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 العرهون *Agaricus bisporus* والعلاج الكيميائي بـ Doxorubicin و Mytomycin-C في سمية بعض الخلايا السرطانية في الزجاج *in vitro*

محفوظة عباس عمران[1] وفاء فوزي ابراهيم الموسوي[2]

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 العرهون *Agaricus bisporus* (ABL) وتركيزه بكبريتات الامونيوم بنسب اشباع تراوحت بين 25- 70% ثم ديلزة المستخلص بالماء المقطر وتجفيده، اختبر تأثير خمسة تراكيز من اللكتين ABLالمنقى جزئياً تراوحت بين 312.5 – 5000 مايكروغرام/مللتر 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/مللتروكانت 24.5% و 37.5 % لخلايا Hep-2 و 37.79% و54.72% 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 / مللتر) ووجدت فروق معنوية باحتمالية ($P\leq0.01$) في عدد الخلايا التي عانت موتاً خلوياً مبرمجاً لكل من خلايا (Hep-2) بنسبة بلغت 75.14% و(AMN3) كانت النسبة 82.6% بالمقارنة مع السيطرة10.82% 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/مللتر من ABL و 10 مايكروغرام/مللتر من DOX و 1.5 مرة لخلايا AMN-3 في المعاملة المتداخلة عند تركيز40 مايكروغرام/مللتر من ABL و 15 مايكروغرام/مللتر 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/مللتر من ABL و 5 مايكروغرام/مللتر 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.

المقدمـــة //

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

وقد ازداد اهتمام الباحثين بلكتينات العراهين 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 عرهون *Volvariella volvacea* تأثيراً مضادا لسرطان sarcoma S-180 (10) ، وللكتين المعزول من عرهون *Grifola frondosa* تأثيرا سميا على الخلايا السرطانية HeLa cells (11), ويمتلك لكتين عرهون *Tricholoma mongolicum* تأثيرا مثبطا لنمو خلايا سرطان mastocytoma P815 في الزجاج وخلايا سرطان sarcoma S-180 في الجسم الحي (12), كما اظهر لكتين عرهون *Agrocybe aegerita* تأثيرا مثبطا لنمو العديد من خطوط الخلايا السرطانية sarcoma S-180, BGC-823, HL-60, MGC80-3, SW480, HeLa لقدرته على حث هذه الخلايا للدخول في الموت الخلوي المبرمج (13). وقد اشارت العديد من البحوث على اهمية لكتين عرهون *Agaricus bisporus* (ABL) لفعاليته 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 العرهون 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 (1L-1) (16) والانترلوكين (1L-6) والانترفيرون كاما (IFN-γ) Interferon gamma ويزيد من كفاءة الخلايا القاتلة الطبيعية (8) , كما أن له قابلية على حث الخلايا السرطانية للدخول في آلية 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 لاتتمكن 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 فضلا عن كونه يزيد من الزيغ الكروموسومي ويوقف من نظام اصلاح الدنا وربما يعمل على التآثر 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 مؤديا الى ايقاف تكوين الشريط المزدوج للدنا او بتداخله مع الدنا بصورة مباشرة (22) مسببا ايقاف تضاعف الدنا واستنساخ الرنا الرسولي mRNA (23).

ان الهدف من الدراسة هواستخلاص اللكتين كمركب فعال من العرهون *A.bisporus*، وإختبار فعاليته التلازنية وتأثيراته السمية الخلوية في نمو الخلايا السرطانية في الزجاج *in vitro* بإستخدام تقنية الزراعة النسيجية، ودراسة التأثيرات العلاجية المتداخلة للكتين بتراكيزمختلفة مع عقاري الـ DOX وMMC في إزدياد سمية العقارات العلاجية للخلايا السرطانية.

المواد وطرائق العمل

- **إستخلاص 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 $CaCl_2$ ،0.6gm Na_2HpO_4 phenylmethal sulfonyl fluride (PMSF), NaN3 (0.04%) بوساطة خلاط كهربائي مبرد لمدة 30 دقيقة، ونقل المزيج إلى دورق (1 لتر) ووضع على محرك مغناطيسي لتحريك المزيج 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 بكبريتات الأمونيوم بنسب إشباع مختلفه وتم التركيز بمرحلتين الاولى من 0-25 وفيها اهمل الراسب وركز الراشح والثانية ركز الراشح بنسبة اشباع 25-70%، ثم أذيب الراسب المستحصل عليه من الخطوة الأخيرة بـ 5 مللتر من محلول PBS وأجريت ديلزته بتبديلات متعددة من الماء المقطر ولمدة 18 ساعة بحرارة (4) م° ثم جفد بجهاز التجفيد Lyophillizer وحفظ في قناني زجاجية بحرارة (4)م°, وعند الحاجة الى استخدامه يتم تذويب (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، وعدّ هذا المحلول خزيناً Stock solution الذي عُمل منه باقي التخافيف (24).

- **تقدير فعالية اللكتين**

قدرت فعالية اللكتين بالإعتماد على طريقة تقدير معيار التلازن الدموي حيث أستخدمت تخافيف مضاعفة (Two fold dilution) للكتين Lectin المركز من العرهون *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 التمريرة (255) و الخط AMN3 لخلايا سرطانة الغدة اللبنية الفأري Murine mammary gland carcinoma (AMN3) تسلّم من التمريرة (62) المنماة في أوعية الزرع النسيجي (Falcon 25cm^3) الحاوي على الوسط الزرعي RPM1-1640 المزود بمصل الجنين البقري بتركيز 10% Fetal Calf serum (FCS) . وتم ضبط التعداد الحي لخطوط الخلايا السرطانية الى تركيز x 10^5 (1) خلية/حفرة باستخدام صبغة التريبان الزرقاء (Trypan blue) وحسب (26).

- **اختبار السمية الخلوية للكتين في نموالخطوط الورمية في الزجاج**

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

تم تفكيك مزارع الخلايا المنماة في أوعية الزرع النسيجي والمكونة لطبقة أحادية كاملة من الخلايا (Confluent monolayer) بسكب الوسط الزرعي المغذي، وغسل الخلايا بمحلول PBS الدافئ ثم بمحلول التربسين- فرسين الدافئ (المحضر بمزج 20 مللتر من محلول التربسين 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 التربسين- فرسين الدافئ ثانية لتفكيك الخلايا ثم حظنها بحرارة 37 ْم لمدة 3-5 دقيقة، وبعد تفكيكها ، تمت إضافة 10-15 مللتر من الوسط الزرعي المغذي الكامل, و تم 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 10^5) 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 تمّ التخلص من الوسط الزرعي القديم في الحفر، وأضيف (0.2) مل من التراكيز المحضرة آنياً لكل مستخلص باستعمال الوسط الزرعي 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 الزرعي الخالي من المصل، حضنت الأطباق بحرارة (37) م° وبواقع 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) مايكروليترمن صبغة البنفسج البلوري لكل حفرة وأعيد الطبق الى الحاضنة ليحضن لمدة (30) دقيقة، بعدها اخرج 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) وكالآتي:

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

- **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 كوحدات فردية (Monomeres) لتشع لوناً أخضر في حين أن الخلايا التي لم تعان من الموت الخلوي المبرمج فأن الصبغة تتجمع في المايتوكوندريا لتشع لوناً أحمر. جُهز 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 (1×10^6 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 الزرعي القديم في الحفر، وأضيف (0.4) مل من التركيز (5000) مكغم/مل المحضر سابقاً للكتين وبواقع اربعة مكررات للتركيز، كما تم عمل اربعة مكررات للسيطرة التي يضاف لها (0.4) مل من الوسط الزرعي الخالي من المصل. وبعد مرور مدة التعريض المحددة للحضن 24 ساعة، وذلك لاستحثاث 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 آنياً 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**

جُهز عالق الخلايا ونقل 0.2 مل منه لكل حفرة من حفر طبق الزرع النسيجي ، إذ احتوت كل حفرة على (1×10^5) خلية. وحضنت الأطباق في الحاضنة بحرارة 37ْم لمدة 24 ساعة الى حين التصاق الخلايا في الحفرة، ومتابعة ذلك بالفحص بوساطة المجهر المقلوب الطور، أعقبها سكب الوسط الزرعي المغذي من الحفر ومعاملة الخلايا بـ 0.1 مللتر من كل تركيز من التراكيز المحظرة مسبقا من المحلول الخزين للكتين ABL للوصول للتراكيز 10, 20, 40, 60 مايكروغرام/ مللتر بإستعمال SFM، وبواقع اربعة مكررات لكل تركيز، ثم حضنت الأطباق بحرارة 37ْم 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 اضافة0.1 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) وبالتراكيزالمحضرة 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 الزرعي الخالي من المصل، حضنت الأطباق بحرارة (37) م° .

كما أضيف 0.2 مللتر من كل تركيز من تراكيز العقار قيد الدراسة بمفرده وبواقع ستة مكررات لكل تركيز من تراكيز العقارين لدراسة تأثير السمية الخلوية للعقار بمفرده على حيوية ونمو الخلايا الورمية. ثم إعادة حظن الأطباق بحرارة 37ْم لمدة 24 ساعة، (بواقع طبقين 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 وقُرأت 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 للللكتين**

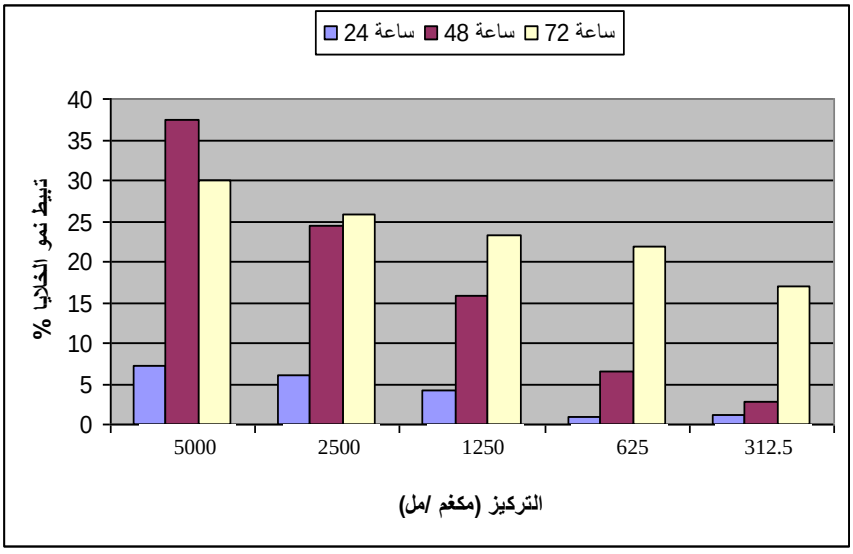
بلغ الوزن الجاف للللكتين المستخلص من الجزء الثمري للعرهون *Agaricus bisporus* والمركز بالترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسب إشباع تراوحت بين 25-70% مقدار 1 غرام : 80 غرام (وزن جاف : وزن طري) اي بنسبة استخلاص 1.25%، إذ يعد تركيز المستخلص بكبريتات الأمونيوم إحدى مراحل التنقية للتخلص من بعض البروتينات التي تقلل من الفعالية التلازنية (34)، تستخدم العديد من المختبرات اللكتينات المنقاة جزئياً في فحص فعالية التلازن في حين تلجأ اخرى إلى إستخدام اللكتينات المنقاة لحد التجانس بالإعتماد على كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي على هلام Sephacry S-300 ، أو السيفادكس G-100 في الفحص ذاته، أو بإستخدام طرائق كروموتوغرافيا الألفة على هلام Sepharose-4B المنشط ببروميد 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 للللكتين وقابليته على حث الية الموت الخلوي المبرمج في الخطوط الخلوية السرطانية**

أظهرت نتائج معاملة الخلايا الورمية (AMN-3, Hep-2) 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 إعتماداً على النسب المئوية لمعدل التثبيط (IR) مقارنة بالسيطرة التي عُد معدل نموها 100% في الظروف ذاتها.

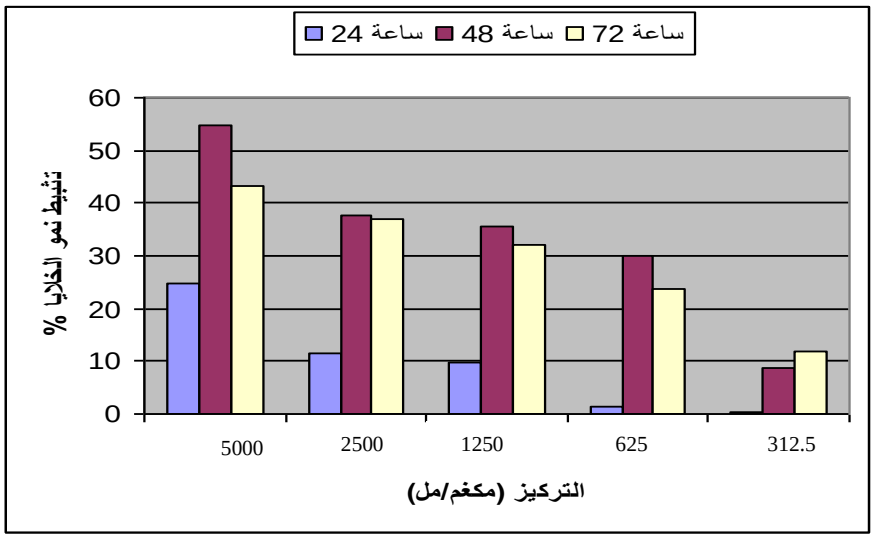
إعتمدت النسبة المئوية لتثبيط نمو خط خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2 على التركيز المستخدم للللكتين (ABL) ووقت التعريض، إذ سجلت أعلى نسب تثبيط لنمو خلايا Hep-2 عند التركيز 5000 مايكروغرام/مللتر ولأوقات التعريض الثلاثة، وإنخفض هذا التثبيط معنوياً ($P \leq 0.05$) بإنخفاض التراكيز المستعملة شكل (1). إذ لم يكن التأثير السمي لكل التراكيز المستعملة من اللكتين واضحاً بعد 24 ساعة من المعاملة، إلا أنه ظهر أكثر وضوحاً بعد 48 ساعة، ليبلغ اعلى نسبة عند التركيز 5000 مايكروغرام/مللتر (37.5% ,24.5% ,15.88% ,6.57% ,2.82%) على التوالي، وكان التاثير معنويا 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 (بإستثناء التراكيز 2500 ,1250 ,625 مايكرو غرام/ 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.

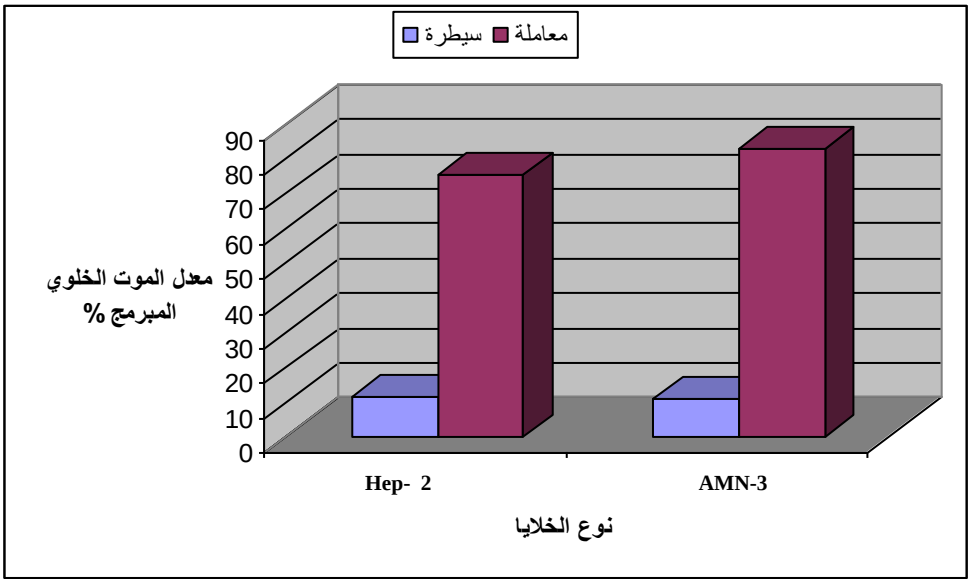
وتشير النتائج الموضحة في الشكل (2) الى وجود تثبيط لنمو خلايا AMN-3 بإستعمال التراكيز الخمسة من اللكتين والذي يزداد وضوحاً بتقدم مدة التعريض وزيادة التركيز المستخدم، فقد سجلت أعلى نسب لتثبيط نمو الخلايا المعاملة بتركيز 5000 مايكروغرام/مللتر هي ,54.72% 24.64% ,43.3% ولثلاث فترات تعريض 24 ,48 ,72 ساعة على التوالي حيث كان التثبيط معنويا عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) للاوقات الثلاثة بالمقارنة مع السيطرة. وقد كان التأثير السمي للكتين في خلايا AMN-3 بعد 24 ساعة واطئا 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/مللتر 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 لنموالخلايا والمصاحبة لإزدياد تركيز ABL، وكان هذا التأثير أكثر وضوحاً بعد 48 ساعة من التعريض.



الشكل (2) التأثير السمي الخلوي لتراكيز مختلفة من لكتين العرهون *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 / مللتر (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 وAMN-3 التي عانت موتا خلويا مبرمجا 74.14% ,82.6% بالمقارنة مع السيطرة 11.35% ,10.82% على التوالي.



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

ظهر من خلال الدراسات أن للمركبات المعزولة من العراهين المأكولة فعل مضاد لتكاثر الخلايا السرطانية مثل لكتين عرهون *Agaricus bisporus* (ABL) نتيجة لارتباطه بانتقائية والفة عالية بمستقبلات خاصة توجد على سطح الخلايا السرطانية الطلائية 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 Reversibile 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 حاجزا يمنع دخول البروتينات الى النواة والتي تعتبر عوامل نمو تؤدي لزيادة انقسام الخلايا, وقد أكد الباحث (40) هذه الحقيقة أيضاً اذ وجد ان معظم اللكتينات هي عوامل نمو خارجية قوية Exogenous growth factors تشبه إلى حد ما تأثير الهرمونات ولكي تتمكن من إحداث فعلها لابد 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 الطلائية السرطانية للقولون HT29 وخلايا سرطان الثدي MCF-7 (14) مما يتيح الفرصة للكتينات المتواجدة في الغذاء بمقاومة الهضم أولاً والوصول إلى خلايا القولون بشكلها الفعّال فتسبب تثبيطا لنمو الخلايا السرطانية ثانياً (41).

وجد الباحث (6) ان حضن الخلايا الطلائية الورمية للمعدة (AGS) مع المستخلص المائي لعرهون *Agaricus blazei* يحفز الخلايا للدخول في الموت الخلوي المبرمج من خلال حثه للكاسبيز3(Caspase-3) ولايقافه دورة حياة الخلية في مرحلة G2/M.

وأشارالباحث (42) الى أن المكونات الرئيسة التي تشترك في آلية الموت الخلوي المبرمج الذي تحثه مستخلصات عرهون *Agaricus blazei* في خط خلايا سرطان ابيضاض الدم البشري U937 هي على الأغلب عائلة bcl-2 وانزيم الكاسبيز 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 الاساسية المنظمة لآلية الموت الخلوي المبرمج سواء كونها منشطات لهذه الآلية مثل bax أو مثبطات لها مثل bcl-2 (43).

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

كما اظهر لكتين عرهون *Agrocybe aegerita* تأثيرا مثبطا 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 عرهون *Agaricus bisporus* لها قدرة تثبيط نمو خلايا سرطان ابيضاض الدم U937 بالاعتماد على الجرعة المعطاة لقدرتها على حث آلية البدء بآلية الموت الخلوي المبرمج.

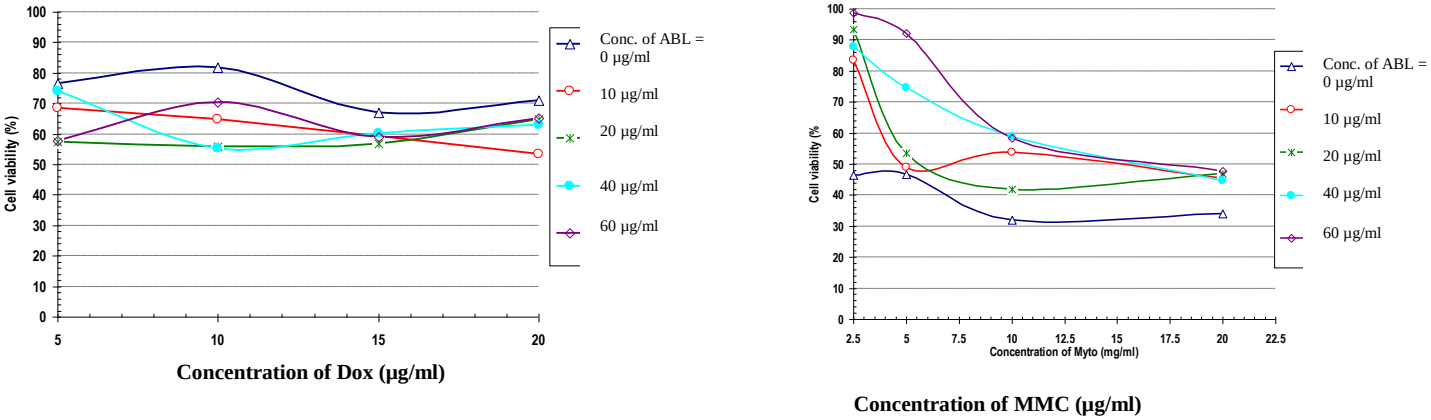
عند مقارنة نتائج تأثير المستخلصين المائي والكحولي الخام للعرهون في خلايا AMN3 مع تأثيرها في خلايا Hep-2 وجد أن خلايا AMN3 كانت أكثر حساسية من خلايا Hep-2 تجاه هذين المستخلصين، ربما يعود السبب في ذلك الى اختلاف طبيعة المستقبلات Receptor الموجودة في الأغشية الخلوية للخلايا السرطانية والتي تختلف تبعاً لاختلاف 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/مللتر على حيوية خلايا Hep-2 ثم معاملة هذه الخلايا بتراكيز متباينة من عقارالـ DOX والـ MMC بعد 24 ساعة من الحضن 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/مللتر وهي (76.5 - 70.9%) والتي لم تظهر فروقاً معنوية معتمدة على إرتفاع تراكيز العقار، بينما كان هنالك إنخفاض معنوي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) في حيوية الخلايا المعاملة مسبقاً بـ ABL بالتركيزين 10 و20 مايكروغرام/مللتر المصاحب للمعاملة بالـ DOX من 5-20 مايكروغرام/مللتر، إذ تراوحت النسب المئوية لحيوية الخلايا بين (53.3-68.6) % و (64.8-57.5) % على التوالي، بينما لم تلاحظ فروق معنوية في حيوية الخلايا المعاملة مسبقاً بالـ ABL بالتركيزين 40 و60 مايكروغرام/مللتر معتمدة على التراكيز المتزايدة من الـ DOX.

a



شكل (4) التأثير السمي المتداخل للكتين وعقار الـ DOX (a) والـMMC (b) في حيوية خلايا Hep-2 بعد مدة 24 ساعة من التعريض.

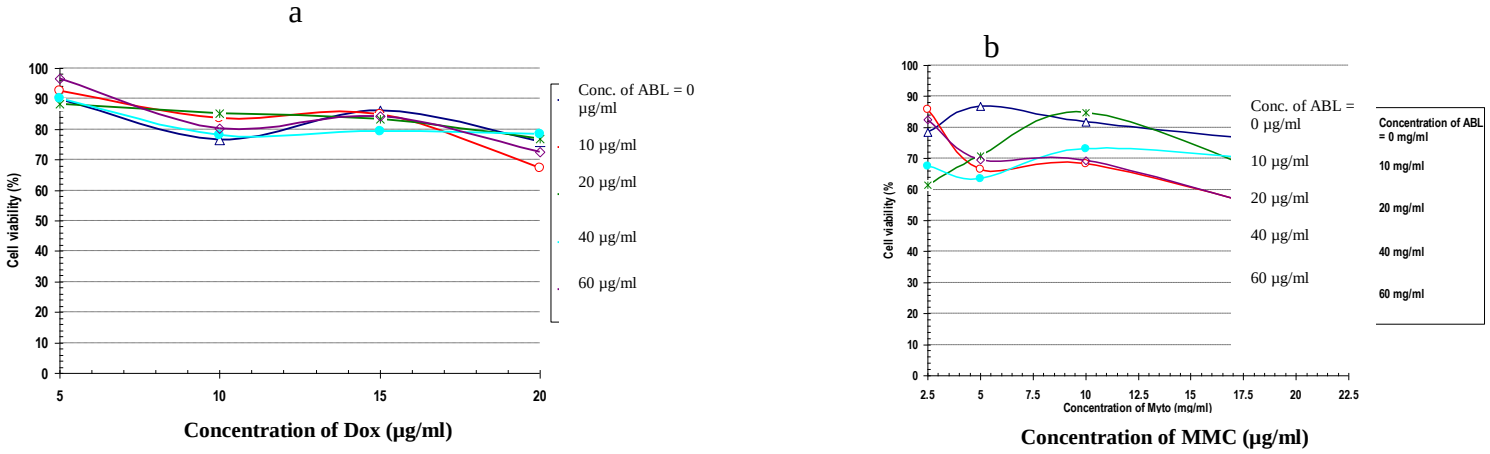
كما كشفت تلك النتائج عن ظهور إنخفاض معنوي باحتمالية ($P \leq 0.05$) في حيوية الخلايا معتمدة على تراكيز ABL المعاملة بها الخلايا مسبقاً بالتركيزين 20 و40 مايكروغرام/مللتر مع عقارالـ DOX بالتركيز 10 مايكروغرام/مللتر، إذ سجلت نسب تثبيط إضافية لحيوية خلايا Hep-2 بلغت 2.41 و 2.44 مرة على التوالي ويعتقد ان لحساب كفاءة المعاملات تاثيرا على حيوية الخلايا (49) بالمقارنة مع نسب التثبيط المسجلة بإستعمال التركيز ذاته من العقار بغياب اللكتين.

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

التأثير المتداخل للكتينات وعقاري الـDOX والـ MMC في حيوية خلايا AMN-3

أظهرت النتائج المبينة في الشكل (5-a) عدم ظهورتثبيطا ملحوظا في حيوية خلايا AMN-3 معتمدة على إرتفاع تراكيز عقارالـ DOX (5-20 مايكروغرام/مللتر) وبغياب ABL، إذ تراوحت النسب المئوية لحيوية الخلايا عند تلك التراكيز ما بين (89.9 -75.8) %. في حين سجل إنخفاض معنوي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) في حيوية الخلايا معتمداً على تراكيز عقارالـ DOX عندما تكون الخلايا معاملة مسبقاً باللكتين بالتراكيز 10 ,20 ,60 مايكروغرام/مللتر تراوح بين (92.5 – 67.3) % و(88.8 – 74.4) % و(96.6 – 77.4) % على التوالي، وفي الوقت الذي لم تكن الفروق المسجلة في النسب المئوية لحيوية الخلايا المعاملة مسبقاً باللكتين وحده وبتركيز 40 مايكروغرام/مللتر معنوية ، وقد سجل إنخفاض في حيوية الخلايا ذات المعاملة المتداخلة للكتين بتركيز 40 مايكروغرام/مللتر مع 15 مايكروغرام/مللتر من الـ DOX، يليه الإنخفاض المسجل عند المعاملة المتداخلة للـ ABL بتركيز 10 مايكروغرام/مللتر والعقار بتركيز 20 مايكروغرام/مللتر لتبلغ نسب التثبيط الإضافية 1.5 و 1.35 مرة على التوالي.

وعند معاملة خلايا AMN-3 بعقار الـ MMC فلم تظهر فروق معنوية في النسب المئوية لحيوية الخلايا معتمدة على إرتفاع تراكيز العقار بغياب ABL شكل(5- ط)، كما لم يظهرتاثير للمعاملة بعقارالـ MMC لكل التراكيزالمستخدمة على الخلايا التي عوملت مسبقاً بـ ABL بالتراكيز 40,20,10 مايكروغرام/مللتر وقد تراوحت عند تلك المعاملات النسب المئوية لحيوية الخلايا بين (85.9 – 51.8) % و(61.3 – 61.8) % و(67.4 – 68.7) % على التوالي، إلا أنه سجل إنخفاضا ملحوظا في حيوية الخلايا ذات المعاملة المتداخلة للكتين بتركيز 40 و10 مايكروغرام/مللتر مع العقار بتركيز 5 مايكروغرام/مللتر بلغت عندها نسب التثبيط الإضافي 2.79 و 2.55 مرة على التوالي, كما سببت المعاملة ظهور فروق معنوية باحتمالية ($P \leq 0.05$) في حيوية الخلايا عند المعاملة بتركيز 20 مايكروغرام/مللترمن العقار معتمدة على تزايد تركيزاللكتين المستعمل.



شكل (5) التأثير السمي المتداخل للكتين وعقارالـ DOX (a) والـMMC (b) في حيوية خلايا AMN-3 بعد 24 ساعة من التعريض.

تتمثل آلية مقاومة الخلايا السرطانية للعلاج بعقارالـ DOX بتغييرات في النقل الخلوي للعقار، وتفاعلات العقار مع مجاميع السلفاهايدرول والبروتينات والكلوتاثيون ، كما يمكن أن يؤثر العقار في التنظيم العلوي up regulation لتكوين مركب الـ Metalomethionine الذي تتأثر مجاميعه مع العقار بتفاعلات مماثلة للكلوتاثيون، أو قد يؤدي الى زيادة الهدم الحيوي للتنظيم السفلي للأنزيمات الفعالة (50). وقد أشيد بكفاءة دخول ABL سايتوبلازم الخلايا حيث أنه يتمركز حول النواة مؤديا الى تثبيط النقل النووي غير المتخصص للبروتينات مثل (Glutathion-S-transferase (GST من السايتوبلازم إلى النواة وبذلك تحمي الخلية من سمية العقار، وأن المعاملة المسبقة لبعض أنواع الخطوط الخلوية السرطانية كخط خلايا (HCT_8) بتركيز 40 مايكروغرام/مللترمن ABL تليها المعاملة بالـ DOX قد خفض 50% من نسبة دخول الكلوتاثيون GST π المنتقل للنواة مما يؤدي إلى زيادة كمية الـ DOX داخل النواة والذي يعكس كميته المرتبطة بالدنا وبالتالي زيادة حساسية الخلايا للعقار (22).

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

أما فيما يتعلق بعقار الـ MMC فقد ظهر أن له تأثيراً سمياً عالياً على خلايا Hep-2 معتمداً على تركيزه، وأن هذا الخط الخلوي يمتلك حساسية عالية لعقار الـ MMC، ولم يكن للـ ABL تأثير إيجابي في الحصول على نسب تثبيط إضافية بالتداخل معه، إن الفعل السمي متأتٍ بالدرجة الرئيسة 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 إستخدام اللكتينات المنتجة من العرهون *A.bisporus* في تنميط مجاميع دم الإنسان لعدم وجود تخصص إتجاهها، وتفاوت الفعالية التثبيطية للكتينات تجاه الخطوط الخلوية السرطانية والتي ظهرفيها أن خط خلايا AMN-3 كان ذو حساسية تفوق حساسية خلايا Hep-2 سواء كان تاثيرا سمياً 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 اعلى 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 adipose.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.; Furkukawa, 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. Damian1, L.; Fournier, D.; Winterhalter, M. and Paquereau, L. (2005). Determination of thermodynamic parameters of Xerocomus 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 mytomycin C and combined procedures. *Br. J. Opthalmol*.,77: 693 -697.
20. Undeger, U.; Ayden, S.; Bassaran, A. and Bassaran, N.(2004). The modulation of effects of quercetin and rutin on mytomycin C induced DNA damage. *Toxic Lett*.,151:143 – 149.
21. Papachristou, F.; Lialiaras,T.; Toulopidis, S.; Kalaitize, C.; Simopoulos, C. and Sofikitis, N.(2006). Evidance of increased chromosomal instability in infertile males after exposure to mytomycine 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-Acα2 – Galβ1-4 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 Shohet, D. (1987). Surface haemagglutininating 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 forclonal 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. *Johnwiley and Sons. NewYork.*
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- Friedenreichrelated 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*, Concavalin-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. NaH 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-{kappa}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-kB 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-kB 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 echinococcos 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.