Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics

DOI: 10.29409/ijcmg.v4i1.273

التأثير المضاد للورم للمستخلصين المائي والكحولي الخام للعرهون *Agaricus bisporus* في الفئران المغروسة بسرطانة الغدة اللبنية الفأري

وفاء فوزي الموسوي*، ناهي يوسف ياسين**، سالم رشيد حمودي***

*فرع التحليلات المرضية / كلية الصيدلة/ جامعة كربلاء
**المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية/ الجامعة المستنصرية
*** كلية الطب/ فرع الامراض النسيجية/ جامعة بغداد

الخلاصة:

صممت هذه التجربة لدراسة التأثير العلاجي للمستخلصين المائي والكحولي الخام للعرهون *Agaricus bisporus* في الفئران المغروسة بسرطانة الغدة اللبنية الفأري (AM-3) باستعمال ثلاثة جرع علاجية هي(333.3 ، 500 ، 666.6 ملغم / كغم) للمستخلص المائي والجرع (500 ، 1000 ، 1500) ملغم/كغم للمستخلص الكحولي وذلك عن طريق الحقن داخل الخلب Intra-Peritoneum (IP) لمدة 30 يوماً بواقع جرعة واحدة كل 48 ساعة فعالية علاجية في اختزال حجم الورم بشكل يعتمد على الجرعة المستخدمة منها. كانت الجرعة العلاجية للمستخلص المائي (666.6) ملغم/كغم هي الأفضل تأثيراً من خلال تثبيطها لحجم الورم بنسبة بلغت 87.10% .

أما المستخلص الكحولي فكانت الجرعة العلاجية الأفضل هي (500) ملغم/كغم بنسبة تثبيط لحجم الورم بلغت 87.93%. أن مقارنة نسبة تثبيط حجم الورم لمختلف المجاميع العلاجية يوضح الفروق المعنوية الكبيرة بين هذه المجاميع ومجموعة السيطرة.

بيّن الفحص النسيجي لورم سرطانة الغدة اللبنية الفأري والمعالج بالمستخلصين الخام ولجميع الجرع المستخدمة وجود نسيج ليفي يحيط ببقايا الورم مرتشح بعدد هائل من الخلايا الالتهابية مع ظهور تنخر واسع داخل الورم.

المقدمة:

أهتم العلماء والباحثون بدراسة السرطان منذ اكتشافه وإلى يومنا هذا وبجوانبه كافة ، لما يشكله من خطر كبير على حياة الإنسان حيث أصبح بمثابة الشبح الذي يثير الرعب بين الكثير من الناس ويهدد حياتهم إذ يعد ثاني أهم مسببات الموت في العالم بعد أمراض القلب والأوعية الدموية (1) .

ان العديد من الأعشاب الطبية شاع استخدامها وسائل متممة للطب التقليدي خاصة في البلدان الأسيوية، حيث تقوم بتعديل العلاقة بين المضيف والورم من خلال بعض التحويرات التي تحدثها في الاستجابة للمضيف ضد الخلايا السرطانية وصولاً إلى الفعل العلاجي المطلوب (2). تمتاز طرائق الطب المكمل والبديل بفاعليتها المانعة أو الواقية من مرض السرطان، فهي عامل وقائي فعّال ومثالي لكونها قليلة أو عديمة السمية، وذات كفاءة عالية في مواقع متعددة من الجسم، مع سهولة تناولها عن طريق الفم، وكلفتها قليلة، فضلاً عن أنها مقبولة من الجميع (3).

تعد العراهين من الأغذية الطبية لما لها من قيمة غذائية عالية في المجتمعات العالمية (4). ويعد عرهون *Agaricus bisporus* من أهم العراهين المأكولة (5) Edible Mushroom والتي استخدمت منذ آلاف السنين مصدرا غذائيا مهما ومواد طبية في العديد من المجتمعات في العالم وخاصة في اليابان والصين (6). وأن عدوى الاهتمام بالعراهين انتقلت إلى المجتمعات الغربية وخاصة المجتمع الأمريكي. وبتقدم البحث أثبتت الدراسات القيمة الغذائية العالية للعرهون وقدرته على تقوية الصحة العامة (7).

ونظراً لكون العلاجات المتاحة للسرطان كالعلاج الكيميائي والإشعاعي لم تعط نتائج شفائية عالية لذلك أصبح التوجه إلى المستحضرات الطبيعية للعرهون خاصة تلك التي تظهر فعلاً مضاداً للورم من خلال تنشيطها الجهاز المناعي وقتلها الخلايا السرطانية من دون الضرر بالخلايا الطبيعية (8)، فهي تسلك سلوك المواد المضادة للأكسدة (9) والمضادة للالتهاب (10). لقد وجد أن المستخلص المائي المائي الخام لعرهون Agaricus blazei Murill (ABM) له تأثيراً مضاداً للورم Antitumor وتأثيراً مضاداً للطفرات Antimutagenic (12,11) ، فضلا عن كونه معدلاً للحالة المناعية Immunological status من خلال تحفيزه لتكوين IL-12 وهو من الحركيات الخلوية المنظمة للاستجابة المناعية الخلوية (14,13) وتظهيره لمعقد التطابق النسيجي الصنف الثاني (15) MHC-2 وبذلك يمكن ان يستعمله المرضى المصابون بالسرطان والخاضعين للعلاج الكيميائي للتغلب على الآثار السلبية للعلاج (كفقدان الشهية وتساقط الشعر والوهن العام مع عدم الاستقرار النفسي). وقد أوضحت العديد من الدراسات على الحيوانات المختبرية أنه

Corresponding Address:
Nahi Y. Yaseen
Iraqi Centre of Cancer and Medical Genetics Research / Al Mustasiyria University
Email: nahiyaseen@yahoo.com

عند حقن المستخلص (ABM) داخل الكتلة الورمية Intratumer سوف يزيد من ارتشاح الخلايا القاتلة الطبيعية NK لموقع الورم مؤدياً إلى زيادة فعالية هذه الخلايا في تحطيم الكتلة الورمية (16) وزيادة ارتشاح خلايا Th1 وتحطيمها للخلايا الورمية مع قدرتها على أنتاج IFN-γ وحثها على تظهير مستقبلات CTL (18,17)، وعند إعطاءه عن طريق الفم ينتج عنه اضمحلال الورم (19). ان حقن المستخلص الكحولي (ABM) داخل الورم يحث الخلايا الورمية للدخول في الموت الخلوي المبرمج ويوقف دورة حياة الخلية السرطانية و له قدرة على تحفيز الخلايا البلعمية في إفراز عامل تنخر الورم TNF - α و أنترلوكين-8 (1L-8) وأوكسيد النتريك Nitric oxide (20).

ان بعض مستخلصات العرهون المستخدمة في الدراسات العلاجية للأورام تحضر بطريقة الاستخلاص الحار أو الاستخلاص المائي القلوي لعديد السكريات (21)، التي يتم تجريبها على أنظمة ورمية متعددة أكثرها شيوعاً الأورام المغروسة في الفئران خاصة في التجويف الحبني Ascitic، وثم متابعة الفعاليات الحياتية التي تظهرها هذه المستخلصات، فقد أكدت البحوث أن مركبات عديد السكريات ذي الوزن الجزيئي العالي هي التي يعزى لها النشاط البايولوجي داخل الفئران المعاملة (22)، على الرغم من أنها لم تبد فعّالية سامة للخلايا السرطانية لكنها أعطت فعلاً مضاداً لها (23).

ان للمستخلصات الخام لعرهون Agaricus blazei فعالية مضادة للأورام ففي دراسة أجريت على خلايا سرطان أبيضاض الدم اللمفاوي Lymphocytic leukemia (L1210) المغروسة في بريتون الفئران Nude mice وعلى خلايا سرطان الرئة Lewis lung carcinoma (3LL) المغروسة في عضلات الفئران، وجد أن حقن المستخلص الخام لعرهون Agaricus في بريتون الفئران الحاملة للورم وبجرعة مقدارها (75mg/kg) من وزن الجسم يومياً سبب إطالة فترة حياة الفئران الحاملة لسرطان أبيضاض الدم بنسبة 50% و 14% لتلك الحاملة لسرطان الرئة بالمقارنة مع السيطرة (2) .

المواد وطرائق العمل:

• **تحضير المستخلصين المائي والكحولي الخام للعرهون**

أجريت الدراسة على فطر العرهون *Agaricus bisporus* الذي تم الحصول عليه من مزرعة الحميدية في محافظة الأنبار / العراق, حيث يتم انتاجه سنوياً من شهر تموز وحتى شهر تشرين الثاني.

اتبعت طريقة Shimizu في تحضير المستخلص المائي(24) ، وأعطت طريقة التحضير وزنا قدره 5 غم من 70 غم من العرهون الطري أي بنسبة استخلاص 7.14% ، وكان قوام المستخلص الناتج كثيفا مع لزوجة قليلة ولون بني داكن مائل الى السواد.

كما جرى تحضير المستخلص الكحولي الخام للعرهون باستخدام جهاز السكسوليت Soxhlet وحسب الطريقة المتبعة في (25) ، وتم الحصول على مستخلص كحولي خام جاف بوزن قدره 5 غم من 50 غم مسحوق العرهون أي بنسبة استخلاص 10% ، وكان المستخلص الناتج ذا قوام كثيف مائل الى اللزوجة ذي لون بني مصفر. وعند الحاجة الى استخدام احد المستخلصين تم تذويب (1) غرام من المستخلص الجاف في (10) مل من محلول دارئ الفوسفات القاعدي (PBS) ، وخفف باستخدام المحلول نفسه وعقم من خلال ترشيحه بورق ترشيح (Whatman No. 1) ، ثم يعاد ترشيحه وتعقيمه بمرشحات غشائية سعة 0.45µm و 0.22µm على التوالي، وعدّ هذا المحلول خزيناً Stock solution الذي عُمل منه باقي التخافيف.

• **تهيئة الحيوانات المختبرية الحاملة للورم**

تم تجهيز فأرة مصابة بسرطانة الغدة اللبنية Mammary adenocarcinoma من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية من التمريرة (23) حيث استخلص الورم ووزع على (70) فأرة سليمة وكالآتي:

خدّر الحيوان الحامل للورم مع تعقيم كتلة الورم، ثم تم ادخال ابرة قياس (gage No.18) في كتلة الورم ورشفت الخلايا Aspirated بمقدار 3-5 سم3 ، ونقلت الخلايا بعدها الى بيكر معقم واضيف اليها حجم مساو من (PBS) معقم، ومزجت جيداً ثم قطعت القطع الكبيرة أن وجدت، وغسلت الخلايا ولمرة واحدة بنقلها الى انبوبة اختبار معقمة ووضعت في جهاز الطرد المركزي المبرد 1000 دورة لمدة 10 دقائق وبحرارة (4) م° ، وذلك للتخلص من الدم وحطام الانسجة، اهمل الطافي وأعيد تعليق الراسب في حجم مساو من (PBS) معقم، بعدها تمّ حقن الخلايا (1 x 105 cell / mouse) حسب (25) في كل فأر باستعمال ابرة قياس (gage No.18) وذلك بادخالها من المنطقة الظهرية الفخذية وتحت الجلد وصولاً الى المنطقة العنقية مع ضغط خفيف على المنطقة ما قبل العنق لمنع رجوع العالق الخلوي وخروجه من الفتحة عند سحب الابرة ،تمت مراقبة الحيوانات لملاحظة ظهور الورم ومتابعة نموه اما الحيوانات التي لم يظهر فيها الورم فتم عزلها.

• **التجارب العلاجية على النماذج السرطانية الفأرية**

بعد نمو الورم في الفئران المغروسة ووصول قطره الى (6-10) ملم (26) ثم تقسيم الحيوانات الى (7) مجاميع بواقع ثمان فأرات لكل مجموعة، تم اعطاء العلاج بالحقن داخل الخلب(IP) بواقع ثلاث مرات اسبوعياً للجرع الثلاثة لكل من المستخلص المائي الخام وهي (333.3 و 500 و 666.6) ملغم/كغم من وزن الجسم والكحولي وهي (500 ، 1000، 1500) ملغم/كغم من وزن الجسم وقد اختيرت الجرع اعتماداً على الجرعة الوسطية المميتة LD50، بحجم (0.3) مل لمدة 30 يوماً بواقع جرعة كل 48 ساعة فإذا ما اختفى الورم يتم قطع العلاج، تنتهي التجربة بموت آخر فأرة من مجموعة السيطرة السالبة، أعطيت الجرعات كالآتي:

المجموعة الأولى: بدورها قسمت الى ثلاث مجاميع متساوية احتوى كل قسم على ثمانية فئران، حقنت كل مجموعة بالجرع المذكورة انفا من المستخلص المائي الخام.

المجموعة الثانية: قسمت الى ثلاث مجاميع متساوية احتوى كل قسم على 8 فئران، حقنت كل مجموعة بالجرع المذكورة اعلاه من المستخلص الكحولي الخام.

المجموعة الثالثة: حقنت بمحلول (PBS) وعدت سيطرة.

خلال فترة التجربة تم قياس حجم الورم (Tumor volume (TV مرتين في الاسبوع باستعمال آلة القياس (القدمة) Vernier calipers وأخذ قياسا (الطول والعرض) صورة رقم (2-3) ، واستخرج الحجم بالاعتماد على طريقة (27) حسب المعادلة الآتية:

TV = L.W2 / 2

حيث أن:

TV: حجم الورم بالملم 3.

L : الطول.

W : العرض.

كما تم حساب النسبة المئوية لتثبيط نمو الورم Growth (Inhibition (GI% حسب28) (من المعادلة الآتية:

GI % = (A – B / A) x 100

حيث ان:

GI: النسبة المئوية لتثبيط نمو الورم.

A : حجم الورم في المجموعة غير المعالجة.
B : حجم الورم في المجموعة المعالجة.

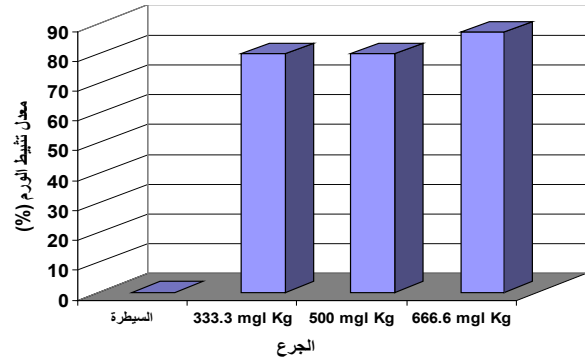
بعد انتهاء المعاملة تم قتل الفئران بطريقة التنخيع وشرحت مباشرة للحصول على عينة الورم وإجراء الفحص النسيجي المرضي Histopathological examination عليها بعد وضعها في محلول الفورمالين المتعادل (10%) ، وعمل المقاطع النسيجية لها واستخدمت صبغة هارس هيماتوكسلين Harris haematoxyline والأيوسين Eosine وحسب (29) لتوضيح تأثير العلاجات المستخدمة ومقارنتها مع السيطرة.

• التحليل الإحصائي ***Statistical Analysis***

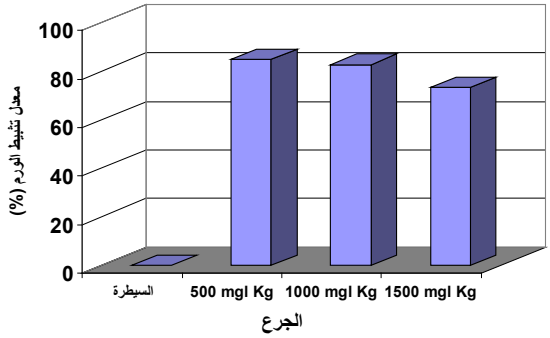
تم تحليل نتائج البيانات إحصائياً باستخدام التصميم العشوائي التام (CRD) من تجربة عاملية اشتملت على عاملين هما وقت المعاملة والتراكيز المختلفة للمستخلصين المائي والكحولي. ولتحليل نتائج البيانات احصائياً تم استخدام البرنامج الاحصائي الجاهز (30) SPSS، ولتحديد معنوية الفرق بين المعاملات استخدم اختبار دانكن متعدد الحدود (31).

النتائج:

وتشير النتائج الموضحة في الشكل (1) الى أن المعاملة بالمستخلص المائي الخام قد ادت الى تثبيط نمو الورم لكل الجرع المستخدمة بمستوى احتمالية ($P\leq0.01$) طيلة فترة التجربة حيث ازدادت نسبة التثبيط بمرور الوقت واستمرار المعاملة. وقد كانت أفضل جرعة للمستخلص المائي الذي أظهرت أعلى نسبة تثبيط لنمو الورم هي 666.6 ملغم/كغم بنسبة بلغت 87.10% لليوم الأخير من التجربة ثم الجرعتان 333.3 و (500 ملغم/كغم اللتان اعطتا نسبة تثبيط هي 79.80) و (79.90% على التوالي. وبين الشكل (2) ان تقدير تثبيط نمو الورم تم بحساب نسبة التثبيط GI%، حيث تزداد نسبة تثبيط نمو الورم معنوياً باحتمالية ($P\leq0.01$) بمرور الوقت لكل الجرع المستخدمة. فقد كانت القيمة الأعلى لتثبيط نمو الورم بعد المعاملة بالجرعتين 500) و (1000 ملغم/كغم بنسبة تثبيط مقدارها 87.93) و %(82.80 على التوالي لليوم الأخير من التجربة، أما الجرعة 1500 ملغم/كغم فقد كانت النسبة المئوية لتثبيطها هي % 73.20.



شكل *(1)*: تأثير جرع مختلفة من المستخلص المائي الخام للعرهون في معدل تثبيط الورم *(GI) %* للفئران الحاملة لسرطانة الغدة اللبنية الفأري في نهاية التجربة.



شكل *(2)*: تأثير جرع مختلفة من المستخلص الكحولي الخام للعرهون في معدل تثبيط الورم *(GI) %* للفئران الحاملة لسرطانة الغدة اللبنية الفأري في نهاية التجربة.

من جهة أخرى يبين الفحص النسيجي لورم سرطانة الغدة اللبنية المغروس في الفئران المختبرية وغير المعالج عن وجود مناطق ذات تركيب غدي Glandular structure تتألف من عدة طبقات من الخلايا بشكل صفائح (Sheet)، تشير الى القابلية العالية لتكاثر الخلايا الورمية، كذلك لوحظ وجود توسع كيسي (Cystic diltation) يحتوي على افرازات بروتينية، فضلاً عن وجود مواد شبيهة بالحليب تظهر داخل الاسناخ (Duct). وتحاط كتلة الورم الفصيصية الشكل بمحفظة Capsule مؤلفة من نسيج ليفي ناضج، تنفصل الفصيصات بوساطة امتدادات ليفية ، كما توجد مناطق تكاثر للارومات الليفية Fibroblast proliferation ووجود نسيج ساند Stroma جيد متكون من نسيج ضام غني بالاوعية الدموية (صورة 1).

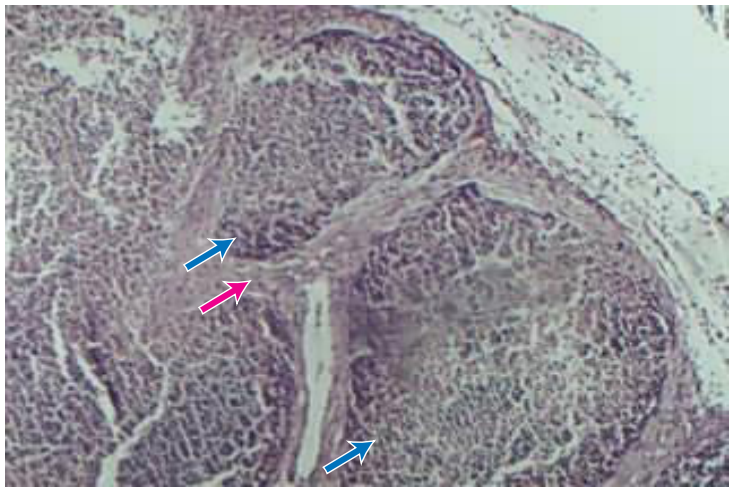
أظهر الفحص انعدام التمايز (Undifferentiated (Anaplasia في الخلايا ووجود ظاهرة التعدد الشكلي Pleomorphism مع العديد من الخلايا ذات الانوية الكبيرة الواضحة ووجود بعض الأشكال الانقسامية Mitotic figures ، كما توجد مناطق متنخرة Necrotic area تقع في مركز الورم (صورة 2).

في حين أظهر الورم المعامل بالجرعتين العالية والمتوسطة من المستخلص المائي الخام وجود تنخر واسع داخل كتلة الورم مع بقايا خلايا ورم الغدة اللبنية مع ارتشاح كبير جداً للخلايا الالتهابية وحيدة النواة (Mononuclear cells) مثل الخلايا اللمفاوية Lymphocytes والبلاعم الكبيرة Macrophages وكذلك خلايا العدلة Neutrophils (صورة 3) ، فقد كانت الخلايا من النسيج الليفي Fibrous connective tissue التي تحيط بالورم والتي تسبب عزل الورم عن جسم الحيوان (صورة 4).

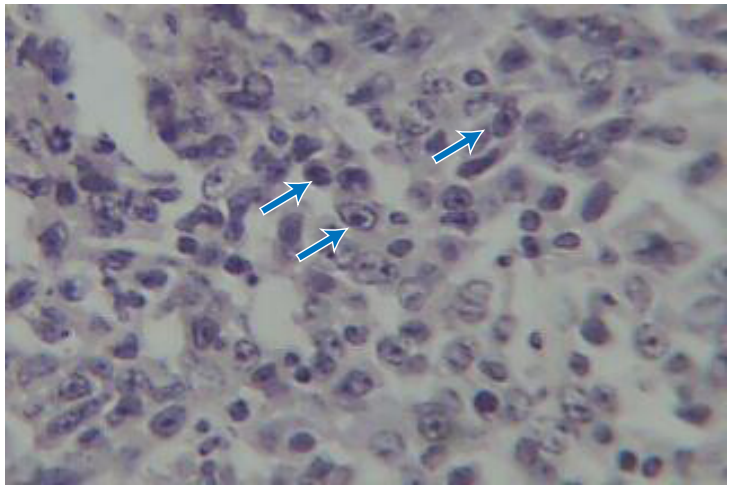
كما أظهرت الجرعة الواطئة وجود تنخر بدرجة أقل من الجرعتين العالية والمتوسطة وارتشاح أقل للخلايا الالتهابية ووحيدة النواة، كذلك وجود نسيج ليفي يحيط بالورم. كما أوضح الفحص النسجي للورم المعامل بالجرعتين العالية والمتوسطة من المستخلص الكحولي الخام وجود مناطق تنخر كبيرة ، وارتشاح هائل للخلايا الالتهابية وحيدة النواة (صورة 5)، ووجود احتقان ونزف دموي داخل نسيج الورم (صورة 6)، ووجود نسيج ليفي يحيط ببقايا ورم الغدة اللبنية الخبيث Malignant mammary adenocarcinoma فضلا عن وجود نسيج ليفي غير ناضج متغلغل في نسيج الورم (صورة 7) ووجود خلايا عانت من الموت الخلوي المبرمج (صورة 8)، وأظهرت الجرعة الواطئة مناطق تنخر مركزي أصغر من التركيزين العالي والمتوسط وارتشاح للخلايا الالتهابية وحيدة .

النواة مع نزف واحتقان دموي.

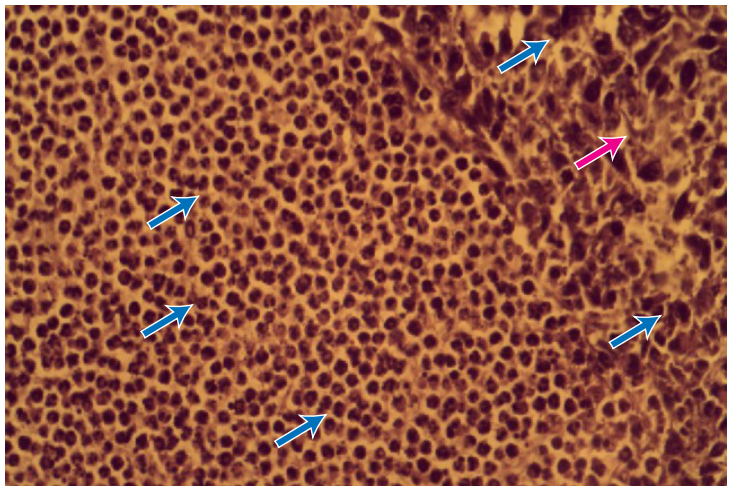
ان التغيـرات المرضية في المجاميع العلاجية قد تشـابهت بصورة عامة ، أما عند المقارنة بين الجرع المسـتخدمة فقد وجد هناك اختلاف كبيـر في شـدة التاثير اعتمد علـى الجرعة المسـتخدمة، ففي الجرعة الأعلـى ظهـرت مناطق تنخـر كبيرة وتكـون الخلايا السـرطانية في منطقـة أصغـر وكانت المنطقـة الالتهابية أكبر مقارنة بالسـيطرة. اما عنـد المعاملـة بالمسـتخلص المائي فقد وجد تشـابه فـي التأثيرات مع المستخلص الكحولي ولكن بدرجة أقل.



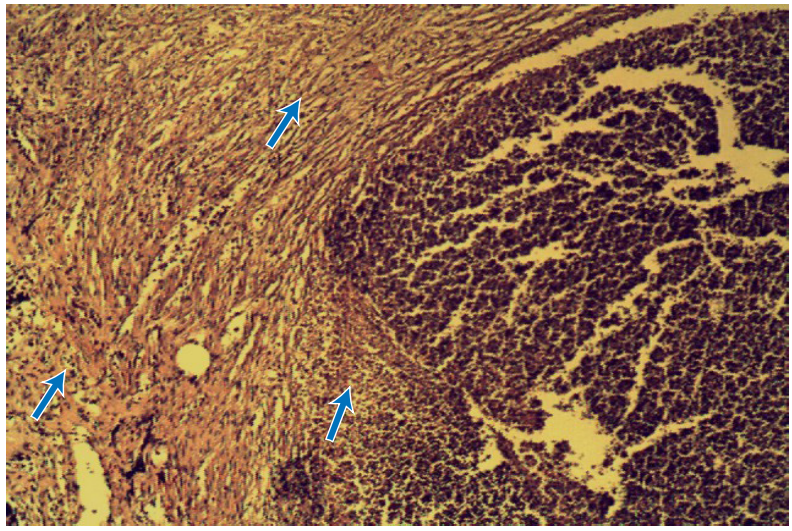
صورة *(1)*: مقطع نسـيجي لسرطانة الغدة اللبنية الفأري غير المعالج *(السـيطرة)* ، لوحظ نمو الخلايا السرطانية بحيث كونت مناطق صلدة *Solid tumor* سـدت أسناخ الغدة اللبنية *(↑)* ومفصولة بحويجزات من النسـيج الليفي *(-) (H&E 100X)*.



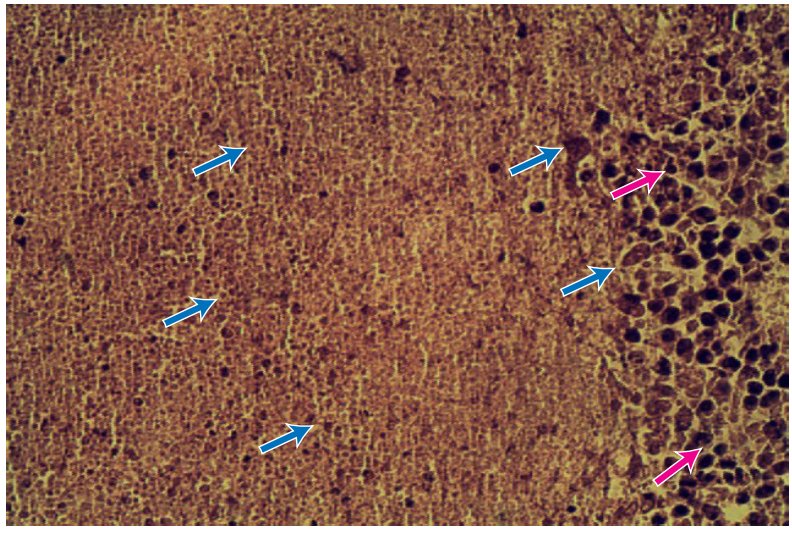
صورة *(2)*: مقطع نسـيجي لسرطانة الغدة اللبنية الفأري غير المعالج *(السـيطرة)*، يوضح تكاثر كثيف للخلايـا السرطانيـة المتعددة الأشكال والأحجام *(-) (H&E 400X)*.



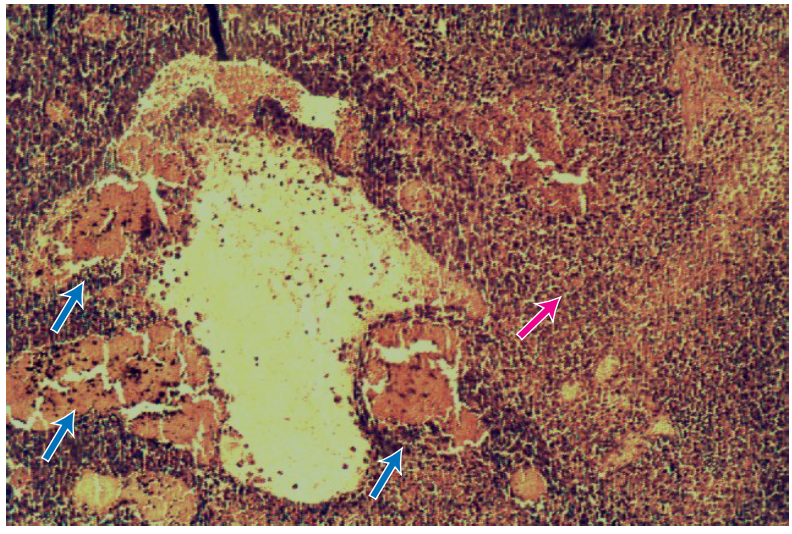
صورة *(3)*: مقطع نسـيجي لسرطانة الغدة اللبنيـة الفأري المعالج بالجرعـة الواطئة من المستخلص المائي الخام ، لوحظ ارتشاح هائل للخلايـا الالتهابية وحيدة النـواة *(-)* ووجود خلايا سرطانيـة *(-)* مع ظهور مناطق تنخر *(-) (H&E 400X)*.



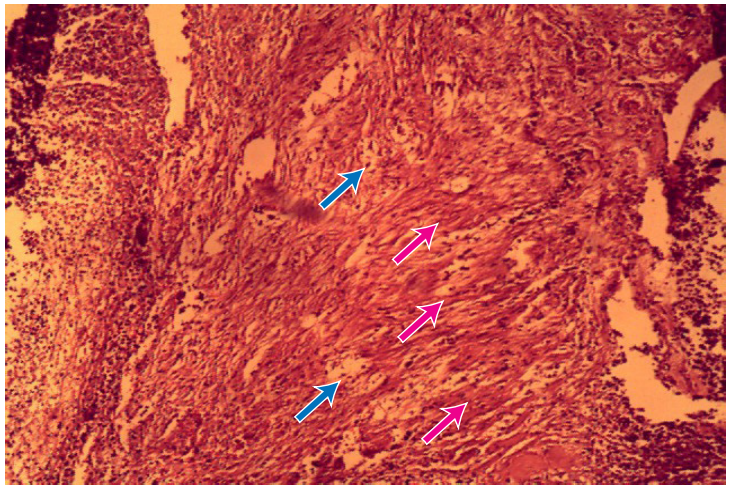
صورة *(4)*: توضح وجود نسيج ورم الغدة اللبنية الفأري الحاوي على مناطق تنخر *(-)* مع ارتشاح خلايا التهابية في النسيج الليفي المحيط بالورم *(-)*، لوحظ اتساع المحفظة الليفية المحيطة بالورم *(-)* عند العلاج بالجرعة العالية والمتوسطة من المستخلص المائي الخام *(H&E 200X)*.



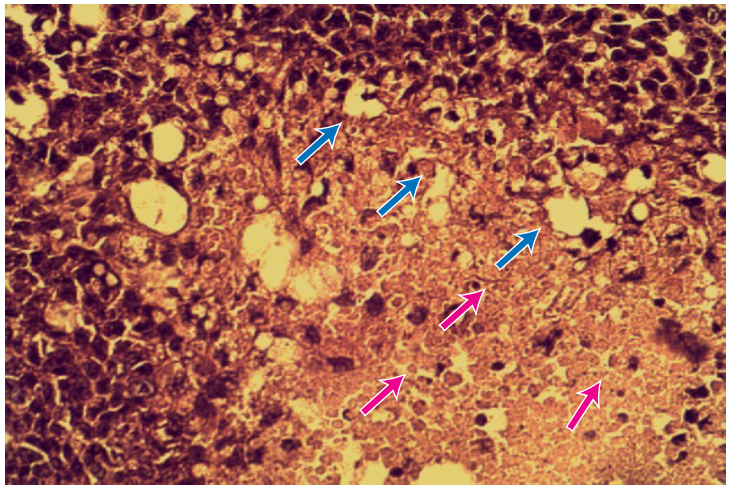
صورة *(5)*: تكبير للتنخر *(-)* داخل ورم سرطانة الغدة اللبنية الفأري المعالج بالجرعة العالية من المستخلص الكحولي الخام، لوحظ ارتشاح للخلايا الالتهابية وحيدة النواة *(-)* *(H&E 400X)*.



صورة *(6)*: مقطع نسيجي لسرطانة الغدة اللبنية الفأري، يوضح وجود مناطق واسعة من التنخر *(-)* داخل الورم وارتشاح خلايا التهابية وحيدة النواة مع احتقان ونزف دموي داخل النسيج الورمي *(-)* وذلك عند العلاج بالجرعة العالية من المستخلص الكحولي الخام *(H&E 100X)*.



صورة *(7)*: توضح وجود تفاعل ليفي متسع *(-)* مع ارتشاح للخلايا الالتهابية وحيدة النواة بين الألياف *(-)* حول وداخل ورم الغدة اللبنية الفأري المعالج بالجرعة المتوسطة من المستخلص الكحولي الخام *(H&E 200X)*.



صورة *(8)*: توضح وجود مناطق واسعة من التنخر *(-)* داخل ورم الغدة اللبنية الفأري المعالج بالجرعة المتوسطة من المستخلص الكحولي الخام ووجود خلايا عانت من الموت الخلوي المبرمج *(-) (H&E 400X)*.

المناقشة :

بينت النتائج التأثير التثبيطي الواضح لكلا المستخلصين في حجم الورم بشكل يعتمد على الجرعة المستخدمة ومدة التجريع, كما أشارت النتائج الى أن افضل جرعة للمستخلص المائي الخام المستخدم في علاج سرطانة الغدة اللبنية الفأري هو 666.6 ملغم/كغم وذلك لأنه أظهر تثبيطا لنمو الورم بنسبة بلغت 87.10% ملغم/كغم (شكل 1). أما بالنسبة للمستخلص الكحولي الخام فقد أظهرت نتائج الدراسة أن أفضل نسبة لتثبيط نمو الورم كانت في الجرعة 500 ملغم/كغم حيث بلغت 84.93) %(، (شكل 2).

ولقد أختبر تأثير مستخلص عديد السكريات للعراهين *Agaricus bisporus* و Lentinus edodes في تكاثر خلايا سرطان الكبد البشري AMC-7721 وفي خلايا سرطان Sarcoma-S180 المغروس في الفئران وأوضحت النتائج وجود انخفاض معنوي في معامل الانقسام الخلوي لهذه الخلايا وعددها وفعالية المايتوكوندريا عند مستوى احتمالية ($P\leq0.05$) بالمقارنة مع السيطرة، وأن لهذه المستخلصات قابلية على تثبيط نمو الخلايا السرطانية المغروسة في الفأر حيث كانت نسبة التثبيط 51.9% و 56.6% على التوالي (32).

لقد بينت نتائج هذه الدراسة قابلية المستخلصات الخام للعرهون في اعطاء فعل مضاد للورم بدلالة الاختزال الحاصل في حجم الورم في الفئران المغروسة بالورم فقد يكون السبب في هذا التأثير مباشرا من خلال امتلاك هذه المستخلصات بعض المركبات الفعالة القادره على حث الية الموت الخلوي المبرمج في الخلايا الورمية. تؤكد هذه النتائج مع ما توصل اليه 33) (أن اللكينات (ML-1) المعزولة من عرهون Mistleto تمتلك فعالية إيقاف نمو Cytostatic أو قتل الخلايا الورمية Cytotoxic وذلك من خلال تنشيطها لانزيم الكاسبيز Caspase 3 ، أو تنشيطها لانزيم الكاسبيز 34) Caspase 8)، فقد نجحت لكتينات (ML-1) في علاج سرطانة المبيض البشري المغروسة في الفئران المكبوحة مناعياً وذلك بتعديل التعبير الجيني عن بروتين PRb وبروتين P53 الذان يؤديان دوراً أساسياً في حماية الخلايا من التحول الورمي وذلك بمنعها من الدخول في مرحلة G1 الى S-phase أو بحثها للدخول في الموت الخلوي المبرمج (35)، حيث يشترك هذان البروتينان في تنظيم عملية الاستنساخ في دورة حياة الخلية (36).

ومن الآليات المضادة للأورام هو تثبيط مستخلصات العرهون Agaricus blazei لتكاثر الخلايا السرطانية كما في سرطان الثدي البشري (MCF-7) وذلك لاحتوائها على مركبات الفلافونات Flavones والتي تعمل على تثبيط أنزيم Aromatase (الذي يعدّ العامل الأساس في نشوء سرطان الثدي) (45) أو من خلال تأثيرها المباشر في مستقبلات الاستروجين (ER+) الموجودة في خلايا MCF-7 فهو يقلل من التعبير عن هذه المستقبلات وبذلك يوقف دورة حياة الخلية (46) . لذلك استخدمت مستخلصات العرهون للوقاية من الإصابة بسرطان الثدي عند النساء وخاصة بعد سن اليأس.

أما التأثير الأخر الذي تقترحه هذه الدراسة فقد يكون تأثيرا غير مباشر في اختزال حجم الورم واعطاء فعل علاجي في الفئران المغروسة بالورم ناتج عن احتواء هذه المستخلصات على بعض المركبات المعززة لعمل الجهاز المناعي من خلال تنشيطها للخلايا اللمفاوية التائية التي تؤدي دورا كبيرا في الاستجابة المناعية ضد الاورام السرطانية فهي تجذب الخلايا المناعية الى موقع الورم من خلال افرازها IL-2 و IFN-γ (من الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة Th-1) والتي تقوم بجذب التائية المسممة والقاتلة الطبيعية الى داخل الورم لتحطيمه مؤدية الى اختزال حجمه. وكذلك من خلال ملاحظة التغيرات النسيجية المرضية في المقاطع النسيجية للورم التي أظهرت زيادة هائلة في ارتشاح الخلايا الالتهابية داخل كتلة الورم كما أظهرت استبدال النسيج الورمي بتنخرات محاطة بنسيج ليفي سميك تحوي بداخلها عددا هائلا من الخلايا الالتهابية وحيدة النواة (كالبلاعم الكبيرة واللمفاوية التائية فضلا عن العدلات التي تؤدي دوراً مهماً في تحطيم الورم وتنخره) (صورة 3 ، 5).

ان تفسير تثبيط نمو الورم في الفئران بفعل المستخلصين يتوافق مع ما اقترحته بعض الدراسات التي تناولت آليات الفعالية المضادة للسرطان لبعض المركبات المعزولة من العراهين والنباتات الطبية. حيث عدّت مستخلصات العرهون Agaricus blazei كمضادات للورم فهي تؤثر في أداء الجهاز المناعي فتنشطه وبذلك تعمل بوصفها منشطات مناعية وذلك من خلال تحفيزها للخلايا القاتلة الطبيعية NK . تظهر خلايا NK تأثيرات مهمة في اختزال نمو الورم وتثبيط انبثاثه، فضلا عن التحلل المباشر للخلايا الهدف فأنها تظهر CD16 الذي يسمح باشتراك الاضداد حيث تشارك NK عن طريق مستقبلها للقطعة المتبلورة للاضداد المغطية للخلايا السرطانية (37) وزيادة أنتاج (IFN-γ) الذي يعدّ من المقومات الأساسية في التحري عن الأورام (38) وأن كل من الانترلوكين (IL-12) و (IL-18) يعملان على تنشيط الخلايا القاتلة الطبيعية NK) 39). كما أشار (40) الى التأثيرات المعدلة مناعياً للمستخلص الكحولي لعرهون Agaricus blazei في الفئران الحاملة لسرطان Ehrlich tumor ووجد أن علاجها لمدة 30 يوما قادر على زيادة فعالية الخلايا اللمفاوية وتكاثرها في الطحال وخاصة الخلايا القاتلة الطبيعية NK حيث ازداد عددها الى (21.48 ± 5.26)% بالمقارنة مع السيطرة (17.9 ± 7.77)% ، وكذلك حصول زيادة معنوية في إنتاج الأضداد Antibodies.

وفي دراسة أجريت على المستخلصات المائية لعرهون Agaricus blazei التي أثبتت قابليتها على تحفيز الخلايا القاتلة الطبيعية NK ولكن التأثير الأقوى كان للمستخلصات الكحولية حيث أظهرت زيادة كبيرة في انتاج (IFN-γ 42) إذ تعدّ الخلايا القاتلة الطبيعية و IFN-γ مقومات أساسية في التحري عن الأورام والجراثيم .(43)

وتقترح هذه الدراسة تأثيرا غير مباشر اخر لهذه المستخلصات في قدرتها على اختزال حجم الورم بسبب احتوائها على المركبات القادرة على اظهار فعل مضاد لتخليق الاوعية الدموية Anti-angiogenesis (الضرورية لادامة خلايا الكتلة الورمية وتكاثرها) مما ادى الى جعل الظروف داخل كتلة الورم لاوكسيجينية hypoxia منتهية بموت الخلايا الورمية وتنخرها وهذا ماظهرته المقاطع النسيجية في الورم من تنخر للخلايا الورمية واحتقان للاوعية الدموية المزودة لها (صورة 7).

ان هذا الاقتراح يؤكده العديد من الدراسات حيث ذكر (14) أن مستخلص عديد السكريات للعرهون Agaricus blazei يمتلك فعالية مضادة للورم وخاصة الصلبة منها Solid tumor وذلك لاحتوائه على مركب Ergosterol المسؤول عن هذه الفعالية على الرغم من كونه غير مسمم للخلايا السرطانية وإنما له قابلية على غلق آلية تخليق الأوعية الدموية Anti-angiogenesis مسببا موت الخلايا السرطانية من خلال منعها من التزود الدموي وتكوين أوعية دموية جديدة Neovascularization. كما تم اختبار كفاءة هذه المركبات بوصفها مواد مضادة للأورام وانبثاثها Metastasis في الفئران الحاملة للورم (Lewis lung carcinoma (LLC وقد نجحت في كبح نمو الورم وانتقاله الى الرئة بعد أعطاءها بالجرع (30 ، 100 ، 300 ملغم/كغم، وقد فُسرت هذه النتيجة ان مادة (Sodium pyroglutamate (A1 المعزولة من العرهون استطاعت تثبيط الانخفاض الحاصل في الاستجابة المناعية المتسبب عن نمو الورم وتثبيط الانخفاض في عدد الخلايا اللمفاوية التائية في الطحال مثل +CD4 و +CD8 وزيادة في عدد الخلايا التي تعاني من الموت الخلوي المبرمج والخلايا اللمفاوية التائية +CD8 والقاتلة الطبيعية NK الواصلة لمنطقة الورم وكذلك تثبيط تكوين الأوعية الدموية الجديدة التي يحث على تكوينها الورم، وبالتالي فأن هذه المادة تعدّ مادة واعدة في حقل العلاج من الأمراض السرطانية لأن لها تأثيرات متعددة فهي تسلك كمواد مضادة للأورام وكابحة لانبثاثه وفعاليتها المعدلة للاستجابة المناعية (44).

المصادر:

1. Nevidjon, B.M. and Sowers, K.W. (2000). A Nurses Guide to Cancer Cares. Lippincott Company, Philadelphia.
2. Werner, G.H. and Jolles, P. (1996). Immunostimulating agents. What next-areview of their present and potential medical applications. Eur.J.Biochem, 242:1-19.
3. Siddiqui, I.A.; Adhami, V.M.; Saleem, M. and Mukhtar, H. (2006). Beneficial effects of tea and its polyphenols against prostate cancer. Mol. Nutr. Food Res., 50: 130–143.
4. Chang, S.T. and Miles, P.G. (1989). Edible mushrooms and their cultivation. CRC Press, Boca Raton.
5. Chang, S.T. (1999). World production of cultivated edible and medicinal mushooms in 1997 with emphasis on Lentinus edodes (Berk.) Sing. in China. Int. J. of Med. Mushrooms., 1: 291–300.
6. Wasser, S.P. and Weis, A.L. (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: Current perspectives (Review). International Journal Medicinal Mushrroms, 1: 31-62.
7. Hobbs, C. (1996). Medicinal Mushrooms: An Exploitation of Tradition, Healing and Culture. Botanica Press, Santa Cruz, CA.251. pp.
8. Curt, G.A. (1998). Investment in research is a national priority. Oncologist, 3: 64-66.
9. Matsuzawa, T.; Saitoh, H.; Sano, M.; Tomita, I.; Ohkawa, M. and Ikekawa, T. (1998). Studies on antioxidant effects on Hypsizigus

1. marmoreus. II. Effects Hypsizigus mammoreus for antioxidant activities of tumor bearing mice. Oct., 118(10): 476-81.
2. Ajith, J.A. and Janardhanan, K.K. (2001). Antioxidant and anti-inflammatory activities of methanolic extract of Pbellinus rimosus (Berk.) Pilat. Indian. J. Exp. Biol,. 39: 1166-1169.
3. Ahn, W.S.; Kim, D.J.; Chae, G.T.; Lee, J.M.; Baes, S.M.; Sins, J.I. and Lee, I.P. (2004). Natural killer cell activity and quality of life were improved by consumption of a mushroom extract, Agaricus blazei Murill Kyow, in gynecological cancer patients undergoing chemo-therapy. Int. J. Gynecol. Cancer, 14: 589-594.
4. Pinheiro, F.; Faria, R.R.; Camargo, J.L.V.; Barbissan, A.L.T. and Barbisan, L.F. (2003). Chemoprevention of preneoplastic liver foci development by dietry mushroom Agaricus blazei Murill in the rat. Food and Toxicology, 4: 1543-1550.
5. Kasai, H.; He, L.M.; Kawamura, M.; Yang, P. T.; Deng, X.W.M.; Munkanta, A. Yamashita, H.; Terunuma, M. and Hirama, I. (2004). IL-12 Production Induced by Agaricus blazei Fraction H (ABH) Involves Toll-like Receptor (TLR). Evid Based Complement Alternat Med., 1(3): 259–267.
6. Takaku, T.; Kimura, Y. and Okuda, H. (2001). Isolation of an antitumor compound from Agaricus blazei Murell and its mechanism of action. J. Nurt., 131: 1407-1413.
7. Kim, G.Y. (2005). Effect of water-soluble proteoglycan isolated from Agaricsu blazei on the maturation of murine bone marrow – derived dendritic cells. Int. Immunopharmacol, 5(10): 1523-32.
8. Fujimiya, Y.; Yamamoto, H.; Nijim, S.I. (1998). Peroral effect on tumor progression of soluble beta (1,6)-glucans prepared acid treatment from Agaricus blazei Murr. Agaricacex, higher Basidiomycetes. International of Medicinal Mushrooms, 2: 43-50.
9. Okamoto, M.; Hasegawa, Y.; Hara, T.; Hashimoto, N.; Imaizumi, K.; Shimokata, K. (2005). T-helper type 1/T-helper type 2 balance in malignant pleural effusions compared to tuberculous pleural effusions. Chest. 128: 4030–5.
10. Knutson, K.L. and Disis, M.L. (2005). Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. Cancer Immunol. Immunother., 54 : 721–8.
11. Oshiman, K.; Fujimiya, Y.; Ebina, T. (2002). Orally administered beta-1, 6-D-polyglucose. Planta Med., 68: 610-4.
12. Sorimachi, K.; Akimoto, K.; Ikehara, Y. (2001). Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with Agaricus blazei Murill fractions *In vitro*. Cell structur. Funct., 26: 103-8.
13. Ohno, N.; Hashimoto, T.; Adachi, Y. and Yadomae, T. (1996). Conformation dependency of nitric oxide synthesis of murine peritoneal macrophages by beta-glucans *In vitro*. Immunol. Lett, 53: 157-163.
14. Reshetnikov, S.V.; Wasser, S.P. and Tan, K.K. (2001). Higher Basidio-mycetes as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides (Review). Inte. J. Medicinal Mushrooms, 3: 361-394,
15. Mizuno, T. (1999). The extraction and development of antitumor – active polysaccharides from medicinal mushroom in Japan (Review). International Journal of Medicinal Mushrooms, 1: 9-30.
16. Shimizu, Y. (1997). Purification of water soluble natural products. Cannell, R.J.P. (eds.). Natural product isolation methods biotechnology, 4: 329-341 Human Press Inc. Totowa, J.
17. Lee,Y.L.; Kim, H.J.; Lee, S.M.; Kim, M.J. (2003). Oral administration of Agaricus blazei (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inculation model. Exp. Anim. 52(5): 371-375.
18. Boreerg, H.; Oettgen, H.E.; Choudry, K. and Beattie, E.J. (1972). Inhibition of Established Transplants of Chemically Induced Sarcomas In Syngeneic Mice by lymphocytes from Immunized Donors. International. J. Cancer, 10: 539-547.
19. Ge, N.L.; Ye, S.; Zheng, N.; Sun, R.; Lin, Y. and Tang, Z. (2003). Prevention of hepatocellular carcinoma in mice by IL-2 and 137-1 genes co-transfected liver cancer cell vaccines. World J. Gastroenterol, 9 : 2182-5.
20. Blumenthal, R.M.; Sharkey, R.M.; Natale, A.M.; Kashi, R.; Wong, G. and Goldenberg, D.M. (1994). Comparison of equitoxic radio-immunotherapy and chemotherapy in treatment of human colonic cancer xenografts. Cancer Res., 54: 142-151.
21. Luna, L.G. (1968). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed., McGraw-Hill Book Company. New York, USA.
22. SPSS, (1998). Statistical package for social science. User's Guide for statistics.
23. Duncan, B.D. (1955). Multiple range and multiple F-test. Biometrics, 11: 1-42.
24. Zhong, M.; Tai, A. and Yamaoto, I. (2005). *In vitro* Augmentation of Natural Killer activity and Interferon-γ production in Murine spleen cells with Agaricus blazei fruiting body fractions. Biosci. Biotechnol. Biochem., 69(12): 2466-2469.
25. Bantel, H.; Engels, H.I.; Voelter, W. and Wesselborg, S. (1999). Mistletoe lectin Activate caspase-8/FLICE Independently of Death Receptor Signaling and Enhances Anticancer Drug-induced Apoptosis. Cancer Research, 59: 2083-2090.
26. Levine, A.J. (1997). Identification and characterization of a P53 homologue in drosophila melanogaster. Cell, 88: 323-331.
27. Lukas, J.; Bartkova, J.; Rohde, M.; Strauss, M.; Strauss, M. and Bartek, J. (1995). Mol. Cell. Biol., 15: 2600-2611.
28. Sorimachi, K.; Akimoto, K.; Ikehara, Y. (2001). Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with Agaricus blazei Murill fractions *In vitro*. Cell structur. Funct., 26: 103-8.
29. Smyth, M.J.; Dunn, G.P.; Schreiber, R.D. (2001). Cancer immunosurveillance and immunoediting the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. Adv. Immunol., 90: 1-50.
30. Okamura, H.; Kashiwamura, S.; Tsutsui, H.; Yoshimoto, T.; Nakanishi, K. (1998). Regulation of interferon-γ production by IL-12 and IL-18. Curr. Opin. Immunol., 10: 259-64.
31. Kaneno, R.; Fontanari, L.M.; Santos, S.A.; Stasi, L.C.D.; Filho, E.R. and Eira, A.F. (2004). Effects of extracts from Brazilian sun –mushroom (Agaricus blazei) on the NK activity and lymphoproliferative responsivness of Ehrlich tumor-bearing mice. Food and Chemical Toxicology, 42: 909-916.
32. Zh, X. and Jiang, S.M. (1996). The extracts of Gonaderma Lucidum on DNA synthesis of hepatoma SMMC-7721 cells. China Edible Fungi. 15:34-35.
33. Smyth, M.J.; Dunn, G.P.; Schreiber, R.D. (2001). Cancer immunosurveillance and immunoediting the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. Adv. Immunol., 90: 1-50.
34. Kimura, Y.; Kido, T.; Takaku, T.; Sumiyoshi, M. and Babo, K. (2004). Isolation of an anti-angiogenic substance from Agaricus blazei Murill: Its antitumor and antimetastatic actions. Cancer Sci., 95: 758-64.
35. Grube, B.; Eng, E.T.; Kao, Y.C.; Kwon, A.; Chen, S. (2001). White button mushroom phytochemicals inhibit aromatase activity and breast cancer cell proliferation. J. Nutr. Dec., 131(12): 3288-93.
36. Tanmahasamut, P.; Liu, J.; Hendry, L.B. and Sidell, N. (2004). Conjugated Linoleic acid blocks Estrogen signaling in human breast cancer cells. J. Nutri., 134: 674-680.
37. Freshney, R.I. (1994). Culture of animal cells: A manual of basic technique. New York, PP. 440.

Anti-tumor effect of Water and Alcoholic Extracts of Mushroom *Agaricus bisporus* Against Murine Mammary Adenocarcinoma-implanted Mice

Wafaa F. AL-Mosawy*, Nahi Y. Yaseen **, Salim R. Hamudi***

** Branch of Clinical Laboratory Science/College of Pharmacy /University of Kerbala'a*

***Iraqi Center for Cancer and Medical Genetics Research/ AL-Mustansiriya University*

****Department of Histopathology/College of Medicine /Baghdad University*

Abstract :

This research was designed to study the effect of water and alcoholic crude extracts of *Agaricus bisporus in vivo*. Therapeutic effect of both extracts was studied in murine mammary adenocarc- inoma- implanted mice after (I.P) administration of watery extract at concentrations of (333.3, 500, 666.6 mg/kg) and alcoholic extract at concentrations of (500, 1000, 1500 mg/kg) for 30 days alternatively.

The results revealed significant reduction in the tumor volume weather in those treated with watery extract 87.10%, or those treated with alcoholic extract 87.98%, particularly at the concentration of 666.6 mg/kg and 500 mg/kg respectively.

Histopathological study showed necrosis and infiltration of inflammatory cells within fibrous encapsulated tumor mass.