

PAPER DETAILS

TITLE: Kültüre Alinmis Pleurotus ostreatus'un İnsan Respiratuvar Sinsityal Virüsü (HRSV)'ne Karsi
In Vitro Antiviral Etkisinin Degerlendirilmesi

AUTHORS: Hasan Hüseyin DOĞAN,Yasemin TÜRKÇETİN,Rüstem DUMAN

PAGES: 172-180

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/1301056>



Geliş(Received) :21.09.2020
Kabul(Accepted) :15.10.2020

Araştırma Makalesi/Research Article
Doi: 10.30708.mantar.797728

Kültüre Alınmış *Pleurotus ostreatus*'un İnsan Respiratuvar Sinsityal Virüsü (HRSV)'ne Karşı İn Vitro Antiviral Etkisinin Değerlendirilmesi

Hasan Hüseyin DOĞAN^{*1}, Yasemin TÜRKÇETİN²,
Rüstem DUMAN³

^{*}Sorumlu yazar: hhuseyindogan@yahoo.com

- ¹ Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Kampüs/Konya
Orcid No: 0000-0001-8859-0188/hhuseyindogan@yahoo.com
² Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Kampüs/Konya
Orcid No: 0000-0002-9117-73240/ yaseminlila_1989@hotmail.com
³ Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Kampüs/Konya
Orcid No: 0000-0002-2320-7448/ rduman@selcuk.edu.tr

Öz: İnsan respiratuvar sinsityal virüsü (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 nedenlerindendir. Virüsün kontrolü ve önlenmesine yönelik yeni yöntemlere olan gereksinim, HRSV'den etkilenen insanların sayısını azaltmak için son derece önemlidir. Mantarlar, yeni antiviral etki mekanizmalarına sahip ilaçların öncü bileşiklerini içerirler. Nihai hedefi anti-HRSV ilaç adaylarını tespit etmek olan bu çalışma, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm'dan elde edilen metanol, etanol ve su ekstraktlarının HRSV'ye karşı antiviral aktiviteye sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Ekstrelerin HRSV'ye karşı antiviral aktivitesi kolorimetrik XTT testi ile değerlendirilmiştir. Ekstrelerin HRSV'ye karşı %50 koruma sağlayan konsantrasyonu EC₅₀ olarak tanımlanmış ve CC₅₀ (%50 hücrel sitotoksikite gösteren konsantrasyon)'nin EC₅₀'ye oranından da seçicilik indeksi (SI) belirlenmiştir. Ribavirin (RBV) anti-HRSV aktiviteye yönelik pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Sitotoksikite sonuçlarına göre, en toksik ekstre 12500 µg/mL MNTC (Maksimum non toksik konsantrasyon) ve 23811.05 CC₅₀ ile metanol olup, bunu 3125 µg/mL MNTC, 5967.67 CC₅₀ değerleriyle etanol ve 3125 µg/mL MNTC, 6622.28 CC₅₀ değerleriyle su ekstresi izlemiştir. RBV için ise bu değerler 0.98 µg/mL MNTC ve 117.00 CC₅₀ dir.

Araştırma sonucunda, HRSV'ye karşı en güçlü antiviral aktiviteyi 2910.57 µg/mL EC₅₀ ve 8.18 SI değeri ile metanol ekstresi göstermiş, bunu sırasıyla, etanol (EC₅₀: 900.71 µg/mL, SI: 6.63) ve su (EC₅₀: 1654.55 µg/mL, SI: 4.00) ekstraktları takip etmiştir. RBV için bu değerler 4.19 EC₅₀ ve 27.92 SI tir.

Sonuç olarak, *P. ostreatus* ekstraktlarının HRSV'ye karşı klinikte kullanılan ilaçlara karşı bir alternatif olarak geliştirilebilmesi için daha ileri çalışmalara layık olduğunu söyleyebiliriz. Bu çalışma, *P. ostreatus*'un anti-HRSV aktivitesine yönelik ilk rapordur.

Anahtar kelimeler: Antiviral aktivite, İnsan respiratuvar sinsityal virüsü, Kolorimetrik XTT testi, *Pleurotus ostreatus*.

Evaluation of in Vitro Antiviral Activity of Cultured *Pleurotus ostreatus* Against Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV)

Abstract: Human respiratory syncytial virus (HRSV) is the leading cause of serious upper and lower respiratory infections in infants, children, elderly adults and people of all ages with respiratory, heart or immunodeficiency. The requirement for new methods of virus control and prevention is crucial to reducing the number of people affected by HRSV. Fungi contain the precursor compounds of drugs with novel mechanisms of antiviral action. This study, whose ultimate goal is to identify anti-HRSV drug candidates, was conducted to determine whether methanol, ethanol and aqueous extracts from *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm having antiviral activity against HRSV. Antiviral activity of extracts against HRSV was assessed by



colorimetric XTT test. The concentration of extracts providing 50% protection against HRSV was defined as EC_{50} and the selectivity index (SI) was determined from the CC_{50} (concentration showing 50% cellular cytotoxicity) to EC_{50} . Ribavirin (RBV) was used as a positive control for anti-HRSV activity.

According to cytotoxicity results; the most toxic extract was methanol with the values of 12500 $\mu\text{g/mL}$ for MNTC and 23811.05 for CC_{50} , and it was followed by ethanol (3125 $\mu\text{g/mL}$ for MNTC and 5967.67 for CC_{50}) and aqueous extract (3125 $\mu\text{g/mL}$ for MNTC, 6622.28 for CC_{50}). These values for RBV was 0.98 $\mu\text{g/mL}$ MNTC and 117.00 CC_{50} .

As a result of the research, the strongest antiviral activity against HRSV showed methanol extract with 2910.57 $\mu\text{g/mL}$ EC_{50} and 8.18 SI values, followed by ethanol (EC_{50} : 900.71 $\mu\text{g/mL}$, SI: 6.63) and water (EC_{50} : 1654.55 $\mu\text{g/mL}$, SI: 4.00) extracts, respectively.

In conclusion, we can say that *P. ostreatus* extracts are worthy of further work in fighting HRSV infection (detection of the active compound/compounds responsible for anti-HRSV activity). This study is the first report of *P. ostreatus* for anti-HRSV activity.

Key words: Antiviral activity, Human respiratory syncytial virus, Colorimetric XTT test, *Pleurotus ostreatus*.

Giriş

HRSV tüm yaşlarda görülebilen en önemli respiratuvar hastalık sebebidir. Bebeklerde ve 4 yaşın altındaki çocuklarda en sık görülen şiddetli solunum yolu enfeksiyonlarının nedenidir. Yaşlılarda ve bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda ciddi problemlere yol açan bu virüsün daha büyük çocuklar ve yetişkinlerdeki enfeksiyonu hafif seyirlidir. Bebek ve küçük çocuklarda alt solunum yolu enfeksiyonlarının en yaygın sebebi olan bu virüs yüksek riskli pediatrik popülasyonda (konjenital kalp hastalığı, kronik akciğer hastalığı, prematüre bebekler, immün yetmezlik) önemli oranda mortalite ve morbiditeye yol açar. Ayrıca bebeklikte geçirilen HRSV sonraki yıllarda reaktif hava yolu hastalığı gelişimine sebep olabilir (Hammer ve ark.,1995; Rota 1999; Anonim, 2003).

Güvenli ve etkili HRSV aşısının elde edilmesinde birtakım güçlükler karşımıza çıkmaktadır. Ciddi seyirli HRSV enfeksiyonları hayatın ilk 7 aylık döneminde daha sık görüldüğü için bu aşının da bebeklere hayatın ilk haftalarında uygulanması gerekmektedir. Ancak hayatın ilk dönemlerindeki bebeğin immünolojik imatüritesi ve anneden geçen nötralizan HRSV antikorlarının immünosupresif etkileri ilk ayda uygulanacak immünizasyona engeldir. Uygulanacak aşı doğal enfeksiyonunkine oranla daha uzun süreli bağışıklık sağlamalıdır (Collins ve ark., 1996; Ball, 1994).

HRSV'ye karşı ilk aşı 1960'lı yıllarda geliştirilmiştir. 1960-1980 yılları arasında geliştirilen inaktif HRSV aşıları antikor oluşturmalarına karşın, sonrasında vahşi virüs enfeksiyonunu takiben ağır hastalık tabloları geçirilmesine neden olmuş ve bu durum geçici bir süreyle aşı çalışmalarını sektöre uğratmıştır. Bunun sonucunda HRSV için attenue aşı çalışmaları başlamış olup bunlar;

subunit aşılar (F; füzyon proteini kullanılarak), immün aktivasyon yapan anjuvanlarla kombine subunit aşılar, canlı zayıflatılmış aşılar, genetik mühendisliği yoluyla yapılan aşılar ve polipeptit aşılarıdır. Ancak günümüzde henüz etkili ve rutin bir aşı yoktur (Ball, 1994, Mulholland ve ark., 1996).

Ribavirin, birçok DNA ve RNA virüsüne karşı in vitro etkili, viral çoğalmayı azaltan, sentetik bir nükleozid analogudur. Ciddi HRSV enfeksiyonlarına karşı 1993 yılında tek lisanslı ilaç olarak kabul görse de; uzun süreli aerosol uygulama ve hastaneye yatış gerekliliği, zehirlenme potansiyeli (kemik iliği baskılanması, karsinojenite), gebelikte teratojenik etki ve yüksek maliyet gibi nedenlerle APA tarafından rutin kullanımı önerilmemektedir. HRSV enfeksiyonları için aşının henüz geliştirilmemiş olması ve ciddi enfeksiyonlarda kullanılan tek bir antiviral ilacı ribavirinin oluşu, çocuk doktorlarında sıkıntılara sebebiyet vermektedir. Bundan kaynaklanan sorunlardan dolayı, oral veya parental olarak kolay uygulamalı özgün anti-HRSV ilaçların üretilmesi ve geliştirilmesi elzem hale gelmektedir (Ma ve ark., 2002).

Mantarlar, çok eski zamanlardan beri gıda olarak tüketilmektedir. Beslenme yönünden; düşük kalori içermesinin yanı sıra, esansiyel aminoasitler, karbonhidratlar, lifler, önemli vitaminler ve mineraller bakımından zengin bir içeriğe sahiptir. Mantarlar aynı zamanda doğu ülkelerinde yüzyıllardır ilaç olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan bilimsel araştırmalar sonucunda ise bağışıklık sistemini güçlendirdiği ve sağlığı koruduğu ispatlanmıştır (Sevindik ve ark., 2018; 2016).

Tıbbi özellikleri için analiz edilen *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. (Reishi), *Lentinus edodes*



(Berk.) Pegler (Shiitake), *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray (Maitake), *Agaricus blazei* Murrill (Hime matsutake), *Cordyceps militaris* (L.) Fr. (Tırtıl mantarı), *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (Kayın mantarı) ve *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers., (Aslan yelesi) mantar türlerinin polisakkaritler, diyet lifi, oligosakkaritler, peptidler ve proteinler, alkoller ve fenoller, çinko, bakır, iyot, selenyum ve demir gibi mineral maddeler, vitaminler, aminoasitler başta olmak üzere birçok aktif bileşeni içerdiği tespit edilmiştir. Bu bileşenlerin bağışıklık sistemini güçlendirdiği, anti-kanserojen ve kolesterol düşürücü özelliğe sahip olduğu ve hepatite karşı koruyucu ajan olarak görev yaptıkları belirlenmiştir (Lakhanbal ve Rana, 2005).

Günümüzde de birçok mantar türü antibiyotik, antikanser, antiviral, antitümör özellikleri nedeniyle tıbbi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tıbbi mantar türleri özellikle son yıllarda biyoteknolojik çalışmalarda da kullanılmaktadır (Carlile ve Watkinson, 1994; Denis, 1995).

Mantarların sentezlediği ve genellikle organizmalarına özgü olan bazı fenolik bileşikler, purinler, pirimidinler, kuinonlar, terpenoidler ve fenil propanoid türevi antagonistik maddeler antimikrobiyal etkiye neden olmaktadır. Antitümör etki gösteren en önemli maddeler ise kalvasin, volvotoksin, flammotoksin, lentinan ve porisin denilen yalnızca makro mantarlardan izole edilmiş maddelerdir. Bu bileşikler aynı zamanda antiviral özellik de göstermektedir (Benedict ve Brady, 1972; Conchran, 1978).

Bu çalışma, Türkiye’de doğal olarak yetişen ve yenen bir makromantar türü olan *P. ostreatus*’un kültür ortamında geliştirilen örneklerinin HRSV’ye karşı antiviral aktivitesini değerlendirmek için yapılmıştır. Kültür olarak yetiştirilen örneklerin antiviral etkisinin varlığı veya yokluğunun ortaya konmasıyla doğal gıda olarak tüketilen mantarların sağlık açısından koruyucu olup olmadığının ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmanın materyali olan *P. ostreatus* Seydişehir’de piyasadan satın alınmıştır. Taze olarak satın alınan örnekler 45 °C de mantar kurutma dolabında kurutularak toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen örnekler metanol, etanol ve su ekstraktları için ayrı ayrı 30 gr tartılarak ultrasonikatörde 45 °C de 400 mL çözücü kullanılarak 1 saat bekletilmiş ve watman no:1 filtreden geçirilmiştir. Filtreden geçmeyen katı faz tekrar 4 kez sonikasyona tabii tutulup filtre edilmiştir. Toplam ekstraktlar düşük basınç altında 45 °C de Evaporatörde uçurulduktan sonra liyofilize edilerek + 4 °C de toz halinde saklanmıştır.

Sitotoksikite test

P. ostreatus bazidyokarplarından elde edilen metanol, etanol ve su ekstraktlarının yanısıra HRSV için pozitif kontrol olarak kullanılan RBV (ribavirin)’nin HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri, imalatçı firmanın (Biological Industries, Israel) talimatlarına uygun olarak XTT temelli hücre proliferasyon kiti ile ayrı ayrı incelenmiştir.

96 kuyucuklu mikroyetkilerin 1. kolonu Vasat Kontrol (VK), 2. kolonu Hücre Kontrol (HK) olarak kullanılmıştır. VK olarak kullanılan 1. kolondaki kuyucuklara 150 µL EMEM (serumsuz) konulmuştur. 3. kolon hariç, geriye kalan 10 kolondaki (yani, 2-12) kuyucukların her birine 100’er µL EMEM (serumsuz) konulmuştur. 3. Kolona ekstraktların çalışma solüsyonundan (75 mg/mL) 200 µL konulmuştur. log₂ tabanına göre sulandırılmalar (75-0.146 mg/mL) hazırlanmıştır. 3-12 arasındaki kolonların kuyucuklarına ve HK olarak kullanılan 2. kolondaki kuyucuklara mililitresinde 1×10⁵ hücre içeren HEp-2 hücre süspansiyonundan 50’şer µL konulmuştur. Ekstrelerin XTT boyası ile etkileşime girip girmediklerini değerlendirmek amacıyla, 3-12 arasındaki kolonların F, G, H sıralarındaki kuyucuklara 50’şer µL EMEM (serumsuz) konulmuştur. Böylece ekstraktların kuyucuklardaki son konsantrasyonları 50-0.098 mg/mL olmuştur.

RBV’nin HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde de, RBV’nin XTT boyası ile etkileşime girip girmediklerinin değerlendirilmesi amacıyla pleytlerin bazı kuyucuklarının ayrılması dışında, aynı işlemler uygulanmıştır. Mikroyetkilerin 1. kolonu Vasat Kontrol (VK), 2. kolonu Hücre Kontrol (HK) olarak kullanılmıştır. VK olarak kullanılan 1. kolondaki kuyucuğun her birine 150 µL EMEM (serumsuz) konulmuştur. 3. kolon hariç, geriye kalan 10 kolondaki kuyucukların her birine 100’er µL EMEM (serumsuz) konulmuştur. Üçüncü kolonda bulunan kuyucukların her birine RBV’nin çalışma solüsyonundan (750 µg/ml) 200 µL konulmuş ve log₂ tabanına göre sulandırılmalar (750.00-1.46 µg/mL) hazırlanmıştır. 2-12 arasındaki kolonların kuyucuklarına mililitresinde 1×10⁵ hücre içeren HEp-2 hücre süspansiyonundan 50’şer µL konulmuştur. Böylece, RBV’nin kuyucuklardaki son konsantrasyonları 500-0.98 µg/mL olmuştur. Mantar ekstraktlarını ve RBV’ni içeren mikroyetkiler 3 gün süreyle % 5 CO₂’li nemli bir inkübatörde 37°C’de inkübe edildikten sonra, XTT ayırıcının hazırlanan karışımından her kuyucuğa 50’şer µL konulmuştur. Mikroyetkiler, XTT formazan ürününün oluşması için 3 saat daha inkübe edilmiştir. Optik dansite (OD)’ler, 490 nm bir test dalga boyu ve 630 nm



bir referans dalga boyunda, ELISA okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutularak kuyucuklardan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir. Ekstrelerin XTT ile doğrudan kimyasal etkileşimlerinin ekarte edilmesi amacıyla, hücre içeren kuyucuklardaki farklı ekstre konsantrasyonlarının ortalama OD değerlerinden, hücre içermeyen aynı konsantrasyondaki ekstrelerin ortalama OD değerleri çıkarılmıştır. Testler üç kopya olarak yapılmış ve sonuçlar hücre kontrole göre ortalama sitotoksosite % oranı olarak gösterilmiştir. Sitotoksosite % oranını hesaplamak için, A'nın hücre kontrolün OD'sini, B'nin ekstre (veya RBV) ile muamele edilmiş hücrelerin OD'sini temsil ettiği aşağıdaki formül kullanılmıştır (Andrighetti-Fröhner ve ark., 2003):

$$\text{Sitotoksosite (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

Hesaplanan sitotoksik etki yüzdeleri test edilen ekstrelerin (veya RBV'nin) ilgili konsantrasyonlarına karşı grafiğe dönüştürülmüştür. HK'ler ile karşılaştırıldığında ekstreler (veya RBV) ile muamele edilmiş hücrelerin OD'sini %50'ye kadar azaltan konsantrasyon olarak tanımlanan %50 Sitotoksik Konsantrasyon (CC₅₀) değerleri, elde edilen verilerin ışığında GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı yardımıyla non-linear regresyon analizi uygulanarak belirlenmiştir (Ho, 2008). HK'lerin OD'leri ile karşılaştırılarak Ekstrelerin (veya RBV'nin) MNTC (maksimum non-toksik konsantrasyon)'leri belirlenmiştir. Belirlenen bu MNTC'ler ekstrelerin ve RBV'nin antiviral aktivitesinin saptanmasında kullanılmıştır.

Antiviral test

Ribavirinin anti-HRSV aktivitesinin belirlenmesi

RBV'nin Hep-2 hücrelerine karşı belirlenen MNTC'undan (0.98 µg/mL) başlangıç alan 2 misli sulandırılmaları anti-HRSV aktiviteleri yönünden Ho ve ark.'nın (2010) bildirdikleri "Cytopathic Effect (CPE) Reduction" testinin kolorimetrik XTT metoduna uyarlanması ile, 100 misli %50 doku kültürü infektif doz (DKID₅₀) içeren HRSV süspansiyonuna karşı kontrol edilmiştir. Pleytin kuyucuklarına (VK olarak kullanılan pleytin 1. kolonundaki kuyucuklar hariç) kuyucuk başına 100 µL hacimde (2.5 × 10⁴ hücre/kuyucuk) ekim yapılmış ve 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Hücreler konfluent olduğunda, kuyucuklardaki üretme vasatı çekilerek boşaltılmıştır. HRSV stoğu, %1 FBS içeren EMEM (idame vasatı) kullanılarak 100 DKID₅₀ oranında sulandırılmıştır. RBV'nin stok solüsyonundan (1000 mg/mL) daha önce belirlenen MNTC'sinden (0.98 µg/mL) konsantrasyonu 2 misli fazla olan bir sulandırma hazırlanmıştır. Pleytin 1. kolonu VK (vasat kontrol), 2.

kolonu HK (hücre kontrol), 3. kolonu ise virus kontrol (VrK) olarak kullanılmıştır. VK ve HK kuyucuklarına 200'er µL idame besiyeri konulmuştur. Pleytin virus kontrol (VrK) olarak kullanılan 3. kolonundaki kuyucuklara 100 DKID₅₀ oranında sulandırılan HRSV süspansiyonundan 100'er µL ve idame besiyerinden 100'er µL eş zamanlı olarak konulmuştur. Pleytin geriye kalan kolonlarındaki (yani, 4-12. kolonlarındaki) 9 kuyucuğun her birine 100 DKID₅₀ oranında sulandırılan HRSV süspansiyonundan 100'er µL konulduktan sonra üzerlerine eş zamanlı olarak RBV'nin 2 × MNTC'sinden başlangıç alan sulandırmalarından 100'er µL konulmuştur. Pleytler 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 3 gün süreyle inkübe edilmiştir. VrK kuyucuklarında maksimum sinsityum oluşumu gözlemlendikten sonra, kuyucuklardaki süpernatant boşaltılmış ve kuyucuklara 150'şer µL serumsuz EMEM konulmuştur. Daha sonra, XTT karışımından her kuyucuğa 50'şer µL konulmuştur. XTT formazan ürününün oluşması için pleyt 3 saat daha inkübe edilmiştir. Optik dansisite (OD)'ler, 570 nm dalga boyunda bir ELISA okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutularak 8 kuyucuktan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir. Farklı RBV konsantrasyonlarının virusa karşı koruma yüzde oranları, spektrofotometrik olarak aşağıdaki formülde hesaplanmıştır (Andrighetti-Fröhner ve ark., 2003):

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

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 EC₅₀ 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) ise, CC₅₀/EC₅₀ oranından hesaplanmıştır.

Mantar ekstrilerinin anti-HRSV aktivite testi

P. ostreatus bazidyokarplarından hazırlanan ekstrelerin HEP-2 hücrelerine karşı belirlenen MNTC'lerinden (MNTC_{metanol}: 12500 µg/mL; MNTC_{etanol}: 3125 µg/mL; MNTC_{su}: 3125 µg/mL) başlangıç alan 2 misli sulandırılmaları anti-HRSV aktiviteleri yönünden Ho ve ark.'nın (2010) bildirdikleri "Cytopathic Effect (CPE) Reduction" testinin kolorimetrik XTT testine uyarlanmasıyla 100 misli %50 doku kültürü infektif doz (DKID₅₀) içeren HRSV süspansiyonuna karşı kontrol edilmiştir. Ekstrelerin stok solüsyonundan MNTC'lerinden



2 misli konsantre sulandırılmaları ($2 \times \text{MNTC}_{\text{metanol}}$: 25000 $\mu\text{g/mL}$; $2 \times \text{MNTC}_{\text{etanol}}$: 6250 $\mu\text{g/mL}$; $2 \times \text{MNTC}_{\text{su}}$: 6250 $\mu\text{g/mL}$) hazırlanmıştır. Pleytlerinin kuyucuklarına kuyucuk başına 100 μL hacimde (2.5×10^4 hücre/kuyucuk) ekim yapılmış ve 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Hücreler konfluent olduğunda, kuyucuklardaki besiyeri çekilerek boşaltılmıştır. 96 kuyucuklu pleytlerin 1. kolonu HK, 2. kolonu ise VrK olarak kullanılmıştır. HK kuyucuklarına 200'er μL idame besiyeri konulmuştur. Pleytlerin VK olarak kullanılan 2. kolonlarındaki kuyucukların her birine 100 DKID_{50} oranında sulandırılan HRSV süspansiyonundan 100'er μL ve idame vasatından 100'er μL eş zamanlı olarak konulmuştur. Pleytlerin geriye kalan kolonlarındaki (yani, 3-12) kuyucuklara 100 DKID_{50} oranında sulandırılan HRSV süspansiyonundan 100'er μL konulduktan sonra üzerlerine eş zamanlı olarak ekstrelerin $2 \times \text{MNTC}$ 'lerinden başlangıç alan sulandırılmalarından 100'er μL konulmuş ve 37°C 'de %5 CO_2 'li ortamda 3 gün süreyle inkübe edilmiştir. VrK kuyucuklarında maksimum sinsityum oluşumu gözlemlendikten sonra, kuyucuklardaki süpernatant boşaltılmış ve kuyucuklara 150'şer μL serumsuz EMEM konulmuştur. Daha sonra, XTT karışımından her kuyucuğa 50'şer μL konulmuş, 3 saat daha inkübe edilmiştir. Optik dansite (OD)'ler, 570 nm dalga boyunda bir ELISA okuyucusunda (Multiskan EX, Labsystems) okutularak kuyucuklardan elde edilen OD ortalamaları kaydedilmiştir. Farklı ekstre konsantrasyonlarının virusa karşı koruma yüzde oranları, spektrofotometrik olarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Andrighetti-Fröhner ve ark., 2003):

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

A = 8 gözdeki her bir ekstre 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 ekstre konsantrasyonu olarak tanımlanan EC_{50} değeri, ekstre konsantrasyonlarına karşı belirlenen koruma % oranlarından yararlanılarak, GraphPad Prism Version 5.03 istatistik programı kullanılarak non-linear regresyon analiziyle belirlenmiştir. Ekstrelerin seçicilik indeksi (SI) ise, $\text{CC}_{50}/\text{EC}_{50}$ oranından hesaplanmıştır.

Bulgular

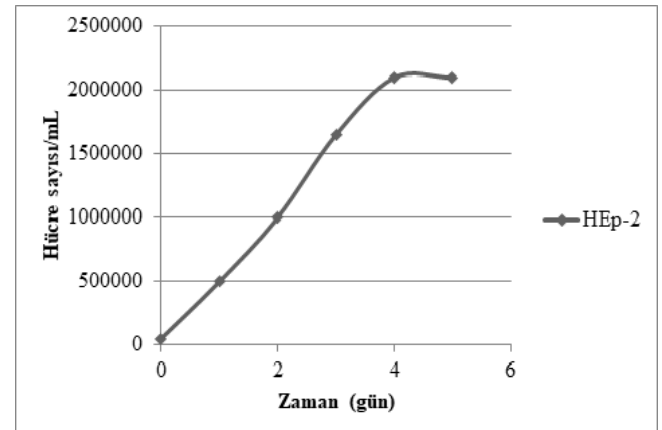
Hücre çoğalma eğrisi

HEp-2 hücreleri ile XTT yöntemi uygulamadan önce hücre çoğalma eğrisini çıkarmak, hücrelerin kaçınıcı

saatte hangi fazda olduklarını anlamak ve uygulanacak ekstrelerin (veya RBV'nin) hücre hattı ile en az kaç saat muamele edilmesi gerektiğinin anlaşılmasında önemli rol oynar. Bu amaçla ilk olarak HEp-2 hücreleri için 5 günlük çoğalma eğrisi grafiği çıkartılmış ve ikilenme zamanı ("doubling time") elde edilmiştir. Absise zaman (gün), ordinata hücre sayıları yerleştirilerek çoğalma eğrisi oluşturulmuştur (Tablo 1, Şekil 1). HEp-2 hücrelerinin ikilenme zamanı yaklaşık olarak 2 gün (48 saat) olarak hesaplanmıştır.

Tablo.1. HEp-2 hücrelerinin zamana göre belirlenmiş hücre sayıları

Zaman (Gün)	Hücre sayısı/mL
0	50000
1	500000
2	1000000
3	1650000
4	2100000
5	2100000



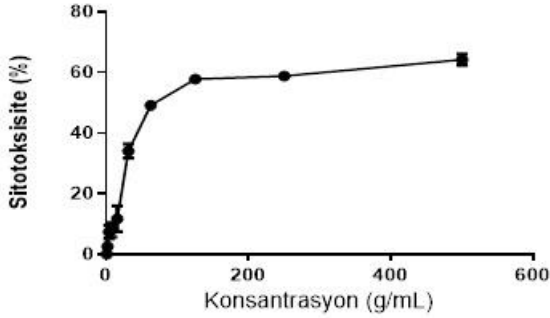
Şekil. 1. 5×10^4 hücre/mL ile başlatılan kültürlerde canlı HEp-2 hücre sayısı belirlenerek oluşturulmuş yarı-logaritmik çoğalma eğrisi (ikilenme zamanı ~2 gün = 48 saat).

Sitotoksosite test sonuçları

Antiviral testlerin gerçekleştirilmesi için ön koşul olarak, virüs-konakçı hücrelerine (HRSV-HEp-2) karşı ekstrelerin ve HRSV'ye karşı pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'nin sitotoksiteleri kolorimetrik hücre canlılık testi ile araştırılmıştır. RBV'nin MNTC 'si 0.98 $\mu\text{g/mL}$, CC_{50} değeri ise 117 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir (Şekil 2, Tablo 2). *P. ostreatus* metanol, etanol ve su

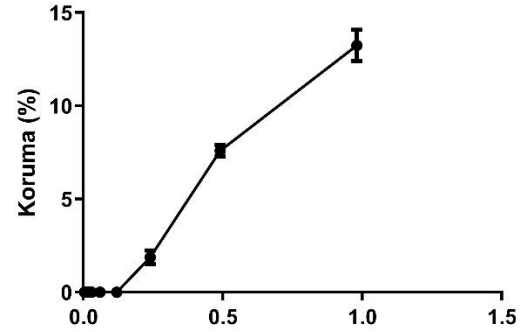


ekstrelerinin MNTC'leri sırasıyla 12500 µg/mL, 3125 µg/mL ve 3125 µg/mL dir. CC₅₀ değerleri ise sırasıyla 23811.05 µg/mL, 5967.67 µg/mL ve 6622.28 µg/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 3, Tablo 2).

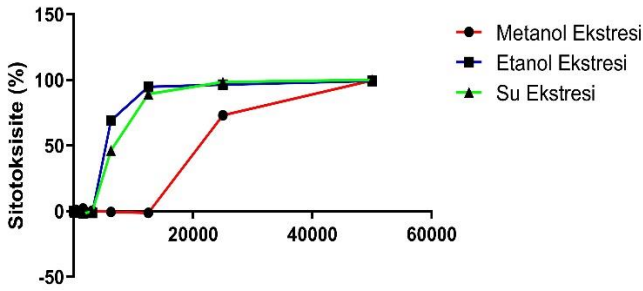


Şekil 2. RBV'nin sitotoksik aktivitesi (MNTC: 0.98 µg/mL; CC₅₀ : 117 µg/mL).

olarak belirlenmiş CC₅₀'nin EC₅₀'ye oranı olarak tanımlanan seçicilik indeksi (SI) ise, 27.92 olarak belirlenmiştir (Şekil 4, Tablo 2).



Şekil 4. RBV'nin anti-RSV aktivitesi (EC₅₀: 4.19 µg/mL; SI= 27.92).

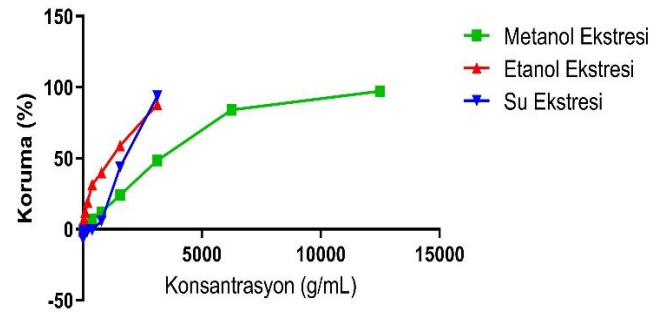


Şekil 3. Hep-2 hücrelerine karşı *Pleurotus ostreatus* ekstrelerinin sitotoksitesisi. Metanol ekstresi (CC₅₀ = 23811.05 µg/mL), etanol ekstresi (CC₅₀ = 5967.67 µg/mL), su ekstresi (CC₅₀ = 6622.28 µg/mL).

Antiviral Aktivite Test Sonuçları

HRSV inhibisyonu için pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'nin EC₅₀ (enfekte hücrelerin % 50'sinde koruma sağlayan konsantrasyon) değeri, 4.19 µg/mL

P. ostreatus metanol ekstresinin EC₅₀ değeri 2910.57 µg/mL, SI değeri ise 8.18 olarak tespit edilmiştir (Şekil 5, Tablo 2). *P. ostreatus* etanol ekstresinin EC₅₀ değeri 900.71 µg/mL, SI değeri ise 6.63 olarak tespit edilmiştir (Şekil 5, Tablo 2). *P. ostreatus* su ekstresinin EC₅₀ değeri 1654.55 µg/ml ve SI değeri ise 4.00 olarak tespit edilmiştir (Şekil 5, Tablo 2).



Şekil 5. *Pleurotus ostreatus* ekstrelerinin anti-HRSV aktivitesi.

Tablo 2. *P. ostreatus* metanol, etanol ve su ekstrelerinin sitotoksitesite ve antiviral aktivite deneyleri toplu sonuçları.

Mantar Türü	Ekstre Çeşidi	Toksitesite		Anti-HRSV Aktivite	
		MNTC (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)	EC ₅₀ (µg/mL)	SI
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Metanol	12500	23811.05	2910.57	8.18
	Etanol	3125	5967.67	900.71	6.63
	Su	3125	6622.28	1654.55	4.00
Ribavirin (RBV)		0.98	117.00	4.19	27.92



Tartışma

Ajanların hücreler üzerinde toksik etki sergilemesi antiviral etki göstermesi ile karıştırılabilir. Doğru bir aktiviteden bahsedebilmemiz için ajanın konak hücre sistemi üzerinde toksite etkisini belirledikten sonra antiviral aktivite deneyleri yapmak testin güvenilirliği açısından önem arz etmektedir (Dargan ve Subak Sharpe, 1986; Hu ve Hsiung, 1989). Bundan dolayı, *P. ostreatus*'un metanol, etanol ve su ekstralarının yanı sıra HRSV'ye karşı pozitif kontrol olarak kullanılan RBV'nin bir insan epidermal larinks karsinoma hücre hattı olan HEp-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri (MNTC'leri ve CC₅₀ değerleri) kolorimetrik XTT testi ile araştırılmıştır. Tablo 2'de görüldüğü gibi, ekstraların HEp-2 hücreleri üzerine HRSV enfeksiyonlarına karşı standart ilaç olarak kullanılan RBV'den daha çok toksik olduğu, ekstralar ve RBV'nin CC₅₀ değerlerinin EC₅₀ değerlerinden daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Bu durum, antiviral bir ajanın güvenilirliği bakımından önemlidir (Schinazi ve ark., 2009).

Sitotoksisite testlerinden sonra, ekstraların ve RBV'nin belirlenen MNTC'lerinden başlangıç alan sulandırılmaları, anti-HRSV aktiviteleri yönünden kontrol edilmiştir. Test sonucunda, *P. ostreatus* metanol ekstresinin 2910.57 µg/mL EC₅₀ değeri ve 8.18 SI değeriyle, RBV (EC₅₀ = 4.19 µg/ml, SI = 27.92) ile kıyaslanabilecek oranda önemli antiviral aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Chattopadhyay ve ark. (2009), 3 ve 3'den büyük SI değerlerinin test ekstralarının potansiyel olarak güvenilir antiviral aktivitesinin göstergesi olarak kabul edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. *P. ostreatus*'un metanol, etanol ve su ekstralarının antiviral aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Mantarların antiviral aktiviteleri genellikle su ekstralarının etkilerine bağlanmış ve sıklıkla da suda çözünür polisakkaritlerin varlığıyla ilişkili bulunmuştur (Kim ve ark., 2000; Zhang ve ark., 2004; Santoyo ve ark., 2012). *P. ostreatus* ve *P. pulmonarius* polisakkaritli su ekstraları, herpes simpleks tip-2 virüsüne karşı aktif bulunmuştur. Mantarın su ekstralarının antiviral aktivitesi polisakkaritlerin varlığı ile ilişkilidir ve artan polisakkarit konsantrasyonu ile artmaktadır (Chihara ve ark., 1970). *P. tuberregium* sklerotia'dan izole edilen iki suda çözünmeyen beta-glukan, karşılık gelen suda çözünür sülfatlanmış türevleri, herpes simpleks virüsü tip 1 ve tip 2'ye karşı antiviral aktiviteler gösterir. Etki muhtemelen sülfatlanmış beta-glukanların viral partiküllere bağlanması, böylece bunların konakçı hücrelere bulaşmasını önleyerek ortaya çıkmaktadır (Zhang ve ark., 2003, 2004).

P. ostreatus'un su ve metanol ekstralarının antiviral özellikleri, herpes simpleks virüsü tip 1'e karşı değerlendirilmiştir. Antiviral aktivite, su ekstralarından daha yüksek antiviral aktivite gösteren polisakkarit fraksiyonunda bulunan beta-glukanlarla ilişkilidir (Santoyo ve ark., 2012). El Fakharany ve ark. (2010), bir

lakkazın, Hepatit C virüsünün periferik kan hücrelerine ve hepatom HepG2 hücrelerine girişini inhibe edebilen ve replikasyonunu yapabilen *P. ostreatus*'tan saflaştırıldığını bildirmişlerdir. Ubikitin benzeri glikoprotein, insan immün yetmezlik virüsünün gelişimini inhibe eden *P. ostreatus*'tan izole edilmiştir (Wang ve Ng, 2000). *P. sajo-caju* ve *P. pulmonarius* sıcak su ekstraları, insan immün yetmezlik virüsü HIV-1 ters transkriptazına karşı önleyici aktivite göstermiştir (Wang ve ark., 2007).

P. ostreatus ve *P. pulmonarius*'un su ve metanol ekstralarının antiviral etkisi, influenza virüsleri ile ilişkili olarak gösterilmiştir. *P. pulmonarius*'un bazidyokarplarının su ekstraları influenza virüslerine karşı yüksek aktivite göstermiştir (Kabanov ve ark., 2011).

Polisakkaritler, mantarlarda, örneğin *P. ostreatus*'ta bulunan bir çeşit makromolekül şeker polimeridir (Palacios ve ark., 2012). Antitümör, antiviral aktivite, immunomodülasyon, antilipidemik etki ve oksidasyon koruması gibi çeşitli biyolojik özelliklere sahiptirler (Jing ve ark., 2016). *P. ostreatus*'un kimyasal bileşiminde, kuru mantarın 100 gramında 24.9 g protein, 2.08 g yağ, 61.9 g şeker, 6.32 g kül ve 1552.26 kJ enerji verdiği hesaplanmıştır (Tsai ve ark., 2009). Yapılan başka bir çalışmada mantarın şeker bileşimi arabitol, glukoz, mannitol, mannoz ve trehaloz olarak belirtilmiştir (Beluhan ve Ranogajec, 2011). *P. ostreatus*'un yağ asidi bileşimi analiz edilmiş ve çalışma sonucunda palmitik asit, palmitoleik asit, oleik asit, linoleik asit ve linolenik asit majör yağ asitleri olarak bulunmuştur (Dimau ve ark., 2002). Zhu ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, *P. ostreatus*'un Cu, Zn, Fe, Mn, Cd, Cr, Ni ve Pb ağır metallerini içerdiği rapor edilmiştir. Dolayısıyla çalışmamızda kullandığımız *Pleurotus ostreatus*'un metanol, etanol ve su ekstralarının anti-HRSV aktivitesi, metanolde, etanolde ya da suda çözünen polisakkaritlerin, yağların ya da metallerin varlığına bağlı olabilir.

Öneriler

Elde edilen sonuçlar dikkate alındığında, *P. ostreatus*'dan elde edilen metanol, etanol ve su ekstralarının HRSV enfeksiyonuna karşı önemli sayılabilecek antiviral aktiviteye sahip olduğu, ancak bu ekstraların antiviral etki mekanizması ve etkili maddelerinin henüz tespit edilmediği söylenebilir. Bu aktiviteden hangi bileşik ya da bileşiklerin sorumlu olabileceğini aynı zamanda antiviral etkiyi nasıl gösterdiklerini kanıtlamak için ilave çalışmalar gerekmektedir. Bundan dolayı ileride araştırılabilecek konuların bu araştırmadaki eksiklikleri kapatarak, *P. ostreatus*'un antiviral etkisini daha kapsamlı bir şekilde belirlenmesi sağlanabilir.

Teşekkür

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü tarafından 19201074 nolu proje numarasıyla desteklenmiştir. Çalışma Yasemin Türkçetin'in Yüksek Lisans tezine aittir.



Kaynaklar

- Andrighetti-Fröhmer, C.R., Antonio, R.V., Creczynski-Pasa, T.B., Barardi, C.R.M. ve Simões, C.M.O. (2003). Cytotoxicity and Potential Antiviral Evaluation of Violacein Produced by *Chromobacterium violaceum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 98: 843-848.
- Anonim, (2003). *American Academy of Pediatrics. Respiratory Syncytial Virus*. In: Pickering, L.K., ed. Red Book: 2003, Report of the Committee on Infectious Diseases, 26 th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics, 524.
- Ball, C.B. (1994). *Respiratory Syncytial Virus*, "Zuckerman A J, Banatvala J E, Pattison J R (eds)": Principles and Practice of Clinical Virology". Chichester. John Wiley and Sons, s. 270.
- Beluhan, S. ve Ranogajec, A. (2011). Chemical Composition and non-volatile Components of Croatian Wild Edible Mushrooms. *Food Chem*, 124: 1076-1082.
- Benedict, R.G. ve Brady, L.R. (1972). Antimicrobial Activity of Mushroom Metabolites. *J. Pharm. Sci.*, 61(11) 1820-182.
- Carlile, M.J. ve Watkinson, S.C. (1994). *The Fungi*. London: Academic Press, 373-409.
- 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 Antiviral Activities of Natural Products. *N Biotechnol*, 25: 347-368.
- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y. ve Fukuoka, F. (1970). Fractionation and Purification of the Polysaccharides with Marked Antitumor Activity, Especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Res.*, 30(11) 2776-2781.
- Collins, P.L., Chanock, R.M., McIntosh, K. (1996). *Parainfluenza viruses*, "Fields, B.N, Knipe, D.M., Howley, P.M. (eds.): Fields Virology", Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1313.
- Conchran, K.W. (1978). *Medicinal Effects*, in: *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*, "Chung, S.T. ve Hayes, W.A. (eds)". New York: Academic Press.
- Dargan, D.J. ve Subak-Sharpe, J.H. (1986). The Antiviral Activity against Herpes Simplex Virus of the Triterpenoid Compounds Carbenoxolone Sodium and Cicloxolone Sodium. *J Antimicrob Chemother*, 18 Suppl B: 185-200.
- Denis, R.B. (1995). *Mushrooms: Poisons and Panaceas*, New York: W.H. Freeman and Co.
- Dimou, D.M., Georgala, A., Komaitis, M. ve Aggelis, G. (2002). Mycelial Fatty Acid Composition of *Pleurotus* spp. and its Application in the Intrageneric Differentiation. *Mycol Res*, 106(8) 925-929.
- El-Fakharany, E.M., Haroun, B.M., Ng, T.B. ve Redwan, E.R. (2010). Oyster Mushroom Laccase Inhibits Hepatitis C Virus Entry into Peripheral Blood Cells and Hepatoma Cells. *Protein & Peptide Letters*, 17: 1031-1039.
- Hammer, J., Numa, A. ve Newth, C.J.L. (1995). Albuterol Responsiveness in Infant with Respiratory Failure Caused by Respiratory Syncytial Virus Infection. *The Journal of Pediatrics*, 127: 485-490.
- Ho, W.S. (2008). *Antiviral Activity of the Medicinal Plants, Adina Pilulifera, Narcissus Tazetta and Wikstroemia Indica, Against Respiratory Syncytial Virus*. Hong Kong: Chinese University of Hong Kong.
- Hu, J.M. ve Hsiung, G.D. (1989). Evaluation of New Antiviral Agents: I. In vitro perspectives. *Antiviral Res*, 11(5-6) 217-32.
- Jing, Y., Gao, Y., Wang, W., Cheng, Y., Lu, P., Ma, C. ve Zhang, Y. (2016). Optimization of the Extraction of Polysaccharides from Tobacco Waste and Their Biological Activities. *Int. J. Biol. Macromol.*, 91: 188-197.
- Kabanov, A., Kosogova, T., Shishkina, L., Tepliakova, T., Skarnovich, M., Mazurkova, N., Puchkova, L., Malkova, E., Stavskii, E. ve Drozdov, I. (2011). Study of Antiviral Activity of Extracts Obtained from Basidial Fungi against Influenza Viruses of Different Subtypes in Experiments in Vitro and in Vivo. *Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunobiologii*, 1: 40-43.
- Kim, Y.S., Eo, S.K., Oh, K.W., Lee, C.K. ve Han, S.S. (2000). Antiherpetic Activities of Acidic Protein Bound Polysaccharide Isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in Combinations with Interferons. *J. Ethnopharmacol*, 72(3) 451-458.
- Lakhanbal, T.N. ve Rana M. (2005). *Medicinal and Nutraceuical Genetic Resources of Mushrooms*. Cambridge: Cambridge University Pres, Plant Genetic Resources, 3: 288-303.
- 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. *J. Ethnopharmacol*, 79(2) 205-211.
- Mulholland, E.K., Olinsky, A. ve Shann, F.A. (1996). Clinical Findings and Severity of Acute Bronchiolitis. *Lancet*, 335: 1259-1261.
- Palacios, I., Garci'a-Lafuente, A., Guillamo'n, E. ve Villares, A. (2012). Novel Isolation of Water-Soluble Polysaccharides from the Fruiting Bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Carbohydr. Res*, 358: 72-77.
- Rota, S. (1999). *Solunum Sinsityal Virus*. "Ustaçelebi, Ş. (ed)". Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 941-943.
- Santoyo, S., Ramirez-Anguiano, A.C., Aldars-Garcia, L., Reglero, G., ve Soler-Rivas, C. (2012). Antiviral Activities of *Boletus edulis*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes* Extracts and Polysaccharide Fractions against Herpes simplex virus type 1. *J Food Nutr Res*, 51(4) 225-235.
- 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. *Handb. Exp. Pharmacol*, 189: 25-51.



- Sevindik, M., Bal, C. ve Akgül, H. (2018). Comparison of antioxidant potentials of the wild and cultivated forms of edible *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus* mushrooms. *Türk Yaşam Bilimleri Dergisi*, 3(2): 263-266.
- Sevindik, M., Akgül, H., Günal, S. ve Doğan, M. (2016). *Pleurotus ostreatus*' un doğal ve kültür formlarının antimikrobiyal aktiviteleri ve mineral madde içeriklerinin belirlenmesi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 16(1): 153-156.
- Tsai, S.Y., Huang, S.J., Lo, S.H., Wu, T.P., Lian, P.Y. ve Mau, J.L. (2009). Flavour Components and Antioxidant Properties of Several Cultivated Mushrooms. *Food Chem*, 113: 578-584.
- Wang, H. ve Ng, T.B. (2000). Isolation of a Novel Ubiquitin-Like Protein from *Pleurotus ostreatus* Mushroom with Anti-Human Immunodeficiency Virus, Translation-Inhibitory and Ribonuclease Activities. *Biochem. Biophys*, 276: 587-593.
- Wang, J., Wang, H.X. ve Ng, T.B. (2007). A Peptide with HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitory Activity from the Medicinal Mushroom *Russula paludosa*. *Peptides*, 28(3) 560-565.
- Zhang, M., CK Cheung, P., EC Ooi, V. ve Zhang, L. (2004). Evaluation of Sulphated Fungal Beta-Glucans from the Sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as a Potential Water-Soluble Anti-Viral Agent. *Carbohydr Res*, 339(13) 2297-301.
- Zhang, M., Zhang, L., Wang, Y. ve Cheung, P.C. (2003). Chain Conformation of Sulphated Derivatives of Beta-Glucan from Sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*. *Carbohydr Res*, 338: 2863-2870.
- Zhu, F., Qu, L., Fan, W., Qiao, M., Hao, H. ve Wang, X. (2011). Assessment of Heavy Metals in Some Wild Edible Mushrooms Collected from Yunnan Province, China. *Environ Monit Assess*, 179: 191-199.