

مقایسه آثار اسانس دو گونه گیاه *Origanum majorana L.* و *Origanum vulgare L.* بر رده سلول سرطانی BCL-1 و سلول‌های سیستم ایمنی

فاطمه مشهدی^۱، مجید قربانی نهوجی^۲ و رویا یارائی^{۳*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲- استادیار، سیستماتیک گیاهی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

۳* - نویسنده مسئول، دانشیار، گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران، پست الکترونیک: ryarace@yahoo.com

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۰

تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۹

چکیده

گیاهان خانواده نعنائیان منبع غنی از ترکیب‌های دارویی با خواص ضدسرطان هستند. در بسیاری از تحقیقات تنها به خواص ضد سرطانی این ترکیب‌ها پرداخته شده است و به سمیت آنها بر سلول‌های سالم توجهی نشده است. این مطالعه با هدف ارزیابی و مقایسه اثرهای سمی اسانس دو گونه از جنس مرزنجوش (خانواده نعنائیان) شامل *Origanum vulgare L.* و *Origanum majorana L.* بر رده سلول سرطانی BCL-1 و لنفوسیت (ایمنی اکتسابی) و ماکروفاژ (ایمنی ذاتی) نرمال در شرایط *In vitro* طراحی شده است. نمونه گیاهان تهیه و اسانس روغنی با روش تقطیر با آب آماده شد. سپس آنالیز اسانس‌ها با دستگاه‌های GC و GC.MS انجام گردید. رده سلول سرطانی BCL-1، لنفوسیت و ماکروفاژ نرمال با غلظت‌های مختلف اسانس‌ها به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. حیات سلولی و مسمومیت سلولی تحت تأثیر اسانس‌های روغنی از طریق سنجش MTT و LDH تعیین شد. نتایج GC.MS تنوع ترکیب‌های دو اسانس را نشان می‌دهد، به طوری که تنها دارای ۱۲ جزء مشترک می‌باشد. دو اسانس در محدوده غلظت ۱-۰/۰۱ درصد (*O. vulgare*: ۴۷-۷۹٪ و *O. majorana*: ۳۰-۸۲٪) موجب مهار رشد سلول سرطانی BCL-1 می‌شود (IC₅₀ اسانس *O. vulgare*: ۰/۰۱٪ و IC₅₀ اسانس *O. majorana*: ۰/۰۳٪). هر دو اسانس در بالاترین غلظت (۱٪) فعالیت حیاتی سلول‌های ایمنی را کاهش نمی‌دهند. همچنین با توجه به نتایج آزمون LDH هیچ‌یک از غلظت‌های مورد آزمایش دو اسانس اثر سمی بر لنفوسیت و ماکروفاژ نداشتند. اسانس گیاهان *O. majorana* و *O. vulgare* کاندید مناسبی برای درمان سرطان می‌باشند، زیرا علاوه بر داشتن خاصیت ضدسرطانی قوی، در سلول‌های نرمال سیستم ایمنی آسیبی ایجاد نمی‌کنند.

واژه‌های کلیدی: *Origanum*، ضدسرطان، BCL-1، لنفوسیت، ماکروفاژ.

مقدمه

استفاده از ترکیب‌های گیاهی به‌عنوان درمان‌های مکمل در پزشکی مدرن گسترش جهانی پیدا کرده است. گیاهان خانواده نعناعیان (Lamiaceae) به‌صورت سنتی در بسیاری از کشورها از جمله ایران به‌عنوان خوراکی و داروی گیاهی استفاده می‌شوند. گونه *Origanum vulgare* L. و *Origanum majorana* L. هر دو از این خانواده می‌باشند و با خواص دارویی متنوع از جمله ویژگی ضدسرطانی شناخته شده‌اند (Morshedloo et al., 2018; Mombeini et al., 2009; Teixeira et al., 2013). با توجه به شباهت‌های مورفولوژیک این دو گونه، گاهی اوقات تفکیک این دو گیاه برای برخی محققان دشوار بوده و در مقالات گیاه *Origanum vulgare* و *Origanum majorana* با نام مرزنجوش معرفی می‌شوند (Noori et al., 2015; Jeddi et al., 2018; Sotoudeh et al., 2018).

از سویی لنفوم و لوسمی از سرطان‌های شایع دنیا می‌باشد که سالانه جان هزاران نفر را می‌گیرد. با وجود کارآمدی شیوه‌های درمانی مختلف، اما همچنان نیاز به یک داروی جدید با عوارض کمتر وجود دارد (Hashemi-Bahremani et al., 2007). یکی از مشکلات اصلی داروهای ضدسرطان عوارض منفی آنها بر سلول‌های سالم می‌باشد. در بسیاری از تحقیقات خواص ضد سرطانی ترکیب‌ها بدون در نظر گرفتن آثار منفی (و یا مثبت احتمالی) آنها بر سلول‌های سالم بررسی می‌شود (Han & Parker, 2017; Begnini et al., 2014). پس در کنار ارزیابی اثر ضد سرطانی این دو گیاه، بررسی آسیب سلولی و فعالیت حیاتی سلول‌های سیستم ایمنی مثل لنفوسیت و ماکروفاژ که در مقابله بدن با سرطان نقش اصلی را ایفاء می‌کنند و آسیب به این سلول‌ها منجر به پیشروی بیشتر سلول‌های سرطانی شود، می‌تواند کارآمد باشد (Gonzalez, 2018).

لنفوسیت‌ها گروه اصلی سلول‌های ایمنی اکتسابی می‌باشند که به‌دنبال شناسایی آنتی‌ژن بیگانه، فعال شده و شروع به تکثیر می‌کنند. پاسخ این سلول‌ها عمدتاً از طریق

ترشح سایتوکاین و تولید آنتی‌بادی انجام می‌شود (Sigvardsson, 2018). در ایمنی ذاتی، طیف وسیعی از سلول‌ها فعال می‌شوند که مهمترین و مؤثرترین آنها ماکروفاژها می‌باشند. ماکروفاژها به روش‌های مختلف از جمله انفجار تنفسی و ADCC و ترشح سایتوکاین با عوامل خارجی و سرطان مقابله می‌کنند (Schiller et al., 2006; Dranoff, 2004; Xaus et al., 2001). بررسی وضعیت این دو گروه سلول ماکروفاژ و لنفوسیت می‌تواند شروع خوبی برای بررسی خواص یک فرآورده گیاهی بر پاسخ سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی باشد.

هدف مطالعه ما بررسی و مقایسه آثار اسانس‌های دو گونه *O. vulgare* و *O. majorana* بر سلول‌های سرطانی رده BCL-1 و سلول‌های نرمال سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی (لنفوسیت و ماکروفاژ) در شرایط *In vitro* می‌باشد و برای بررسی تفاوت آثار دو گونه گیاهی، نتایج خواص اسانس *O. vulgare* و *O. majorana* با یکدیگر مقایسه می‌شوند. در بسیاری از مواقع ترکیب‌ها با غلظت مناسب برای فعالیت بیولوژیک مورد نظر، عوارض و اثر منفی نیز دارند، به همین منظور در کنار سنجش حیات سلولی لنفوسیت و ماکروفاژ به روش MTT، آسیب سلولی و اثر سمی اسانس‌ها را به روش LDH بررسی می‌کنیم.

مواد و روش‌ها

تهیه فرآورده گیاهی

گونه‌های مورد مطالعه از مناطق رویشی و کلکسیون گیاهان دارویی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج (در سال ۱۳۹۷) تهیه و پس از آماده‌سازی نمونه‌های هرباریومی استاندارد، توسط کلیدهای شناسایی و فلورهای معتبر مورد ارزیابی و شناسایی دقیق قرار گرفت. در نهایت نمونه‌های هرباریومی استنادی (ووشر) در هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی (IMPH) به‌صورت معتبر و مؤثر نمایه گردید. گیاه *O. vulgare* با کد هرباریومی (۷۰۹۳) و گیاه *O. majorana* با کد هرباریومی

کشت سلول‌های رده سلول سرطانی BCL1

سلول رده BCL1 clone5B1b با کد C551 جدا شده از لوسمی موش با منشأ رده سلولی لنفوسیت B به شکل فعال و در یک فلاسک از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. همه مراحل کشت در شرایط استریل زیر هود لامینار (ICN Flow) انجام گردید. ابتدا محیط رویی کشت سلول خارج و سلول‌های چسبیده به کف فلاسک با ۵ میلی‌لیتر RPMI-1640 (BioIDEA) شستشو داده شد. برای حذف چسبندگی و جدا کردن سلول‌ها از کف فلاسک ابتدا ۲ میلی‌لیتر تریپسین و پس از ۲ دقیقه محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FBS (BioIDEA) به فلاسک اضافه شد. سوسپانسیون سلولی را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸-۱۰ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۱۵۰۰ ساترینفوژ (SIGMA) کرده و روی رسوب سلولی بدست آمده ۵ میلی‌لیتر RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ پنی‌سیلین استرپتومایسین (BioIDEA) اضافه گردید. تعداد 2×10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. پلیت در انکوباتور (n-Biotek) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ قرار گرفت. به منظور سازگاری، بعد از ۲۴ ساعت اسانس‌ها اضافه شد.

جداسازی و کشت ماکروفاژ

استخراج سلول‌های لنفوسیت و ماکروفاژ از طحال و حفره صفاق موش سالم با رعایت اصول اخلاق در پژوهش انجام شد. موش‌های سوری نر سالم با سن تقریبی ۸ تا ۱۲ هفته و وزن تقریبی ۲۵-۳۰ گرم از آزمایشگاه حیوانات دانشگاه بقیه‌الله (عج) خریداری و به مدت یک هفته برای سازگاری با محیط در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه شاهد قرار گرفتند. بعد از بیهوش کردن موش، به منظور استخراج ماکروفاژ ۱۰ میلی‌لیتر نرمال سالین سرد به داخل صفاق لاواژ گردید و مایع حاوی سلول‌های ایمنی بدست آمده ساترینفوژ شد. سپس رسوب سلولی بدست آمده ۲ مرتبه با

معرفی شدند. اسانس‌گیری از گیاهان در پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج به روش تقطیر با آب و توسط دستگاه کلونجر انجام شد (Ghasemi Dehkordi et al., 2003; Zhang et al., 2018).

استخراج و آنالیز اسانس

استخراج اسانس به روش تقطیر با آب (دستگاه کلونجر) به مدت ۴ ساعت انجام شد. اسانس گیاهان پس از آماده‌سازی با دستگاه‌های گاز کروماتوگرافی تجزیه شد. دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC) استفاده شده از نوع Agilent 6890 با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع BPX5 بود. برای شناسایی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس، نمونه که توسط n-هگزان رقیق شده بود به مقدار ۱ میکرولیتر به دستگاه GC/MS تزریق شد. برنامه دمایی ستون به صورت ذیل تنظیم گردید: دمای ابتدایی ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد و بعد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد و ۳ دقیقه توقف در این دما و زمان پاسخ ۷۵ دقیقه بود. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد به صورت اسپیلیت ۱ به ۳۵ بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان (فلو) ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده گردید. طیف‌نگار جرمی (MS) مورد استفاده مدل Agilent 5973 با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود. محدوده اسکن طیف‌ها از ۴۰ تا ۵۰۰ نانومتر تنظیم گردید. نرم‌افزار مورد استفاده chemstation بود. شناسایی نوع ترکیب‌های اسانس با استفاده از GC/MS و درصد ترکیب‌ها با استفاده از دستگاه GC تعیین شد (Adams, McLafferty & Stauffer, 1989; Adams, 2007).

غلظت نهایی اسانس در چاهک می‌باشد.

سنجش فعالیت حیاتی سلول با آزمون MTT

پس از ۲۴ ساعت مجاورت سلول‌ها با ترکیب‌های گیاهی، برای بررسی میزان فعالیت متابولیکی که نوعی مارکر سلول‌های زنده محسوب می‌شود آزمون MTT انجام شد. تشکیل کریستال‌های بنفش رنگ فورومازان در نتیجه احیای MTT نشان‌دهنده فعال بودن آنزیم‌های زنجیره تنفسی و معیاری برای زنده بودن سلول‌هاست. محلول MTT (DNA biotech) با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آماده شد. به میزان ۱۰٪ حجم سوسپانسیون سلولی، به هر چاهک اضافه و پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ قرار گرفت. پس از ۴ ساعت پلیت را سانتریفوژ کرده و محیط رویی کشت به آرامی برداشته و برای حل کریستال‌های فورومازان رسوب کرده، ایزوپروپانول (Merck) (۰/۰۴ مولار HCl) اضافه گردید و میزان رنگ هر چاهک با دستگاه میکروپلیت ریدر (Biotek USA) در طول موج ۴۹۲ خوانده شد (Yaraee et al., 2011; Pozzolini et al., 2003).

به‌منظور بررسی مداخله احتمالی اسانس گیاه *O. majorana* و *O. vulgare* با محلول MTT، ابتدا اسانس‌ها با غلظت‌های ۱-۰/۰۱ درصد و RPMI-1640 به‌عنوان گروه کنترل تهیه شد. سپس محلول MTT به چاهک‌ها اضافه گردید. پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت و محیط رویی به آرامی برداشته و در نهایت ایزوپروپانول اضافه شد. میزان جذب نوری با دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۴۹۲ خوانده شد. نتایج نشان می‌دهد که هیچ‌یک از غلظت‌های دو اسانس *O. majorana* و *O. vulgare* موجب ایجاد تداخل در آزمون MTT نمی‌شود.

ایندکس فعالیت (Fold Increase)

نتایج آزمون MTT به‌صورت میانگین جذب نوری و Fold Increase گزارش شده است. Fold Increase به معنی

RPMI-1640 شستشو شد. تعداد و درصد کل سلول‌های زنده با ترکیب کردن میزان یکسانی تریپان بلو (DNA biotech) و سوسپانسیون سلولی با استفاده از لام نتوبار شمارش و تعداد 4×10^5 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. پلیت به مدت ۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ قرار گرفت، سپس برای حذف دیگر سلول‌های صفاقی، محیط رویی کشت خارج و ماکروفاژهای چسبیده به کف پلیت ۲ مرتبه به آرامی با نرمال سالین گرم (با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) شستشو داده شد. در آخر محلول RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FBS به هر چاهک اضافه شد و چاهک‌ها از نظر یکنواخت بودن تعداد سلول با میکروسکوپ INVERT بررسی شدند (Doyle et al., 1995).

آماده‌سازی طحال و کشت لنفوسیت

به‌منظور تهیه لنفوسیت، طحال موش در شرایط استریل خارج شد و سلول‌های آن با روش تزریق RPMI-1640 و خرد کردن با پنس استخراج شد. برای حذف گلبول‌های قرمز از بافر لیزکننده که حاوی کلرید آمونیوم (Merck) ۰/۱۶ مولار با ۱۰٪ تریس (Merck) ۰/۱۷ مولار بود، استفاده شد و پس از ۲ دقیقه برای خنثی‌سازی فرایند لیز سلولی، به همان نسبت FBS اضافه گردید. پس از سانتریفوژ برای ایجاد سوسپانسیون سلولی، محلول RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FBS اضافه شد و پس از شمارش سلول‌های زنده، تعداد 2×10^5 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد (Yaraee et al., 2011; Pozzolini et al., 2003).

در مرحله پایانی کشت، اسانس *O. vulgare* و *O. majorana* در غلظت نهایی ۰/۰۱-۱٪ به‌طور مجزا به چاهک‌های سلول BCL-1 و لنفوسیت و ماکروفاژ اضافه شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ قرار گرفتند (۵ چاهک به ازای هر حالت در نظر گرفته شد). یادآوری می‌شود که رقت‌سازی با محیط کشت RPMI انجام شده و تمام غلظت‌های ذکر شده،

میزان افزایش فعالیت حیاتی در گروه نمونه نسبت به گروه کنترل می‌باشد که از رابطه زیر بدست می‌آید.

$$\text{fold increase} = \frac{\text{mean OD test}}{\text{mean OD control}}$$

مهار رشد (Growth Inhibition)

همچنین درصد مهار رشد (growth inhibition) سلول‌های سرطانی در اثر مجاورت با اسانس گیاهی که با آزمون MTT سنجیده شده است از طریق فرمول زیر محاسبه می‌شود.

$$\text{growth inhibition}(\%) = \frac{\text{mean OD control} - \text{mean OD test}}{\text{mean OD control}} * 100\%$$

IC₅₀ (Inhibitory Concentration)

IC₅₀ به معنی غلظت ایجادکننده ۵۰٪ مرگ و میر سلول BCL-1 می‌باشد که با محاسبه سمیت غلظت‌های مختلف اسانس گیاهی و رسم نمودار تعیین می‌شود.

سنجش میزان سمیت اسانس با آزمون LDH

لاکتات دهیدروژناز یک آنزیم پایدار سیتوزولی است که در نتیجه آسیب به غشاء سلولی آزاد می‌شود و به‌عنوان مارکر آسیب و حتی مرگ سلولی مطرح است. سنجش میزان سمیت فرآورده گیاهی با آزمون LDH طبق پروتکل انجام شد. بدین منظور پس از (حداقل ۱۸ ساعت) ۲۴ ساعت مجاورت سلول‌ها با غلظت‌های مختلف اسانس *O. vulgare* و *O. majorana* پلیت سانتریفوژ شد و ۵۰ میکرولیتر

محلول رویی کشت هر چاهک برداشته و به پلیت دیگر منتقل گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر محلول Reaction mix کیت LDH (ROCH) به آنها اضافه شد. به مدت ۹۰ دقیقه در محیط بی‌نور و دمای اتاق نگهداری و میزان جذب نوری با دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد. این آزمون برای گروه سلول‌های مرده با تریتون ۱۰۰ (DNA biotech) با غلظت ۵٪ به‌عنوان کنترل مثبت (۱۰۰٪) و سلول‌های سالم بدون اسانس به‌عنوان کنترل پایین (۰٪) و محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FBS به‌عنوان کنترل منفی (بک گراند) و کنترل اسانس (به منظور حذف اثر تداخل ترکیب‌ها با آزمون LDH) نیز انجام شد. نتایج به‌صورت درصد مسمومیت سلولی گزارش می‌شود (Stockinger et al., 2007).

$$\text{cytotoxicity}(\%) = \frac{\text{exp. value} - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} \times 100$$

نتایج

پس از اتمام فرایند اسانس‌گیری حجم آنها اندازه‌گیری شد. به ازای هر ۴۲۵ گرم پودر برگ گیاه *O. vulgare* یک میلی‌لیتر اسانس (۲۵٪) و به‌ازای هر ۴۰۰ گرم پودر برگ گیاه *O. majorana* ۱/۵ میلی‌لیتر اسانس (۳۷٪) بدست آمد. شناسایی ترکیب‌های اسانس با کمک طیف نرمال آلکان‌ها و شاخص بازداری آنها و در مرحله بعد مقایسه آن

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها به‌وسیله نرم‌افزار SPSS24 انجام شد. با توجه به نتایج آزمون شاپیرو-ویلک تمام داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار بوده و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با آزمون‌های تحلیل واریانس یک‌طرفه ANOVA انجام گردید. مقادیر Pvalue کمتر ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

اجزاء در اسانس *O. vulgare* بیشتر از *O. majorana* بوده است. این دو اسانس تنها در ۱۲ ترکیب با یکدیگر مشترک می‌باشند. مهمترین ترکیب‌های مشترک شامل ساینین، گاما-تریپنین، ترپینین-۴-آل و لینالول می‌باشد.

با داده‌های موجود در کتاب‌های مرجع و همچنین طیف‌های جرمی ترکیب‌های استاندارد انجام شد. همانطور که نتایج در جدول ۱ نشان داده است دو اسانس *O. vulgare* و *O. majorana* دارای ترکیب‌های متفاوتی می‌باشند. تنوع

جدول ۱- ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس روغنی دو گونه *O. majorana* و *Origanum vulgare*

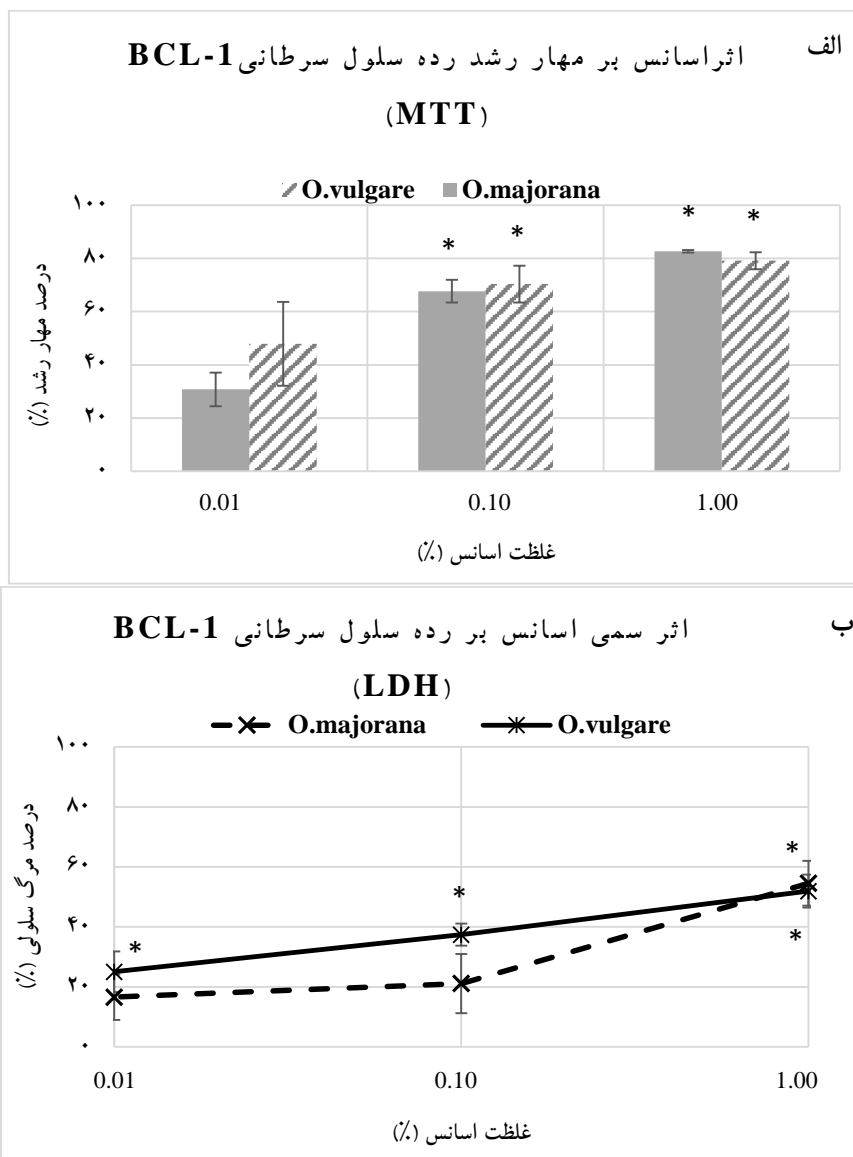
<i>O. majorana</i> (%)	<i>O. vulgare</i> (%)	شاخص بازداری (RI)	نام ترکیب	ردیف
-	۰/۳	۸۷۲	2E-hexenal	۱
۰/۴	۰/۴	۹۳۷	α -thujene	۲
۰/۷	۰/۳	۹۴۵	α -pinene	۳
۵/۷	۹/۳	۹۸۷	sabinene	۴
۰/۸	-	۹۹۲	β -pinene	۵
-	۱/۲	۹۹۹	1-octen-3-ol	۶
۱/۵	۱/۷	۱۰۰۳	myrcene	۷
-	۰/۳	۱۰۱۵	1-octanol	۸
۷/۱	۱/۲	۱۰۳۲	α -terpinene	۹
۳	۳/۸	۱۰۴۲	p-cymene	۱۰
۱/۶	۱/۰	۱۰۴۵	limonene	۱۱
۲/۳	-	۱۰۴۷	β -phellandrene	۱۲
-	۱/۶	۱۰۴۸	eucalyptol	۱۳
-	۷/۵	۱۰۵۲	trans- β -ocimene	۱۴
-	۳/۹	۱۰۶۲	β -cis-osimene	۱۵
۱۲/۶	۳/۳	۱۰۷۵	γ -terpinene	۱۶
۲/۰	-	۱۰۸۹	cis-sabinene hydrate	۱۷
۲/۷	۰/۶	۱۱۰۱	terpinolene	۱۸
۱/۷	۱/۶	۱۱۱۹	linalool	۱۹
۸/۷	-	۱۱۲۲	trans-sabinene hydrate	۲۰
۲/۲	-	۱۱۴۵	trans-para-menth-2-en-1-ol	۲۱
۱/۲	-	۱۱۶۴	terpineol	۲۲
۳۵/۴	۵/۳	۱۲۰۶	terpinen-4-ol	۲۳
-	۰/۳	۱۲۱۴	myrtenol	۲۴
۶/۵	۰/۸	۱۲۲۰	α -terpineol	۲۵

ادامه جدول ۱- ...

<i>O. majorana</i> (%)	<i>O. vulgare</i> (%)	شاخص بازداری (RI)	نام ترکیب	ردیف
۰/۹	-	۱۲۳۳	cis-piperitol	۲۶
-	۰/۲	۱۲۶۳	pulegone	۲۷
۰/۴	-	۱۲۶۵	linalyl acetate	۲۸
-	۰/۴	۱۲۷۰	cumin aldehyde	۲۹
-	۰/۳	۱۳۱۴	E-anethole	۳۰
-	۰/۳	۱۳۱۹	carvacrol	۳۱
-	۰/۲	۱۳۹۴	α -cubebene	۳۲
-	۲/۶	۱۴۰۳	β -bourbonene	۳۳
-	۰/۷	۱۴۰۸	β -elemene	۳۴
۱	-	۱۴۴۰	caryophyllene	۳۵
-	۹/۳	۱۴۴۲	E-caryophyllene	۳۶
-	۱/۱	۱۴۷۸	α -humulene	۳۷
-	۰/۷	۱۴۸۲	alloaromadendrene	۳۸
-	۱۰/۴	۱۵۰۵	germacrene D	۳۹
-	۰/۲	۱۵۱۳	γ -amorphene	۴۰
۰/۹	۱/۲	۱۵۱۹	bicyclogermacrene	۴۱
-	۴/۳	۱۵۲۳	α -farnesene	۴۲
-	۰/۳	۱۵۲۸	β -bisabolene	۴۳
-	۰/۲	۱۵۳۷	γ -cadinene	۴۴
-	۱/۶	۱۵۴۱	δ -cadinene	۴۵
-	۰/۴	۱۵۴۶	cis-calamenene	۴۶
-	۳/۶	۱۶۰۸	spathulenol	۴۷
-	۷/۶	۱۶۱۳	caryophyllene oxide	۴۸
-	۰/۸	۱۶۲۴	viridiflorol	۴۹
-	۰/۴	۱۶۳۴	isoaromadendrene epoxide	۵۰
-	۰/۴	۱۶۷۵	ι -muuroloal	۵۱
-	۱/۳	۱۶۸۷	α -cadinol	۵۲
-	۰/۳	۱۸۶۱	hexahydrofarnesyl acetone	۵۳
۹۸/۴	۹۲/۳		total identified	

مسمومیت سلولی تحت تأثیر اسانس‌های *O. vulgare* و *O. majorana* بر رده سلول سرطانی BCL-1 به روش MTT سنجیده و میزان مهار رشد نسبت به گروه کنترل محاسبه شده‌است.

اثر غلظت‌های مختلف اسانس روغنی (۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ درصد) *O. majorana* بر رده سلول سرطانی BCL-1



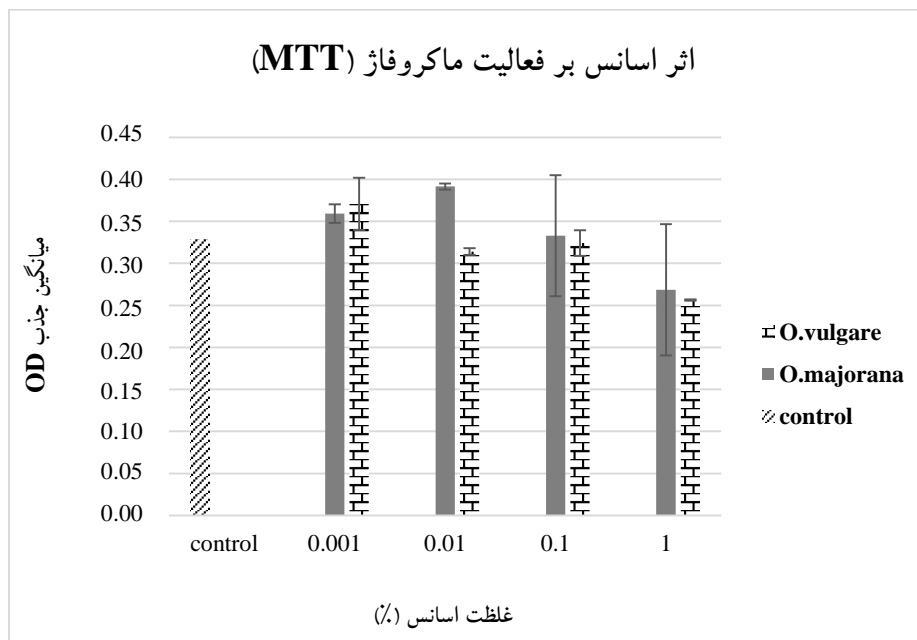
شکل ۱- اثر اسانس روغنی *O. majorana* و *O. vulgare* بر مهار رشد رده سلول سرطانی BCL-1؛

الف: براساس داده‌های آزمون MTT، ب: براساس داده‌های آزمون LDH

هر چاهک حاوی 2×10^4 سلول بوده و برای هر غلظت ۵ چاهک (۵ بار تکرار) در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) گزارش شده است. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری آماری در نظر گرفته شده است. * نشان‌دهنده تفاوت آماری نسبت به گروه کنترل می‌باشد. در آزمون MTT نتایج به صورت درصد مهار رشد و در آزمون LDH به صورت درصد سمیت گزارش شده است.

غلظت ۰/۰۳٪ می‌باشد. به این ترتیب اسانس *O. vulgare* نسبت به اسانس *O. majorana* در غلظت پایین‌تری موجب مرگ ۵۰٪ از سلول‌های سرطانی BCL-1 می‌شود. نتایج آزمون LDH در سلول سرطانی BCL-1 مجاور شده با اسانس *O. vulgare* و *O. majorana* نشان می‌دهند که غلظت ۱٪ اسانس *O. vulgare* و *O. majorana* در سلول سرطانی موجب افزایش آزادسازی LDH شده است که طبق فرمول، برابر ۵۰٪ مرگ و میر می‌باشد و بالاترین سمیت در همین غلظت دیده می‌شود که از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد. اسانس *O. vulgare* در غلظت‌های کمتر یعنی ۰/۱٪ و ۰/۰۱٪ به ترتیب باعث مرگ و میر ۲۵٪ و ۳۷٪ سلول‌های سرطانی می‌شود که هر دو نیز از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (Pvalue<0.05). اما اسانس *O. majorana* در غلظت‌های کمتر (۰/۱٪ و ۰/۰۱٪) منجر به مرگ حدود ۲۰٪ از سلول‌های سرطانی می‌شود که این میزان سمیت معنی‌دار نمی‌باشد (شکل ۱).

همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود، در مورد اسانس هر دو گیاه با افزایش غلظت شاهد افزایش ظرفیت مهار رشد سلول سرطانی BCL-1 هستیم. این آثار به نحوی است که در دوز بالا یعنی غلظت ۱٪، در هر دو اسانس موجب مرگ حدود ۸۰٪ از سلول سرطانی BCL-1 می‌شود و در غلظت پایین‌تر (۰/۱٪) اسانس *O. vulgare* و اسانس *O. majorana* به ترتیب ۷۰٪ و ۶۷٪ رشد رده سلول سرطانی BCL-1 را مهار می‌کنند (نزدیک به ۷۰٪) که از نظر آماری معنی‌دار هستند (Pvalue<0.05). حتی در کمترین غلظت (۰/۰۱٪) اسانس *O. vulgare* تا ۴۷٪ و اسانس *O. majorana* تا حدود ۳۰٪ فعالیت حیاتی سلول سرطانی نسبت به گروه کنترل (بدون اسانس) کاهش می‌یابد. قابل توجه است که سلول‌های سرطانی BCL-1 در گروه کنترل که هیچ‌یک از اسانس‌های روغنی را دریافت نکرده‌اند در طول ۲۴ ساعت رشد و تکثیر چشمگیری داشته‌اند. در این آزمون، میزان IC_{50} محاسبه شده برای اسانس *O. vulgare* غلظت ۰/۰۱٪ و برای اسانس *O. majorana*



شکل ۲- اثر اسانس روغنی *O. majorana* و *O. vulgare* بر فعالیت حیاتی ماکروفاژ بر اساس میزان جذب در آزمون MTT

اسانس به مدت ۲۴ ساعت در غلظت‌های ۰/۰۰۱٪ تا ۱٪ به چاهک‌ها اضافه شد. هر چاهک حاوی 2×10^5 سلول بوده و داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) گزارش شده است. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری آماری در نظر گرفته شده است.

را بر ماکروفاژ داشته است. اما این مقادیر به لحاظ آماری معنی دار نمی باشند.

با توجه به نتایج آزمون LDH، در تمامی غلظت‌های مورد آزمایش (۰/۰۰۱٪ تا ۱٪) میزان مرگ‌ومیر ماکروفاژها مواجه شده با اسانس گیاه *O. majorana* و *O. vulgare* در محدود صفر درصد می باشد. به عبارت دیگر هیچ‌یک از غلظت‌های اسانس *O. majorana* و *O. vulgare* بر ماکروفاژهای نرمال اثر سمی ندارند.

اثر اسانس *O. majorana* و *O. vulgare* بر فعالیت حیاتی لنفوسیت

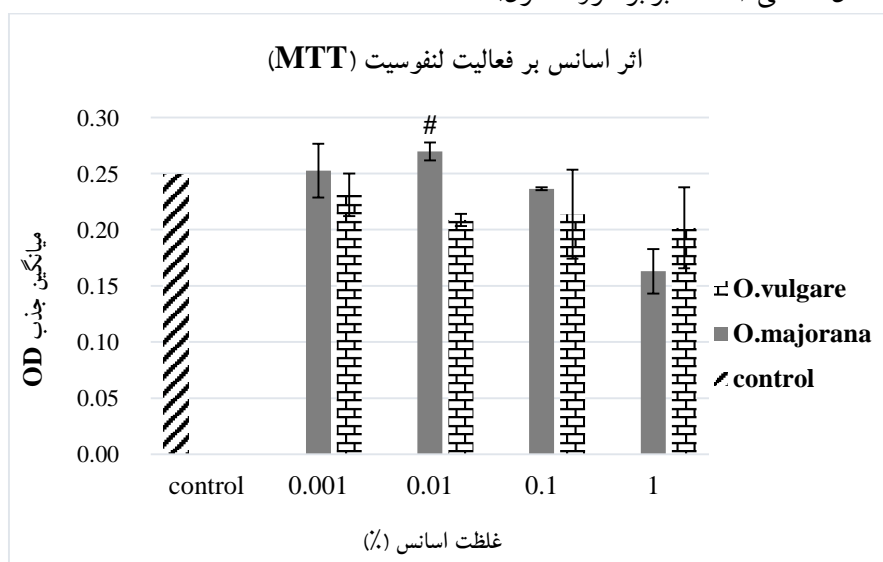
فعالیت حیاتی سلول‌ها با توانایی آنها برای احیای رنگ MTT رابطه مستقیم دارد. به طوری که هرچه تعداد سلول‌ها بیشتر شود، مقادیر بیشتری از رنگ MTT احیاء می شود، از این رو تکثیر سلولی موجب افزایش جذب در آزمون MTT می شود. اثر مجاورت ۲۴ ساعت غلظت‌های مختلف اسانس روغنی *O. majorana* و *O. vulgare* (۰/۰۰۱٪ تا ۱٪) بر فعالیت حیاتی لنفوسیت نرمال در شکل ۳ دیده می شود.

اثر اسانس *O. majorana* و *O. vulgare* بر فعالیت حیاتی ماکروفاژ

ماکروفاژها با تراکم 2×10^5 سلول در هر چاهک کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف دو اسانس *O. majorana* و *O. vulgare* مجاور گردیدند. تکثیر یا تحریک فعالیت ماکروفاژها در نتیجه مواجهه با اسانس روغنی، منجر به احیای بیشتر MTT و افزایش میانگین جذب نوری می شود.

فعالیت حیاتی ماکروفاژها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس *O. majorana* و *O. vulgare* تفاوت بارزی نسبت به گروه کنترل ندارند و یک شرایط ثابت مشابه گروه کنترل ایجاد می کنند. این نتایج نشان می دهد که اسانس *O. vulgare* و اسانس *O. majorana* رشد و تکثیر ماکروفاژهای نرمال را تحت تأثیر قرار نمی دهند و اثر سمی معنی داری بر این سلول‌ها ندارند (شکل ۲).

فعالیت ماکروفاژ تحت تأثیر غلظت ۰/۰۱٪ اسانس *O. majorana*، به میزان ۱/۱۹ برابر گروه کنترل افزایش یافته است. همچنین اسانس *O. vulgare* در غلظت ۰/۰۰۱٪ بیشترین اثر فعال‌کنندگی (۱/۱۳ برابر گروه کنترل)



شکل ۳- اثر اسانس روغنی *O. majorana* و *O. vulgare* بر فعالیت حیاتی لنفوسیت بر اساس میزان جذب در آزمون MTT

اسانس به مدت ۲۴ ساعت در غلظت‌های ۰/۰۰۱٪ تا ۱٪ به چاهک‌ها اضافه شد. هر چاهک حاوی 2×10^5 سلول بوده و داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) گزارش شده است. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی داری آماری در نظر گرفته شده است. # نشان‌دهنده تفاوت معنی دار دو اسانس با یکدیگر می باشد.

با توجه به نتایج ارائه شده در این تحقیق، هر دو غلظت (۱٪ و ۰/۱٪) اسانس *O. majorana* و *O. vulgare* سمیت قابل ملاحظه‌ای بر رده سلول سرطانی BCL-1 داشته و باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی به‌طور معنی‌دار می‌شود. نکته دیگری که در تأیید کارآمدی این اسانس‌ها به‌عنوان ترکیب ضد سرطان حائز اهمیت است، اثر آنها بر سلول‌های نرمال سیستم ایمنی می‌باشد. نتایج بیانگر این مطلب است که غلظت‌های ۱٪ تا ۰/۰۱٪ هر دو اسانس سمیت معنی‌داری بر لنفوسیت‌ها نداشته‌اند. شباهت و تکرار این الگو در ماکروفاژ، تأییدی بر صحت نتایج می‌باشد. همچنین نتایج آزمون LDH نشان‌دهنده عدم وجود آسیب سلولی در سلول‌های نرمال سیستم ایمنی مجاور شده با این دو اسانس می‌باشد. این یافته در تکمیل و تأیید نتایج آزمون MTT ارزشمند است.

در مقایسه اثر دو اسانس *O. majorana* و *O. vulgare* بر لنفوسیت‌ها، تفاوت در غلظت ۰/۰۱٪ معنی‌دار بوده است. در این غلظت اسانس *O. majorana* نسبت به اسانس *O. vulgare* در فعال‌سازی سلول‌ها مؤثرتر عمل کرده است. با توجه به این موضوع که اثر فعال‌سازی احتمالی سلول‌های سیستم ایمنی در غلظت ۰/۰۱٪ اسانس *O. majorana* وجود دارد، استفاده از مشتقات این گیاه در تقویت لنفوسیت‌های بیمارانی که اغلب به ضعف ایمنی اکتسابی مبتلا هستند مانند سالمندان و درمان بیماری‌هایی همانند انواع سرطان‌ها، بیماری‌های عفونی، نقص ایمنی اولیه و AIDS که پاتولوژی آنها بر پایه نقص سیستم ایمنی می‌باشد، می‌تواند مفید واقع شود (Luu et al., 2012؛ Rubio & Schmidt, 2018؛ Arvin et al., 2007؛ Bomken et al., 2018؛ et al., 2018).

از برآیند نتایج اثر اسانس‌ها بر سلول‌های نرمال و سرطانی سیستم ایمنی می‌توان استدلال کرد که مؤثرترین غلظت اسانس *O. majorana* و *O. vulgare* در محدوده ۰/۱٪ تا ۱٪ می‌باشد، زیرا در این محدوده غلظت، مرگ سلول سرطانی BCL-1 به‌طور چشمگیری افزایش پیدا می‌کند، اما کاهش فعالیت حیاتی لنفوسیت و ماکروفاژ قابل توجه نمی‌باشد و اثر سمی معنی‌داری دیده نمی‌شود. در نهایت نتایج ما در شرایط

به‌طور کلی اسانس *O. majorana* و *O. vulgare* در غلظت ۰/۰۱٪ تا ۱٪ تغییری در فعالیت حیاتی لنفوسیت‌ها ایجاد نمی‌کند و نتایج مشابه گروه کنترل می‌باشد. همچنین فعالیت لنفوسیت تحت تأثیر اسانس *O. majorana* در غلظت‌های ۰/۰۱٪ و ۰/۰۱٪ افزایش پیدا کرده است و طبق فرمول ایندکس فعالیت این افزایش برابر ۰/۰۱ تا ۱/۰۸ برابر گروه کنترل می‌باشد اما مقادیر ذکر شده به لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد.

در مقایسه‌ای که بین غلظت‌های مختلف این دو اسانس انجام شده است، نتایج غلظت ۰/۰۱٪ حائز اهمیت می‌باشد، زیرا اختلاف معنی‌داری در نتایج آزمون MTT اسانس *O. vulgare* با اسانس *O. majorana* بر لنفوسیت‌ها وجود دارد (Pvalue=0.002) (شکل ۳).

با توجه به نتایج آزمون LDH که با هدف بررسی خواص سمی اسانس *O. majorana* و *O. vulgare* بر لنفوسیت‌ها انجام شد، میزان مرگ و میر سلولی در تمام غلظت‌ها در محدوده صفر درصد می‌باشد. این نتایج نشان‌دهنده عدم آسیب سلولی در لنفوسیت‌ها و غیرسمی بودن این دو اسانس است.

بحث

امروزه محققان بر این تلاشند تا به مؤثرترین ترکیب‌های ضدسرطان با منشأ گیاهی که کمترین اثر منفی بر سلول‌های سالم را داشته باشند، دست یابند. البته در بسیاری از تحقیقات به آثاری که ترکیب‌های ضدسرطانی بر سلول‌های نرمال سیستم ایمنی می‌گذارند توجهی نشده است. در مورد خواص آنتی‌اکسیدان و ضد میکروبی گیاه *O. vulgare* و *O. majorana* مطالعات بسیاری انجام شده است (Rahimi & Farrokhi, 2019؛ Leyva-López et al., 2017؛ Noori et al., 2015) اما هدف مطالعه ما بررسی و مقایسه خواص سمی اسانس‌های دو گونه *O. majorana* و *O. vulgare* بر رده سرطانی BCL-1 و سلول‌های تک هسته‌ای نرمال سیستم ایمنی (ماکروفاژ و لنفوسیت) در شرایط *in vitro* بوده است.

- Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P.S., Roizman, B., Whitley, R. and Yamanishi, K., 2007. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge University Press, 1408p.
- Begnini, K.R., Nedel, F., Lund, R.G., Carvalho, P.H.A., Rodrigues, M.R.A., Beira, F.T.A. and Del-Pino, F.A.B., 2014. Composition and antiproliferative effect of essential oil of *Origanum vulgare* against tumor cell lines. Journal of Medicinal Food, 17(10): 1129-1133.
- Bomken, S., van der Werff Ten Bosch, J., Attarbaschi, A., Bacon, C.M., Borkhardt, A., Boztug, K., Fischer, U., Hauck, F., Kuiper, R.P., Lammens, T., Loeffen, J., Neven, B., Pan-Hammarstrom, Q., Quinti, I., Seidel, M.G., Warnatz, K., Wehr, C., Lankester, A.C. and Gennery, A.R., 2018. Current understanding and future research priorities in malignancy associated with inborn errors of immunity and DNA repair disorders: the perspective of an interdisciplinary working group. Frontiers in Immunology, 9: 2912.
- Doyle, A., Stein, M. and Keshav, S., 1995. Assay for macrophage activation by cytokine. In: Balkwill, F.R., (Ed.). Cytokines-a Practical Approach. IRL Press, Oxford, 384p.
- Dranoff, G., 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. Nature Reviews Cancer, 4: 11-22.
- Elansary, H.O., Abdelgaleil, S.A.M., Mahmoud, E.A., Yessoufou, K., Elhindi, L. and El-Hendawy, S., 2018. Effective antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of essential oils of horticultural aromatic crops in northern Egypt. BMC Complementary and Alternative Medicine, 18: 214.
- Ghasemi Dehkordi, N.A., Sajadi, S.E., Ghanadi, A.R., Amanzadeh, Y., Azadbakht, M., Asghari, G.R., Amin, Gh.R., Haji Akhoundi, A. and Taleb, A.M., 2003. Iranian herbal pharmacopoeia (IHP). Hakim Research Journal, 6: 63-69.
- Gonzalez, H., Hagerling, C. and Werb, Z., 2018. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. Genes & Development, 32(19-20): 1267-1284.
- Gu, Y., Ting, Z., Qiu, X., Zhang, X., Gan, X., Fang, Y., Xu, X. and Xu, R., 2010. Linalool preferentially induces robust apoptosis of a variety of leukemia cells via upregulating p53 and cyclin-dependent kinase inhibitors. Toxicology, 268: 19-24.
- Han, X. and Parker, T.L., 2017. Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil in a human skin disease model', Biochimie Open, 4: 73-77.
- Hashemi-Bahremani, M., Parwaresch, M.R., Tabrizchi, H., Gupta, R.K. and Raffii, M.R., 2007. in vitro بر کشت سلول هم‌راستا با نتایج دیگر محققان، ویژگی ضدسرطانی این گیاهان را تأیید می‌کند (Han & Parker, 2017؛ Begnini et al., 2014؛ Yaraee et al., 2016). اگرچه ترکیب‌های ضدتوموری در گیاهان دارای تنوع بالایی می‌باشد اما با توجه به مشاهدات ما و نتایج آنالیز GC.MS اسانس‌ها، خاصیت ضدسرطانی این دو گیاه ممکن است به دلیل وجود ترکیب‌های اصلی مشترک مانند ساینین، گاما-ترپینن، ترپینن-۴-آل و لینالول باشد (Elansary et al., 2018؛ Gu et al., 2016؛ Iwasaki et al., 2016؛ Shapira et al., 2016؛ Nakayama et al., 2017؛ 2010). ویژگی ضد سرطانی هر یک از این ترکیب‌ها در مقالات مشابه بررسی و تأیید شده است. از این‌رو نتایج این مطالعه همسو با دیگران تحقیقات بر خواص ضدسرطانی گیاهان حاوی ترکیب‌های مذکور تأیید می‌کند. اطمینان از این نتایج مستلزم انجام تحقیقات در سطح in vivo بر حیوان آزمایشگاهی می‌باشد و اسانس *O. vulgare* و *O. majorana* در محدود غلظت ۱/۱٪ تا ۱٪ می‌تواند به‌عنوان مؤثرترین غلظت برای بکارگیری در مطالعات بعدی مطرح شود. اسانس این دو گیاه با ایجاد اثر متفاوت بین سلول سرطانی و سلول سالم منجر به مرگ اختصاصی سلول‌های سرطانی می‌شود، از این‌رو می‌تواند به‌عنوان کاندید مناسبی برای تحقیقات وسیع‌تر در حوزه درمان سرطان در نظر گرفته شود.
- ### سپاسگزاری
- این مقاله استخراج شده از پایان‌نامه دانشجویی با کد اخلاق IR.SHAHED.REC.1397.094 می‌باشد. از این‌رو از همکاری و مساعدت مسئولان و استادان محترم سپاسگزاری می‌شود. نویسندگان این مطالعه هیچ‌گونه تعارض منافی را برای انتشار مقاله اعلام نکرده‌اند.
- ### منابع مورد استفاده
- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA, 804p.

- inflammatory bowel disease and colon cancer. *Anticancer Research*, 38(7): 3811-3815.
- Schiller, M., Metzger, D., Luger, T.A., Grabbe, S. and Gunzer, M., 2006. Immune response modifiers-mode of action. *Experimental Dermatology*, 15: 331-341.
 - Shapira, Sh., Pleban, Sh., Kazanov, D., Tirosh, P. and Arber, N., 2016. Terpinen-4-ol: a novel and promising therapeutic agent for human gastrointestinal cancers. *PloS One*, 11(6): e0156540.
 - Sigvardsson, M., 2018. Molecular regulation of differentiation in early B-lymphocyte development. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7): 1928.
 - Sotoudeh, E., Mardani, F., Jafari, M., Habibi, H. and Moradyan, S.H., 2018. Growth indices, feeding efficiency and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different levels of *Echinacea angustifolia* and *Origanum majorana* extracts. *Journal of Aquatic Animals Nutrition*, 4: 1-12.
 - Stockinger, B., Veldhoen, M. and Martin, B., 2007. Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Seminars in Immunology* 19(6): 353-361.
 - Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N.R., Nogueira, J.M., Saraiva, J.A. and Nunes, M.L., 2013. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(11): 2707-2714.
 - Xaus, J., Comalada, M., Villedor, A.F., Cardó, M., Herrero, C., Soler, C., Lloberas, J. and Celada, A., 2001. Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. *Immunobiology*, 204(5): 543-550.
 - Yang, B., Chi, X.H., Lu, X.C., Tuo, S., Zhang, F., Zhang, W.Y., Tuo, C.W., Han, W.D. and Yao, S.Q., 2012. Research progress on immunocyte senescence-review. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 20(3): 782-787.
 - Yaraee, R., Ghazanfari, T., Eghtedardoost, M., Rajabi, M. and Naseri, M., 2011. The effect of MS14 on innate and cellular immune responses in BALB/c mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33(3): 509-514.
 - Yaraee, R., Kamalinejad, M., Radjabian, T., Eghtedardoost, M. and Jalali, D., 2016. Comparison of toxic effects of SIM5 and its fractions on normal resting, activated and cancerous cells. *Daneshvar Medicine*, 24: 1-12.
 - Zhang, Q.W., Lin, L.G. and Ye, W.C., 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13: 1-26.
 - Lymphomas in Iran. *Archives of Iranian Medicine*, 10(3): 343-348.
 - Iwasaki, K., Zheng, Y.W., Murata, S., Ito, H., Nakayama, K., Kurokawa, T., Sano, N., Nowatari, T., Villareal, M.O., Nagano, Y.N., Isoda, H., Matsui, H. and Ohkohchi, N., 2016. Anticancer effect of linalool via cancer-specific hydroxyl radical generation in human colon cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(44): 9765-9774.
 - Jeddi, S., Jafarpour, S.A., Yeganeh, S. and Naseri, M., 2018. Evaluation of color and tissue of rainbow trout fillet by chitosan edible coating incorporated with marjoram essential oil during refrigerated storage. *Fisheries Science and Technology*, 7: 33-39.
 - Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E.P., Vazquez-Olivo, G. and Heredia, J.B., 2017. Essential oils of oregano: biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*, 22: 989.
 - Luu, S., Gardiner, E.E. and Andrews, R.K., 2018. Bone marrow defects and platelet function: a focus on MDS and CLL. *Cancers*, 10(5): 147.
 - McLafferty, F.W. and Stauffer, D.B., 1989. *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*. Wiley, 1064p.
 - Mombeini, T., Mombeini, M. and Aghayi, M., 2009. Evaluation of pharmacological effects of *Origanum* genus (*Origanum* spp.). *Journal of Medicinal Plants*, 8(29): 18-189.
 - Morshedloo, M.R., Ahmadi, H., Pirali Hamedani, M. and Yazdani, D., 2018. An over review to *Origanum vulgare* L. and its pharmacological properties. *Journal of Medicinal Plants*, 17(68): 15-31.
 - Nakayama, K., Murata, S., Ito, H., Iwasaki, K., Villareal, M.O., Zheng, Y.W., Matsui, H., Isoda, H. and Ohkohchi, N., 2017. Terpinen-4-ol inhibits colorectal cancer growth via reactive oxygen species. *Oncology Letters*, 14: 2015-2024.
 - Noori, S., Rahchamani, R., Kohsar, J.B. and Binabaj, F.B., 2015. Antibacterial effect of *Lavandula stoechas* and *Origanum majorana* essential oils against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 11: 35-41.
 - Pozzolini, M., Scarfi, S., Benatti, U. and Giovine, M., 2003. Interference in MTT cell viability assay in activated macrophage cell line. *Analytical Biochemistry*, 313(2): 338-341.
 - Rahimi, A. and Farrokhi, E., 2019. Evaluation of the effect of different drying methods on antioxidant and phytochemical activity of essential oil of *Origanum vulgare* L. subsp. *gracile*. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 7(3): 14-27.
 - Rubio, C.A. and Schmidt, P.T., 2018. Severe defects in the macrophage barrier to gut microflora in

Effects of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. on cancer cells line BCL-1 and immune system cells

F. Mashhadi¹, M. Ghorbani Nohooji² and R. Yaraee^{3*}

1- M.Sc. student, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

2- Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran

3*- Corresponding author, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

E-mail: ryaraee@yahoo.com

Received: November 2020

Revised: July 2021

Accepted: September 2021

Abstract

Plants from the fam. lamiaceae are the rich sources of medicinal compounds with the anticancer properties. In many studies, only the anticancer properties of these compounds have been investigated and their toxicity on the healthy cells has not been addressed. The present study was designed to evaluate and compare the toxic effects of *Origanum vulgare* L. and *O. majorana* L. essential oils on the cancer cells line BCL-1 and normal lymphocytes and macrophages under *in vitro* conditions. The plant samples essential oils were extracted using the hydro-distillation method and analyzed by GC and GC/MS. The cancer cells line BCL-1 and normal lymphocytes and macrophages were cultured with the various concentrations of essential oils for 24h. The viability and cells toxicity under the influence of essential oils were determined by the MTT and LDH assays. The GC/MS results showed that the two essential oils had only 12 common components. Both essential oils inhibited the growth of cancer cells line BCL-1 (*O. vulgare*, 47-79% and *O. majorana*, 30-82%) at a concentration of 0.01-1% (*O. vulgare* essential oil IC₅₀: 0.01% and *O. majorana* essential oil IC₅₀: 0.03%). The essential oils at the highest concentration (1%) did not decrease the immune cells viability. Also, according to the LDH test results, none of the concentrations of both essential oils had a toxic effect on the normal lymphocytes and macrophages. Overall, based on the present study results, the *O. vulgare* and *O. majorana* essential oils could be recommended as good candidates for the cancer treatment because they had no cytotoxic effect on the normal immune system cells in addition to having the strong anticancer properties.

Keywords: *Origanum*, anti-cancer, BCL-1, lymphocyte, macrophage.