T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AGARICUS BLAZEI MURRIL'NİN İNSAN RESPİRATUVAR SİNSİTYAL VİRUSU'NA KARŞI IN VITRO ANTİVİRAL AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hadeel Abduljabbar Abbas AL-MAFRACHİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalını

Ağustos-2018
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AGARICUS BLAZEI MURRIL'NİN İNSAN RESPİRATUVAR SİNSİTYAL VİRUSU'NA KARŞI IN VITRO ANTİVİRAL AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hadeel Abduljabbar Abbas AL-MAFRACHİ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN

2018, 71 Sayfa

Jüri
Danışman: Prof. Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN
ÜYE: Prof.Dr. Birol ÖZKALP
ÜYE: Prof.Dr. Rüstem DUMAN

Bu çalışma, yaygın bir kullanımı olan Dünya'da, özellikle Asya ülkelerinde tıbbi amaçlar için tüketilen *A. blazei*'den elde edilen metanol ve su ekstraktlarının anti-RSV aktivitesini incelemek amacıyla yapılmıştır. Ekstraktlar kolorimetrik XTT testi aracılığıyla test edilmiştir. Virusun neden olduğu sitopatik etkilere karşı % 50 koruma sağlayan konsantrasyon EC_{50} olarak tanımlanmış ve % 50 hücresel sitotoksisite konsantrasyonunu gösteren CC_{50}'nin EC_{50}'ye oranı olarak da seçicilik indeksi (SI) belirlenmiştir.

Test sonuçları, *A. blazei* metanol ekstraktının (EC_{50}: 5692.31 µg/ml and SI: 3.81) ve su ekstraktının (EC_{50}: 4433.28 µg/ml and SI: 10.85) RSV'ye karşı pozitif kontrol olarak kullanılan ribavirin (EC_{50} = 4.19 µg/ml, SI = 27.92) kadar olmasa da, önemli sayılabilecek anti-RSV aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Hücre sitotoksisite testi, test edilen ekstraktların her ikisinin de, EC_{50} değerlerinden daha yüksek CC_{50} değerlerine sahip olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak, her iki ekstraktın da RSV'ye karşı klinikte yaygın olarak kullanılan ribavirine karşı alternatif olarak geliştirilebilmeleri için daha ileri çalışmalara layık olduğunu söyleyebiliriz. Bu çalışma, *A. blazei*'nin anti-RSV aktivitesine yönelik ilk rapordur.

Anahtar Kelimeler: *Agaricus blazei* Murril, metanol ekstraktı, su ekstraktı, anti-RSV aktivite

ABSTRACT

MS THESIS

EVALUATION OF *IN VITRO* ANTIVIRAL ACTIVITY OF *AGARICUS BLAZEI* MURRIL AGAINST HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS

Hadeel Abduljabbar Abbas AL-MAFRACHİ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY

Advisor: Prof. Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN

2018, 71 Pages

Jury

Advisor: Prof. Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN

Member: Prof.Dr. Birol ÖZKALP

Member: Prof.Dr. Rüstem DUMAN

This study was conducted to investigate the anti-RSV activity of crude methanol and aqueous extracts obtained from *Agaricus blazei* Murrill which is used for medicinal purpose in the World, especially in Asian countries. Extracts were tested by means of the colorimetric XTT assay. The EC_{50} was defined as the concentration required to achieve 50% protection against virus-induced cytopathic effects, and the selectivity index (SI) was determined as the ratio of CC_{50} (concentration of 50% cellular toxicity) to EC_{50}.

Results showed that methanol extract of *Agaricus blazei* (EC_{50}: 5692.31 µg/mL and SI: 3.81) and its aqueous extract (EC_{50} = 4433.28 µg/mL and SI = 10.85) had anti-RSV activity in comparable rates to ribavirin (EC_{50} = 4.19 µg/mL, SI = 27.92) used as a positive control against RSV. The cell cytotoxicity test showed that both of the extracts tested had higher CC_{50} values than the EC_{50} values.

As a result, we can say that both extracts deserve further study in order to be developed as an alternative to ribavirin, which is commonly used clinically against RSV. This is the first report on the anti-RSV activity of *A. blazei*.

Key Words: *Agaricus blazei* Murril, methanolic extract, aqueous extract, anti-RSV activity

ÖNSÖZ

Çalışmamızın deneysel aşamasında katkılarından dolayı Danışmanım Prof.Dr. Hasan Hüseyin Doğan'a, Prof. Dr. Rüstem Duman'a ve yüksek lisans öğrencisi Pınar Tuncer'e, ayrıca **18201016** no'lu projemizi destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Hadeel Abduljabbar Abbas AL-MAFRACHİ

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **4**

2.1. İlaç Keşfinde Doğal Ürünlerin Rolü 4

2.2. Biyoaktif Bileşiklerin Kaynağı Olarak Mantarlar 5

2.3. Mantarların Tıbbi Özellikleri 6

2.4. *Agaricus blazei*'nin Tıbbi Özellikleri 8

2.5. *Agaricus blazei*'den Elde Edilen Maddelerin Biyoktivitesi ve Tıbbi Özellikleri 10

2.5.1. Antikanser etkileri 10

2.5.2. Antiviral aktivite 16

2.6. Respiratuvar sinsityal virus (RSV) 18

3. MATERYAL VE METOT **21**

3.1. Materyal 21

3.1.1. Mantar materyali 21

3.1.2. Hücre ve virus 21

3.1.3. Besiyerleri ve solüsyonlar 21

3.2. Metot 23

3.2.1. Ekstraktların hazırlanması 23

3.2.2. Ribavirin stok solüsyonunun hazırlanması 23

3.2.3. Trypan blue solüsyonunun (% 0.4'lük) hazırlanması 24

3.2.4. Hücre kültürlerinin hazırlanması 24

3.2.5. Stok virus süspansiyonlarının hazırlanması 24

3.2.6. Virus titrasyonu 25

3.2.7. Sitotoksisite testi 29

3.2.8. Antiviral aktivite testi 32

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI **36**

4.1. Virus Titrasyonu 36

4.2. Sitotoksisite Testi Sonuçları 37

4.3. Antiviral Aktivite Testi Sonuçları 41

5. TARTIŞMA **46**

6. SONUÇ VE ÖNERİLER **49**

7. KAYNAKLAR 50

SİMGELER

dk : Dakika

g : Gram

l : Litre

mg : Miligram

mg/ml : Miligram/Mililitre

ml : Mililitre

mm : Milimetre

µg : Mikrogram

µg/ml : Mikrogram/Mililitre

µl : Mikrolitre

µm : Mikrometre

nm : Nanometre

rpm : Revolutions per minute

°C : Santigrat Derece

U : Ünite

U/ml : Ünite/Mililitre

% : Yüzde

Kısaltmalar

ACV : Asiklovir

ACVK : Asiklovir Kontrol

AIDS : Acquired Immunodeficiency Syndrome

ATCC : American Type Culture Collection

CPE : Sitopatolojik Etki

$DKİD_{50}$: Doku Kültürü İnfektif Doz_{50}

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : Dimetil Sülfoksit

EC_{50} : %50 Etkili Konsantrasyon

EDTA : Etilen Diamin Tetraasetik Asit

FBS : Fetal Bovine Serum

GM : Growth Medium (Üretme Vasatı)

HIV : Human Immunodeficiency Virus

HK : Hücre Kontrol

HSV : Herpes Simplex Virus

HSV-1 : Herpes Simplex Virus Tip 1

ME : Metanol Ekstraktı

MM : Maintenance Medium (İdame Vasatı)

MNTK : Maksimum Non-Toksik Konsantrasyon

OD : Optik Dansisite

PBS : Phosphate Buffered Saline

PMS : N–methyl Dibenzopyrazine Methyl Sulfate

SD_{50} : %50 Sitotoksik Konsantrasyon

SE : Su Ekstraktı

Sh : Standart Hata

SI : Seçicilik İndeksi

Vero : African Green Monkey Kidney

VK : Virus Kontrol

WHO : World Health Organization

XTT : 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide

1. GİRİŞ

Virusların neden olduğu akut respiratuvar enfeksiyonlar, dünyanın her yerinde çocuklarda morbidite ve mortalitenin başlıca sebebidirler. Respiratory syncytial virus (RSV), bebeklerde, genç çocuklarda ve hatta erişkinlerde bile pnömoni ve bronşiyolitin en önemli sebebidir **(Hruska ve ark., 1982; Treanor ve Falsey, 1999)**. RSV, bağışıklığı baskılanmış populasyonlarda tahripkâr da olabilmektedir **(Wyde, 1998).** Ayrıca, tekrarlayan enfeksiyonlar, doğal olarak kazanılmış bağışıklığın uzun süreli koruma sağlamadığını gösteren yaygın bir olgudur **(Dubovi ve ark., 1981)**. RSV'ye etkili aşı geliştirme çalışmaları başarısız olmuştur **(CHIN ve ark., 1969; Wyde, 1998).** Kaldı ki, bu aşılardan birisi kabul görse bile, bu aşı, RSV'ye duyarlı bazı populasyonlarda, örneğin, çok küçük bebeklerde ve bağışıklığı baskılanmış bireylerde uygun olmayabilmektedir **(Wyde, 1998).** Ribavirin ve yüksek titreli RSV-spesifik nötralizan antikorları içeren immunglobulinler, günümüzde RSV enfeksiyonlarının tedavisi ve önleniminde kullanımları kabul görmüş antivirallerdir **(Kneyber, 2000)**. Bununla birlikte, bunların her ikisi de ucuz ve tatbiki kolay olmayan preparatlardır. Ribavirin'in intravenöz yolla verildiğinde miyelositotoksik olduğu bildirilmiş ve bu nedenle de sadece küçük aerosol partiküller halinde kullanımına izin verilmiştir **(Smith ve ark., 1991; Lewinsohn ve ark., 1996)**. İlaçların hastalara, özellikle bebeklere ve çocuklara aerosol uygulanması, evde beceriyle kullanılması ve kontrolü bakımından oldukça güçlük göstermekte ve bu nedenle de hastaların kemoterapi için hastanelere gitmesi gerekmektedir. RSV'nin önlenimi için kullanılabilir aşının olmayışı ve sadece şiddetli enfeksiyonlarda kullanılan tek bir antiviral etkenin (ribavirin) bulunması, çocuk hekimliğinde hala sorun teşkil etmektedir. Bu yüzden, oral veya parental olarak uygulanabilen özgün anti-RSV ilaçların geliştirilmesi gerekmektedir **(Ma ve ark., 2002)**.

Doğal ürünlerin öncü moleküllerin önemli bir kaynağı olduğu kanıtlanmış ve antiviral aktivitesi olan bitki veya mantar orijinli pek çok ekstrakt ve bileşik bildirilmiştir **(Ma ve ark., 2002; Kitazato ve ark., 2007)**.

Agaricus blazei, uzun yıllardan beri, Brezilya'nın güneydoğusundaki, doğal habitatı olan Sao Paulo'daki dağlık bölgede geleneksel olarak fonksiyonel bir gıda olarak kullanılmış olan Brezilya orijinli bir mantardır **(Mizuno, 1995)**. Öne sürülen tıbbi etkileri nedeniyle Japonya'ya getirilmiş ve günümüzde Asya ülkelerinde kanserin önlenmesi ve tedavisinde doğal bir terapi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır **(Firenzuoli ve ark., 2008)**. *Agaricus blazei*, işlenmiş/kısmen tanımlanmış gıda ekstraktifi olarak tanımlanan, diyet takviyesi olarak kapsüller veya tabletler şeklinde tüketilen bir terim anlamına gelen nutrasötik olarak Japonya'da son derece popülerdir **(Chang ve Buswell, 1996)**. Mantar nutrasötikleri, Çin ve Japonya'da yaygın olarak kullanılmakta ve dünyanın birçok başka ülkesine ihraç edilmektedir. İnternette *Agaricus blazei* terimine yönelik yapılacak basit bir araştırma, esas olarak tabletler şeklinde ya da toz şeklinde kurutulmuş bazidyokarpları içeren çay formunda veya sıvı ekstraktlar şeklinde olmak üzere, bu *Agaricus blazei* nutrasötiklerini pazarlayan düzinelerce web sitelerine rastlamak mümkündür. *Agaricus blazei*'nin cilt onarımına yardımcı olma, kollajen üretimine yardımcı olma veya cinsel eroksiyon kusurunu iyileştirme yetenekleri gibi, bu ürünler hakkında yapılan bazı terapötik iddiaların çok az bilimsel temeli vardır. Bununla birlikte, *Agaricus blazei*'nin kanseri tedavi etme ve bağışıklık sistemini uyarabilme iddiaları, son 30 yılda gerçekleştirilen bilimsel araştırma sonucunda doğrulanmıştır **(Tilmanis, 2010).**

A. blazei bazidyokarplarından elde edilen polisakkaridlerin ve polisakkarit-protein komplekslerinin antikanser etkileri üzerine çok sayıda araştırma yapılmış ve antikanser aktivite iddialarını desteklemeye yönelik azımsanmayacak sonuçlar elde edilmiştir. *A. blazei* polisakkaritlerinin, farelerde Sarkoma 180 ve Meth A fibrosarkom gibi, sarkomlar veya bağ doku kanserleri dâhil olmak üzere bir dizi tümörlere karşı *in vivo* etkili olduğu bulunmuştur **(Kawagishi ve ark., 1989; Kawagishi ve ark., 1990; Mizuno ve ark., 1990; Itoh ve ark., 1994; Fujimiya ve ark., 1998b; Ohno ve ark., 2001; Gonzaga ve ark., 2009)**. Ayrıca, polisakkaritlerin, Ehrlich ascites karsinomu ve Shionogi karsinomu gibi epitelyal hücreleri etkileyen bir dizi fare modeli karsinomu ve kanserine karşı aktif oldukları da bildirilmiştir **(Ito ve ark., 1997).**

Buna ilaveten, insanlarda yapılan klinik çalışmalar, *A. blazei*'nin kemoterapinin istenmeyen yan etkilerini hafifletebileceğini göstermiştir **(Ahn ve ark., 2004).**

A. blazei bazidyokarpları aynı zamanda bir dizi tümör hücrelerine karşı sitotoksisite sonuçları ile birlikte **(Fujimiya ve ark., 1999)**, **(Liu ve ark., 2006)**, **(Chan ve ark., 2007)**, **(Kim ve ark., 2009)** *in vitro* kanser hücreleri üzerine bir etki de göstermiştir. Gözlemlenen sitotoksik aktiviteye yönelik etki tarzının, apoptozun indüklenmesine bağlı olduğu bildirilmiştir **(Liu ve ark., 2006; Kim ve ark., 2009)** *A. blazei*'nin antikanser etkileri aynı zamanda *in vitro* etkileri bildiren pek çok çalışma ile, immünomodülasyon etkilerine de atfedilmiştir **(Sorimachi ve ark., 2001a; Hashimoto ve ark., 2002; Kuo ve ark., 2002; Yuminamochi ve ark., 2007).** Bu çalışmaların birçoğu, aktif bileşeni tespit edilmemiş olan *A. blazei* ekstraktlarını kullanarak yapılmıştır **(Tilmanis, 2010)**.

Çok yakın geçmişte, *A. blazei*'nin antimutajenite **(Martinez, 2003; Guterrez ve ark., 2004; Angeli ve ark., 2006)** ve antioksidan aktivitesi **(Ker ve ark., 2005; Lou ve ark., 2007; Soares ve ark., 2009)** gibi diğer tıbbi etkileriyle ilgili artan bir sayıda çalışma vardır.

Ayrıca, bu mantar türünden elde edilen kaba ekstrakt ve düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerin western equine encephalitis virus (WEE), herpes simplex virus (HSV), polio virus ve hepatit C virusları gibi DNA ve RNA viruslarına karşı antiviral etkiye sahip olduğu bildirilmiştir **(Sorimachi ve ark., 2001b; Grinde ve ark., 2006; Faccin ve ark., 2007)**. Ancak, *A. blazei*'nin bir RNA virusu olan RSV'ye karşı antiviral aktivitesi konusunda hiç çalışma yapılmamıştır. Dolayısıyla, çeşitli farmakolojik ve biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinen bu mantar türünün RSV'ye karşı da etkili olabileceği düşünülerek ve de özgün anti-RSV ilaçları geliştirme çabalarına katkıda bulunmak amacı ile bu araştırma planlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. İlaç Keşfinde Doğal Ürünlerin Rolü

Doğal ürünler ilaç keşfi sürecinde, özellikle kanser ve enfeksiyöz hastalık tedavisi alanlarında önemli bir rol oynamış ve oynamaya devam etmektedirler **(Cragg ve ark., 1997)**. Özellikle son otuz yılda, bitkisel ilaç endüstrisinde ve hastalıkların tedavisinde doğal ürünlerin kullanımında bir artış görülmüştür **(Hamburger ve Hostettmann, 1991)**. Bu ilgiye yönelik uyartı, geleneksel tıbbi sistemlerin tanınması olmuştur; çünkü, bu tür doğal ürünlerin pek çok kaynağı, tabiatı gereği tarihe geçmiş veya folklordan bilinmektedir **(Pandey, 1998)**. En dikkat çekeni bitkiler ve bitksel ürünler olmak üzere, doğal ürünlerin kaynakları uçsuz bucaksızdır. Ağaç kabuğundan, yapraklarından, sebzeler ve Çin ve Hint şifalı bitkilerinden elde edilen bileşiklerin bir dizi hastalık ve rahatsızlığın tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir **(Pandey, 1998)**. Etkili yeni ilaçlara yönelik sürekli bir araştırma olması ve şu anda mevcut olan ilaçlara karşı direnç gösteren patojen mikroorganizmaların sayısının artmasına bağlı olarak yeni yaklaşımlara gereksinimden dolayı, doğal dünyanın muazzam biyoçeşitliliği keşfedilmeyi bekleyen yeni ilaçlar için büyük bir kullanılmamış rezervuarı temsil etmektedir **(Farnsworth, 1995.).**

Birçok yararlı ilaç, doğal ürünlerin taranması yoluyla elde edilmiştir **(Shu, 1998)**. Doğal kaynaklardan elde edilen orijinal bileşiklere ilaveten, etkinliği arttırmak veya yan etkileri veya toksisiteyi azaltmak amacıyla doğal ürünlerde yapılan modifikasyonlar, 19. yüzyılın sonlarında önemli bir odak noktası haline gelmiş ve bu strateji günümüzde de devam etmektedir **(Sneader, 1985; Newman ve ark., 2003).** Örneğin, aspirin, bu kimyasal olarak modifiye edilmiş doğal ürünlerin en eskilerden biriyken, tanınmış tıbbi bitkilerden türetilen diğer önemli bileşikler bugün hala yüksek kullanımda olan morfin, atropin ve kodein gibi alkaloidleri içermektedir **(Foye, 1995; Clark, 1996)**. Her yıl piyasaya sürülen ortalama iki veya üç antibiyotiğin mikroorganizmalardan türetildiğini bildirilmiştir. **Newman ve Cragg,**

(2007), 1981-2006 dönemi boyunca tıbbi endikasyonları olan yeni tescil edilmiş kimyasal maddelerin (çok sayıda ilaç kayıtından ve yıllık raporlardan elde edilen) bir taramasını yapmıştır. Araştırıcılar, bu kimyasal maddelerin %65'inin doğada ya biyolojik olarak doğal bir kaynaktan, doğal bir üründen türetilmiş oldukları ya da doğal bir ürünün taklidi olarak bulundukları sonucuna varmışlardır. Özellikle, 1940'lardan bugüne kadarki kanser ilaçlarının % 47'sinin ya doğal ürünler olduğu ya da doğrudan doğal ürünlerden türetilmiş olduğu bildirilmiştir. Buna ilaveten, ilaç geliştirmenin antienfektif alanı, doğal ürünlere ve onların yapılarına çok bağlıdır.

Bitkiler, doğal kaynaklardan biyoaktif bileşik keşfi için büyük bir odak noktası olmuştur **(Qin ve Xu, 1998; Cowan, 1999).** Bununla birlikte çevre sorunları vardır; çünkü, geleneksel olarak ilaç olarak kullanılan bitkiler yok olmakta, ekologların ilaçların bir kaynağı olarak doğal kaynakların kullanımının sürdürülebilirliğini sorgulamasına neden olmaktadır **(Nigg, 1992.; Cragg ve ark., 1993).** Mantarlar, yüksek yapılı bitkilere göre daha çevre dostu bir alternatif kaynak oluşturabilirler. Mantarlar suni olarak kültüre edilebilirler ve üretilmeleri için gerekli zamanın daha kısa olmasına bağlı olarak daha sürdürülebilirler ve hücre çeperlerinde bulunan yapısal bileşiklerin potansiyel aktivitesine ilaveten, ilaç geliştirmede kullanılabilen çok sayıda sekonder metabolit de üretebilirler **(Tilmanis, 2010).**

2.2. Biyoaktif Bileşiklerin Kaynağı Olarak Mantarlar

Geleneksel olarak mantarlar bitkiler Âlemine dâhil edilmiş, ancak 1969'da mantarlar ayrı bir Âlem halinde Mantarlar Âlemi olarak sınıflandırılmışlardır. **(Whittaker, 1969)**. Yeşil bitkiler gibi klorofil içermezler ve bunun sonucu olarak kendi besinlerini üretemezler. Bunun yerine, diğer organizmalar tarafından üretilen organik madde ve besinleri sindirerek besin maddelerini elde ederler **(Whittaker, 1969; Arora, 1986).** Mantarlar âlemi, Zygomycota (küfler) ve Eumycota (septalı funfuslar) olmak üzere iki bölüme ayrılmıştır. Eumycota, ayrıca, Acomycota (keseli mantarlar), Basidiomycota (tokmak şekilli mantarlar), Deuteromycota (fungi imperfekti) ve Likenler olmak üzere dört alt bölüme ayrılabilir **(Tilmanis, 2010)**. Belki de mantarlardan elde edilen en önemli biyoaktif bir bileşiğin keşfi, *Penicillium notatum* fungusunda Sir Alexander Fleming tarafından gözlemlenen antimikrobiyal aktivitedir **(Fleming, 1929)**. Bu, günümüzde hala yaygın olarak kullanılan penisilin

antibiyotiğinin **(Florey ve ark., 1949)** ve diğer β-laktam antibiyotiklerinin geliştirilmesine yol açmıştır.

Ayrıca, lipit düşürücü (statin) ilaçlar koroner kalp hastalığına bağlı riskleri azaltmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. İlki mevastatin olan, bu bileşikler, bir *Penicillium* türünden kesfedilmişlerdir **(Endo ve ark., 1976).** Bu fungus Deuteromycota veya fungi imperfekti alt bölümüne aittir ve bu bileşiklerin ilaçlar olarak keşfi ve daha sonra kullanılmasından itibaren, bu alt bölüme ait diğer fungusların biyolojik özelliklerini ve üretilmelerini araştırmaya ilgi gösterilmiştir **(Fukushima ve ark., 1991; al-Hilli ve Smith, 1992; Lee ve ark., 1999; Rodrigues ve ark., 2000).** Bununla birlikte son 20 yılda, fungusların diğer bir alt bölümü olan Basidiomycota alt bölümünün, daha genel olarak mantarların, potansiyel biyoaktif özellikleri bilimsel araştırmaların daha fazla odağı haline gelmiştir **(Tilmanis, 2010).**

2.3. Mantarların Tıbbi Özellikleri

Mantar terimi genellikle bir mantarın reprodüktif yapısını veya bazidyokarpını tanımlamak için kullanılır. Küfler ve mayalar gibi, fungusların tümü bazidyokarp meydana getirmezler ve bu terim (mantar terimi) genellikle daha sınırlı bir anlamda bazidyokarplarının lamel olarak adlandırılan ışınsal perdeler üzerinde sporları taşıdığı, kültür mantarları gibi etli fungusları kapsamaktadır **(Arora, 1986; Borchers ve ark., 1999)**. Bazidyomiset fungusların bazidyokarpları, bazidium olarak adlandırılan mikroskopik tokmak biçimli hücrelerin dış tarafında yer alan sporların üretildiği yerlerdir **(Stamets ve Chilton, 1983).** Bazidyomiset funguslar aynı zamanda, bazidyokarplarının çıplak gözle görülebilecek ve elle toplanabilecek kadar büyük olmasından dolayı makrofunguslar olarak da adlandırılırlar. Makrofunguslar dört gruba ayrılabilirler: 1) Yenilebilen, örneğin *Agaricus*, *Lentinus*, *Pleurotus*; 2) Tıbbi, örneğin *Ganoderma*; 3) Zehirli, örneğin *Amanita* ve 4) diğerleri, bunların özellikleri iyi tanımlanmamıştır **(Chang ve Miles, 1992)**. Geleneksel olarak insanlar mantarları özel bir gıda sınıfı olarak görmüşler ve binlerce yıldır mantarları normal bir diyetin parçası olarak ve arzu edilen tatları ve aromaları nedeniyle nefis bir yiyecek olarak tüketmişlerdir **(Chang ve Buswell, 1996)**. Buna ek olarak, mantarların tıbbi özellikleri birçok antik ve modern kültür tarafından kabul görmüştür.

Eski Yunanlılar mantarların savaşta savaşçılar için güç sağladığına inanıp, Romalılar mantarların yalnızca bayram günlerinde sunulan Tanrı'nın Yiyeceği gözüyle bakarlarken, Çinliler mantarları uzun süredir sağlıklı yiyecekler ve hayatın bir iksiri olarak görmüşlerdir **(Chang ve Miles, 1989)**. Özellikle oryantal kültürler, tıbbi özelliklerinden dolayı mantarları uzun zamandır tanımış ve sahiplenmişlerdir. Geleneksel olarak mantarla tedavi edilen rahatsızlıkların bazıları hemoroit ve mide rahatsızlıkları (*Auricularia* türleri), gastrik ülserler (*Hericium erinaceus*) iken, *Volvariella volvacea*'nın kan basıncını düşürerek yara iyileşmesine yardımcı olduğu düşünülmüştür **(Chang ve Buswell, 1996)**. Modern kimyasal analiz tekniklerinin son zamanlarda yaşama geçirilmesi, bildirilen tıbbi özelliklerden sorumlu bileşiklerin izole ve identifiye edildiği son otuz yıl zarfındaki çok sayıda çalışma ile, bu eski deneysel gözlemlere bilimsel destek sağlamıştır **(Tilmanis, 2010).**

Son otuz yılda tıbbi mantar araştırmasının odak noktası, antikanser etkilere sahip olan çeşitli polisakkarit ve polisakkarit-protein komplekslerinin izolasyonu üzerine olmuştur **(Ikekawa, 1969; Fujii ve ark., 1978; Ito, 1980; Kawagishi ve ark., 1990; Mizuno, 1995; Mizuno ve ark., 1999; Wasser ve Weis, 1999a; Ooi, 2000; Reshetnikov ve Tan, 2001; Gonzaga ve ark., 2009)**. Bu bileşiklerin biyolojik aktivitesinin, konakçının immun sisteminin immünmodülasyonu veya artırılması olduğu bildirilmiştir. Bunlar genellikle konak savunma kuvvetlendiricileri veya biyolojik yanıt değiştiricileri (Biological Response Modifiers = BRM'ler) olarak adlandırılmışlardır **(Ooi, 2000)**. Esas olarak β-glukanlar olan bu polisakkaritler, mantar bazidyokarplarından, kültürü yapılan miselyum sıvısından ve sıvı kültür süzüntüsünden izole edilmişlerdir **(Wasser ve Weis, 1999b; Reshetnikov ve Tan, 2001; Mizuno, 2002)**. Japonya'da ticari olarak satılan ve öncelikle immunomodülatör aktiviteye sahip tıbbi mantar polisakkaritlerinden geliştirilmiş olan üç ilaç, *Coriolus versicolor*'un kültüre alınmış miselyum sıvısından elde edilen Krestin (PSK), Shiitake (*Lentinus edodes*)'nin bazidyokarplarından elde edilen Lentinan ve *Schizopyllum commune*'nin kültür sıvısından elde edilen Sonifilan (Schizophyllum)'dır **(Mizuno, 1993)**. Lentinan ve Sonifilan saf β-glukanken, Krestin proteine bağlı bir β-glukandır **(Ooi, 2000)**. Lentinan ve Sonifilan, sırasıyla, mide kanseri ve serviks kanserinin tedavisinde kullanılırken; Krestin, sindirim

organları kanseri, akciğer kanseri ve meme kanserinin tedavisinde kullanılmıştır **(Mizuno, 1999)**.

Araştırmaların çoğu antitümör polisakkaritlere odaklanmıştır; ancak mantar bazidyokarplarında, kültürü yapılan miselyum sıvısında veya kültür sıvısında bulunan maddelere atfedilen diğer birçok tıbbi özellikte vardır. Bu tıbbi özellikler, antiviral aktiviteyi **(Cochran ve ark., 1966; Suzuki ve ark., 1979; Jong ve Donovick, 1989; Chihara, 1992)**; antimikrobiyal aktiviteyi **(Tsukagoshi ve ark., 1984; Chihara, 1992; Hirasawa ve ark., 1999; Rosa ve ark., 2003)**; antioksidan aktiviteyi **(Hu, 1992; Liu ve ark., 1997; Yang ve ark., 2002)**; anti-inflamatuar aktiviteyi **(Czarnecki ve Grzybek, 1995)**; hipokolesterolemik etkileri **(Yamamura ve Cochran, 1974; Breene, 1990; Cheung, 1996)**; antidiyabetik ve hipoglisemik aktiviteyi **(Hikino ve ark., 1985; Tomoda ve ark., 1986)**; kan basıncı regülasyon aktivitesini **(Adachi ve ark., 1988; Kabir ve Kimura, 1989; Wang ve ark., 1996);** hepatoprotektif etkileri **(Yeung ve ark., 1994; Ooi, 1996; Barbisan, 2002)** ve antitrombotik aktiviteyi **(Mizuno, 1995)** kapsamaktadır.

2.4. *Agaricus blazei*'nin Tıbbi Özellikleri

Agaricus blazei, uzun yıllardan beri, Brezilya'nın güneydoğusundaki, doğal habitatı olan Sao Paulo'daki dağlık bölgede geleneksel olarak fonksiyonel bir gıda olarak kullanılmış olan Brezilya orijinli bir mantardır **(Mizuno, 1995).** İddia edilen sağlık etkileri nedeniyle Japonya'ya getirilmiş ve günümüzde oryantal ülkelerde kanserin önlenmesi ve tedavisinde doğal bir terapi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır **(Firenzuoli ve ark., 2008).** *Agaricus blazei*, işlenmiş/kısmen tanımlanmış gıda ekstraktifi olarak tanımlanan, diyet takviyesi olarak kapsüller veya tabletler şeklinde tüketilen bir terim anlamına gelen nutrasötik olarak Japonya'da son derece popülerdir **(Chang ve Buswell, 1996)**. Mantar nutrasötikleri, Çin ve Japonya'da yaygın olarak kullanılmakta ve dünyanın birçok başka ülkesine ihraç edilmektedir. İnternette *Agaricus blazei* terimine yönelik yapılacak basit bir araştırma, esas olarak tabletler şeklinde ya da pulverize kurutulmuş bazidyokarpları içeren çay formunda veya sıvı ekstraktlar şeklinde olmak üzere, bu *Agaricus blazei* nutrasötiklerini pazarlayan düzinelerce web sitelerini sağlayacaktır.

Agaricus blazei'nin cilt onarımına yardımcı olma, kollajen üretimine yardımcı olma veya cinsel eroksiyon kusurunu iyileştirme yetenekleri gibi, bu ürünler hakkında yapılan bazı terapötik iddiaların çok az bilimsel temeli vardır. Bununla birlikte, *Agaricus blazei*'nin kanseri tedavi etme ve bağışıklık sistemini uyarabilme iddiaları, son 30 yılda gerçekleştirilen bilimsel araştırma sonucunda doğrulanmıştır **(Tilmanis, 2010).**

A. blazei bazidyokarplarından elde edilen polisakkaridlerin ve polisakkarit-protein komplekslerinin antikanser etkileri üzerine çok sayıda araştırma yapılmış ve antikanser aktivite iddialarını desteklemeye yönelik azımsanmayacak sonuçlar vardır **(Tilmanis, 2010)**. *A. blazei* polisakkaritlerinin, farelerde Sarkoma 180 ve Meth A fibrosarkom gibi, sarkomlar veya bağ doku kanserleri dahil olmak üzere bir dizi tümörlere karşı *in vivo* etkili olduğu bulunmuştur **(Kawagishi ve ark., 1989; Mizuno ve ark., 1990; Itoh ve ark., 1994; Fujimiya ve ark., 1998b; Ohno ve ark., 2001; Chen, 2006; Gonzaga ve ark., 2009)**. Ayrıca, polisakkaritlerin, Ehrlich ascites karsinomu ve Shionogi karsinomu gibi epitelyal hücreleri etkileyen bir dizi fare modeli karsinomu ve kanserine karşı aktif oldukları da bildirilmiştir **(Ito ve ark., 1997).** Buna ilaveten, insanlarda yapılan klinik çalışmalar, *A. blazei*'nin kemoterapinin istenmeyen yan etkilerini hafifletebileceğini göstermiştir **(Ahn ve ark., 2004; Okamoto, 2007).**

A. blazei bazidyokarpları aynı zamanda bir dizi tümör hücrelerine karşı sitotoksisite bildirileri ile birlikte **(Fujimiya ve ark., 1999; Ito, 2000; Shen, 2001; Liu ve ark., 2006; Chen, 2007; Kim ve ark., 2009)**. *in vitro* kanser hücreleri üzerine bir etki de göstermiştir. Gözlemlenen sitotoksik aktiviteye yönelik etki tarzının, apoptozun indüklenmesine bağlı olduğu bildirilmiştir **(Shen, 2001; Liu ve ark., 2006; Kim ve ark., 2009)**. *A. blazei*'nin antikanser etkileri aynı zamanda *in vitro* etkileri bildiren pek çok çalışma ile, immünomodülasyon etkilerine de atfedilmiştir **(Sorimachi ve ark., 2001b; Hashimoto ve ark., 2002; Kuo ve ark., 2002; Yuminamochi ve ark., 2007)**. Bu çalışmaların birçoğu, aktif bileşeni tespit edilmemiş olan *A. blazei* ekstraktlarını kullanarak yapılmıştır **(Tilmanis, 2010).**

Çok yakın geçmişte, *A. blazei*'nin antimutajenite **(Martins de Oliveira, 2002; Guterrez ve ark., 2004; Angeli ve ark., 2006)** ve antioksidan aktivitesi **(Ker**

ve ark., 2005; Li, 2007; Soares ve ark., 2009) gibi diğer tıbbi etkileriyle ilgili artan bir sayıda bildiri yayınlanmıştır.

Agaricus blazei'nin tıbbi özellikleri ile ilgili bildirilerin çoğunluğu bazidyokarplardan izole edilen maddelere odaklanmışken, kültüre edilen miselyum sıvısının ve kültür süzüntüsünün aktivitelerine yönelik çok az bildiri vardır ve bu kaynaklardan elde edilen ekstrakt ve bileşiklerin aktivite yelpazesi kapsamlı bir şekilde araştırılmamıştır **(Tilmanis, 2010).**

2.5. *Agaricus blazei*'den Elde Edilen Maddelerin Biyoktivitesi ve Tıbbi Özellikleri

2.5.1. Antikanser etkileri

A. blazei'den elde edilen bileşiklerde tanımlanan üç ana antitümör aktivite tarzı vardır. Bunlar, konakçı aracılı antitümör aktivite, immünomodülasyon ve *in vitro* tümör hücre serilerine karşı sitotoksisitedir. En dikkat çekeni polisakkaritler olmak üzere, bu özellikleri gösteren *A. blazei*'den elde edilen bileşikler aşağıdaki bölümlerde tartışılmıştır **(Tilmanis, 2010).**

2.5.1.1. Konakçı aracılı antitümör aktivite

In vivo solid tümörlerin büyüklüğünde önemli, bazen tam bir azalma ile tespit edilmiş olan konakçı aracılı antitümör aktivite, değişik fare tümör modelleri, özellikle transplante edilmiş Sarkoma 180 tümörleri kullanarak *Agaricus blazei* polisakkarit ve ekstraktlarında incelenmiştir **(Tilmanis, 2010).**

A. blazei bazidyokarplarından izole edilen çeşitli yapılardaki polisakkaritler, farelere transplante edilen Sarkoma 180'e karşı önemli antitümör aktivite göstermiştir (**Kawagishi ve ark., 1989)**. Farelerde Sarkoma 180 tümör gelişiminin %99 inhibisyonuna neden olan (1→6)-β-D glukan-protein kompleksinden ibaret bir polisakkariti izole edilmiştir. Ayrıca, kompleksin ilgili polisakkarit ve protein bileşenleri içindeki formolizini incelenmiş ve saf glukanın, protein bileşeninin etkili kompleks aktivitesi için gerekli olduğunu gösterecek şekilde, antitümör aktivitesi göstermediği bulunmuştur **(Kawagishi ve ark., 1990; Itoh ve ark., 1994)**. Ayrıca, bu (1→6)-β-D glukan-protein kompleksinin (FIII-2-b olarak adlandırılmış) BALB /

c farelerindeki Meth A fibrosarkomuna karşı antitümör etkisini inceleyerek hem tek başına hem de geniş bir insan kanseri spektrumu için yaygın olarak kullanılan bir pirimidin analoğu olan 5-florourasil (5-FU) ile kombinasyon halinde araştırılmıştır. Araştırıcılar, FIII-2-b'nin tek başına tümör boyutunda orta derecede bir azalma gösterdiğini, fakat tek başına 5-FU kadar önemli olmadığını bulmuşlardır. Bununla birlikte FIII-2-b ve 5-FU birlikte verildiğinde gözlemlenen anti-tümör etki, onların kanser tedavisinde kombinasyon halinde kullanımının mümkün olduğunu gösterecek şekilde, tek başına iki bileşenin herhangi birininkinden daha yüksektir. Diğer antikanser bileşikleriyle kombine *A. blazei* polisakkaritlerinin sinerjistik etkileriyle ilgili birkaç çalışma bulunmaktadır **(Mizuno ve ark., 1990; Ebina, 2004; Liu ve ark., 2006; Gonzaga ve ark., 2009)**.

A. blazei bazidyokarplarından Sarkoma 180/ICR-JCL farelerinde %93-97 inhibisyon gösteren dört adet suda çözünür polisakkarit izole etmişlerdir. Bu polisakkaritler, bir (1→6)- (1→3)-β-D glukan, bir asidik (1→6)- (1→4)-α-D glukan, bir asidik (1→6)-(1→3)-α-D glukan ve bir asidik RNA-protein kompleksi dâhil olmak üzere, çeşitli yapı ve farklı özellikler ihtiva etmektedir. Bunlardan sonuncusu, mantar nükleik asitlerinde konakçı aracılı antitümör aktivitenin gözlemlenmesi seyrek olduğu için, özel bir ilgi çekmiştir **(Mizuno, 1995).** Aynı araştırıcı grubu, bazidyokarpların %1 amonyum oksalat, %5 sodyum hidroksit (NaOH), %20 NaOH ve %5 lityum klorür-dimetilasetamid ile ardışık ekstraksiyonuyla elde edilen suda çözünmez polisakkaritlerin etkisini de araştırmışlardır **(Mizuno ve ark., 1990).** Amonyum oksalatla ekstrakte edilen heteroglikan-protein kompleksleri zayıf antitümör özelliklere sahipken, %5 NaOH ile izole edilen bir (1→6)-β-D glukan-protein ve bir ksiloglukan-protein kompleksinde dikkate değer antitümör aktivite bildirilmiştir. Antitümör aktivite aynı zamanda %20 NaOH fraksiyonundan izole edilen bir glukoksilanda da tespit edilirken, %5 lityum klorür-dimetilasetamid ile fraksiyonize edilen maddelerde aktivite tespit edilememiştir **(Mizuno ve ark., 1990)**.

A. blazei bazidyokarplarından NaOH ile ekstraksiyon vasıtasıyla iki polisakkarit izole edilmiştir. Primer yapıları (1→6)-β-D glukandan oluşan bu polisakkaritlerin her ikisi de farelerde Sarkoma 180'nin solid formuna karşı antitümör aktivite göstermiştir.

Buna ilaveten, glukozidik bağları incelenmiş ve yüksek düzeyde dallanmış 1,3-β-1,3-β-glukan segmentlerinin antitümör aktivitenin aktif merkezini oluşturduğunu bulmuşlardır **(Fujimiya ve ark., 1998a; Ohno ve ark., 2001)**.

A. blazei'nin bazidyokarplarından elde ettikleri suda çözünür ve çözünmez, amonyum oksalatta çözünmez ve su-etanol karışımında çözünmez ekstraktların farelerde Meth A tümör gelişimi üzerine etkisini araştırılmıştır. Ekstraktların tümör içine verilmesi, tüm fraksiyonlarda antitümör aktiviteyle sonuçlanmış, bunların arasında en yüksek aktiviteyi ise amonyum oksalat ekstraktı göstermiştir. Bununla birlikte, bu fraksiyonların oral yoldan uygulanması hiçbir tümör inhibisyonuna yol açmamıştır. Ancak, amonyum oksalat fraksiyonunun asitle muamelesinin, onun tümör-içi uygulama yoluyla antitümör etkinliğini devam ettirirken, aynı zamanda, mantarın tümör inokülasyonu sırasında değil de tümör inokulasyonundan önce oral yoldan uygulanmasıyla ile önemli inhibisyonu olduğunu da gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, asit muamelesinin kan dolaşımındaki aktif komponentin seviyelerinin artmasına yol açarak (ki bu aktif komponentler, daha sonra tümör bölgesine göç edebilirler), sindirim sisteminden emilimi artırdığını varsaymışlardır **(Fujimiya ve ark., 1998a)**. Takip eden bir çalışmada, asitle muamele edilen fraksiyonun *in vitro* Meth A tümör hücre gelişimini inhibe ettiğini de bulmuşlardır. Amonyum oksalat ekstraktının fraksiyonizasyonu, en aktif bileşenin (1→6)-β dallanmasına sahip bir (1→4)-α-D glukan olduğunu ortaya koymuştur. İlginç bir şekilde, ekstraksiyondan önce bazidyokarpların kendilerinin asitle muamele edilmesi, ekstraksiyondan sonra asitle muamele edilen fraksiyonlarda olduğu gibi, intra-tümöral uygulama vasıtasıyla hemen hemen aynı antitümör etkinliği sergileyen ekstraktların izolasyonuna yol açmıştır. Her iki ekstrakt da oral uygulama yoluyla antitümör aktivite göstermiştir **(Fujimiya ve ark., 2000).**

Sarcoma 180'e karşı belirgin bir antitümör aktivite sergileyen *A. blazei*'nin sıvı besiyerlerinde gelişen miselyumundan izole edilen bir polisakkaritin, *A. blazei*'den izole edilen antitümör polisakkaritlerin ortak (1→6)-β-D glukan yapısı ile tamamen farklı bir yapıya sahip olduğu bulunmuştur **(Mizuno ve ark., 1999)**. Polisakkaritin esas olarak, β-1,2-bağlı D-mannopiranozil kalıntılarından oluşan bir ana zincir ile yan zincir olarak bir β-D-glikopiranozil kalıntılarına sahip olan bir glukomannan olduğu ve implante edilen tümörlerde % 89 oranında bir inhibisyon

gösterdiği bulunmuştur. Geniş bir antitümör aktivite spektrumuna sahip bir başka polisakkarit kompleksi, *A. blazei* miselyumundan izole edilmiştir **(Ito ve ark., 1997)**. ATOM olarak adlandırılan polisakkarit-protein kompleksi, günlük 10 ve 20 mg/kg dozlarında 10 günlük bir uygulamadan sonra Sarkom 180'e karşı belirgin bir antitümör aktivite göstermiş; buna karşın kompleksin günlük 50 ve 100 mg/kg dozları Ehrlich ascites karsinom, Shionogi karsinom 42 ve Meth A fibrosarkomuna karşı etkili olmuştur **(Ito ve ark., 1997).**

Agaricus blazei'nin kültür süzüntüsünden elde edilen antitümör özelliklere sahip polisakkaritlerle ilgili birkaç çalışma vardır ve yine onun yapısının mantar bazidyokarplarından izole edilenlerinkinden belirgin olarak farklı olduğu bulunmuştur **(Mizuno, 1995; Tilmanis, 2010)**. Ayrıca *A. blazei*'nin konsantre kültür süzüntüsünde yüksek antitümör aktivite gösteren bir mannoz-protein kompleksi tespit etmişlerdir. **(Fan ve ark., (2003)** *A. blazei* kültür sıvısından farelerde Sarkom 180'nin gelişimini önemli derecede inhibe eden ekzopolisakkaritleri tanımlamışlardır.

2.5.1.2. İmmünomodülasyon

A. blazei bileşik ve ekstraktlarında gözlenen ikinci antitümör etki şekli, immünomodülasyon veya konakçının immünolojik fonksiyonlarının uyarılmasıdır. Bu etki mekanizmasını (hücre aracılı immün yanıt) gösteren bileşikler, aynı zamanda immünopotansiyalizatörler veya biyolojik yanıt değiştiricileri (Biological Response Modifiers = BRM'ler) olarak da adlandırılırlar **(Ooi ve Liu, 1999)**. Mantarlardan elde edilen bazı bileşiklerin gen ekspresyonunu ve TNF-a, interlökin-1 (IL-1), interlökin-8 (IL-8) ve interlökin-6 (IL-6) dahil olmak üzere sitokinlerin üretimini tetikleme yeteneği vardır. Monositler, makrofajlar ve diğer hücre tipleri tarafından üretilen bu sitokinler, sitotoksik T hücrelerini tümörlere karşı uyarırlar ve bağışıklık sisteminin uyarılmasıyla ilişkili diğer biyolojik etkileri arasında B lenfositleri tarafından antikor üretimine neden olurlar **(Daba ve Ezeronye, 2003)**. Bu aktivite, önceki bölümde tartışılan *Agaricus blazei* polisakkaridlerinde gözlenen antitümör aktiviteden sorumlu ana faktör olarak kabul edilirken, antitümör esaslı araştırmalara girmeden immünmodülatör aktiviteleri araştıran çalışmalar da bildirilmiştir **(Tilmanis, 2010).**

A. blazei'den elde edilen çeşitli ekstraktların sitokinlerin hem *in vitro* hem de *in vivo* salınımın uyardığı bildirilmiştir **(Tilmanis, 2010).** *A. blazei* bazidyokarplarından elde edilen su ekstraktlarının *in vitro* rat kemik iliğinden kaynaklanan makrofajların TNF-α, IL-8 ve nitrik oksit sekresyonunu indüklediği **(Sorimachi ve ark., 2001b)**, farelerde T hücreleri ve makrofajları antikor üretiminin artışıyla sonuçlanan IL-1β ve IL-6 salgılamaları için uyardığı **(Nakajima ve ark., 2002)** ve Balb/cByJ farelerinde serum immünoglobulin G seviyelerini, T-hücresi sayılarını, TNF-α sekresyonunu ve fagositik aktiviteyi artırdığı **(Chan ve ark., 2007)** bildirilmiştir. Ayrıca, farelerde *A. blazei* ekstraktlarının oral yoldan verilmesinin 11-12 gama interferon üretimi yoluyla doğal öldürücü hücre aktivasyonunu artırdığını gösterilirken **(Yuminamochi ve ark., 2007)**, *A. blazei*'den elde edilen düşük molekül ağırlıklı ürünler ile muamele edilen keratinositlerde sitokin üretiminin arttığı gözlenmiştir **(Sugita ve ark., 2008)**. IL-1α, granülosit makrofaj-koloni uyarıcı faktör ve TNF-α seviyeleri doza bağımlı bir şekilde artarken, keratinositlerin proliferasyonu etkilenmemiştir **(Sugita ve ark., 2008)**.

A. blazei bazidyokarplarından elde edilen solvent ekstraktları da immünomodülatör aktivite göstermiştir **(Kaneno ve ark., 2004)**. 10 gün süreyle hekzan ekstraktı ile muamele edilmiş Ehrlich tümörlü fareler restore doğal öldürücü hücre aktivitesi gösterirlerken; diklorometan veya metanol ekstraktları ile 30 gün süreyle muamele, yüksek spesifik antikor üretimine yol açmıştır **(Kaneno ve ark., 2004)**.

A. blazei ekzopolisakkaritlerinin biyoaktivitesiyle ilgili az sayıdaki raporlardan birinde, **Zhang ve Ren, (2007)**, 5-30 mg/kg konsantrasyonlarında *A. blazei* ekzopolisakkariti verilen Kunming farelerinde makrofajların fagositik fonksiyonunun arttığını bildirmişlerdir.

2.5.1.3. *In vitro* sitotoksik aktivite

Agaricus blazei'ye karşı gözlenen üçüncü temel antitümör aktivite şekli, *in vitro* tümör hücre hatlarına karşı sitotoksisitedir. Çeşitli polisakkaritlerin, özellikle de *A. blazei* bazidyokarplarından ekstrakte edilenlerin, çeşitli hücre proliferasyon testleri kullanılarak tümör hücrelerinin çoğalmalarını inhibe ettiği gösterilmiştir **(Tilmanis, 2010)**.

Sitotoksik aktiviteye sahip oldukları tespit edilen polisakkaritlerin büyük bir kısmı, bu aktiviteyi lösemik hücre hatlarına karşı göstermiştir. Sitotoksik aktivitenin belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan yöntem, kolorimetrik 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) testidir **(Tilmanis, 2010)**. Bu yöntem ile çeşitli polisakkaritler ve polisakkarit-protein komplekslerinin *in vitro* lösemik hücre hatlarına karşı etkili olduğu bulunmuştur **(Ito, 2000; Shen, 2001; Chu, 2006.; Chen, 2007)**, ayrıca ^{3}H-timidin ve ^{3}H-uridin inkorporasyon testlerini kullanarak, (1→6)-β-D-glukan-protein kompleksinin 400-2000 g/ml konsantrasyonlarda insan lenfoid lösemi Molt4B hücrelerine karşı antiproliferatif etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Bazı *A. blazei* bazidyokarp ekstraktları da lösemi hücrelerine karşı aktivite göstermiştir **(Jin ve ark., 2007; Cai, 2008; Kim ve ark., 2009)**. *A. blazei* bazidyokarplarından elde edilen polisakaridlerin de karaciğer kanseri hücreleri **(Liu ve ark., 2006),** insan tiroid karsinomu **(Shimizu ve ark., 2002),** gibi diğer tümör hücre hatlarına karşı aktiviteye sahip olduğu gösterilmişken, bir polisakkarit-protein kompleksinin Meth A fibrosarkom hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği bulunmuştur **(Fujimiya ve ark., 1999)**.

Agaricus blazei'nin kültürü yapılmış miselyum sıvısından ve homojenize sıvı kültürlerinden elde edilen polisakkaritlerin sitotoksik aktivitesi ile ilgili birkaç açıklama yapılmıştır **(Jiang, 2005; Tilmanis, 2010)**. *A. blazei* misellerinden sıcak su ile çözülebilir polisakkaritleri ekstrakte edilmiştir. Bu ekstraktlardan biri ağırlıklı olarak mannozdan, diğer ikisi başlıca glukoz ve mannoz'dan oluşmuştur. Bunlar, üç polisakkaritin her biri için farklı sonuçlar veren rat kolon karsinom hücreleri (CT-26) ve insan karaciğer karsinom hücrelerine (Bel-7402) karşı test edilmişlerdir. Mannoz polisakkaridinin Bel-7202 hücrelerinde sitotoksik aktivitesi bulunmadığı tespit edilirken, iki glukoz-mannoz bileşiğinin bu hücrelerin çoğalmasını önemli derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir. Her üç polisakkarit CT-26 hücrelerini inhibe ederken, en yüksek seviyede hücre proliferasyonu inhibisyonu gösteren glukoz-mannoz polisakkaritleri yanında, bunu değişik derecelerde yapmışlardır **(Yu ve ark., 2008)**.

Yu ve ark., (2008). *Agaricus blazei*'den (miselyum ve kültür süzüntüsünün ikisinin bir karışımından) elde edilen broth fraksiyonlarının yaklaşık %50 polisakkaritten [%1.2 (1,3)-β-D-glukan'dan oluşan] meydana geldiğini bildirilmiştir. Broth fraksiyonu, 400 g/ml ve 800 g/ml konsantrasyonlarda androjen bağımlı

(LNCaP) ve androjen bağımsız (DU145 ve PC3) insan prostat kanseri hücre hatlarına karşı *in vitro* sitotoksik aktivite göstermişlerdir.

A. blazei'den ekstrakte edilen steroid bileşiklerin de *in vitro* tümör hücrelerinin gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir **(Kawagishi ve ark., 1988; Tilmanis, 2010).** *A. blazei* bazidyokarplarının aseton ekstraktından, üçünün *in vitro* insan serviks kanseri hücrelerine (HeLa) karşı sitotoksik aktivite gösterdiği kanıtlanan altı steroid izole etmişlerdir. Hücreler test bileşiklerinin varlığında 72 saat süreyle inkübe edilmiş ve daha sonra canlı hücrelerin sayısı Giemsa metodu kullanılarak boyama ile belirlenmiştir. HeLa hücrelerinin tam çoğalmasını inhibe eden konsantrasyonlar, 8-63 g/ml arasında bulunmuştur. Steroidlerin aynı zamanda hepatoselüler karsinom hücrelerine karşı da aktif olduğu bulunmuştur. *A. blazei*'nin kültürü yapılmış misellerinin hekzan/etil asetat ekstraktlarından izole edilen iki steroid bileşiğin (blazeispirol A ve blazeispirol C'nin) *in vitro* hepatoselüler karsinom hücreleri olan HepG2 ve Hep3B'ye karşı çok toksik olduğu bildirilmiştir **(Su ve ark., 2008).** *A. blazei*'nin bazidyokarplarından izole edilen özgün bir steroid olan Blazein, *in vitro* insan akciğer kanser hücreleri (JU99) ve mide kanser hücreleri (KATOIII)'nin çoğalmasını inhibe etmiştir **(Itoh ve ark., 2008)**.

Çeşitli *A. blazei* polisakkarit, steroid ve ekstraktlarına yönelik gözlenen sitotoksik aktivitenin başlıca etkinlik tarzı, apoptozun indüksiyonu aracalığıyla olduğu tespit edilmiştir **(Fujimiya ve ark., 1999; Liu ve ark., 2006; Chu, 2006.; Chen, 2007; Jin ve ark., 2007; Cai, 2008; Itoh ve ark., 2008; Yu ve ark., 2008; Kim ve ark., 2009)**.

2.5.2. Antiviral aktivite

Bir virusun çoğalma yeteneği, konakçı hücrelerin metabolik aktivitesine bağlıdır **(Eo ve ark., 1999)**. Potensiyel antiviral etkenler, konak hücreyi etkilemeksizin viral replikasyonun inhibisyonuna spesifik olmalıdır **(Oxford ve ark., 1999)**. *Agaricus blazei*'nin hem kültürü yapılmış miselyum sıvısından hem de bazidyokarplarından elde edilen ekstraktların spesifik antiviral aktivitesi hakkında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır **(Tilmanis, 2010)**.

A. blazei'nin kültürü yapılan misellerinden ve bazidyokarplarından elde edilen su ekstraktları, %0-50 arasında değişen etanol konsantrasyonları ile

fraksiyonlarına ayrılmış ve Vero hücreleri üzerinde sitopatik etkilere sahip olan western equine encephalitis virus (WEE), herpes simplex virus (HSV) ve polio virus olarak adlandırılan viruslara karşı *in vitro* antiviral aktiviteleri yönünden test edilmişlerdir**.** Özellikle virus ile enfekte VERO hücrelerinde CPE'yi tamamen inhibe eden %44 ve %50'lik etanol konsantrasyonlarından oluşan fraksiyonlar olmak üzere, 100 µg/ml bir test konsantrasyonunda tüm miselyal fraksiyonlar, WEE virusuna karşı güçlü antiviral aktivite göstermişlerdir. Bu fraksiyonlarda aynı zamanda HSV'ye karşı da zayıf antiviral aktivite gözlenmiştir; ancak, miselyal konsantrasyonların hiçbiri polio virusa karşı aktivite göstermemişlerdir. *A. blazei* bazidyokarplarından elde edilen etanol ekstraktları 100 µg/ml test konsantrasyonunda WEE ve Herpes simplex viruslarına karşı herhangi bir antiviral aktivite göstermemiştir. Bir haftalık kültür sonrasında polio virusa karşı zayıf bir CPE inhibisyonu gözlenmiş, ancak 2 hafta sonra bu etki ortadan kalkmıştır (**Sorimachi ve ark., 2001b**).

Faccin ve ark. (2007), *A. blazei*'yi *in vitro* polio virus enfeksiyonunu önleme yeteneği yönünden daha büyük ölçüde araştırmışlardır. Araştırıcılar su ekstraktlarını, etanol ekstraktlarını ve izole edilen bir polisakkariti Hep-2 hücrelerini kullanarak polio virus tip 1'e karşı antiviral aktiviteleri yönünden incelemişlerdir. Araştırma sonucunda, en etkili olanının etanol ekstraktı olduğunu (bu ekstrakt kontrol grubuna göre plak sayısında %88 bir azalma göstermiştir), üç test solüsyonunun tümünde konsantrasyona bağlı olarak plak sayısında bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Su ekstraktı ve polisakkarit için plakların sayısındaki azalma yüzdesini, sırasıyla %50 ve %67 olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca, tüm test maddelerinin, poliovirus enfeksiyonu esnasında eklendiğinde daha etkili olduğunu, ancak viral adsorpsiyon üzerinde çok az etkili ve virusidal olmadığını tespit etmişler ve test maddelerinin poliovirus replikasyonunun ilk evrelerinde etkili olduğuna hükmetmişlerdir. **Grinde ve ark. (2006)** tarafından yapılan bir çalışmada, interferon ile düzenli tedaviye yanıt alınamamış beş kronik Hepatit C (HCV) hastasının tedavisinde *A. blazei* ekstraktının olası bir rolü araştırılmıştır. Hastalara imalatçı firma tarafından tavsiye edilen şekilde 1 hafta süreyle günde 3 kez 20 ml *A. blazei* ekstraktı (Gold label from ACE Co., Ltd., Gifu-ken, Japan) verilmiştir. HCV RNA'nın miktarı, ekstrakt ile muameleden önce, 4 gün sonra ve 7 gün sonra hastalardan alınan kan örneklerinde ölçülmüştür. Araştırıcılar, *A. blazei* ekstraktıyla bir hafta muameleden sonra virusun ortalama

titresinin nispeten düşmesine rağmen, farkın açıkça belirgin olmadığını ve ekstraktın kronik Hepatit C tedavisi için uygun olmadığına karar vermişlerdir.

2.6. Respiratuvar sinsityal virus (RSV)

İnsan respiratuvar sinsityal virüsü (Human Respiratory Syncytial Virus = HRSV) bebekler, çocuklar, yaşlı yetişkinler ile solunum, kalp veya immun sistem yetersizliği olan her yaştan insanlarda ciddi üst ve alt solunum yolu enfeksiyonunun önde gelen nedenidir. Tüm insan populasyonlarında yaygın bir patojendir ve RSV salgınının mevsimselliği bölgeden bölgeye değişmektedir. Avrupa, Kuzey Amerika ve ılıman iklime sahip ülkelerde kış ve ilkbahar aylarında ortaya çıkarken, tropikal ülkelerde yağmurlu mevsimde ortaya çıkabilmektedir. RSV, yaşamın ilk yıllarındaki bebeklerin % 65 kadarını enfekte etmekte ve esas itibarıyla 2 yaşına kadar tüm bebekler enfekte olmaktadır. RSV enfeksiyonu çocukluk çağında en sık burun akıntısı, öksürük ve ateş ile karakterize üst solunum yolu enfeksiyonu şeklinde görülür. Bronşiyolit ve/veya pnömoni ilk enfeksiyonların en yaygın sonuçlarıdır ve yaklaşık olarak çocukluk bronşiyolit vakalarının %80'i ve bebek pnömonilerinin %50'si RSV enfeksiyonundan ileri gelmektedir **(Black, 2003)**. RSV'nin tahmini global yıllık enfeksiyon ve mortalite rakamları, sırasıyla, 64 milyon ve 160 bindir **(Organization., 2008)**.

RSV, enfekte bireylerle yakın temasla ya da enfeksiyöz sekresyonlarla doğrudan temasla bulaşmaktadır. İnkübasyon süresi, ilk temastan sonra 2-8 gündür. Virus saçılımı, sıklıkla başlıca belirtilerin başlangıcından olmak üzere, enfeksiyondan sonra bir gün içinde başlamaktadır. RSV saçılımının genel hatlarıyla enfekte bireylerin yaşı, enfeksiyonun şiddeti ve enfekte kişide bağışıklık yetersizliği olup olmadığıyla ilişkili olduğu görünmektedir **(Black, 2003)**.

RSV, siliyer motilite ve bazen epitelyal destrüksiyon gibi özelleşmiş fonksiyonların bozulmasına yol açan, akciğer epitel hücrelerinde doğrudan sitopatik etkiye neden olmaktadır.

Submukozal ödem ve mukus sekresyonu ile beraber peribronkiyoler mononükleer hücre infiltrasyonu yaygın olarak gözlenmektedir. Bunlar, yama tarzında atelektazi ve kompansatuar amfizemli bölgelerle birlikte bronşioler obstrüksiyona neden olmuştur **(Openshaw, 2005)**. Aynı zamanda, RSV

enfeksiyonundan sonra bildirilen, akut ortakulak iltihabı ve astımın gelişmesine katkıda bulunabilen solunum yolu hiperreaktivitesine bağlı kalıcı hırıltılı solunumu içeren, pek çok geçmek bilmeyen etkiler de vardır **(Black, 2003; Martinez, 2003)**.

Çok hücreli organizmaların viral enfeksiyona karşı çeşitli stratejileri vardır. İlk savunma hattı, makrofajları, doğal öldürücü (NK) hücreleri ve fagositozun yanı sıra hücre lizisini indükleyerek enfekte hücreleri ortadan kaldıran nötrofilleri aktive eden ve onlara yardımcı olan, interlökinler (IL) ve tümör nekroz faktörü (TNF) gibi sitokinlerin üretilmesini içine alan hücre aracılı immün yanıttır. İkinci savunma hattı, sitotoksik T lenfositlerini (CTL), antikorlari ve çeşitli sitokinleri içeren humoral immün yanıttır. Bununla birlikte, yeterli immün yanıtlar oluşmadan önce, ağır hasar ya da ölüm meydana gelebilir, bu nedenle üçüncü bir savunma düzeyi bulunur — viral nükleik asitlerin varlığında interferonların (IFN'ler) harekete geçmesi. Bununla birlikte, bu immün yanıtlar, sadece çocukluk çağı bronşiyoliti ile değil, aynı zamanda erişkinlerde obstrüktif akciğer hastalıklarıyla da ilgili olabilen, hastalık şiddetinin artmasına neden olmaktadır **(Roulston ve ark., 1999)**.

Virüse özgü immün yanıtlar genellikle hem RSV ile ilişkili alt solunum yolu enfeksiyonlarına karşı korunmadan hem de enfeksiyonun atlatılmasından sorumlu olmakla birlikte, RSV'ye karşı immün yanıtlar kısa ömürlüdür, dolayısıyla hayat boyunca reenfeksiyon ortaya çıkabilmektedir. Hastalığın şiddeti genellikle sonraki reenfeksiyonlarda düşüş gösterir; reekfeksiyonlar yaygın olmasına rağmen, tekrarları yaşla birlikte azalır **(Maggon ve Barik, 2004)**.

RSV enfeksiyonlarına yönelik etkili tedavi geliştirmek amacıyla yapılan teşebbüsler, virüs tanındığından bu yana devam etmektedir. Bununla birlikte, spesifik bir anti-RSV ilaç henüz keşfedilmemiştir. Klinik tedavide, hospitalizasyon, ilave oksijen verme, nazofarengeal aspirasyon ve şiddetli vakaların çoğunda entübasyon ve mekanik ventilasyon olmak üzere destekleyici tedaviler kullanılmaktadır. Bronkodilatörler, kortikosteroidler ve ribavirin (RBV) kullanılması, diğer stratejileri oluşturmaktadır **(Ho, 2008)**.

Aerosolize ribavirin, yüksek riskli hastanede yatan bebeklerde ve küçük çocuklarda şiddetli alt solunum yolu RSV enfeksiyonlarının tedavisi için FDA tarafından onaylanmış tek antiviral preparattır ve yapısal olarak pek çok DNA ve

RNA virüslerine karşı geniş spektrumlu antiviral aktivitesi olan ribonükleozit guanozin ile ilişkili sentetik bir bileşiktir. Ribavirin, viral polimerazın inhibisyonu, mRNA 5' başlık formasyonunun inhibisyonu, inositol monofosfat dehidrogenaz ve immun modülatör etkinin inhibisyonu dahil olmak üzere, çeşitli mekanizmalarla viral multiplikasyonu engellemektedir **(Maggon ve Barik, 2004; Bosch ve ark., 2007)**. Ribavirinin etkisi pek çok çalışma ile kontrol edilmiştir, fakat sonuçlar tutarsız ve çelişkilidir. Ribavirin uygulaması çok yoğun işgücü gerektirmekte ve tıbbi görevliler için bazı riskleri vardır **(Black, 2003)**. Ayrıca, ilaç masraflıdır ve onun maliyet etkinliği göz önüne alınmalıdır **(Maggon ve Barik, 2004).** 1996'da, Amerikan Pediatri Akademisi, ribavirinin doktorlar tarafından önemli ek hastalıkları (kardiyopulmoner hastalık veya immünsüpresif hastalık veya tedavi gibi) olan çocuklar ya da son derece şiddetli RSV enfeksiyonu olanları göz önüne aldıktan sonra kullanılması gerektiğini tavsiye etmiştir **(Black, 2003)**.

Uygun aşı veya diğer immunoprofilaktik etkenlerin bulunmamasından ve hastanede yatan hastalarda RSV hastalığının iyileştirilmesi üzerine ribavirinin değişken yararlı etkisinden dolayı, ılımlıdan şiddetliye RSV hastalığı sırasında terapötik girişime yönelik yeni stratejilere apaçık ihtiyaç duyulmaktadır. Viral döngünün farklı basamaklarını hedef alan antiviral bileşikler, hastalığın değişik aşamalarına göre kullanılabilmektedir. Viral bağlanmayı ve/veya füzyonu hedef alan antiviral ilaç, erken viral enfeksiyonları veya virusun daha çok yayılmasını sınırlayabilmektedir. Ribavirin gibi, viral replikasyon inhibitörleri, ilk enfeksiyondan sonra uygun bir zamanda kullanılabilmekte ve hastalarda viral titreyi sınırlayabilmektedir. Bu antiviraller, klinik kullanıma yönelik başarılı antiviral etkenler olarak yüksek geliştirilme potansiyeline sahiptirler. Çeşitli antiviral bileşikler identifiye edilmiş ve *in vitro* ve *in vivo* RSV replikasyonunu azaltma yetenekleri yönünden test edilmişlerdir **(Ho, 2008)**.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Mantar materyali

Anti-RSV aktivitesi yönünden araştırılmış olan *Agaricus blazei* bazidyokarpları (Şekil 3.1), 2017 yılı Mayıs ayında Çin'den temin edilmiş ve S. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Fungaryumu'nda teşhisi yapılmıştır.



Şekil 3.1. *Agaricus blazei* Murril'nin bazidyokarpı

3.1.2. Hücre ve virus

Bütün deneylerde konak hücre olarak insan respiratuvar sinsityal virusu (human respiratory syncytial virus: HRSV, ATCC-VR-26)'nün duyarlılık gösterdiği insan epidermoid larinks karsinoma hücre serisi (Hep-2, ATCC-CCL-23) kullanılmıştır. Hep-2 hücreleri ve HRSV, S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Viroloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.1.3. Besiyerleri ve solüsyonlar

3.1.3.1. Hücre kültürü besiyerleri

a) Fötal sığır serumu (Fetal bovine serum, FBS): FBS (ATCC-30-2020), ticari olarak elde edilmiştir.

b) Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC-30-2003): 500 ml'lik volümler halinde ticari olarak sağlanmış ve kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır.

c) Üretme besiyeri: %10 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin sülfat ve 0.25 µg/ml amfoterisin B olacak şekilde, EMEM ile hazırlanmıştır.

d) İdame besiyeri: %1 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin sülfat ve 0.25 µg/ml amfoterisin B olacak şekilde, EMEM ile hazırlanmıştır.

3.1.3.2. Solüsyonlar

a) Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS): Hücrelerin yıkanmasında ve % 0.4'lük tripan mavisi solüsyonunun hazırlanmasında kullanılan, kalsiyum-magnezyum içermeyen bu fosfat tamponlu tuz solüsyonu, ticari olarak (Biological Industries, Cat. No:02-023-1A, Israel) elde edilmiştir.

b) % 0.25'lik tripsin-edta (etilen diamin tetraasetik asit) (1×) solüsyonu: Hücrelerin ayrıştırılmasında kullanılan bu solüsyon, ticari olarak (Biological Industries, Cat. No:03-050-1A, Israel) temin edilmiştir. Solüsyon, kullanılıncaya kadar –20°C'de saklanmıştır.

c) Antibiyotik Antimikotik Solüsyonu (100x) (Sigma-A5955): Hücre kültürü uygulamalarında mililitre başına 10.000 ünite penisilin, 10 mg streptomisin sülfat ve 25 µg amfoterisin B içermek üzere Sigma-Aldrich Kimyasal A.Ş (St. Louis, MO, USA) tarafından formüle edilmiş olan bu ticari antibiyotik-antimikotik karışımı, üretici firmanın tavsiyesi üzerine hücre kültürü vasatlarına 10 mL/L olmak üzere eklenmiştir.

d) Ribavirin (RBV): İnsanlarda RSV enfeksiyonlarının tedavisi için onaylanmış bir ilaç olan ribavirin (R9644-10 mg, Sigma, USA) ticari olarak sağlanmıştır.

e) Trypan blue boyası (Sigma-T6146): Hücre sayımında ölü hücrelerin boyanmasında kullanılan bu boya, ticari olarak Sigma (ABD) firmasından toz halinde elde edilmiştir.

f) XTT temelli hücre proliferasyon kiti: Ekstraktların sitotoksik ve antiviral etkilerinin belirlenmesinde, ticari olarak Biological Industries Israel Beit Haemek Ltd. (Kibbutz Beit Haemek 25115, Israel) Şirketi'nden elde edilen, XTT Ayıracı (10 × 5 ml) ve Aktivasyon Ayıracı (2 × 0.5 ml) içeren XTT temelli hücre proliferasyon

kiti (Kat. No.: 20-300-1000) kullanılmıştır. Kit, kullanılıncaya kadar -20ºC'de saklanmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Ekstraktların hazırlanması

Agaricus blazei bazidyokarpları toprak gibi herhangi bir kalıntıdan arındırmak amacıyla yıkanarak temizlenmiş ve ardından 40°C'deki bir fırında kurutulmuştur. Kurutulan örnekler bir değirmen kullanılarak ince toz halinde öğütülmüştür. Toz halindeki 20'şer g numune, ayrı ayrı, 200 ml metanolün ve 200 ml steril distile suyun içerisine konulmuştur. Hazırlanan bu karışımlar 25-37ºC sıcaklıkta ultrasonikasyon ile 1 saat ekstraksiyona tabi tutulmuşlardır. Protokol sırasında örneklerdeki bileşiklerin sıcaklıktan dolayı bozulmasını önlemek amacıyla sıcaklığın 40ºC'nin altında tutulmasına özellikle dikkat edilmiştir. Mantar ekstraktları filtre (Whatman no 1) kullanılarak süzülmüş ve daha sonra kullanılan çözücüler rotary evaporatör'de (Heidolph Laborota 4000) 40ºC'nin altında ve düşük basınçta tamamen uçurulmuşlardır. Uçurma işleminden sonra ekstraktta kalan son sıvı kalıntılarından kurtulmak için, liyofilizatörde düşük basınç altında -110ºC'de kurutulup toz haline getirilmiştir. Liyofilize haldeki metanol ve su ekstraktının her 1000 mg'ı 10 ml EMEM (serumsuz) içinde çözdürülerek 100 mg/ml konsantrasyonunda stok solüsyonlar hazırlanmıştır.

Stok solüsyonlar 0.22 µm'lik milipor filtreden geçirilerek steril edilmiş ve 2 ml'lik tüplere 1'er ml taksim edilerek, kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır. Sitotoksisite ve antiviral aktivite testlerinde kullanılacak ekstrakt dilüsyonları bu stoklardan hazırlanmıştır,

3.2.2. Ribavirin stok solüsyonunun hazırlanması

Steril bir deney tüpünün içerisine toz halindeki ribavirinden 5 mg konulduktan sonra, üzerine 5 ml EMEM (serumsuz) eklenmiştir. Elde edilen 1000 µg/ml konsantrasyonundaki süspansiyon 0,2 µm por çapındaki milipor filtreden geçirilerek 10 ml'lik şişeye süzülmüş ve 1 dk süreyle vorteksle karıştırılmıştır. Stok solüsyon deneylerde kullanılıncaya kadar -80°C'da saklanmıştır (+4°C'da saklandığında, 1 hafta içinde kullanılmıştır).

3.2.3. Trypan blue solüsyonunun (% 0.4'lük) hazırlanması

0.20 g trypan blue boyası, 50 ml DPBS içerisinde eritildikten sonra, filtreden (0.2 μm) geçirilmiş ve 5-10 ml miktarlarda şişelere paylaştırılarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.2.4. Hücre kültürlerinin hazırlanması

Çalışmada, gerek sitotoksisite testlerinde ve gerekse antiviral aktivite deneylerinde American Type Culture Collection (ATCC)'dan temin edilen ve S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Viroloji Laboratuvarı'nda çoğaltılarak dondurulmuş olan HEp-2 hücreleri (ATCC CCL-23) kullanılmıştır. İçinde dondurulmuş halde 1 ml HEp-2 hücre süspansiyonu bulunan dondurma ampulü sıvı azot tankından (–196°C) çıkarıldıktan sonra 37°C su banyosunda süratle (2–5 dk) çözdürülerek 75 cm^2'lik doku kültürü flaskındaki üretme besiyeri (%10 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 μg/ml streptomisin ve 0,25 μg/ml amfoterisin B ilave edilmiş EMEM) içerisine transfer edilmiştir. 37°C'de 24 saat süreyle inkübasyon işleminden sonra vasat değiştirilmiştir.

Flaskın üzerine hücrenin adı, subkültür sayısı ve tarih yazılarak 37°C'deki %5 CO_2'li etüve kaldırılmıştır. Hücrelerin üreme ve sağlık durumları invert mikroskopta izlenmiştir. 75 cm^2'lik flaskta üretilen hücrelerin daha sonra 1:4 veya 1:10 oranında subkültivasyonları yapılmıştır. Hücrelerin bu şekilde devamlılıkları sağlandıktan sonra, kültürde meydana gelebilecek risklere karşı hücrelerin bir kısmı belli aralıklarla dondurularak saklanmıştır. Bu amaçla logaritmik fazdaki hücreler tripsinize edilerek santrifügasyonla toplanmıştır. % 10 DMSO içeren FBS kullanılarak hazırlanan saklama ortamında yaklaşık $1x10^7$ hücre/ml olacak şekilde hazırlanan hücre stokları dondurulmuştur (–80 °C ve –196 °C).

3.2.5. Stok virus süspansiyonlarının hazırlanması

75 cm^2'lik flaska ekildikten sonra % 70-85 çoğalma düzeyine (konfluensi) ulaşan HEp-2 hücreleri üzerindeki üretme vasatı boşaltılmış ve hücreler 37°C'deki benmaride önceden ısıtılmış steril 1–2 ml DPBS ile 1-2 kez yıkanmıştır. Virus suşunu (ATCC VR-26) içeren ampul 37°C'deki su banyosunda süratle (2–5 dk) çözülmüştür. Çoğaltılmak istenen stok ampuldeki virus, titresi göz önünde

bulundurularak 1:10 oranında sulandırılmış ve 75 cm^2'lik flaska (%70–85 konflüent hücre içeren), flask içindeki hacim 2.5 ml olacak şekilde ekim yapılarak 37°C'de %5 CO_2 içeren ortamda 1 saat inkübe edilmiştir. Bu süre boyunca doku kültürü flaskı 15 dakikada bir hafifçe çalkanarak virusun homojen dağılması sağlanmış ve hücre tabakasının kuruması önlenmiştir. Virus adsorbsiyonu için 1 saat inkübasyon süresinden sonra, flaska 22.5 ml virus üretme besiyeri (%1 FBS'li EMEM) konularak adsorbsiyon sona erdirilmiştir. Flask, 37°C'deki %5 CO_2 içeren inkübatörde 3 gün inkübe edilmiştir. Hücreler her gün sitopatik etki (CPE) oluşumu açısından kontrol edilmiştir. İnkübasyonun 3. gününde % 90 CPE görülen doku kültürü flaskı –80°C'ye kaldırılmıştır. Dondurulmuş doku kültürü flaskı 37°C'de benmaride ısıtılarak çözülmüştür. Dondurma-çözdürme işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Bu şekilde, hassaslaşmış olan hücrelerin parçalanarak virusların hücre dışına çıkması sağlanmıştır. Bunu takiben flask içeriği santrifüj tüpüne aktarılarak 3500 rpm'de +4°C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınarak, üzerinde suş adı ve hazırlanma tarihi yazılı ampullere 1'er ml pipetlenerek –80 °C'de depolanmıştır.

3.2.6. Virus titrasyonu

Virus enfektivitesinin titrasyonu, %50 doku kültürü enfeksiyöz doz ($DKID_{50}$) metodu ile yapılmıştır **(Frey ve Liess, 1971)**. Bu amaçla, ilk önce hücre üretme besiyeri kullanarak ml'sinde 2.5×10^5 hücre içeren 10 ml HEp-2 hücre süspansiyonu hazırlanmıştır.

♦ Mililitresinde 2.5×10^5 hücre içeren süspansiyon (10 ml) hazırlamak için, aşağıdaki prosedür takip edilmiştir:

1) 75 cm^2'lik flaskın içerisinde bulunan üretme besiyeri çekilerek alınmıştır.

2) Flaska 2 ml tripsin-EDTA (% 0.25, 1×, Biological Industries, Cat. No:03-050-1A, Israel)) solüsyonu konularak hücrelerin yüzeyi kısa bir süre yıkandıktan sonra, solüsyon çekilerek boşaltma kabına alınmıştır. Flaska tekrar 2 ml tripsin-EDTA konularak enzimin aktifleşmesi için 5 dk kadar inkübatörde bekletilmiştir. Hücrelerin kalktığını gördükten sonra tekrar yapışmamaları için flaska hafifçe vurulmuştur. Sonra, tripsin-EDTA'yı inaktive etmek için flaska 6 ml kadar hücre üretme besiyeri konulmuş, flask içeriği santrifüj tüpüne aktarılmış ve 800 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve elde edilen hücre pelletinin üzerine 10

ml hücre üretme besiyeri konularak hücre sayımına geçilmiştir. Bunun için de sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

a) Ependorf tüpünde 100 µl hücre süspansiyonu + 400 µl Trypan Blue (%0.4'lük) iyice karıştırılmıştır (1:5 dilüsyon).

b) Otomatik pipetle hemositometrenin her iki sayım kamarasına yaklaşık 15 µl hücre süspansiyonu konulmuştur. Kapiller hareketle sayım kamarasının dolmasına izin verilmiştir. Sayıma başlamadan önce 1 dakika süreyle hücrelerin yerleşmesine izin verilmiştir.

c) 10× objektif kullanılarak, sayım odasının ızgara çizgilerine odaklanılmış ve her iki sayım kamarasında bulunan 16 küçük karedeki canlı hücreler (mavi olmayan) sayılmıştır. Çizgilerin üzerinde bulunan hücreler sayıma dâhil edilmemiştir. Üst ve alt sayım kamaralarında sayılan hücrelerin ortalaması alınmıştır.

d) Aşağıdaki formüle göre hücre süspansiyonunun mililitresinde bulunan canlı hücre sayısı belirlenmiştir:

Canlı hücre/ml = ortalama hücre sayısı × dilüsyon faktörünün tersi × 10^4 (3.1)

Canlı hücre/ml = $19 \times 5 \times 10^4 = 9.5 \times 10^5$ hücre/mL bulunmuştur.

e) Hücre sayımı yapılır yapılmaz, 2.5×10^5 konsantrasyonda toplam 10 mL hücre süspansiyonu hazırlamak için aşağıdaki formülden yararlanılmıştır:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \quad (3.2)$$

Bu formülde:

V_1, istenilen sulandırılmış hücre süspansiyonunun mL olarak hacmidir.

C_1, istenilen konsantrasyondur (hücre sayısı/mL).

V_2, orijinal hücre süspansiyonunun (hesaplanacak) mL olarak hacmidir. Bu, sulandırılması gerekecek olan orijinal hücre süspansiyonunun hacmidir.

C_2, orijinal hücre süspansiyonunun konsantrasyonudur (hücre sayısı/mL).

Böylece, **V_2** + **sulandırıcı** = istenilen konsantrasyonda **V_1**

Bizim, 10 ml 2.5×10^5 hücre/ml konsantrasyonda süspansiyona ihtiyacımız ve elimizde 9.5×10^5 hücre/ml konsantrasyonda bir hücre süspansiyonu olduğu için, ihtiyaç duyduğumuz orijinal hücre süspansiyonunun hacmi (V_2) aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \qquad (3.2)$$

$$10 \text{ ml} \times (2.5 \times 10^5 \text{ hücre/ml}) = V_2 \times (9.5 \times 10^5 \text{ hücre/ml})$$

$$V_2 = \frac{2.5 \times 10^6}{9.5 \times 10^5} = 2.63 \text{ ml} = 2630 \text{ µl}$$

Buradan hareketle, 10 ml (V_1) 2.5×10^5 hücre/ml elde etmek için, 7.37 ml (7370 µl) hücre üretme besiyerine 2630 µl (V_2) orijinal hücre süspansiyonu eklenmiştir.

♦ HEp-2 hücreleri 96 kuyucuklu pleyte ekilmiş (2.5×10^4 hücre/kuyucuk) ve %5 CO_2'li ortamda 37ºC'de 24 saat süreyle üretme besiyerinde (100 µl/kuyucuk) kültüre edilmiştir.

♦ Hücreler her kuyucukta neredeyse konfluent olduğunda, vasat aspire edilmiş ve daha sonra idame besiyeri (%2 FBS'li EMEM) kullanılarak RSV'nin seri 10 misli sulandırmaları hazırlandıktan sonra her dilüsyondaki virus süspansiyonundan 4'er kuyucuğa 100'er µl konulmuştur. Ayrıca virus kontrol (VK) ve hücre kontrol (HK) için de dörder kuyucuk seçilmiştir. Virus kontrol için seçilen kuyucuklara 50 µl stok virus, 50 µl idame besiyeri, hücre kontrol için seçilen kuyucuklara da 100 µl hücre idame besiyeri konulmuştur.

♦ Virus inokule edilmiş hücre kültürleri ilaveten 4-6 gün süreyle inkübe edilmiş ve virus CPE (sitopatik etki)'si mikroskop altında her gün gözlenmiştir. $DKID_{50}$ değeri, inokule edilmiş kültürlerin % 50'sinde sitopatik etki oluşturan virus dozunu yansıtan, Spearmann-Kaerber metodu **(Kaerber, 1964)** ile hesaplanmıştır.

Spearmann-Kaerber metoduna göre virusun titresi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Log}_{10} \text{ DKİD}_{50} = -\left[X_0 - \frac{D}{2} + D\left(\frac{R}{N}\right) \right] \qquad (3.3)$$

X_0 = Bütün kuyucukların pozitif olduğu (CPE oluştuğu) en düşük sulandırma değerinin Log_{10}'u

D = Sulandırma faktörünün Log_{10}'u

R = X_0 ve daha düşük sulandırmalarda tespit edilen pozitiflerin (CPE) toplamı

N = Her bir sulandırmada kullanılan kuyucuk sayısı

Virus sulandırmaları CPE

1/10 (10^{-1}) …… + + + + (4/4) 4 gözün 4'ünde de CPE +

1/100 (10^{-2}) ……. + + + + (4/4) 4 gözün 4' ünde de CPE +

1/1000 (10^{-3}) …… + + + + (4/4) 4 gözün 4' ünde de CPE +

1/10000 (10^{-4}) **……..** + + + + (3/4) 4 gözün 3' ünde CPE +

1/100000 (10^{-5}) …… + + - - (1/4) 4 gözün 1'nde CPE +

1/1000000 (10^{-6}) …….. - - - - (0/4) 4 gözün 4' ünde de CPE negatif

1/10000000 (10^{-7}) …… - - - - (0/4) 4 gözün 4' ünde de CPE negatif

1/100000000 (10^{-8}) …… - - - - (0/4) 4 gözün 4' ünde de CPE negatif

$X_0 = Log_{10}10^{-3}$……..$X_0 = 3$

$D = Log_{10}{}^{10}$ …….. D = 1

R = 4+3+1 …….. R = 8

N = 4

$$Log_{10}\ DK\dot{I}D_{50} = -\left[3 - \frac{1}{2} + 1\left(\frac{8}{4}\right)\right] = _\ 4.5$$

1 $DK\dot{I}D_{50}$ = $10^{-4.5}$/0.1 ml bulunmuştur (Bu değeri açıklayacak olursak; doku kültürlerine (kuyucuklara) 0.1 ml virus ekimi yapıldığında kültürlerin %50'sinde

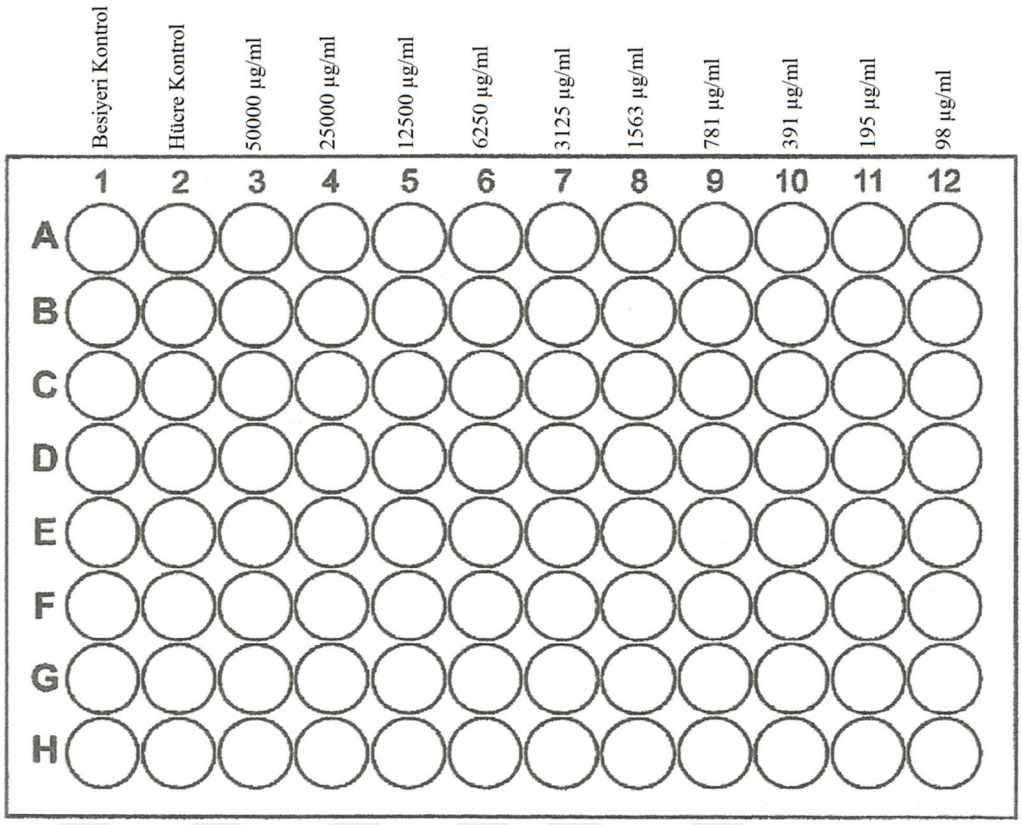
CPE meydana getiren, %50' sinde CPE meydana getirmeyen virus sulandırması, yani o virusun titresi, $10^{-4.5}$' dir).

3.2.7. Sitotoksisite testi

Agaricus blazei mantarından elde edilen metanol ve su ekstraktlarının yanı sıra, insanlarda RSV enfeksiyonlarının tedavisi için onaylanmış bir ilaç olan ribavirin (RBV)'in HEp-2 hücreleri üzerine olan toksik etkilerini belirlemek için, **(Wang ve ark., 2012)** tarafından bildirilen metot kullanılmıştır. Test, şöyle yapılmıştır:

Hücre üretme besiyeri ile konsantrasyonu 0.625×10^5 hücre/ml olacak şekilde bir HEp-2 süspansiyonu hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikrotitrasyon pleytlerinin her kuyucuğuna [besiyeri kontrol (BK) için kullanılan pleytlerin 1. kolonundaki 8 kuyucuk hariç] hazırlanan bu hücre süspansiyonundan 100'er µl ekilmiş (6250 hücre/kuyucuk) ve nemlendirilmiş % 5 CO_2'li bir inkübatörde 37ºC'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Ekstraktların stok solüsyonundan (100 mg/ml), EMEM kullanılarak %10 FBS içerecek şekilde 50000 µg/ml konsantrasyonlu bir solüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra, 50000 µg/ml konsantrasyonlu bu ekstrakt solüsyonlarından hücre üretme besiyeri kullanılarak log2 tabanına göre sulandırmalar (25000, 12500, 6250, 3125, 1563, 781, 391, 195, 98 µg/mL konsantrasyonlu sulandırmalar) hazırlanmıştır.

Hücrelerin 37°C'de nemlendirilmiş %5 CO_2 içeren bir ortamda 24 saat süreyle inkübasyonundan sonra, kuyucuklardaki süpernatant boşaltılmış ve hazırlanan bu ekstrakt sulandırmalarının (50000, 25000, 12500, 6250, 3125, 1563, 781, 391, 195, 98 µg/mL konsantrasyonlu sulandırmalar) her biri için pleytin 8'er kuyucuğu kullanılarak, bu kuyucuklara sulandırmalardan 150'şer µl konulmuştur. Pleytlerin BK olarak kullanılan 1. kolonlarındaki ve hücre kontrol (HK) olarak kullanılan 2. kolonlarındaki 8 kuyucuğun her birine 150 µl hücre üretme besiyeri konulmuştur (**Şekil 3.2**). Pleytler 48 saat daha inkübe edildikten sonra, ticari olarak elde edilen XTT (2,3-bis[2 methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-5-(phenylamino)carbonyl-2H-tetrazolium hydroxide) ayıracının 5 ml'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS (fenazin metosülfat: elektron bağlama ayıracı)'nin 0.1 ml'sinin karıştırılmasıyla hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 50'şer µl konulmuştur.



Şekil 3.2. Ekstraktların sitotoksisitesinin belirlenmesinde uygulanan doz miktarları

Pleytler boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için hafifçe çalkalanmıştır.

Pleytler, XTT formazan ürününün oluşması için 2 saat daha inkübe edilmiştir. Optik dansisite (OD)'ler, 490 nm bir test dalga boyu ve 630 nm bir referans dalga boyunda bir ELISA okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutularak 8 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir. Testler üç kopya olarak yapılmış ve sonuçlar hücre kontrole göre ortalama sitotoksisite % oranı olarak gösterilmiştir. Sitotoksisite % oranını hesaplamak için, A'nın hücre kontrolün OD'sini, B'nin ekstraktlar ile muamele edilmiş hücrelerin OD'sini temsil ettiği aşağıdaki formül kullanılmıştır **(Andrighetti-Fröhner ve ark., 2003):**

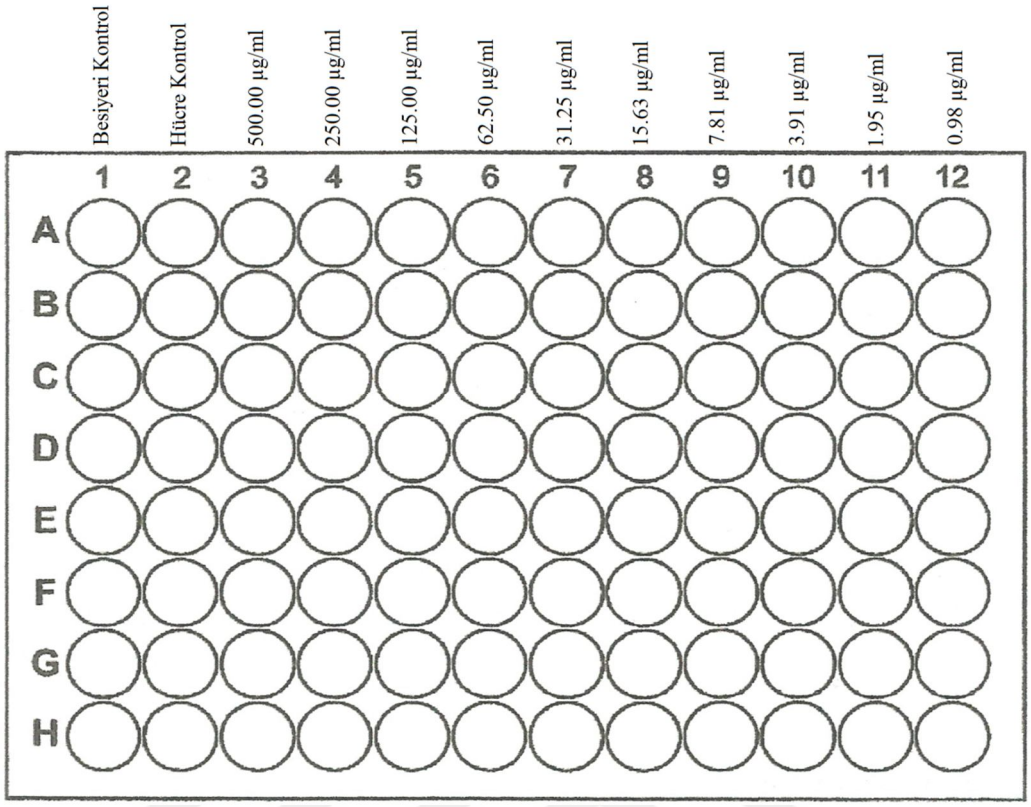
$$\text{Sitotoksisite (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100 \qquad (3.5)$$

HK'ler ile karşılaştırıldığında ekstraktlar ile muamele edilmiş hücrelerin OD'sini %50'ye kadar azaltan konsantrasyon olarak tanımlanan %50 Sitotoksik Konsantrasyon (CC_{50}), elde edilen verilerin ışığında GraphPad Prism Version 5.03

istatistik programı yardımıyla non-linear regresyon analizi uygulanarak belirlenmiştir. HK'lerin OD'leri ile karşılaştırılarak ekstraktların MNTK (maksimum non-toksik konsantrasyon)'leri belirlenmiştir. Belirlenen bu MNTK'ler, ekstraktların antiviral aktivitesinin saptanmasında kullanılmıştır.

İnsanlarda RSV enfeksiyonlarının tedavisine yönelik onaylanmış bir ilaç olan RBV'nin sitotoksik etkisini değerlendirmek için de aynı prosedür uygulanmıştır. RBV'nin stok solüsyonundan (1000 µg/ml) EMEM kullanılarak %10 FBS içerecek şekilde 500 µg/mL konsantrasyonlu bir solüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra, 500 µg/mL konsantrasyonlu bu RBV solüsyonundan üretme vasatı kullanılarak log2 tabanına göre sulandırmalar (250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98 µg/ml konsantrasyonlu sulandırmalar) hazırlanmıştır. Hücrelerin 37°C'de nemlendirilmiş %5 CO_2 içeren bir ortamda 24 saat süreyle inkübasyonundan sonra, kuyucuklardaki süpernatant boşaltılmış ve hazırlanan bu RBV sulandırmalarının (500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98 µg/ml) her biri için pleytin 8'er kuyucuğu kullanılarak, bu kuyucuklara sulandırmalardan 150'şer µL konulmuştur. Pleytin BK olarak kullanılan 1. kolonundaki ve HK olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 kuyucuğun her birine 150 µl üretme vasatı konulmuştur (**Şekil 3.3**). Pleyt 48 saat daha inkübe edilmiştir.

Bu aşamadan sonraki işlemler, ekstraktlarda uygulandığı şekilde yapılmıştır. Sitotoksisite deneyleri her bir ekstrakt ve RBV için 3 kez tekrarlanmıştır.



Şekil 3.3. Ribavirinin sitotoksisitesinin belirlenmesinde uygulanan doz miktarları

3.2.8. Antiviral aktivite testi

3.2.8.1. Ekstraktların anti-RSV aktivitesinin belirlenmesi

Ekstraktların HEp-2 hücrelerine karşı belirlenen MNTK'lerinden 10 misli daha konsantre olacak şekilde hazırlanan sulandırmalarından başlamak üzere Log2 tabanına göre hazırlananan sulandırmaları RSV'ye karşı antiviral aktiviteleri yönünden XTT metodu **(Chiang ve ark., 2002).** ile 100 $DKID_{50}$ oranında sulandırılan olan virus dozuna karşı kontrol edilmiştir. Yöntem aşağıda tarif edildiği şekilde uygulanmıştır: Tripsin ile muamele edilen HEp-2 hücrelerinin %10 FBS içeren EMEM kullanılarak 1×10^5 hücre/ml konsantrasyonda olacak şekilde süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre süspansiyonundan 96 kuyucuklu kültür pleytinin kuyucuklarına (BK olarak kullanılan pleytin 8 kuyucuğu hariç) kuyucuk başına 70 µl volümde (7000 hücre/kuyucuk) ekim yapılmıştır. 37ºC'de %5 CO_2'li ortamda 24 saat inkübasyondan sonra, kuyucuklardaki besiyerleri boşaltılmış ve pleytin tüm kuyucuklarına 70'er µl idame besiyeri (%2 FBS'li EMEM) konulmuştur. Daha sonra, kuyucuklara (pleytin BK olarak kullanılan 1. kolonu ile

HK olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 kuyucuk hariç) idame besiyeri kullanılarak 100 $DKİD_{50}$ / 0.1 ml oranında sulandırılan RSV süspansiyonundan 20'şer µl konulmuştur. Mikropleytin 3. kolonundaki 8 adet kuyucuk Virus Kontrol (VK) olarak kullanılmıştır. Mikropleytin BK olarak kullanılan 1. kolonu ile HK olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 adet kuyucuğa 20'şer µl idame besiyeri konulmuş ve pleyt 2 saat daha inkübe edilmiştir. Ekstraktların stok solüsyonlarından (100 mg/ml) %2 FBS içerecek şekilde 10 × MNTK'de sulandırmaları hazırlanmıştır (toplam 2 ml). Daha sonra, 10 × MNTK'deki ekstrakt solüsyonlarından idame besiyeri kullanılarak seri halinde 2 misli sulandırmalar hazırlanmıştır (toplam 1'er ml). İki saatlik inkübasyon süresinden sonra, 96 kuyucuklu mikropleytlerin 4. kolonlarındaki 8'er kuyucuğa hazırlanan 10 × MNTK'deki ekstrakt sulandırmalarından 10'ar µl konulmuştur. Mikropleytlerin geriye kalan 8 kolonundaki kuyucuklara (yani, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolonlardaki kuyucuklara) da ekstraktların (10×MNTK)/2, (10×MNTK)/4, (10×MNTK)/8, (10×MNTK)/16, (10×MNTK)/32, (10×MNTK)/64, (10×MNTK)/128, (10×MNTK)/256 konsantrasyonundaki sulandırmalarından 10'ar µl konulmuştur. Mikropleytlerin BK, HK ve VK olarak kullanılan kolonlarındaki kuyucuklarına da 10'ar µl idame besiyeri konulmuştur. Pleytlerin kapağı kapatılmış ve 37ºC'de %5 CO_2'li ortamda 3 gün süreyle inkübe edilmişlerdir. İnkübasyondan sonra, ticari olarak elde edilen XTT ayıracının 5 ml'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS aktivatörünün 0.1 ml'sinin karıştırılmasıyla hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 50'şer µl konulmuştur. Boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için pleytler hafifçe çalkalanmıştır. XTT formazan ürününün oluşması için pleytler 2 saat daha inkübe edilmiştir. OD'ler, 490 nm test dalga boyu ve 630 nm referans dalga boylarında bir ELISA okuyusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutularak 8 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir.

Farklı ekstrakt konsantrasyonlarının virusa karşı koruma yüzde oranları, spektrofotometrik olarak aşağıdaki formülden hesaplanmıştır **(Andrighetti-Fröhner ve ark., 2003):**

$$\text{Koruma \%'si} = [\ (A-B) / (C-B) \times 100\ ] \qquad (3.5)$$

A = 8 gözdeki her bir ekstrakt konsantrasyonu için ortalama OD

B = Virus kontrol OD'si (8 gözdeki OD değerlerinin ortalaması)

C = Hücre kontrol OD'si (8 gözdeki OD değerlerinin ortalaması)

Enfekte hücrelerin % 50'sinde koruma sağlayan ekstrakt konsantrasyonu olarak tanımlanan EC_{50} değeri, ekstrakt konsantrasyonlarına karşı belirlenen koruma % oranlarından yararlanılarak, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analiziyle belirlenmiştir. Ekstraktların seçicilik indeksi (SI) ise, CC_{50}/EC_{50} oranından hesaplanmıştır. Deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.2.8.2. RBV'nin anti-RSV aktivitesinin belirlenmesi

RBV'nin RSV'ye karşı antiviral aktivitesinin değerlendirilmesinde **(Chiang ve ark., 2002)** tarafından bildirilen metot kullanılmıştır. Test, şöyle yapılmıştır: Tripsin ile muamele edilen HEp-2 hücrelerinin %10 FBS içeren EMEM kullanılarak 1×10^5 hücre/ml konsantrasyonda olacak şekilde süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre süspansiyonundan 96 kuyucuklu kültür pleytinin kuyucuklarına (BK olarak kullanılan pleytin 8 kuyucuğu hariç) kuyucuk başına 70 µl volümde (7000 hücre/kuyucuk) ekim yapılmıştır. 37ºC'de %5 CO_2'li ortamda 24 saat inkübasyondan sonra, kuyucuklardaki besiyerleri boşaltılmış ve pleytin tüm kuyucuklarına 70'er µl idame besiyeri (%2 FBS'li EMEM) konulmuştur. Daha sonra, kuyucuklara (pleytin BK olarak kullanılan 1. kolonu ile HK olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 kuyucuk hariç) idame besiyeri kullanılarak 100 $DKİD_{50}$ / 0.1 ml oranında sulandırılan RSV süspansiyonundan 20'şer µl konulmuştur. Mikropleytin 3. kolonundaki 8 adet kuyucuk Virus Kontrol (VK) olarak kullanılmıştır. Mikropleytin BK olarak kullanılan 1. kolonu ile HK olarak kullanılan 2. kolonundaki 8 adet kuyucuğa 20'şer µl idame besiyeri konulmuş ve pleyt 2 saat daha inkübe edilmiştir.

RBV'nin stok solüsyonundan (1000 µg/ml) %2 FBS içerecek şekilde 10 × MNTK'de bir sulandırması hazırlanmıştır (toplam 2 ml). Daha sonra, 10 × MNTK'deki RBV solüsyonundan idame besiyeri kullanılarak seri halinde 2 misli sulandırmalar hazırlanmıştır (toplam 1'er ml). İki saatlik inkübasyon süresinden sonra, 96 kuyucuklu mikropleytin 4. kolonundaki 8 kuyucuğa hazırlanan 10 × MNTK'deki RBV sulandırmasından 10'ar µl konulmuştur. Mikropleytin geriye kalan 8 kolonundaki kuyucuklara (yani, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. kolonlardaki kuyucuklara) da RBV'nin (10×MNTK)/2, (10×MNTK)/4, (10×MNTK)/8, (10×MNTK)/16, (10×MNTK)/32, (10×MNTK)/64, (10×MNTK)/128,

(10×MNTK)/256 konsantrasyonundaki sulandırmalarından 10'ar µl konulmuştur. Mikropleytin BK, HK ve VK olarak kullanılan olan kolonlarındaki kuyucuklarına da 10'ar µl idame besiyeri konulmuştur. Pleytin kapağı kapatılmış ve 37ºC'de %5 CO_2'li ortamda 3 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, ticari olarak elde edilen XTT ayıracının 5 ml'si ile yine ticari olarak elde edilen PMS aktivatörünün 0.1 ml'sinin karıştırılmasıyla hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 50'şer µl konulmuştur. Pleyt, boyanın kuyucuklara homojen bir şekilde dağılması için hafifçe çalkalanmıştır. Pleyt, XTT formazan ürününün oluşması için 2 saat daha inkübe edilmiştir. OD'ler, 490 nm test dalga boyu ve 630 nm referans dalga boylarında bir ELISA okuyusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutularak 8 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir. Farklı RBV konsantrasyonlarının virusa karşı koruma yüzde oranları, spektrofotometrik olarak aşağıdaki formülden hesaplanmıştır **(Andrighetti-Fröhner ve ark., 2003):**

Koruma %'si = [(A−B) / (C−B) x 100] (3.5)

A = 8 gözdeki her bir RBV konsantrasyonu için ortalama OD

B = Virus kontrol OD'si (8 gözdeki OD değerlerinin ortalaması)

C = Hücre kontrol OD'si (8 gözdeki OD değerlerinin ortalaması

Enfekte hücrelerin % 50'sinde koruma sağlayan RBV konsantrasyonu olarak tanımlanan EC_{50} değeri, RBV konsantrasyonlarına karşı belirlenen koruma % oranlarından yararlanılarak, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analiziyle belirlenmiştir. RBV'nin seçicilik indeksi (SI) değeri ise, CC_{50}/EC_{50} oranından belirlenmiştir. Deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

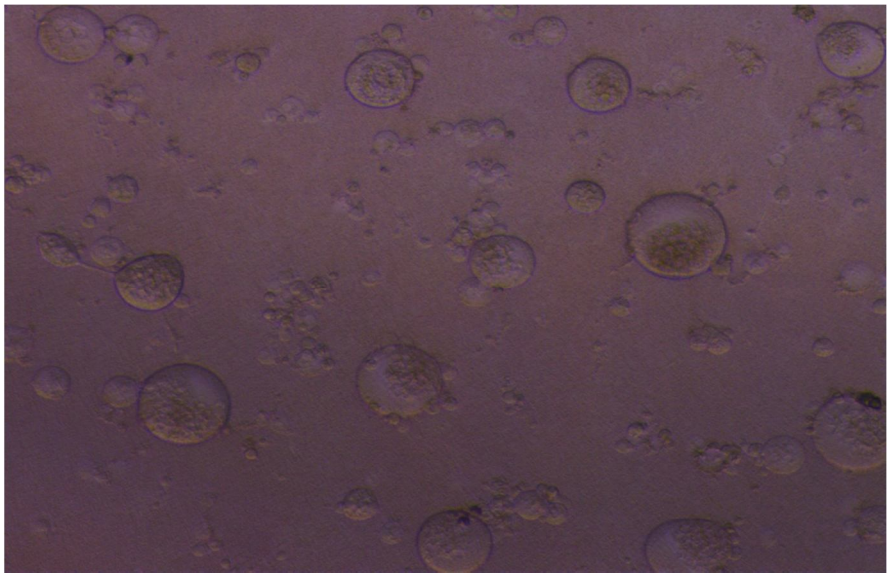
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. Virus Titrasyonu

Araştırmada kullanılan RSV'nin HEp-2 hücre kültüründe, mikrotitrasyon yöntemi ile yapılan titrasyonunda, enfeksiyözite gücü 5. gün sonunda $DKİD_{50} = 10^{-4.5}$/0.1 ml olarak saptanmıştır. Virusun HEp-2 hücrelerinde oluşturduğu CPE'ler ve enfekte olmamış HEp-2 hücreleri (HEp-2 Kontrol)'nin görünümleri Şekil 4. 1. ve Şekil 4. 2.'de görülmektedir.



Şekil 4. 1. Enfekte olmamış HEp-2 hücrelerinin görünümü (Orijinal)



Şekil 4. 2. RSV'nin HEp-2 hücrelerinde oluşturduğu CPE görünümü (Orijinal)

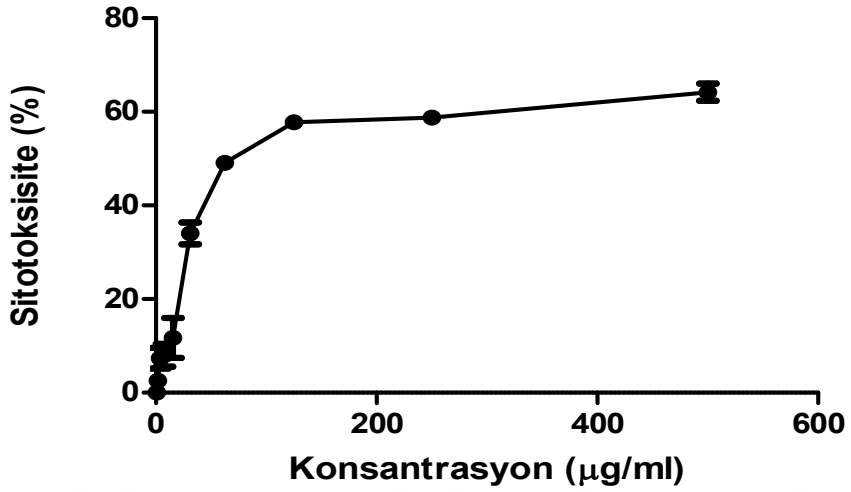
4.2. Sitotoksisite Testi Sonuçları

Agaricus blazei metanol ve su ekstraktlarının ve HRSV için pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'nin HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini değerlendirmek için XTT yöntemi uygulanmıştır. 48 saatlik inkübasyon periyodundan sonra RBV'nin ve ekstraktların MNTK'ları ve CC_{50} değerleri belirlenmiştir.

Ribavirin'in MNTK'sini ve CC_{50} değerini saptamak için 3 tekrar halinde gerçekleştirilen test sonucunda elde edilen hesaplanan sitotoksisite % oranları Çizelge 4.1'de gösterilmektedir. Ribavirin'in MNTK'si 0.98 µg/ml, CC_{50} değeri ise 117 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1, 4.7 ve Şekil 4.3).

Çizelge 4.1. Ribavirin'in MNTK ve CC_{50} değerlerini belirlemek için uygulanan XTT testi sonucunda hesaplanan sitotoksisite % oranları

Konsantrasyon (µg/ml)	% Sitotoksisite 1. Deney	% Sitotoksisite 2. Deney	% Sitotoksisite 3. Deney	Konsantrasyon (µg/ml)
500.00	61.76	67.83	62.98	500.00
250.00	58.82	60.00	57.43	250.00
125.00	55.88	59.13	58.26	125.00
62.50	50.00	47.83	49.45	62.50
31.25	30.15	38.26	33.67	31.25
15.63	19.12	4.35	11.56	15.63
7.81	11.76	3.48	8.78	7.81
3.91	11.03	3.48	7.56	3.91
1.95	3.68	1.74	2.34	1.95
0.98 (MNTK)	0.00	0.00	0.00	0.98 (MNTK)
HK	0.00	0.00	0.00	HK

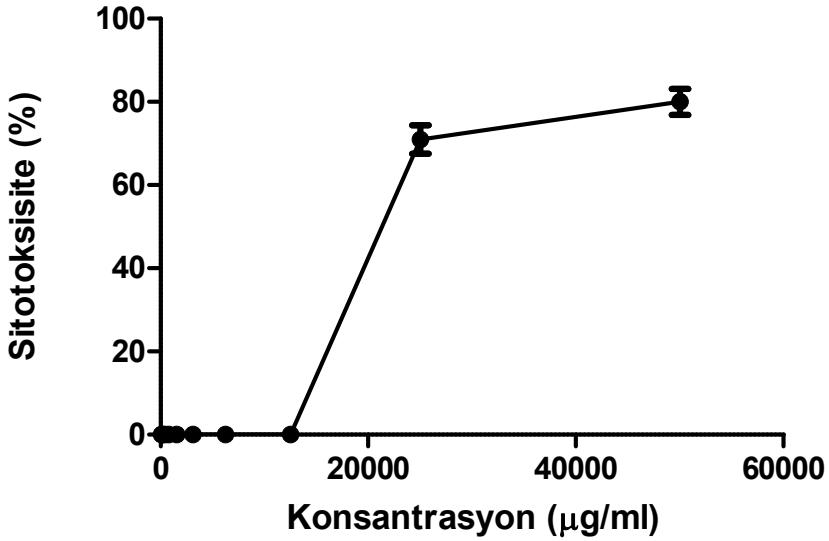


Şekil 4.3. Ribavirin'in sitotoksik aktivitesi (MNTK: 0.98 µg/ml; CC_{50} : 117 µg/ml). HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksisite, XTT testi ile ölçülmüştür. CC_{50} değeri, sitotoksisite yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenmiştir.

Agaricus blazei'den elde edilen metanol ve su ekstraktlarının HEp-2 hücrelerine karşı MNTK'lerini ve CC50 değerlerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda hesaplanan sitotoksisite % oranları Çizelge 4.2 ve 4.3'de görülmektedir. Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi, A. blazei metanol ekstraktının MNTK'si 12500 µg/ml; sitotoksisite yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenen CC50 değeri ise 21684.18 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4). A. blazei su ekstraktının ise MNTK'si 25000 µg/ml (Çizelge 4.3), CC50 değeri 48107.40 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.5).

Çizelge 4.2. *Agaricus blazei* metanol ekstraktı (ME)'nın HEp-2 hücrelerine karşı MNTK'unu ve CC_{50} değerini belirlemek için uygulanan XTT testi sonucunda hesaplanan sitotoksisite % oranları

Konsantrasyon (µg/ml)	% Sitotoksisite 1. Deney	% Sitotoksisite 2. Deney	% Sitotoksisite 3. Deney
50000	84.96	74.32	80.72
25000	71.50	64.78	76.56
12500 (MNTK)	0.00	0.00	0.00
6250	0.00	0.00	0.00
3125	0.00	0.00	0.00
1563	0.00	0.00	0.00
781	0.00	0.00	0.00
391	0.00	0.00	0.00
195	0.00	0.00	0.00
98	0.00	0.00	0.00
HK	0.00	0.00	0.00

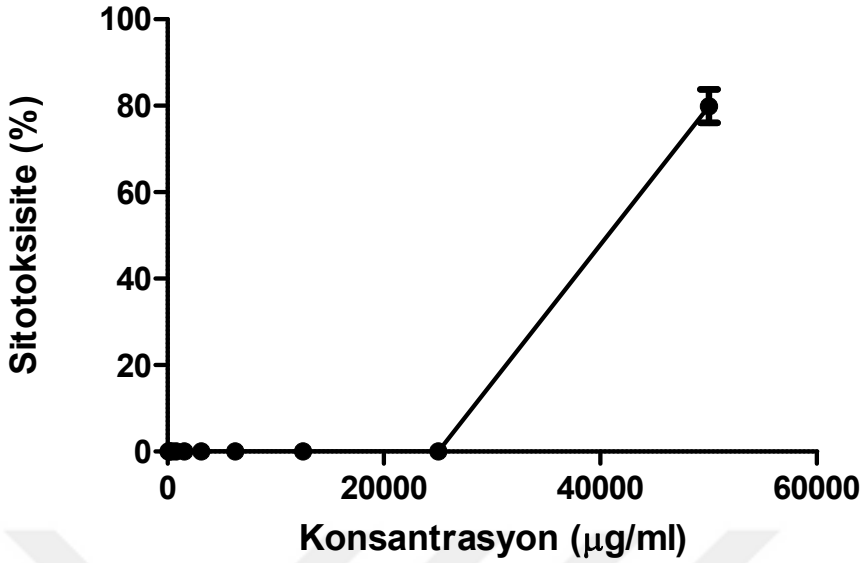


Şekil 4.4. *Agaricus blazei* metanol ekstraktının HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi (MNTK: 12500 µg/ml; CC_{50}: 21684.18 µg/ml). Hep-2 hücreleri üzerine

sitotoksisite, XTT testi ile ölçülmüştür. CC_{50} değeri, sitotoksisite yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. *Agaricus blazei* su ekstraktının HEp-2 hücrelerine karşı MNTK'sini ve CC50 değerini belirlemek için uygulanan XTT testi sonucunda hesaplanan sitotoksisite % oranları

Konsantrasyon (µg/ml)	% Sitotoksisite 1. Deney	% Sitotoksisite 2. Deney	% Sitotoksisite 3. Deney
50000	84.77	82.68	72.30
25000 (MNTK)	0.00	0.00	0.00
12500	0.00	0.00	0.00
6250	0.00	0.00	0.00
3125	0.00	0.00	0.00
1563	0.00	0.00	0.00
781	0.00	0.00	0.00
391	0.00	0.00	0.00
195	0.00	0.00	0.00
98	0.00	0.00	0.00
HK	0.00	0.00	0.00



Şekil 4.5. *Agaricus blazei* su ekstraktının HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi (MNTK: 25000 µg/ml; CC_{50}: 48107.40 µg/ml). Hep-2 hücreleri üzerine sitotoksisite, XTT testi ile ölçülmüştür. CC_50 değeri, sitotoksisite yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenmiştir.

4.3. Antiviral Aktivite Testi Sonuçları

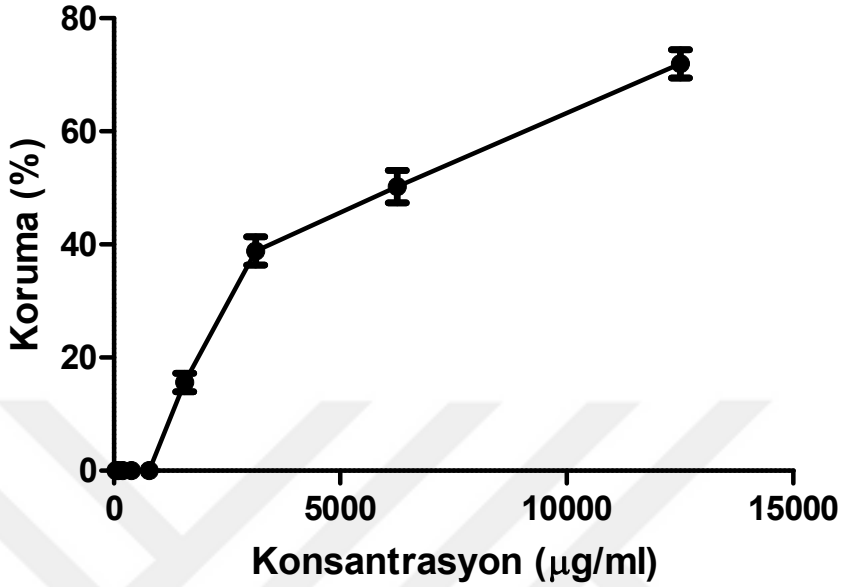
Agaricus blazei metanol ve su ekstraktının MNTK'den başlamak üzere log2 tabanına göre hazırlanan sulandırmalarının HRSV'ye karşı koruma yüzde oranlarını saptamak için 3 tekrar halinde gerçekleştirilen kolorimetrik XTT testi sonucunda hesaplanan koruma % oranları, sırasıyla, Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5'te gösterilmektedir. *Agaricus blazei* metanol ekstraktının EC_{50} değeri 5692.31 µg/ml, SI değeri 3.81 olarak tespit edilirken (Şekil 4.6 ve Çizelge 4.7), *Agaricus blazei* su ekstraktının EC_{50} değeri 4433.28 µg/ml, SI değeri ise 10.85 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.7 ve Çizelge 4.7).

Çizelge 4.4. *Agaricus blazei* metanol ekstraktının RSV'ye karşı koruma yüzde oranları

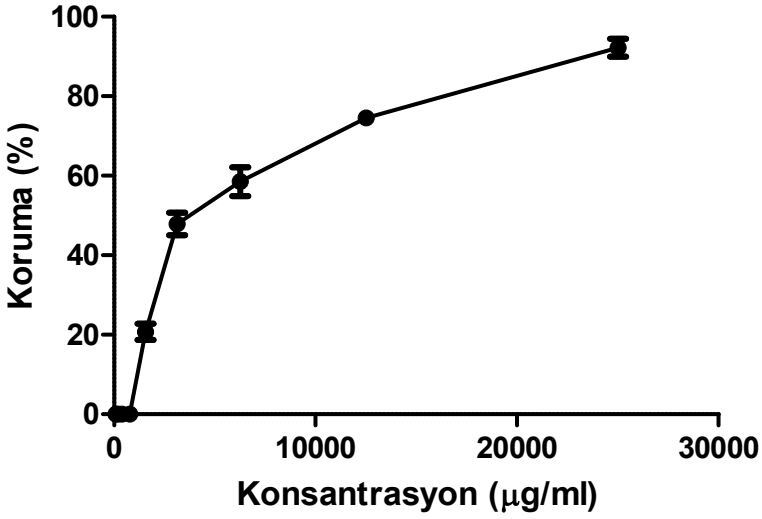
Konsantrasyon (µg/ml)	Koruma (%) 1. Deney	Koruma (%) 2. Deney	Koruma (%) 3. Deney
49	0.00	0.00	0.00
98	0.00	0.00	0.00
195	0.00	0.00	0.00
391	0.00	0.00	0.00
781	0.00	0.00	0.00
1563	12.71	18.44	15.66
3125	35.85	43.82	36.88
6250	50.15	55.22	45.33
12500	67.33	75.88	72.66

Çizelge 4.5. *Agaricus blazei* su ekstraktının RSV'ye karşı koruma yüzde oranları

Konsantrasyon (µg/ml)	Koruma (%) 1. Deney	Koruma (%) 2. Deney	Koruma (%) 3. Deney
98	0.00	0.00	0.00
195	0.00	0.00	0.00
391	0.00	0.00	0.00
781	0.00	0.00	0.00
1563	17.86	24.68	19.62
3125	46.28	53.40	43.91
6250	58.31	52.35	64.88
12500	76.36	71.22	75.99
25000	96.28	91.87	88.55



Şekil 4.6. *Agaricus blazei* metanol ekstraktının anti-RSV aktivitesi (EC_{50} = 5692.31 μg/ml, SI = CC_{50}/EC_{50} = 21684.18 /5692.31 = 3.81). EC_{50} değeri, koruma yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenmiştir.



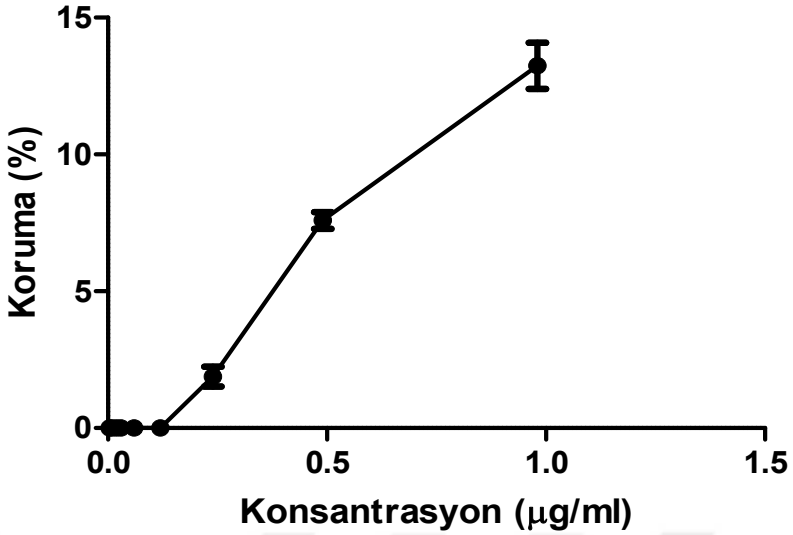
Şekil 4.7. *Agaricus blazei* su ekstraktının anti-RSV aktivitesi (EC_{50} = 4433.28 μg/ml, SI = CC_{50}/EC_{50} = 48107.40 /4433.28 = 10.85). EC_{50} değeri, koruma yüzdesine göre

çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenmiştir.

RSV inhibisyonu için pozitif kontrol olarak kullanılan Ribavirin'in EC_{50} (enfekte hücrelerin % 50'sinde koruma sağlayan konsantrasyon) değerini saptamak için 3 kopya halinde gerçekleştirilen test sonucunda hesaplanan koruma % oranları Çizelge 4.6'da ve son olarak hesaplanan koruma % oranlarına göre çizilen grafik ise Şekil 4.8'de görülmektedir. RBV'nin EC_{50} değeri, GraphPad Prism istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analiziyle 4.19 µg/ml olarak belirlenmiş (Şekil 4.8 ve Çizelge 4.7), CC_{50}'nin EC_{50}'ye oranı olarak tanımlanan seçicilik indeksi (SI) ise, 27.92 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.6. Ribavirin'in RSV'ye karşı koruma yüzde oranlarını belirlemek amacıyla uygulanan XTT testi sonucunda hesaplanan koruma % oranları

Konsantrasyon (µg/ml)	Koruma (%) 1. Deney	Koruma (%) 2. Deney	Koruma (%) 3. Deney
0.004	0.00	0.00	0.00
0.010	0.00	0.00	0.00
0.020	0.00	0.00	0.00
0.030	0.00	0.00	0.00
0.060	0.00	0.00	0.00
0.120	0.00	0.00	0.00
0.240	1.32	2.56	1.78
0.490	7.89	6.98	7.90
0.980	11.84	14.76	13.12



Şekil 4.8. Ribavirin'in anti-RSV aktivitesi (EC_{50}: 4.19 µg/ml; SI= 27.92). EC_{50} değeri, koruma yüzdesine göre çizilen doz-cevap eğrisinden, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programıyla belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. *Agaricus blazei* metanol ve su ekstraktlarının sitotoksisite ve antiviral aktivite deneyleri toplu sonuçları

Mantar Türü	**Ekstrakt Türü**	**Toksisite**		**Antiviral aktivite**	
		MNTK (µg/ml)	CC_{50} (µg/ml)	EC_{50} (µg/ml)	SI
Agaricus blazei	Metanol	12500	21684.18	5692.31	3.81
	Su	25000	48107.40	4433.28	10.85
Ribavirin (RBV)		0.98	117.00	4.19	27.92

5. TARTIŞMA

HRSV, üst solunum mukozasını enfekte edebilmekte ve başlangıçta nazofarenkste replike olabilmektedir. HRSV muhtemelen sekresyonların aspirasyonu ile alt solunum sistemine hızla yayılabilmektedir. HRSV esas olarak alt solunum yollarının patolojisi ile morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Bu nedenle, HRSV enfeksiyonunun yönetimi hem üst hem de alt solunum yollarının viral enfeksiyonunu engellemek için etkili bir stratejiye ihtiyaç duymaktadır **(Collins, 2007)**.

Bu çalışma, *Agaricus blazei*'den elde edilen metanol ve su ekstraktlarının insan üst solunum sistemi hücrelerinde (HEp-2) RSV'nin neden olduğu sitopatik etkilerin inhibe edilmesinde, RSV enfeksiyonlarının tedavisinde standart ilaç olarak kullanılan RBV kadar olmasa da, önemli sayılabilecek derecede etkili olduğunu göstermiştir. Çizelge 4.7'de görüldüğü gibi, *Agaricus blazei* metanol ve su ekstraktlarının EC_{50} değerleri sırasıyla 5692.31 µg/ml ve 4433.28 µg/ml olarak tespit edilirken, SI değerleri sırasıyla 3.81 ve 10.85 olarak tespit edilmiştir. RBV'nin EC_{50} ve SI değerleri ise sırasıyla 4.19 µg/ml ve 27.92 olarak tespit edilmiştir. Yine, Çizelge 4.7'de görüldüğü gibi, ekstraktların HEp-2 hücreleri üzerine RSV enfeksiyonlarına karşı standart ilaç olarak kullanılan RBV'den daha az toksik olduğu, ekstraktlar ve RBV'nin CC_{50} değerlerinin EC_{50} değerlerinden daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Bu durum, antiviral bir ajanın güvenirliği bakımından önemlidir **(Schinazi ve ark., 2009)**. Ayrıca, **Chattopadhyay ve ark., (2009)**, 3 ve 3'den büyük SI değerlerinin test ekstraktlarının potansiyel olarak güvenilir antiviral aktivitesinin göstergesi olarak kabul edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Yapılan bu çalışma dışında, *Agaricus* türlerine ait ekstrakt ve bileşenlerin anti-RSV aktivitelerinin değerlendirildiği hiçbir çalışma bulunmamakta, diğer DNA (herpes simplex virus) ve RNA viruslarına (western equine encephalitis virus, poliovirus, hepatitis c virus) karşı antiviral aktivitelerin değerlendirilmesine yönelik ise çok az çalışma bulunmaktadır **(Kaij-A-Kamb ve ark., 1991; Rusak ve ark., 1997; Karagöz ve ark., 2002; Koca ve Özçelik, 2009; Özçelik ve ark., 2009)**.

A. blazei'nin kültürü yapılan misellerinden ve bazidyokarplarından elde edilen su ekstraktları, %0-50 arasında değişen etanol konsantrasyonları ile fraksiyonlarına ayrılmış ve Vero hücreleri üzerinde sitopatik etkilere sahip olan western equine encephalitis virus (WEE), herpes simplex virus (HSV) ve polio virus olarak adlandırılan viruslara karşı *in vitro* antiviral aktiviteleri yönünden test edilmişlerdir. 100 µg/ml bir test konsantrasyonunda, tüm miselyal fraksiyonlar, özellikle virus ile enfekte VERO hücrelerinde CPE'yi tamamen inhibe eden, %44 ve %50'lik etanol konsantrasyonlarından oluşan fraksiyonlar, WEE virusuna karşı güçlü antiviral aktivite göstermişlerdir. Bu fraksiyonlarda aynı zamanda HSV'ye karşı da zayıf antiviral aktivite gözlenmiştir; ancak, miselyal konsantrasyonların hiçbiri polio virusa karşı aktivite göstermemişlerdir. *A. blazei* bazidyokarplarından elde edilen etanol ekstraktları 100 µg/ml test konsantrasyonunda WEE ve Herpes simplex viruslarına karşı herhangi bir antiviral aktivite göstermemiştir. Bir haftalık kültür sonrasında polio virusa karşı zayıf bir CPE inhibisyonu gözlenmiş, ancak 2 hafta sonra bu etki ortadan kalkmıştır (**Sorimachi ve ark., 2001a). Grinde ve ark., (2006)**, tarafından yapılan bir çalışmada, interferon ile düzenli tedaviye yanıt alınamamış beş kronik Hepatit C (HCV) hastasının tedavisinde *A. blazei* ekstraktının olası bir rolü araştırılmıştır. Hastalara imalatçı firma tarafından tavsiye edilen şekilde 1 hafta süreyle günde 3 kez 20 ml *A. blazei* ekstraktı (Gold label from ACE Co., Ltd., Gifu-ken, Japan) verilmiştir. HCV RNA'nın miktarı, ekstrakt ile muameleden önce, 4 gün sonra ve 7 gün sonra hastalardan alınan kan örneklerinde ölçülmüştür. Araştırıcılar, *A. blazei* ekstraktıyla bir hafta muameleden sonra virusun ortalama titresinin nispeten düşmesine rağmen, farkın açıkça belirgin olmadığını ve ekstraktın kronik Hepatit C tedavisi için uygun olmadığına hükmetmişlerdir. **(Faccin ve ark., 2007)**, *A. blazei*'yi *in vitro* polio virus enfeksiyonunu önleme yeteneği yönünden daha büyük ölçüde araştırmışlardır. Araştırıcılar su ekstraktlarını, etanol ekstraktlarını ve izole edilen bir polisakkariti Hep-2 hücrelerini kullanarak polio virus tip 1'e karşı antiviral aktiviteleri yönünden incelemişlerdir. En etkili olanının etanol ekstraktı olduğu (bu ekstrakt kontrol grubuna göre plak sayısında %88 bir azalma göstermiştir), üç test solüsyonunun tümünde konsantrasyona bağlı olatrak plak sayısında bir azalma gözlemlenmiştir. Su ekstraktı ve polisakkarit için plakların sayısındaki azalma yüzdesi, sırasıyla %50 ve %67 olarak tespit edilmiştir. Tüm test

maddeleri, poliovirus enfeksiyonu esnasında eklendiğinde daha etkili olmuş, ancak viral adsorpsiyon üzerinde çok az etkileri var ve virusidal değillerdir; bu da test maddelerinin poliovirus replikasyonunun ilk evrelerinde etkili olduklarını akla getirmektedir.

Agaricus blazei'den izole edilen polisakkarit (homoglukan: (1→6)-β-glucan; heteroglukan: mannogalactoglucan) ve polisakkarit-protein komplekslerinin [(1→6)-ß-D-glucan–protein] antitümör aktiviteye sahip olmaları yanında **(Cho ve ark., 1999; Kobayashi ve ark., 2005; Hong ve Choi, 2007)**, antiviral aktiviteye de sahip oldukları ve bu antiviral etkinin viral replikasyonun inhibisyonuna veya dolaylı olarak immunostimülasyon aktiviteye bağlı olabileceği bildirilmiştir **(Liu ve ark., 2004; Lindequist ve ark., 2005)**. Dolayısıyla, yapılan bu çalışmada *A. blazei* ekstraktlarının anti-RSV aktiviteleri, bu bileşiklerin veya başka bir bileşiğin varlığına bağlı olabilir. Bu çalışma, *A. blazei*'nin anti-RSV aktivitesine yönelik olarak yapılan ilk çalışmadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada, kolorimetrik XTT testi ile anti-RSV aktiviteleri yönünden test edilen *Agaricus blazei* mantarına ait metanol ve su ekstraktlarının pozitif kontrol olarak kullanılan RBV ile eşdeğerde hatta daha da yüksek sayılabilecek anti-RSV aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Ancak, ekstraktların kimyasal kompozisyonlarının tespit edilerek elde edilen saf bileşiklerin teste tabi tutulmamasının doğru ve güvenilir sonuçlar elde edilmesi bakımından önemli bir eksiklik olduğu da bir gerçektir. Bu nedenle, bundan sonra yapılacak araştırmalarda bu eksiklikler giderilerek, aynı türe ait ekstraktlarda anti-RSV aktiviteden sorumlu bileşikler ve bu bileşiklerin antiviral etki mekanizmaları tespit edilmeye çalışılacaktır.

7. KAYNAKLAR

Adachi, K., Nanba, H., Otsuka, M. ve Kuroda, H., 1988, Blood pressure-lowering activity present in the fruit body of grifola frondosa (maitake). I, *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 36 (3), 1000-1006.

Ahn, W. S., Kim, D. J., Chae, G. T., Lee, J. M., Bae, S. M., Sin, J. I., Kim, Y. W., Namkoong, S. E. ve Lee, I., 2004, Natural killer cell activity and quality of life were improved by consumption of a mushroom extract, Agaricus blazei Murill Kyowa, in gynecological cancer patients undergoing chemotherapy, *International Journal of Gynecological Cancer*, 14 (4), 589-594.

Al-Hilli, A. L. ve Smith, J., 1992, Influence of propionic acid on growth and aflatoxin production by Aspergillus flavus in liquid submerged and solid substrate conditions, *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 11 (2), 57-60.

Andrighetti-Fröhner, C., Antonio, R., Creczynski-Pasa, T., Barardi, C. ve Simões, C., 2003, Cytotoxicity and Potential Antiviral Evaluation of Violacein Produced by Chromobacterium violaceum, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98 (6), 843-848.

Angeli, J. F., Ribeiro, L., Gonzaga, M., Soares, S. d. A., Ricardo, M., Tsuboy, M., Stidl, R., Knasmueller, S., Linhares, R. ve Mantovani, M., 2006, Protective effects of β-glucan extracted from Agaricus brasiliensis against chemically induced DNA damage in human lymphocytes, *Cell Biology and Toxicology*, 22 (4), 285-291.

Arora, D., 1986, Mushrooms demystified, Ten Speed Press.

Barbisan, L. F., Miyamoto, M., Scolastici, C., Salvadori, D.M.F., Ribeiro, L.R., da Eira, A.F., de Camargo, J.L.V., 2002, Influence of aqueous extract of Agaricus blazei on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. Journal of Ethnopharmacology, (83), 25-32.

Black, C. P., 2003, Systematic review of the biology and medical management of respiratory syncytial virus infection, *Respiratory care*, 48 (3), 209-233.

Borchers, A. T., Stern, J. S., Hackman, R. M., Keen, C. L. ve Gershwin, M. E., 1999, Mushrooms, tumors, and immunity, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 221 (4), 281-293.

Bosch, M. E., Sánchez, A. R., Rojas, F. S. ve Ojeda, C. B., 2007, Ribavirin: analytical determinations since the origin until today, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 45 (2), 185-193.

Breene, W. M., 1990, Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms, *Journal of Food Protection*, 53 (10), 883-894.

Cai, Y.-M., Zhang, Q-X., Xiao, Y-X., Jiao, X-Y., 2008, Effect of Agaricus blazei Murill on proliferation and apoptosis of acute lymphocytic leukemia cells in vitro. Guangdong Yixue (29(2)), 204-206.

Chan, Y., Chang, T., Chan, C., Yeh, Y., Chen, C., Shieh, B. ve Li, C., 2007, Immunomodulatory effects of Agaricus blazei Murill in Balb/cByJ mice, *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 40 (3), 201.

Chang, S.-t. ve Miles, P. G., 1989, Edible mushrooms and their cultivation, *Edible mushrooms and their cultivation.*

Chang, S. ve Miles, P., 1992, Mushroom biology—a new discipline, *Mycologist*, 6 (2), 64-65.

Chang, S. ve Buswell, J., 1996, Mushroom nutriceuticals, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12 (5), 473-476.

Chattopadhyay, D., Chawla-Sarkar, M., Chatterjee, T., Dey, R. S., Bag, P., Chakraborti, S. ve Khan, M. T. H., 2009, Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products, *New Biotechnology*, 25 (5), 347-368.

Chen, C., Chu, H., Hao, J., Li, 2006, Influences of selenium-rich protein and polysaccharide extracted from selenium-rich Agaricus blazei on S180 sarcomabearing mice. Zhongyaocai (29(11):), 1215-1217.

Chen, C., Hao, J., Chu, H-Y., Liu, Y-Q., Zhang, Y-M., 2007, An investigation of antitumour activity of mice serum and apoptosis of K562 cells treated with selenium-protein polysaccharide. Zhongguo Xinyao Zazhi, (16(17)), 1361-1364.

Cheung, P. C., 1996, The hypocholesterolemic effect of extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom, *Nutrition Research*, 16 (11-12), 1953-1957.

Chiang, L., Chiang, W., Chang, M., Ng, L. ve Lin, C., 2002, Antiviral activity of Plantago major extracts and related compounds in vitro, *Antiviral research*, 55 (1), 53-62.

Chihara, G., 1992, Immunopharmacology of lentinan, a polysaccharide isolated from Lentinus edodes: its application as a host defense potentiator, *International Journal of Oriental Medicine*, 17 (5).

Chin, J., Magoffin, R. L., Shearer, L. A., Schieble, J. H. ve Lennette, E. H., 1969, Field evaluation of a respiratory syncytial virus vaccine and a trivalent parainfluenza virus vaccine in a pediatric population, *American journal of epidemiology*, 89 (4), 449-463.

Cho, S.-M., Park, J.-S., Kim, K.-P., Cha, D.-Y., Kim, H.-M. ve Yoo, I.-D., 1999, Chemical features and purification of immunostimulating polysaccharides from the fruit bodies of Agaricus blazei, *The Korean Journal of Mycology*, 27 (2), 170-174.

Chu, H., Chen, C., 2006., Study on apoptosis of K562 cells induced by tumor-bearing herb serum of selenium-protein polysaccharide extracted from Qinba seleniummushroom (Agaricus blazei). Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Jijiu Zazhi 13(3), 142-145.

Clark, A. M., 1996, Natural products as a resource for new drugs, *Pharmaceutical research*, 13 (8), 1133-1141.

Cochran, K., Nishikawa, T. ve Beneke, E., 1966, Botanical sources of influenza inhibitors, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 6, 515.

Collins, P. L., 2007, Respiratory syncytial virus and metapneumovirus, *Fields virology*, 1601-1646.

Cowan, M. M., 1999, Plant products as antimicrobial agents, *Clinical microbiology reviews*, 12 (4), 564-582.

Cragg, G., Body, M., Cardellina, J., Grever, M., Schepartz, S. ve Spader, K., 1993, The role of plants in the drug discovery program of the US manuipulation. eln., International Crop Science 1 Maddison, USA", *Crop Science Society of America*, 179-196.

Cragg, G. M., Newman, D. J. ve Snader, K. M., 1997, Natural products in drug discovery and development, *Journal of natural products*, 60 (1), 52-60.

Czarnecki, R. ve Grzybek, J., 1995, Antiinflammatory and vasoprotective activities of polysaccharides isolated from fruit bodies of higher Fungi P. 1. polysaccharides from Trametes gibbosa (Pers.: Fr) Fr.(Polyporaceae), *Phytotherapy Research*, 9 (2), 123-127.

Daba, A. ve Ezeronye, O., 2003, Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms, *African Journal of Biotechnology*, 2 (12), 672-678.

Dubovi, E., Geratz, J., Shaver, S. ve Tidwell, R., 1981, Inhibition of respiratory syncytial virus-host cell interactions by mono-and diamidines, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 19 (4), 649-656.

Ebina, T., 2004, Antitumor Effect of a Hot Water Extract of Agaricus blazei," Himematsutake," Combined with an Organogermanium Compound, Ge-132, *Biotherapy-Tokyo-*, 18 (2), 161-166.

Endo, A., Kuroda, M. ve Tsujita, Y., 1976, ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterogenesis produced by Penicillium citrinum, *The Journal of antibiotics*, 29 (12), 1346-1348.

Eo, S.-K., Kim, Y.-S., Lee, C.-K. ve Han, S.-S., 1999, Antiviral activities of various water and methanol soluble substances isolated from Ganoderma lucidum, *Journal of ethnopharmacology*, 68 (1), 129-136.

Faccin, L., Benati, F., Rincão, V., Mantovani, M., Soares, S., Gonzaga, M., Nozawa, C. ve Carvalho Linhares, R., 2007, Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from Agaricus brasiliensis against poliovirus type 1, *Letters in applied microbiology*, 45 (1), 24-28.

Fan, L., Soccol, A. T., Pandey, A., Germano, S., Rau, R., Pedroso, A. L. ve Soccol, C. R., 2003, Production of polysaccharide by culinary-medicinal mushroom Agaricus brasiliensis S. Wasser et al. LPB 03 (Agaricomycetideae) in submerged fermentation and its antitumor effect, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 5 (1).

Farnsworth, N. R., 1995, An old source for new drugs. Pharmaceutical Technology(August), 14-15.

Firenzuoli, F., Gori, L. ve Lombardo, G., 2008, The medicinal mushroom Agaricus blazei murrill: review of literature and pharmaco-toxicological problems, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5 (1), 3-15.

Fleming, A., 1929, On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae, *British journal of experimental pathology*, 10 (3), 226.

Florey, H. W., Chain, E., Heatley, N. G., Jennings, M. A., Sanders, A., Abraham, E.-P. ve Florey, M., 1949, Antibiotics. A survey of penicillin, streptomycin, and other antimicrobial substances from fungi, actinomyeetes, bacteria, and plants. Volume II, *Antibiotics. A survey of penicillin, streptomycin, and other antimicrobial substances from fungi, actinomyeetes, bacteria, and plants. Volume II.*

Foye, W. O., Lemke, T.L., Williams, D.A., 1995, Principles of Medicinal Chemistry, Williams & Wilkins, Baltimore, M.D.

Frey, H. R. ve Liess, B., 1971, Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit eines stark zytopathogenen VD-MD-Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode, *Zoonoses and Public Health*, 18 (1), 61-71.

Fujii, T., Maeda, H., Suzuki, F. ve Ishida, N., 1978, Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from culture mycelia of Lentinus edodes, *The Journal of antibiotics*, 31 (11), 1079-1090.

Fujimiya, Y., Kobori, H., Oshiman, K., Soda, R. ve Ebina, T., 1998a, Tumoricidal activity of high molecular weight polysaccharides derived from Agaricus blazei via oral administration in the mouse tumor model, *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi* 45, 246-252.

Fujimiya, Y., Suzuki, Y., Oshiman, K.-i., Kobori, H., Moriguchi, K., Nakashima, H., Matumoto, Y., Takahara, S., Ebina, T. ve Katakura, R., 1998b, Selective tumoricidal effect of soluble proteoglucan extracted from the basidiomycete, Agaricus blazei Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis, *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 46 (3), 147-159.

Fujimiya, Y., Suzuki, Y., Katakura, R. ve Ebina, T., 1999, Tumor-specific cytocidal and immunopotentiating effects of relatively low molecular weight products derived from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, *Anticancer Research*, 19 (1A), 113-118.

Fujimiya, Y., Yamamoto, H., Noji, M. ve Suzuki, I., 2000, Peroral effect on tumor progression of soluble β-(1, 6)-glucans prepared by acid treatment from Agaricus blazei Murr.(Agaricaceae, Higher Basidiomycetes), *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2 (1), 43-49.

Fukushima, Y., Itoh, H., Fukase, T. ve Motai, H., 1991, Stimulation of protease production byAspergillus oryzae with oils in continuous culture, *Applied microbiology and biotechnology*, 34 (5), 586-590.

Gonzaga, M. L. C., Bezerra, D. P., Alves, A. P. N. N., de Alencar, N. M. N., de Oliveira Mesquita, R., Lima, M. W., de Aguiar Soares, S., Pessoa, C., de Moraes, M. O. ve Costa-Lotufo, L. V., 2009, In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by an α-(1→ 4)-glucan–β-(1→ 6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from Agaricus blazei Murill, *Journal of natural medicines*, 63 (1), 32-40.

Grinde, B., Hetland, G. ve Johnson, E., 2006, Effects on gene expression and viral load of a medicinal extract from Agaricus blazei in patients with chronic hepatitis C infection, *International Immunopharmacology*, 6 (8), 1311-1314.

Guterrez, Z., Mantovani, M., Eira, A., Ribeiro, L. ve Jordão, B., 2004, Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of Agaricus blazei Murrill in vitro, *Toxicology in Vitro*, 18 (3), 301-309.

Hamburger, M. ve Hostettmann, K., 1991, 7. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine, *Phytochemistry*, 30 (12), 3864-3874.

Hashimoto, T., Nonaka, Y., Minato, K.-i., Kawakami, S., Mizuno, M., Fukuda, I., Kanazawa, K. ve Ashida, H., 2002, Suppressive effect of polysaccharides from the edible and medicinal mushrooms, Lentinus edodes and Agaricus blazei, on the expression of cytochrome P450s in mice, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66 (7), 1610-1614.

Hikino, H., Konno, C., Mirin, Y. ve Hayashi, T., 1985, Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of Ganoderma lucidum fruit bodies, *Planta medica*, 51 (04), 339-340.

Hirasawa, M., Shouji, N., Neta, T., Fukushima, K. ve Takada, K., 1999, Three kinds of antibacterial substances from Lentinus edodes (Berk.) Sing.(Shiitake, an edible mushroom), *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11 (2), 151-157.

Ho, W. S., 2008, Antiviral Activity of the Medicinal Plants, Adina Pilulifera, Narcissus Tazetta and Wikstroemia Indica, Against Respiratory Syncytial Virus, *Chinese University of Hong Kong*, Master of Philosophy in Biology.

Hong, J. H. ve Choi, Y. H., 2007, Physico-chemical properties of protein-bound polysaccharide from Agaricus blazei Murill prepared by ultrafiltration and spray drying process, *International journal of food science & technology*, 42 (1), 1-8.

Hruska, J. F., Morrow, P. E., Suffin, S. C. ve Douglas, R. G., 1982, In vivo inhibition of respiratory syncytial virus by ribavirin, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 21 (1), 125-130.

Hu, T. X., Chen, J.W., Xu, J.Y., Lu, J.Y., Yang, Q.Y., 1992, Effects of polysaccharide-peptide of Coriolus and polysaccharide of Ganoderma on scavenging active oxygen species. Acta Biochimica Biophysica Sinica, (24), 465-470.

Ikekawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nakanishi, M., Fukuoka, F., 1969, Antitumour activity of aqueous extracts of edible mushrooms. Cancer Research (29), 734-735.

Ito, H., Shimura, K., Itoh, H. ve Kawade, M., 1997, Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from Agaricus blazei (Iwade strain 101)" Himematsutake" and its mechanisms in tumor-bearing mice, *Anticancer Research*, 17 (1A), 277-284.

Ito, H., Itoh, H. , 2000, Antiproliferative action in human lymphoid leukemia Molt4B cells by polysaccharide from Agaricus blazei Murrill (Iwade strain 101) "Himematsutake". *Igaku to Seibutsugaku*, 140 (3), 59-62.

Ito, H., Shimura, K., 1980, Extraction of anti-tumor polysaccharides from the mushroom Agaricus blazei. *Japan Kokai Tokkyo Koho*,

Itoh, H., Ito, H., Amano, H. ve Noda, H., 1994, Inhibitory action of a (1→ 6)-β-D-glucan-protein complex (FIII-2-b) isolated from Agaricus blazei Murill (" Himematsutake") on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism, *The Japanese Journal of Pharmacology*, 66 (2), 265-271.

Itoh, H., Ito, H. ve Hibasami, H., 2008, Blazein of a new steroid isolated from Agaricus blazei Murrill (himematsutake) induces cell death and morphological change indicative of apoptotic chromatin condensation in human lung cancer LU99 and stomach cancer KATO III cells, *Oncology reports*, 20 (6), 1359-1361.

Jiang, H., Gu, W., 2005, Study on in vitro effects and primary structure analysis of Agaricus blazei polysaccharides. *Zhongcaoyao*, 36 (11), 1616-1618.

Jin, C.-Y., Moon, D.-O., Choi, Y. H., Lee, J.-D. ve Kim, G.-Y., 2007, Bcl-2 and caspase-3 are major regulators in Agaricus blazei-induced human leukemic U937 cell apoptosis through dephoshorylation of Akt, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30 (8), 1432-1437.

Jong, S.-C. ve Donovick, R., 1989, Antitumor and antiviral substances from fungi, *Advances in Applied Microbiology*, 34, 183-262.

Kabir, Y. ve Kimura, S., 1989, Dietary mushrooms reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR), *Journal of nutritional science and vitaminology*, 35 (1), 91-94.

Kaerber, G., 1964, Diagnostic procedures for virus and ricketsial disease, *Public Health Ass*, 3, 48-50.

Kaij-A-Kamb, M., Amoros, M., Chulia, A., Kaouadji, M., Mariotte, A. ve Girre, L., 1991, Screening of in vitro antiviral activity from Brittany plants, specially from Centaurea nigra L.(Asteraceae), *Journal de pharmacie de Belgique*, 46 (5), 325-326.

Kaneno, R., Fontanari, L., Santos, S., Di Stasi, L., Rodrigues Filho, E. ve Eira, A., 2004, Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (Agaricus blazei) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice, *Food and Chemical Toxicology*, 42 (6), 909-916.

Karagöz, A., Cevahir, G., Özcan, T., Sadıkoğlu, N., Yentür, S. ve Kuru, A., 2002, Bazı Yüksek Bitkilerden Hazırlanan Sulu Ekstrelerin Antiviral Aktivite Potansiyellerinin Değerlendirilmesi, *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı-Bildiriler, Eskişehir*, 318-321.

Kawagishi, H., Katsumi, R., Sazawa, T., Mizuno, T., Hagiwara, T. ve Nakamura, T., 1988, Cytotoxic steroids from the mushroom Agaricus blazei, *Phytochemistry*, 27 (9), 2777-2779.

Kawagishi, H., Inagaki, R., Kanao, T., Mizuno, T., Shimura, K., Ito, H., Hagiwara, T. ve Nakamura, T., 1989, Fractionation and antitumor activity of the water-in-soluble residue of Agaricus blazei fruiting bodies, *Carbohydrate Research*, 186 (2), 267-273.

Kawagishi, H., Kanao, T., Inagaki, R., Mizuno, T., Shimura, K., Ito, H., Hagiwara, T. ve Nakamura, T., 1990, Formolysis of a potent antitumor (1→ 6)-β-d-glucan-protein complex from Agaricus blazei fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products, *Carbohydrate Polymers*, 12 (4), 393-403.

Ker, Y.-B., Chen, K.-C., Chyau, C.-C., Chen, C.-C., Guo, J.-H., Hsieh, C.-L., Wang, H.-E., Peng, C.-C., Chang, C.-H. ve Peng, R. Y., 2005, Antioxidant capability of polysaccharides fractionated from submerge-cultured Agaricus blazei mycelia, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (18), 7052-7058.

Kim, C.-F., Jiang, J.-J., Leung, K.-N., Fung, K.-P. ve Bik-San Lau, C., 2009, Inhibitory effects of Agaricus blazei extracts on human myeloid leukemia cells, *Journal of ethnopharmacology*, 122 (2), 320-326.

Kitazato, K., Wang, Y. ve Kobayashi, N., 2007, Viral infectious disease and natural products with antiviral activity, *Drug Discov Ther*, 1 (1), 14-22.

Kneyber, M. C. J., Mou, H.A., Groot, R.D., 2000, Treatment and prevention of respiratory syncytial virus infection. European Journal of Pediatrics (159), 339–411.

Kobayashi, H., Yoshida, R., Kanada, Y., Fukuda, Y., Yagyu, T., Inagaki, K., Kondo, T., Kurita, N., Suzuki, M. ve Kanayama, N., 2005, Suppressing effects of daily oral supplementation of beta-glucan extracted from Agaricus blazei Murill on spontaneous and peritoneal disseminated metastasis in mouse model, *Journal of cancer research and clinical oncology*, 131 (8), 527-538.

Koca, U. ve Özçelik, B., 2009, Antiviral, Antibacterial, and Antifungal Activities of Centaurea tchihatcheffii Extracts, *Turk J. Pharm. Sci.,* 6,(2), 125, 134.

Kuo, Y.-C., Huang, Y.-L., Chen, C.-C., Lin, Y.-S., Chuang, K.-A. ve Tsai, W.-J., 2002, Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulated by Agaricus blazei, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 140 (3), 176-187.

Lee, D. G., Shin, S. Y., Maeng, C.-Y., Jin, Z. Z., Kim, K. L. ve Hahm, K.-S., 1999, Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from Aspergillus niger, *Biochemical and biophysical research communications*, 263 (3), 646-651.

Lewinsohn, D. M., Bowden, R. A., Mattson, D. ve Crawford, S. W., 1996, Phase I study of intravenous ribavirin treatment of respiratory syncytial virus pneumonia after marrow transplantation, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40 (11), 2555-2557.

Li, L., Song, M., Yuan, F., Hou, J., Jiang, Y., Fu, M., Liu, F. , 2007, Antioxidant components of mushrooms. *Nankai Daxue Xuebao Ziran Kexueban*, 40 (6), 62-66.

Lindequist, U., Niedermeyer, T. H. ve Jülich, W.-D., 2005, The pharmacological potential of mushrooms, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2 (3), 285-299.

Liu, F., Ooi, V. ve Chang, S., 1997, Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts, *Life sciences*, 60 (10), 763-771.

Liu, J.-c., Cui, H.-x. ve Sun, J.-n., 2006, Experimental study on Bel-7402 cell apoptosis induced by polysaccharides of Agaricus Blazei Muill, *Journal-Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, 29 (6), 408-411.

Liu, J., Yang, F., Ye, L.-B., Yang, X.-J., Timani, K. A., Zheng, Y. ve Wang, Y.-H., 2004, Possible mode of action of antiherpetic activities of a proteoglycan isolated from the mycelia of Ganoderma lucidum in vitro, *Journal of ethnopharmacology*, 95 (2), 265-272.

Lou, L., Dong, M., Peng, X., Yu, K. ve Liu, S., 2007, Nankai Daxue Xuebao, *Ziran Kexueban*, 40, 62-66.

Ma, S.-C., Du, J., But, P. P.-H., Deng, X.-L., Zhang, Y.-W., Ooi, V. E.-C., Xu, H.-X., Lee, S. H.-S. ve Lee, S. F., 2002, Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus, *Journal of ethnopharmacology*, 79 (2), 205-211.

Maggon, K. ve Barik, S., 2004, New drugs and treatment for respiratory syncytial virus, *Reviews in medical virology*, 14 (3), 149-168.

Martinez, F. D., 2003, Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma, *The Pediatric infectious disease journal*, 22 (2), S76-S82.

Martins de Oliveira, J., B. Q. Jordao, et al. , 2002, Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (Agaricus blazei Murill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1775-1780.

Mizuno, M., Minato, K. i., Ito, H., Kawade, M., Terai, H. ve Tsuchida, H., 1999, Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured Agaricus blazei mill, *IUBMB Life*, 47 (4), 707-714.

Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T. ve Asakura, A., 1990, Antitumor Activity and Some Properties of Water-soluble Polysaccharides from "Himematsutake," the Fruiting Body of Agavicus blazei Murill, *Agricultural and Biological Chemistry*, 54 (11), 2889-2896.

Mizuno, T., 1993, Food function and medicinal effect of mushroom fungi. *Foods and Food Ingredients Journal of Japan*, 55-70.

Mizuno, T., 1995, Kawariharatake, Agaricu blazei Murill: Medicinal and dietary effects, *Food Reviews International*, 11 (1), 167-172.

Mizuno, T., 1999, The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1 (1), 9-29.

Mizuno, T., 2002, Medicinal properties and clinical effects of culinary-medicinal mushroom Agaricus blazei Murrill (Agaricomycetideae), *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4 (4), 1-14.

Nakajima, A., Ishida, T., Koga, M., Takeuchi, T., Mazda, O. ve Takeuchi, M., 2002, Effect of hot water extract from Agaricus blazei Murill on antibody-producing cells in mice, *International Immunopharmacology*, 2 (8), 1205-1211.

Newman, D. J., Cragg, G. M. ve Snader, K. M., 2003, Natural products as sources of new drugs over the period 1981− 2002, *Journal of natural products*, 66 (7), 1022-1037.

Newman, D. J. ve Cragg, G. M., 2007, Natural products as sources of new drugs over the last 25 years, *Journal of natural products*, 70 (3), 461-477.

Nigg, H. N., Seigler, D., 1992., Phytochemical resources for medicine and agriculture, Plenum Press, New York.

Ohno, N., Furukawa, M., Miura, N. N., Adachi, Y., Motoi, M. ve Yadomae, T., 2001, Antitumor β-glucan from the cultured fruit body of Agaricus blazei, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24 (7), 820-828.

Okamoto, T., 2007, Agaricus blazei to improve side effects caused by cancer drugs. *Current Topics in Pharmacology*, 11(2), 27-30.

Ooi, V., 1996, Hepatoprotective effect of some edible mushrooms, *Phytotherapy Research*, 10 (6), 536-538.

Ooi, V. E. C. ve Liu, F., 1999, A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1 (3), 195-206.

Ooi, V. E. C., Liu, F., 2000, Immunomodulation and anticancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current Medicinal Chemistry*, (7), 715-729.

Openshaw, P. J., 2005, Antiviral immune responses and lung inflammation after respiratory syncytial virus infection, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2 (2), 121-125.

Organization., W. H., 2008, Initiative for Vaccine Research: respiratory syncytial virus. http://apps.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index2.-html; Son erişim tarihi 21 Haziran 2016.

Oxford, J., Kelly, L., Davies, S. ve Lambkin, R., 1999, Antiviral testing. In "Virus culture: A practical approach." Edited by Cann AJ, Oxford University Press Oxford;.

Özçelik, B., Gürbüz, I., Karaoglu, T. ve Yeşilada, E., 2009, Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from Centaurea solstitialis L. ssp. solstitialis, *Microbiological Research*, 164 (5), 545-552.

Pandey, R. C., 1998, Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural sources, *Medicinal research reviews*, 18 (5), 333-346.

Qin, G. w. ve Xu, R. s., 1998, Recent advances on bioactive natural products from Chinese medicinal plants, *Medicinal research reviews*, 18 (6), 375-382.

Reshetnikov, S. V. ve Tan, K.-K., 2001, Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3 (4), 361-394.

Rodrigues, K. F., Hesse, M. ve Werner, C., 2000, Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from Spondias mombin, *Journal of basic microbiology*, 40 (4), 261-267.

Rosa, L. H., Machado, K. M. G., Jacob, C. C., Capelari, M., Rosa, C. A. ve Zani, C. L., 2003, Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98 (7), 967-974.

Roulston, A., Marcellus, R. C. ve Branton, P. E., 1999, Viruses and apoptosis, *Annual Reviews in Microbiology*, 53 (1), 577-628.

Rusak, G., Krajačić, M. ve Pleše, N., 1997, Inhibition of tomato bushy stunt virus infection using a quercetagetin flavonoid isolated from Centaurea rupestris L, *Antiviral research*, 36 (2), 125-129.

Schinazi, R. F., Coats, S. J., Bassit, L. C., Lennerstrand, J., Nettles, J. H. ve Hurwitz, S. J., 2009, Approaches for the development of antiviral compounds: the case of hepatitis C virus, In: Antiviral Strategies, Eds: Springer, p. 25-51.

Shen, A., Sun, Z., Liu, P., Gu, W., 2001, Isolation and purification of polysaccharides from Agaricus blazei murill and its inhibition on human leukemia cell. *Wuxi Qinggong Daxue Xuebao*, 20 (4), 380-383.

Shimizu, S., Kitada, H., Yokota, H., Yamakawa, J., Murayama, T., Sugiyama, K., Izumi, H. ve Yamaguchi, N., 2002, Activation of the alternative complement pathway by Agaricus blazei Murill, *Phytomedicine*, 9 (6), 536-545.

Shu, Y.-Z., 1998, Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective, *Journal of natural products*, 61 (8), 1053-1071.

Smith, D. W., Frankel, L. R., Mathers, L. H., Tang, A. T., Ariagno, R. L. ve Prober, C. G., 1991, A controlled trial of aerosolized ribavirin in infants receiving mechanical ventilation for severe respiratory syncytial virus infection, *New England Journal of Medicine*, 325 (1), 24-29.

Sneader, W., 1985, Drug discovery: the evolution of modern medicine, *J Wiley & Sons, Chichester*.

Soares, A. A., de Souza, C. G. M., Daniel, F. M., Ferrari, G. P., da Costa, S. M. G. ve Peralta, R. M., 2009, Antioxidant activity and total phenolic content of Agaricus brasiliensis (Agaricus blazei Murril) in two stages of maturity, *Food Chemistry*, 112 (4), 775-781.

Sorimachi, K., Akimoto, K., Ikehara, Y., Inafuku, K., Okubo, A. ve Yamazaki, S., 2001a, Secretion of TNF-α, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with Agaricus blazei Murill fractions in vitro, *Cell structure and function*, 26 (2), 103-108.

Sorimachi, K., Ikehara, Y., Maezato, G., Okubo, A., Yamazaki, S., Akimoto, K. ve Niwa, A., 2001b, Inhibition by Agaricus blazei Murill fractions of cytopathic effect induced by western equine encephalitis (WEE) virus on VERO cells in vitro, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65 (7), 1645-1647.

Stamets, P. ve Chilton, J., 1983, The Mushroom Cultivator: A Pratical Guide to growing mushrooms at home.

Su, Z.-Y., Hwang, L. S., Kuo, Y.-H., Shu, C.-H. ve Sheen, L.-Y., 2008, Black soybean promotes the formation of active components with antihepatoma activity in the fermentation product of Agaricus blazei, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (20), 9447-9454.

Sugita, K., Kabashima, K. ve Tokura, Y., 2008, Agaricus blazei Murill augments keratinocyte production of bioactive cytokines capable of promoting antigen-presenting capacity, *The Journal of dermatology*, 35 (6), 373-376.

Suzuki, F., Suzuki, C., Shimomura, E., Maeda, H., Fujii, T. ve Ishida, N., 1979, Antiviral and interferon-inducing activities of a new peptidomannan, KS-2, extracted from culture mycelia of Lentinus edodes, *The Journal of antibiotics*, 32 (12), 1336-1345.

Tilmanis, D. R., 2010, Growth and Therapeutic Properties of Agaricus blazei, *Swinburne University of Technology*, Phd thesis

Tomoda, M., Gonda, R., Kasahara, Y. ve Hikino, H., 1986, Glycan structures of ganoderans B and C, hypoglycemic glycans of Ganoderma lucidum fruit bodies, *Phytochemistry*, 25 (12), 2817-2820.

Treanor, J. ve Falsey, A., 1999, Respiratory viral infections in the elderly, *Antiviral research*, 44 (2), 79-102.

Tsukagoshi, S., Hashimoto, Y., Fujii, G., Kobayashi, H., Nomoto, K. ve Orita, K., 1984, Krestin (Psk), *Cancer treatment reviews*, 11 (2), 131-155.

Wang, H., Ooi, V., Ng, T., Chiu, K. ve Chang, S., 1996, Hypotensive and vasorelaxing activities of a lectin from the edible mushroom Tricholoma mongolicum, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 79 (6), 318-323.

Wang, K. C., Chang, J. S., Chiang, L. C. ve Lin, C. C., 2012, Cimicifuga foetida L. inhibited human respiratory syncytial virus in HEp-2 and A549 cell lines, *The American journal of Chinese medicine*, 40 (01), 151-162.

Wasser, S. P. ve Weis, A. L., 1999a, Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1 (1), 31-62.

Wasser, S. P. ve Weis, A. L., 1999b, Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective, *Critical Reviews in Immunology*, 19 (1), 65-96.

Whittaker, R. H., 1969, New concepts of kingdoms of organisms, *Science*, 163 (3863), 150-160.

Wyde, P. R., 1998, Respiratory syncytial virus (RSV) disease and prospects for its control, *Antiviral research*, 39 (2), 63-79.

Yamamura, Y. ve Cochran, K., 1974, Chronic hypocholesterolemic effect of Lentinus edodes in mice and absence of effect on scrapie, *Mushroom Sci*, 9 (1), 489-493.

Yang, J.-H., Lin, H.-C. ve Mau, J.-L., 2002, Antioxidant properties of several commercial mushrooms, *Food Chemistry*, 77 (2), 229-235.

Yeung, J., Chiu, L. ve Ooi, V., 1994, Effect of polysaccharide peptide (PSP) on glutathione and protection against paracetamol-induced hepatotoxicity in the rat, *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, 16 (10), 723-729.

Yu, C.-H., Kan, S.-F., Shu, C.-H., Lu, T.-J., Sun-Hwang, L. ve Wang, P. S., 2008, Inhibitory mechanisms of Agaricus blazei Murill on the growth of prostate

cancer in vitro and in vivo, *The Journal of nutritional biochemistry*, 20 (10), 753-764.

Yuminamochi, E., Koike, T., Takeda, K., Horiuchi, I. ve Okumura, K., 2007, Interleukin-12-and interferon-γ-mediated natural killer cell activation by Agaricus blazei Murill, *Immunology*, 121 (2), 197-206.

Zhang, B. ve Ren, H., 2007, STI571 induces apoptosis of K562 cells through down-regulation of anti-apoptotic protein Mcl-1 and Bcl-xl expression, *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi/Zhongguo bing li sheng li xue hui= Journal of experimental hematology/Chinese Association of Pathophysiology*, 15 (6), 1182-1185.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Hadeel Abduljabbar Abbas AL-MAFRACHİ
Uyruğu	**:**	Irak
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Bağdat/Irak 13.05.1979
Telefon	**:**	05349209530
Faks	**:**	
e-mail	**:**	mahernoor200@gmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	El Anfal Lisesi Bağdat/IRAK	1997
Üniversite	:	Baghdat Universitesi Ibn al-haytam College Bağdat/IRAK	2001
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi Selçuklu/KONYA	Tez Aşamasında
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**

UZMANLIK ALANI
Biyoloji

YABANCI DİLLER
İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR

Hasan Hüseyin Doğan, Hadeel Abduljabbar Abbas Al-Mafrachi, Rüstem Duman, "Evaluation of in vitro antiviral activity of Agaricus blazei murril against human respiratory syncytial virus", 7th International Molecular Biology and Biotechnology Congress 25-27 April 2018, SAYFA 160.