

The Combination effects of Lectin extracted from mushroom *Agaricus bisporus* and Chemotherapy by Doxorubicin and Mytomycin-C in Cytotoxicity on some tumor cells *in vitro*

التأثير المتداخل للكتين المستخلص من العرھون *Agaricus bisporus* والعلاج الكيماي بـ Doxorubicin و Mytomycin-C في سمية بعض الخلايا السرطانية في الزجاج *in vitro*

محفوظة عباس عمران¹ وفاء فوزي ابراهيم الموسوي²

*1 قسم التقنيات الاحيائية / كلية العلوم / جامعة بغداد

*2 فرع الادوية والسموم / كلية الصيدلة / جامعة كربلاء / كربلاء / العراق

الاختصاص الدقيق: فسلجة حيوانية

الخلاصة

استهدفت هذه الدراسة استخلاص اللكتين من العرھون (*Agaricus bisporus* (ABL) وتركيزه بكبرينات الامونيوم بنسب اشباع تراوحت بين 25-70% ثم ديلزة المستخلص بالماء المقطر وتجفيفه، اختبر تأثير خمسة تراكيز من اللكتين ABL المنقى جزئياً تراوحت بين 312.5 – 5000 مايكروغرام/ملتر في فحص السمية الخلوية (Cytotoxicity assay) لخطين من الخلايا الورمية وهما خط خلايا سرطان الحنجرة البشري Human epithelial cell carcinoma of larynx (Hep-2) وخط خلايا سرطان الغدة اللبنية الفأري Murine mammary carcinoma (AMN3) لثلاثة اوقات تعريض 24 و 48 و 72 ساعة. اذ سجلت نتائج تلك الاختبارات فروق معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) في نسب تثبيط نمو خلايا Hep-2 و AMN-3 معتمدة على تراكيز اللكتين المستخدمة وعلى مدة التعريض، بلغت اعلى نسبة تثبيط عند التراكيز 2500 و 5000 مايكروغرام/ملتر وكانت 24.5% و 37.5% لخلايا Hep-2 و 37.79% و 54.72% لخلايا AMN-3 بعد التعريض لمدة 48 ساعة.

كما حسبت نسبة الخلايا التي عانت من الموت الخلوي المبرمج لخلايا Hep-2 و AMN-3 عند التركيز الذي اظهر اعلى نسبة تثبيط نمو وهو (5000 مايكروغرام / ملتر) ووجدت فروق معنوية باحتمالية ($P \leq 0.01$) في عدد الخلايا التي عانت موتاً خلويماً مبرمجاً لكل من خلايا (Hep-2) بنسبة بلغت 75.14% و (AMN3) كانت النسبة 82.6% بالمقارنة مع السيطرة 10.82% و 11.35% على التوالي، ونتج من التعريض المتداخل لتراكيز متباينة من اللكتين ABL التي تسبق معاملة الخلايا الورمية بعقاري الـ DOX (Doxorubicin) و MMC (Mytomycin) ازدياد التأثير السمي لعقار DOX بمقدار 2.44 مرة على خلايا Hep-2 في المعاملة المتداخلة عند تركيز 40 مايكروغرام/ملتر من ABL و 10 مايكروغرام/ملتر من DOX و 1.5 مرة لخلايا AMN-3 في المعاملة المتداخلة عند تركيز 40 مايكروغرام/ملتر من ABL و 15 مايكروغرام/ملتر من DOX. ولم تسبب المعاملة لخلايا Hep-2 بـ ABL اية تأثيرات ايجابية في ازدياد التأثير السمي لعقار MMC، بينما ارتفع التأثير السمي لعقار MMC الى 2.79 مرة لخلايا AMN-3 عند المعاملة المتداخلة بـ 40 مايكروغرام/ملتر من ABL و 5 مايكروغرام/ملتر من MMC.

Summary

The objective of this study was the extraction of Lectin from mushroom *Agaricus bisporus* (ABL) and concentrated using precipitation in Ammonium sulfate from 25-70% saturation, followed by dialysis against distilled water and PBS, and lyophilized. The cytotoxic effect of five concentration from 312.5-5000 µg/ml of ABL were studied in cytotoxicity assay (*in vitro*) of two tumor cell lines, Human epithelial cell carcinoma of larynx (Hep-2) and Murine mammary gland carcinoma (AMN3) at different exposure times 24, 48 and 72hr. The results revealed high significant differences ($P \leq 0.001$) in inhibition rate (IR) of Hep-2 and AMN-3 dependent on Lectin concentration and exposure times, IR were the higher in Hep-2 at 2500 and 5000 µg/ml of *Agaricus bisporus* lectin (ABL) 24.5%, 37.5%, and 37.79%, 54.72% in AMN-3 after exposure to 48 hours. The determination of apoptotic cells of Hep-2 and AMN-3 at at the highest concentration (5000) µg/ml ABL revealed significant apoptotic effect in each of

(Hep-2) cell line 75.14% and (AMN3) cell line 82.6% in comparison with those of non treated (11.35, 10.82%).

The combination effects of ABL ranged from 10-60 µg/ml with drugs Doxorubicin (DOX) and Mytomycin-C (MMC) caused increasing in Cytotoxic effect of DOX to 2.44 time in Hep-2 pretreated with 40 µg/ml ABL and 10 µg/ml DOX and 1.5 time in AMN3 pretreated with 40 µg/ml ABL and 15 µg/ml DOX. But there were no positive effects in Cytotoxicity of MMC on Hep-2 pretreated with ABL, while Cytotoxic effect was increased 2.79 time in AMN-3 cells pretreated with ABL 40 µg/ml and 5 µg/ml MMC.

// المقدمة //

عرفت العرايين بقيمتها الغذائية والطبية ذات الفوائد العلاجية وذلك لتنوع المركبات ذات الخصائص الدوائية المعزولة منها واهمها عديد السكريات وعديد السكريات البيبتيدية والبروتينية واللكتينات (1)، كما درست الخصائص الإحيائية لمستخلص العر هون بشكل واسع بسبب إحتوائها على مواد فعالة تجعلها تقوم بدور كبير في علاج العديد من الأمراض كأمراض القلب وتصلب الشرايين وارتفاع الكولستيرول وضغط الدم وعلاج فقر الدم وداء السكري، وكمواد مضادة للإلتهاب والمايكروبات (2)، فضلاً عن كونها مضادة للتطير والسرطان (3).

وقد ازداد اهتمام الباحثين بلكتينات العرايين في العقد الاخير لاكتشاف اكثر من 50 نوع منها (4). فهي تعد صنف من أصناف البروتينات السكرية (glycoproteins) المرتبطة تساهمياً مع الجزء الكاربوهيدراتي من أصل غير مناعي. يوجد بشكل واسع في الحيوانات والنباتات والاحياء المجهرية، تتمثل الفعالية الحيوية للكتينات بتلازن الخلايا أو ترسيب المركبات من خلال قدرتها على الارتباط بالسكريات المعبرة (expressed) على سطوح الخلايا (5) وتحفيزها على الانقسام الخلوي (6) وفعاليتها المضادة لتكاثر الخلايا السرطانية وتأثيرها السمي عليها (7) وكونها معدلة للجهاز المناعي (8) وقابليتها على حث الية الموت الخلوي المبرمج (9).

ووجد أن للكتين المعزول من عر هون *Volvariella volvacea* تأثيراً مضاداً لسرطان sarcoma S-180 (10)، وللكتين المعزول من عر هون *Grifola frondosa* تأثيراً سمي على الخلايا السرطانية HeLa cells (11)، ويمتلك لكتين عر هون *Tricholoma mongolicum* تأثيراً مثبطاً لنمو خلايا سرطان mastocytoma P815 في الزجاج وخلايا سرطان sarcoma S-180 في الجسم الحي (12). كما اظهر لكتين عر هون *Agrocybe aegerita* تأثيراً مثبطاً لنمو العديد من خطوط الخلايا السرطانية HeLa, SW480, MGC80-3, HL-60, BGC-823, sarcoma S-180، لقدرته على حث هذه الخلايا للدخول في الموت الخلوي المبرمج (13). وقد اشارت العديد من البحوث على اهمية لكتين عر هون *Agaricus bisporus* (ABL) لفعاليتها الكبيرة في تثبيط نمو الخلايا السرطانية في الزجاج والحي كخلايا سرطان القولون البشري HT29 وخلايا سرطان الثدي MCF-7 (14). وعُد اللكتين المعزول من هذا العر هون مصدراً رئيساً لتصنيع الأدوية المضادة للسرطان من خلال تنشيطها للجهاز المناعي (15)، فضلاً عن كونها منشطات جيدة للخلايا البلعمية مسببة زيادة كفاءتها، وزيادة تحرير عامل التنخر الورمي Tumor necrosis factor (TNF-α) وإنتاج الأنترلوكين (IL-1) (16) والأنترلوكين (IL-6) والأنترفيرون كما (IFN-γ) Interferon gamma ويزيد من كفاءة الخلايا القاتلة الطبيعية (8)، كما أن له قابلية على حث الخلايا السرطانية للدخول في الية الموت الخلوي المبرمج Apoptosis (17).

يعد عقار المايتومايسين Mytomycin-C (MMC) من العقارات الكيميائية التي تستخدم لمعالجة انواع عديدة من السرطانات منها سرطان القولون والمستقيم والرئة والكبد والرحم والثدي والمبيض والمثانة (18) اذ يعمل على تثبيط تضاعف الدنا عن طريق تكوين ترابطات عرضية مع السلسلة المزدوجة للدنا او قد يسبب كسور في الكروموسومات، لذا فان الخلية المعاملة به لا تتمكن من البقاء حية (19). و ثبت ان الخلايا السرطانية تكون عالية الحساسية للمايتومايسين في مرحلة متأخرة من طور G1 لدورة حياة الخلية وخلال المراحل المبكرة من تصنيع الدنا (20)، كما انه يثبط الانقسام الخلوي نتيجة لتأثيره في مكونات خيوط المغزل خلال انقسام الخلية فضلاً عن كونه يزيد من الزيج الكروموسومي ويوقف من نظام اصلاح الدنا وربما يعمل على التأثير مع انزيم Topoisomerase II للدنا (21).

اما عقار الدوكسوروبوسين Doxorubicin (DOX) هو ايضا من العقارات الكيميائية المستخدمة في علاج السرطان لقدرته على تثبيط انزيم Topoisomerase II حيث يتداخل مع معقد الدنا والانزيم مؤدياً الى ايقاف تكوين الشريط المزدوج للدنا او بتداخله مع الدنا بصورة مباشرة (22) مسبباً ايقاف تضاعف الدنا واستنساخ الرنا الرسول mRNA (23). ان الهدف من الدراسة هو استخلاص اللكتين كمركب فعال من العر هون *A. bisporus*، وإختبار فعاليتها التلازنية وتأثيراته السمية الخلوية في نمو الخلايا السرطانية في الزجاج *in vitro* باستخدام تقنية الزراعة النسيجية، ودراسة التأثيرات العلاجية المتداخلة للكتين بتركيز مختلفة مع عقاري الـ DOX و MMC في إزدياد سمية العقارات العلاجية للخلايا السرطانية.

المواد وطرائق العمل

• استخلاص اللكتين

تم الحصول على الجسم الثمري الطري للفطر *Agaricus bisporus* من مزرعة الحميدية/ محافظة الأنبار المنتج للفترة من شهر تموز – تشرين الثاني 2005 , وأستخلص اللكتين بهرس 80 غرام من الوزن الطري للفطر مع 400 مللتر من دارئ المحلول دارئ الفوسفات القاعدي (Phosphate buffer Saline (PBS) المبرد ذو الرقم الهيدروجيني 7.2، ويحتوي اللتر منه على: 0.017gm ، 0.4gm ascorbic acid ، 0.3gm Thiourea ، 3.6gm NaCl ، 0.005gm CaCl₂ ، 0.6gm Na₂HPO₄ ، 0.04% NaN₃ (PMSF) phenylmethal sulfonyl fluoride) بوساطة خلاط كهربائي مبرد لمدة 30 دقيقة، ونقل المزيغ إلى دورق (1 لتر) ووضع على محرك مغناطيسي لتحريك المزيغ بحرارة (4) م° لمدة 18 ساعة، ورشح بوساطة قطعة قماش (الشاش)، ثم رشح مرة اخرى باستعمال ورق ترشيح (Whatman No. 1) ونبذ بجهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 6000 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة بحرارة (4) م°.

ركز المستخلص الخام للكتين بتجزئته بالترسيب بكيريتات الأمونيوم بنسب إشباع مختلفه وتم التركيز بمرحلتين الأولى من 0-25 وفيها اهمل الراسب وركز الراشح والثانية رركز الراشح بنسبة اشباع 25-70%، ثم أذيب الراسب المستحصل عليه من الخطوة الأخيرة بـ 5 مللتر من محلول PBS وأجريت ديلزته بتديلات متعددة من الماء المقطر ولمدة 18 ساعة بحرارة (4) م° ثم جفد بجهاز التجفيد Lyophilizer وحفظ في قناني زجاجية بحرارة (4) م°، وعند الحاجة الى استخدامه يتم تذيب (1) غرام من المستخلص الجاف في (10) مل من محلول PBS، وخفف باستخدام المحلول نفسه وعقم من خلال ترشيحه بورق ترشيح (Whatman No. 1)، ثم أعيد ترشيحه وتعقيمه بمرشحات غشائية سعة 0.45µm و 0.22µm على التوالي، وعد هذا المحلول خزيناً Stock solution الذي عمل منه باقي التخفيف (24).

• تقدير فعالية اللكتين

قدرت فعالية اللكتين بالإعتماد على طريقة تقدير معيار التلازن الدموي حيث استخدمت تخفيف مضاعفة (Two fold dilution) للكتين Lectin المركز من العرھون *Agaricus bisporus* (ABL) المحضر من محلول خزين بتركيز 1000 مايكروغرام/ مللتر لإختبار الفعالية التلازنية، بإستعمال 50 مايكروليتر/مللتر من محلول PBS المضاف له البومين مصل الأبقار بتركيز 60 مايكروغرام/مللتر في صفيحة الإختبار المستديرة القعر، ثم أضيف له 50 مايكروليتر من عالق كريات الدم الحمراء للإنسان لكل صنف دم من O, B, A بتركيز 5%، حضنت الصفيحة بحرارة 37 م° لمدة ساعة واحدة، ثم سجلت النتائج على شكل عيارية (Titer) وهي مقلوب أعلى التخفيف، إذ يعد ظهور ترسب حبيبي واضح حول القعر دلالة موجبة للتلازن (25).

• تهيئة خطوط الخلايا السرطانية

جهزت الخطوط الخلوية الورمية من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية/ الجامعة المستنصرية والمتمثلة بخطي خلايا سرطان الحنجرة البشري (Human epithelial cell carcinoma of larynx (Hep-2) تسلّم من التميريرة (255) و الخط AMN3 لخلايا سرطانة الغدة اللبينية الفأري (Murine mammary gland carcinoma (AMN3) تسلّم من التميريرة (62) النمماة في أوعية الزرع النسيجي (Falcon 25cm³) الحاوي على الوسط الزرع RPMI-1640 المزود بمصل الجنين البقري بتركيز 10% (Fetal Calf serum (FCS). وتم ضبط التعداد الحي لخطوط الخلايا السرطانية الى تركيز 10⁵ x (1) خلية/حفرة باستخدام صبغة التريبان الزرقاء (Trypan blue) وحسب (26).

• اختبار السمية الخلوية للكتين في نمو الخطوط الورمية في الزجاج

أختبرت خمسة تراكيز نصفية التخفيف من لكتين عرھون *Agaricus bisporus* المحضرة أنياً وهي 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 مايكروغرام/مللتر بإستعمال الوسط الزرع الخالي من المصل (Serum free media (SFM) في فحص السمية الخلوية للكتين في نمو خطوط الخلايا Hep-2 و AMN-3 بعد فترات تعريض متباينة 24, 48, 72 ساعة، وأجريت الخطوات الخاصة بالزرع النسيجي تحت ظروف معقمة حسب (27) وكالاتي:

تم تفكيك مزارع الخلايا النمماة في أوعية الزرع النسيجي والمكونة لطبقة أحادية كاملة من الخلايا (Confluent monolayer) بسكب الوسط الزرع المغذي، وغسل الخلايا بمحلول PBS الدافئ ثم بمحلول التريسين- فرسين الدافئ (المحضر بمزج 20 مللتر من محلول التريسين المعقم 1% ، 10 مليلتر من محلول الفرسين (EDTA) 1% مع 370 مللتر من محلول PBS والمعقم من خلال ترشيحه بمرشحات غشائية سعة 0.22 مايكروميتر) ، وإضافة 2-3 مللتر من محلول التريسين- فرسين الدافئ ثانية لتفكيك الخلايا ثم حظنها بحرارة 37 م° لمدة 3-5 دقيقة، وبعد تفكيكها، تمت إضافة 10-15 مللتر من الوسط الزرع المغذي الكامل، وتم مزج عالق الخلايا جيداً وأخذ منه (0.2) مل بعد كل مزجة الى كل حفرة من حفر طبق الزرع النسيجي، إذ احتوت كل حفرة على تركيز (1 x 10⁵) خلية، ثم تمت تغطية سطح الطبق بورق لاصق شفاف معتم. تركت الأطباق في الحاضنة بحرارة (37) م° لمدة 24 ساعة الى حين التصاق الخلايا في الحفرة، ومتابعة ذلك بالفحص بوساطة المجهر المقلوب الطور (Inverted microscope) وبعدها تم التخلص من الوسط الزرع القديم في الحفر، وأضيف (0.2) مل من التراكيز المحضرة أنياً لكل مستخلص بإستعمال الوسط الزرع الخالي من المصل (SFM) وهي (5000، 2500، 1250، 625، 312.5) مكغم/مل، وبواقع خمسة مكررات لكل تركيز. كما تم عمل خمسة مكررات للسيطرة السالبة والتي أضيف لها

(0.2) مل من الوسط الزراعي الخالي من المصل، حضنت الأطباق بحرارة (37) م° وبقواقع صفيحتين لكل نوع من الخلايا الورمية ولكل مدة تعريض .

بعد مرور مدة التعريض المحددة للحضن وهي (24, 48, 72) ساعة وحسب طريقة (28) أخرج الطبق من الحاضنة وأضيف له (50) مايكروليتر من صبغة البنفسج البلوري لكل حفرة وأعيد الطبق الى الحاضنة ليحضن لمدة (30) دقيقة، بعدها أخرج الطبق وأزيلت محتوياته وغسلت بمحلول PBS لحين زوال الصبغة الزائدة وتركت الخلايا لتجف ، قُرأت النتائج باستخدام جهاز المطياف الضوئي الخاص باطباق المعايرة الدقيقة بطول موجي 492 نانوميتر. حسبت النسبة المئوية لمعدل تثبيط النمو IR (Inhibition rate) على وفق الطريقة المعتمدة من قبل (29) وكالاتي:

$$\frac{\text{النسبة المئوية لمعدل تثبيط النمو}}{\text{الكثافة الضوئية للسيطرة السالبة} - \text{الكثافة الضوئية لمجموعة الإختبار}} \times 100 = \text{النسبة المئوية لمعدل تثبيط النمو}$$

• تأثير اللكتين في الموت الخلوي المبرمج لخطوط الخلايا السرطانية

أنجز هذا الإختبار إستناداً إلى الطريقة المعتمدة من قبل الشركة المصنعة (U.S. Biological) للعدة المستعملة (Apoptosis detection, Mitochondria bioassay Kit)، للتعرف على الموت الخلوي المبرمج الحاصل في خطوط الخلايا السرطانية تحت تأثير اللكتين، ويعتمد هذا الفحص على مبدأ التغير اللوني فالخلايا التي تعاني من الموت الخلوي المبرمج تنتشر الصبغة في سايتوبلازمها كوحدة فردية (Monomers) لتتبع لوناً أخضر في حين أن الخلايا التي لم تعاني من الموت الخلوي المبرمج فإن الصبغة تتجمع في المايوتوكونديريا لتتبع لوناً أحمر. جُهِز عالق الخلايا ونقل (0.4) مل منه الى شريحة خاصة بالزرع النسيجي ذي ثمان غرف Chamber slide for tissue culture إذ احتوت كل حفرة على عدد معلوم من الخلايا الحية (1 x 10⁶ خلية/حفرة) ، تركت الشرائح في الحاضنة بحرارة (37) م° لمدة تراوحت بين (12-18) ساعة الى حين التصاق الخلايا في الحفرة وتكوين طبقة احادية كاملة وبعدها تم التخلص من الوسط الزراعي القديم في الحفرة، وأضيف (0.4) مل من التركيز (5000) مكغم/مل المحضر سابقاً للكتين وبقواقع اربعة مكررات للتركيز، كما تم عمل اربعة مكررات للسيطرة التي يضاف لها (0.4) مل من الوسط الزراعي الخالي من المصل. وبعد مرور مدة التعريض المحددة للحضن 24 ساعة، وذلك لاستحداث الموت الخلوي المبرمج ، وغسلت الخلايا مرتين باستعمال دارئ الفوسفات المتعادل PBS.

ثم أضيف محلول الصبغة الحاوي على الكاشف Mitocapture Reagent بمقدار (0.4) مل لكل حفرة وحضنت الشرائح بحرارة (37) م° ولمدة 20 دقيقة، وبعدها تم التخلص من محلول الصبغة وعلقت الخلايا باضافة قطرات من محلول الكليسيرول (70%) ، ووضع غطاء الشريحة على الخلايا لتغطيتها (30)، ثم فحصت الخلايا آتياً بوساطة المجهر الومضي وباستخدام مرشح عبور الحزمة (الذي يشخص الفلورسين Fluorescin) وتم حساب نسبة الخلايا المتألقة حسب طريقة (31)، إذ قسمت الخلايا المتألقة على العدد الكلي للخلايا المفحوصة (200) وكما في المعادلة الآتية:

$$\text{الموت الخلوي المبرمج \%} = \frac{\text{عدد الخلايا التي عانت موتاً مبرمجاً}}{\text{العدد الكلي للخلايا}} \times 100$$

• فحص السمية الخلوية المتداخلة للكتين (ABL) وعقاري DOX أو MMC

جُهِز عالق الخلايا ونقل 0.2 مل منه لكل حفرة من حفر طبق الزرع النسيجي ، إذ احتوت كل حفرة على (1 x 10⁵) خلية. وحضنت الأطباق في الحاضنة بحرارة 37 م° لمدة 24 ساعة الى حين التصاق الخلايا في الحفرة، ومتابعة ذلك بالفحص بوساطة المجهر المقلوب الطور، أعقبها سكب الوسط الزراعي المغذي من الحفر ومعاملة الخلايا بـ 0.1 مللتر من كل تركيز من التراكيز المحضرة مسبقاً من المحلول الخزين للكتين ABL للوصول للتراكيز 10, 20, 40, 60 مايكروغرام/ مللتر بإستعمال SFM، وبقواقع اربعة مكررات لكل تركيز، ثم حضنت الأطباق بحرارة 37 م° لمدة 6 ساعات.

وتم إضافة 0.1 مللتر من التراكيز المحضرة من الـ DOX وهي 5, 10, 15, 20 مايكروغرام/ مللتر من المحلول الخزين (200 مايكروغرام/ مللتر) بإستعمال SFM. وكذلك اضافة 0.1 مللتر من التراكيز المحضرة من الـ MMC وهي 5, 10, 20, 2.5 مايكروغرام/ مللتر من المحلول الخزين للـ MMC (200 مايكروغرام / مللتر) بإستعمال SFM، تم اضافة كل من العقارين (كلا على حدة) وبالتراكيز المحضرة إلى الحفر المعاملة مسبقاً بكل تركيز من تراكيز ABL وبمعدل اربعة مكررات لكل تركيز متداخل (مع مراعاة الإضافة بتراكيز مضاعفة تلافياً لحصول التخفيف لإحتواء الحفر على ABL) كما تم عمل اربعة مكررات للسيطرة السالبة والتي أضيف لها (0.2) مل من الوسط الزراعي الخالي من المصل، حضنت الأطباق بحرارة (37) م° .

كما أضيف 0.2 مللتر من كل تركيز من تراكيز العقار قيد الدراسة بمفرده وبقواقع ستة مكررات لكل تركيز من تراكيز العقارين لدراسة تأثير السمية الخلوية للعقار بمفرده على حيوية ونمو الخلايا الورمية. ثم إعادة حظن الأطباق بحرارة 37 م° لمدة 24 ساعة، وبقواقع طبقتين لكل نوع من الخلايا الورمية المعاملة بنوع واحد من العقار).

بعد إنتهاء مدة التعريض سكبت محتويات الحفر، وصبغت الخلايا بصبغة البنفسج البلوري كما في اعلاه وفُرات النتائج باستخدام جهاز المطياف الضوئي على طول موجي 492 نانوميتر لحساب النسبة المئوية لحيوية الخلايا.

التحليل الإحصائي

تم تحليل نتائج البيانات إحصائياً باستخدام التصميم العشوائي التام (CRD) من تجربة عاملية اشتملت على عاملين هما وقت المعاملة والتراكيز المختلفة لمستخلص اللكتين ABL وللعقارين DOX و MMC. ولتحليل نتائج البيانات احصائياً تم استخدام البرنامج الاحصائي الجاهز (SPSS(32)، ولتحديد معنوية الفرق بين المعاملات استخدم اختبار دانكن متعدد الحدود (33).

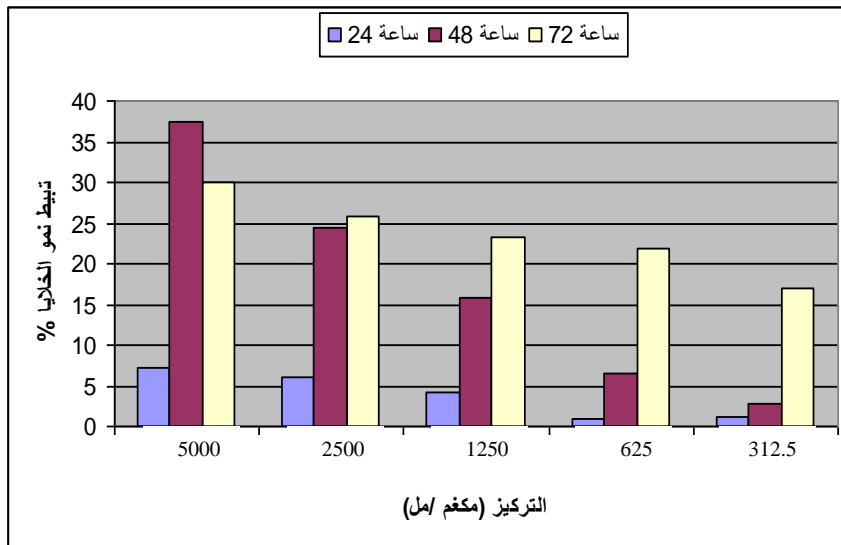
النتائج والمناقشة

• استخلاص وإختبار فعالية التلازن للكتين

بلغ الوزن الجاف للكتين المستخلص من الجزء الثمري للعرهون *Agaricus bisporus* والمركز بالترسيب بكريينات الأمونيوم بنسب إشباع تراوحت بين 25-70% مقدار 1 غرام : 80 غرام (وزن جاف : وزن طري) اي بنسبة استخلاص 1.25%، إذ يعد تركيز المستخلص بكريينات الأمونيوم إحدى مراحل التنقية للتخلص من بعض البروتينات التي تقلل من الفعالية التلازنية (34)، تستخدم العديد من المختبرات اللكتينات المنقاة جزئياً في فحص فعالية التلازن في حين تلجأ أخرى إلى استخدام اللكتينات المنقاة لحد التجانس بالإعتماد على كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي على هلام Sephacry S-300، أو السيفادكس G-100 في الفحص ذاته، أو بإستخدام طرائق كروماتوغرافيا الألفة على هلام Sepharose-4B المنشط ببروميدي السيانوجين في تنقية اللكتين من بذور الحبة السوداء، أو المنقى من مصادر مايكروبية (35). وأظهر مستخلص اللكتين فعالية تلازنية تجاه كريات الدم الحمراء للإنسان بمجاميعه الثلاث O,B,A عيارية (64, 16, 32) على التوالي، وهذا يعني أن اللكتين المستخلص من عرهون *A. bisporus* غير متخصص تجاه مجاميع دم الإنسان، إلا أنها قد تبدي تخصصاً تجاه سكريات محددات مجاميع الدم على سطح الكرية الحمراء (36).

• التأثيرات السمية للكتين وقابليته على حث الية الموت الخلوي المبرمج في الخطوط الخلوية السرطانية

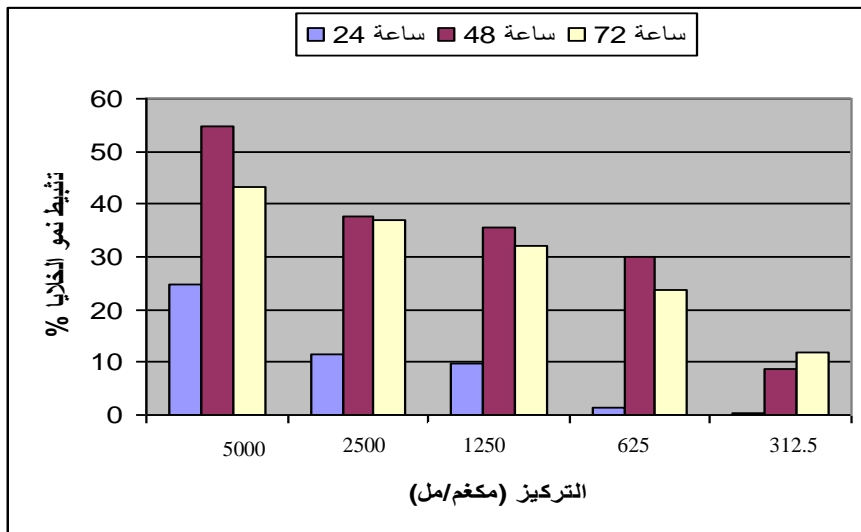
أظهرت نتائج معاملة الخلايا الورمية (Hep-2, AMN-3) لخمس تراكيز نصفية من اللكتين تراوحت بين 312.5-5000 مايكروغرام/مللتر لثلاث فترات من التعريض (72,48,24 ساعة) تأثيراً متبايناً في نمو وتضاعف الخلايا من خلال تقييم التأثير السمي الخلوي اعتماداً على النسب المئوية لمعدل التثبيط (IR) مقارنة بالسيطرة التي عُد معدل نموها 100% في الظروف ذاتها. إتمتدت النسبة المئوية لتثبيط نمو خط خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2 على التركيز المستخدم للكتين (ABL) ووقت التعريض، إذ سجلت أعلى نسب تثبيط لنمو خلايا Hep-2 عند التركيز 5000 مايكروغرام/مللتر ولأوقات التعريض الثلاثة، وإنخفض هذا التثبيط معنوياً ($P \leq 0.05$) بإنخفاض التراكيز المستعملة شكل (1). إذ لم يكن التأثير السمي لكل التراكيز المستعملة من اللكتين واضحاً بعد 24 ساعة من المعاملة، إلا أنه ظهر أكثر وضوحاً بعد 48 ساعة، ليبلغ أعلى نسبة عند التركيز 5000 مايكروغرام/مللتر (37.5%، 24.5%، 15.88%، 6.57%، 2.82%) على التوالي، وكان التأثير معنوياً عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) بعد مدة تعريض 72 ساعة، كما أظهرت النتائج فروق معنوية بإحتمالية ($P \leq 0.05$) في نسب التثبيط المسجلة بين التراكيز المستعملة ولكل وقت من أوقات التعريض (باستثناء التراكيز 625، 1250، 2500 مايكروغرام/مللتر بعد 72 ساعة)، والحال ذاته من الفروق المعنوية في نسب التثبيط لنمو الخلايا المعتمدة على أوقات التعريض الثلاثة ولجميع التراكيز.



شكل (1) التأثير السمي الخلوي لتراكيز مختلفة من لكتين العرهون *A. bisporus* في خط خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2 ولثلاث فترات تعريض.

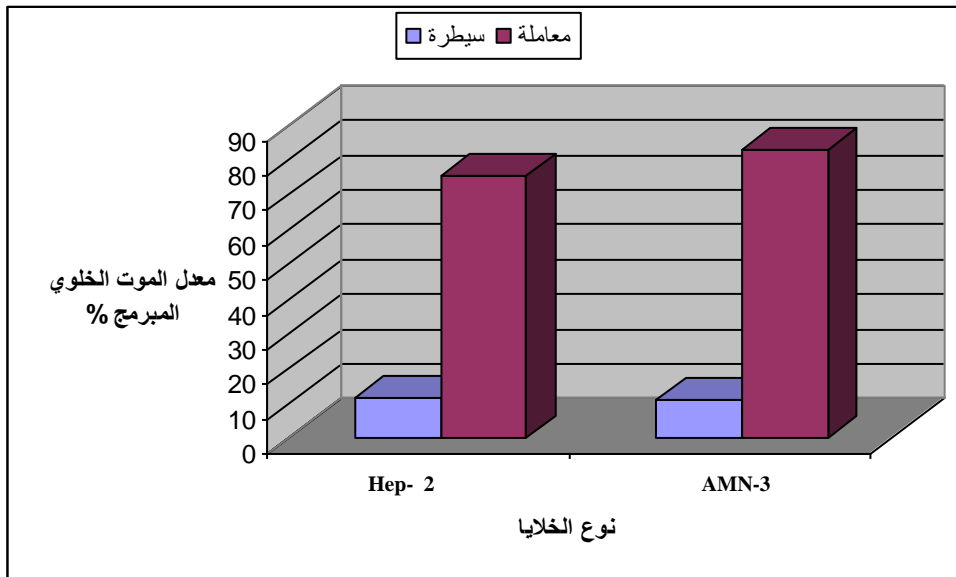
وتشير النتائج الموضحة في الشكل (2) الى وجود تثبيط لنمو خلايا AMN-3 بإستعمال التراكيز الخمسة من اللكتين والذي يزداد وضوحاً بتقدم مدة التعريض وزيادة التركيز المستخدم، فقد سجلت أعلى نسب لتثبيط نمو الخلايا المعاملة بتركيز 5000 مايكروغرام/ملتر هي 54.72%، 24.64%، 43.3% ولثلاث فترات تعريض 24، 48، 72 ساعة على التوالي حيث كان التثبيط معنوياً عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) للاوقات الثلاثة بالمقارنة مع السيطرة. وقد كان التأثير السمي للكتين في خلايا AMN-3 بعد 24 ساعة واطناً بالمقارنة بمدتي التعريض 48، 72 ساعة، بينما بلغ أقصاه 35.6%، 29.95%، 8.56% 54.72%، 37.79% بعد 48 ساعة عند التراكيز 5000، 2500، 1250، 625، 312.5 مايكروغرام/ملتر على التوالي، وظهر إنخفاض معنوي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) في نسب تثبيط نمو خلايا AMN-3 بتقدم مدة التعريض من 48 إلى 72 ساعة عند المعاملة بنفس التراكيز.

وجد أن التأثير السمي للكتين يعتمد على تركيز المستخلص ومدة التعريض ونوع الخلايا السرطانية، إذ يعد إختبار التأثيرات السمية لأي مركب في نمو الخلايا السرطانية من التقنيات التي يعتمد عليها في التحري عن إحتواء تلك المواد تأثيراً قاتلاً للخلايا السرطانية (37)، ففي الوقت الذي أظهر ABL تأثيراً تثبيطياً في نمو خلايا Hep-2 معتمداً على مدة التعريض من خلال إرتفاع نسب التثبيط لأغلب التراكيز المستعملة المصاحبة لتقدم فترات التعريض التي بلغت أقصاها بعد 72 ساعة. في حين سجل ABL تأثيرات تثبيطية لنمو خلايا AMN-3 يعتمد على تركيز اللكتين المستعمل وعلى مدة التعريض، إذ لوحظ إرتفاع الفعالية التثبيطية لنمو الخلايا والمصاحبة لإزدياد تركيز ABL، وكان هذا التأثير أكثر وضوحاً بعد 48 ساعة من التعريض.



الشكل (2) التأثير السمي الخلوي لتراكيز مختلفة من لكتين العهون *A. bisporus* في خط خلايا سرطان الغدة اللبنية الفأري AMN-3 ولثلاث فترات تعريض

كما درس تأثير اللكتين ABL في حث الية الموت الخلوي المبرمج لخطي خلايا Hep-2 و AMN-3 المعاملة بتركيز 5000 مايكروغرام / ملتر (التركيز الذي أظهر اعلى نسب تثبيط نمو لكلا الخطين الورميين المستخدمين في الدراسة)، يظهر الشكل (3) قابلية اللكتين على حث الموت الخلوي المبرمج في كلا خطي الخلايا الورمية، إذ بلغت نسبة خلايا Hep-2 و AMN-3 التي عانت موتاً خلويًا مبرمجاً 74.14%، 82.6% بالمقارنة مع السيطرة 11.35%، 10.82% على التوالي.



الشكل (3) تأثير لكتين العرھون *A. bisporus* في معدل الموت الخلوي المبرمج % لخطي خلايا Hep-2 و AMN-3 خلال مدة 24 ساعة من التعريض

ظهر من خلال الدراسات أن للمركبات المعزولة من العراھين المأكولة فعل مضاد لتكاثر الخلايا السرطانية مثل لكتين عرھون *Agaricus bisporus* (ABL) نتيجة لارتباطه بانتقائية وافية عالية بمستقبلات خاصة توجد على سطح الخلايا السرطانية الطلانية وهي عبارة عن مستضدات تدعى Thomsen-Friedenreich (TF) antigens, لذلك يستخدم لكتين (ABL) في اختبارات الكيمياء النسيجية للكشف عن هذه المستضدات (38). فالتأثير المضاد للتكاثر الذي تظهره اللكتينات يكون في الأغلب تأثيراً عكسياً Reversible والسبب في ذلك يعود لقدرة الخلايا على تحريره مرة أخرى بعد إدخاله وهذا يوضح قدرة اللكتينات على مقاومة الهضم، وقد أوضح الباحث (39) أن لكتينات (ABL) عندما يتم إدخالها إلى الخلايا تظهر تأثيرها المثبط للنمو من خلال مشاهدة تراكمها حول نواة الخلية ليكون حاجزاً يمنع دخول البروتينات إلى النواة والتي تعتبر عوامل نمو تؤدي لزيادة انقسام الخلايا، وقد أكد الباحث (40) هذه الحقيقة أيضاً إذ وجد أن معظم اللكتينات هي عوامل نمو خارجية قوية Exogenous growth factors تشبه إلى حد ما تأثير الهرمونات ولكي تتمكن من إحداث فعلها لا بد لها من آلية معينة تمكنها من الدخول إلى داخل الخلية والتي تتطلب تعبير الخلية عن مستقبلات خاصة باللكتينات ولذلك فإن نسبة التعبير عن مستقبلات اللكتينات يزداد بشكل واضح في الخلايا الطلانية السرطانية للقولون HT29 وخلايا سرطان الثدي MCF-7 (14) مما يتيح الفرصة للكتينات المتواجدة في الغذاء بمقاومة الهضم أولاً والوصول إلى خلايا القولون بشكلها الفعال فتسبب تثبيطاً لنمو الخلايا السرطانية ثانياً (41).

وجد الباحث (6) أن حضن الخلايا الطلانية الورمية للمعدة (AGS) مع المستخلص المائي لعرھون *Agaricus blazei* يحفز الخلايا للدخول في الموت الخلوي المبرمج من خلال حثه للكاسباز 3 (Caspase-3) ولايقافه دورة حياة الخلية في مرحلة G2/M. وأشار الباحث (42) إلى أن المكونات الرئيسية التي تشترك في آلية الموت الخلوي المبرمج الذي تحثه مستخلصات عرھون *Agaricus blazei* في خط خلايا سرطان ابيضاض الدم البشري U937 هي على الأغلب عائلة bcl-2 وانزيم الكاسباز Caspase-3 وذلك من خلال ازالة الفسفرة من بعض بروتينات أو اشارات مسلك Akt (الخاص بعيوشية وتكاثر الخلايا وتنظيم الموت الخلوي المبرمج ومد الأوعية الدموية) حيث تعد عائلة bcl-2 المفاتيح الأساسية المنظمة لآلية الموت الخلوي المبرمج سواء كونها منشطات لهذه الآلية مثل bax أو مثبطات لها مثل bcl-2 (43).

وفي دراسة أخرى اظهر مستخلص عرھون *Agaricus blazei* تأثيراً حاثاً للموت الخلوي المبرمج في خلايا سرطان ابيضاض الدم البشري THP-1 (44) عن طريق مسلك المايوتوكونديريا فهو يحفز على توليد اشكال من الاوكسجين النشط (ROS) واطالة تنشيط انزيم الكاينيز Jun N-terminal Kinase (JNK) المسببان للبدء في هذا المسلك (45) وله دور في التنظيم العالي upregulation لعمل بروتينات bax و bad المسؤولة عن تحفيز موت الخلية المبرمج (46) كما يثبط نشاط العامل النووي Nuclear Factor (NF)-Kappa B (الذي يحافظ على بقاء الخلية السرطانية حية) (47).

كما اظهر لكتين عرھون *Agrocybe aegerita* تأثيراً مثبطاً لنمو العديد من خطوط الخلايا السرطانية SW480, sarcoma S-180, BGC-823, HL-60, MGC80-3 لقدرته على حث هذه الخلايا على الدخول في الموت الخلوي المبرمج من خلال ايقافه لدورة حياة الخلية في مرحلة G2/ M, وزيادة فعالية انزيم DNAase, وذلك لامتلاكه فعالية مشابهة لفعالية الانزيمات داخل النواة Endonucleases مسببه تحطيم دنا الخلايا السرطانية وبالتالي موتها (13).

ان نتائج هذه الدراسة تؤكد ما توصل اليه الباحث (48) من ان اللكتينات المعزولة من عرهن *Agaricus bisporus* لها قدرة تثبيط نمو خلايا سرطان ابيضاض الدم U937 بالاعتماد على الجرعة المعطاة لقدرتها على حث آلية البدء بألية الموت الخلوي المبرمج.

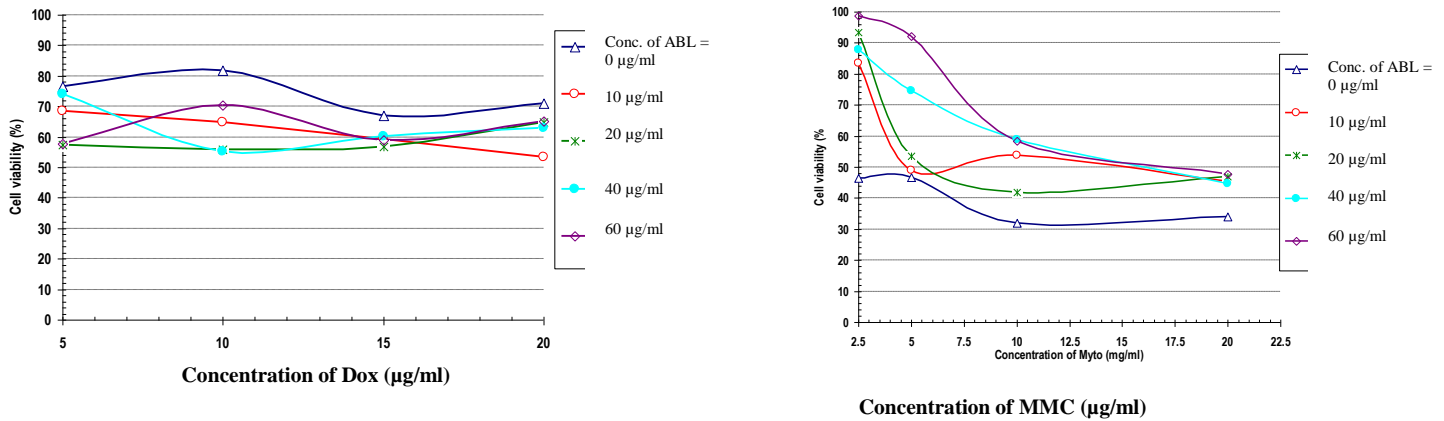
عند مقارنة نتائج تأثير المستخلصين المائي والكحولي الخام للعرهن في خلايا AMN3 مع تأثيرها في خلايا Hep-2 وجد أن خلايا AMN3 كانت أكثر حساسية من خلايا Hep-2 تجاه هذين المستخلصين، ربما يعود السبب في ذلك الى اختلاف طبيعة المستقبلات Receptor الموجودة في الأغشية الخلوية للخلايا السرطانية والتي تختلف تبعاً لاختلاف الخلايا السرطانية ومنشئها.

التأثير المتداخل للكتينات وقابلية الخلايا السرطانية للإستجابة للعلاج الكيميائي

• التأثير المتداخل للكتينات وعقاري الـ DOX والـ MMC في حيوية خلايا Hep-2

درس تأثير معاملة تراكيز مختلفة من اللكتين ABL تراوحت بين 10-60 مايكروغرام/ملتر على حيوية خلايا Hep-2 ثم معاملة هذه الخلايا بتراكيز متباينة من عقاري الـ DOX والـ MMC بعد 24 ساعة من الحضان مع ABL ، ومقارنتها مع حيوية الخلايا المعاملة بالتراكيز ذاتها من العقارين بغياب ABL. بينت النتائج الموضحة في الشكل (a-4) تسجيل نسب عالية لحيوية خلايا Hep-2 المعاملة بتراكيز مختلفة من الـ DOX تراوحت بين (5-20) مايكروغرام/ملتر وهي (76.5 - 70.9%) والتي لم تظهر فروقاً معنوية معتمدة على ارتفاع تراكيز العقار، بينما كان هنالك إنخفاض معنوي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) في حيوية الخلايا المعاملة مسبقاً بـ ABL بالتركيزين 10 و 20 مايكروغرام/ملتر المصاحب للمعاملة بالـ DOX من 5-20 مايكروغرام/ملتر، إذ تراوحت النسب المئوية لحيوية الخلايا بين (53.3-68.6) % و (57.5-64.8) % على التوالي، بينما لم تلاحظ فروق معنوية في حيوية الخلايا المعاملة مسبقاً بالـ ABL بالتركيزين 40 و 60 مايكروغرام/ملتر معتمدة على التراكيز المتزايدة من الـ DOX.

a



شكل (4) التأثير السمي المتداخل للكتين وعقاري الـ DOX (a) والـ MMC (b) في حيوية خلايا Hep-2

بعد مدة 24 ساعة من التعريض.

كما كشفت تلك النتائج عن ظهور إنخفاض معنوي باحتمالية ($P \leq 0.05$) في حيوية الخلايا معتمدة على تراكيز ABL المعاملة بها الخلايا مسبقاً بالتركيزين 20 و 40 مايكروغرام/ملتر مع عقاري الـ DOX بالتركيز 10 مايكروغرام/ملتر، إذ سجلت نسب تثبيط إضافية لحيوية خلايا Hep-2 بلغت 2.41 و 2.44 مرة على التوالي ويعتقد ان لحساب كفاءة المعاملات تأثيراً على حيوية الخلايا (49) بالمقارنة مع نسب التثبيط المسجلة بإستعمال التركيز ذاته من العقار بغياب اللكتين.

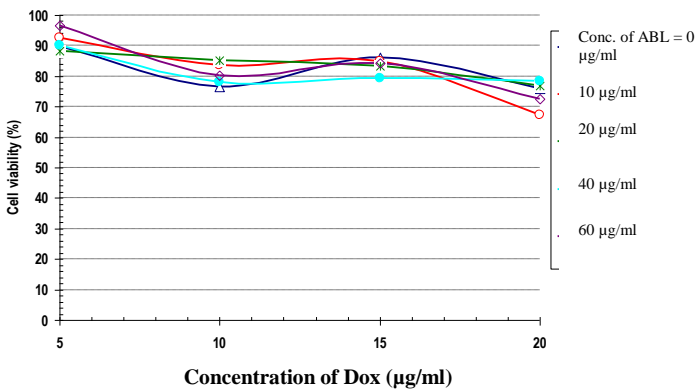
وعند تعريض خلايا Hep-2 المعاملة مسبقاً بـ ABL لعقاري الـ MMC، فقد سجل إنخفاض معنوي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) في حيويتها مصاحباً لارتفاع تراكيز الـ MMC بغياب ABL تراوح بين (33.9-46.4) % كما مبين في الشكل (b-4)، أي أن الإنخفاض في حيوية الخلايا إعتد بالدرجة الرئيسة على ارتفاع تراكيز العقار، ولم يكن للمعاملة المسبقة للخلايا بـ ABL تأثير إيجابي في تخفيض حيوية الخلايا.

التأثير المتداخل للكيتينات و عقاري ال-DOX وال-AMN-3 في حيوية خلايا

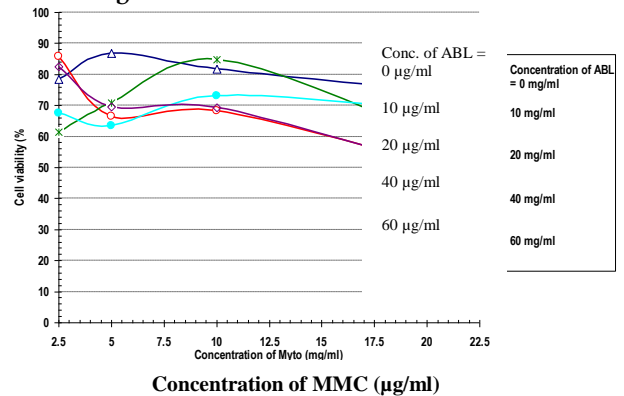
أظهرت النتائج المبينة في الشكل (5-5) عدم ظهور تثبيط ملحوظاً في حيوية خلايا AMN-3 معتمدة على ارتفاع تراكيز عقار ال-DOX (5-20 مايكروغرام/ملتر) وبغياب ABL، إذ تراوحت النسب المئوية لحيوية الخلايا عند تلك التراكيز ما بين (75.8- 89.9) % . في حين سجل إنخفاض معنوي عند مستوى احتمالية (P ≤ 0.05) في حيوية الخلايا معتمداً على تراكيز عقار ال-DOX عندما تكون الخلايا معاملة مسبقاً بالكيتينين بالتراكيز 10، 20، 60 مايكروغرام/ملتر تراوح بين (67.3 – 92.5) % و(74.4 – 88.8) % و(77.4 – 96.6) % على التوالي، وفي الوقت الذي لم تكن الفروق المسجلة في النسب المئوية لحيوية الخلايا المعاملة مسبقاً بالكيتينين وحده وبتراكيز 40 مايكروغرام/ملتر معنوية، وقد سجل إنخفاض في حيوية الخلايا ذات المعاملة المتداخلة للكيتينين بتركيز 40 مايكروغرام/ملتر مع 15 مايكروغرام/ملتر من ال-DOX، يليه الإنخفاض المسجل عند المعاملة المتداخلة لل-ABL بتركيز 10 مايكروغرام/ملتر والعقار بتركيز 20 مايكروغرام/ملتر لتبلغ نسب التثبيط الإضافية 1.5 و 1.35 مرة على التوالي.

وعند معاملة خلايا AMN-3 بعقار ال-DOX فلم تظهر فروق معنوية في النسب المئوية لحيوية الخلايا معتمدة على ارتفاع تراكيز العقار بغياب ABL شكل(5-5 ط)، كما لم يظهر تأثير للمعاملة بعقار ال-DOX لكل التراكيز المستخدمة على الخلايا التي عوملت مسبقاً ب-ABL بالتراكيز 10،20،40 مايكروغرام/ملتر وقد تراوحت عند تلك المعاملات النسب المئوية لحيوية الخلايا بين (51.8 – 85.9) % و(61.3 – 61.8) % و(67.4 – 68.7) % على التوالي، إلا أنه سجل إنخفاض ملحوظاً في حيوية الخلايا ذات المعاملة المتداخلة للكيتينين بتركيز 40 و 10 مايكروغرام/ملتر مع العقار بتركيز 5 مايكروغرام/ملتر بلغت عندها نسب التثبيط الإضافي 2.79 و 2.55 مرة على التوالي، كما سببت المعاملة ظهور فروق معنوية باحتمالية (P ≤ 0.05) في حيوية الخلايا عند المعاملة بتركيز 20 مايكروغرام/ملتر من العقار معتمدة على تزايد تركيز الكيتين المستعمل.

a



b



شكل (5) التأثير السمي المتداخل للكيتين وعقار ال-DOX (a) وال-AMN-3 (b) في حيوية خلايا

بعد 24 ساعة من التعريض.

تتمثل آلية مقاومة الخلايا السرطانية للعلاج بعقار ال-DOX بتغييرات في النقل الخلوي للعقار، وتفاعلات العقار مع مجاميع السلفهايدروكسيل والبروتينات والكلوتاتيون، كما يمكن أن يؤثر العقار في التنظيم العلوي up regulation لتكوين مركب ال-Metalomethionine الذي تتأثر مجاميعه مع العقار بتفاعلات مماثلة للكلوتاتيون، أو قد يؤدي إلى زيادة الهدم الحيوي للتنظيم السفلي للأنزيمات الفعالة (50). وقد أشيد بكفاءة دخول ABL سايتوبلازم الخلايا حيث أنه يتمركز حول النواة مؤدياً إلى تثبيط النقل النووي غير المتخصص للبروتينات مثل (GST-S-transferase) من السايتوبلازم إلى النواة وبذلك تحمي الخلية من سمية العقار، وأن المعاملة المسبقة لبعض أنواع الخطوط الخلوية السرطانية كخط خلايا (HCT₈) بتركيز 40 مايكروغرام/ملتر من ABL تليها المعاملة بال-DOX قد خفضت 50% من نسبة دخول الكلوتاتيون GST المنتقل للنواة مما يؤدي إلى زيادة كمية ال-DOX داخل النواة والذي يعكس كميته المرتبطة بالدنا وبالتالي زيادة حساسية الخلايا للعقار (22).

كما أظهرت نتائج التأثير السمي المتداخل للكيتينات مع عقار ال-DOX تباين كبير في إيجاد التوليفة المناسبة للحصول على أقصى نسب تثبيط نمو للخلايا السرطانية (قيد الدراسة)، إذ أن هذا الاختلاف متأت من اختلاف المادة الوراثية للخلايا السرطانية وإلى طبيعة الطفرات الحاصلة فيها والتي قد تستحث جينات المقاومة للعلاج الكيميائي، وإلى وجود المستقبلات الخاصة بالخلايا الورمية والمرتبطة بزيادة التعبير عن بعض البروتينات التي ترتبط بآلية معينة لزيادة المقاومة للعقار المضادة للأورام (51).

أما فيما يتعلق بعقار ال-DOX فقد ظهر أن له تأثيراً سميّاً عالياً على خلايا Hep-2 معتمداً على تركيزه، وأن هذا الخط الخلوي يمتلك حساسية عالية لعقار ال-DOX، ولم يكن لل-ABL تأثير إيجابي في الحصول على نسب تثبيط إضافية بالتداخل معه، إن الفعل السمي متأت بالدرجة الرئيسية من العقار ذاته، في حين كان تأثير ABL واضح في خلايا AMN-3 وتخفيض النسب المئوية

لحيوية الخلايا مرات عدة بوجوده قياساً بحيوية الخلايا المعاملة بالعقار بمفرده، وهذا قد يعود إلى طبيعة الطفرات وما لها من تأثير وتغيير في المادة الوراثية بتقدم التمريرات المستعملة من Hep-2 بالمقارنة بتمريرات خلايا AMN-3 (52). يستنتج من هذه الدراسة عدم إمكانية استخدام اللكتينات المنتجة من العرھون *A.bisporus* في تنميط مجاميع دم الإنسان لعدم وجود تخصص إتجاهها، وتفاوت الفعالية التثبيطية للكتينات تجاه الخطوط الخلوية السرطانية والتي ظهر فيها أن خط خلايا AMN-3 كان ذو حساسية تفوق حساسية خلايا Hep-2 سواء كان تأثيراً سميماً أو محفزاً للموت الخلوي المبرمج فضلاً عن إمكانية زيادة التأثير السمي للعقارات العلاجية المستعملة للسرطان بوجود تراكيز محددة ومدروسة من اللكتينات مرتبطة بنوع الخط الخلوي السرطاني للحصول على أعلى نسبة تثبيط نمو للخلايا السرطانية.

References

1. Zhang, G. Q.; Sun, J.; Wang, H. X. and Ng, T. B. (2009). A novel lectin with antiproliferative activity from the medicinal mushroom *Pholiota adiposa*. *Acta. Biochimica.Polonica.*, 56 (3):415-421.
2. Kim, Y.W.; Kim, K.H.; Choi, H.J. and Lee, D.S. (2005). Anti-diabetic activity and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. *Biotechnol Lett.*, 27 : 483–7.
3. Liu, Y.; Fukuwatari, Y.; Okumura, K.; Takeda, k.; Ishibashi, K.; Furukawa, M.; Ohno, N. and Mori, K. (2007). Immunomodulating Activity of *Agaricus brasiliensis* KA21 in Mice and in Human Volunteers. *eCAM.*, 12 : 1-27.
4. Wang, H. X.; Ng, T. B. and Ooi, V. E. C. (1998). Lectins from mushroom- a review. *Mycol. Res.*, 102: 897-906.
5. Schwarz, R. E. ; Wojciechowicz, D.C. ; Picon, A.L. ; Schwarz, M.A. and Paty, P.B. (1999). Wheat germ agglutinin – mediated toxicity in pancreatic cells . *Br. J. Cancer.*,80:1754 – 1762.
6. Jin, C.Y.; Choi, Y.H.; Moon, D.O.; Park, C.; Park, Y.M. and Jeong, S.C. (2006). Induction of G2/M arrest and apoptosis in human gastric epithelial AGS cells by aqueous extract of *Agaricus blazei*. *Oncol. Rep.*, 16 : 1349–55.
7. Damian, L.; Fournier, D.; Winterhalter, M. and Paquereau, L. (2005). Determination of thermodynamic parameters of Xeroconomus chrysenteron lectin interactions with N-acetylgalactosamine and Thomsen-Friedenreich antigen by isothermal titration calorimetry. *BMC Biochemistry*, 6(11):1-7.
8. Tang, N. Y.; Yang, J. S.; Lin, J. P.; Hsia, T. C.; Fan, M. J.; Lin, J. J.; Weng, S. W. and Ma, Y. S. et al. (2009). Effects of *Agaricus blazei* Murill Extract on Immune Responses in Normal BALB/c Mice. *In Vivo (Athens, Greece)*, 23(5): 761-766.
9. Ng, T.B.; Ngai, P.H.K. and Lixin, X. (2006). An agglutinin with mitogenic and antiproliferative activities from the mushroom *Flammulina velutipes*. *Mycologia*, 98 (2):167-171.
10. Lin, J. Y. and Chou, T. B. (1984). Isolation and characterization of a lectin from edible mushroom, *Volvariella volvacea*. *J. Biochem. (Tokyo)*, 96: 35-40.
11. Kawagishi, H.; Nomura, A.; Mizuno, T.; Kimura, A. and Chiba, S. (1990). Isolation and characterization of a lectin from *Grifola frondosa* fruiting bodies. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1034: 247-252.
12. Wang, H. X.; Ng, T. B.; Ooi, V. E. C.; Liu, W. K. and Chang, S. T. (1997). Actions of lectins from the mushroom *Tricholoma mongolicum* on macrophages, splenocytes and life-span in sarcoma-bearing mice. *Anticancer Res.* 17: 419–424.
13. Zhao, C.; Sun, H.; Tong, X. and Yipeng, Q.I. (2003). An antitumour lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Biochemical Society J.*, 374: 321–327.
14. Yu, L. G.; Fernig, D. J.; Smith, J. A.; Milton, J. D. and Rhodes, J. M. (1993). Reversible inhibition of proliferation of epithelial cell lines by *Agaricus bisporus* (edible mushroom) lectin. *Cancer Res.* 53: 4627-4632.
15. Chan, Y.; Chang, T.; Chan, C.H.; Chen, C.W.; Shich, B. and Li, C. (2007). Immunomodulatory effects of *Agaricus blazei* Murill in Balb/c in mice. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* , 40: 201-208.
16. Bellini, M.F.; Angeli, J.P.F.; Matuo, R.; Terezan, A.P.; Ribeiro, L.R. and Mantovani, M.S. (2006). Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in

- chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-K1 and HTC cells. *Toxicology in vitro*, 20 : 355–60.
17. Kima, C. F.; Jianga, J. J.; Leungb, K. N.; Fungb, K. P.; Laua, C. S. (2009). Inhibitory effects of *Agaricus blazei* extracts on human myeloid leukemia cells. *J. Ethnopharmacology*, 122: 320–326.
 18. Toshihiro, O. (2005). Safety of quercetin for clinical application. *Int. Mol. Med.*, 16: 275 – 278.
 19. Costes, V.P.; Mostter, M. and Wilson, R.P. (1993). Effects to typical mytomyacin C and combined procedures. *Br. J. Ophthalmol.*, 77: 693 -697.
 20. Undeger, U.; Ayden, S.; Bassaran, A. and Bassaran, N. (2004). The modulation of effects of quercetin and rutin on mytomyacin C induced DNA damage. *Toxic Lett.*, 151: 143 – 149.
 21. Papachristou, F.; Lialiaras, T.; Toulipidis, S.; Kalaitize, C.; Simopoulos, C. and Sofikitis, N. (2006). Evidance of increased chromosomal instability in infertile males after exposure to mytomyicine C and Caffeine. *Asian J. Andro.*, 8(2): 199- 204.
 22. Goto, S.; Ihara, Y.; Izumi, S.; Abe, K.; Koji, T. and Kondo, T. (2001). Doxorubicin-induced DNA intercalation and scavenging by nuclear glutathione S-transferase π . *FASEB J.*, 15: 2702 - 2714.
 23. D'Arpa, P. and Liu, L. F. (1989). Topoisomerase-targeting antitumor drugs. *Biochim. Biophys. Acta*, 989: 163-177.
 24. Hanqing, MO. ; Harry, C.W. and Irwin, J.G. (2000). Purification and characterization of a Neu5-Ac α 2 – Gal β 1-4 Glc/Glc NAC . Specific lectins from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. *J. Biol. Chem.* , 275 (14): 10623 – 10629.
 25. Glick, J. ; Garber, N. and Shoheit, D. (1987). Surface haemagglutinating activity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.*, 50: 69 – 80.
 26. Freshney, R.I. (1994). Culture of animal cells: A manual of basic technique. *New York*, PP. 440.
 27. Freshney, R.I. (2000). Culture of animal cells : A manual for basic technique. (4th ed.). Wiley-liss, A John Wiley and Sons, Inc. Publication, *New York*, PP. 566.
 28. McKeehan, W.L.; McKeehan, K.A.; Hammond, S.L. and Ham, R.G. (1977). Improved medium for clonal growth of human diploid cells at low concentrations of serum protein. *In vitro*, 3: 399-416 (Cited by Freshney, 1994).
 29. Gao, S.; Yu, B. -P.; Dong, W. -G.; Luo, I. -S. and Li, Y. (2003). Antiproliferative Effect of *Octreotide* on Gastric Cancer Cells Mediated by Inhibition of Akt/PKB and Telomerase. *World J. Gastroenterol.*, 9 (10): 2362-2365.
 30. Goto, S.; Ihara, Y.; Urata, Y.; Izumi, S.; Abe, K. and Koji, J. (2001). Scavenging by nuclear glutathione S-transferase II. *FASEB J.*, 15: 2702-2714.
 31. Rieux-Laucat, F.; Bahadoran, P. and Brousse, N. (1998). Highly restricted human T-cell repertoire in peripheral blood and tissue-infiltrating lymphocytes in Omenn's syndrome. *J. Clin. Invest.*, 102: 312-321.
 32. SPSS, (1998). Statistical package for social science. *User's Guide for statistics*.
 33. Duncan, B.D. (1955). Multiple range and multiple F-test. *Biometrics*, 11: 1-42.
 34. Gilboa-Gorber, N. (1986). Lectins of *Pseudomonas aeruginosa*: Properties, biological effects, and applications. In: *Microbial lectins and agglutinins* (ed. Mirelman, D.) P.: 256 – 268. *John Wiley and Sons. New York*.
 35. المعيني، صفاء عبد لطيف (2001). أستخلاص وتوصيف اللكتينات من بعض المصادر الميكروبية. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم – جامعة بغداد. العراق.
 36. Hart, D.A. (1980). Lectins in biological system : Applications to microbiology. *Am. J. Clin. Nutrit.* , 33: 2416 – 2425.
 37. Freshney, R.I. (2001). Application of cell culture to toxicology. *Cell Biology and Toxicology*, 17: 213-230.
 38. Cao, Y.; Stosiek, P.; Springer, G.F. and Karsten, U. (1996). Thomsen- Friedenreich related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study. *Histochem Cell Biol.*, 106: 197-207.

39. Yu, L. G.; Fernig, D. G.; White, M. R.; Spiller, D. G.; Appleton, P.; Evans, R. C.; Grierson, I.; Smith, J. A.; Davies, H. and Gerasimenko, O. V. et al. (1999). Edible mushroom (*Agaricus bisporus*) lectin, which reversibly inhibits epithelial cell proliferation, blocks nuclear localization sequence-dependent nuclear protein import. *J. Biol. Chem.*, 274, 4890-4899.
40. Kiss, R.; Camby, I.; Duckworth, G.; Decker, R.D.; Salmon, I.; Pateels, J.L.; Danguy, A. and Yeaton, P. (1997). In vitro influence of *Phaseolus vulgaris*, *Griffonia simplicifolia*, Concanavalin-A, Wheat germ, and Peanut agglutinins on HCT-15, Lovo, and SW837 human colorectal cancer cell growth. *Gut.*, 40: 253-261.
41. Ryder, S.D.; Smith, J.A. and Rhodes, J.M. (1992). Peanut lectin: a mitogen for normal human colonic epithelium and human HT29 colorectal cancer cells. *J. Natl Cancer Inst.*, 84: 1410-6.
42. Adams, J.M. and Cory, S. (1998). Bcl2 – family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Science*, 281: 1322-1326.
43. Jin, C.Y.; Moon, D.O.; Choi, Y.H.; Lee, J.D. and Kim, G.Y. (2007). BCL-2 and caspase-3 are Major Regulators in *Agaricus blazei*-Induced human leukemic U937 cell apoptosis through Dephosphorylation of Akt. *Biol. Pharm. Bull.*, 30(8): 1432-1437.
44. Kim, M.O.; Moon, D.O.; Jung, J.M.; Lee, W.S.; Choi, Y.H.; Kim, G.Y. (2009). *Agaricus blazei* Extract Induces Apoptosis through ROS-dependent JNK Activation Involving the Mitochondrial Pathway and Suppression of Constitutive NF- κ B in THP-1 Cells. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine doi: 10. 1093/ecam/nep, 176 : 1-9.
45. Javvadi, P.; Segan, A.T.; Tuttle, S.W. and Koumenis, C. (2008). The chemopreventive agent curcumin is a potent radiosensitizer of human cervical tumor cells via increased reactive oxygen species production and overactivation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Pharmacol.*, 73:1491-501.
46. Wullaert, A.; Heyninck, K. and Beyaert, R.(2006). Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF- κ B and JNK activation in hepatocytes. *Biochem Pharmacol.*, 72:1090-101.
47. Guzman, M.L.; Neering, S.J.; Upchurch, D.; Grimes, B.; Howard, D.S. and Rizzieri, D.A. et al.(2001). Nuclear factor- κ B is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* , 98: 2301-7.
48. Koyama, Y.; Katsuno, Y.; Miyoshi, N.; Hayakawa, S.; Mita, T. and Isemura, M. (2002). Apoptosis Induction by lectin Isolated from the mushroom *Bletopsis leucomelas* in U937 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(4): 784-789.
49. Perez-Serrano, J.; Denegri, G.; Casado, N. and Fodriguez-Cabaeiro (1997). In vivo of oral albendazol and albendazol sulphoxide on the development of secondary echinococcus in mice. *Int. J. Parasit.*, 27:1341 – 1345.
50. King, R.J.B.(2000). Cancer biology. 2nd (eds.) London, UK. , PP.:38 – 268.
51. Medeiros, R. ; Soares, R. ; Vasconcelos, A. ; Schmitt, F. and lopes, C. (2004). Glutathion-s-transferase genotype GSTM-1 as a predictor of elevated angiogenesis phenotype in patients with early breast cancer. *Angiogenesis*, 7: 53-58.
52. علي ، آمال محمد (2004). دراسة وراثية خلوية ومناعية لخط خلايا سرطان الحنجرة Hep-2. رسالة ماجستير. كلية العلوم/جامعة بغداد. العراق.