

УДК 582.284.5; 615.281; 578.832

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ВОДНЫХ ЭКСТРАКТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВЫСШИХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ, В ОТНОШЕНИИ ПАНДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА А(H1N1)2009

Филиппова Е. И., Мазуркова Н. А., Кабанов А. С., Теплякова Т. В., Ибрагимова Ж. Б., Макаревич Е. В., Мазурков О. Ю., Шишкина Л. Н.

Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», 630559, Кольцово, Новосибирская область, Россия, e-mail: filippova_ei@vector.nsc.ru

Проведено исследование токсичности и противовирусной активности водных экстрактов высших базидиальных грибов *Laetiporus sulphureus* (трутовик серно-желтый), *Ganoderma applanatum* (трутовик плоский) и *Inonotus obliquus* (трутовик скошенный, чага) на перевиваемой линии клеток MDCK и мышях Balb/c. Выявлено, что все исследованные грибные экстракты малотоксичны для культуры клеток MDCK и лабораторных животных. Установлено, что экстракты базидиомицетов подавляют размножение пандемического вируса гриппа А/Moscow/226/2009 (H1N1)v в культуре клеток MDCK на 2,69 – 3,22 lg, что было сравнимо с эффектом референс-препарата Тамифлю® в этих экспериментах (подавление репродукции вируса составило 2,90 lg). В опытах *in vivo* при пероральном введении экстрактов базидиомицетов мышам, инфицированным штаммом пандемического вируса гриппа А/Moscow/226/2009 (H1N1)v, наблюдается уменьшение его продукции в легких животных. Через 4 сут после инфицирования мышей вирусом гриппа его концентрация в гомогенатах легких у животных, получавших экстракты базидиомицетов *Inonotus obliquus* и *Laetiporus sulphureus*, была достоверно ниже контроля на 1,83 и 2,00 lg соответственно; для мышей, получавших Тамифлю®, снижение содержания вируса по сравнению с контролем составило 2,16 lg.

Ключевые слова: базидиомицеты, водные экстракты, пандемический вирус гриппа, культура клеток MDCK, мыши Balb/c, токсичность, противовирусная активность.

ANTIVIRAL PROPERTIES OF AQUEOUS EXTRACTS ISOLATED FROM HIGHER BASIDIOMYCETES AS RESPECT TO PANDEMIC INFLUENZA VIRUS A(H1N1)2009

Filippova E. I., Mazurkova N. A., Kabanov A. S., Teplyakova T. V., Ibragimova Z. B., Makarevich E. V., Mazurkov O. Y., Shishkina L. N.

State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, 630559, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia, e-mail: filippova_ei@vector.nsc.ru

Aqueous extracts of higher fungi basidiomycetes *Laetiporus sulphureus*, *Ganoderma applanatum* и *Inonotus obliquus* were investigated with respect to their toxicity and antiviral activity for cell culture MDCK and mice Balb/c. All investigated specimens fungal extracts were low-toxic for cell culture MDCK and laboratory animals. Fungal extracts reduced the infectivity of pandemic influenza virus strain A/Moscow/226/2009 (H1N1)v in MDCK cells about 2,69 – 3,22 lg, that was comparable with the use of Tamiflu® (the suppression of reproduction of the virus was 2,90 lg). In experiments *in vivo* by per oral administration of basidiomycetes extracts to mice infected with the pandemic influenza virus strain A/Moscow/226/2009 (H1N1)v there is a reduction of its products in the lungs of animals. 4 days post infection the virus concentration in lung homogenates of animals treated with basidiomycetes *Inonotus obliquus* и *Laetiporus sulphureus* extracts was authentically lower than control on 1,83 and 2,00 lg respectively; for mice treated with Tamiflu® the reduction of the virus concentration in comparison with the control was 2,16 lg.

Key words: basidiomycetes, aqueous extracts, pandemic influenza virus, cell culture MDCK, Balb/c mice, influenza A, influenza B, toxicity, antiviral activity.

Введение

Вирус гриппа является единственным вирусом, способным вызвать пандемию в современном мире. В прошлом столетии зарегистрированы три пандемии, различающиеся по своей тяжести. Наиболее разрушительной была пандемия «испанского гриппа» в 1918–1919 гг., по разным данным, приведшая к заражению 600 млн и гибели 50–100 млн человек (т.е.

30 % и 5 % населения земного шара соответственно) и вызванная вирусом гриппа А антигенного субтипа Н1N1 (прототипный штамм A/Brevig Mission/1/18). Следующие пандемии гриппа, имевшие место в 1957–1959 гг. («азиатский грипп»), вызванный вирусом гриппа Н2N2 (прототип – A/Singapore/1/57), и в 1968–1970 гг. («гонконгский грипп»), вызванный вирусом гриппа Н3N2 (прототип – A/Hong Kong/1/68), стали причиной гибели около 2 млн и 500 тыс. человек соответственно. По официальным данным, «азиатским гриппом» переболело от 20 до 50 % населения Земли, а заболеваемость «гонконгским гриппом» составляла около 20 %.

Первая в новом веке пандемия «свиного гриппа» (2009–2010 гг.; A/California/07/09 (H1N1) sw1), на конец марта 2010 г., по данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), стала причиной гибели более 17 тыс. человек, потребовала масштабных затрат и усилий международного сообщества на проведение противоэпидемических мероприятий [8]. Пандемический вирус гриппа 2009 года отличается от обычного сезонного гриппа Н1N1, циркулирующего в человеческой популяции с 1977 года, уникальной комбинацией генов, имеющих происхождение от вирусов гриппа птиц, свиней и человека. Заболевание, вызываемое этим вирусом, более контагиозное по сравнению с сезонным гриппом и быстро передается от человека к человеку.

Борьба с гриппозной инфекцией основывается на вакцинопрофилактике и на лечении с применением иммунокорректирующей, патогенетической, симптоматической терапии, вирулицидных и противовирусных этиотропных препаратов. Однако для лечения и профилактики пандемического гриппа ВОЗ рекомендует использовать препараты этиотропного действия, оказывающие непосредственное прямое воздействие на размножение вируса.

В настоящее время в мире активно проводятся исследования по поиску и разработке противовирусных препаратов на основе соединений природного происхождения, обладающих более мягким терапевтическим действием и низкой токсичностью по сравнению с синтетическими лекарственными средствами. В этом отношении базидиальные грибы представляют значительный интерес как источники лечебных и профилактических средств с противоопухолевой, иммуностимулирующей и противовирусной активностью. Так, Pirano F. получил на основе водного экстракта гриба *Rozites caperata* противовирусный препарат белковой природы, препятствующий процессу репликации вирусов простого герпеса 1 и 2 типов, цитомегаловирусов, респираторного синциального вируса и вируса гриппа типа А [12]. Mothana R. A. A. с соавт. [11] обнаружил противовирусную активность экстрактов *Ganoderma pfeifferi* против вируса гриппа типа А и вируса простого герпеса 1 типа, при этом основными противовирусными компонентами были тритерпеноиды: ганодермадиол,

луцидодиол и апланоксиновая кислота G. В работе Ali N.A.A. et al. [9] показано, что вещества хиспидин и хисполон, имеющие изопреноидную природу и найденные в этанольном экстракте гриба *Inonotus hispidus*, проявляли активность против вируса гриппа типа А и типа В. Исследования, проведенные нами, показали перспективность поиска продуцентов противовирусных соединений среди базидиальных грибов в отношении вируса гриппа А субтипов H3N2 и H5N1 [6, 7].

Целью данной работы является изучение противовирусной активности водных экстрактов, выделенных из базидиомицетов, на перевиваемой культуре клеток MDCK и мышцах Balb/c в отношении пандемического вируса гриппа А(H1N1)2009.

Материалы и методы

Экстракты базидиальных грибов. В работе были использованы водные экстракты из плодовых тел базидиальных грибов *Ganoderma applanatum* (09-11), *Laetiporus sulphureus* (09-12) и склероция *Inonotus obliquus* (09-24). Концентрации сухого вещества в исследуемых образцах 09-11, 09-11 и 09-24 были следующими: 13,3; 5,0 и 27,5 мг/мл соответственно.

Культура клеток. Для тестирования токсичности и противовирусной эффективности грибных экстрактов использовали перевиваемую культуру клеток MDCK, полученных из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Суспензию клеток с концентрацией 1×10^5 кл./мл питательной среды Stem Alpha.MDCK (Франция) вносили в объеме 100 мкл/лунку 96-луночного планшета. Планшеты с клетками помещали в термостат на 2–3 сут до образования монослоя при температуре 37 °С, 5 % CO₂ и 100 % влажности.

При определении токсических доз экстракты разводили в 5, 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ раз средой Stem Alpha.MDCK, вносили по 50 мкл/лунку экстрактов и 100 мкл/лунку среды, планшеты ставили в термостат на 2 сут при температуре 37 °С, 5 % CO₂ и 100 % влажности. Через 2 сут с помощью инвертированного микроскопа оценивали деструктивные изменения в монослое клеток MDCK, инкубированных с разными концентрациями экстрактов. В качестве контроля использовали монослой культуры клеток MDCK без экстракта. Определяли минимально токсическую концентрацию (МТК) и максимально переносимую концентрацию (МПК), равную половине концентрации экстракта, не оказывающей на клетки токсического действия. В исследованиях противовирусной активности экстрактов грибов использовали МПК или более низкие концентрации [5].

Вирус гриппа (ВГ). В работе использовали штамм пандемического вируса гриппа А/Moscow/226/2009 (H1N1)v, полученный из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Концентрацию вируса определяли путем титрования на клетках MDCK [3], рассчитывали и выражали в Ig ТЦД₅₀/мл (десятичных логарифмах 50 %-х тканевых цитопатических доз в мл) по методу Спирмана – Кербера [2].

Препарат сравнения. В качестве референс-препарата использовали Тамифлю® (Ф.Хоффманн – Ля Рош Лтд., Швейцария). В экспериментах *in vitro* Тамифлю вносили в культуральную среду в конечной концентрации 100 мкг/мл через 1 ч после адсорбции вируса на клетках MDCK. В экспериментах *in vivo* Тамифлю® вводили мышам один раз в сутки перорально из расчета 30 мкг/г массы в объеме 0,2 мл сразу после заражения и далее в течение 4 сут после заражения вирусом гриппа.

Лабораторные животные. В работе были использованы мыши Balb/c массой 14–16 г, полученные из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Мышей содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды, подвергали эвтаназии в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [4].

Определение противовирусной активности экстрактов на культуре клеток. Для определения противовирусной активности грибных экстрактов *in vitro* применяли максимально переносимые концентрации (МПК) препаратов. В среде Stem Alpha.MDCK, содержащей 2 мкг/мл трипсина, готовили 8 разведений ВАЖ с десятикратным шагом. На монослой клеток MDCK вносили разведения экстракта в объеме 50 мкл/лунку и разведения вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) (с 1-го по 8-е) в объеме 100 мкл/лунку. Клетки инкубировали 3 сут при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в термостате. Затем в каждой лунке с помощью инвертированного микроскопа регистрировали цитопатическое действие в монослое клеток и определяли наличие вируса гриппа в среде культивирования по реакции гемагглютинации с 1 % эритроцитами кур. Определяли инфекционность вируса в клетках, то есть титры вируса гриппа в Ig ТЦД₅₀/мл в опыте и контроле (ИД₅₀ *in vitro* с экстрактом и без него), а затем высчитывали индекс его нейтрализации (ИН) под влиянием экстракта: $ИН = ИД_{50}^{контроль} - ИД_{50}^{опыт} (lg)$ [5].

Изучение противогриппозного действия экстрактов на лабораторных мышях. Мышей инфицировали интраназально под легким эфирным наркозом при введении в обе ноздри суммарно 40 мкл соответствующего разведения штамма вируса гриппа A/Moscow/226/2009 (H1N1)v в дозе 10 ИД₅₀ (50 %-х инфицирующих доз *in vivo*), равной $1,3 \pm 0,3$ Ig ЭИД₅₀/гол. (десятичных логарифмов 50 %-й эмбриональной инфицирующей дозы), применение которой приводило к инфицированию 100 % животных (ИД₁₀₀). Мышам перорально вводили экстракты базидиальных грибов родов *Laetiporus* и *Inonotus* в объеме 200 мкл/гол. сразу после заражения вирусом гриппа и далее один раз в день в течение 4 сут. Дозу вводимых экстрактов определили опытным путем в предварительных экспериментах. Определение концентрации ВГ в легких животных проводили через 4 сут. после заражения вирусом гриппа при титровании объединенных гомогенатов легких для мышей каждой

группы на культуре клеток MDCK, рассчитывали по методу Спирмана – Кербера и выражали в lg ТЦД₅₀/мл [2].

Статистическая обработка данных. При расчетах 50 %-х инфицирующих доз и титров вируса гриппа в биологических образцах в каждом единичном повторе использовали метод Спирмана – Кербера: определяли 95 %-й доверительный интервал (I₉₅) и сравнивали по z-критерию [2]. Для нескольких повторов определяли среднее значение показателя (M) и ошибку среднего (m), достоверность различия средних величин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента [2].

Результаты и обсуждение

Первичный скрининг противовирусной активности водных экстрактов базидиальных грибов в отношении пандемического вируса гриппа A/Moscow/226/2009 (H1N1)v нами был проведен на культуре клеток MDCK. Было показано, что все исследованные экстракты подавляют репликацию пандемического вируса гриппа (H1N1)v (таблица). Представленные в таблице данные свидетельствуют о достоверном снижении инфекционности вируса гриппа в культуре клеток MDCK при инкубировании с экстрактами на (2,69 – 3,22) lg относительно контроля. Инфекционность вируса гриппа в клетках MDCK при использовании Тамифлю® также была ниже, чем в контроле на 2,90 lg.

Далее по результатам экспериментов в культуре клеток MDCK нами были отобраны наиболее эффективные экстракты для определения способности подавлять продукцию штамма вируса гриппа A/Moscow/226/2009 (H1N1)v в легких у лабораторных мышей через 4 сут после заражения (таблица). Как видно из таблицы, через 4 сут после инфекции концентрация вируса гриппа в гомогенатах легких у мышей, получавших препараты 09-12, 09-24 и Тамифлю®, была достоверно ниже контроля на 2,00; 1,83 и 2,16 lg соответственно.

Таблица

Противовирусная активность водных экстрактов базидиомицетов в отношении пандемического вируса гриппа A/Moscow/226/2009 (H1N1)v in vitro и in vivo

Препараты	Концентрация препаратов in vitro (мг/мл)	Суточная доза препаратов in vivo (мкг/г массы мыши)	Инфекционность вируса в клетках MDCK (ИД ₅₀ в lg ТЦД ₅₀ /мл) через 3 сут после заражения при инкубировании с препаратами (M±m, n=6)	Титры вируса (в lg ТЦД ₅₀ /мл ±I ₉₅) в гомогенатах легких у мышей, через 4 сут после заражения при пероральном введении препаратов
09-11 (Ganoderma Applanatum)	4,4	180,0	2,65±0,08*	н/и
09-12 (Laetiporus Sulphureus)	1,7	66,7	2,23±0,08*	1,83±0,21*

09-24 (<i>Inonotus Obliquus</i>)	9,2	366,7	2,76±0,08*	2,00±0,22*
Тамифлю	0,1	30,0	2,55±0,09*	1,67±0,17*
Контроль (без препарата)			5,45±0,08	3,83±0,21

Примечание: * – достоверное отличие от соответствующего контроля ($p \leq 0,05$);
n – число повторов; н/и – не исследовали.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что исследованные водные экстракты базидиальных грибов *Ganoderma applanatum*, *Inonotus obliquus*, *Laetiporus sulphureus* подавляют репликацию пандемического вируса гриппа А/Moscow/226/2009 (H1N1)v в культуре клеток MDCK. Кроме того, при пероральном введении экстрактов базидиальных грибов *Laetiporus sulphureus* и *Inonotus obliquus* мышам, инфицированным этим штаммом, наблюдается уменьшение его продукции в легких.

Одной из возможных причин эффективности проверяемых экстрактов, выделенных из базидиальных грибов, является наличие в них полисахаридов, меланинов, флавоноидов и других биологически активных веществ [1, 10, 12, 13].

Заключение

Обнаружение противовирусной активности экстрактов базидиальных грибов открывает перспективу для дальнейших исследований по созданию на их основе препаратов, обладающих профилактическим и лечебным эффектом в отношении вируса гриппа, в том числе пандемического вируса гриппа А(H1N1)2009.

Список литературы

1. Белова Н. В. Перспективы использования биологически активных соединений высших базидиомицетов в России // Микология и фитопатология. – 2004. – Т. 38, № 2. – С. 1-7.
2. Закс Л. Статистическое оценивание. – М.: Статистика, 1976. – 598 с.
3. Мейхи Б. Вирусология. Методы. – М.: Мир, 1988. – 344 с.
4. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. – Washington, D.C.: National Academy Press, 1996. – 138 с.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Хабриева Р. У. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
6. Теплякова Т. В., Косогова Т. А., Мазуркова Н. А. и др. Ингибитор репродукции вируса гриппа А на основе базидиального гриба *Phallus impudicus* // Патент РФ № 2475529, опубл. в БИ № 5 от 20.02.2013.

7. Теплякова Т. В., Косогова Т. А., Мазуркова Н. А. и др. Ингибитор репродукции вируса гриппа А на основе базидиального гриба *Laetiporus sulphureus* // Патент РФ № 2475530, опубл. в БИ № 5 от 20.02.2013.
8. Щелканов М. Ю. Эволюция высоковирулентного вируса гриппа А (H5N1) в экосистемах Северной Евразии (2005–2009 гг.): Автореферат дис... д-ра биол. наук. – М., 2010. – 53 с.
9. Ali N. A. A., Jansen R., Pilgrim H. et al. Hispolon, a yellow pigment from *Inonotus hispidus* // *Phytochemistry*. – 1996. – V. 41, № 3. – P. 927-929.
10. Brandt C. R. and Pirano F. Mushroom antiviral // *Recent Res Dev Antimicrobial Agent Chemoter.* – 2000. – V. 4. – P. 11-26.
11. Mothana R. A. A., Awadh A. N. A., Jansen R. et al. Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma preifferi* // *Fitoterapia*. – 2003. – V. 74. – P. 177-180.
12. Pirano F. F. The Development of the Antiviral Drug RC 28 from *Rozites caperata* (Pers.: Fr.) P. Karst. (Agaricomycetidae) // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2005. – V. 7. – P. 356.
13. Teplyakova T. V., Psurtseva N. V., Kosogova T. A. et al. Antiviral Activity of Polyporoid Mushrooms (Higher Basidiomycetes) from Altai Mountains // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2012. – V. 14, № 1. – P. 37-45.

Рецензенты:

Трошкова Галина Павловна, д-р биол. наук, профессор, заведующая сектором биохимии отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская область.

Белявская Валентина Александровна, д-р биол. наук, заведующая сектором отдела научно-методической подготовки персонала по работе с возбудителями особо опасных инфекций, профессор ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская область.