



## 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)<sup>1,2</sup>  , Mahboube Rahmati Kukandeh<sup>3</sup> 

Mohammad Karami (Ph.D)<sup>1</sup>  , Samane Sadat Besharat<sup>\*4</sup> 

<sup>1</sup> Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. <sup>2</sup> Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. <sup>3</sup> Ph.D Candidate in Toxicology, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. <sup>4</sup> 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. [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  $\beta$ -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 کارواکرول و تیمول بر سمیت سلولی ناشی از دوستاگل در رده سلولی A549 با ارزیابی حیات سلولی و استرس اکسیداتیو

دکتر محمد شکرزاده<sup>۱</sup>    ، محبوبه رحمتی کوکنده<sup>۲</sup>  ، دکتر محمد کریمی<sup>۱</sup>  ، سمانه سادات بشارت<sup>۴</sup> 

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:** دوستاگل یکی از داروهای شیمی درمانی موثر برای درمان سرطان ریه است؛ اما اثرات جانبی و سمیت سلولی آن محدودیت‌هایی در کاربرد آن ایجاد کرده است. ترکیبات طبیعی مانند کارواکرول و تیمول به دلیل خواص ضدسرطانی و ضدالتهابی به‌عنوان عوامل کمکی برای کاهش سمیت و افزایش اثربخشی داروهای شیمی درمانی مورد توجه قرار گرفته‌اند. این مطالعه به منظور تعیین اثر هم‌افزایی کارواکرول و تیمول بر سمیت سلولی ناشی از دوستاگل 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. سلول‌های A549 تحت پیش تیمار با غلظت‌های مختلف کارواکرول و تیمول (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با دوز آسیب‌زای دوستاگل (۸/۹۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) 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 تیوباربتوریک اسید (TBA) انجام شد.

**یافته‌ها:** کارواکرول و تیمول اثرات سیتوتوکسیک دوستاگل را در غلظت‌های ۲۰۰-۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش دادند ( $P < 0/05$ ). ارزیابی سمیت سلولی نشان داد که کارواکرول و تیمول در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ( $98/11 \pm 1/64$  درصد) نسبت به غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ( $54/74 \pm 2/03$  درصد) اثر افزایشی بارزتری از خود نشان دادند. از طرفی این دو ترکیب به‌طور معنی‌دار استرس اکسیداتیو ناشی از دوستاگل را از طریق کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و مالون‌دی‌آلدید (MDA) اعمال کردند. ( $P < 0/05$ ). به‌طوری که در غلظت ۲۰۰ میزان ROS و MDA به ترتیب  $13/57 \pm 0/09$  درصد و  $0/55 \pm 0/03$  درصد نسبت به غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ( $20/50 \pm 0/59$  درصد و  $0/98 \pm 0/01$ ) اثر مهاری بارزتری بر رشد سلول‌های سرطانی از خود نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** کارواکرول و تیمول به‌عنوان ترکیبات پتانسیل بالا در بهبود عملکرد سلولی و کاهش سمیت سلولی ناشی از دوستاگل در سلول‌های سرطانی A549 موثر ارزیابی شدند.

**واژه‌های کلیدی:** دوستاگل، کارواکرول، 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 ۱۴۰۴/۴/۱۲

### مقدمه

می‌دهند.<sup>۲</sup> سرطان ریه سلول کوچک (SCLC) یک بیماری تهاجمی با ویژگی‌های پاتولوژیک، بالینی و مولکولی متمایز از سرطان ریه غیرسلول کوچک است و دارای پتانسیل متاستاتیک بالایی است که منجر به پیش‌آگهی بالینی ضعیف می‌شود.<sup>۲</sup> سرطان ریه NSCLC اکثر موارد سرطان ریه را تشکیل می‌دهد. بسته به مرحله سرطان ریه، بیماران واجد شرایط درمان‌های خاصی از جراحی گرفته تا پرتودرمانی و شیمی‌درمانی و نیز درمان هدفمند هستند.<sup>۴</sup> تحقیقات به‌طور مداوم برای

سرطان ریه پس از سرطان پروستات برای مردان و سرطان پستان برای زنان، دومین تشخیص شایع سرطان بر اساس جنسیت است.<sup>۱</sup> دو ساب تایپ اصلی سرطان ریه از نظر آسیب‌شناختی 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 آنتی‌اکسیدانی است و همچنین یک ترکیب فعال برای مهار سلول‌های سرطانی است.<sup>۱۸-۱۵</sup> تیمول یک ترکیب فنلی اصلی است که در اسانس آویشن ولگاریس وجود دارد. کارواکرول یک فنل مونوترپنوئیدی فعال زیستی طبیعی است که در اسانس‌های خانواده *Lamiaceae* از جمله جنس *Origanum* و *Thymus* یافت می‌شود.<sup>۱۵</sup> مطالعات قبلی نشان داده‌اند کارواکرول دارای خواص ضد رگ‌زایی، ضد درد، آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد التهابی است. علاوه بر این، کارواکرول اثر ضد تکثیر بر رده‌های سلولی سرطان کبد، ریه، روده بزرگ و سینه دارد.<sup>۱۹</sup> این دو ترکیب، فعالیت ضد قارچی، حشره‌کشی، ضد ویروس، ضد تومور، ضد انگلی، حذف کننده رادیکال‌های آزاد و عوامل ضد پراکسیداتیو لپیدی نیز از خود نشان می‌دهند که اساس استفاده گسترده از این ترکیبات در صنایع آرایشی و بهداشتی، غذایی و دارویی است.<sup>۲۰-۲۲</sup>

طبق تصمیم کمیسیون اروپا به‌طور کلی به عنوان ترکیبات ایمن و به‌عنوان مواد طعم‌دهنده شناخته می‌شوند.<sup>۲۳</sup> بنابر تحقیقات کارواکرول می‌تواند سطوح سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلو تاتیون پراکسیداز (GPx)، گلو تاتیون ردوکتاز (GR) و گلو تاتیون (GSH) را افزایش دهد.<sup>۱۲</sup> در مطالعات تایید شده زمانی که غلظت تیمول افزایش یابد؛ پتانسیل آنتی‌اکسیدانی خود را نشان داده و تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، پراکسیداسیون لپیدی و از دست دادن یکپارچگی غشاء را مسدود می‌کند.<sup>۲۴، ۲۵</sup> در نتیجه با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی و محافظتی کارواکرول و تیمول و اثر آنها بر مهار رادیکال‌های آزاد؛ این مطالعه به منظور تعیین اثر هم‌افزایی کارواکرول 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 آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین کشت داده شدند و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت کافی و میزان ۵ درصد دی‌اکسید کربن نگهداری شدند. برای انجام تست‌های مختلف، زمانی که سلول‌ها حداقل به ۸۰-۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند؛ توسط تریپسین-اتیلن دی‌آمین تراستیک اسید (EDTA) از ته فلاسک (بدون هیچ‌گونه shake و ضربه به فلاسک حاوی سلول) جدا شدند. سپس در دور ۲۰۰۰ rpm به مدت

یافتن راه‌حلی بهتر در درمان سرطان ریه انجام می‌شود. دسته‌های مختلفی از داروها توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده برای درمان سرطان ریه تأیید شده‌اند که یکی از رایج‌ترین آنها دوستاکسل (Docetaxel: DTX) است که یک داروی شیمی‌درمانی بسیار موثر در درمان انواع مختلف سرطان از جمله سرطان ریه سلول غیر کوچک NSCLC است.<sup>۵</sup> دوستاکسل یک داروی ضد سرطان، متعلق به خانواده تاکسان‌ها است و یک ماده نیمه‌مصنوعی است که به‌طور برگشت‌ناپذیر به بتا-اکتین متصل می‌شود و در نتیجه پلیمریزاسیون میکروتوبول را تغییر می‌دهد و میتوز سلول را مختل می‌کند و باعث آپوپتوز می‌شود.<sup>۶</sup> عوامل شیمی‌درمانی از جمله تاکسان‌ها 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 بافت‌های طبیعی مانند مغز و بیضه دارد.<sup>۷</sup> عوارض جانبی جدی مانند سرکوب مغز استخوان، آلپسی، آنفیلکسی، واکنش گوارشی، ضعف، ادم و آسیب عملکرد کبد ممکن است پس از مصرف دوستاکسل رخ دهد. محدودیت‌هایی 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.<sup>۹، ۸</sup>

چندین مطالعه نشان می‌دهند که سمیت دوستاکسل با تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) ایجاد می‌شود. همچنین شواهدی وجود دارد که التهاب و آپوپتوز می‌تواند نقش حیاتی در سمیت بافتی ناشی از دوستاکسل ایفا کند.<sup>۷، ۱۰، ۱۱</sup> بنابراین، جستجوی مداوم برای یافتن موادی وجود دارد که می‌توانند برای ایجاد درمان‌های 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 به‌طور 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.<sup>۱۲</sup>

ترکیبات فنلی یک گروه از ترکیبات مورد مطالعه گسترده هستند که به دلیل خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی شناخته شده‌اند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی در چندین مطالعه آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفته و به‌عنوان جذب کننده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند.<sup>۱۳</sup> پتانسیل آنتی‌اکسیدانی آنها به تعداد و آرایش گروه‌های هیدروکسیل و میزان ترکیب ساختار بستگی دارد.<sup>۱۴</sup> تیمول (۲-ایزوپروپیل-۵-متیل فنول) یک ترکیب فنلی اصلی است که در اسانس گیاهان مختلف از جمله *Thymus vulgaris* (*Lamiaceae*) وجود دارد.<sup>۱۵، ۱۶</sup> خواص بیولوژیکی فراوانی برای تیمول گزارش شده که شامل اثرات ضد التهابی، ضدباکتریایی،

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 دوستاگل به تنهایی و به صورت 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 لیزکننده 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 لیزکننده 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 دوستاگل:** بر اساس نمودار یک، داروی دوستاگل به عنوان 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 تریان 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.<sup>۲۶</sup>

**طراحی مطالعه:** در گام اول داروی دوستاگل به عنوان مدل سایتوتوکسیک در غلظت‌های (۷۰-۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)<sup>۲۷</sup> 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 به دست آوردن غلظت اپتیم سمی داروی دوستاگل، اثرات محافظتی کارواکرول و تیمول در ۷ گروه با غلظت‌های متفاوت (۲۰۰-۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)<sup>۱۹</sup> به همراه دوستاگل در غلظت IC50 در همه تست‌ها به صورت 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 دوستاگل در غلظت IC50.

گروه‌های درمانی شامل ۷ غلظت از کارواکرول (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به همراه دوستاگل در غلظت IC50

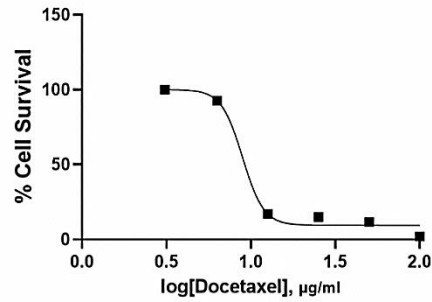
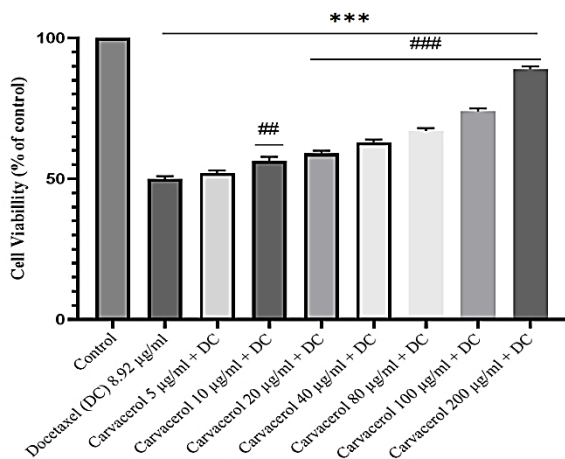
گروه‌های درمانی شامل ۷ غلظت از تیمول (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به همراه دوستاگل در غلظت IC50

غلظت موثر هم‌افزایی شامل ۷ غلظت از تیمول و کارواکرول (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به همراه دوستاگل 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 دوستاگل 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

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

(P<۰/۰۰۱) (نمودار ۴ و جدول یک).

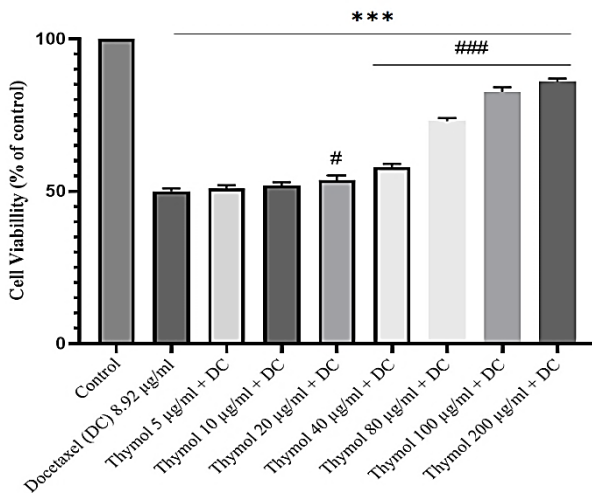


IC50= 8.92 µg/ml

نمودار ۱: اثر سایتوتوکسیسیته داروی دوستاکسل بر روی سلول‌های A549

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<۰/۰۰۱)  
 #### دارای اختلاف معنی‌دار با گروه دوستاکسل (P<۰/۰۰۱)  
 ## دارای اختلاف معنی‌دار با گروه دوستاکسل (P<۰/۰۱)

**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<۰/۰۰۱). کارواکرول در غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر 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 میلی لیتر P<۰/۰۱ و غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر P<۰/۰۰۱). کارواکرول در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر باعث اثر معنی‌داری بر بهبود عملکرد سلولی و افزایش زیست‌پذیری در سلول‌های مواجهه یافته با دوستاکسل نشد (نمودار ۲).



نمودار ۳: میانگین و انحراف معیار اثر غلظت‌های مختلف تیمول بر میزان زیست‌پذیری سلولی در سلول‌های مواجهه یافته با دوستاکسل  
 \*\*\* دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل (P<۰/۰۰۱)  
 #### دارای اختلاف معنی‌دار با گروه دوستاکسل (P<۰/۰۰۱)  
 # دارای اختلاف معنی‌دار با گروه دوستاکسل (P<۰/۰۵)

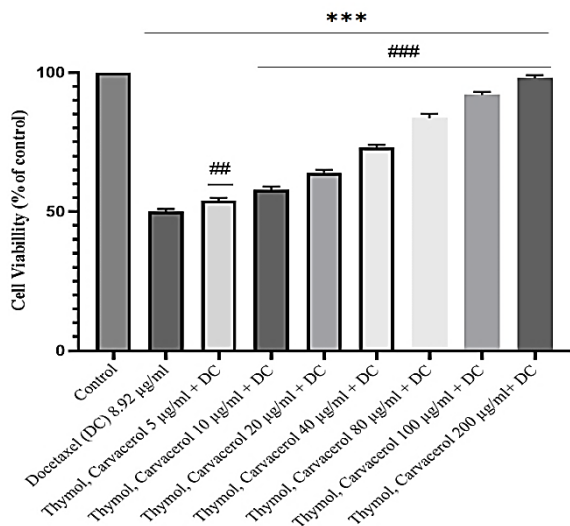
**اثر تیمول بر میزان عملکرد سلولی در سلول‌های A549 مواجهه یافته با دوستاکسل:** تیمول در غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر منجر به بهبود عملکرد سلولی و افزایش زیست‌پذیری در سلول‌های مواجهه یافته با دوستاکسل شد که نسبت به گروه دوستاکسل دارای اختلاف معنی‌داری شد (غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر P<۰/۰۱ و غلظت‌های ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر P<۰/۰۰۱). تیمول در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر 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 میلی لیتر موجب افزایش چشمگیر میزان گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های نرمال شد که نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری شد (P<۰/۰۰۱). 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 میلی لیتر 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 میلی لیتر P<۰/۰۱ و غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر

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



نمودار ۴: میانگین و انحراف معیار اثر کارواکرول 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

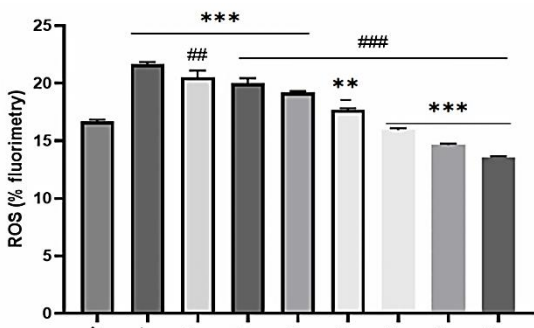
\*\*\* دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل (P<۰/۰۰۱)

#### دارای اختلاف معنی‌دار با گروه دوستاکسل (P<۰/۰۰۱)

## دارای اختلاف معنی‌دار با گروه دوستاکسل (P<۰/۰۱)

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  $P<۰/۰۱$  و غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر  $P<۰/۰۰۱$ ). همچنین کارواکرول و تیمول 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 گروه کنترل دارای تفاوت معنی‌داری شد (غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر  $P<۰/۰۱$  و غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر  $P<۰/۰۰۱$ ) (نمودار ۵ و جدول یک).

اثر کارواکرول 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 زیست‌پذیری (Bioavailability) در مقایسه با گروه کنترل شد. در حالی که تیمار با کارواکروول در غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر منجر به بهبود عملکرد سلولی و افزایش زیست‌پذیری در سلول‌های مواجهه‌یافته با دوستاکسل شد که نسبت به گروه دوستاکسل دارای اختلاف معنی‌داری بود. در حالی که در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کارواکروول، تغییر معنی‌داری در زیست‌پذیری سلول‌های مواجهه‌یافته مشاهده نشد. در مورد تیمول نیز، غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر منجر به بهبود عملکرد سلولی و افزایش زیست‌پذیری در سلول‌های مواجهه‌یافته با دوستاکسل شد که نسبت به گروه دوستاکسل دارای اختلاف معنی‌داری شد. در حالی که در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کارواکروول، تغییر آماری معنی‌داری در زیست‌پذیری سلول‌های مواجهه‌یافته مشاهده نشد. انکوباسیون همزمان کارواکروول و تیمول در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت چشمگیری باعث بهبود زیست‌پذیری سلول‌ها و کاهش تغییرات استرس اکسیداتیو نسبت به گروه‌های مواجهه‌یافته با دوستاکسل در سلول‌های A549 شد.

سرطان ریه یک رشد غیرقابل کنترل سلولی در بافت ریه است که با تغییرات در سلول‌ها، تغییرات اپی‌ژنتیکی و ژنتیکی، فعال‌سازی آنکوژن‌ها و تکامل کلونال سلول‌های بدخیم همراه است. مهم‌ترین عامل خطر برای سرطان ریه، سیگار کشیدن است که ۸۰ تا ۸۵ درصد از موارد را شامل می‌شود. 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. استراتژی‌های رایج در درمان سرطان ریه شامل شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و جراحی هستند. با این حال، این روش‌ها عوارض جانبی مختلفی از جمله سمیت قابل توجه، کارایی محدود و مقاومت چنددارویی دارند. گیاهان و محصولات مشتق از گیاهان نقش مؤثری در درمان و پیشگیری از سرطان ریه ایفا کرده‌اند. به طوری که می‌توانند عوامل معمول را حساس‌تر کرده، زمان بقا را افزایش داده؛ عوارض جانبی شیمی‌درمانی را کاهش داده؛ به بهبود فیزیولوژیکی کمک نموده و کیفیت زندگی بیماران مبتلا به بدخیمی‌های ریوی را ارتقا دهند.<sup>۲۸</sup>

در مطالعه Ozkan و Erdogan اثر کارواکروول و تیمول بر روی رده سلول سرطانی ریه (H1299) پرداخته شد. کارواکروول و تیمول از سلول‌ها در برابر سمیت سلولی ناشی از H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و آسیب غشاء و DNA محافظت نمود و زیست‌پذیری سلول‌ها را افزایش داد.<sup>۲۹</sup> در مطالعه حاضر برای ارزیابی سمیت سلولی از دوستاکسل با غلظت ایتیم ۸/۹۲

مشاهده شد. به طوری که میزان LPO در گروه‌های تیمار شده با دوستاکسل نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری شد ( $P < 0/001$ ). در سلول‌های تیمار شده با کارواکروول و تیمول در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت چشمگیری میزان LPO را نسبت به گروه‌های مواجهه‌یافته با دوستاکسل کاهش داد (غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر  $P < 0/01$  و غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر  $P < 0/001$ ) (نمودار ۶ و جدول یک).

### بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، دوستاکسل به طور معنی‌داری باعث

مشخص شد کارواکرول به طور قابل توجهی باعث بهبود عملکرد سلولی و افزایش زیست‌پذیری سلول‌های در معرض خردل شد. همچنین درمان دو ماهه با کارواکرول سلول‌های التهابی و نشانگرهای زیستی اکسیدان را کاهش داد و نشانگرهای زیستی آنتی‌اکسیدانی را افزایش داد و آزمایش‌های PFT را در بیماران در معرض خردل سولفور را بهبود بخشید.<sup>۳۷</sup> در مطالعه Palabiyik و همکاران که بر روی اثر تیمول و کارواکرول در بهبود اثرات سمی استامینوفن با مهار آسیب اکسیداتیو و التهاب ناشی از استامینوفن در رده سلولی HepG2 انجام گردید؛ مشخص شد تیمول و کارواکرول با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش سیتوکین‌های التهابی مانند فاکتور نکروز تومور  $\alpha$  و اینترلوکین  $\beta 1$  در برابر سمیت ناشی از استامینوفن در سلول‌های HepG2 محافظت می‌کنند. مصرف تیمول با دوز بالا و درمان کارواکرول اثری نزدیک به N-استیل سیستین در سمیت استامینوفن دارد؛ اما تیمول اثر درمانی بهتری نسبت به کارواکرول داشت.<sup>۳۸</sup> این در حالی بود که در مطالعه حاضر تیمول و کارواکرول اثر درمانی مشابهی بر روی سلول‌های A549 مواجهه یافته با دوستاکسل داشتند. در مطالعه Hassan و همکاران تجویز تیمول در موش‌های صحرایی نر و بیستار، فعالیت محافظتی امیدوارکننده‌ای را در برابر سرطان روده بزرگ با کاهش قابل توجه سطح سرمی نشانگرهای تومور مرتبط با کولون، کربوهیدرات آنتی‌ژن ۱۹-۹ (CA 19) و آنتی ژن کارسینوم بیونیک (CEA)، و همچنین نشانگر آپوپتوز، کاسپاز-۳ در مقایسه با گروه سرطان روده بزرگ به دنبال داشت. علاوه بر این، با افزایش آنتی‌اکسیدان‌های آزیمی SOD، CAT، GSH و GST، کاهش استرس اکسیداتیو را افزایش داد و با کاهش TNF- $\alpha$ ، NF- $\kappa$ B و IL-6، التهاب را مهار کرد.<sup>۳۹</sup> در مطالعه Aydin و همکاران نیز این یافته تبیین و نشان داده شد که کارواکرول می‌تواند منبعی از فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و شیمی‌پیشگیرانه برای بررسی بیماری‌های سرطانی باشد.<sup>۴۰</sup> اثر محافظتی کارواکرول بر پیشگیری از سرطان معده نیز توسط مطالعه Bayir و همکاران تایید و مشخص شد که کارواکرول در غلظت‌های پایین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که رادیکال‌های آزاد یعنی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را از بین برده و از سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند.<sup>۴۱</sup> البته در مطالعه حاضر کارواکرول در غلظت‌های پایین اثر آنتی‌اکسیدانی معنی‌داری نداشت و در غلظت‌های بالا ROS و LPO را کاهش داد.

توصیه می‌شود در مطالعات بعدی مسیرهای التهابی که منجر به تغییرات استرس اکسیداتیو می‌شود؛ نیز بر روی سلول‌های مواجهه یافته با دوستاکسل تیمار شده با تیمول و کارواکرول مورد بررسی قرار گیرد.

این مطالعه پیشنهاد می‌کند که اثرات محافظتی کارواکرول و تیمول در غلظت‌های مختلف و به صورت پیش‌درمانی بر سمیت سلولی ناشی

میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد و سمیت سلولی ناشی از دوستاکسل با استفاده از پارامترهای سیستم اکسیداتیو در سلول‌های 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.<sup>۳۰</sup> در مطالعه Amara و همکاران<sup>۳۱</sup> اثرات محافظتی تیمول و کارواکرول در برابر استرس اکسیداتیو تولید شده توسط di (2-ethylhexyl) phthalate در سلول‌های HEK-293 بررسی شد. طبق نتایج تیمول یا کارواکرول باعث کاهش تولید بیش از حد ROS، فعالیت‌های کاتالاز تعدیل شده (CAT) و سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD) شدند که این نشان می‌دهد تیمول و کارواکرول می‌توانند از سلول‌های HEK-293 در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از DEHP محافظت کنند که با نتایج مطالعه حاضر مبنی بر اثر تیمول و کارواکرول بر کاهش استرس اکسیداتیو همخوانی داشت. همچنین یافته مطالعه حاضر مبنی بر اثر تیمول و کارواکرول بر کاهش استرس اکسیداتیو مشابه مطالعه Rúa و همکاران<sup>۳۲</sup> بود. در مطالعه Rúa و همکاران اثرات آنتی‌اکسیداتیو کارواکرول و تیمول را بر روی ۱۹ سویه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بررسی و نتایج نشان داد که ترکیب کارواکرول و تیمول در غلظت‌های پایین به عنوان آنتی‌اکسیدانت عمل کرده و ممکن است برای حفظ خواص ارگانولیتیک غذا و همچنین برای سلامت انسان مفید باشند.<sup>۳۳</sup> با توجه به اینکه مطالعه حاضر روی سلول‌های A549 صورت گرفته؛ غلظت‌های بالاتری از ترکیب تیمول و کارواکرول بر میزان کاهش استرس اکسیداتیو موثر بود و متناسب با افزایش غلظت این ترکیب، کاهش بیشتر در استرس اکسیداتیو مشاهده شد.

در مطالعه‌ای تجویز تیمول و کارواکرول باعث کاهش آسیب اکسیداتیو و افزایش سطح آنتی‌اکسیدان و بهبود پارامترهای کیفیت اسپرم گردید<sup>۳۴</sup> که با نتایج مطالعه حاضر مشابهت داشت.

در مطالعه El-Sayed و همکاران اثرات محافظتی احتمالی تیمول و کارواکرول در برابر سمیت قلبی ناشی از دوکسورویسین بررسی و تجویز تیمول و یا کارواکرول عملکرد قلب و پارامترهای استرس اکسیداتیو را بهبود بخشید.<sup>۳۴</sup> در مطالعه شاهرخی و همکاران نیز همسو با نتایج مطالعه حاضر نشان داده شد که کارواکرول اثرات محافظت کننده عصبی قابل توجهی بر آسیب‌های عصبی ایجاد می‌کند که اثر محافظتی کارواکرول ممکن است با اثر آنتی‌اکسیدانی این دارو ایجاد شود.<sup>۳۵</sup> در مطالعه Chen و همکاران مشخص شد که تجویز کارواکرول به طور قابل توجهی از عملکرد قلب محافظت کرده؛ سطوح SOD و CAT را افزایش داد؛ سطح MDA را کاهش می‌دهد<sup>۳۶</sup> که این نتیجه با کاهش LPO در مطالعه حاضر با استفاده از کارواکرول همخوانی داشت. در مطالعه Khazdair و همکاران نیز

نتایج این مطالعه نشان داد که کارواکروول و تیمول به عنوان ترکیبات پتانسیل بالا در بهبود عملکرد سلولی و کاهش سمیت سلولی ناشی از دوستاگل 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 دوستاگل 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 کارواکروول 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 کارواکروول 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, Ca<sup>2+</sup> 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>.
- Yardımlı A, Kucukler S, Özdemir S, Çomaklı S, Çağlayan 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, Hosseinimehr 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, Yigiturk 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 Schmiedebergs 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>.