



تحقیقی

اثر حفاظتی ویتامین E و عصاره آبی برگ آویشن بر سمیت سلولی ناشی از آمبودارون بر رده سلولی غیرسرطانی ریه (HLF) و رده سلولی سرطانی ریه (A549)

سارا رایزن^۱ ID، دکتر مهرآسا شادمانی^۲ ID، دکتر الهه قره خانی^۲ ID
دکتر محبوبه رحمتی کوکنده^۲ ID، دکتر محمد شکرزاده*^۳ ID

۱ دانشجوی داروسازی، دانشکده داروسازی، پردیس رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران. ۲ دکتری تخصصی سم شناسی، گروه داروسازی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. ۳ استاد، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. ۴ مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: آمبودارون یک داروی ضدآریمی موثر در آریمی‌های قلبی است که به دلیل وجود ید در ساختار آن تمایل به تجمع در بافت‌های چربی دوست از جمله ریه‌ها دارد که منجر به آسیب ریه و سایر عوارض مهم این دارو می‌شود. این مطالعه به منظور تعیین اثر حفاظتی ویتامین E و عصاره آبی برگ آویشن بر سمیت سلولی ناشی از آمبودارون بر رده سلولی غیرسرطانی ریه (HLF) و رده سلولی سرطانی ریه (A549) انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی تحلیلی روی رده سلولی غیرسرطانی ریه (HLF) و رده سلولی سرطانی ریه (A549) تهیه شده از انستیتو پاستور ایران در آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شد. گروه‌بندی رده سلولی سرطانی و غیرسرطانی ریه شامل کنترل منفی، کنترل مثبت (آمبودارون در غلظت IC_{50}) و گروه‌های تیمار شده با تیمین و ویتامین E در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکرومولار و گروه‌های تک تیمین و ویتامین E در غلظت ۵۰ میکرومولار به صورت سه تکرار و تعداد سلول‌ها 10^4 بودند. به منظور بررسی سمیت سلولی آمبودارون (۵/۶ میکرومولار) سنجش MTT (۴۸ ساعته)، ROS (۶ ساعته) و LPO (۴۸ ساعته) انجام شد.

یافته‌ها: افزودن آمبودارون به سلول‌های سرطانی و غیرسرطانی ریه منجر به کاهش معنی‌دار درصد بقای سلولی در سنجش MTT (در رده نرمال غلظت ۵۰ میکرومولار از تیمین و ویتامین E و در رده سرطانی غلظت ۲۰ میکرومولار تیمین و ویتامین E) و افزایش قابل توجه در مقدار ROS (رده نرمال در غلظت‌های ۲۰ و ۵۰ میکرومولار تیمین و ویتامین E و رده سرطانی در غلظت ۲۰ میکرومولار تیمین و ویتامین E) و MDA در سنجش LPO (رده نرمال در غلظت‌های ۲۰ و ۵۰ میکرومولار تیمین و ویتامین E و رده سرطانی در غلظت ۲۰ میکرومولار تیمین و ویتامین E) گردید ($P < 0/05$). افزودن مخلوطی از ویتامین E و عصاره آویشن در سلول‌های غیرسرطانی ریه مسموم با آمبودارون منجر به افزایش معنی‌دار بقای این سلول‌ها با IC_{50} و کاهش معنی‌دار MDA گردید ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: افزودن آمبودارون به سلول‌های سرطانی و غیرسرطانی ریه منجر به سمیت در این رده‌های سلولی می‌شود. افزودن ویتامین E و عصاره آویشن به سلول‌های تیمار شده با آمبودارون منجر به کاهش آسیب اکسیداتیو و افزایش درصد بقای سلولی بر روی سلول‌های غیرسرطانی ریه گردید.

واژه‌های کلیدی: آمبودارون، نئوپلاسم‌های ریه، آنتی‌اکسیدانت‌ها، ویتامین E، عصاره آویشن، برون تن

* نویسنده مسؤول: دکتر محمد شکرزاده، پست الکترونیکی: mshokrzadeh@mazums.ac.ir و mislamuk@yahoo.com

نشانی: ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده داروسازی، گروه سم شناسی و داروشناسی، تلفن: ۰۱۱-۳۳۰۴۴۰۰۰ داخلی ۲۰۳۸

وصول ۱۴۰۳/۱۰/۱۹ اصلاح نهایی ۱۴۰۴/۶/۱۹ پذیرش ۱۴۰۴/۶/۱۵ انتشار In Press

مقدمه

با رادیولوژیک (X-ray یا CT) و یا هردو می‌شود که می‌تواند دربرگیرنده عوارضی چون التهاب ریه، فیروز ریوی، ندول‌های ریوی، سندروم زجز تنفسی و سرطان ریه شود.^۱ در تمام خانواده‌های دارویی، داروهایی وجود دارند که می‌توانند منجر به بروز مسمومیت ریوی به عنوان یک عارضه جانبی شوند که

سمیت ریوی، یک نام کلی در ارتباط با تمام عوارض جانبی مرتبط با ریه است که عموماً توسط داروهای خاص و در برخی موارد توسط اشعه‌های رادیوتراپی و گردوغبار معلق در هوا بروز می‌کند.^۱ سمیت ریوی شامل طیف وسیعی از علائم و نشانه‌های بالینی

بینایی غیر اختصاصی (NSIP) از نوع سلولی یا فیبروتیک با بردن آلوئولها توسط ماکروفاژهای کف آلود یا پنومونی سازماندهی شونده یا آسیب منتشر آلوئولی و حتی فیروز بینایی ریه؛ می‌تواند الگوهای از «پنومونی بینایی معمول» یا هر ترکیبی از آنها بسته به بیمار و مرحله بیماری و احتمالاً نواحی بیوپسی ریه باشند.^{۱۱}

آنتی‌اکسیدانت‌ها ترکیباتی هستند که به‌وسیله مهار آغاز یا مهار انتشار واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون مانع اکسیداسیون مولکول‌های دیگر شده یا آنها را به تاخیر می‌اندازند.^{۱۲} ویتامین E یکی از ویتامین‌های محلول در چربی بوده و مهم‌ترین آنتی‌اکسیدانت محلول در چربی درون سلولی است که با قرار گرفتن روی بخش چربی غشای سلولی، فسفولیپیدهای اشباع نشده غشا را از تغییرات اکسیداتیو ناشی از انواع رادیکال‌های آزاد از طریق انتقال یک هیدروژن به رادیکال‌ها و تبدیل آنها به متابولیت‌های بی‌خطر، حفظ می‌کند.^{۱۳}

آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) یکی از گیاهان تیره نعناعیان (*Lamiaceae*) است که در نواحی مختلف مدیترانه و برخی نواحی آسیا می‌روید و امروزه در مناطق مختلف جهان و از جمله در ایران کشت و تولید می‌شود. اسانس، ماده موثره آویشن است که مایعی زرد یا قهوه‌ای مایل به قرمز تیره با بوی مطبوع قوی و طعم تند و پایدار و خنک‌کننده است که از تقطیر برگ‌ها و سرشاخه‌های گلدار به‌دست می‌آید. آویشن محتوی ۰/۸ تا ۲/۶ درصد (معمولاً یک درصد) اسانس است که قسمت اعظم آن ران‌فل‌ها، هیدروکربن‌های مونوترپنی و الکل‌ها تشکیل می‌دهند. تیمول جزء اصلی ترکیبات فنلی در گیاه آویشن است. روغن آویشن دارای خواص نظیر ضداسپاسم، بادشکن، ضدقارچی، ضدباکتریایی، ضدعفونی‌کننده، ضدکرم، ضدرماتیسم، خلط‌آور، آنتی‌اکسیدان، نگهدارنده طبیعی غذا و تاخیردهنده پیری پستانداران است.^{۱۴}

این مطالعه به منظور تعیین اثر حفاظتی ویتامین E و عصاره آبی برگ آویشن بر سمیت سلولی ناشی از آمیودارون بر رده سلولی سرطانی و غیرسرطانی ریه انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی تحلیلی روی رده سلولی غیرسرطانی ریه (HFL) و رده سلولی سرطانی ریه (A549) تهیه شده از انستیتو پاستور ایران در آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران طی سال ۱۴۰۳ انجام شد.

از DMSO، اتانول ۹۶ درصد، سرم تازه گاو، پنی‌سیلین، استرپتومایسین، کلرید کادمیوم، محیط کشت DMEM H.G، انیدرید سولفات سدیم، L-glutamine، گالیک اسید، هیپورین سدیم، فسفات سدیم مونوبازیک، فسفات سدیم دی‌بازیک و اسید استیک گلیسیل استفاده شد. همه مواد شیمیایی بجز استرپتومایسین، از سیگما آلدردیج

بیشتر مسمومیت ریوی ناشی از خانواده داروهای شیمی‌درمانی است.^{۴۳}

یکی از داروهای پرکاربرد اما با سمیت ریوی، آمیودارون است. آمیودارون برای اولین بار در سال ۱۹۶۱ ساخته شد و در سال ۱۹۶۲ برای درد قفسه‌سینه مرتبط با قلب مورد استفاده پزشکی قرار گرفت؛ ولی در سال ۱۹۶۷ به دلیل عوارض جانبی از بازار دارویی جمع شد. در سال ۱۹۷۴ مشخص گردید که برای آریتمی مفید است و دوباره معرفی شد. امروزه آمیودارون یک داروی ضدآریتمی از کلاس III است که برای درمان انواع آریتمی قلبی (بطنی و دهلیزی) مورد استفاده قرار می‌گیرد.^{۴۵} این دارو، مشتقی از Benzofuran است.^۶

مصرف طولانی‌مدت آمیودارون می‌تواند منجر به سه عارضه خطرناک شامل سمیت ریوی، سمیت کبدی و مشکل تیروئید شود.^۸ سمیت ریوی آمیودارون به شکل وابسته به دوز و آرام آرام پیشرفت می‌کند که شایع‌ترین علل مرگ و میر در بیماران مصرف‌کننده این دارو است.^۵ با توجه به خاصیت لیپوفیلیته بالای داروی آمیودارون به دلیل داشتن مقادیر بالای ید در ساختار خودش در بافت لیپوفیلی چون ریه تجمع می‌کند و منجر به بروز سمیت ریوی می‌شود که این سمیت با افزایش دوز، بیشتر می‌شود.^۹ با توجه به مکانیسم سمیت ریوی آمیودارون، این دارو در دو مسیر مختلف شامل مکانیسم غیرمستقیم با هجوم سلول‌های التهابی یا ایمنی به ریه و نیز مکانیسم مستقیم منجر به آسیب سلول‌های پارانشیمی ریه و متعاقباً پاسخ فیبروتیک می‌شود.^{۱۰} سمیت مستقیم برای سلول‌های اپیتلیال آلوئولی منجر به ویژگی‌های شایعی مانند تجمع ماکروفاژهای کف‌آلود و تکثیر سلول‌های اپیتلیال نوع II آلوئولی در فیروز ریوی ناشی از آمیودارون می‌شود. همچنین، این دارو می‌تواند به سلول‌های اندوتلیال عروقی و فیبروبلاست‌ها آسیب برساند. علاوه بر این، ممکن است تعادلی بین سلول‌های Th1 و Th2 ایجاد کند و تولید فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α) و فاکتور رشد تبدیل‌کننده بتا (TGF- β) توسط ماکروفاژهای آلوئولی را افزایش دهد و همچنین می‌تواند باعث آپوپتوز ناشی از آنژیوتانسین II در سلول‌های اپیتلیال آلوئولی شود. به این ترتیب، اندوتلیوم ریوی در معرض گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) قرار می‌گیرد که منجر به اختلال عملکرد اندوتلیال می‌شود و خود را با جذب لکوسیت‌ها، افزایش نفوذپذیری سلول‌های اپیتلیال، چسبندگی و تراگذاری، ترومبوز و سایر روش‌هایی که باعث شروع و گسترش التهاب می‌شوند؛ نشان می‌دهد. اتساع مویرگ‌های بینایی ممکن است اثر این دارو را در افزایش نفوذپذیری مویرگی و در نتیجه تشکیل ادم را توضیح دهد. ادم به سرعت پس از تجویز آمیودارون رخ داده و چند روز بعد منجر به نفوذ سلول‌های التهابی می‌شود. الگوهای ریوی که تحت عنوان «پنومونیت ناشی از آمیودارون» شناسایی می‌شوند؛ شامل پنومونی

و مرکب تهیه شدند. همچنین آمیودارون و ویتامین E از سیگما آلدریج تهیه شد. استریتومایسین از شرکت داروسازی زکریا تبریز تهیه شد. عصاره آبی آویشن در آزمایشگاه در شرایط کاملاً کنترل شده، استخراج گردید.

نمونه‌های خونی به هفت گروه مجزای یک میلی‌لیتری به شرح زیر تقسیم شدند.

(۱) گروه کنترل (حلال).

(۲) گروه آمیودارون با غلظت ۵/۶ میکرومولار.

(۳) گروه آویشن و ویتامین E با غلظت ۱۰ میکرومولار به همراه آمیودارون.

(۴) گروه آویشن و ویتامین E با غلظت ۲۰ میکرومولار به همراه آمیودارون.

(۵) گروه آویشن و ویتامین E با غلظت ۵۰ میکرومولار به همراه آمیودارون.

(۶) آویشن با غلظت نهایی ۵۰ میکرومولار.

(۷) ویتامین E با غلظت نهایی ۵۰ میکرومولار.

عصاره گیری: آویشن باغی دستچین شده و سپس توسط متخصص گیاه‌شناس تشخیص هراریوم به شماره SANRU-H-1186 انجام شد. برای تهیه عصاره آبی آویشن از روش خیساندن (Maceration) استفاده شد. آویشن پس از خشکاندن، به صورت دستی کاملاً پودر شد و ۵۰۰ گرم از این پودر خشک با آب مقطر مخلوط شد. به طوری که سطح آب مقطر چند سانتی‌متر بالاتر از سطح پودر بود. پس از گذشت ۲۴ ساعت، فاز بالای عصاره اولیه گیاه آویشن جدا و برداشته شد. سپس روی باقیمانده دوباره آب مقطر ریخته و مخلوط شد. این کار به مدت ۲ روز تکرار شد تا عصاره اولیه گیاه به‌طور کامل و تا حد امکان خالص استخراج شود. سپس عصاره اولیه در دستگاه تقطیر با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا آب آن به تدریج تبخیر و در نهایت ۱۰ گرم عصاره خشک آویشن برای انجام کارهای آزمایشگاهی به‌دست آمد. عصاره خشک حاصله درون ظروف کاملاً دربسته در شرایط دور از نور و رطوبت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تهیه محلول‌های با غلظت‌های مختلف از عصاره، با افزودن آب مقطر ۲ بار تقطیر به میزان مورد نیاز استفاده شد.^{۱۵}

کشت سلولی: ابتدا رده سلولی غیرسرطانی ریه در محیط کشت (DMEM H.G) با افزودن ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، L- glutamine با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی سیلین - استرپتومایسین کشت داده شد و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت کافی و میزان ۵ درصد دی‌اکسید کربن نگهداری گردید. زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند؛ توسط تریپسین-اِتلِن دی‌آمین

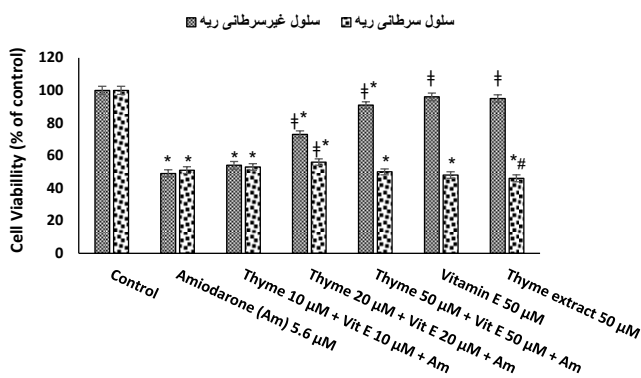
تترا استیک اسید (EDTA) از ته فلاسک جدا و در دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی در یک میلی‌لیتر محیط کشت به حالت سوسپانسیون تهیه و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریپان‌بلو با استفاده از لام هموسایتومتر و بررسی با میکروسکوپ نوری تعیین شدند. پس از حصول اطمینان از عدم آلودگی سلول‌ها، از سلول‌های با درصد زنده بودن بالای ۹۰ درصد برای انجام تست استفاده شد.^{۱۶}

همچنین رده سلولی سرطانی ریه (A549) جمع‌آوری شده از بافت کارسینومای ریه انسان با مورفولوژی اپیتلیال در محیط کشت DMEM H.G با افزودن DMEM به همراه ۱۰ درصد FBS کشت داده شدند. به میزان یک درصد آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین و استرپتومایسین) به این محیط اضافه شد و پلیت‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن نگهداری شد. پس از رسیدن به میزان رشد ۷۰ درصد سلولی، سلول‌ها توسط ۲۵ درصد تریپسین از سطح پلیت جدا شده و در پلیت‌های جدید پاساژ داده شدند. ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده را با مقدار مساوی از تریپتان‌بلو مخلوط کرده و روی لام هموسایتومتر قرار دادیم. سپس زیر میکروسکوپ نوری تعداد سلول‌های موجود شمارش شدند.^{۱۷}

تست MTT: به منظور بررسی سمیت سلولی آمیودارون (۵/۶ میکرومولار) و اثر حفاظتی مخلوط ویتامین E و آویشن (۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکرومولار) از تست MTT استفاده شد که بر مبنای تعیین درصد بقای سلول‌ها و شمارش سلولی است. اساس این روش مبتنی بر فعالیت میتوکندری بوده و فعالیت میتوکندریایی در سلول‌های زنده به‌صورت پایدار است. بنابراین افزایش یا کاهش تعداد سلول‌های زنده به‌صورت خطی با فعالیت میتوکندری در ارتباط است. رنگ تترازولیوم MTT در سلول‌های فعال (به لحاظ متابولیکی)، احیا می‌شود. در این روش، تشکیل رنگ به‌عنوان نشانگر سلول‌های زنده مورد استفاده قرار می‌گیرد.^{۱۸-۲۰} برای خوانش نتایج، از دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر استفاده شد. درصد زنده ماندن (viability) سلولی سرطانی و غیرسرطانی پس از مواجهه با عصاره آویشن و ویتامین E انجام شد. درصد زنده ماندن همان سلول‌های غیرسرطانی که در مجاورت با ترکیب مورد نظر دچار تخریب میتوکندری نشدند؛ نسبت به گروه شاهد و نیز سائوتوکیسیسته و قدرت مهارکنندگی رشد (IC₅₀) عصاره آویشن و ویتامین E (بعد از انجام تست MTT) با استفاده از نرم‌افزار آماری Prism-8 محاسبه شد.^{۲۱}

تست ROS: برای بررسی میزان ROS داخل سلول‌های تیمار شده با آمیودارون و آویشن و ویتامین E از ۷، ۲ دی کلرو هیدروفلورسین دی استات (DCFH-DA) استفاده شد. این محلول استوک در

آمیودارون و نیز به تنهایی (در دوز ۵۰ میکرومولار) منجر به اختلاف آماری معنی‌دار با گروه آمیودارون در غلظت IC_{50} شدند ($P < 0/001$). درصد زنده ماندن برای گروه تیمار شده با آمیودارون برابر با ۴۹ درصد، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۱۰ میکرومولار آویشن و ۱۰ میکرومولار ویتامین E برابر با ۵۴ درصد، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۲۰ میکرومولار آویشن و ۲۰ میکرومولار ویتامین E برابر با ۷۳ درصد، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۵۰ میکرومولار آویشن و ۵۰ میکرومولار ویتامین E برابر با ۹۱ درصد، برای گروه تیمار شده با ۵۰ میکرومولار ویتامین E برابر با ۹۶ درصد و برای گروه تیمار شده با ۵۰ میکرومولار آویشن برابر با ۹۵ درصد تعیین شد.



نمودار ۱: میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از تست MTT بر رده سلولی سرطانی و غیرسرطانی ریه
 * $P < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل
 † $P < 0/001$ در مقایسه با گروه آمیودارون در غلظت IC_{50}
 ‡ $P < 0/01$ در مقایسه با گروه آمیودارون در غلظت IC_{50}

نتایج حاصل از تست MTT بر رده سلول‌های سرطانی ریه در نمودار یک آمده است. آمیودارون میزان حیات سلولی سلول‌های سرطانی ریوی را تا ۵۰ درصد کاهش داد و از نظر آماری با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری بود ($P < 0/001$). اضافه شدن ویتامین E یا عصاره آویشن باغی در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکرومولار به سلول‌های سرطانی ریه تحت درمان با آمیودارون منجر به اختلاف معنی‌دار با گروه آمیودارون نشد و تا حدودی حیات سلولی سلول‌های سرطانی را افزایش داد. این درحالی است که عصاره گیاه آویشن به تنهایی در غلظت ۵۰ میکرومولار باعث کاهش حیات سلولی سلول سرطانی نسبت به گروه آمیودارون شد. با توجه به نمودار یک، به‌طور کلی می‌توان گفت در تست MTT، این سلول‌ها کاهش آماری معنی‌داری نسبت به حیات سلولی گروه کنترل داشتند ($P < 0/001$). درصد زنده ماندن برای گروه تیمار شده با آمیودارون برابر با ۵۱ درصد، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۱۰ میکرومولار آویشن و ۱۰ میکرومولار ویتامین E برابر با ۵۳ درصد، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه

۱۰ میلی‌مولار در DMSO تهیه و در دمای ۴ درجه نگهداری شد. سلول‌های انکوبه شده با داروهای موردنظر طبق پروتکل زمانی مشخص ۲ بار با HBSS شسته شدند. محلول کار DCFH-DA به صورت ۱۰۰ میکرومولار در HBSS از محلول استوک اولیه تهیه گردید. سپس محلول کار DCFH-DA به سلول‌ها اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شد. محلول DCFH-DA از محیط خارج شده و سپس سلول‌ها دو بار دیگر با HBSS شسته شدند. محلول لیز کننده سرد به سلول‌ها اضافه شده و پس از یک دقیقه محتویات چاهک‌ها جمع‌آوری شده و سانتریفیوژ شدند. ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی به دو چاهک از پلیت ۹۶ خانه منتقل شدند. اندازه‌گیری میزان فلورسنس توسط میکروپلیت ریدر (Emmission: 530 nm, Excitation: 480 nm) اندازه‌گیری شد.

تست LPO: یکی از آسیب‌های ناشی از حمله رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو در سطح مولکول‌ها، پراکسیداسیون لیپیدها است. در پاسخ به استرس اکسیداتیو، سطح مولکول‌های مشتق شده از شکستن اسیدهای چرب، نظیر هیدروپراکسیدها و آلدئیدهای لیپیدی افزایش می‌یابند.^{۲۳،۲۴} مولکول‌های مشتق شده از شکستن اسیدهای چرب، قابلیت واکنش با تیوباربتوریک اسید (TBA) را دارند. مهم‌ترین مولکول از این خانواده، مالون دی آلدئید (MDA) بوده که معمولاً به‌عنوان استاندارد استفاده می‌شود.^{۲۵،۲۶} کمپلکس بوجود آمده دارای رنگ ارغوانی بوده و در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارای حداکثر جذب نوری و در صورت استفاده از تکنیک فلورومتری، طول موج تهییجی ۵۱۵ نانومتر و طول موج نشی ۵۵۳ نانومتر است. با استفاده از مالون‌دی‌آلدئید به عنوان استاندارد، نتایج به‌صورت معادل میکرومول MDA گزارش می‌شود. با استفاده از تکنیک‌های کالریمتری و فلوریمتری میزان پراکسیداسیون لیپیدی با کیت‌های موجود سنجیده شد.^{۲۶}

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Graph pad Prism-8 تجزیه و تحلیل شدند. آنالیز داده‌ها با آزمون آماری One way ANOVA در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ انجام شد.

یافته‌ها

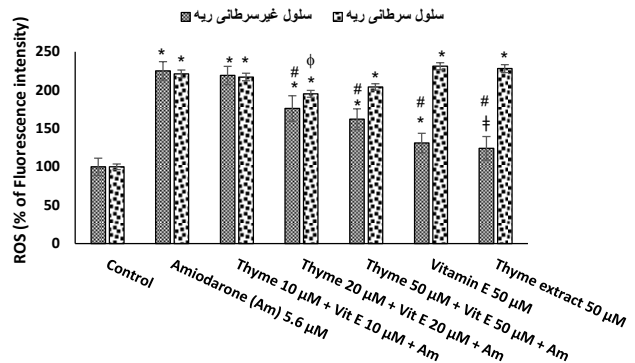
نتایج حاصل از تست MTT بر رده سلول‌های غیرسرطانی ریه در نمودار یک آمده است. داروی آمیودارون با دوز ۵/۶ میکرومولار منجر به کاهش ۵۰ درصدی و معنی‌دار درصد زنده ماندن (IC_{50}) در رده سلولی غیرسرطانی ریه نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0/001$). همچنین در گروه‌های تیمار شده با آمیودارون با اضافه شدن ترکیب آویشن باغی و ویتامین E در غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۵۰ میکرومولار، کاهش آماری معنی‌داری از درصد زنده ماندن نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($P < 0/001$). در حالی که ویتامین E و آویشن در دوزهای ۲۰ و ۵۰ میکرومولار در سلول‌های مواجهه یافته با

کردن ۲۰ و ۵۰ میکرومولار از آویشن و ویتامین E دارای کاهش معنی دار ROS نسبت به گروه آمیودارون در غلظت IC₅₀ شدند (P<۰/۰۰۱). در گروه دریافت کننده ۵۰ میکرومولار عصاره آویشن اختلاف معنی دار با گروه کنترل مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). سطح ROS نسبت به گروه کنترل، برای گروه تیمار شده با آمیودارون برابر با ۲۲۵ درصد، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۱۰ میکرومولار آویشن و ۲۱۹ درصد، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۲۰ میکرومولار آویشن و ۱۷۶ درصد، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۵۰ میکرومولار آویشن و ۱۶۲ درصد، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۱۰ میکرومولار ویتامین E برابر با ۱۳۱ درصد و برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۵۰ میکرومولار ویتامین E برابر با ۱۲۴ درصد تعیین شد.

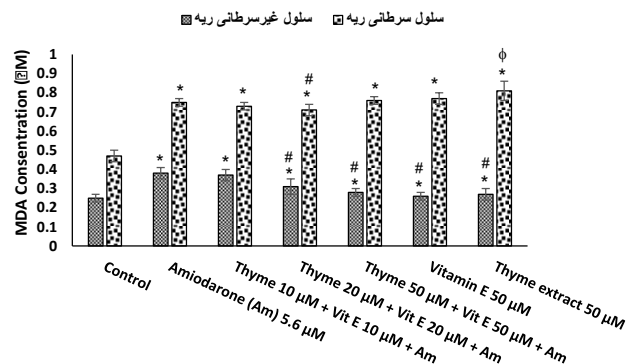
نتایج حاصل از ROS بر رده سلول‌های سرطانی ریه در نمودار ۲ آمده است. آمیودارون با غلظت ۵/۶ میکرومولار منجر به افزایش معنی دار غلظت ROS نسبت به گروه کنترل در رده سلولی سرطانی شد (P<۰/۰۰۱). همچنین سایر گروه‌های دریافت کننده این دارو که غلظت‌هایی از عصاره آویشن و ویتامین E دریافت کردند و گروه‌هایی که فقط آویشن یا ویتامین E دریافت کردند؛ دارای افزایش آماری معنی داری نسبت به گروه کنترل بودند (P<۰/۰۰۱). افزودن ۲۰ میکرومولار آویشن و ویتامین E به سلول‌های تیمار شده با آمیودارون سبب کاهش معنی دار نسبت به آمیودارون در غلظت IC₅₀ شد (P<۰/۰۰۱). سطح ROS نسبت به گروه کنترل برای گروه تیمار شده با آمیودارون برابر با ۲۲۱ درصد، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۱۰ میکرومولار آویشن و ۱۰ میکرومولار ویتامین E برابر با ۲۱۷ درصد، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۲۰ میکرومولار آویشن و ۱۹۵ درصد، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۵۰ میکرومولار آویشن و ۲۰۴ درصد، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۱۰ میکرومولار ویتامین E برابر با ۲۳۱ درصد و برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۵۰ میکرومولار آویشن برابر با ۲۲۸ درصد تعیین شد.

میزان لیپید پراکسیداسیون بر رده سلول‌های غیرسرطانی ریوی در نمودار ۳ آمده است. داروی آمیودارون با غلظت ۵/۶ میکرومولار منجر به افزایش معنی دار غلظت MDA در رده سلولی غیرسرطانی ریه نسبت به گروه کنترل شد (P<۰/۰۰۱). همچنین گروه‌های تیمار شده با آمیودارون که غلظت‌هایی از عصاره آویشن و ویتامین E اضافه شده بود؛ افزایش معنی دار سطح MDA نسبت به گروه کنترل داشت. این در حالی است که مخلوط آویشن و ویتامین E در غلظت‌های ۲۰ و ۵۰ میکرومولار، میزان MDA حاصل از LPO

۲۰ میکرومولار آویشن و ۲۰ میکرومولار ویتامین E برابر با ۵۶ درصد، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۵۰ میکرومولار آویشن و ۵۰ میکرومولار ویتامین E برابر با ۴۸ درصد، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۵۰ میکرومولار آویشن برابر با ۴۶ درصد تعیین شد.



نمودار ۲: میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از تست ROS بر رده سلولی سرطانی و غیرسرطانی ریه
* P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل
† P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل
P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه آمیودارون در غلظت IC₅₀
φ P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه آمیودارون در غلظت IC₅₀



نمودار ۳: میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از تست LPO بر رده سلولی سرطانی و غیرسرطانی ریه
* P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل
P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه آمیودارون در غلظت IC₅₀
φ P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه آمیودارون در غلظت IC₅₀

نتایج حاصل از ROS بر رده سلول‌های غیرسرطانی ریه در نمودار ۲ آمده است. داروی آمیودارون با غلظت ۵/۶ میکرومولار منجر به افزایش معنی دار میزان ROS در رده سلولی غیرسرطانی ریه نسبت به گروه کنترل شد (P<۰/۰۰۱). همچنین در گروه‌های دریافت کننده آمیودارون به همراه غلظت‌هایی از عصاره آویشن و ویتامین E و نیز فقط ویتامین E؛ افزایش معنی دار سطح ROS نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). سلول‌های تیمار شده با آمیودارون به اضافه

در نتیجه با کاهش زیست‌پذیری مواجه شدند که طبق نتایج به دست آمده درصد زنده‌مانی نسبت به گروه کنترل به صورت قابل توجهی کاهش نشان داد. علاوه بر آن، میزان ROS اندازه‌گیری شده در این سلول‌ها و نیز MDA حاصل از فرایند لیپید پراکسیداسیون در این گروه‌ها نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت. در مطالعه حاضر پس از اندازه‌گیری‌های تست‌های MTT، ROS و LPO می‌توان بیان کرد که آمیودارون موجب افزایش چشمگیر میزان گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در سلول‌ها، آسیب اکسیداتیو و در نتیجه مرگ سلول می‌گردد.

مطالعه Budin و همکاران نشان داد که مصرف آمیودارون می‌تواند منجر به بروز درجات مختلفی از سمیت ریوی شامل تنگی نفس پیشرونده، سرفه غیرمولد و صدای کراکل ریه شود.^{۲۷} در مطالعه Nacca و همکاران نیز تایید شد که مصرف آمیودارون خصوصاً در افراد با سابقه بیماری‌های ریوی می‌تواند منجر به بروز طیف گسترده‌ای از آسیب‌های ریه از تنگی نفس تا فیروز ریوی شود.^{۲۸}

مطالعه Card و همکاران نشان داد که ویتامین E با مهار بیان ژن تبدیل‌کننده فاکتور رشد Beta-1 بدون اختلال در عملکرد میتوکندری منجر به جلوگیری از آسیب‌های ریوی ناشی از آمیودارون شده است.^{۲۹} در مطالعه Arise و همکاران نیز مشخص شد که ویتامین E منجر به جلوگیری از بروز سمیت ریوی در موش‌های صحرائی قرار گرفته در معرض دود می‌شود.^{۳۰}

مطالعه Pandur و همکاران نشان داد که اسانس آویشن به‌واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی منجر به کاهش فاکتورهای IL-6، IL-8، IL-β و TNF-α می‌شود.^{۳۱} مطالعه Hussein و همکاران نشان داد که تیمول استخراج شده از آویشن به‌واسطه مهار واکنش‌های استرس اکسیداتیو، تعدیل سیگنالینگ miR-29a/TGF-β و PI3K/Akt منجر به جلوگیری از فیروز ریوی توسط بلنوماسین می‌شود.^{۳۲}

در مطالعه Soliman و همکاران عصاره برگ آویشن در محافظت از سلول‌های کبدی در برابر سدیم نیترات (NaNO₂) حاصل از استرس اکسیداتیو موثر بود.^{۳۳} مطالعه Kubatka و همکاران که روی فعالیت ضدسرطانی *Thymus vulgaris* بر سلول‌های سرطانی پستانی انجام شد؛ نشان داد که عصاره آویشن باعث بهبود اندازه تومور سلول 4T1 پستان موش صحرائی و نیز کاهش نسبی قسمت نکروز شده تومور شده است.^{۳۴} همچنین نتایج حاصل از اثر عصاره آویشن بر رده سلولی سرطانی ریه می‌تواند با نتایج تحقیق Zeng و همکاران^{۳۵} همسو باشد. نتایج مطالعه Zeng و همکاران در مورد اثر ضدتوموری تیمول موجود در آویشن باغی در متاستاز سلول‌های سرطانی روده بزرگ، نشان داد که این ماده می‌تواند تکثیر سلول، مهاجرت، تهاجم و تحول سلول‌های سرطانی اپیتلیال - مزانشیمال روده بزرگ را هم در *in-vitro* و هم *in-vivo* با غلظت IC₅₀ کمتر از

سلول‌های تیمار شده با آمیودارون را به‌طور چشمگیری کاهش داد که از نظر آماری این اختلاف از گروه آمیودارون در غلظت IC₅₀ معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). همچنین سلول‌هایی که جداگانه در معرض این دو ماده با غلظت‌های ۵۰ میکرومولار قرار گرفتند؛ از لحاظ میزان تولید MDA دارای کاهش قابل توجهی نسبت به گروه آمیودارون IC₅₀ بودند (P<۰/۰۰۱). مقدار LPO برای گروه کنترل برابر با ۰/۲۵ میکرومولار، برای گروه تیمار شده با آمیودارون برابر با ۰/۳۸ میکرومولار، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۱۰ میکرومولار آویشن و ۱۰ میکرومولار ویتامین E برابر با ۰/۳۷ میکرومولار، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۲۰ میکرومولار آویشن و ۲۰ میکرومولار ویتامین E برابر با ۰/۳۱ میکرومولار، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۵۰ میکرومولار آویشن و ۵۰ میکرومولار ویتامین E برابر با ۰/۲۸ میکرومولار، برای گروه تیمار شده با ۵۰ میکرومولار ویتامین E برابر با ۰/۲۶ میکرومولار و برای گروه تیمار شده با ۵۰ میکرومولار آویشن برابر با ۰/۲۷ میکرومولار تعیین شد.

میزان لیپید پراکسیداسیون بر رده سلول‌های سرطانی ریوی در نمودار ۳ آمده است. اضافه شدن آمیودارون با دوز ۵/۶ میکرومولار منجر به افزایش معنی‌دار غلظت MDA در رده سلولی سرطانی ریه نسبت به گروه کنترل شد (P<۰/۰۰۱). همچنین افزودن ویتامین E یا عصاره آویشن باغی به این سلول‌ها افزایش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل نشان داد (P<۰/۰۰۱). در مورد عصاره آویشن (۵۰ میکرومولار) به تنهایی این اثر به‌صورت افزایش معنی‌دار MDA نسبت به گروه آمیودارون بود (P<۰/۰۰۱). همچنین اضافه شدن ترکیب آویشن و ویتامین E در غلظت‌های ۲۰ میکرومولار در سلول‌های تیمار شده با آمیودارون باعث کاهش درصدی از MDA نسبت به گروه آمیودارون شد (P<۰/۰۰۱). مقدار LPO برای گروه کنترل برابر با ۰/۴۷ میکرومولار، برای گروه تیمار شده با آمیودارون برابر با ۰/۷۵ میکرومولار، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۱۰ میکرومولار آویشن و ۱۰ میکرومولار ویتامین E برابر با ۰/۷۳ میکرومولار، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۲۰ میکرومولار آویشن و ۲۰ میکرومولار ویتامین E برابر با ۰/۷۱ میکرومولار، برای گروه تیمار شده با آمیودارون به اضافه ۵۰ میکرومولار آویشن و ۵۰ میکرومولار ویتامین E برابر با ۰/۷۶ میکرومولار، برای گروه تیمار شده با ۵۰ میکرومولار ویتامین E برابر با ۰/۷۷ میکرومولار و برای گروه تیمار شده با ۵۰ میکرومولار آویشن برابر با ۰/۸۱ میکرومولار تعیین شد.

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، گروه‌های در مواجهه با آمیودارون در هر دو رده سلولی سرطانی و غیرسرطانی ریه با مکانیسم اکسیداتیو و

۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مهار کند.^{۳۵}

رامسر - دانشگاه علوم پزشکی مازندران با شماره IR.MAZUMS.RIB.REC.1402.113 قرار گرفت.

حمایت مالی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم سارا رایزن (شماره مصوب ۱۹۹۲۴) برای اخذ درجه دکتری عمومی در رشته داروسازی از پردیس خودگردان رامسر دانشگاه علوم پزشکی مازندران بود و مورد حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران قرار گرفته است.

مشارکت نویسندگان

سارا رایزن: انجام پروژه و جمع‌آوری داده‌ها.

دکتر مهرآسا شادمانی: انجام پروژه و جمع‌آوری داده‌ها.

دکتر الهه قره‌خانی: انجام پروژه، جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز داده‌ها، تفسیر نتایج و نوشتن نسخه اولیه مقاله.

دکتر محبوبه رحمتی کوننده: آنالیز داده‌ها و تفسیر نتایج.

دکتر محمد شکرزاده: مدیریت و طراحی پروژه و تایید نسخه نهایی مقاله.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض منافع وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولین پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و هیأت داوران پایان‌نامه که ما را در انجام و ارتقای این مطالعه یاری نمودند؛ سپاسگزاری می‌نماییم.

در مطالعه You و همکاران سمیت همزمان مصرف آمیودارون بر روی بافت ریه، کبد، چشم و غده تیروئید در یک بیمار ۶۱ ساله گزارش و نتیجه‌گیری شد که عوارض مصرف آمیودارون بایستی پایش گردد.^{۳۶}

در مطالعه بالینی Fatima و همکاران که روی ۶۷ بیمار ثبت شده تحت درمان با آمیودارون انجام شد؛ ۳۸ نفر هیچ عارضه جانبی نداشتند. داده‌های عوارض جانبی در بقیه گروه‌ها بر اساس سیستم اندامی تحت تأثیر قرار گرفت. به طوری که ۹ بیمار عوارض کلیوی، ۶ بیمار عوارض چشمی، ۴ بیمار عوارض غدد درون‌ریز و ۵ بیمار عوارض کبدی داشتند و هیچگونه عوارض ریوی مشاهده نشد.^{۳۷}

در مطالعه مرووری Şorodoc و همکاران مقادیر پیشنهادی برای مصارف روزانه آمیودارون به منظور کاهش خطرات آسیب به بافت‌های گوناگون از جمله بافت ریه ارائه شد.^{۳۸}

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن آمیودارون به سلول‌های سرطانی و غیرسرطانی ریه منجر به سمیت در این رده‌های سلولی می‌شود. افزودن ویتامین E و عصاره آویشن به سلول‌های تیمار شده با آمیودارون منجر به کاهش آسیب اکسیداتیو و افزایش درصد بقای سلولی بر روی سلول‌های غیرسرطانی ریه گردید.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش پردیس خودگردان

References

- Kodavanti UP. Respiratory toxicity biomarkers. In: Kodavanti U, Gupta R. Biomarkers in Toxicology. San Diego: Academic Press. 2014; pp: 217-39.
- Vogel J, Hui S, Hua CH, Dusenbery K, Rassiah P, Kalapurakal J, et al. Pulmonary Toxicity After Total Body Irradiation - Critical Review of the Literature and Recommendations for Toxicity Reporting. *Front Oncol.* 2021 Aug;11:708906. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.708906>.
- Laprise-Lachance M, Lemieux P, Grégoire JP. Risk of pulmonary toxicity of bleomycin and filgrastim. *J Oncol Pharm Pract.* 2019 Oct;25(7):1638-44. <https://doi.org/10.1177/1078155218804293>.
- Sadowska AM, Specenier P, Germonpre P, Peeters M. Antineoplastic therapy-induced pulmonary toxicity. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2013 Aug;13(8):997-1006. <https://doi.org/10.1586/14737140.2013.817684>.
- Fischer J, Ganellin CR. Analogue-based drug discovery. *Chemistry International--Newsmagazine for IUPAC.* 2010;32(4):5-12.
- Chokesuwattanaskul R, Shah N, Chokesuwattanaskul S, Liu Z, Thakur R. Low-dose Amiodarone Is Safe: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Innov Card Rhythm Manag.* 2020 Apr;11(4):4054-61. <https://doi.org/10.19102/icrm.2020.110403>.
- Singh BN. Amiodarone as paradigm for developing new drugs for atrial fibrillation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008 Oct;52(4):300-5. <https://doi.org/10.1097/fjc.0b013e31818914b6>.
- Vrobel TR, Miller PE, Mostow ND, Rakita L. A general overview of amiodarone toxicity: its prevention, detection, and management. *Prog Cardiovasc Dis.* 1989 May-Jun;31(6):393-426. [https://doi.org/10.1016/0033-0620\(89\)90016-9](https://doi.org/10.1016/0033-0620(89)90016-9).
- Wolkove N, Baltzan M. Amiodarone pulmonary toxicity. *Can Respir J.* 2009 Mar-Apr;16(2):43-48. <https://doi.org/10.1155/2009/282540>.
- Feduska ET, Thoma BN, Torjman MC, Goldhammer JE. Acute Amiodarone Pulmonary Toxicity. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2021 May;35(5):1485-94. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2020.10.060>.
- Mitrofan CE, Cretu A, Mitrofan C, Bar C, Ghiciuc CM. Amiodarone induced lung disease. *Arch Clin Cases.* 2022 Sep;9(3):126-32. <https://doi.org/10.22551/2022.36.0903.10217>.
- Shokrzadeh M, Rahmati Kukandeh M, Kargar Darabi N, Modanloo M, Fallah M, Mohammadpour A. [Cellular Effects of Naringin in Prevention of Genotoxicity Caused by Mifepristone on Human Blood Lymphocytes]. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2018; 28(161):115-20. [Article in Persian]
- Liu Q, Lanari MC, Schaefer DM. A review of dietary vitamin E supplementation for improvement of beef quality. *J Anim Sci.* 1995 Oct;73(10):3131-40. <https://doi.org/10.2527/1995.73103131x>.
- Naghdi Badi H, Makkizadeh M. [Review of common thyme]. *J. Med. Plants* 2003;2(7):1-12. [Article in Persian]
- Bina R, Heidari R, Mohammadzadeh M, ilkhani pour M. [Effects aqueous extract of thyme *Thymus vulgaris* L on blood biochemical parameters and liver tissue in rats under immobilization stress]. *Journal of Animal Research (Iranian*

- Journal of Biology). 2019; 32(1): 1-10. [Article in Persian]
16. Ghassemi-Barghi N, Varshosaz J, Etebari M, Jafarian Dehkordi A. Role of recombinant human erythropoietin loading chitosan-tripolyphosphate nanoparticles in busulfan-induced genotoxicity: Analysis of DNA fragmentation via comet assay in cultured HepG2 cells. *Toxicol In Vitro*. 2016 Oct;36:46-52. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.07.001>.
 17. Sundararajan R, Salameh T, Camarillo IG, Prabu RR, Natarajan A, Sankaranarayanan K. Irreversible electroporation: a drug-free cancer treatment. Sundararajan R. In: *Irreversible electroporation: a drug-free cancer treatment. Electroporation-Based Therapies for Cancer*. Cambridge: Woodhead Publishing. 2014; pp: 219-43.
 18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec;65(1-2):55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
 19. Sylvester PW. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol Biol*. 2011;716:157-68. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-012-6_9.
 20. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*. 2011;731:237-45. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20.
 21. Manosroi J, Dhumtanom P, Manosroi A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Lett*. 2006 Apr;235(1):114-20. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.04.021>.
 22. Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans*. 2001 May;29(Pt 2):358-62. <https://doi.org/10.1042/0300-5127:0290358>.
 23. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1991 Aug;288(2):481-87. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90224-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90224-7).
 24. Jenkins RR. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med*. 1988 Mar;5(3):156-70. <https://doi.org/10.2165/00007256-198805030-00003>.
 25. Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Aug;1366(1-2):53-67. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(98\)00120-0](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(98)00120-0).
 26. Meng XX, Wang RL, Gao S, Xie H, Tan JT, Qian YB. Effect of ulinastatin on paraquat-induced-oxidative stress in human type II alveolar epithelial cells. *World J Emerg Med*. 2013;4(2):133-37. <https://doi.org/10.5847/wjem.j.issn.1920-8642.2013.02.009>.
 27. Budin CE, Cocuz IG, Sabău AH, Niculescu R, Ianosi IR, Ioan V, et al. Pulmonary Fibrosis Related to Amiodarone-Is It a Standard Pathophysiological Pattern? A Case-Based Literature Review. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Dec;12(12):3217. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12123217>.
 28. Nacca N, Bhamidipati CM, Yuhico LS, Pinnamaneni S, Szombathy T. Severe amiodarone induced pulmonary toxicity. *J Thorac Dis*. 2012 Dec;4(6):667-70. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2012.06.08>.
 29. Card JW, Racz WJ, Brien JF, Massey TE. Attenuation of amiodarone-induced pulmonary fibrosis by vitamin E is associated with suppression of transforming growth factor-beta1 gene expression but not prevention of mitochondrial dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Jan;304(1):277-83. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.043208>.
 30. Arise RO, Olapade EO, Olufemi O, Yekeen AA. Taurine and vitamin E protect against pulmonary toxicity in rats exposed to cigarette smoke. *Scientific African*. 2021 Sep; 13: e00923. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00923>.
 31. Pandur E, Micalizzi G, Mondello L, Horváth A, Sipos K, Horváth G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Essential Oils Prepared at Different Plant Phenophases on *Pseudomonas aeruginosa* LPS-Activated THP-1 Macrophages. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Jul;11(7):1330. <https://doi.org/10.3390/antiox11071330>.
 32. Hussein RM, Arafa EA, Raheem SA, Mohamed WR. Thymol protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis via abrogation of oxidative stress, inflammation, and modulation of miR-29a/TGF-β and PI3K/Akt signaling in mice. *Life Sci*. 2023 Feb;314:121256. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121256>.
 33. Soliman MM, Aldhahrani A, Metwally MMM. Hepatoprotective effect of *Thymus vulgaris* extract on sodium nitrite-induced changes in oxidative stress, antioxidant and inflammatory marker expression. *Sci Rep*. 2021 Mar;11(1):5747. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85264-9>.
 34. Kubatka P, Uramova S, Kello M, Kajo K, Samec M, Jasek K, et al. Anticancer Activities of *Thymus vulgaris* L. in Experimental Breast Carcinoma in Vivo and in Vitro. *Int J Mol Sci*. 2019 Apr;20(7):1749. <https://doi.org/10.3390/ijms20071749>.
 35. Zeng Q, Che Y, Zhang Y, Chen M, Guo Q, Zhang W. Thymol Isolated from *Thymus vulgaris* L. Inhibits Colorectal Cancer Cell Growth and Metastasis by Suppressing the Wnt/β-Catenin Pathway. *Drug Des Devel Ther*. 2020 Jul;14:2535-47. <https://doi.org/10.2147/dddt.s254218>.
 36. You HS, Yoon JH, Cho SB, Choi YD, Kim YH, Choi W, et al. Amiodarone-Induced Multi-Systemic Toxicity Involving the Liver, Lungs, Thyroid, and Eyes: A Case Report. *Front Cardiovasc Med*. 2022 Feb;9:839441. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.839441>.
 37. Fatima N, Mandava K, Khatoun F, Badar J, Begum SF, Narasimhan C, et al. CLINICAL Profile and Side Effects of chronic use of oral Amiodarone in cardiology outpatients department (CLIPSE-A Study)- A prospective observational study. *Ann Med Surg (Lond)*. 2022 Jul;80:104167. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.104167>.
 38. Şorodoc V, Indrei L, Dobroghii C, Asaftei A, Ceasovschiu A, Constantin M, et al. Amiodarone Therapy: Updated Practical Insights. *J Clin Med*. 2024 Oct;13(20):6094. <https://doi.org/10.3390/jcm13206094>.