تأثير المستخلصات المائية والكحولية الفطر *Calvatia craniiformis* في خلايا نقي العظم و مستوى الانترفيرون-كاما في المصل للفئران المختبرية من ضرب Balb/c

*أبراهيم هادي محمد * غسان حمدان جميل***

استلام البحث 4, تشرين الثاني,2011
قبول النشر 28, ايار,2012

الخلاصة:

صمم هذا البحث لدراسة التأثيرات السمية الخلوية للمستخلصين المائي والكحولي للفطر *Calvatia craniiformis* في خلايا نخاع العظم للفئران. وتضمنت الدراسة ايضا دراسة التاثيرات السمية للمستخلصين الخام في الحي التي شملت التاثيرات السمية الحادة والتي من خلالها حددت الجرعة المميتة الوسطية (LD_{50}) في الفئران وهي 85 ملغم/كغم و 177 ملغم/كغم للمستخلصين المائي والكحولي الخام على الترتيب . في حين كانت نتائج التأثيرات السمية المزمنة باستعمال الجرع (50 ، 75 ، 100) ملغم/كغم و(100 ، 200,150) ملغم/كغم للمستخلصين المائي والكحولي الخام على التوالي داخل الخلب (IP) لمدة 30 يوما وبواقع جرعة واحدة كل 48 ساعة كالاتي: أظهرت نتائج التأثيرات السمية للمستخلصين الخام في خلايا نقي العظم في الفئران، التي تضمنت تأثيرها في معامل الانقسام الخيطي (MI) ومعامل التحول الآرومي (BI)، ارتفاعاً معنوياً ($P\leq0.01$) في (MI) عند المعاملة بالمستخلص المائي الخام، في حين لم تظهر النتائج فرقاً معنوياً عند المعاملة بالمستخلص الكحولي الخام، سببت المعاملة بالمستخلصين الخام ارتفاعاً معنوياً واضحاً في معامل التحول الآرومي (BI) أعتمد على الجرعة. وبينت النتائج ايضا وجود فروق معنوية باحتمالية ($P\leq0.01$) في مستوى IFN-γ في المصل ولجميع الجرع المستعملة. في حين لم تظهر المعاملة بالمستخلصين الخام فروقا معنوية في عملية البلعمة مقارنة بالسيطرة.

الكلمات المفتاحية: *Calvatia craniiformis* , الانترفيرون-كاما, نقي العظم

المقدمة:

أتجهت أنظار الباحثين في السنوات الأخيرة الى أهمية استعمال بعض الأعشاب الطبية أو السامة في محاولة لعلاج مرض السرطان [1]ومن ذلك المنطلق فقد توجهت الأنظار نحو العراهين فقد عرف أكثر من 270 نوع من العراهين في الوقت الحاضر منها ذات أهمية غذائية لكونها من الأنواع المأكولة ومنها ذات فوائد علاجية [2]وتركز الاهتمام بشكل خاص على العراهين الطبية وازدادت البحوث العلمية عليها خاصة في اليابان والصين[3]. فقد وجد أن لمركب Lentinan المعزول من عرهون *Lentinus edodes* تأثيرا فعّالا في علاج السرطان [4]، كما أثبت أن للمستخلص المائي لعرهون *Hypsizygus mamoreus* فعالية مضادة للأورام في الحي كسرطان Sarcoma 180 المغروس في الفئران لاحتوائه على مركب 1,3-β-glucan [5]. درست الخصائص الاحيائية لمستخلصات العرهون *Calvatia craniifomis* بشكل واسع جداً وأظهرت الكثير من الخصائص الطبية لاحتوائها على مواد فعّالة مثل Galvatic acidالتي تعد مواد مضادة للالتهاب ومضادة للسرطان [6]. لقد ازداد الاهتمام بلكتينات العراهين خلال العقود الأخيرة بشكل كبيرً وذلك بسبب قدرتها على تثبيط الأورام مثل اللكتين المعزول من العرهون *Agaricus bisporus* الذي له فعالية مضادة للتكاثر ضد خلايا سرطان القولون البشري Human Colon Cancer (HT29)ومضادة للاكسدة ومعدلة للجهاز المناعي [7] وقد تمكن الباحثون من عزل مركبات عديد السكريات من العرهون*Agaricus blazei* وعدّوها مصدرا رئيسا لتصنيع الأدوية المضادة للسرطان من خلال تنشيطها للجهاز المناعي [8] لكونها تزيد من فعالية الخلايا اللمفية التائية T-lymphocytes والخلايا القاتلة الطبيعية Natural killer [9] فضلا عن كونها منشطات جيدة لوظائف الخلايا البلعمية لحثها على تحرير عامل تنخر الورم TNF-α [10] كما أنها تزيد من كفاءة عملية البلعمة والخاصيةالسمية للبلاعم [11]. وجد أن للكتينات العرهون قابلية على تثبيط انقسام الخلايا السرطانية وتكاثرها في الزجاج وداخل الجسم الحي [13,12] . و في محاولة لإيجاد مركبات فعّالة ضد مرض السرطان فقد اختير العرهون *Calvatia craniiformis* لاحتوائه على الكثير من المركبات

*كلية العلوم \ قسم علوم الحياة \جامعة ديالى
**كلية التربية قسم علوم الحياة \جامعة ديالى

المضادة للأورام. ونظرا لقلة الدراسات حول فعاليته ضد مرض السرطان، ولعدم اختبار ذلك في العراق فقد صممت هذه الدراسة لتحقيق الأهداف الاتية:-

1- دراسة التاثيرات السمية الحادة والمزمنة لكل من المستخلصين الخام وذلك باستعمال نظام اللبائن لمعرفة الجرعة الوسطية المميتة (LD_{50}).
2- النشاط الانقسامي لخلايا نقي العظم ومستوى الانترفيرون كاما IFN-γ في المصل

صورة (رقم 1) الفطر *Calvatia craniiformis*

طرائق العمل:

جمع الفطر

أجريت الدراسة على فطر *Calvatia craniiformis* الذي تم الحصول عليه من بساتين محافظة ديالى /قضاء الخالص العراق, (صورة رقم 1).

تحضير المستخلصين المائي والكحولي الخام للفطر

اختير الفطر *Calvatia craniiformis* الذي ينتمي الى المملكة الفطرية اذ يعد من الفطريات الحقيقية للعائلة Lycopedaceae جرى تشخيص الفطر (المكتشف لاول مرة في العراق) الى مستوى النوع والجنس في مختبر ابحاث الفطريات كلية الزراعة –جامعة بغداد بالاعتماد على صفات الفطر التشريحيةاتبعت طريقة [14] في تحضير المستخلص المائي.وجرى تحضير المستخلص الكحولي الخام للعرهون باستعمال جهاز السكسوليت Soxhlet وبحسب الطريقة المتبعة في[11].

تحضير الملون الخاص باختبار التهام الخميرة المقتولة في الزجاج

اذيب (0.2) غم من مسحوق صبغة ليشمان Leishman stain في (100) مل من الكحول المثيلي المطلق ثم وضعت على صفيحة المحرك المغناطيسي لمدة ساعة واحدة ورشحت بورق ترشيح وحفظت في قنينة معتمة وبدرجة حرارة الغرفة.

اختبار التأثيرات السمية للمستخلصين المائي والكحولي الخام للعرهون في الحي.

تم تهيئة الحيوانات المختبرية اذ استعملت اناث فئران ضرب Balb/c بعمر (6-8) أسابيع، بوزن (20-30) غراما .

التأثيرات السمية الحادة Acute Toxicity Effect

اعتمدت طريقة الصعود والنزول Up-and down التي ذكرها [15] لتحديد الجرعة المميتة الوسطية LD_{50}، للمستخلصين المائي والكحولي الخام للعرهون ويتم حساب قيمة LD_{50} من المعادلة الاتية:بحسب [15]

$$LD_{50} = xF + kd$$

اذ ان:

xF : آخر جرعة استعملت.

d : مقدار الزيادة والنقصان الثابت في الجرعة المعطاة.

k : قيمة جدولية تحسب من الجدول الملحق (1) اذ أن:

O : رمز لبقاء الحيوان حياً خلال 24 ساعة من الحقن.

X : رمز لهلاك الحيوان خلال 24 ساعة من الحقن.

التأثيرات السمية المزمنة Chronic Toxicity Effect

تضمنت هذه الدراسة فئرانا طبيعية ، وقسمت الحيوانات الى سبع مجاميع وبواقع خمس فئران لكل مجموعة وقد تم اعطاء المستخلصين بالحقن داخل الخلب(IP) وبالجرع الثلاث للمستخلص المائي الخام وهي (50 و 75 ,100) ملغم/كغم من وزن الجسم والكحولي وهي(100، 150,200) ملغم/كغم من وزن الجسم وعدت المجموعة السابعة سيطرة حقنت بمحلول (PBS) ، وقد اختيرت الجرع اعتماداً على الجرعة الوسطية المميتة LD_{50}، وبحجم (0.3) مل لمدة 30 يوماً بواقع جرعة كل 48 ساعة ، أعطيت الجرعات بحسب [16].

بعد انتهاء المعاملة تمت التضحية بالفئران بطريقة التنخيع وشرحت مباشرة للحصول على عينات الدم وخلايا نقي العظم .

جمع خلايا نقي العظم لحساب معامل الانقسام الخلوي

حقن كل فأر بـ (0.25) مل من الكولجسين بجرعة 10 ملغم/كغم من وزن الجسم قبل ثلاث ساعات من انتهاء المعاملة عن طريق الخلب ثم قتلت الحيوانات بطريقة التنخيع وشرحت مباشرة للحصول على خلايا نقي العظم اذ اتبعت طريقة [17] وتم قياس دليل الانقسام الخلوي (MI) ومعامل التحول الآرومي (BI) لخلايا نقي العظم في الفئران تم

سحب الدم من كل فأرة وذلك بطعن القلب بوساطة محقنة طبية (2) مل :
1 - غير حاوية على الهيبارين وذلك لفصل المصل عن الدم ثم نبذ بجهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق ، عُزل المصل بعناية ونقل الى أنابيب ابندروف وحفظ بدرجة حرارة (-20) م° الى حين الاستعمال، وذلك لإجراء فحص مستوى IFN-γ.
2 - حاوية على الهيبارين لاجراء اختبار البلعمة.

فحص مستوى الانترفيرون-كاما-Interferon Gamma في المصل بالاعتماد على الامتزاز المناعي المرتبط بالانزيم (ELISA)

يعتمد الفحص مبدأ الشطيرة Sandwich method وفيها يتم التصاق الضد الأولي النوعي للانترفيرون كاما (IFN-γ) على قاع حفر طبق المعايرة المجهرية ذي القعر المسطح Flat bottom ، يضاف المصل المراد التحري عن وجود الانترفيرون كاما فيه الى حفر الطبق، ثم يضاف الضد الثانوي النوعي للانترفيرون كاما والمعلم بالبايوتين (Biotin) ويليه اضافة انزيم الفوسفاتيز القلوي Alkaline phosphatase (ALP) المرتبط بمادة Streptovidin ذات الالفة العالية للارتباط بالضد الثانوي من خلال تفاعلها مع البايوتين، وأخيراً تضاف الركيزة التي يعمل عليها الانزيم وهي مادة p- (pNPP) nitrophenyl phosphate ، ثم تقاس الشدة اللونية بجهاز قارئ الاليزا ELISA Reader .

طريقة العمل :

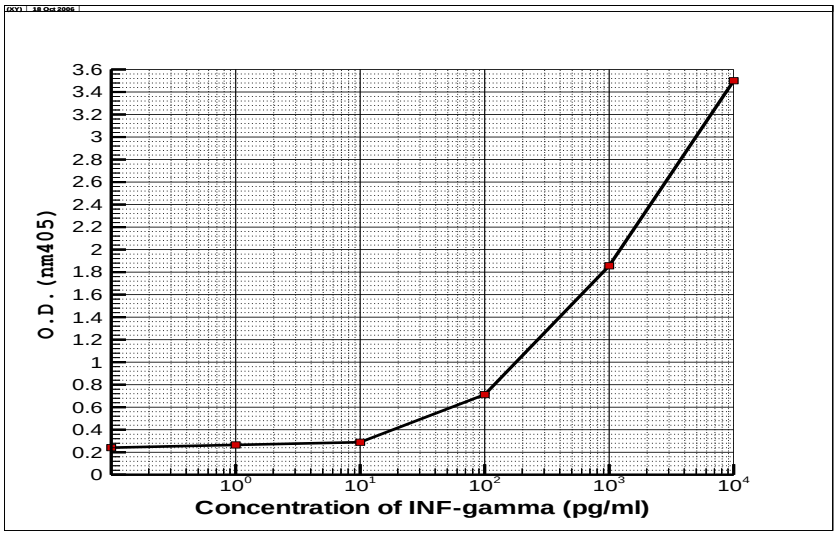
أنجزت الطريقة بالاعتماد على توجيهات الشركة المصنعة (Mabtech).

قرئت النتائج باستعمال جهاز الأليزا ELISA Reader بطول موجي 405 نانوميتروحسبت النتائج بالاعتماد على المعادلة المستحصلة من المنحنى القياسي وهي:

$Y=1445.3x^2 - 1053.9x + 139.55$

Y : تركيز IFN-γ (pg/ml) في المصل.

X : يمثل الكثافة الضوئية O.D .



شكل (1) المنحنى القياسي لتقدير مستوى الانترفيرون كاما.

النتائــج:

نتائج تحضيرالمستخلصين المائي والكحولي الخام للفطر *Calvatia craniiformis*

يتكون الجسم الثمري في العراهين من نسيج فطري كاذب مؤلف من تجمع للخيوط الفطرية والتي تكون رقيقة الجدران وثنائية النواة وهي قد تحتوي على اتصالات كلابية أو فاقدة لها , أعطت طريقة تحضير المستخلص المائي الخام وزنا قدره 5 غم من 75 غم من الفطر الطري أي بنسبة استخلاص 7.15% ، وكان قوام المستخلص الناتج كثيفا مع لزوجة قليلة ولون بني داكن مائل الى السواد.وتم الحصول على مستخلص كحولي خام جاف بوزن قدره 5 غم من 50 غم مسحوق الفطر أي بنسبة استخلاص 10% ، وكان المستخلص الناتج ذا قوام كثيف مائل الى اللزوجة وذا لون بني مصفر.

التأثيرات السمية للمستخلصين المائي والكحولي الخام للفطر في الفئران

تم تحديد الجرعة الوسطية المميتة (LD_{50}) للمستخلصين المائي والكحولي في الفئران المختبرية بطريقة الصعود والنزول. ويلاحظ من الجدول (1) أن الجرعة الوسطية المميتة

للمستخلصين المائي والكحولي كانت 85 و 177 ملغم/كغم على التوالي.

جدول (1) يوضح الجرعة الوسطية المميتة للمستخلصين المائي والكحولي

نوع المستخلص	مقدار الزيادة أوالنقصان في الجرعة (d)	موت الحيوان أو بقاؤه حياً بعد 24 ساعة	قيمة K الجدولية	آخر جرعة إستعملت (xf)	الجرعة المميتة النصفية (LD50)
المستخلص المائي	25	ooxo	-439	100	85 mg\kg
المستخلص الكحولي	50	oxxx	1.5	200	177 mg\kg

تأثير جرع مختلفة من المستخلصين المائي والكحولي الخام للفطر في معامل الانقسام الخلوي MI ومعامل التحول الارومي BI لخلايا نخاع العظم للفئران

تشير النتائج الموضحة في الجدول (2) الى ارتفاع معدلات معامل الانقسام الخلوي MI في الفئران وكان هذا الارتفاع معنوياً عند مستوى احتمالية ($P\leq0.01$) وخاصة للجرع (100,75,) ملغم/كغم اذ كان المعدل (16.20 و 16.80)% على التوالي مقارنة بالسيطرة 13.01% ، في حين كان المعدل منخفضاً للمجموعة المعاملة بالجرعة 50 ملغم/كغم وهو 13.50%. وقد اوضحت نتائج مقارنة معدلات معامل التحول الارومي BI الى وجود زيادة معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) بين الجرع المستعملة وكانت الزيادة واضحة في معدلي الجرعتين (50 و 75) ملغم/كغم وهي (73.05 و 72.09)% على التوالي مقارنة بالسيطرة 66.13%، في حين كانت أقل قيمة للـ BI في الجرعة 100 ملغم/كغم وهي 56.40. بينت نتائج مقارنة معدلات الانقسام الخلوي الموضحة في الجدول (3) عدم وجود فروق معنوية بين الجرع المستعملة الكحولي للفئران مقارنة بالسيطرة. في حين أدت المعاملة بالمستخلص الكحولي الخام الى زيادة معدل معامل التحول الارومي في الجرعة 100ملغم/كغم زيادة معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) بقيمة مقدارها 77% مقارنة بالسيطرة 66.13% ، في حين لم يلاحظ فرق في معدلات BI عند المعاملة بالجرعتين الثانية والثالثة موضحة بالصورة (2).

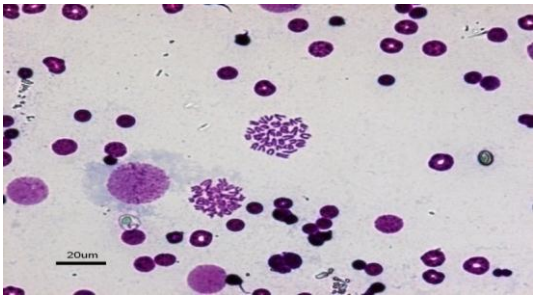
جدول (2): تأثير جرع مختلفة من المستخلص المائي الخام للفطر في معامل الانقسام الخلوي MI ومعامل التحول الارومي BI لخلايا نخاع العظم للفئران.

الجرع mg/Kg	MI للفئران المعدل ± الخطأ القياسي	BI للفئران المعدل ± الخطأ القياسي
0	^{b} 0.57 ± 13.01	^{b} 4.42 ± 66.13
50	^{b} 0.56 ± 13.50	^{a} 4.13 ± 73.05
75	^{a} 1.60 ± 16.20	^{a} 3.34 ± 72.09
100	^{a} 2.25 ± 16.80	^{c} 7.27 ± 56.40
الاحتمالية ≤	0.01	0.01

جدول (3): تأثير جرع مختلفة من المستخلص الكحولي الخام للفطر في معامل الانقسام الخلوي MI ومعامل التحول الارومي BI لخلايا نخاع العظم للفئران

الجرع mg/Kg	MI للفئران	BI للفئران
	المعدل ± الخطأ القياسي	المعدل ± الخطأ القياسي
0	^{a} 0.57 ± 13.01	^{b} 4.42 ± 66.13
100	^{a} 0.23 ± 11.23	^{a} 2.01 ± 77.00
150	^{a} 2.23 ± 13.10	^{b} 5.12 ± 69.42
200	^{a} 1.68 ± 12.95	^{b} 2.92 ± 66.36
الاحتمالية ≤	N.S	0.01

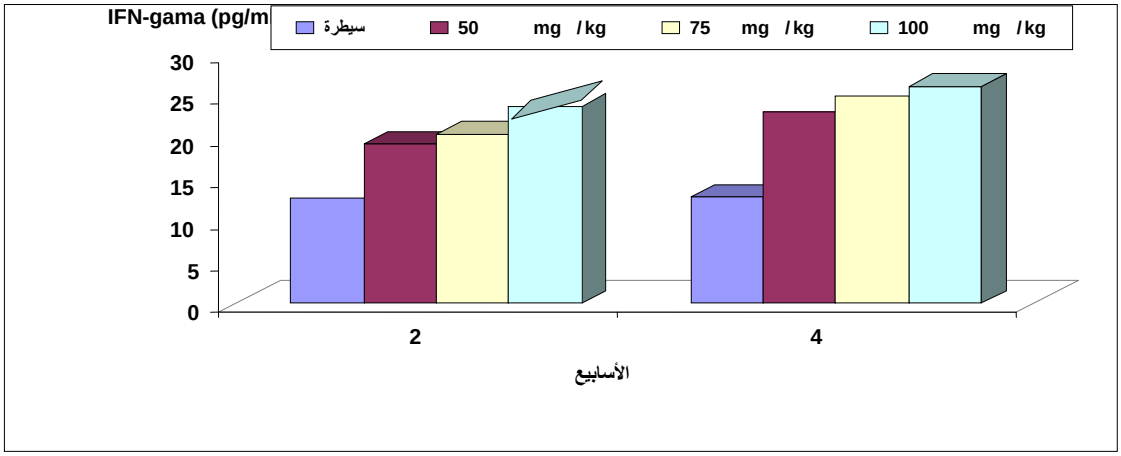
- الأحرف الصغيرة المختلفة ضمن العمود تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية $P\leq0.05$)
- N.S تدل على عدم وجود فروق معنوية.



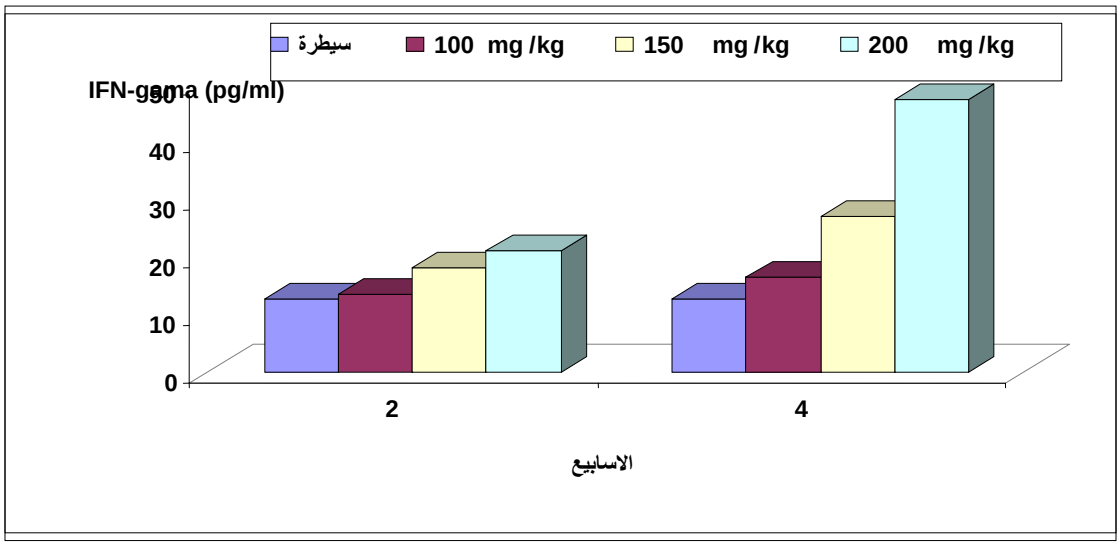
صورة (2) كروموسومات خلايا نقي العظم للفئران متوقفة في الطور الاستوائي معاملة بالمستخلص المائي للفطر *Calvatia craniiformis*

تأثير جرع مختلفة من المستخلصين المائي والكحولي الخام للفطر في مستوى الانترفيرون-كاما IFN-γ في مصل الفئران

لقد أظهرت المعاملة باستعمال المستخلص المائي الخام بالجرع الثلاث زيادة معنوية في مستوى IFN-γ بعد الأسبوع الثاني والرابع من المعاملة عند مستوى احتمالية ($P\leq0.05$) مقارنة بالسيطرة اذ كانت معدلات مستوى IFN-γ بعد الأسبوع الثاني أبتداء من الجرعة الأولى حتى الثالثة (19.05 و 20.20 و 23.62) بيكوغرام/مل مقارنة بالسيطرة 12.60 بيكوغرام/مل كما في الشكل (2) ، أما المعدلات بعد الأسبوع الرابع فكانت أعلى وهي (22.96 و 24.81 و 25.93) بيكوغرام/مل على التوالي مقارنة بالسيطرة 12.67 بيكوغرام/مل . لم تؤثر المعاملة بالمستخلص بين الأسبوع الثاني والرابع في مستوى IFN-γ على الرغم من وجود زيادة في المعدلات لكنها لم تكن زيادة معنوية.وجد أن استعمال المستخلص الكحولي له تأثير في معدل مستوى IFN-γ بعد الأسبوع الثاني والرابع اذ كان التأثير معنوياً وبمستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) للأسبوع الثاني وخاصة للجرعة الثالثة حيث كان المعدل 20.85 بيكوغرام/مل مقارنة بالسيطرة 12.60 بيكوغرام/مل ، بمستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) للأسبوع الرابع اذ أظهرت الجرع الثلاث زيادة في المعدلات وهي (16.40 و 26.81 و 47.03) بيكوغرام/مل حيث كانت الزيادة طردية فكلما ازدادت الجرعة ازدادت معدلات مستوى IFN-γ لمقارنة بالسيطرة 12.67 بيكوغرام/مل كما في الشكل (3). وعند مقارنة المعدلات بين الأسبوع الثاني والرابع نجدها ازدادت معنوياً بمستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) للتركيز الثاني و بمستوى احتمالية ($P\leq0.01$) للجرعة الثالثة.



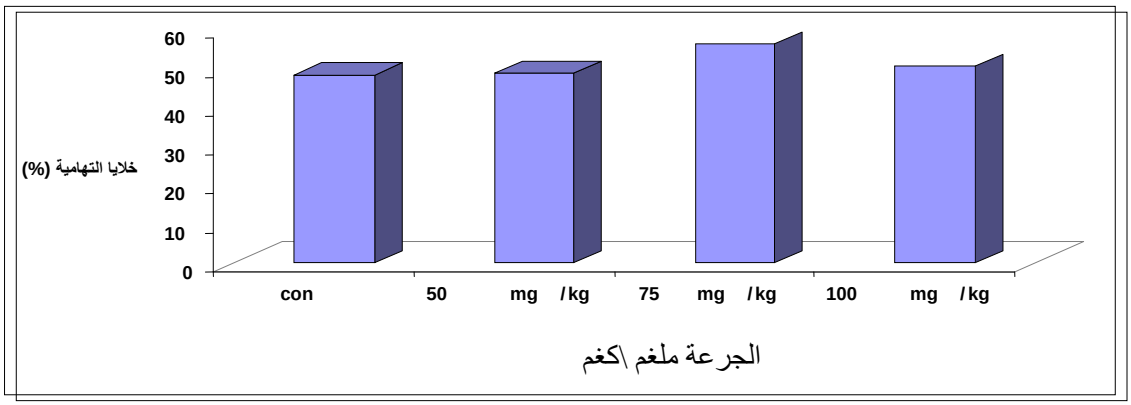
شكل (2): تأثير جرع مختلفة من المستخلص المائي الخام للفطر في مستوى IFN-γ للفئران بعد (2 ، 4) اسبوع من المعاملة.



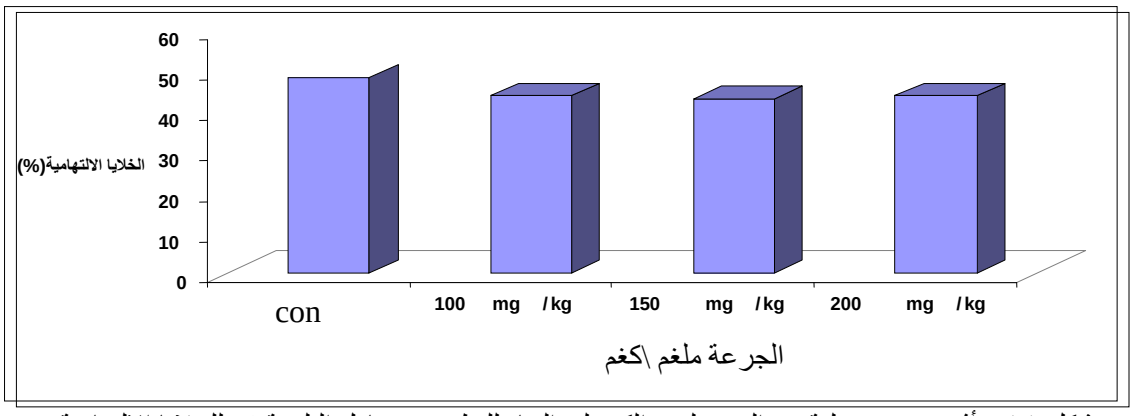
شكل (3): تأثير جرع مختلفة من المستخلص المائي الخام للفطر في مستوى IFN-γ للفئران المعاملة بعد (2 ، 4) اسبوع من المعاملة.

تأثير المستخلصين المائي والكحولي الخام للفطر في معامل البلعمة

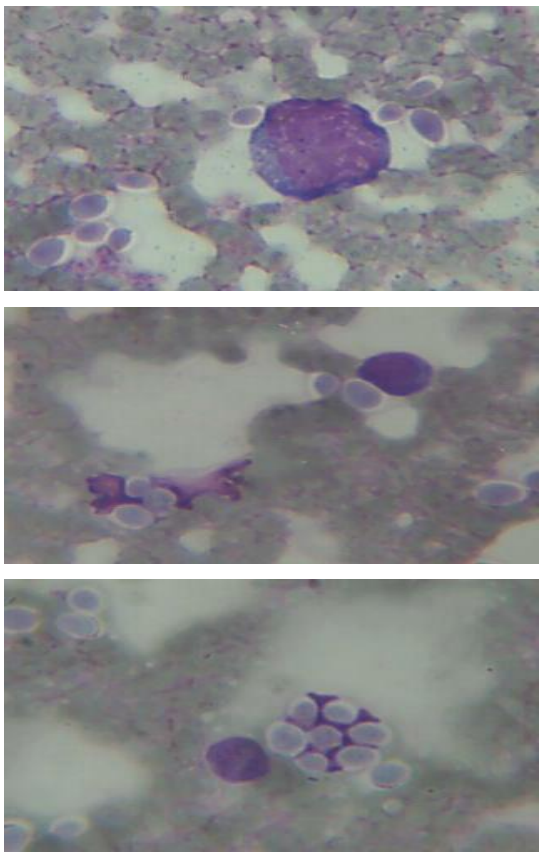
لقد تم اختيار جرع مختلفة من المستخلص المائي الخام لدراسة تأثيرها في وظائف بعض الخلايا المناعية مثل التهام الخميرة المقتولة في الزجاج (البلعمة) ، ومن خلال النتائج الموضحة في الشكل (4-5)، وجد أن الجرع المستعملة لم يكن لها تأثير معنوي في معامل البلعمة على الرغم من ان معدلات البلعمة للجرعتين (75 و 100) ملغم/كغم كانت مرتفعة وهي (56.19 و 50.50)% على التوالي مقارنة بالسيطرة 48.22% (صورة 2). لم تؤثر الجرع المستخدمة من المستخلص الكحولي الخام تأثيراً معنوياً في معامل البلعمة مقارنة بالسيطرة كما في الشكل (4) ، فقد كانت معدلات البلعمة للجرع الثلاث (43.70 و 43.04 و 43.80)% مقارنة بالسيطرة 48.22% (صورة 3). (43.68 و 43.04 و 43.76)% مقارنة بالسيطرة 48.22% (صورة3)



شكل (4):تأثير جرع مختلفة من المستخلص المائي الخام للفطر في معامل البلعمة % للخلايا الالتهامية الفأرية.



شكل (5): تأثير جرع مختلفة من المستخلص الكحولي الخام للفطر في معامل البلعمة % للخلايا الالتهامية الفأرية.



صورة (3): تبين التهام الخميرة المقتولة في الزجاج من الخلايا البلعمية بعملية البلعمة Phagocytosis بعد المعاملة بالمستخلصين المائي والكحولي الخام للفطر (Leishman stain X400).

المناقشة:

التأثيرات السمية الحادة Acute Toxicity Effect

يُعد هذا الاختبار من الفحوصات المهمة التي يجب القيام بها قبل إجراء التجارب التي تستعمل فيها الحيوانات المختبرية وذلك لاستبعاد الجرعة القاتلة التي تسبب موت الحيوان قيد الاختبار فضلاً عن الاعتماد عليها في اختبار الجرع العلاجية التي تستعمل في التجارب العلاجية.درس التأثير السمي الحاد للمستخلصين المائي والكحولي للعرهون وذلك من خلال تحديد الجرعة القاتلة الوسيطة (LD_{50}) ، فقد استعملت تراكيز عدة لمعرفة الجرعة القاتلة الوسطية والتي كانت (85، 277)ملغم/ كغم من وزن الجسم للمستخلصين المائي والكحولي الخام على الترتيب، وهي تعكس حقيقة أن هذين المستخلصين أمينان إذ ان العراهين من الأغذية الطبية لما لها من قيمة غذائية عالية في المجتمعات العالمية [18]. وقد شملت دراسة التأثيرات السمية للمستخلصين الخام في خلايا نخاع عظام الفئران، وأعتمد التأثير على الجرعة المستعملة فالمرتفعة منها سببت ارتفاعاً معنوياً في (MI) و(BI)عند المعاملة بالمستخلص المائي الخام الموضحة في الجدول (4)، في حين لم تظهر النتائج فرقاً معنوياً عند المعاملة بالمستخلص الكحولي في (MI), في حين سببت المعاملة ارتفاعا معنويا ($P\leq0.01$) في (BI) مقارنة بالسيطرة جدول (3). وقد بينت نتائج الدراسة أن المعاملة بالمستخلصين المائي والكحولي الخام لا يوجد لهما تأثير سمي في خلايا نخاع العظم في الفئران بل كان لهما تأثير محفز في زيادة هذه الخلايا. وقد أشاركل من[19]الى أن الفئران المعاملة فموياً بالمستخلص المائي للعرهون *Agaricus blazei* سبب زيادة معنوية في الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة T-helper (CD4) والخلايا اللمفاوية المسممة T-cytotoxic (CD8) في الطحال حيث كانت نسبتهما (40.3 ، 25.0)% على التوالي مقارنة بالسيطرة (29.4 ، 19.4)% على التوالي.

ان الوظيفة الأساسية للحركيات الخلوية هي تنظيم نشوء وسلوك الخلايا المناعية المؤثرة، اذ تنتج الانترفيرونات من خلايا الجهاز المناعي المتأصل والمتخصص وخاصة الخلايا التائية T-helper 1[20] ، ولكي تقوم هذه الخلايا بافراز IFN-γ يجب أن تنشط وان آلية التنشيط تتطلب الاستجابة الى محركات خلوية أخرى هي IL-2 [21].وأشار الباحث [19]الى أن الأجسام الثمرية المجففة للفطر *Calvatia craniiformis* ومستخلصاته قد استعملت بشكل واسع في الطب المكمل والبديل، فقد جرعت هذه المستخلصات للفئران المختبرية فموياً ، ووجد أنها تزيد من القدرة التسممية للخلايا القاتلة الطبيعية NK وزيادة انتاج IFN-γ من الخلايا الشجيرية Dendritic cell (DC) وفي انتاج انترلوكين (IL-12) وأن هذه الحركيات الخلوية نفسها تزيد من نشاط الخلايا القاتلةالطبيعية وبذلك فان لمستخلصات العرهون قابلية على تنشيط الجهاز المناعي من خلال تنشيطها لتكاثر الخلايا التائية اللمفاوية Th1 وافرازها IFN-γ. [22].

تأثير المستخلصين المائي والكحولي الخام للفطر في معامل البلعمة

من خلال نتائج دراسة تأثير المستخلصين الخام في وظائف الخلايا المناعية كالتهام الخميرة المقتولة في الزجاج، وجد أن المستخلصين المائي والكحولي الخام وبجرعهما الثلاث المستعملة لم يكن لهما تأثيراً معنوياً في معامل البلعمة على الرغم من أن معدلات البلعمة كانت مرتفعة مقارنة بالسيطرة شكل(3,4). ان عديد السكريات المستخلص من الفطر *Calvatia craniiformis* له قدرة عالية على تنشيط الخلايا البلعمية واللمفاوية التائية والقاتلة الطبيعية، كما يحث على انتاج الحركيات الخلوية مثل TNF-α والانترلوكينات سواء في التجارب التي أجريت في الزجاج أو في الأنظمة الحيوانية وقدرته على الارتباط بمستقبلات المتمم CR3 الموجودة على أغشية الخلايا البلعمية مسبباً زيادة كفاءتها في الالتهام [23].

المصادر :

1- Jiménez-Medina, E. ; Garcia-Lora, A. ; Paco, L. ; Algarra, I. ; Collado, A. and Garrido, F. 2006. A new extract of the plant Calendula officinalis produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer*, 6:119-132 .

2- Shen, Y.C.; Chou, C.J.; Wang, Y.H.; Chen, C.F.; Chou, Y.C. and Lu, M.K. 2004. Anti-inflammatory activity of the extracts from mycelia of *Antrodia comphorata* cultured with water-soluble fractions from five different *Cinnamomum species*. *FEMS Microbiol. Lett.*,:8(6)1-16.

3- 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.

4- Wasser, S. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulatin g polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 60: 258-274.

5- Motoi, M.; Goto, S. and Ohno, N. 2003. Structure and Antitumor activity of 1,3-β-glucan from cultivated fruit bodies of culinary – medicinal mushroom *Hypsizygus mamoreus* (Peck) Bigel. (Agaricomycetideae). *Inter. J. Medicinal Mushrooms*, 5: 247-259.

6- Zaidan,H. and Kagaku,K.1975.Production of anew antibiotic calvatic acid.J.Antibiotics,28(87-90).

7- 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 .

8- Ehrenberg, R. 2008.Fungi aid immune systems fight. *Science News*, 173(10):157

9- 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.

10- 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.

11-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.

12- Kubo, N. 2005. Protective effects of a water-soluble extract from cultured medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia and *Agaricus blazei murill* against x-irradiation in B6C3F1 mice: Induced small intestinal crypt survival and prolongation of average time to animal death. Int. J. Mol. Med., 15(3): 401-6.

13- 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 .

14- 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.

15- Dixon, W.J. 1980. Efficient Analysis of Experimental Observations. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*., 20: 441-62.

16- Verma, R.S. and Babu, A. 1989. Human chromosomes : Manual of Basic Techniques. Pregramon Press, New York.pp.240.

17- King, M.; Wild, D.; Gocke, E. and Eckhardt, K. 1982. 5-Bromo deoxy uridine tablets with improved depot effect for analysis *In vivo* of SCE, in bone marrow and spermatogonal cells. Mut. Res., 97: 7-9.

18- Wolff, S. and Rodin, B. 1978. Saccharin-induced sister chromatid exchange in chinese hamster and human cells. *Science*, 200: 543-5.

19- 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.

20- Stites, D. 2001. Medical Immunology, (9th ed.), McGraw-Hill Companies, USA. PP: 148-167.

23- Mueller, A.; Raptis, J.; Rice, A.J.; Kalbfleisch, J.H.; Stout, R.D.; Ensley, H.E.; Browder, W.; Williams, D.L. 2000. The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1-3)-beta –D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. *Glycobiology*, 10: 339-346.

21- Yuminamochi, E.; Koike, T.; Takeda, K.; Horiuchi, I. and Okumura, K.O. 2006. Interleukin-12 and interferon-γ mediated natural killer cell activation by *Agaricus blazei Murill*.*PMID*.,121:197-206.

22- Saijo, S.; Fujikado, N.; Furuta, T.; Chung, S.; Kotaki, H.; Seki, K. 2007. Dectin-1 is required for host defense against Pneumocystis carinii but not *Candida albicans*. *Nat. Immunol.*, 8 : 39–46.

Effect of aqueous and alcoholic extracts of Mushroom *Calvatia craniiformis* in bone marrow and interferon Gamma in mice

Ibrahim Hade Mohameed* ghassan Hamdan jamil**

*Collage of science .microbiology Dep. Diyala Unv.
**Collage of eduction. biology Dep. Diyala Unv.

Abstract:

This research was designed to study the effect of water and alcoholic crude extracts of *Calvatia craniiformis* in *vitro* and *in vivo* On the other hand this study tested the toxic effect of both extracts in normal laboratory mice. The results showed that water and alcoholic extracts relatively have an acute toxic effect in mice in respect to LD_{50} (85 mg/kg, and 177mg/kg respectively). However the chronic toxicity of water extract at three different concentration (50, 75, 100 mg/kg) and alcoholic extract at concentrations of (100, 150, 200 mg/kg) was investigated in normal mice by (I.P) administration for 30 days alternatively and one drag in 48 hours . The results indicated significant effect ($P \geq 0.01$) increasing in (MI) and (BI) of bone marrow cells and serum IFN-γ level. Also both extract caused inhibitory effect in each of (MI) and (BI), however they should significant increase ($P \geq 0.01$) in the serum level of IFN-γ but no significant in Phagocytosis and control.