



Synergistic Effects of Carvacrol and Thymol on Docetaxel-Induced Cytotoxicity in the A549 Cell Line by Evaluating Cell Viability and Oxidative Stress

Mohammad Shokrzadeh (Ph.D)^{1,2} , Mahboube Rahmati Kukandeh³ 

Mohammad Karami (Ph.D)¹ , Samane Sadat Besharat^{*4} 

¹ Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. ² Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. ³ Ph.D Candidate in Toxicology, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. ⁴ Pharmacy Student, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

Research Article

Abstract

Background and Objective: Docetaxel is an effective chemotherapy drug for treating lung cancer, but its side effects and cytotoxicity limit its use. Natural compounds like carvacrol and thymol, known for their anti-cancer and anti-inflammatory properties, have gained attention as adjunct agents to reduce toxicity and enhance the efficacy of chemotherapy drugs. This study aimed to investigate the impact of carvacrol and thymol on cell viability and function in A549 cancer cells exposed to docetaxel.

Methods: This experimental study was conducted on the epithelial cell line derived from lung cancer tissue (A549), obtained from the Pasteur Institute of Iran at the Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences in the year 1042. In this research, A549 cells were pre-treated with various concentrations of carvacrol and thymol (5, 10, 20, 40, 80, 100, and 200 µg/mL) along with a cytotoxic dose of docetaxel (8.92 µg/mL) over a period of 48 hours. Cytotoxicity was assessed using the MTT assay. Additionally, the levels of reactive oxygen species (ROS) in cells were measured using the DA-DCFH reagent, and malondialdehyde (MDA) levels were determined using the thiobarbituric acid (TBA) reagent.

Results: Carvacrol and thymol significantly reduced the cytotoxic effects of docetaxel at concentrations ranging from 5 to 200 µg/mL ($P < 0.05$). The evaluation of cytotoxicity indicated that at a concentration of 200 µg/mL, carvacrol and thymol exhibited a more pronounced enhancing effect ($98.11 \pm 1.64\%$) compared to the concentration of 5 µg/mL ($54.64 \pm 2.03\%$). Furthermore, these compounds significantly mitigated the oxidative stress induced by docetaxel by decreasing the production of reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) ($P < 0.05$). Specifically, at the concentration of 200 µg/mL, the levels of ROS and MDA were ($13.57 \pm 0.09\%$) and ($0.55 \pm 0.003\%$), respectively, in contrast to the levels at 5 µg/mL, which were ($20.50 \pm 0.59\%$) and ($0.98 \pm 0.01\%$). This demonstrates a notable inhibitory effect on the growth of cancer cells by carvacrol and thymol.

Conclusion: Carvacrol and thymol demonstrate high potential as compounds to improve cell function and reduce the cytotoxicity induced by docetaxel in A549 cancer cells. These findings suggest the potential enhancement of chemotherapy regimens for cancer treatment.

Keywords: Docetaxel, Carvacrol, Thymol, Oxidative Stress, Lipid Peroxidation

*Corresponding Author: Samane Sadat Besharat, E-mail: samanbst39@gmail.com



Received 2 Aug 2024

Received in revised form 17 Nov 2024

Accepted 23 Dec 2024

Available Online 3 Jul 2025

Cite this article as: Shokrzadeh M, Rahmati Kukandeh M, Karami M, Besharat SS. [Synergistic Effects of Carvacrol and Thymol on Docetaxel-Induced Cytotoxicity in the A549 Cell Line by Evaluating Cell Viability and Oxidative Stress]. J Gorgan Univ Med Sci. 2025; 27(2): 70-82. <http://dx.doi.org/10.21859/JGorganUnivMedSci.27.2.70>. [Article in Persian]





Introduction

Lung cancer is the second most common cancer diagnosis by gender, following prostate cancer in men and breast cancer in women.

The two main pathological subtypes of lung cancer are non-small cell lung cancer (NSCLC) and small cell lung cancer (SCLC). SCLC is an aggressive disease with distinct pathological, clinical, and molecular characteristics, differentiating it from NSCLC. It has a high metastatic potential, which leads to a poor clinical prognosis. NSCLC accounts for the majority of lung cancer cases. Depending on the stage of the cancer, patients are eligible for specific treatments ranging from surgery to radiation therapy, chemotherapy, and targeted therapy. Various classes of drugs have been approved by the United States Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of lung cancer. Among the most common is docetaxel (DTX), a highly effective chemotherapeutic agent used in the treatment of various cancers, including NSCLC. DTX, an anticancer drug belonging to the taxane family, is a semi-synthetic agent that irreversibly binds to β -actin, thereby altering microtubule polymerization, disrupting cell mitosis, and inducing apoptosis. Chemotherapeutic agents, including taxanes, are associated with severe complications, such as renal and neurotoxicity. DTX has been utilized for a long time in the treatment of several cancer types, including glioblastoma, breast cancer, and prostate cancer. However, this drug exhibits numerous adverse effects on normal tissues, such as the brain and testes. Severe complications, such as bone marrow suppression, alopecia, anaphylaxis, gastrointestinal reactions, weakness, edema, and liver dysfunction, may occur following DTX administration. Limitations, including a high recurrence rate and adverse effects like immune system damage and gastrointestinal tract injury, necessitate the discovery of novel therapeutic strategies for lung cancer. Several studies indicate that DTX-induced toxicity is caused by the overproduction of reactive oxygen species (ROS). There is also evidence suggesting that inflammation and apoptosis may play crucial roles in DTX-induced tissue toxicity. Therefore, there is a continuous search for materials that can be used to create more effective cancer treatments with fewer complications. One promising group of materials comprises natural products. Many medicinal plants have scientifically proven therapeutic properties.

Phenolic compounds are a widely studied group of compounds known for their antimicrobial and antioxidant properties. Thymol (2-isopropyl-5-methylphenol) is a major phenolic compound found in the essential oil of various plants, including *Thymus vulgaris* (Lamiaceae). Numerous biological properties have been reported for thymol, including anti-inflammatory, antibacterial, antispasmodic, wound-healing, and antioxidant effects. It is also an active compound for inhibiting cancer cells. Thymol is a major phenolic compound present in the essential oil of *Thymus vulgaris*. Carvacrol is a naturally bioactive monoterpenoid phenol found in the essential oils of the Lamiaceae family, including the genera *Origanum* and *Thymus*. Previous studies have shown that carvacrol possesses anti-angiogenic, analgesic, antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory properties. Furthermore, carvacrol exerts antiproliferative effects on liver, lung, colon, and breast cancer cell lines. These two compounds also demonstrate antifungal, insecticidal, antiviral, antitumor, antiparasitic, free radical scavenging, and lipid antiperoxidative activities. These characteristics form the basis for their widespread use in the cosmetic, food, and pharmaceutical industries.

Research reveals that carvacrol can elevate the levels of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), and glutathione (GSH). Studies have also confirmed that thymol, when its

concentration is increased, exhibits significant antioxidant potential. It effectively blocks the excessive production of ROS, inhibits lipid peroxidation (LPO), and prevents the loss of membrane integrity. Given the established antioxidant and protective effects of carvacrol and thymol, and their ability to inhibit free radicals, this study was conducted to determine the synergistic effects of carvacrol and thymol on DTX-induced cytotoxicity in A549 cell line by evaluating cell viability and oxidative stress. This was achieved by evaluating cell viability and oxidative stress.

Methods

This descriptive-analytical study was conducted on the A549 lung cancer cell line (derived from lung cancerous tissue) at the Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences.

Cellular Culture: In this study, A549 cell lines were purchased from the National Genetic Resources Cell Bank. The cell lines were cultured in the Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Biowest, France) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, USA) and 1% penicillin-streptomycin antibiotic. Cells were maintained in an incubator at 37°C with adequate humidity and 5% carbon dioxide. For various experiments, when cell confluence reached at least 70-80%, cells were detached from the flask bottom using trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), without any shaking or tapping of the flask, and then centrifuged at 2000 rpm for 5 minutes. The resulting cell pellet was resuspended in 1 mL of culture medium, and the viability percentage of cells in the cell suspension was determined by mixing equal parts of trypan blue and counting with a hemocytometer under a light microscope. After confirming the absence of cell contamination, cells with a viability percentage greater than 80-90% were used for the test.

Study Design: In the initial step, DTX was used as a cytotoxic model and applied to A549 cells across a concentration range of 0-70 $\mu\text{g/mL}$, increasing from low to high concentrations in order to determine the optimal cytotoxic concentration of DTX for oxidative stress assays (ROS and LPO) and to establish its inhibitory concentration (IC₅₀) on the studied cell line. Subsequently, after determining the optimal cytotoxic concentration of DTX, the protective effects of carvacrol and thymol were investigated in seven groups with varying concentrations (5-200 $\mu\text{g/mL}$) alongside DTX at its IC₅₀ concentration in all tests, using a pre-treatment approach.

Grouping was performed as follows:

- The negative control group (consisting of A549 cells + DMEM culture medium)
- The positive control group (consisting of DTX at its IC₅₀ concentration)
- Treatment groups (consisting of 7 concentrations of carvacrol [5, 10, 20, 40, 80, 100, and 200 $\mu\text{g/mL}$] combined with DTX at its IC₅₀ concentration)
- Treatment groups (consisting of 7 concentrations of thymol ([5, 10, 20, 40, 80, 100, and 200 $\mu\text{g/mL}$] combined with DTX at its IC₅₀ concentration)
- The synergistic effective concentration (consisting of 7 concentrations of thymol and carvacrol [5, 10, 20, 40, 80, 100, and 200 $\mu\text{g/mL}$] combined with DTX at its IC₅₀ concentration).

Cytotoxicity Assessment: This was performed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay.

Reactive Oxygen Species Level Measurement: Cells were treated with DTX alone and as a pre-treatment with thymol and carvacrol, and then examined.



Lipid Peroxidation Level Measurement: Following cell incubation, LPO levels were measured using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay.

Results

Determination of Docetaxel IC50 Value: DTX, a cytotoxic drug, was used to treat A549 cells across a concentration range of 0-70 µg/mL (from low to high concentrations) to determine the inhibitory concentration (IC50) of DTX on the studied cell line. The IC50 value for A549 cells when treated with DTX was determined to be 8.92 µg/mL.

The Effect of Carvacrol on Cell Function in Docetaxel-Treated A549 Cells: According to the results obtained from the MTT assay, the cell function and viability in DTX-treated cells showed a significant decrease, which was statistically significant compared to the control group ($P < 0.001$). Carvacrol, at concentrations of 10, 20, 40, 80, 100, and 200 µg/mL, culminated in improved cell function and increased viability in DTX-treated cells. This improvement was statistically significant compared to the DTX-only group ($P < 0.01$ for 10 µg/mL and $P < 0.001$ for 20, 40, 80, 100, and 200 µg/mL). However, carvacrol at a concentration of 5 µg/mL did not significantly affect cell function improvement or viability increase in DTX-treated cells.

The Effect of Thymol on Cell Function in Docetaxel-Treated A549 Cells: Thymol, at concentrations of 20, 40, 80, 100, and 200 µg/mL, improved cell function and increased viability in DTX-treated A549 cells compared to the DTX-alone group ($P < 0.01$ for 20 µg/mL and $P < 0.001$ for 40, 80, 100, and 200 µg/mL), showing a significant difference. At concentrations of 5 and 10 µg/mL, thymol did not show any significant effect on improving cell function or increasing viability in DTX-treated cells.

The Simultaneous Effects of Carvacrol and Thymol on Cell Function in Docetaxel-Treated A549 Cells: Carvacrol and thymol, at concentrations of 5, 10, 20, 40, 80, 100, and 200 µg/mL, led to an improvement in cell function and viability in DTX-treated A549 cells. This improvement was significantly different compared to the DTX-only group ($P < 0.01$ for 5 µg/mL, and $P < 0.001$ for 10, 20, 40, 80, 100, and 200 µg/mL).

The Effects of Carvacrol and Thymol on Reactive Oxygen Species Formation in Docetaxel-Treated A549 Cells: ROS formation was investigated in DTX-treated A549 cells and varying concentrations of carvacrol and thymol after 24 hours of incubation at 37°C. DTX, at a concentration of 8.92 µg/mL, significantly increased ROS levels in normal cells, showing a statistically significant difference compared to the control group ($P < 0.001$). However, carvacrol and thymol, at concentrations of 5, 10, 20, 40, 80, 100, and 200 µg/mL, significantly reduced ROS formation and oxidative damage in treated cells. This reduction was notably different when compared to the DTX-treated groups ($P < 0.01$ for 5 µg/mL and $P < 0.001$ for 10, 20, 40, 80, 100, and 200 µg/mL concentrations). Moreover, carvacrol and thymol, at concentrations of 40, 80, 100, and 200 µg/mL, significantly reduced ROS formation and oxidative damage in the treated cells, with this reduction being statistically significant when compared to the control group ($P < 0.01$ for 5 µg/mL and $P < 0.001$ for 10, 20, 40, 80, 100, and 200 µg/mL).

The Effects of Carvacrol and Thymol on Lipid Peroxidation Levels in Docetaxel-Treated A549 Cells: A significant increase in LPO levels was observed in DTX-treated cells so that LPO levels

in the DTX-treated groups were significantly different compared to the control group ($P < 0.001$). In carvacrol- and thymol-treated cells, at concentrations of 5, 10, 20, 40, 80, 100, and 200 µg/mL, the LPO levels were significantly reduced compared to the DTX-treated groups ($P < 0.01$ for 5 µg/mL and $P < 0.001$ for 10, 20, 40, 80, 100, and 200 µg/mL concentrations).

Conclusion

Based on the findings of our study, DTX significantly increased markers of oxidative stress (ROS) and LPO (malondialdehyde [MDA]), while decreased viability compared to the control group. In contrast, treatment with carvacrol at concentrations of 10, 20, 40, 80, 100, and 200 µg/mL culminated in improved cell function and increased viability in DTX-treated cells, showing a significant difference when compared to the DTX-only group. However, at a concentration of 5 µg/mL of carvacrol, no significant change was observed in viability of treated cells. Regarding thymol, concentrations of 20, 40, 80, 100, and 200 µg/mL led to improved cell function and increased viability in DTX-treated cells, showing a significant difference compared to the DTX-only group. Conversely, regarding carvacrol, at concentrations of 5 and 10 µg/mL, no statistically significant change was observed in the viability of treated cells. Simultaneous incubation with carvacrol and thymol at concentrations of 5, 10, 20, 40, 80, 100, and 200 µg/mL significantly improved cell viability and reduced oxidative stress changes in A549 cells compared to the DTX-treated groups.

Given that the current study was conducted on A549 cells, higher concentrations of thymol and carvacrol were effective in reducing oxidative stress. A greater reduction in oxidative stress was also observed commensurate with increasing concentrations of these compounds. In the present study, thymol and carvacrol exhibited similar therapeutic effects on DTX-treated A549 cells, while carvacrol did not demonstrate significant antioxidant effects at low concentrations. It reduced ROS and LPO at higher concentrations.

Ethical Statement

The study received approval from the Research Ethics Committee at Mazandaran University of Medical Sciences (IR.MAZUMS.REC.1402.375).

Funding

This article has been extracted from doctoral dissertation of Ms. Samaneh Sadat Besharat in Pharmacy from the Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences. This study was funded by the Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences.

Authors' Contributions

Mohammad Shokrzadeh: Project administration and design and approval of the final manuscript.

Mahboube Rahmati Kukandeh: Data analysis and interpretation of the results.

Mohammad Karami: Project administration and design.

Samane Sadat Besharat: Project execution, data collection, and drafting of the initial manuscript.

Conflicts of Interest

No conflicts of interest.

Carvacrol and thymol are effective as high-potential compounds in improving cell function and reducing DTX-induced cytotoxicity in A549 cancer cells.



تحقیقی

اثر هم افزایی کارواکروئول و تیمول بر سمیت سلولی ناشی از دوستاکسل در رده سلولی A549 با ارزیابی حیات سلولی و استرس اکسیداتیو

دکتر محمد شکرزاده^۱  ، محبوبه رحمتی کوکنده^۲ ، دکتر محمد کرمی^۳ ، سمانه سادات بشارت^۴ 

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

چکیده

زمینه و هدف: دوستاکسل یکی از داروهای شیمی درمانی موثر برای درمان سرطان ریه است؛ اما اثرات جانبی و سمیت سلولی آن محدودیت هایی در کاربرد آن ایجاد کرده است. ترکیبات طبیعی مانند کارواکروئول و تیمول به دلیل خواص ضدسرطانی و ضدالتهابی به عنوان عوامل کمکی برای کاهش سمیت و افزایش اثربخشی داروهای شیمی درمانی مورد توجه قرار گرفته اند. این مطالعه به منظور تعیین اثر هم افزایی کارواکروئول و تیمول بر سمیت سلولی ناشی از دوستاکسل در رده سلولی A549 با ارزیابی حیات سلولی و استرس اکسیداتیو انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی تحلیلی روی رده سلولی اپتلیال مشتق شده از بافت سرطانی ریه (A549) در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران طی سال ۱۴۰۲ انجام شد. سلول های A549 تحت پیش تیمار با غلظت های مختلف کارواکروئول و تیمول (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) با دوز آسیب زای دوستاکسل (۸/۹۲ میکروگرم بر میلی لیتر) در بازه زمانی ۴۸ ساعت قرار گرفتند. سمیت سلولی توسط تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین برای سنجش میزان ROS سلول با معرف DA-DCFH و میزان MDA با استفاده از معرف تیوباربیتریک اسید (TBA) انجام شد.

یافته ها: کارواکروئول و تیمول اثرات سیتوتوکسیک دوستاکسل را در غلظت های ۲۰۰-۵ میکروگرم بر میلی لیتر کاهش دادند ($P < 0.05$). ارزیابی سمیت سلولی نشان داد که کارواکروئول و تیمول در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (9.1 ± 11.64 درصد) نسبت به غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر (54.7 ± 16.03 درصد) اثر افزایشی بارزتری از خود نشان دادند. از طرفی این دو ترکیب به طور معنی دار استرس اکسیداتیو ناشی از دوستاکسل را از طریق کاهش تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) و مالون دی آلدید (MDA) اعمال کردند ($P < 0.05$). به طوری که در غلظت ۲۰۰ میزان ROS و MDA به ترتیب 13.07 ± 0.09 درصد و 0.55 ± 0.03 درصد نسبت به غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر (20.50 ± 0.59 درصد و 0.70 ± 0.01) اثر مهاري بارزتری بر رشد سلول های سرطانی از خود نشان دادند.

نتیجه گیری: کارواکروئول و تیمول به عنوان ترکیبات پتانسیل بالا در بهبود عملکرد سلولی و کاهش سمیت سلولی ناشی از دوستاکسل در سلول های سرطانی A549 موثر ارزیابی شدند.

واژه های کلیدی: دوستاکسل، کارواکروئول، تیمول، استرس اکسیداتیو، لیپید پراکسیداسیون

* نویسنده مسؤول: سمانه سادات بشارت، پست الکترونیکی: samanbst39@gmail.com

نشانی: ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده داروسازی، گروه سم شناسی و داروشناسی، تلفن: ۰۱۱-۳۴۵۴۲۰۵۷

وصول	۱۴۰۳/۵/۱۵	اصلاح نهایی	۱۴۰۳/۸/۲۷	پذیرش	۱۴۰۳/۱۰/۳	انتشار	۱۴۰۴/۴/۱۴
------	-----------	-------------	-----------	-------	-----------	--------	-----------

مقدمه

می دهند.^۲ سرطان ریه سلول کوچک (SCLC) یک بیماری تهاجمی با ویژگی های پاتولوژیک، بالینی و مولکولی متمایز از سرطان ریه غیرسلول کوچک است و دارای پتانسیل متاستاتیک بالایی است که منجر به پیش آگهی بالینی ضعیف می شود.^۳ سرطان ریه NSCLC اکثر موارد سرطان ریه را تشکیل می دهد. بسته به مرحله سرطان ریه، بیماران واجد شرایط درمان های خاصی از جراحی گرفته تا پرتودرمانی و شیمی درمانی و نیز درمان هدفمند هستند.^۴ تحقیقات به طور مداوم برای

سرطان ریه پس از سرطان پروستات برای مردان و سرطان پستان برای زنان، دومین تشخیص شایع سرطان بر اساس جنسیت است.^۱ دو ساب تایپ اصلی سرطان ریه از نظر آسیب شناختی شامل non-small-cell lung cancer (NSCLC) و small-cell lung cancer (SCLC) است که به ترتیب ۷۶ درصد و ۱۲ درصد از کل موارد سرطان ریه در ایالات متحده را تشکیل

ضداسپاسم، ترمیم زخم و آنتی اکسیدانی است و همچنین یک ترکیب فعال برای مهار سلول های سرطانی است.^{۱۸-۱۵} تیمول یک ترکیب فنلی اصلی است که در اسانس آویشن ولگاریس وجود دارد. کارواکروئول یک فنل مونوترپنئیدی فعال زیستی طبیعی است که در اسانس های خانواده *Lamiaceae* از جمله جنس *Origanum* و *Thymus* یافت می شود.^{۱۵} مطالعات قبلی نشان داده اند کارواکروئول دارای خواص ضد رگ زایی، ضد درد، آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد التهابی است. علاوه بر این، کارواکروئول اثر ضد تکثیر بر رده های سلولی سرطان کبد، ریه، روده بزرگ و سینه دارد.^{۱۹} این دوترکیب، فعالیت ضد قارچی، حشره کشی، ضد ویروس، ضد تومور، ضد انگلی، حذف کننده رادیکال های آزاد و عوامل ضد پراکسیداتیو لپیدی نیز از خود نشان می دهند که اساس استفاده گسترده از این ترکیبات در صنایع آرایشی و بهداشتی، غذایی و دارویی است.^{۲۰-۲۲}

طبق تصمیم کمیسیون اروپا به طور کلی به عنوان ترکیبات ایمن و به عنوان مواد طعم دهنده شناخته می شوند.^{۲۳} بنابر تحقیقات کارواکروئول می تواند سطوح سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلو تاتیون پراکسیداز (GPx)، گلو تاتیون ردو کتاز (GR) و گلو تاتیون (GSH) را افزایش دهد.^{۲۲} در مطالعات تایید شده است زمانی که غلظت تیمول افزایش یابد؛ پتانسیل آنتی اکسیدانی خود را نشان داده و تولید بیش از حد گونه های اکسیژن فعال (ROS)، پراکسیداسیون لپیدی و از دست دادن یکپارچگی غشاء را مسدود می کند.^{۲۴، ۲۵} در نتیجه با توجه به اثرات آنتی اکسیدانی و محافظتی کارواکروئول و تیمول و اثر آنها بر مهار رادیکال های آزاد؛ این مطالعه به منظور تعیین اثر هم افزایی کارواکروئول و تیمول بر سمیت سلولی ناشی از دوستاکسل در رده سلولی A549 با ارزیابی حیات سلولی و استرس اکسیداتیو انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی تحلیلی روی رده سلولی اپیتلیال مشتق شده از بافت سرطانی ریه (A549) در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران طی سال ۱۴۰۲ انجام شد.

کشت سلول: در مطالعه حاضر، رده سلولی A549 از بانک سلولی ذخایر ملی ژنتیک خریداری شدند. رده سلولی در محیط کشت DMEM (Biowest، فرانسه) با افزودن ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) (Gibco، آمریکا) و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین کشت داده شدند و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت کافی و میزان ۵ درصد دی اکسید کربن نگهداری شدند. برای انجام تست های مختلف، زمانی که سلول ها حداقل به ۸۰-۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند؛ توسط تریپسین-اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) از ته فلاسک (بدون هیچگونه shake و ضربه به فلاسک حاوی سلول) جدا شدند. سپس در دور ۲۰۰۰ rpm به مدت

یافتن راه حلی بهتر در درمان سرطان ریه انجام می شود. دسته های مختلفی از داروها توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده برای درمان سرطان ریه تأیید شده اند که یکی از رایج ترین آنها دوستاکسل (Docetaxel: DTX) است که یک داروی شیمی درمانی بسیار موثر در درمان انواع مختلف سرطان از جمله سرطان ریه سلول غیر کوچک NSCLC است.^۵ دوستاکسل یک داروی ضد سرطان، متعلق به خانواده تاکسان ها است و یک ماده نیمه مصنوعی است که به طور برگشتناپذیر به بتا-اکتین متصل می شود و در نتیجه پلیمریزاسیون میکروتوبول را تغییر می دهد و میتوز سلول را مختل می کند و باعث آپوپتوز می شود.^۶ عوامل شیمی درمانی از جمله تاکسان ها دارای عوارض جانبی جدی مانند سمیت کلیوی و عصبی هستند. DTX برای مدت طولانی در درمان چندین نوع سرطان از جمله گلیوبلاستوما، پستان و پروستات استفاده شده است؛ اما این دارو اثرات نامطلوب زیادی در بافت های طبیعی مانند مغز و بیضه دارد.^۷ عوارض جانبی جدی مانند سرکوب مغز استخوان، آلویسی، آنافیلاکسی، واکنش گوارشی، ضعف، ادم و آسیب عملکرد کبد ممکن است پس از مصرف دوستاکسل رخ دهد. محدودیت هایی از جمله میزان عود بالا و عوارض جانبی مانند آسیب ایمنی و آسیب دستگاه گوارش، یافتن استراتژی درمانی جدید برای سرطان ریه را ضروری ساخته است.^{۸، ۹} چندین مطالعه نشان می دهند که سمیت دوستاکسل با تولید بیش از حد گونه های اکسیژن فعال (ROS) ایجاد می شود. همچنین شواهدی وجود دارد که التهاب و آپوپتوز می تواند نقش حیاتی در سمیت بافتی ناشی از دوستاکسل ایفا کند.^{۱۰، ۱۱} بنابرین، جستجوی مداوم برای یافتن موادی وجود دارد که می توانند برای ایجاد درمان های مؤثرتر، با عوارض جانبی کمتر، برای استفاده در برابر سرطان استفاده شوند. یک گروه امیدوارکننده از مواد، محصولات طبیعی هستند. گیاهان دارویی زیادی وجود دارند که خواص دارویی آنها به طور علمی اثبات شده است. با این حال، تنوع بسیار زیاد طبیعت هنوز بسیاری از ترکیبات گیاهی را بدون مطالعات کافی، به ویژه در حوزه انکولوژی باقی گذاشته است.^{۱۲}

ترکیبات فنلی یک گروه از ترکیبات مورد مطالعه گسترده هستند که به دلیل خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی شناخته شده اند. فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی در چندین مطالعه آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفته و به عنوان جذب کننده رادیکال های آزاد عمل می کنند.^{۱۳} پتانسیل آنتی اکسیدانی آنها به تعداد و آرایش گروه های هیدروکسیل و میزان ترکیب ساختار بستگی دارد.^{۱۴} تیمول (۲-ایزوپروپیل-۵-متیل فنول) یک ترکیب فنلی اصلی است که در اسانس گیاهان مختلف از جمله *Thymus vulgaris* (*Lamiaceae*) وجود دارد.^{۱۵، ۱۶} خواص بیولوژیکی فراوانی برای تیمول گزارش شده که شامل اثرات ضد التهابی، ضد باکتریایی،

به هر چاهک اضافه شد تا فورمازان حل شود. جذب نوری کلنی‌های سلولی در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه ELISA reader اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری میزان ROS: سلول‌ها با دوستاکسل به‌تنهایی و به‌صورت پیش‌درمان با تیمول و کارواکرول تیمار شده و طبق پروسه زیر بررسی شدند.

محلول استوک DCFH-DA به صورت ۱۰ میلی‌مولار در DMSO تهیه و در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. محلول لیز کننده اختصاصی برای تست ROS تهیه شد. سلول‌های انکوبه شده با داروهای موردنظر طبق پروتکل زمانی مشخص دو بار با HBSS شسته شدند. محلول کار DCFH-DA به صورت ۱۰۰ میکرومولار در HBSS از محلول استوک تهیه شد و به سلول‌ها اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس محلول DCFH-DA از محیط خارج و سلول‌ها دو بار دیگر با HBSS شسته شدند. محلول لیز کننده سرد به سلول‌ها اضافه و پس از یک دقیقه محتویات چاهک‌ها جمع‌آوری و سانتریفیوژ شد. ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی به دو چاهک از پلیت ۹۶ خانه منتقل شد. میزان فلورسانس توسط میکروپلیت ریدر (Excitation: 485 nm, Emission: 530 nm) اندازه‌گیری شد. در تمام مراحل، سلول‌ها در مکان تاریک قرار داشتند. H_2O_2 ۰/۱ میلی‌مولار به عنوان کنترل مثبت و سلول‌های انکوبه شده با محیط کشت به تنهایی به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند.

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدی: پس از انکوباسیون سلول‌ها، میزان پراکسیداسیون لیپیدی براساس روش تیوبایتوریک اسید اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب معرف TBA به سوسپانسیون سلولی اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم انکوبه شد. بعد از سرد شدن، n-بوتانل به نمونه اضافه و سانتریفیوژ شد. لایه n-بوتانل برای سنجش در طول موج ۵۳۲ nm جدا شده و مقدار TBARS از روی منحنی استاندارد محاسبه شد.

آنالیز آماری: برای مقایسه IC50ها از نرم‌افزار آماری Prism Ver.8 استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ به روش رگرسیون غیرخطی (nonlinear Regression) و مقایسه داده‌ها با روش آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و Tukey-Kramer multiple comprehension test انجام شد.

یافته‌ها

تعیین میزان IC50 داروی دوستاکسل: بر اساس نمودار یک، داروی دوستاکسل به‌عنوان مدل سایتوتوکسیک در غلظت‌های (۷۰-۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با دامنه غلظتی کم به زیاد بر سلول‌های A549 تیمار شد تا میزان غلظت مهار (IC50) این ترکیب بر رده سلولی مورد مطالعه تعیین شد. مقدار IC50 سلول‌های A549 در مواجهه با

۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی در یک میلی‌لیتر محیط کشت به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی با مخلوط شدن نسبت مساوی از تریپان بلو با استفاده از لام هموسایتومتر و بررسی با میکروسکوپ نوری تعیین شد. پس از حصول اطمینان از عدم آلودگی سلول‌ها، از سلول‌های با درصد زنده بودن بالای ۹۰-۸۰ درصد برای انجام تست استفاده شد.^{۲۶}

طراحی مطالعه: در گام اول داروی دوستاکسل به‌عنوان مدل سایتوتوکسیک در غلظت‌های (۷۰-۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)^{۲۷} با دامنه غلظتی کم به زیاد بر سلول‌های A549 تیمار شد تا میزان غلظت اپتیم سمی در تست‌های استرس اکسیداتیو (ROS و LPO) و مهار (IC50) این ترکیب بر رده سلولی مورد مطالعه تعیین گردید. در ادامه پس از به‌دست آوردن غلظت اپتیم سمی داروی دوستاکسل، اثرات محافظتی کارواکرول و تیمول در ۷ گروه با غلظت‌های متفاوت (۵-۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)^{۱۹} به‌همراه دوستاکسل در غلظت IC50 در همه تست‌ها به‌صورت pre-treatment مورد بررسی قرار گرفتند.

گروه‌بندی به شرح زیر انجام شد:

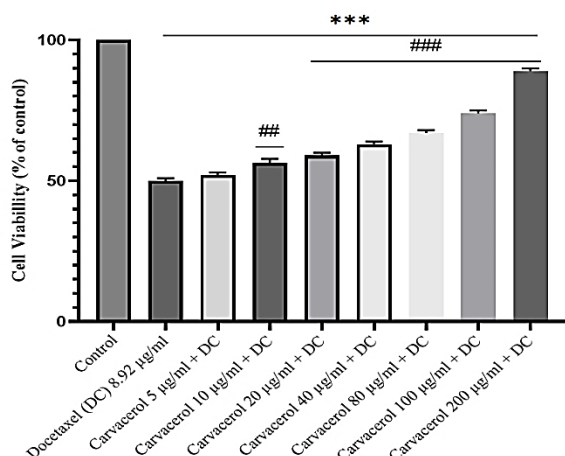
گروه کنترل منفی شامل سلول‌های A549+ محیط کشت DMEM. گروه کنترل مثبت شامل دوستاکسل در غلظت IC50. گروه‌های درمانی شامل ۷ غلظت از کارواکرول (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌همراه دوستاکسل در غلظت IC50.

گروه‌های درمانی شامل ۷ غلظت از تیمول (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌همراه دوستاکسل در غلظت IC50.

غلظت موثر هم‌افزایی شامل ۷ غلظت از تیمول و کارواکرول (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌همراه دوستاکسل در غلظت IC50.

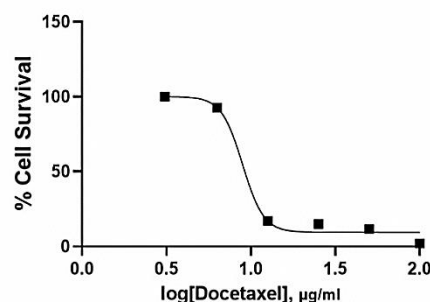
ارزیابی سمیت سلولی با استفاده از روش MTT: روش MTT براساس کاهش نمک زرد رنگ MTT توسط آنزیم‌های ردوکتاز میتوکندریایی به فورمازان ارغوانی نامحلول در سلول‌های زنده است. در مرحله پیش‌درمان، تیمول و کارواکرول ۲۴ ساعت قبل از داروی مدل دوستاکسل به پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای اضافه شدند. هر چاهک حاوی 10^4 سلول و ۹۰ میکرولیتر محیط کشت بود و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند تا سلول‌ها به مرحله رشد لگاریتمی رسیدند. سپس، ترکیبات مورد مطالعه به چاهک‌ها اضافه و پلیت‌ها برای ۴۸ ساعت دیگر انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، محیط کشت خارج و سلول‌ها سه مرتبه با نرمال سالین شستشو داده شدند. به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه و پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. سپس، محلول MTT خارج و ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO

(نمودار ۴ و جدول یک). ($P < 0.001$)



نمودار ۲: میانگین و انحراف معیار اثر غلظت‌های مختلف کارواکرول بر میزان زیست‌پذیری سلولی در سلول‌های مواجهه یافته با دوستاکسل
*** دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($P < 0.001$)

داروی دوستاکسل، دوز ۸/۹۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.



IC50 = 8.92 µg/ml

نمودار ۱: اثر سایتوتوکسیک‌سیتة داروی دوستاکسل بر روی سلول‌های A549

اثر کارواکرول بر میزان عملکرد سلولی در سلول‌های A549 مواجهه یافته با دوستاکسل: با توجه به نتایج حاصل از تست MTT، میزان زیست‌پذیری و عملکرد سلولی در سلول‌های مواجهه یافته با دوستاکسل کاهش قابل توجهی داشت که از نظر آماری با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری بود ($P < 0.001$). کارواکرول در غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر منجر به بهبود عملکرد سلولی و افزایش زیست‌پذیری در سلول‌های مواجهه یافته با دوستاکسل شد که نسبت به گروه دوستاکسل دارای اختلاف معنی‌داری شد (غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر $P < 0.001$ و غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر $P < 0.001$). کارواکرول در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث اثر معنی‌داری بر بهبود عملکرد سلولی و افزایش زیست‌پذیری در سلول‌های مواجهه یافته با دوستاکسل نشد (نمودار ۲).

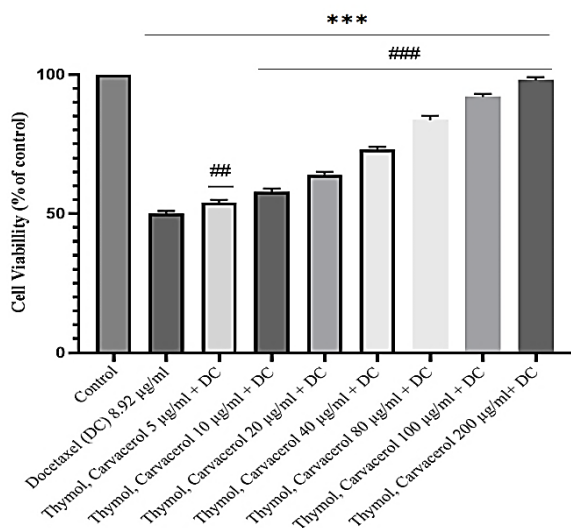
اثر تیمول بر میزان عملکرد سلولی در سلول‌های A549 مواجهه یافته با دوستاکسل: تیمول در غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر منجر به بهبود عملکرد سلولی و افزایش زیست‌پذیری در سلول‌های مواجهه یافته با دوستاکسل شد که نسبت به گروه دوستاکسل دارای اختلاف معنی‌داری شد (غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر $P < 0.001$ و غلظت‌های ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر $P < 0.001$). تیمول در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث اثر معنی‌داری بر بهبود عملکرد سلولی و افزایش زیست‌پذیری در سلول‌های مواجهه یافته با دوستاکسل نشد (نمودار ۳).

اثر کارواکرول و تیمول بر میزان شکل‌گیری ROS در سلول‌های A549 مواجهه یافته با دوستاکسل: میزان شکل‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های A549 تیمار شده با دوستاکسل و غلظت‌های مختلف کارواکرول و تیمول پس از ۲۴ ساعت انکوبه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. دوستاکسل با غلظت ۸/۹۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب افزایش چشمگیر میزان گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های نرمال شد که نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری شد ($P < 0.001$). در حالی که کارواکرول و تیمول

اثر همزمان کارواکرول و تیمول بر میزان عملکرد سلولی در سلول‌های A549 مواجهه یافته با دوستاکسل: کارواکرول و تیمول در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر منجر به بهبود عملکرد سلولی و افزایش زیست‌پذیری در سلول‌های مواجهه یافته با دوستاکسل شد که نسبت به گروه دوستاکسل دارای اختلاف معنی‌داری شد (غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر $P < 0.001$ و غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

جدول ۱: میزان میانگین و انحراف معیار گروه‌های کنترل و غلظت‌های مختلف از کارواکروئول و تیمول به همراه دوستاکسل در دوز IC50 بر رده سلولی A549 با روش MTT، اندازه‌گیری میزان ROS و LPO

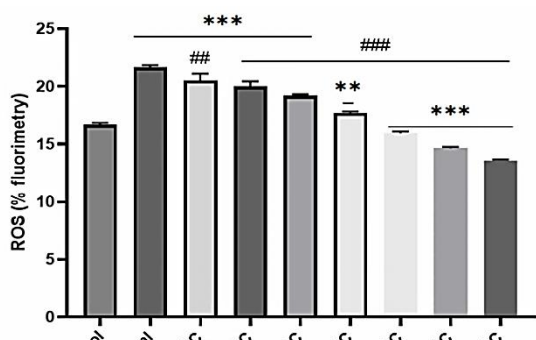
روش	گروه‌ها	میانگین و انحراف معیار رده سلولی A549
روش MTT	کنترل	۱۰۰±۱/۰۰
	دوستاکسل در دوز IC50	۴۹/۶۷±۱/۵۲
	کارواکروئول + تیمول (۵ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	۵۴/۶۴±۲/۰۳
	کارواکروئول + تیمول (۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	۵۸/۴۴±۱/۶۸
	کارواکروئول + تیمول (۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	۶۴/۴۹±۱/۷۸
	کارواکروئول + تیمول (۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	۷۳/۲۰±۱/۳۱
	کارواکروئول + تیمول (۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	۸۴/۳۱±۲/۴۷
	کارواکروئول + تیمول (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	۹۲/۴۲±۱/۲۴
	کارواکروئول + تیمول (۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	۹۸/۱۱±۱/۶۴
اندازه‌گیری میزان ROS	کنترل	۱۶/۶۷±۰/۱۶
	دوستاکسل در دوز IC50	۲۱/۶۷±۰/۱۶
	کارواکروئول + تیمول (۵ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	۲۰/۵۰±۰/۵۹
	کارواکروئول + تیمول (۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	۲۰/۰۰±۰/۴۴
	کارواکروئول + تیمول (۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	۱۹/۲۰±۰/۱۱
	کارواکروئول + تیمول (۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	۱۷/۷۰±۰/۱۱
	کارواکروئول + تیمول (۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	۱۵/۹۲±۰/۱۶
	کارواکروئول + تیمول (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	۱۴/۶۳±۰/۱۱
	کارواکروئول + تیمول (۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	۱۳/۵۷±۰/۰۹
اندازه‌گیری میزان LPO	کنترل	۰/۵۵±۰/۰۰۵
	دوستاکسل در دوز IC50	۱/۰۲±۰/۰۰۵
	کارواکروئول + تیمول (۵ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	۰/۹۸±۰/۰۱۹
	کارواکروئول + تیمول (۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	۰/۹۶±۰/۰۱۴
	کارواکروئول + تیمول (۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	۰/۹۴±۰/۰۰۳
	کارواکروئول + تیمول (۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	۰/۸۹±۰/۰۰۳
	کارواکروئول + تیمول (۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	۰/۸۳±۰/۰۰۵
	کارواکروئول + تیمول (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	
	کارواکروئول + تیمول (۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به همراه دوستاکسل در دوز IC50	



نمودار ۴: میانگین و انحراف معیار اثر کارواکروئول و تیمول در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر میزان زیست‌پذیری سلولی در سلول‌های مواجهه یافته با دوستاکسل
*** دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($P<0/001$)

در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ بر میلی لیتر به‌طور قابل توجهی باعث کاهش میزان شکل‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن و آسیب اکسیداتیوی در سلول‌های مواجهه یافته شد که در هنگام مقایسه با گروه‌های تیمار شده با دوستاکسل دارای تفاوت معنی‌داری شد (غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر $P<0/01$ و غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر $P<0/001$). همچنین کارواکروئول و تیمول در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ بر میلی لیتر به‌طور قابل توجهی باعث کاهش میزان شکل‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن و آسیب اکسیداتیوی در سلول‌های مواجهه یافته شد که در هنگام مقایسه با گروه کنترل دارای تفاوت معنی‌داری شد (غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر $P<0/01$ و غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر $P<0/001$) (نمودار ۵ و جدول یک).

اثر کارواکروئول و تیمول بر میزان لیپید پراکسیداسیون در سلول‌های A549 مواجهه یافته با دوستاکسل: در سلول‌های مواجهه یافته با دوستاکسل افزایش میزان قابل توجه LPO در سلول‌ها



افزایش مارکرهای استرس اکسیداتیو (ROS)، لیپید پراکسیداسیون (MDA) و کاهش زیست پذیری (Bioavailability) در مقایسه با گروه کنترل شد. درحالی که تیمار با کارواکروئول در غلظت های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر منجر به بهبود عملکرد سلولی و افزایش زیست پذیری در سلول های مواجهه یافته با دوستاکسل شد که نسبت به گروه دوستاکسل دارای اختلاف معنی داری بود. در حالی که در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر کارواکروئول، تغییر معنی داری در زیست پذیری سلول های مواجهه یافته مشاهده نشد. در مورد تیمول نیز، غلظت های ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر منجر به بهبود عملکرد سلولی و افزایش زیست پذیری در سلول های مواجهه یافته با دوستاکسل شد که نسبت به گروه دوستاکسل دارای اختلاف معنی داری شد. در حالی که در غلظت های ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر کارواکروئول، تغییر آماری معنی داری در زیست پذیری سلول های مواجهه یافته مشاهده نشد. انکوباسیون همزمان کارواکروئول و تیمول در غلظت های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به صورت چشمگیری باعث بهبود زیست پذیری سلول ها و کاهش تغییرات استرس اکسیداتیو نسبت به گروه های مواجهه یافته با دوستاکسل در سلول های A549 شد.

سرطان ریه یک رشد غیرقابل کنترل سلولی در بافت ریه است که با تغییرات در سلول ها، تغییرات اپی ژنتیکی و ژنتیکی، فعال سازی آنکوژن ها و تکامل کلونال سلول های بدخیم همراه است. مهم ترین عامل خطر برای سرطان ریه، سیگار کشیدن است که ۸۰ تا ۸۵ درصد از موارد را شامل می شود. سایر دلایل ابتلا به سرطان ریه (۱۵ تا ۲۰ درصد) شامل عوامل ژنتیکی، قرارگیری در معرض دود سیگار دست دوم، آلودگی هوا، تابش، گازهای خطرناک و مواد شیمیایی خارجی است. استراتژی های رایج در درمان سرطان ریه شامل شیمی درمانی، پرتودرمانی و جراحی هستند. با این حال، این روش ها عوارض جانبی مختلفی از جمله سمیت قابل توجه، کارایی محدود و مقاومت چندارویی دارند. گیاهان و محصولات مشتق از گیاهان نقش مؤثری در درمان و پیشگیری از سرطان ریه ایفا کرده اند. به طوری که می توانند عوامل معمول را حساس تر کرده، زمان بقا را افزایش داده؛ عوارض جانبی شیمی درمانی را کاهش داده؛ به بهبود فیزیولوژیکی کمک نموده و کیفیت زندگی بیماران مبتلا به بدخیمی های ریوی را ارتقا دهند.^{۲۸}

در مطالعه Erdogan و Ozkan اثر کارواکروئول و تیمول بر روی رده سلول سرطانی ریه (H1299) پرداخته شد. کارواکروئول و تیمول از سلول ها در برابر سمیت سلولی ناشی از H₂O₂ و آسیب غشاء و DNA محافظت نمود و زیست پذیری سلول ها را افزایش داد.^{۲۹} در مطالعه حاضر برای ارزیابی سمیت سلولی از دوستاکسل با غلظت اپتیمم ۸/۹۲

مشاهده شد. به طوری که میزان LPO در گروه های تیمار شده با دوستاکسل نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف معنی داری شد ($P < 0.001$). در سلول های تیمار شده با کارواکروئول و تیمول در غلظت های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به صورت چشمگیری میزان LPO را نسبت به گروه های مواجهه یافته با دوستاکسل کاهش داد (غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر $P < 0.001$ و غلظت های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر $P < 0.001$) (نمودار ۶ و جدول یک).

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، دوستاکسل به طور معنی داری باعث

مشخص شد کارواکرویل به طور قابل توجهی باعث بهبود عملکرد سلولی و افزایش زیست پذیری سلول های در معرض خردل شد. همچنین درمان دو ماهه با کارواکرویل سلول های التهابی و نشانگرهای زیستی اکسیدان را کاهش داد و نشانگرهای زیستی آنتی اکسیدانی را افزایش داد و آزمایش های PFT را در بیماران در معرض خردل سولفور را بهبود بخشید.^{۳۷} در مطالعه Palabiyik و همکاران که بر روی اثر تیمول و کارواکرویل در بهبود اثرات سمی استامینوفن با مهار آسیب اکسیداتیو و التهاب ناشی از استامینوفن در رده سلولی HepG2 انجام گردید؛ مشخص شد تیمول و کارواکرویل با افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و کاهش سیتوکین های التهابی مانند فاکتور نکروز تومور α و اینترلوکین $\beta 1$ در برابر سمیت ناشی از استامینوفن در سلول های HepG2 محافظت می کنند. مصرف تیمول با دوز بالا و درمان کارواکرویل اثری نزدیک به N-استیل سیستین در سمیت استامینوفن دارد؛ اما تیمول اثر درمانی بهتری نسبت به کارواکرویل داشت.^{۳۸} این در حالی بود که در مطالعه حاضر تیمول و کارواکرویل اثر درمانی مشابهی بر روی سلول های A549 مواجهه یافته با دواستاکسل داشتند. در مطالعه Hassan و همکاران تجویز تیمول در موش های صحرایی نر و یستار، فعالیت محافظتی امیدوارکننده ای را در برابر سرطان روده بزرگ با کاهش قابل توجه سطح سرمی نشانگرهای تومور مرتبط با کولون، کربوهیدرات آنتی ژن ۱۹-۹ (CA 19) و آنتی ژن کارسینوم برونیک (CEA)، و همچنین نشانگر آپوپتوز، کاسپاز-۳ در مقایسه با گروه سرطان روده بزرگ به دنبال داشت. علاوه بر این، با افزایش آنتی اکسیدان های آنزیمی SOD، CAT، GSH و GST، کاهش استرس اکسیداتیو را افزایش داد و با کاهش $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ، $\text{TNF-}\alpha$ و IL-6، التهاب را مهار کرد.^{۳۹} در مطالعه Aydin و همکاران نیز این یافته تبیین و نشان داده شد که کارواکرویل می تواند منبعی از فعالیت های آنتی اکسیدانی و شیمی پیشگیرانه برای بررسی بیماری های سرطانی باشد.^{۴۰} اثر محافظتی کارواکرویل بر پیشگیری از سرطان معده نیز توسط مطالعه Bayir و همکاران تایید و مشخص شد که کارواکرویل در غلظت های پایین دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است که رادیکال های آزاد یعنی گونه های فعال اکسیژن (ROS) را از بین برده و از سلول ها در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می کند.^{۴۱} البته در مطالعه حاضر کارواکرویل در غلظت های پایین اثر آنتی اکسیدانی معنی داری نداشت و در غلظت های بالا ROS و LPO را کاهش داد. توصیه می شود در مطالعات بعدی مسیرهای التهابی که منجر به تغییرات استرس اکسیداتیو می شود؛ نیز بر روی سلول های مواجهه یافته با دواستاکسل تیمار شده با تیمول و کارواکرویل مورد بررسی قرار گیرد.

این مطالعه پیشنهاد می کند که اثرات محافظتی کارواکرویل و تیمول در غلظت های مختلف و به صورت پیش درمانی بر سمیت سلولی ناشی

میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد و سمیت سلولی ناشی از دواستاکسل با استفاده از پارامترهای سیستم اکسیداتیو در سلول های A549 ارزیابی شد. مشابه مطالعه حاضر، در مطالعه جعفری و همکاران تیمول، پراکسیداسیون لیپیدی را با کاهش سطح MDA، افزایش محتوای GSH و کاهش ROS به طور قابل توجهی کاهش داد.^{۳۰} در مطالعه Amara و همکاران^{۳۱} اثرات محافظتی تیمول و کارواکرویل در برابر استرس اکسیداتیو تولید شده توسط di (2-ethylhexyl) phthalate در سلول های HEK-293 بررسی شد. طبق نتایج تیمول یا کارواکرویل باعث کاهش تولید بیش از حد ROS، فعالیت های کاتالاز، تعدیل شده (CAT) و سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD) شدند که این نشان می دهد تیمول و کارواکرویل می توانند از سلول های HEK-293 در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از DEHP محافظت کنند که با نتایج مطالعه حاضر مبنی بر اثر تیمول و کارواکرویل بر کاهش استرس اکسیداتیو همخوانی داشت. همچنین یافته مطالعه حاضر مبنی بر اثر تیمول و کارواکرویل بر کاهش استرس اکسیداتیو مشابه مطالعه Rúa و همکاران^{۳۲} بود. در مطالعه Rúa و همکاران اثرات آنتی اکسیدانی کارواکرویل و تیمول را بر روی ۱۹ سویه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بررسی و نتایج نشان داد که ترکیب کارواکرویل و تیمول در غلظت های پایین به عنوان آنتی اکسیدانت عمل کرده و ممکن است برای حفظ خواص ارگانولپتیک غذا و همچنین برای سلامت انسان مفید باشند.^{۳۳} با توجه به اینکه مطالعه حاضر روی سلول های A549 صورت گرفته؛ غلظت های بالاتری از ترکیب تیمول و کارواکرویل بر میزان کاهش استرس اکسیداتیو موثر بود و متناسب با افزایش غلظت این ترکیب، کاهش بیشتر در استرس اکسیداتیو مشاهده شد.

در مطالعه ای تجویز تیمول و کارواکرویل باعث کاهش آسیب اکسیداتیو و افزایش سطح آنتی اکسیدان و بهبود پارامترهای کیفیت اسپرم گردید^{۳۴} که با نتایج مطالعه حاضر مشابهت داشت.

در مطالعه El-Sayed و همکاران اثرات محافظتی احتمالی تیمول و کارواکرویل در برابر سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین بررسی و تجویز تیمول و یا کارواکرویل عملکرد قلب و پارامترهای استرس اکسیداتیو را بهبود بخشید.^{۳۴} در مطالعه شاهرخی و همکاران نیز همسو با نتایج مطالعه حاضر نشان داده شد که کارواکرویل اثرات محافظت کننده عصبی قابل توجهی بر آسیب های عصبی ایجاد می کند که اثر محافظتی کارواکرویل ممکن است با اثر آنتی اکسیدانی این دارو ایجاد شود.^{۳۵} در مطالعه Chen و همکاران مشخص شد که تجویز کارواکرویل به طور قابل توجهی از عملکرد قلب محافظت کرده؛ سطوح SOD و CAT را افزایش داد؛ سطح MDA را کاهش می دهد^{۳۶} که این نتیجه با کاهش LPO در مطالعه حاضر با استفاده از کارواکرویل همخوانی داشت. در مطالعه Khazdair و همکاران نیز

نتایج این مطالعه نشان داد که کارواکرول و تیمول به عنوان ترکیبات پتانسیل بالا در بهبود عملکرد سلولی و کاهش سمیت سلولی ناشی از دوستاکسل در سلول‌های سرطانی A549 موثرند.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی مازندران (IR.MAZUMS.REC.1402.375) قرار گرفت.

حمایت مالی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم سمانه سادات بشارت برای اخذ درجه دکتری حرفه‌ای در رشته داروسازی از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران بود. هزینه انجام این مطالعه توسط دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تأمین گردید.

مشارکت نویسندگان

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

محبوبه رحمتی: آنالیز داده‌ها و تفسیر نتایج.

دکتر محمد کرمی: مدیریت و طراحی پروژه.

سمانه سادات بشارت: انجام پروژه، جمع‌آوری داده‌ها و نوشتن نسخه اولیه مقاله.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض منافع وجود ندارد.

References

- de Groot PM, Wu CC, Carter BW, Munden RF. The epidemiology of lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2018 Jun;7(3):220-33. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2018.05.06>.
- Howlader N, Forjaz G, Mooradian MJ, Meza R, Kong CY, Cronin KA, et al. The Effect of Advances in Lung-Cancer Treatment on Population Mortality. *N Engl J Med*. 2020 Aug;383(7):640-49. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1916623>.
- Wang S, Zimmermann S, Parikh K, Mansfield AS, Adjei AA. Current Diagnosis and Management of Small-Cell Lung Cancer. *Mayo Clin Proc*. 2019 Aug;94(8):1599-622. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.034>.
- Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res*. 2016 Jun;5(3):288-300. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.06.07>.
- Razak SA, Mohd Gazzali A, Fisol FA, M Abdulbaqi I, Parumasivam T, Mohtar N, et al. Advances in Nanocarriers for Effective Delivery of Docetaxel in the Treatment of Lung Cancer: An Overview. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 22;13(3):400. <https://doi.org/10.3390/cancers13030400>.
- Thambiraj S, Shruthi S, Vijayalakshmi R, Ravi Shankaran D. Evaluation of cytotoxic activity of docetaxel loaded gold nanoparticles for lung cancer drug delivery. *Cancer Treat Res Commun*. 2019;21:100157. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2019.100157>.
- Baş E, Naziroğlu M. Selenium attenuates docetaxel-induced apoptosis and mitochondrial oxidative stress in kidney cells. *Anticancer Drugs*. 2019 Apr;30(4):339-46. <https://doi.org/10.1097/cad.0000000000000723>.
- Li T, Baochen Z, Yue Z, Cheng W, Yali W, Zongxi S, et al. Network Pharmacology-Based identification of pharmacological mechanism of SQFZ injection in combination with Docetaxel on

از دوستاکسل بررسی شود. نتایج به دست آمده می‌تواند مبنای مطالعات بیشتری برای بررسی کاربردهای درمانی این ترکیبات در سایر مدل‌های سلولی و حیوانی باشد. همچنین، بررسی مکانیسم‌های مولکولی دقیق‌تر اثرات کارواکرول و تیمول و نیز مطالعات در مقیاس بالینی برای تایید کارایی و ایمنی این ترکیبات در درمان سرطان‌های مختلف توصیه می‌شود. افزون بر این، پیشنهاد می‌شود که اثرات احتمالی این ترکیبات در ترکیب با داروهای دیگر نیز مورد ارزیابی قرار گیرد تا بتوان به ترکیبات دارویی موثرتر و با عوارض جانبی کمتر دست یافت.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به نوع سلول‌های مورد استفاده اشاره کرد که تنها شامل رده سلولی A549 بود و ممکن است نتایج به دست آمده برای دیگر رده‌های سلولی قابل تعمیم نباشد. همچنین، این مطالعه به صورت آزمایشگاهی و در شرایط *in vitro* انجام شد و نتایج ممکن است در شرایط *in vivo* متفاوت باشد. محدودیت دیگر مطالعه، استفاده از دامنه غلظت‌های مشخص برای کارواکرول و تیمول است که ممکن است همه اثرات این ترکیبات را پوشش ندهد. علاوه بر این، زمان پیش‌درمانی و انکوباسیون نیز می‌تواند بر نتایج اثرگذار باشد و نیاز به بررسی‌های بیشتری در این زمینه وجود دارد.

نتیجه‌گیری

- lung cancer. *Sci Rep*. 2019 Mar;9(1):4533. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40954-3>.
- Bao Y, Deng Q, Li Y, Zhou S. Engineering docetaxel-loaded micelles for non-small cell lung cancer: a comparative study of microfluidic and bulk nanoparticle preparation. *RSC Adv*. 2018 Sep;8(56):31950-66. <https://doi.org/10.1039/c8ra04512g>.
- Ataizi ZS, Ertlav K, Naziroğlu M. Mitochondrial oxidative stress-induced brain and hippocampus apoptosis decrease through modulation of caspase activity, Ca²⁺ influx and inflammatory cytokine molecular pathways in the docetaxel-treated mice by melatonin and selenium treatments. *Metab Brain Dis*. 2019 Aug;34(4):1077-89. <https://doi.org/10.1007/s11011-019-00428-x>.
- Yardım A, Kucukler S, Özdemir S, Çomaklı S, Caglayan C, Kandemir FM, Çelik H. Silymarin alleviates docetaxel-induced central and peripheral neurotoxicity by reducing oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. *Gene*. 2021 Feb;769:145239. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145239>.
- Sampaio LA, Pina LTS, Serafini MR, Tavares DDS, Guimarães AG. Antitumor Effects of Carvacrol and Thymol: A Systematic Review. *Front Pharmacol*. 2021 Jul;12:702487. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.702487>.
- Nagarajan S, Nagarajan R, Kumar J, Salemme A, Togna AR, Saso L, et al. Antioxidant Activity of Synthetic Polymers of Phenolic Compounds. *Polymers (Basel)*. 2020 Jul;12(8):1646. <https://doi.org/10.3390/polym12081646>.
- Gutiérrez-Larraínzar M, Rúa J, Caro I, de Castro C, de Arriaga D, García-Armesto MR, et al. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control*. 2012;26(2):555-63.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.025>.
15. Kang SH, Kim YS, Kim EK, Hwang JW, Jeong JH, Dong X, et al. Anticancer Effect of Thymol on AGS Human Gastric Carcinoma Cells. *J Microbiol Biotechnol*. 2016 Jan;26(1):28-37. <https://doi.org/10.4014/jmb.1506.06073>.
 16. Nagoor Meeran MF, Javed H, Al Tae H, Azimullah S, Ojha SK. Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. *Front Pharmacol*. 2017 Jun;8:380. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00380>.
 17. Arab H, Fathi M, Mortezaei E, Hosseini-mehr S J. Chemoprotective effect of thymol against genotoxicity induced by bleomycin in human lymphocytes. *Pharm Biomed Res*. 2015;1(1):26-31. <http://dx.doi.org/10.18869/acadpub.pbr.1.1.26>.
 18. Lee KP, Kim JE, Park WH, Hong H. Regulation of C6 glioma cell migration by thymol. *Oncol Lett*. 2016 Apr;11(4):2619-24. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4237>.
 19. Elbe H, Yigitturk G, Cavusoglu T, Baygar T, Ozgul Onal M, Ozturk F. Comparison of ultrastructural changes and the anticarcinogenic effects of thymol and carvacrol on ovarian cancer cells: which is more effective? *Ultrastruct Pathol*. 2020 Mar;44(2):193-202. <https://doi.org/10.1080/01913123.2020.1740366>.
 20. Ramos M, Jiménez A, Peltzer M, Garrigós MC. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *J Food Eng*. 2012;109(3):513-19. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.031>.
 21. Beena, Kumar D, Rawat DS. Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013 Feb;23(3):641-45. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.12.001>.
 22. Naghdi Badi H, Abdollahi M, Mehrafarin A, Ghorbanpour M, Tolyat S, Qaderi A, et al. [An Overview on Two Valuable Natural and Bioactive Compounds, Thymol and Carvacrol, in Medicinal Plants]. *J. Med. Plants*. 2017;16(63):1-32. [Article in Persian]
 23. Ramos M, Beltrán A, Peltzer M, Valente AJ, del Carmen Garrigós M. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *LWT-Food Science and Technology*. 2014;58(2):470-77. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.019>.
 24. Ye X, Ling T, Xue Y, Xu C, Zhou W, Hu L, et al. Thymol Mitigates Cadmium Stress by Regulating Glutathione Levels and Reactive Oxygen Species Homeostasis in Tobacco Seedlings. *Molecules*. 2016 Oct;21(10):1339. <https://doi.org/10.3390/molecules21101339>.
 25. Balan DJ, Rajavel T, Das M, Sathya S, Jeyakumar M, Devi KP. Thymol induces mitochondrial pathway-mediated apoptosis via ROS generation, macromolecular damage and SOD diminution in A549 cells. *Pharmacol Rep*. 2021 Feb;73(1):240-54. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00171-6>.
 26. 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>.
 27. Ajdary H, Safaei S, Hashemzadeh S, Kazemi T, Shanehbandi D, Baghbanzadeh A, et al. Chemotherapeutic Agents Increase PD-L1 Expression in A549 Lung Cancer Cell Line. 2021. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-573138/v1>. Preprint.
 28. Khosravifarsani M, Tolouian R, Yadollahifarsani S, Soleimani P, Sarazen M, Mostafizi P, et al. Medical plants for lung cancer: an overview of current knowledge. *Immunopathol Persa*. 2023;9(1):e38455. <https://doi.org/10.34172/ipp.2022.38455>.
 29. Ozkan A, Erdogan A. A comparative study of the antioxidant/prooxidant effects of carvacrol and thymol at various concentrations on membrane and DNA of parental and drug resistant H1299 cells. *Nat Prod Commun*. 2012 Dec;7(12):1557-60.
 30. Jafari A, Karimipour M, Khaksar MR, Ghasemnejad-Berenji M. Protective effects of orally administered thymol against titanium dioxide nanoparticle-induced testicular damage. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2020 Jan;27(2):2353-60. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06937-7>.
 31. Amara I, Timoumi R, Annabi E, Ben Othmène Y, Abid-Essefi S. The protective effects of thymol and carvacrol against di (2-ethylhexyl) phthalate-induced cytotoxicity in HEK-293 cells. *J Biochem Mol Toxicol*. 2022 Aug;36(8):e23092. <https://doi.org/10.1002/jbt.23092>.
 32. Rúa J, Del Valle P, de Arriaga D, Fernández-Álvarez L, García-Armesto MR. Combination of Carvacrol and Thymol: Antimicrobial Activity Against *Staphylococcus aureus* and Antioxidant Activity. *Foodborne Pathog Dis*. 2019 Sep;16(9):622-29. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2594>.
 33. Güvenç M, Cellat M, Gökçek İ, Yavaş İ, Yurdagül Özsoy Ş. Effects of thymol and carvacrol on sperm quality and oxidant/antioxidant balance in rats. *Arch Physiol Biochem*. 2019 Dec;125(5):396-403. <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1476979>.
 34. El-Sayed el-SM, Mansour AM, Abdul-Hameed MS. Thymol and Carvacrol Prevent Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Abrogation of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in Rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2016 Jan;30(1):37-44. <https://doi.org/10.1002/jbt.21740>.
 35. Shahrokhi Raeini A, Hafizibarjin Z, Rezvani ME, Safari F, Afkhami Aghda F, Zare Mehrjerdi F. Carvacrol suppresses learning and memory dysfunction and hippocampal damages caused by chronic cerebral hypoperfusion. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2020 Apr;393(4):581-89. <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01754-8>.
 36. Chen Y, Ba L, Huang W, Liu Y, Pan H, Mingyao E, et al. Role of carvacrol in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through activation of MAPK/ERK and Akt/eNOS signaling pathways. *Eur J Pharmacol*. 2017 Feb;796:90-100. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.11.053>.
 37. Khazdair MR, Alavinezhad A, Boskabady MH. Carvacrol ameliorates haematological parameters, oxidant/antioxidant biomarkers and pulmonary function tests in patients with sulphur mustard-induced lung disorders: A randomized double-blind clinical trial. *J Clin Pharm Ther*. 2018 Oct;43(5):664-74. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12684>.
 38. Palabiyik SS, Karakus E, Halici Z, Cadirci E, Bayir Y, Ayaz G, et al. The protective effects of carvacrol and thymol against paracetamol-induced toxicity on human hepatocellular carcinoma cell lines (HepG2). *Hum Exp Toxicol*. 2016 Dec;35(12):1252-63. <https://doi.org/10.1177/0960327115627688>.
 39. Hassan HFH, Mansour AM, Salama SA, El-Sayed EM. The chemopreventive effect of thymol against dimethylhydrazine and/or high fat diet-induced colon cancer in rats: Relevance to NF-κB. *Life Sci*. 2021 Jun;274:119335. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119335>.
 40. Aydın E, Türkez H, Keleş MS. The effect of carvacrol on healthy neurons and N2a cancer cells: some biochemical, anticarcinogenicity and genotoxicity studies. *Cytotechnology*. 2014 Jan;66(1):149-57. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9547-5>.

41. Bayir AG, Kiziltan HS, Kocyigit A. Plant family, carvacrol, and putative protection in gastric cancer: Foods, Nutrients, and Dietary Supplements. Dietary Interventions in Gastrointestinal

Diseases. Academic Press. 2019; pp:3-18.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814468-8.00001-6>.