

Т.В.Теплякова, Л.Е.Булычев, Т.А.Косогова, Ж.Б.Ибрагимова, И.А.Юрганова, А.С.Кабанов,
Л.И.Пучкова, Н.И.Бормотов, А.В.Бардашева

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ИЗ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ В ОТНОШЕНИИ ОРТОПОКСВИРУСОВ

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово

Проведена оценка водных экстрактов из базидиальных грибов в клеточной культуре Vero на вирусах натуральной оспы и осповакцины. Вируснейтрализующий эффект проявили *Inonotus obliquus* (чага), *Ganoderma applanatum* (плоский трутовик), *Fomitopsis officinalis* (лиственничный трутовик).

Ключевые слова: базидиальные грибы, водные экстракты, вирусы натуральной оспы и осповакцины, вируснейтрализующий эффект.

T.V.Teplyakova, L.E.Bulychev, T.A.Kosogova, Zh.B.Ibragimova, I.A.Yurganova, A.S.Kabanov, L.I.Puchkova,
N.I.Bormotov, A.V.Bardasheva

Antiviral Activity of Extracts from Basidiomycetes for Orthopoxviruses

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo

Carried out was evaluation of the effect of water extracts from basidiomycetes in Vero cell culture on variola virus, and vaccinia virus. Antiviral effect demonstrated *Inonotus obliquus* (Chaga), befungin and melanin from chaga, *Ganoderma applanatum* (Artist's Bracket), *Fomitopsis officinalis* (Larch Fungus).

Key words: variola virus and vaccinia virus, the aqueous extracts of basidiomycetes, befungin, melanin, antiviral effect.

Семейство *Poxviridae* включает в себя большую группу вирусов, в том числе патогенных для человека: натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, экстремелии и др. Поиск противовирусных препаратов против вируса натуральной оспы и других ортопоксвирусов является актуальной задачей.

Базидиальные грибы, многие из которых являются съедобными, содержат широкий спектр различных биологически активных соединений (БАВ), проявляющих противоопухолевую, антибластическую активность, цитостатическое действие и противовирусный эффект.

Судя по литературным данным, проведены многочисленные исследования по изучению противовирусных свойств базидиальных грибов в отношении поксвирусов. В США несколько штаммов лиственничного трутовика *Fomitopsis officinalis* были выделены в культуру, и был оценен ингибирующий эффект экстрактов из биомассы гриба на поксвирусах в культуре клеток. Один из штаммов *F. officinalis* I показал высокий антивирусный эффект против вируса коров (*cowpox virus*), а другой – *F. officinalis* IV против вируса осповакцины (*vaccinia virus*) [7]. Композиции из грибов родов *Fomitopsis*, *Piptoporus*, *Ganoderma*, как отмечает автор патента [8], могут быть использованы в профилактике и лечении против разных вирусов, включая поксвирусы.

Задачей настоящего исследования была оценка противовирусной активности водных экстрактов и некоторых препаратов из базидиальных грибов на вирусах осповакцины и натуральной оспы. В качестве основных объектов исследований были определены следующие виды грибов: *Fomitopsis officinalis*,

Inonotus obliquus, *Ganoderma applanatum*.

Для изучения противовирусной активности в отношении вируса осповакцины были использованы 2 вида лекарственных грибов, широко применяемых в народной и официальной медицине: лиственничный трутовик *Fomitopsis officinalis* и березовый гриб – чага *Inonotus obliquus*.

Образцы из плодового тела лиственничного трутовика (09-19) и измельченного склероция чаги (08-39) были приготовлены путем выдерживания водных суспензий при 50 °С в термостате в течение 2–3 сут соответственно. Использовали также 5 % водный раствор аптечного препарата из чаги Бефунгин (09-33). Из чаги был получен меланин (08-48) по методике О.В.Королевой и соавт. [3] путем щелочного гидролиза при 0,5 атм. в течение 1 ч с последующим осаждением концентрированной HCl.

Для оценки противовирусной активности грибов в отношении вируса натуральной оспы было приготовлено 7 образцов из трех видов грибов. Образец из чаги (*I. obliquus*) 09-26/1 получен по методике, использованной для образца 08-39. Образец из Бефунгина 09-33/1 готовили по той же методике, что и для вируса осповакцины 09-33.

Из плодового тела гриба *Ganoderma applanatum* (трутовик плоский) приготовлены 2 образца, которые различались способом приготовления. Один получали в виде водного экстракта путем нагревания на водяной бане (09-11/4), другой – смешиванием водного экстракта с этанолом (96 %) и выдерживанием в холодильнике с целью получения суммарных полисахаридов (09-11/4 – полисахарид).

Из гриба *F. officinalis* получено 2 образца: 10-

06/1 – водный экстракт, а 09-19/3 – полисахарид. Образец 09-96 представлял собой готовый препарат гумитон (5 % раствор), содержащий 3,45 % гуминовых кислот. Этот препарат был взят в связи с тем, что чага в своем составе содержит гуминовые кислоты.

Вирусы осповакцины (ВОВ) штамм Л-ИВП и натуральной оспы (ВНО) штамм Индия-3а были получены из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и работали на культуре клеток Vero с титром $5 \cdot 10^5$ и 10^5 БОЕ/мл соответственно.

Эксперименты по противовирусной активности проводили в соответствии с принятыми методиками по профилактической и лечебной схемам. В ходе работы определяли ингибирующую 50 % концентрацию образца (IC_{50}), при которой 50 % клеточного монослоя остается защищенным от действия вируса, а также токсическую 50 % концентрацию (TC_{50}), при которой 50 % клеточного монослоя повреждается за счет токсического действия самого препарата. TC_{50} и IC_{50} были вычислены как средние величины из трех значений, полученных при проведении эксперимента на одном планшете. Индекс селективности (SI) вычислен как отношение TC_{50} к IC_{50} [6]. Образцы с $SI > 10$ считали высокоактивными, а образцы с $SI < 2$ не активными, образцы с SI между 2 и 10 – среднеактивными.

По данным проведенного исследования, можно сделать заключение, что наибольшую противовирусную активность против вируса осповакцины оказывает образец 08-48 (меланин), полученный из *Inonotus obliquus* (индекс селективности $SI=12,5$). Определенным противовирусным потенциалом обладает препарат 09-33 (Бефунгин) из *Inonotus obliquus* ($SI=2$) и образец 09-19 (экстракт) из *Fomitopsis officinalis* ($SI=2$).

Наибольшей противовирусной активностью в отношении вируса натуральной оспы обладают образцы, полученные из *I. obliquus* 09-26/1 ($SI > 9$), 09-33/1 ($SI=7,4$) и из *F. officinalis* 10-06/1 ($SI=4$). Эффективность образцов возрастает при применении их по схеме профилактики – образец начинает воздействовать на клетки Vero за сутки до внесения вируса. В этом случае индекс селективности в сравнении со случаем, когда вирус и препарат вносили одновременно, увеличивается: для препарата 09-33/1 – с 7,4 до 29,8. Суммарные полисахариды из грибов *F. officinalis* и *G. applanatum* дали более низкие показатели по сравнению с водными экстрактами тех же грибов. Это свидетельствует о том, что вируснейтрализующий эффект в отношении данного вируса оказывает более сложный комплекс веществ, включающий и полисахариды.

Поскольку гуминовые кислоты входят в сложный состав компонентов чаги, противовирусный эффект препарата 09-96 (гумитон), полученный нами, не вызывает удивления и указывает на необходимость его дальнейшего изучения. Бефунгин, представляющий готовый аптечный препарат из чаги, проявил противовирусный эффект в отношении обоих тестируемых

вирусов. Индекс селективности по противовирусной схеме для вируса осповакцины составил 2, для вируса натуральной оспы – 7.

На основании полученных данных можно предположить, что образцы из грибов *I. obliquus* и *F. officinalis*, показавшие противовирусные свойства в отношении двух резко отличающихся по патогенности вирусов из семейства *Poxviridae*: вируса натуральной оспы и вируса осповакцины, возможно, будут эффективны и против других ортопоксвирусов: вируса оспы обезьян, экстромелии, вируса оспы коров и других.

Особый интерес для дальнейших исследований представляет гриб *I. obliquus*, чага, который содержит широкий спектр различных БАВ, основным компонентом является хромоген-полифенолоксикарбоновый комплекс (ПФК), близкий по физико-химическим характеристикам к гуминовым кислотам (ГК). В наших исследованиях экстракты из чаги и меланин, полученный из этого гриба, проявляют высокий противовирусный эффект в отношении таких социально значимых вирусов, как вирус простого герпеса 2-го типа, Западного Нила, гриппа, ВИЧ-1 [1, 2, 4, 5].

Полученные данные также подтверждают имеющиеся сведения о том, что препараты из листовничного трутовика проявляют ингибирующий эффект на вирус осповакцины [7]. Это свидетельствует о потенциальной генетической способности грибов вида *F. officinalis* воздействовать на поксвирусы, и делает возможным осуществлять поиск эффективных штаммов против вирусов натуральной оспы в природных местообитаниях Сибири. В более детальном изучении нуждается, по нашему мнению, плоский трутовик *G. applanatum*, у которого все-таки обнаруживается небольшая эффективность. Штаммы этого вида в наших исследованиях проявляют вируснейтрализующий эффект в отношении разных вирусов. Возможно, при приготовлении экстрактов необходима более длительная термическая обработка биомассы из плодового тела гриба. Таким образом, базидиальные грибы *Inonotus obliquus* (чага), *Fomitopsis officinalis* (лиственничный трутовик), *Ganoderma applanatum* (плоский трутовик) являются перспективными продуцентами для дальнейшего изучения с целью разработки на их основе лекарственных препаратов против заболеваний, вызываемых вирусами осповакцины и натуральной оспы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гашикова Н.М., Теплякова Т.В., Проняева Т.Р., Пучкова Л.И., Косогова Т.А., Сергеев А.Н. Результаты исследований по выявлению анти-ВИЧ активности экстрактов из высших базидиальных грибов. Иммунопатол., аллергол., инфектол. 2009; 2:170–1.
2. Кабанов А.С., Косогова Т.А., Шишкина Л.Н., Теплякова Т.В., Скарнович М.О. Мазуркова Н.А. и др. Изучение противовирусной эффективности экстрактов, выделенных из базидиальных грибов, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* в отношении штаммов вируса гриппа разных субтипов. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2011; 1:40–3.
3. Королева О.В., Куликова Н.А., Алексеева Т.Н., Степанова Е.В., Давидчик В.Н., Беляева Е.Ю. и др. Получение меланина из

грибов. Прикладная биохим. и микробиол. 2007; 43(1):69–76.

4. Разумов И.А., Косогова Т.А., Казачинская Е.И., Пучкова Л.И., Щербаклова Н.С., Горбунова И.А. и др. Противовирусная активность водных экстрактов и полисахаридных фракций, полученных из мицелия и плодовых тел высших грибов. Антибиотики и химиотерапия. 2010; 55:9–10.

5. Теплякова Т.В., Гашишкова Н.М., Пучкова Л.И., Проняева Т.Р., Косогова Т.А. Ингибитор репродукции вируса иммунодефицита человека 1 типа. Патент РФ 2375073С1, опубл. 10.12.2009. Бюл. № 34.

6. Duraffour S., Snoeck R., de Vos R., van Den Oord J.J., Crance J.M., Garin D. et al. Activity of the anti-orthopoxvirus compound ST-246 against vaccinia, cowpox and camelpox viruses in cell monolayers and organotypic raft cultures. Antivir. Ther. 2007; 12(8):1205–16.

7. Stamets Paul E. Antipox Properties of *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bondartsev et Singer (Agarikon) from the Pacific Northwest of North America. Int. J. Med. Mush. 2005; 7:495–506.

8. Stamets Paul. Antiviral activity from medicinal mushrooms. Patent Number: US2006171958 A1 20060803.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Gashnikova N.M., Teplyakova T.V., Pronyaeva T.R., Puchkova L.I., Kosogova T.A., Sergeev A.N. [The results of investigation of anti-HIV activity of extracts from higher basidiomycetes]. Immunopatol. Allergol. Infektol. 2009; 2:170–1.

2. Kabanov A.S., Kosogova T.A., Shishkina L.N., Teplyakova T.V., Skarnovich M.O., Mazurkova N.A. et al. [Study of antiviral activity of extracts

obtained from basidial fungi against influenza viruses of different subtypes in experiments *in vitro* and *in vivo*]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2011; 1:40–43.

3. Koroleva O.V., Kulikova N.A., Alekseeva T.N., Stepanova E.V., Davidchik V.N., Belyaeva E.Yu., Tsvetkova E.A. [A comparative characterization of fungal melanin and the humin-like substances synthesized by *Cerrena maxima* 0275]. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 2007; 43(1):69–76.

4. Razumov I.A., Kosogova T.A., Kazachinskaya E.I., Puchkova L.I., Shcherbakova N.S., Gorbunova I.A., Mikhailovskaya I.N., Loktev V.B., Teplyakova T.V. [Antiviral activity of aqueous extracts and polysaccharide fractions from mycelium and fruit bodies of higher fungi]. Antibiot. Khimioter. 2010; 55:9–10.

5. Teplyakova T.V., Gashnikova N.M., Puchkova L.I., Pronyaeva T.R., Kosogova T.A. [Inhibitor of reproduction of human immunodeficiency virus of the 1-st type]. RF Patent 2375073С1.

Authors:

Teplyakova T.V., Bulychev L.E., Kosogova T.A., Ibragimova Zh.B., Yurganova I.A., Kabanov A.S., Puchkova L.I., Bormotov N.I., Bardasheva A.V. State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”. Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Об авторах:

Теплякова Т.В., Булычев Л.Е., Косогова Т.А., Ибрагимова Ж.Б., Юрганова И.А., Кабанов А.С., Пучкова Л.И., Бормотов Н.И., Бардашева А.В. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл, п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 12.09.11.