیب کبدی وابسته به دوز و زمان می شود (14).



نمودار شماره 1: بررسی تغییرات وزن به ترتیب در هفته اول، دوم، سوم و چهارم (W1, W2, W3, W4) در گروه های مختلف آزمایش

FeII احیا می گردد، تولید رنگ آبی می نماید که در طول موج 593 بیش ترین جذب نوری را دارد. مقادیر TAC با استفاده از نمودار استاندارد غلظت 100-1000 میکرومول بر لیتر سولفات آهن اندازه گیری شد (10). داده ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد نشان داده شد. بعد از انجام تست های نرمالیتیه بودن داده ها (کولموگروف - اسمیرنوف) و برابری واریانس ها (آزمون لون) جهت مقایسه میانگین ها از آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی استفاده شد. سنجش آماری داده ها با استفاده از برنامه نرم افزاری SPSS24 انجام و داده ها در سطوح 0/05، 0/01، $P < 0/001$ مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته ها و بحث

در نمودار شماره 1 به بررسی تغییرات وزن حیوانات در طول 4 هفته مطالعه پرداخته شد. همان گونه که مشاهده می شود در گروه های دریافت سرب به صورت وابسته به دوز وزن حیوانات افزایش یافته است. درصد افزایش وزن در گروه کنترل 21/81 درصد، گروه Pb500 21/27 درصد، گروه Pb1000 21/36 درصد، گروه Pb1500 26/19 درصد و در گروه های تجویز عصاره به ترتیب Pb500، Pb1000، Pb1500، 11/62، 14/22، 19/81 درصد شد. کم ترین درصد افزایش وزن در گروه Pb500 به همراه عصاره 11/62 درصد دیده شد. که این عدد نسبت به درصد افزایش وزن در سایر گروه ها معنی دار شد ($P < 0/05$). افزایش وزن بدن را می توان ناشی از تجمع سرب در استخوان ها و بدن دانست. در خصوص گروه های دارای تیمار عصاره این افزایش وزن کم تر بوده که نشان دهنده تاثیر عصاره سماق بر کاهش سطح تری گلیسرید و کلسترول بدن و کاهش میزان تجمع چربی از سوی دیگر است (11، 12، 13).

متوسط مقدار مالون دی آلدئید در بافت کبد بیش تر از مغز بود. کم ترین میزان مالون دی آلدئید در بافت مغز و کبد در گروه کنترل و بیش ترین میزان

جدول شماره 1: تغییرات آنزیم های کبدی در گروه های مورد مطالعه

ALP(U/L)	AST(U/L)	ALT(U/L)	گروه ها
113/365±34/986	22/07±1/783	65/03±5/206	C گروه
a***345/868±13/572	a*31/19±1/900	77/545±3/606	گروه Pb500
a**b**218/821±14/347	a**46/855±4/582	a**b**108/32±8/247	گروه Pb1000
a***b***c***530/906±21/641	a***b***c***123/66±20/374	a***b***c***292/355±34/358	گروه Pb1500
a**c**299/46±10/639	c**d***25/53±2/830	c**d***74/965±4/131	گروه Pb500+R
a***c**d***360/018±9/560	a**b**d***54/30±10/116	a**b***d***110/280±11/332	گروه Pb1000+R
a***c**d***401/34±24/758	a***b***c***137/19±16/037	a***b***c***215/74±40/994	گروه Pb1500+R

*** P < 0/001, ** P < 0/01, * P < 0/05

a, b, c, d به ترتیب در مقایسه با گروه های C, Pb500, Pb1000 و Pb1500

غلظت این آنزیم‌ها در گروه دریافت عصاره نسبت به شرایط عدم دریافت معنی دار شد. در تست ماز به علاوه ارتفاع، درصد تعداد دفعات ورود به بازوی باز با افزایش دوز سرب کاهش یافته و تغییرات در تمام گروه‌ها به جز در گروه دریافت سرب به همراه عصاره در سطح ($P < 0/05$) معنی دار بود (جدول شماره 2).

جدول شماره 2: تغییرات زمان سپری شدن و دفعات ورود به بازوی باز

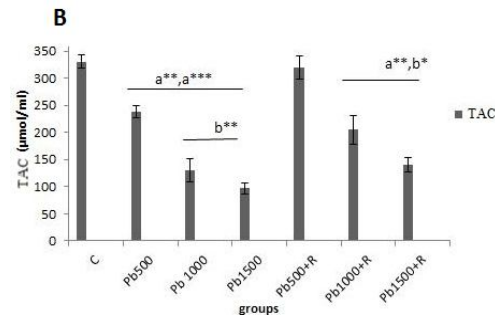
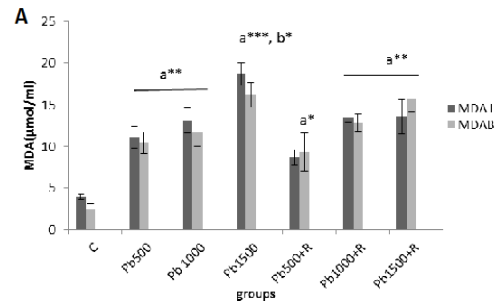
گروه ها	درصد دفعات ورود به بازوی باز	درصد زمان سپری شده در بازوی باز
C گروه	49/4±3/516	50/6±4/429
گروه Pb500	a*28/57±4/404	a*35/32±5/035
گروه Pb1000	a*25/90±8/648	a*29/1±8/433
گروه Pb1500	a**18/58±5/800	a**b*14/42±8/247
گروه Pb500+R	a**20/13±6/130	a**c**d**40/87±7/031
گروه Pb1000+R	a*22/04±7/675	d**a*31/96±6/145
گروه Pb1500+R	a*23/13±5/973	a**b*20/87±4/666

*** P < 0/001, ** P < 0/01, * P < 0/05

a, b, c, d به ترتیب مقایسه با گروه‌های C, Pb1000, Pb1500

سرب از طریق القای رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو و تغییر در سیستم‌های دوپامینژیک و سروتونینژیک می‌تواند سبب آسیب و القای اثرات اضطرابی خود شود (13). سماق با داشتن میریستین به‌عنوان فلاونونول مهم، کائمفرول، کوئرستین و گالیک اسید (14) به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی، سبب کنترل فرایندهای آسیب اکسیداتیو شود (15).

گلشتنی و همکاران 2019 به تاثیر اسانس سماق بر رفتارهای افسردگی و اضطرابی پرداختند (16). آن‌ها اثرات ضد اضطرابی را با افزایش مدت زمان سپری شدن در بازوی باز در مطالعه خود نشان دادند. این اثر احتمالاً



نمودار شماره 2: غلظت MDA و TAC در بافت کلیه حیوانات

A: غلظت MDA در بافت کلیه حیوانات مورد مطالعه بر حسب میکرومول بر میلی لیتر در کبد و مغز
*** P < 0/001, ** P < 0/01, * P < 0/05

a, b به ترتیب در مقایسه با گروه های C, Pb500
B: غلظت TAC در بافت کلیه حیوانات مورد مطالعه بر حسب میکرومول بر میلی لیتر سرم.

*** P < 0/001, ** P < 0/01, * P < 0/05

a, b, c به ترتیب در مقایسه با گروه های C, Pb500, Pb1000

در مطالعه حاضر افزایش غلظت آنزیم‌های کبدی ALT, AST در اثر آسیب سرب به‌عنوان دو شاخص ارزشمند در آسیب کبدی به صورت وابسته به دوز دیده شد. در این ارتباط عصاره آبی سماق توانست بر کنترل این آسیب‌ها ناشی از سرب موثر واقع شود. به نحوی که

در کنترل اضطراب القا شده در مسمومیت سرب ناموفق دانست. در این راستا مطالعات در مورد تاثیر رفتاری آلاینده‌های فلزات سنگین در مدل‌های حیوانی و بررسی پتانسیل‌های گیاهی در خصوص پیشگیری و اصلاح آن حائز اهمیت است. استفاده از تست‌های رفتاری دیگر، بررسی‌های پاتولوژیک بافت کبد و مغز و اندازه‌گیری سایر پارامترهای استرس اکسیداتیو از محدودیت‌های این مطالعه بود.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی واحد سندج به جهت حمایت در تایید و اجرای این پروژه تحقیقاتی و سرکارخانم مهندس ویدانندی کارشناس آزمایشگاه تشکر و قدردانی می‌شود.

به تاثیر ترکیبی کاربوفیلین که جزو سسکوئیتیرین‌ها است و آگونیست CB₂ کانابیکوئیدی بوده و دارای اثرات ضد اضطرابی و ضد افسردگی است، نسبت داده می‌شود (16). در مطالعه حاضر تاثیر عصاره بر اضطراب القا شده توسط سرب نتوانست به صورت معنی‌داری موثر باشد. این مساله احتمالاً می‌تواند به سبب عدم تطبیق مکانیسم عملکردی اثر سرب بر اضطراب و اثرات عصاره سماق در این زمینه باشد. به نحوی که با توجه به ترکیبات متفاوت اسانس و عصاره در این دو مطالعه و تفاوت در ترکیبات موثره آن عدم همسویی این دو مطالعه مشخص می‌شود (16، 17).

نتایج مطالعه حاضر تاکید بر افزایش وابسته به دوز مسمومیت سرب داشته و تاثیر عصاره آبی سماق را در کنترل آسیب‌های کبدی و کاهش سطح آنزیمی موثر اما

References

- Bhattacharya S. Probiotics against alleviation of lead toxicity: recent advances. *Interdiscip Toxicol* 2019; 12(2): 89-92.
- Garza Lombó C, Posadas Y, Quintanar L, Gonsebatt ME, Franco R. Neurotoxicity linked to dysfunctional metal ion homeostasis and xenobiotic metal exposure: redox signaling and oxidative stress. *Antioxid Redox Sign* 2018; 28(18): 1669-1703.
- Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules* 2019; 24(8): 1583.
- Raeeszadeh M, mortazavi P. The study of the effect of hydroalcoholic extracts of broccoli induced oxidative stress by lead in kidney of mice. *Razi J Med Sci* 2018; 25(9): 17-25 (Persian).
- Raeeszadeh M, Fallah M, Salimi naghani E. The Comparison of the Effect of Origanum Vulgar Aqueous Extract and Vitamin C on the Control of Cadmium Chloride Damage in Testicular Tissue in Male Rats. *J Babol Univ Med Sci* 2018; 20(8): 44-50 (Persian).
- Rouhi Boroujeni H, Mosharraf S, Gharipour M, Asadi Samani M, Rouhi Boroujeni H. Antihyperlipidemic effects of sumac (*Rhus coriaria* L.): Can sumac strengthen anti-hyperlipidemic effect of statins. *Der Pharm Lett* 2016; 8(3).
- Shidfar F, Rahideh ST, Rajab A, Khandozi N, Hosseini S, Shidfar S, et al. The effect of sumac *Rhus coriaria* L. powder on serum glycemic status, ApoB, ApoA-I and total antioxidant capacity in type 2 diabetic patients. *Iran J Pharm Res* 2014; 13(4): 1249-1255 (Persian).
- Lezak KR, Missig G, Carlezon Jr WA. Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues Clin Neurosci* 2017; 19(2): 181-191.
- Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a

- new colorimetric method. Clin Chim Acta 1978; 90(1): 37-43.
10. Benzi F, Strain S. Ferric reducing antioxidant assay. Methods Enzymol 1999; 299: 15-27.
 11. Sinkakarimi MH, Solgi E, Hosseinzadeh Colagar A. Cadmium and Lead Effects on Viability, Lipid Peroxidation and Total Antioxidant Capacity Levels in *Eisenia fetida*. J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27(149): 28-39 (Persian).
 12. Setorkil M, Rafieian-Kopaei M, Heidarian E, Ghatreh Samani K, Fard S, Ansari Samani R, Foroozandeh Z. Effect of *Rhus coriaria* consumption with high cholesterol food on some atherosclerosis risk factors in rabbit. J Babol Univ Med Sci 2012; 14(3): 38-45 (Persian).
 13. Ahmed MB, Ahmed MI, Meki AR, AbdRaboh N. Neurotoxic effect of lead on rats: Relationship to Apoptosis. Int J Health Sci 2013; 7(2): 192-199.
 14. Mohammadi R, Farokhi. F, Nejati V, Asri Rezaei. S. Assessment of the Amount of Hepatohistopathological and Enzymatic Changes after Chronic Lead Intoxication In Utero and Throughout Life in Rat. J Qom Univ Med Sci 2013; 7(2): 27-35 (Persian).
 15. Asgarpanah J, Saati S. An overview on phytochemical and pharmacological properties of *Rhus coriaria* L. Research Journal of Pharmacognosy(RJP) 2014; 1(3): 47-54 (Persian).
 16. Golshani Y, Mohammadi S, Golshani M. Effects of *Rhus Coriaria* essential oil on depression and anxiety in male rats. FEYZ 2019; 23(5): 476-484 (Persian).
 17. Raeeszadeh M, Mortazavi P, Atashin-Sadafi R. The Antioxidant, Anti-Inflammatory, Pathological, and Behavioural Effects of *Medicago sativa* L. (Alfalfa) Extract on Brain Injury Caused by Nicotine in Male Rats. Evid-Based Compl Alt Med 2021; 1-9.