

Anti-inflammatory effect of Water and Alcoholic Extracts of Mushroom *Agaricus bisporus* in mice

التأثير المضاد للالتهاب للمستخلصين المائي والكحولي الخام للعرهون في الفئران *Agaricus bisporus*

وفاء فوزي الموسوي * ، هشام علي مهدي **

- * فرع التحليلات المرضية /كلية الصيدلة/جامعة كربلاء/ كربلاء/ العراق ،
- ** متوسطة ثورة الحسين / مديرية تربية كربلاء / كربلاء / العراق
الاختصاص الدقيق: فسلجة حيوانية

الخلاصة

تمت دراسة تأثير المستخلصين المائي والكحولي الخام للعرهون *Agaricus bisporus* ضد الالتهاب المزمن المستحث بالفورمالين في الفئران باعطاء ثلاث جرعات هي 333.3 و 500 و 666.6 ملغم/كغم للمستخلص المائي والجرع 500 و 1000 و 1500 ملغم/كغم للمستخلص الكحولي وذلك عن طريق الحقن داخل الخلب (IP) - (Intra-Peritoneum) لمدة ستة ايام متتالية. وسببت المعاملة بالجرع المستخدمة للمستخلصين المائي والكحولي الخام تثبيطا معنوياً عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) في اختزال الانتفاخ الحاصل في سمك القدم وبنسبة 26 و 62 و 63% و 24 و 37 و 55 % على التوالي بالمقارنة مع 20% في الفئران المعاملة بالعقار القياسي (الدكلوفيناك 10 ملغم/كغم).

Summary

The effect of water and alcoholic crude extracts of mushroom *Agaricus bisporus* against formalin-induced chronic inflammation in mice was studied after intra peritoneal (I.P) administration of three doses at concentrations of 333.3, 500 and 666.6 mg/kg for water extract and three doses at concentrations of 500, 1000 and 1500 mg/kg for alcoholic extract were achieved for 6 consecutive days. The results indicated that all doses of water and alcoholic crude extracts revealed significantly reduction in paw thickness at ($P \leq 0.01$) in 26, 62 and 63 % and 24, 37 and 55 % respectively, in comparison with 20% in mice with a standard drug (diclofenac 10 mg/kg).

// المقدمة

اظهرت البحوث العلمية ان لمستخلصات العرهون خصائص وظيفية لعلاج العديد من الامراض كالربو(1) وحساسية الاغذية (2) والتهاب الجلد التحسسي (3) وبعض الامراض الالتهابية كروماتزم المفاصل (4) وتصلب الشرايين (5). لذلك اهتمت العديد من الدراسات بالفعالية البيولوجية المضادة للالتهاب لمستخلصات العرهون المختلفة سواء كانت مائية او كحولية او مستخلصات الكلوروفورم ولاكثر من نوع من انواع العرهون كعرهون *Morchella esculenta* (6) وعرهون *Ganoderma lucidum* (7) وذلك في ضوء اعتماد طراز استحداث الالتهاب المزمن والحاد في الفئران. وتم تقدير العديد من الفعاليات الحياتية للمستخلص الميثانولي الخام للعرهون *Pleurotus pulmonarius* ، اذ عد المستخلص مضادا للاكسده (Antioxidant) ومضادا للاورام ومضادا للالتهاب الحاد والمزمن باعتبار ان المواقع الالتهابية تعد بؤرا جيدة لانتاج الجذور الحرة والتي تعد سببا رئيسا من اسباب الاعتلال الجسمي (8)، فهو يسلك كمقتنص للجذور الحرة للهيدروكسيل (Hydroxyl radical) ومثبط لأكسدة الدهون (Lipid peroxidation) عندما استخدم بتركيز 476.67 و 960.0 مايكروغرام/مل ، في حين ان اعطائه بالتركيز 250 و 500 و 1000 ملغم / كغم من وزن الجسم سبب اضمحلالا معنوياً للاورام الصلبة، وللمستخلص فعالية مضادة للالتهاب عند اعطائه بالتركيزين 500 و 1000 ملغم/كغم من وزن الجسم من خلال اختزاله للانتفاخ (edema) الحاصل في سمك القدم للفئران المحقونه بالفورمالين بالمقارنة مع الدواء القياسي المضاد للالتهاب كالدكلوفيناك (9).

ويبقى سر الاهتمام بالعرايين الطبيعية هو لقدرتها المضادة للسرطان (10 و 11) إذ عد بعضها مصادر للادوية المضادة للسرطان (12) ، وان قدرة عرهون *Agaricus bisporus* المضادة للاكسده يمكن استخدامها وسيلة لتفسير قدرته المضادة للسرطان (13) و (14) وللعديد من الامراض العضوية الاخرى الناتجة عن فرط انتاج الجذور الحرة كمرض تشمع الكبد وتصلب الشرايين (15) ،

فضلا على العديد من الاعتلالات السريرية المختلفه كقفر الدم الموضعي (Ischemia) واحتشاء العضلة القلبية وروماتزم المفاصل وارتفاع ضغط الدم الحاد والتهاب الكبد الفيروسي (16) .
تعد العراهين من المصادر الممتازة لعنصر السلينيوم Se الذي يؤدي دوراً مهماً بوصفه مادة مضادة للاكسده إذ يقلل من مستويات الجذور الحرة المخربه للانسجه (17). وان اعطاء الاغذية الحاوية على Se للحيوانات المختبرية او الانسان قد اسهمت كثيراً في الاقلال من حدوث السرطانات سواء كانت تلقائية او مستحثه بالمسرطنات الكيماوية والفايروسية (18). فهو يستخدم ليس فقط للوقاية من الاصابة بالسرطان بل حتى في علاج بعض الاورام بصورة مباشرة (١٩) وذلك لقابليته على زيادة نشاط وفعالية انزيم جلوتاثيون بيروكسيداز (Glutathione peroxidase) الضروري في الانظمة المضادة للاكسده داخل الجسم (٢٠) . ان الهدف من البحث هو لمعرفة التأثير المضاد للالتهاب لكلا المستخلصين المائي والكحولي الخام للعرهون *Agaricus bisporus* في الفئران.

المواد و طرائق العمل //

أجريت الدراسة على فطر العرهون *Agaricus bisporus* الذي تم الحصول عليه من مزرعة الحميدية في محافظة الأنبار / العراق، إذ يتم انتاجه سنوياً من شهر تموز وحتى شهر تشرين الثاني.
اتبعت طريقة (21) في تحضير المستخلص المائي، وأعطت طريقة التحضير وزناً قدره 5 غم من 70 غم من العرهون الطري أي بنسبة استخلاص 7.14% ، وكان قوام المستخلص الناتج كثيفاً مع لزوجة قليلة ولون بني داكن مائل الى السواد.
وجرى تحضير المستخلص الكحولي الخام للعرهون باستخدام جهاز السكسوليت (Soxhlet) وعلى وفق الطريقة المتبعة في (22) ، وتم الحصول على مستخلص كحولي خام بوزن قدره 5 غم من 50 غم مسحوق العرهون أي بنسبة استخلاص 10% ، وكان المستخلص الناتج ذا قوام كثيف مائل الى اللزوجة وذا لون بني مصفر. وعند الحاجة الى استخدام احد المستخلصين تم تذويب 1 غرام من المستخلص الجاف في 10 مل من محلول دارى الفوسفات القاعدي (PBS) ، وخفف باستخدام المحلول نفسه وعقم من خلال ترشيحه بورق ترشيح Whatman No. 1 ، ثم يعاد ترشيحه وتعقيمه بمرشحات غشائية سعة 0.45 مايكروميتر و 0.22 مايكروميتر على التوالي، وعدّ هذا المحلول خزيناً (Stock solution) الذي حضرت منه باقي التخافيف.
كما تم تهيئة 32 فأراً ضرب Balb/c قسمت الى 8 مجاميع، ٤ فئران لكل مجموعة شملت المجاميع العلاجية ست مجاميع ومجموعة السيطرة ومجموعة العقار القياسي الدكلوفيناك (diclofenac) بتركيز 10 ملغم/كغم من وزن الجسم. تم اعطاء العلاج بالحقن داخل الخلب (IP) لمدة ستة ايام متتالية للجرع الثلاث لكل من المستخلص المائي الخام وهي 333.3 و 500 و 666.6 ملغم/كغم من وزن الجسم والكحولي وهي 500 و 1000 و 1500 ملغم/كغم من وزن الجسم وقد اختيرت الجرعة اعتماداً على الجرعة الوسطية المميته LD50 ، بحجم 0.3 مل لكل الجرعة ، بينما حقنت مجموعة السيطرة بمحلول دارى الفوسفات الملحي (PBS) .

وقيس سمك وسادة القدم اليمنى (Paw thickness) لكل حيوانات التجربة باستخدام اداة القدمة (Varnier calipers) وسجلت القراءات. ثم حقنت جميع الفئران 0.02 مل من محلول الفورمالين 2% داخل وسادة القدم اليمنى حسب (9) ، وبعد ساعة من الحقن. تم حقن الفئران بالجرع العلاجية الموضحة في اعلاه. ثم قيس سمك وسادة القدم بعد انتهاء مدة المعاملة. واستخرجت قيمة الفرق في سمك وسادة القدم بين القراءة قبل المعاملة (po) والقراءة بعدها (pt) وحسبت النسبة المئوية لتثبيط الالتهاب في سمك وسادة القدم اعتماداً على المعادلة الآتية (23) :

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط \%} = (1 - \frac{\text{ف}}{\text{س}}) \times 100$$

حيث إن:

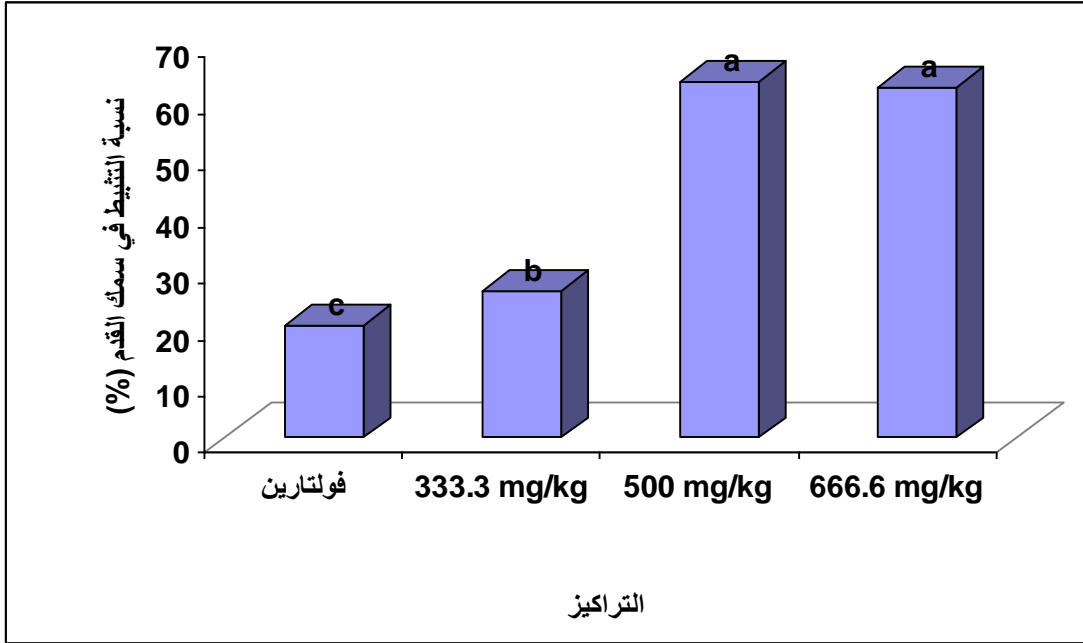
ف : يمثل الفرق في سمك وسادة القدم للمجاميع المعاملة.

س : يمثل الفرق في سمك وسادة القدم لمجموعة السيطرة.

كما حلت نتائج البيانات إحصائياً باستخدام التصميم العشوائي التام (CRD) من تجربة عاملية اشتملت على عاملين هما وقت المعاملة والتراكيز المختلفة للمستخلصين المائي والكحولي. ولتحليل نتائج البيانات احصائياً استخدم البرنامج الاحصائي الجاهز SPSS (24)، ولمعرفة الفرق بين المعاملات استخدم اختبار دانكن متعدد الحدود (25).

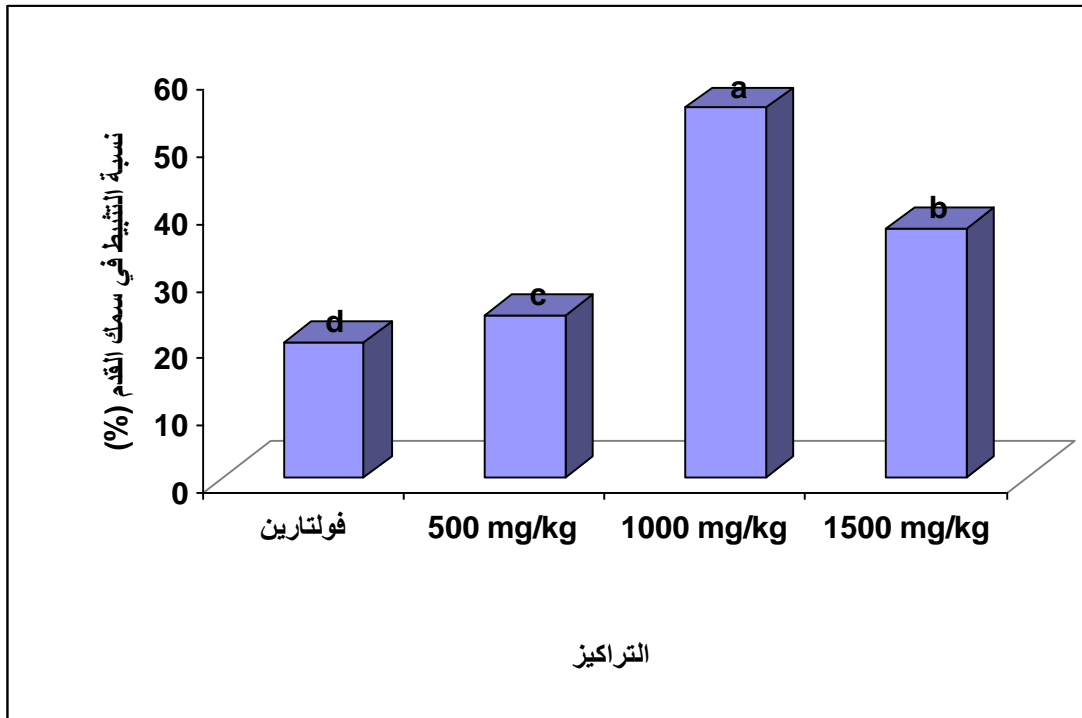
النتائج //

أدت المعاملة بالمستخلص المائي الخام الى حدوث تثبيط للالتهاب المزمن مما سبب تقليص الانتفاخ الحاصل في سمك القدم بنسبة 26 و 62 و 63% للتراكيز 333.3 و 500 و 666.6 ملغم/كغم بالمقارنة مع عقار الدكلوفيناك 20% ، إذ كان التثبيط في سمك القدم معنوياً عند مستوى احتمالية (P≤0.01) شكل (1).



شكل (١): تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي الخام للعرهون في الالتهاب المزمن المستحث بالفورمالين في الفئران. - الأحرف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$).

كما أظهرت نتائج قياس سمك القدم للفئران المعاملة بالمستخلص الكحولي الخام والموضحة في الشكل (2) وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) في تثبيط الانتفاخ الحاصل في سمك القدم وخاصة في التركيزين 1500 و 1000 ملغم/كغم إذ كانت نسبة التثييط 55 و 37% على التوالي بالمقارنة مع عقار الدكلوفيناك 20% بينما أظهر التركيز 500 ملغم/كغم أقل نسبة تثبيط لسمك القدم بلغت 24%.



شكل (٢): تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي الخام للعرهون في الالتهاب المزمن المستحث بالفورمالين في الفئران. - الأحرف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$).

// المناقشة //

يتضح من النتائج المثبتة في شكل ١ و ٢ ان لمستخلصات العرھون فعالية واضحة ضد الالتهاب المزمن المستحث بالفورمالين وبنسبة تثبيطية تضاهي قدرة اكثر العقارات المضادة للالتهاب شيوعا الا وهو الفولتارين. إذ ان طبيعة الالتهاب المزمن المتسبب عن الحقن بالفورمالين تعطي علامات مشابهة لعلامات التهاب المفاصل (26) وقد يعزى السبب في ذلك الى ان تأثير الفورمالين في احداث الالتهاب يتألف من استجابتين الاولى استجابة مبكرة متمثلة في تحرر الهستامين والسيروتونين والكاينينات كوسائط التهابية والاخرى استجابة متأخرة متمثلة بتحرير البروستوكلاندينات (27) لذلك فان هذه المستخلصات لابد ان تحتوي على المكونات او المركبات القادرة على التداخل في انتاج الوسائط الالتهابية، ففي دراسة مماثلة وجد ان التأثير المضاد للالتهاب لمستخلص عرھون *Phellinus linteus* يعود لقابليته على تنشيط الية الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis) في خلايا البلاعم والخلايا اللمفاوية النشطة من خلال تقليل انتاج $TNF-\alpha$ (28) Tumor necrosis factor في حين اظهرت دراسة اخرى ان قابلية مستخلصات العرھون في كبح الالتهاب تكون ناجمة عن تثبيط انتاج البروستوكلاندينات مما يؤدي الى تثبيط انتاج العديد من الوسائط الالتهابية (29) وقد وجد في حالات اخرى ان مستخلصات العرھون لها القابلية على تثبيط انتاج اول اوكسيد النيتروجين (NO) وبروستوكلاندين (PEG2) Prostaglandin E2 و $IL-1\beta$ و $TNF-\alpha$ وهذه كلها تعدّ وسائط التهابية اساسية في احداث الالتهاب (30) ، وان الفعل المضاد للالتهاب الذي اظهرته مستخلصات العرھون ناتج عن قدرتها على التداخل في عملية التعبير الجيني للجينات المسؤولة عن انتاج مثل هذه الوسائط (31 و32) . ان انتاج جذور الاوكسجين النشطة (ROS) المتمثلة بجذور O_2 و H_2O_2 و OH وتواجدها في موقع الالتهاب يسبب التلف النسيجي (33) ، لذلك فان قابلية اي مادة على تثبيط او اختزال عملية توليد الاشكال النشطة من الاوكسجين (ROS) ستعطي بالتاكيد قابلية عالية مضادة للالتهاب ، فقد وجد ان عرھون *Phellinus linteus* يمتلك فعالية مضادة للاكسدة والالتهاب والاورام من خلال قدرته على تقليل توليد مثل هذه الجذور الحرة (34 و35) .

بينت دراسات التحليل الكيميائي لمكونات مستخلصات العرھون *Ganoderma lucidum* ان الجزء الاساسي والفعال هي مجموعة التربينويد (terpenoids) وخاصة ثلاثي التربينويد (Triterpenoids) و عديد السكريات (polysacchrides) (36) الموجودة في مستخلص العرھون هي المسؤولة عن الفعل المضاد للاكسدة والالتهاب ولذلك اصبح هذا المكون يسوق تجاريا لفعاليته المضادة للالتهاب (37) .

ونظرا لنسب التثبيط العالية التي اباهاها مستخلصا العرھون *Agaricus bisporus* المائي والكحولي في تثبيط الالتهاب يجعلهما جديرا بالاهتمام واستكمال دراسات التحليل الكيميائي عليهما لمعرفة الاجزاء الفعالة منهما وامكانية تسويقها كمواد مضادة للالتهاب.

References

1. Liu, Y.H.; Kao, M.C.; Lai, Y.L. and Tsai, J.J.(2003). Efficacy of local nasal immunotherapy for Dp2-induced airway inflammation in mice: using Dp2 peptide and fungal immunomodulatory peptide. J Allergy Clin Immunol. ;112(2):301–310.
2. Hsieh, K.Y.; Hsu, C.I.; Lin, J.Y.; Tsai, C.C. and Lin, R.H.(2003). Oral administration of an edible-mushroom-derived protein inhibits the development of food-allergic reactions in mice. Clin Exp Allergy.;33(11):1595– 1602.
3. Kuo, Y.C.; Huang, Y.L.; Chen, C.C.; Lin, Y.S.; Chuang, K.A. and Tsai, W.J.(2002). Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulated by *Agaricus blazei*. J Lab Clin Med.;140(3):176–187.
4. Kim, G.Y.; Kim, S.H.; and Hwang, S.Y.(2003). Oral administration of proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* in the prevention and treatment of collagen induced arthritis in mice. Biol Pharm Bull.; 26(6):823–831.
5. Yamada, T.; Oinuma, T. and Niihashi, M.(2002). Effects of *Lentinus edodes* mycelia on dietary-induced atherosclerotic involvement in rabbit aorta. J Atheroscler Thromb.;9(3):149– 156.
6. Nitha,B.; Meera,C.R. and Janardhanan,K.K.(2007). Anti-inflammatory and antitumour activities of cultured mycelium of morel mushroom, *Morchella esculenta*. Current Scie.,92(2): 235-239.
7. Joseph, S.; Sabulal,B.; George, V.; Smina, P. T.; Janardhanan, K. K.(2009). Antioxidative and Antiinflammatory Activities of the Chloroform Extract of *Ganoderma lucidum* Found in South India. Sci. Pharm., 77: 111–121.

8. Izawa, S. and Inoue, A. (2004). A screening system for antioxidants using thioredoxin-deficient yeast: discovery of thermostable antioxidant activity from *Agaricus blazei* Murill. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 64(4): 537-42.
9. Jose, N.; Ajith, T.A. and Jananrdhanan, K.K. (2002). Antioxidant, Anti-inflammatory, and Antitumor Activities of Culinary-Medicinal Mushroom *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel. (*Agaricomycetidae*). *International Journal of Medicinal Mushroom*, 4: 329-335.
10. Takimoto, H.; Wakita, D.; Kawaguchi, K. and Kumazawa, Y. (2004). Potentiation of cytotoxic activity in naive and tumor-bearing mice by oral administration of hot-water extracts from *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Biol. Pharm. Bull.*, 27: 404-6.
11. Lee, Y.L.; Kim, H.J.; Lee, S.M. and Kim, M.J. (2003). Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. *Exp. Anim.* 52(5): 371-375.
12. 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.*, 231: 137-143.
13. Ker, Y.B.; Chen, K.C.; Chyau, C.C.; Chen, C.C.; Guo, J.H.; Hsieh, C.L. (2005). Antioxidant capability of polysaccharides fractionated from submerge-cultured *Agaricus blazei* mycelia. *J. Agric. Food Chem.*, 53 : 7052–8.
14. Huan, S. J. and Mau, J. L. (2006). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of irradiation. *Food Sci Technol.*, 39 : 707–16.
15. Halliwell, B. and Gutteridge, J.C. (1995) The definition and measurement of antioxidant in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.*, 18:125.
16. Kawamura, M. (2005). Antithetical effects of hemicellulase treated *Agaricus blazei* on the maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology*, 114(3): 397-409.
17. Bobek, P.; Galbavy, S.; Ozdin, L. (1998). Effect of Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on pathological changes in dimethyl- hydrazine induced rat colon cancer. *Oncol. Rep.*, 30, 5(3): 727-30.
18. Garewal, H. (1995). Beta-Carotene and antioxidant nutrients in oral cancer prevention. In Prasad, K.N.; Santamaria, L.; Williams, R.M. (eds.): Human Press, PP: 235-247.
19. Spallholz, J.E. (2001). Selenium and the prevention of cancer. Part I: Evidence for the carcinostatic Activity of Se compounds. *Food and Nutrition*, Texas Tech. University. www.stda.be.
20. Spolar, M.R.; Schafter, E.M.; Beelman, R.B. and Milner, J.A. (1999). Selenium enriched *Agaricus bisporus* mushrooms suppress 7,12-dimethyl benzo [a] anthracene bioactivation in mammary tissue. *Cancer Letters*, 138: 145-150.
21. 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.
22. 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 inoculation model. *Exp. Anim.* 52(5): 371-375.
23. Jone, S. and Jananrdhanan, K.K. (2000). Antioxidant and Antitumor activity of *Ganoderma lucidum* (Curtifr.) P. Karstreishi (*Apyllophoromycetidae*) from south India. *Int. J. Med. Mushr.*, 2: 195-200.
24. SPSS, (1998). *Statistical package for social science. User's Guide for statistics.*
25. Duncan, B.D. (1955). Multiple range and multiple F-test. *Biometrics*, 11: 1-42.
26. Greenwald, R.A. (1991). Animal model for evaluation of arthritic drugs. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*; 13: 75.
27. Vane, J. and Booting, R. (1987). Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *FASEB J.*; 1: 89–96.

28. Lo, T.N.; Almeida, A.P. and Beaven, M.A.(1982). Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indometacin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; 21: 221–261.
29. Jin, M.; Jung, H.J. and Choi, J.J.(2003). Activation of selective transcription factors and cytokines by watersoluble extract from *Lentinus lepideus*. *Exp. Biol.Med.* (Maywood).;228(6):749–758.
30. Lull,C.; Wichers,H.J. and Savelkoul,H.F.J. (2005).Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Med. Inflam.*2:63-80.
31. Duncan, C.J.; Pugh, N.; Pasco, D.S. and Ross, S.A.(2002). Isolation of a galactomannan that enhances macrophage activation from the edible fungus *Morchella esculenta*. *J Agric Food Chem.*;50(20):5683–5685.
32. Kim, S.H.; Song, Y.S.; Kim, S.K.; Kim, B.C.; Lim, C.J.; Park, E.H. (2004). Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the n-BuOH subfraction of mushroom *Phellinus linteus*. *J Ethnopharmacol.* Jul; 93(1):141-6.
33. Salvemini, D.; Wang, Z.Q.; Bourdon, D.M.; Ster, M.K.; Currie,M.C. and Manning,P.T.(1996).Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan induced rat paw oedema. *Eur.J.Pharmacol.*,303,217.
34. Jose, N.; Ajith, T.A. and Jananrdhanan, K.K. (2002). Antioxidant, Anti-inflammatory, and Antitumor Activities of Culinary-Medicinal Mushroom *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel. (*Agaricomycetidae*). *International Journal of Medicinal Mushroom*, 4: 329-335.
35. Park, Y.M.; Won, J.H.; Kim, Y.H.; Choi, J.W.; Park, H.J.; Lee, K.T.(2005). In vivo and in vitro anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Inonotus obliquus*. *Oct* 3;101(1-3):120-8.
Russell, R. and Paterson, M.(2006). *Ganoderma – A therapeutic fungal factory.* *Phytochemistry.*; 67: 1985–2001.
36. Zhou, Z.; Lin, J.; Yin, Y.; Zhao, J.; Sun, X. and Tang, K.(2007). *Ganodermataceae: Natural products and their related pharmacological functions.* *Amer. J. Chin. Med.*; 35: 559–574.