

ORIGINAL RESEARCH PAPER

Evaluation of Noise-Induced Hearing Loss and Changes in Oxidative Stress Biomarkers in Wistar Rats: The Protective Role of *Nigella sativa* Oil

Vida Rezaei-Hachesu¹, Hassan Haddadzade Niri², Saeid Farahani³,
Mohammad Reza Monazzam Esmaeelpour^{1*}

¹Department of Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

²Rehabilitation Research Center, Department of Audiology, School of Rehabilitation Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

³Department of Audiology, School of Rehabilitation Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 2026/06/29

Accepted: 2026/08/22

ABSTRACT

Introduction: Noise-induced hearing loss (NIHL) is an important occupational and environmental disorder associated with excessive production of reactive oxygen species and cochlear damage. Considering the potential protective effects of antioxidants, the present study was conducted to investigate the protective effect of black seed (BS) oil on NIHL in rats.

Material and Methods: In this experimental study, 36 adults male Wistar rats were randomly divided to four groups: control, BS, noise, and noise+BS. Animals in the noise-exposed groups were subjected to pink noise at 110 dB SPL for 4 h/day. BS (2 mL/kg) was administered orally 1 h before exposure. Auditory brainstem response (ABR) thresholds were measured at baseline and on days 7, 14, and 21. Serum malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (TAC), and superoxide dismutase (SOD) levels were also determined.

Results: Noise exposure caused a significant increase in ABR thresholds compared with baseline ($P<0.05$), a significant decrease in SOD and TAC, and a significant increase in MDA. Administration of BS reduced the increase in ABR thresholds, although this effect was not significant at all frequencies and assessment times. In addition, BS increased SOD and TAC and decreased MDA compared with the exposure group ($P<0.05$).

Conclusion: In this animal model, BS oil showed a potential protective effect against pink noise-induced hearing damage, accompanied by improved antioxidant status and reduced oxidative stress. However, given the use of a single dose and an animal model, these findings should be interpreted cautiously.

Keywords: Noise, Noise induced hearing loss, Auditory brainstem response, Oxidative stress.

HOW TO CITE THIS ARTICLE

Rezaei-Hachesu V., Haddadzade Niri H., Farahani S., Monazzam Esmaeelpour M.R. Evaluation of Noise-Induced Hearing Loss and Changes in Oxidative Stress Biomarkers in Wistar Rats: The Protective Role of *Nigella sativa* Oil. *J Health Saf Work*. 2026; 16(2): 472-485.

1. INTRODUCTION

Noise-induced hearing loss (NIHL) is one of the significant causes of hearing disability and remains as one of the most important health concerns

worldwide. It is a complex pathological condition that results from the interaction of environmental and genetic factors. Although prolonged exposure to high-intensity noise is considered the main environmental cause of NIHL, susceptibility

* Corresponding Author Email: smaeel@tums.ac.ir

to noise damage varies among individuals and animals. The exact pathogenesis of NIHL has not been completely understood, but the excessive production of mitochondrial reactive oxygen species is regarded as one of the primary initiating mechanisms. Therefore, antioxidants could play a role in preventing or reducing NIHL. Black seed (BS) contains multiple bioactive combinations, such as thymoquinone, dithymoquinone, thymohydroquinone, and thymol, and has been reported to have antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, anticancer, and immunomodulatory activities. However, despite the recognized antioxidant properties of BS, evidence regarding its protective effects against NIHL and the associated oxidative stress remains limited. Considering the lack of regeneration of mammalian cochlear hair cells, the present study aimed to evaluate the protective effects of BS against NIHL in an animal model.

2. MATERIAL AND METHODS

In this experimental study, 36 adult male Wistar rats, aged two months and weighing 150–200 g, were randomly divided into four groups: control, noise, BS, and noise+BS. Only male rats were used to avoid the possible protective effects of estrogen receptors reported in previous studies on sensorineural hearing loss. The control group received no intervention. The noise group was exposed to pink noise at 110 dB SPL for 4 hours. The BS group received 2 mL/kg/day of 100% pure cold-pressed BS by oral gavage. The noise+BS group received the same dose of BS one hour before noise exposure.

Noise exposure was performed in an acoustic room. Pink noise was generated using Adobe Audition software and delivered through an amplifier and loudspeaker positioned above the cages. Sound pressure levels were monitored continuously to ensure uniform exposure, and background noise was maintained at 40–50 dB SPL outside the exposure periods. Hearing function was assessed using auditory brainstem response (ABR) before exposure as baseline and on days 7, 14, and 21. Click and tone burst stimuli were used at frequencies of 4, 8, 12, 14, and 16 kHz. The hearing threshold was defined as the lowest intensity at which wave II was clearly visible and reproducible.

After ABR, blood samples were collected from the left ventricle and centrifuged. Malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase

(SOD), and total antioxidant capacity (TAC) were measured using commercial kits. Animals were sacrificed and cochlear tissues were harvested for histopathological examination. Cochleae were fixed in 10% formalin, decalcified, embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin. Histopathological evaluation was performed by blinded pathologists using a light microscope. Data were analyzed using GraphPad Prism 8 and SPSS 26. Results are reported as mean $\pm$ standard deviation. One-way ANOVA with Tukey's post hoc test and repeated-measures ANOVA with Bonferroni correction were used, and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The control and BS groups showed stable ABR thresholds throughout the study, indicating no age-related hearing loss and no evidence of BS-induced ototoxicity. The noise group showed a significant increase in ABR thresholds compared to baseline values. This increase was observed during the first and second weeks of exposure, while a non-significant decrease in thresholds occurred in the third week after the end of exposure. The pattern of ABR threshold changes across frequencies suggested that pink noise caused greater injury in the apical region of the cochlea.

In the noise+BS group, ABR thresholds increased during the first and second weeks and slightly decreased in the third week; however, these changes were not statistically significant. Baseline ABR thresholds obtained with click and tone-burst stimuli showed no significant differences between the groups at any frequency. On day 7, the mean ABR thresholds in the noise and noise+BS groups were significantly higher than those in the control and BS groups. On days 7 and 14, ABR thresholds in the noise group were significantly higher than those in the control and BS groups. Although thresholds in the noise+BS group were also higher than those in the control and BS groups, this increase was not significant at some frequencies. In general, ABR thresholds in the noise+BS group were lower than those in the noise group at all evaluation times, although the difference was not significant in all frequencies and time points.

The biochemical findings showed that noise exposure disturbed the oxidant-antioxidant balance. Serum MDA levels increased significantly in the noise group compared with the control and BS groups, while BS administration significantly

reduced MDA levels in the noise+BS group. The highest SOD activity was observed in the control and BS groups. Noise exposure significantly decreased SOD activity compared with these groups, whereas SOD levels were significantly higher in the noise+BS group than in the noise group. TAC levels also decreased significantly in the noise group compared with the control group. Administration of BS compensated for this reduction and significantly increased TAC levels compared with the noise group.

Histopathological findings supported the functional and biochemical results. In the control and BS groups, the organ of Corti showed a normal structure. Inner hair cells were arranged in one row, outer hair cells were arranged in three regular rows, the tunnel of Corti was preserved, the tectorial membrane was in contact with the hair cells, and nerve fiber density appeared normal. In the noise group, progressive cochlear damage was observed. On day 7, the arrangement of hair cells was severely disrupted, outer hair cells were damaged, the basilar membrane was thickened, and the tectorial membrane was hook-shaped and separated from the sensory epithelium. On day 14, shrinkage of outer hair cells, death of supporting and ganglion cells, and further thinning of nerve fibers were observed. On day 21, these changes persisted. In the noise+BS group, cochlear injury was moderate and relatively stable over time.

Although outer hair cells showed shrinkage and disorganization and some supporting cell damage was present, lateral connections and cytoplasmic structure were partially preserved. The tectorial membrane showed only a slight separation from the sensory epithelium, and the tunnel of Corti remained normal in most samples.

4. CONCLUSIONS

The results showed that exposure to pink noise increased ABR thresholds and disrupted the oxidant–antioxidant balance by increasing MDA and decreasing SOD and TAC. These findings confirm the role of oxidative stress in noise-induced auditory injury. BS reduced ABR threshold changes, improved oxidative stress biomarkers, and decreased the severity of cochlear damage, although its protective effect was not statistically significant at all frequencies and time points. Overall, BS may have a protective role against NIHL, probably through strengthening antioxidant capacity and reducing oxidative injury. However, given the animal model and the use of a single dose, these findings should be regarded as preliminary evidence of the potential protective effect of BS and interpreted with caution. Further studies are needed to determine the optimal dose, duration of administration, and molecular mechanisms involved in these effects.

بررسی کاهش شنوایی ناشی از مواجهه با صدا و تغییرات شاخص‌های استرس اکسیداتیو در رت‌های ویستار: نقش محافظتی روغن سیاهدانه

ویدا رضائی هاجه‌سو^۱، حسن حدادزاده نیری^۲، سعید فراهانی^۳، محمدرضا منظم اسماعیل‌پور^{۴*}

^۱گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

^۲مرکز تحقیقات توانبخشی، گروه شنوایی شناسی، دانشکده علوم توانبخشی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

^۳گروه شنوایی شناسی، دانشکده علوم توانبخشی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۴/۸، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۵/۳۱

چکیده

مقدمه: کاهش شنوایی ناشی از صدا یکی از اختلالات مهم شغلی و محیطی است که با تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن و آسیب ساختاری حلزون گوش همراه است. با توجه به نقش آنتی‌اکسیدان‌ها در کاهش این آسیب مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر محافظتی روغن سیاهدانه بر کاهش شنوایی القا شده با صدا انجام شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی ۳۶ رت نر بالغ ویستار به صورت تصادفی به چهار گروه کنترل، روغن سیاه دانه، مواجهه با صدا و صدا+روغن سیاه دانه تقسیم شدند. حیوانات گروه‌های مواجهه به مدت ۱۴ روز متوالی، در معرض صدای صوتی با شدت ۱۱۰ dB SPL به مدت ۴ h/day قرار گرفتند و در فاصله روزهای ۱۵ تا ۲۱ مواجهه صوتی نداشتند. روغن سیاه دانه با دوز ۲ ml/kg به صورت خوراکی و یک ساعت پیش از مواجهه تجویز شد. آستانه‌های ABR در روزهای پایه، ۷، ۱۴ و ۲۱ اندازه‌گیری و سطوح سرمی مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) تعیین شد.

یافته‌ها: مواجهه با صدا موجب افزایش معنی‌دار آستانه‌های ABR نسبت به مقادیر پایه ($P<0.05$)، کاهش معنی‌دار SOD و TAC و افزایش معنی‌دار MDA شد. افزایش آستانه‌های ABR در هفته دوم نسبت به هفته اول کمتر بود و پس از قطع مواجهه، روندی کاهشی بدون معنی‌داری آماری مشاهده شد. تجویز روغن سیاهدانه افزایش آستانه‌های ABR را کاهش داد، هرچند این اثر در همه فرکانس‌ها و زمان‌های ارزیابی معنی‌دار نبود. همچنین، روغن سیاهدانه موجب افزایش SOD و TAC و کاهش MDA در مقایسه با گروه مواجهه شد ($P<0.05$).

نتیجه‌گیری: در این مدل حیوانی، روغن سیاهدانه اثر محافظتی بالقوه‌ای در برابر آسیب شنوایی ناشی از مواجهه با صدای صوتی نشان داد که با بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس اکسیداتیو همراه بود. با این حال، با توجه به استفاده از یک دوز واحد و انجام مطالعه در مدل حیوانی، این یافته‌ها باید با احتیاط تفسیر شوند.

کلمات کلیدی: صدا، کاهش شنوایی ناشی از صدا، پاسخ شنوایی ساقه مغز، استرس اکسیداتیو

مقدمه

کاهش شنوایی ناشی از صدا^۱ (NIHL) یکی از علل مهم ناتوانی شنوایی در افراد بوده و یک معضل جدی سلامت در سراسر جهان به شمار می‌رود^(۱). NIHL یک بیماری پاتولوژیک پیچیده است که از تعامل بین عوامل محیطی و ژنتیکی ناشی می‌شود^(۲، ۳). اگرچه مواجهه طولانی مدت با صداهای با شدت بالا مهم‌ترین عامل محیطی در بروز این عارضه محسوب می‌شود^(۴)، اما میزان آسیب‌پذیری افراد و حیوانات نسبت به صدمات ناشی از صدا با یکدیگر متفاوت است^(۵). با این حال، پاتوژنز NIHL به‌طور کامل شناخته نشده است؛ اما مکانیسم پذیرفته‌شده کنونی بیان می‌کند که NIHL از طریق تولید بیش‌ازحد گونه‌های فعال اکسیژن میتوکندریایی (ROS) آغاز می‌شود^(۶، ۷). بنابراین، انتظار می‌رود که آنتی‌اکسیدان‌ها بتوانند از بروز یا تشدید NIHL پیشگیری کنند یا آن را کاهش دهند. شواهد فزاینده‌ای حاکی از آن است که ترکیبات آلی موجود در گیاهان می‌توانند در کاهش یا پیشگیری از استرس اکسیداتیو مؤثر باشند^(۸). در میان گیاهان دارویی، سیاه‌دانه^۲ (BS) به واسطه خواص فارماکولوژیک متنوع خود از جمله اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدسرطانی، ضد میکروبی و تعدیل‌کننده سیستم ایمنی برجسته است. دانه‌های این گیاه سرشار از ترکیبات زیست‌فعال نظیر تیموکینون، دایتیموکینون، تیموهیدروکینون و تیمول هستند^(۹). مطالعات گذشته نشان داده‌اند که مصرف روغن سیاه‌دانه می‌تواند از سمیت کبدی ناشی از CCl_4 ^(۱۰)، آسیب قرنیه ناشی از فرمالدهید^(۱۱) و کاهش شنوایی القاشده با جنتامایسین^(۱۲) پیشگیری کند. تاکنون ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مختلفی به منظور پیشگیری از NIHL مورد بررسی قرار گرفته‌اند، اما هیچ یک به‌عنوان درمان استاندارد در این زمینه پذیرفته نشده‌اند^(۱۳). از آنجا که سلول‌های مویی حلزون گوش در پستانداران پس از آسیب‌دیدگی قابلیت بازسازی ندارند، شناسایی آنتی‌اکسیدان‌های جدید که بتوانند به‌طور بالقوه از NIHL جلوگیری کنند، به یکی

از زمینه‌های پراهمیت پژوهش تبدیل شده است. در مطالعه Culhaoglu و همکاران، تجویز خوراکی روغن سیاه‌دانه پس از ترومای صوتی حاد با کاهش تغییرات کوتاه‌مدت آستانه ABR همراه بود^(۱۴). با این حال، این مطالعه به ارزیابی کوتاه‌مدت عملکرد شنوایی محدود بود و شاخص‌های استرس اکسیداتیو و تغییرات هیستوپاتولوژیک حلزون را بررسی نکرد.

در مطالعه حاضر، با انجام یک تحقیق حیوانی، اثرات محافظتی روغن سیاه‌دانه بر NIHL مورد ارزیابی قرار گرفت. در این راستا، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، میزان استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی و تغییرات بافت‌شناختی در بافت حلزون مورد بررسی قرار گرفتند.

روش کار

حیوانات

در این مطالعه از رت‌های نر بالغ نژاد ویستار (با سن دو ماه و وزن ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم) که رفلکس پرپر آن‌ها سالم بود، استفاده شد. تنها رت‌های نر در مطالعه وارد شدند تا از تأثیر احتمالی گیرنده‌های استروژنی، که در مطالعات پیشین نقش محافظتی در برابر افت شنوایی حسی-عصبی در حیوانات نشان داده‌اند، جلوگیری شود^(۱۵). حیوانات در گروه‌های سه‌تایی در هر قفس نگهداری شدند و شرایط دمایی (۲۲ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد) و رطوبت (50 ± 10 درصد) در محیط نگهداری به‌صورت کنترل‌شده حفظ گردید. چرخه روشنایی/تاریکی نیز به‌صورت ۱۲ ساعته تنظیم شد و دسترسی به آب و غذا به‌صورت آزادانه برای آن‌ها فراهم بود. تمامی آزمایش‌ها در واحد حیوانات دانشگاه علوم پزشکی ایران و مطابق با دستورالعمل‌های اخلاقی مصوب کمیته اخلاق در پژوهش‌های حیوانی دانشگاه علوم پزشکی تهران کد اخلاق (IR.TUMS.SPH. REC.1400.130) انجام گرفت.

در مجموع، ۳۶ رت به‌صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند و مطابق با روند آزمایشی مشخص‌شده در شکل ۱، در زمان‌های متفاوت قربانی‌سازی شدند. گروه

1. Noise Induced Hearing Loss
2. . Black Seed

مواجهه با صدا

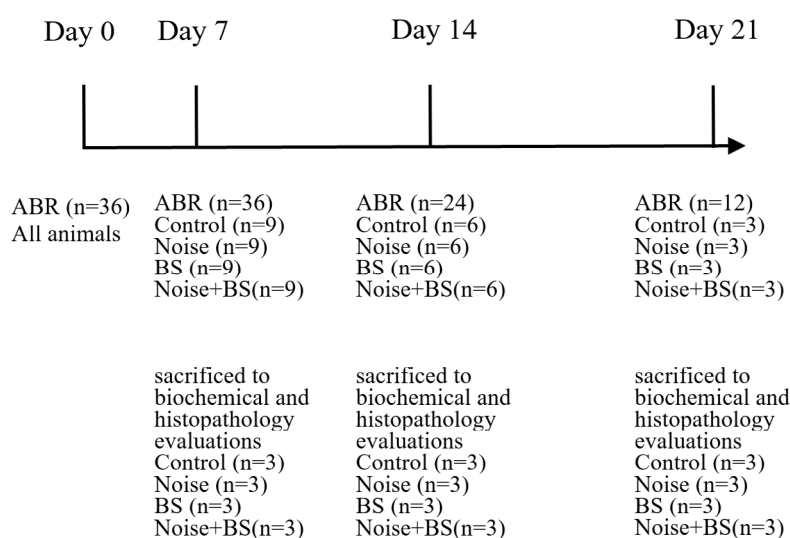
مواجهه حیوانات با صدا در یک اتاقک آکوستیک (acoustic room) انجام شد. دیوارهای داخلی اتاقک با مواد جاذب صوت پوشانده شده بود تا بازتاب امواج صوتی، تشکیل امواج ایستا و اثرات ناشی از طنین صدا به حداقل برسد. برای جلوگیری از تجمع، رت‌ها در قفس توری فلزی با مش بندی مجزا به ابعاد $15 \times 13 \times 17$ سانتی‌متر نگهداری شدند همچنین آب و غذا در طول مدت مواجهه با صدا حذف گردید. صدای صوتی با استفاده از نرم‌افزار Adobe Audition (نسخه ۴.۰.۴۹) تولید شد. برای پخش صدا، از یک تقویت‌کننده (Rock Jw-s317) و یک بلندگو (Yashiao YD103-1) استفاده گردید. بلندگو در فاصله ۵ سانتی‌متری بالای قفس توری نصب شد تا یکنواختی سطح صدا در محیط با انحراف حداکثر ± 1 dB SPL تضمین شود. حیوانات گروه‌های مواجهه (صدا، صدا+روغن سیاه) از روز اول تا پایان روز چهاردهم، روزانه به مدت ۴ ساعت و با سطح فشار صوت ۱۱۰ دسی‌بل در معرض صدا قرار گرفتند (طبق شکل ۱). بنابراین، مواجهه صوتی طی دو بازه متوالی هفت‌روزه انجام شد. از پایان مواجهه در روز چهاردهم تا روز بیست‌ویکم، حیوانات هیچ‌گونه مواجهه صوتی نداشتند و این بازه به‌عنوان دوره

کنترل هیچ‌گونه مداخله‌ای دریافت نکرد؛ گروه مواجهه با صدا در معرض صدای صوتی با شدت ۱۱۰ دسی‌بل SPL به مدت ۴ ساعت قرار گرفت؛ گروه روغن سیاه‌دانه (BS) روزانه مقدار 2 mL/Kg روغن سیاه‌دانه از طریق گاوژ دریافت کرد و گروه صدا + روغن سیاه‌دانه نیز در معرض صدا قرار گرفت و یک ساعت پیش از مواجهه با صدا، روغن سیاه‌دانه دریافت نمود.

آستانه شنوایی پایه با استفاده از آزمون پاسخ شنوایی ساقه مغز (ABR) پیش از شروع مواجهه اندازه‌گیری شد. در ادامه، حیوانات هر گروه به‌طور تصادفی به زیرگروه‌هایی تقسیم شدند و در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ به منظور انجام آنالیزهای بیوشیمیایی قربانی شدند.

تجویز آنتی‌اکسیدان

روغن ۱۰۰٪ خالص سیاه‌دانه از شرکت باریج اسانس (ایران) تهیه شد. این روغن از دانه‌های تازه سیاه‌دانه به روش پرس سرد استخراج و در بطری‌های شیشه‌ای کهریابی برای محافظت در برابر نور خورشید بسته‌بندی شده بود. از روز نخست مطالعه، مقدار ۲ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به‌صورت خوراکی و از طریق گاوژ، یک ساعت پیش از مواجهه با صدا تجویز شد.



شکل ۱: فلوچارت طراحی مطالعه.

هفت‌روزه پیگیری پس از مواجهه در نظر گرفته شد. برای پایش و اندازه‌گیری مداوم سطح صدا در تمامی نقاط قفس توری، از دستگاه صدا سنج دستی دقیق (Brüel & Kjær مدل B&K Type 2250-L، ساخت دانمارک) استفاده شد. صداسنج قبل از هر نوبت اندازه‌گیری، با استفاده از کالیبراتور آکوستیکی استاندارد در سطح مرجع 94 dB و فرکانس 1000 هرتز و مطابق دستورالعمل سازنده کالیبره شد. سطح صدای زمینه برای گروه‌های کنترل و روغن، در طول مطالعه و همچنین برای سایر گروه‌ها در خارج از زمان‌های مواجهه، در محدوده 40 تا 50 دسی‌بل SPL بود.

اندازه‌گیری الکتروفیزیولوژیکی عملکرد شنوایی

اندازه‌گیری آستانه‌ی شنوایی در تمامی حیوانات، با استفاده از دستگاه ABR (Biologic Navigator pro, Natus, USA) و به کمک دو نوع محرک انجام گرفت: محرک‌های click با گستره‌ی فرکانسی 1000 تا 4000 هرتز و محرک‌های tone-burst در بسامدهای 4، 8، 12، 14 و 16 کیلوهرتز. زمان‌های ثبت شامل روزهای پیش از مواجهه (به‌عنوان خط پایه)، روز هفتم، روز چهاردهم و روز بیست‌ویکم دو ساعت پس از مواجهه با صدا بودند. معیار خروج از مطالعه، داشتن آستانه‌ی پایه‌ی بالاتر از 20 دسی‌بل در پاسخ به محرک click در نظر گرفته شد (15). محرک صوتی اختصاصی مورد استفاده، یک tone-burst 5 میلی‌ثانیه‌ای با فرمت WAV و در همان فرکانس‌های 4، 8، 12، 14 و 16 کیلوهرتز بود که به کمک نرم‌افزار MATLAB ساخته شد. طول مدت محرک‌های click نیز 0/1 میلی‌ثانیه در نظر گرفته شد.

در تمام طول مدت آزمون، دمای بدن حیوانات با استفاده از پد حرارتی در محدوده‌ی $37 \pm 0/5$ درجه‌ی سانتی‌گراد پایدار نگه داشته شد و تمام مراحل اندازه‌گیری تحت بیهوشی عمومی و با تزریق داخل‌صفافی ترکیب کتامین 10٪ و زایلازین 2٪ انجام گردید (16). برای ارسال محرک click از گوشی درون‌گوشی (Insert Earphone) متصل به دستگاه Biologic Navigator pro استفاده شد، در

حالی که محرک‌های tone-burst از طریق یک بلندگو که دقیقاً بالای گوش حیوان، در فاصله‌ی 5 سانتی‌متری و با زاویه‌ی 30 درجه نسبت به مجرای شنوایی خارجی قرار گرفته بود، پخش گردیدند. محرک‌های click با قطبیت‌های متناوب اعمال شدند. برای ثبت امواج الکتروادهای سوزنی به‌صورت زیرپوستی در سه ناحیه قرار داده شدند: روی فرق سر (الکترواد غیرواژگون‌گر)، پشت گوش طرف آزمون (الکترواد واژگون‌گر) و پشت گوش طرف مقابل (الکترواد زمین). امپدانس هر الکترواد کمتر از 5 کیلوهم و اختلاف امپدانس میان آن‌ها کمتر از 2 کیلوهم بود. تنظیمات دستگاه به این صورت بود: بهره‌ی تقویت‌کننده روی 100000، پهنای باند فرکانسی پاسخ در محدوده‌ی 30 تا 15000 هرتز، نرخ تکرار 1/21 و پنجره‌ی زمانی 10 میلی‌ثانیه. در هر فرکانس، دستگاه به طور میانگین پاسخ 800 تحریک را جمع‌آوری می‌کرد و امواج حاصل (شماره‌های 1 تا 5) روی نمایشگر کامپیوتر ترسیم می‌شدند. کاهش شدت صوت با گام‌های 10 دسی‌بل آغاز شد و با نزدیک‌تر شدن به آستانه، گام‌ها به 5 دسی‌بل تقلیل یافتند تا مقدار نهایی آستانه مشخص شود. آستانه‌ی شنوایی، پایین‌ترین سطح شدتی تعریف گردید که در آن موج II به‌صورت قابل‌مشاهده و تکرارپذیر تشخیص داده می‌شد (17). کلیه‌ی نتایج ثبت‌شده مربوط به گوش راست حیوانات بودند (18).

ارزیابی بیومارکرهای استرس اکسیداتیو

پس از تکمیل ارزیابی‌های شنوایی، نمونه‌ی خون از بطن چپ قلب جمع‌آوری شد. سپس نمونه‌های خون به‌مدت 15 دقیقه و با سرعت 3500 دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند تا سرم از سایر اجزاء جدا شود. سرم‌های حاصل تا زمان انجام تحلیل‌ها در دمای 80- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مالان‌دی‌آلدئید (MDA)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) با استفاده از کیت تجاری (Zell Bio، آلمان) و مطابق با دستورالعمل‌های ارائه‌شده توسط شرکت سازنده اندازه‌گیری شد.

شواهدی از سمیت شنوایی ناشی از روغن بود. در مقابل، گروه noise افزایش معنی‌داری در آستانه‌های ABR نسبت به مقادیر پایه نشان داد ($P < 0.05$). این افزایش در طول دوره مواجهه (هفته اول و دوم) تداوم یافت و پس از قطع مواجهه (هفته سوم) کاهش غیرمعنی‌داری در آستانه‌ها ثبت گردید ($P > 0.05$). تغییرات آستانه‌ی ABR الگویی کاهشی در طول طیف فرکانسی داشت به طوری که می‌توان گفت صدای صورتی بیشترین میزان آسیب را به قسمت راس حلقون گوش وارد می‌کند و به تناسب افزایش طول مدت مواجهه شدت آسیب افزایش پیدا نکرده بود. در گروه صدا+BS نیز افزایش آستانه در هفته‌های اول و دوم و کاهش مختصر در هفته سوم مشاهده شد، اما هیچ‌یک از این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نبودند ($P > 0.005$).

مقایسه آماری آستانه‌های شنوایی پایه به‌دست‌آمده از محرک‌های tone-burst و click تفاوت معنی‌داری را در هیچ یک از فرکانس‌ها بین گروه‌های مورد مطالعه نشان نداد ($P > 0.05$). شکل ۲ میانگین آستانه‌های ABR در گروه‌های مطالعه را در روزهای ۷ (الف)، ۱۴ (ب) و ۲۱ (ج) برای هر دو محرک را نشان می‌دهد. در روز هفتم، میانگین آستانه‌های ABR در گروه‌های صدا و صدا+BS به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل و BS بود ($P < 0.05$). مقایسه بین گروه‌ها نشان داد که در روزهای ۷ و ۱۴، آستانه‌های ABR در گروه صدای صورتی به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه‌های کنترل و BS بود ($P < 0.05$). آستانه‌های ABR در گروه صدای صدا+BS نیز نسبت به گروه‌های کنترل و روغن افزایش یافت، اما این افزایش در برخی فرکانس‌ها معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). همچنین، آستانه‌های ABR در گروه صدای صدا+BS در تمامی زمان‌های ارزیابی کمتر از گروه صدا بود، اگرچه این اختلاف در روزهای ۷ و ۱۴ در فرکانس‌های ۱۴ و ۱۶ کیلوهرتز و در روز ۲۱ به‌جز فرکانس‌های ۴ و ۸ کیلوهرتز و محرک Click از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). به طور کلی، الگوی تغییرات آستانه‌ها نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار شنوایی در اثر مواجهه با صدا و تأثیر محافظتی BS بود،

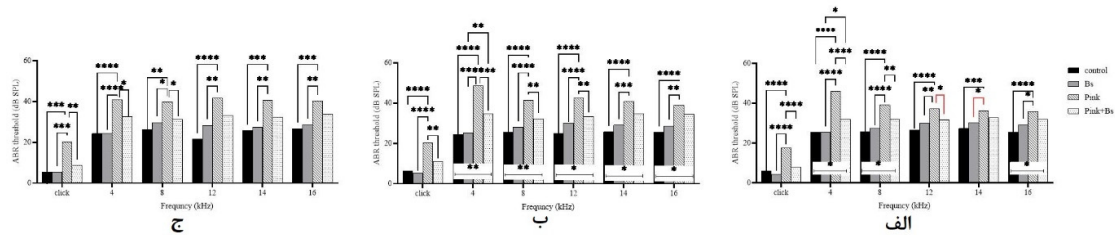
برداشت بافت حلقون و بررسی تغییرات هیستوپاتولوژی پس از انجام تست ABR و نمونه‌گیری خون، رت‌ها با استفاده از گاز CO_2 قربانی شده و سپس قطع سر شدند. گوش‌های داخلی استخراج گردید و کپسول‌های استخوانی حلقونی مورد کالبدشکافی قرار گرفتند. حلقون در محلول فرمالین ۱۰ درصد جهت تحلیل‌های بافت‌شناسی تثبیت گردید. پس از برداشت بافت و انجام فرایند استاندارد دکلسیفیکاسیون (محلول نیتریک اسید ۱۰٪)، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محلول فرمالدهید بافری ۱۰٪ فیکس شدند. سپس با استفاده از روش‌های معمول فرآوری بافت، آب‌گیری، شفاف‌سازی و آغشته‌سازی با پارافین انجام گرفت و نمونه‌ها در قالب پارافینی بلوکه شدند. برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر با میکروتوم تهیه و بر روی لامل قرار داده شدند. پس از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و انوزین (H&E)، نمونه‌ها جهت بررسی هیستوپاتولوژیک با میکروسکوپ نوری (Nikon Eclipse CI-S, Japan) تصویربرداری شدند. پاتولوژیست‌هایی که نمونه‌ها را ارزیابی کردند، نسبت به تخصیص گروه‌ها بی‌اطلاع بودند تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری Graph-Pad Prism-8 و SPSS-26 در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند. نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار ارائه شده است. مقایسه بین گروهی با استفاده از آزمون one-way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. تغییرات زمانی با استفاده از one-way repeated-measures ANOVA و آزمون تعقیبی Bonferroni ارزیابی شد. در تمامی تحلیل‌ها، مقدار $P < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری آماری در نظر گرفته شد.

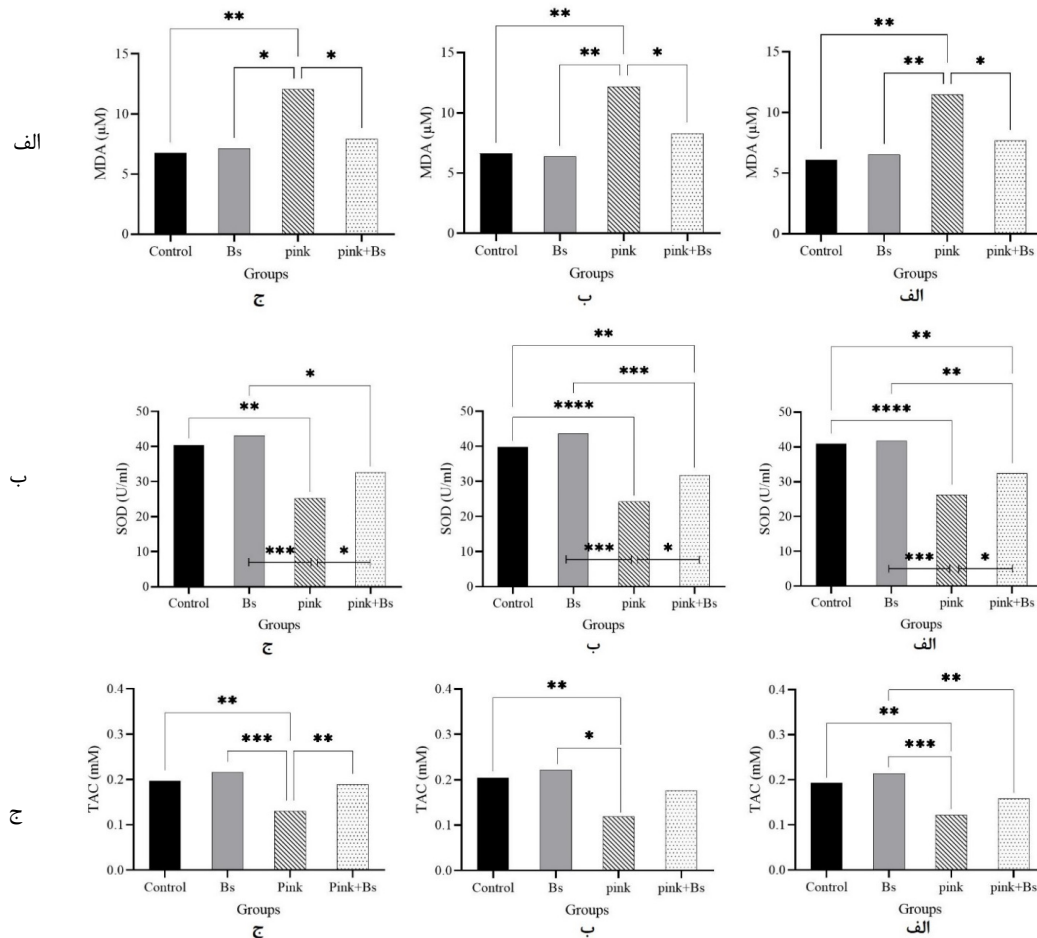
یافته‌ها

تغییرات آستانه‌ی شنوایی

در این مطالعه، گروه‌های کنترل و BS آستانه‌های شنوایی پایداری را در طول دوره پژوهش نشان دادند که بیانگر عدم کاهش شنوایی وابسته به سن و همچنین فقدان



شکل ۲: میانگین تغییرات آستانه ABR در گروه‌های مورد مطالعه. الف: روز ۷ (n=۹)، ب: روز ۱۴ (n=۶)، ج: روز ۲۱ (n=۳). مقادیر به صورت میانگین گزارش شده‌اند. **
p<0.001 *** و p<0.01, * p<0.05



شکل ۳: نتایج آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه برای بررسی اثر مواجهه با صدا و BS بر سطوح MDA (الف)، SOD (ب) و TAC (ج) در سرم. مقادیر به صورت میانگین ±
انحراف معیار گزارش شده‌اند. P < 0.05*, P < 0.01***, P < 0.001****

TAC را در گروه‌های مطالعه در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ نشان می‌دهد. مقایسه درون‌گروهی نشان داد که تغییرات زمانی این شاخص‌ها بین سه زمان ارزیابی از نظر آماری معنادار نبود. باین حال، مقایسه بین‌گروهی در زمان‌های مورد بررسی، تفاوت‌های معناداری را نشان داد. سطح

که در برخی فرکانس‌ها به صورت اختلاف‌های آماری معنادار مشاهده شد.

بیومارکرهاي اکسیدان/آنتی‌اکسیدان خون
شکل ۳ (الف تا ج) سطوح سرمی MDA، SOD و

و گانگلیونی و نازک شدن فیبرهای عصبی همچنان وجود داشت. در گروه صدا+BS، الگوی آسیب در هر سه بازه زمانی با شدتی متوسط و نسبتاً پایدار باقی ماند. در تمامی مراحل، OHCs دچار چروکیدگی و بی‌نظمی بودند و درجاتی از آسیب در سلول‌های پشتیبان مشاهده شد. با این حال اتصالات جانبی و ساختار سیتوپلاسمی تا حدی حفظ شده بود. اگرچه غشای تکتوریال فاصله‌ای اندک از اپیتلیوم حسی نشان می‌داد، تغییر شکل شدیدی مشاهده نشد و ساختار تونل کورتی در اکثر نمونه‌ها طبیعی باقی مانده بود. در گانگلیون حلزون، فضاهای بین‌سلولی، هسته‌های پیکنوتیک محدود، مرگ سلولی و الیاف عصبی نسبتاً واضح بود.

بحث

در مطالعه حاضر، مواجهه با صدای صوتی عمدتاً موجب افزایش آستانه ABR در فرکانس‌های کمتر از ۸kHz شد. این الگو به ویژگی طیفی صدای صوتی و توزیع انرژی آن در گستره فرکانسی مرتبط است. صدای صوتی دارای چگالی توان معکوس با فرکانس ($1/f$) بوده و انرژی بیشتری را در فرکانس‌های پایین متمرکز می‌کند (۱۹). از آنجا که سیستم شنوایی فرکانس‌ها را بر اساس مقیاس اکتاو پردازش می‌کند، این توزیع انرژی به ادراک یکنواخت آن در سراسر اکتاوها منجر می‌شود (۲۰). از سوی دیگر، محل ایجاد ضایعات در حلزون به محتوای فرکانسی محرک وابسته است؛ به‌طوری‌که صداهای با فرکانس پایین عمدتاً رأس و صداهای با فرکانس بالا قاعده اندام کورتی را درگیر می‌کنند (۲۱). در همین راستا، Harding و Bohne نشان دادند که مواجهه با صدای ۴kHz موجب آسیب به نیمه اول اندام کورتی می‌شود (۲۲). همچنین، وسعت و شدت آسیب سلول‌های مویی نیز تحت تأثیر محتوای فرکانسی صدا قرار دارد به‌گونه‌ای که آسیب ناشی از صداهای فرکانس پایین معمولاً گسترده‌تر، اما آسیب ناشی از صداهای فرکانس بالا متمرکزتر و شدیدتر است (۲۳). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزایش آستانه

MDA در گروه صدا در مقایسه با گروه کنترل و BS افزایش معناداری نشان داد ($P<0.05$)، در حالی که تجویز BS این سطح را در گروه صدا+BS به طور معناداری کاهش داد ($P<0.05$) (شکل الف). بیشترین فعالیت آنزیم SOD در گروه کنترل و BS مشاهده شد. مواجهه با صدا منجر به کاهش معنادار سطح آن نسبت به این دو گروه شد ($P<0.05$). اگرچه تجویز BS تفاوت معناداری را با گروه کنترل ایجاد نکرد، اما در گروه صدا+BS، سطح SOD نسبت به گروه noise به‌طور معناداری افزایش یافت ($P<0.05$) (شکل ب). همچنین، سطح TAC در گروه Noise نسبت به کنترل کاهش یافت ($P<0.05$)، اما تجویز BS در گروه در گروه صدا+BS این کاهش را جبران کرده و سبب افزایش معنادار TAC نسبت به گروه صدا گردید ($P<0.05$) (شکل ج).

هیستوپاتولوژی بافت حلزون

در گروه‌های کنترل و BS، تونل کورتی ساختار طبیعی خود را حفظ کرده بود. سلول‌های مویی داخلی در یک ردیف و سلول‌های مویی خارجی در سه ردیف منظم در دو سوی تونل قرار داشتند و غشای تکتوریال با این سلول‌ها در تماس بود. سلول‌های پیلار داخلی و خارجی که مرزهای تونل را تشکیل می‌دهند، در آرایش طبیعی مشاهده شدند. همچنین سلول‌های نگهبان مرتبط با سلول‌های مویی در زیر آن‌ها به‌خوبی قابل تشخیص بودند و تراکم رشته‌های عصبی نیز حالت طبیعی داشت. مشاهدات بافتی در گروه صدا آسیب پیشرونده و شدید ساختار حلزون را در طول زمان نشان داد. در روز هفتم، آرایش سلول‌های مویی کاملاً مختل شده بود. سلول‌های مویی خارجی (OHCs) تخریب شده، غشای پایه ضخیم و غشای تکتوریال به شکل قلاب‌مانند و جدا از اپیتلیوم حسی قرار داشت. در روز چهاردهم، چروکیدگی گسترده سلول‌های مویی خارجی همراه با مرگ سلول‌های پشتیبان و سلول‌های گانگلیونی دیده شد و فیبرهای عصبی کاهش ضخامت بیشتری نشان دادند. در روز ۲۱ام چروکیدگی OHCها، مرگ سلول‌های پشتیبان

ABR در هفته دوم مواجهه نسبت به هفته اول کمتر بود و پس از قطع مواجهه در هفته سوم کاهش نسبی آستانه‌ها مشاهده شد. تغییرات آستانه شنوایی به شدت، مدت مواجهه و محتوای فرکانسی صدا وابسته است (۲۳). در همین راستا، Kömür و همکاران گزارش کردند که مواجهه شش‌ساعته رت‌ها با صدای کم‌فرکانس با شدت ۱۱۰ dB SPL موجب افزایش موقت آستانه‌های ABR شد. با این حال، آستانه‌ها طی سه روز نخست پس از پایان مواجهه به‌طور محسوسی کاهش یافتند و درجات متفاوتی از بازیابی شنوایی در دوره پیگیری ۲۱ روزه مشاهده شد (۲۴). در مقابل، Fraenkel و همکاران افزایش معنی‌دار آستانه‌های ABR را با افزایش مدت مواجهه گزارش کردند (۲۵). این تفاوت احتمالاً ناشی از اختلاف در شدت، مدت و محتوای فرکانسی صداهای مورد استفاده است. کاهش آستانه ABR پس از قطع مواجهه نیز با پدیده تغییر آستانه موقت (TTS) مطابقت دارد که در آن بخشی از افت شنوایی پس از حذف عامل آسیب‌رسان برگشت‌پذیر است در حالی که در مواجهه‌های شدیدتر یا طولانی‌تر بخشی از این تغییرات به تغییر آستانه دائمی (PTS) منجر می‌شود (۲۶). در مدل‌های حیوانی نیز معمولاً تغییر آستانه مرکب (CTS) مشاهده می‌شود که شامل مؤلفه‌های موقت و دائمی است (۳).

در مطالعه حاضر، تجویز روغن سیاه‌دانه موجب کاهش تغییرات آستانه ABR ناشی از مواجهه با صدا شد. مواجهه با صدا با کاهش جریان خون حلزون، ایجاد ایسکمی و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن همراه است و تولید این رادیکال‌ها در جریان تبدیل انرژی صوتی به سیگنال‌های عصبی نیز افزایش می‌یابد (۲۷). گزارش شده است که تیموکینون، ترکیب فعال روغن سیاه‌دانه، با افزایش متابولیسم موجب افزایش جریان خون بافتی و بهبود اکسیژن‌رسانی به سلول‌های تحت استرس می‌شود (۲۸). علاوه بر این، تیموکینون با گلوکاتینون واکنش داده و گلوکاتینونیل-تیموهیدروکینون، یک جمع‌کننده قوی رادیکال‌های آزاد، را تشکیل می‌دهد. علاوه بر اثر آنتی‌اکسیدانی مستقیم، سیستم آنتی‌اکسیدانی درون‌زا

را نیز تقویت می‌کند (۲۹). بنابراین، اثر محافظتی مشاهده‌شده برای روغن سیاه‌دانه احتمالاً ناشی از مجموعه‌ای از اثرات آنتی‌اکسیدانی و بهبود خون‌رسانی حلزون است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مواجهه با صدای صورتی با کاهش معنی‌دار فعالیت SOD و TAC و افزایش سطح MDA همراه بود که بیانگر برهم خوردن تعادل اکسیدان آنتی‌اکسیدان و القای استرس اکسیداتیو است. این یافته با مطالعاتی که کاهش فعالیت SOD و TAC و افزایش MDA را پس از مواجهه با صدا گزارش کرده‌اند، همخوانی دارد (۳۰). از آنجا که SOD نخستین سد دفاعی در برابر گونه‌های فعال اکسیژن بوده و TAC ظرفیت کلی سیستم آنتی‌اکسیدانی را منعکس می‌کند، کاهش این دو شاخص همراه با افزایش MDA که محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی است، نشان‌دهنده غلبه فرآیندهای اکسیداتیو بر ظرفیت دفاعی سلول‌ها است (۳۱). این وضعیت می‌تواند با آسیب اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها و سایر اجزای سلولی همراه باشد و از مکانیسم‌های اصلی آسیب حلزون در کاهش شنوایی ناشی از صدا محسوب شود (۳۱). در همین راستا، تجویز روغن سیاه‌دانه در مطالعه حاضر با افزایش فعالیت SOD و TAC و کاهش سطح MDA در مقایسه با گروه مواجهه با صدای صورتی همراه بود که نشان‌دهنده بهبود وضعیت اکسیداتیو است. این یافته با خواص آنتی‌اکسیدانی شناخته‌شده روغن سیاه‌دانه مطابقت دارد (۳۲). مطالعات نشان داده‌اند که تیموکینون و متابولیت فعال آن (دی‌هیدروتیموکینون) با خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن، مهار پراکسیداسیون لیپیدی و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی درون‌زا، از آسیب اکسیداتیو جلوگیری می‌کنند. علاوه بر این، گزارش شده است که تیموکینون با بهبود جریان خون و اکسیژن‌رسانی بافتی، می‌تواند از آسیب حلزون ناشی از ایسکمی و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن جلوگیری کند (۳۳). همچنین، با توجه به نقش التهاب در پاتوژنز کاهش شنوایی ناشی از صدا، اثرات ضدالتهابی تیموکینون نیز ممکن است در کنار فعالیت

TAC و افزایش MDA می‌شود که بیانگر نقش استرس اکسیداتیو در آسیب شنوایی ناشی از صدا است. تجویز روغن سیاه‌دانه موجب کاهش تغییرات آستانه‌های ABR و بهبود شاخص‌های استرس اکسیداتیو شد، هرچند این اثر در تمامی فرکانس‌ها و زمان‌های ارزیابی از نظر آماری معنی‌دار نبود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که روغن سیاه‌دانه می‌تواند به‌عنوان یک مداخله کمکی، احتمالاً از طریق تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش آسیب اکسیداتیو در کاهش آسیب شنوایی ناشی از مواجهه با صدا نقش داشته باشد. با این حال، در شرایط این مطالعه حیوانی، اثرات محافظتی نسبی در برابر آسیب شنوایی ناشی از مواجهه با صدا نشان داده است. با این حال، با توجه به استفاده از دوز واحد و نبود گروه کنترل حامل، تعمیم این یافته‌ها به کاربردهای بالینی زودهنگام است و انجام مطالعات بیشتر برای تعیین دوز بهینه، مدت تجویز و بررسی مکانیسم‌های مولکولی این اثرات ضروری است.

REFERENCES

1. Fink D. What is the safe noise exposure level to prevent noise-induced hearing loss? J Expo Sci Environ Epidemiol. 2024.
2. Chen KH, Su SB, Chen KT. An overview of occupational noise-induced hearing loss among workers: epidemiology, pathogenesis, and preventive measures. Environ Health Prev Med. 2020;25(1):65.
3. Varela-Nieto I, Murillo-Cuesta S, Calvino M, Cediell R, Lassaletta L. Drug development for noise-induced hearing loss. Expert Opin Drug Discov. 2020;15(12):1457-71.
4. Gratton MA, Eleftheriadou A, Garcia J, Verduzco E, Martin GK, Lonsbury-Martin BL, et al. Noise-induced changes in gene expression in the cochlea of mice differing in their susceptibility to noise damage. Hear Res. 2011;277(1-2):211-26.
5. Waqas M, Gao S, Iram Us S, Ali MK, Ma Y, Li W. Inner Ear Hair Cell Protection in Mammals against the Noise-Induced Cochlear Damage. Neural Plast. 2018;2018:3170801.
6. Li P, Li S, Wang L, Li H, Wang Y, Liu H, et al. Mitochondrial

آنتی‌اکسیدانی آن در ایجاد اثرات محافظتی مشاهده‌شده نقش داشته باشد (۳۴).

از جمله محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به بررسی آستانه شنوایی در محدوده فرکانسی ۴ تا ۱۶ کیلوهرتز، استفاده از تک دوز روغن سیاه‌دانه و فقدان گروه گاوژ اشاره کرد. بنابراین، تغییرات احتمالی آستانه شنوایی در فرکانس‌های بالاتر و رابطه دوز پاسخ روغن سیاه‌دانه بررسی نشد و امکان تفکیک کامل اثرات احتمالی استرس ناشی از گاوژ از اثر روغن سیاه‌دانه نیز وجود نداشت. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، فرکانس‌های بالاتر، دوزهای مختلف روغن سیاه‌دانه و گروه گاوژ با حجم برنامه زمانی مشابه مورد بررسی قرار گیرند.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که مواجهه با صدای صوتی موجب افزایش آستانه‌های ABR و برهم خوردن تعادل اکسیدان آنتی‌اکسیدان، شامل کاهش SOD و

- dysfunction in hearing loss: Oxidative stress, autophagy and NLRP3 inflammasome. Front Cell Dev Biol. 2023;11:119773.
7. Manukyan AL. Noise as a cause of neurodegenerative disorders: molecular and cellular mechanisms. Neuro Sci. 2022;43(5):2983-93.
 8. Paciello F, Di Pino A, Rolesi R, Troiani D, Paludetti G, Grassi C, et al. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of caffeic acid: in vivo evidences in a model of noise-induced hearing loss. Food Chem Toxicol. 2020;143:111555.
 9. Ciesielska-Figlon K, Wojciechowicz K, Wardowska A, Lisowska KA. The Immunomodulatory Effect of Nigella sativa. Antioxidants (Basel). 2023;12(7).
 10. Ebuehi OAT, Olowojaiye AA, Erukainure OL, Ajagun-Ogunleye OM. Nigella sativa (black seed) oil ameliorates CCl₄-induced hepatotoxicity and mediates neurotransmitter levels in male Sprague Dawley albino rats. J Food Biochem. 2020;44(2):e13108.
 11. Salem NA, Mahmoud OM, Al Badawi MH, Gab-Alla AA. Role of Nigella sativa seed oil on corneal injury induced

- by formaldehyde in adult male albino rats. *Folia Morphol (Warsz)*. 2016;75(4):518-26.
12. Edizer DT, Yigit O, Cinar Z, Gul M, Kara E, Yigitcan B, et al. Protective role of intratympanic nigella sativa oil against gentamicin induced hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2017;97:83-8.
13. Hullfish H, Roldan LP, Hoffer ME. The Use of Antioxidants in the Prevention and Treatment of Noise-Induced Hearing Loss. *Otolaryngol Clin North Am*. 2022;55(5):983-91.
14. Culhaoglu B, Erbek SS, Erbek S, Hizal E. Protective Effect of Nigella Sativa Oil on Acoustic Trauma Induced Hearing Loss in Rats. *Audiol Res*. 2017;7(2):181.
15. Shuster B, Casserly R, Lipford E, Olszewski R, Milon B, Viechweg S, et al. Estradiol Protects against Noise-Induced Hearing Loss and Modulates Auditory Physiology in Female Mice. *Int J Mol Sci*. 2021;22(22).
16. Karami E, Goodarzi Z, Chahardoli R, Ghazi Khansari M, Kiani M, Shahtaheri SJ. Investigating the protective effects of aqueous extract of the wormwood plant (*Artemisia absinthium*) on alumina nanoparticle-induced pulmonary toxicity in male Wistar rats. *Journal of Health and Safety at Work*. 2022;12(2):288-308.
17. Rezaei-Hachesu V, Niri HH, Farahani S, Monazzam Esmaeelpour MR. Frequency-Based Analysis of Auditory Threshold Shifts Induced by Noise Color in Rats. *Journal of Health and Safety at Work*. 2023;13(2):236-51. [persian]
18. Tavanai E, Mohammadkhani G. Evaluation of the effects of chronic injection of D-galactose on auditory brainstem responses as a model for studying age-related hearing loss. *Acta Med Iran*. 2019:281-8.
19. Stoyanov M, Gunzburger M, Burkardt J. Pink noise, 1/f α noise, and their effect on solutions of differential equations. *Int J Uncertain Quantif*. 2011;1(3).
20. Yang M, De Coensel B, Kang J. Presence of 1/ f noise in the temporal structure of psychoacoustic parameters of natural and urban sounds. *J Acoust Soc Am*. 2015;138(2):916-27.
21. Yao W, Gao L, Su J, Karpeta N, Xie W, Duan M. Effects of lesions of the organ of corti on hearing. *Acta Otolaryngol*. 2022;142(2):118-26.
22. Harding GW, Bohne BA. Relation of focal hair-cell lesions to noise-exposure parameters from a 4-or a 0.5-kHz octave band of noise. *Hear Res*. 2009;254(1-2):54-63.
23. Natarajan N, Batts S, Stankovic KM. Noise-induced hearing loss. *Journal of clinical medicine*. 2023;12(6):2347.
24. Komur FN, Genc B, Cassinotti LR, Corfas G, Ciprut A, Yumusakhuylu AC. Noise-induced vestibular dysfunction in rats: longitudinal assessment using cVEMP and behavioral testing after low-frequency acoustic trauma. *Front Integr Neurosci*. 2025;19:1677019.
25. Fraenkel R, Freeman S, Sohmer H. The effect of various durations of noise exposure on auditory brainstem response, distortion product otoacoustic emissions and transient evoked otoacoustic emissions in rats. *Audiol Neurotol*. 2001;6(1):40-9.
26. Ryan AF, Kujawa SG, Hammill T, Le Prell C, Kil J. Temporary and Permanent Noise-induced Threshold Shifts: A Review of Basic and Clinical Observations. *Otology and Neurotology*. 2016;37(8):e271-e5.
27. Kitama T, Nishiyama T, Hosoya M, Shimanuki MN, Ueno M, You F, et al. Noise-Induced Hearing Loss: Overview and Future Prospects for Research on Oxidative Stress. *Int J Mol Sci*. 2025;26(10).
28. Sankaranarayanan C, Pari L. Thymoquinone ameliorates chemical induced oxidative stress and β -cell damage in experimental hyperglycemic rats. *Chem Biol Interact*. 2011;190(2-3):148-54.
29. Khalife K, Lupidi G. Reduction of hypervalent states of myoglobin and hemoglobin to their ferrous forms by thymoquinone: the role of GSH, NADH and NADPH. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(4):627-37.
30. Mahmoodzadeh Y, Mahmoudi J, Gorgani-Firuzjaee S, Mohtavinejad N, Namvaran A. Effects of N-acetylcysteine on noise exposure-induced oxidative stress and depressive-and anxiety-like behaviors in adult male mice. *Basic Clin Neurosci*. 2021;12(4):499.
31. Rosa AC, Corsi D, Cavi N, Bruni N, Dosio F. Superoxide dismutase administration: A review of proposed human uses. *Molecules*. 2021;26(7):1844.
32. Sakib R, Caruso F, Aktar S, Belli S, Kaur S, Hernandez M, et al. Antioxidant Properties of Thymoquinone, Thymohydroquinone and Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Seed Oil: Scavenging of Superoxide Radical Studied Using Cyclic Voltammetry, DFT and Single Crystal X-ray Diffraction. *Antioxidants (Basel)*. 2023;12(3).
33. Aslani MR, Saadat S, Boskabady MH. Comprehensive and updated review on anti-oxidant effects of *Nigella sativa*

- and its constituent, thymoquinone, in various disorders. Iran J Basic Med Sci. 2024;27(8):923-51.
34. Kohandel Z, Farkhondeh T, Aschner M, Samarghandian S. Anti-inflammatory effects of thymoquinone and its protective effects against several diseases. Biomed Pharmacother. 2021;138:111492.