

ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ВЫСШИХ ГРИБОВ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Костина Н.Е.¹, Ибрагимова Ж.Б.¹, Проценко М.А.¹, Макаревич Е.В.¹, Скарнович М.А.¹,
Филиппова Е.И.¹, Горбунова И.А.², Власенко В.А.², Трошкова Г.П.¹, Мазуркова Н.А.¹,
Шишкина Л.Н.¹

¹Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», 630559, Новосибирская область, п. Кольцово, e-mail: nekostina@vector.nsc.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный Сибирский ботанический сад СО РАН, 630090, Новосибирск, Золотодолинская, 101

С целью изучения биохимического состава и противовирусной активности были получены и охарактеризованы экстракты высших грибов более 20 наименований, произрастающих на территории Новосибирской области (Юг Западной Сибири). В водных и этанольных экстрактах высших грибов обнаружено наличие белков, полисахаридов, тритерпенов, каротиноидов и в некоторых экстрактах - флавоноидов. Обнаружено, что диапазон содержания полисахаридов в экстрактах грибов достаточно широк и составляет в водных экстрактах от 8,5 мг/г для *Flammulina velutipes* до 373 мг/г для *Trichaptum biforme*, в этанольных экстрактах от 37,9 мг/г для *Fomitopsis pinicola* до 451,3 мг/г для *Daedaleopsis tricolor*. Содержание суммарного белка составляет от 3,0 мг/г в водном экстракте *Amanita muscaria* до 44,1 мг/г в этанольном экстракте *Lycoperdon pyriforme*. Водные экстракты *Coprinus comatus* и *Trametes trogii*, а также этанольные экстракты *Lycoperdon pyriforme*, *Phallus impudicus*, *Steccherinum ochraceum* и *Bjerkandera adusta* проявляли противовирусную активность в отношении ортопоксвирусов (вирусов осповакцины и оспы мышей) и вируса простого герпеса 2-го типа. Оценка количественного содержания биологически активных веществ (БАВ) в экстрактах имеет прогностическое значение при анализе их биологического действия, в том числе противовирусной активности, и играет важную роль при создании комплексных противовирусных препаратов в отношении ДНК-содержащих вирусов.

Ключевые слова: высшие грибы, водные и этанольные экстракты, биологически активные вещества, ортопоксвирусы, вирус герпеса, культура клеток Vero, противовирусные свойства.

ISOLATION, CHARACTERISTIC AND ANTIVIRAL PROPERTIES OF BIOLOGICALLY ACTIVE AGENTS OF THE HIGHEST MUSHROOMS OF WESTERN SIBERIA

Kostina N.E.¹, Ibragimova Zh.B.¹, Protsenko M.A.¹, Makarevich E.V.¹, Skarnovich M.A.¹,
Philippova E.I.¹, Gorbunova I.A.², Vlasenco V.A.², Troshkova G.P.¹, Mazurkova N.A.¹,
Shishkina L.N.¹

¹State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, 630559, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia, e-mail: nekostina@vector.nsc.ru

²Central Siberian botanical garden Russian Academy of Sciences Siberian branch research institution, 630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya st., 101

In order to study the biochemical composition and antiviral activity were prepared and characterized extracts of more than 20 higher fungi, which grow in the Novosibirsk region (South of Western Siberia). It was revealed the presence proteins, polysaccharides, carotenoids, triterpenes and flavonoids (in a few samples) in the aqueous and ethanol extracts of higher fungi. It was found that the polysaccharides content in aqueous extracts ranges from 8,5 mg/g for *Flammulina velutipes* to 373 mg/g for *Trichaptum biforme* and in ethanol extracts from 37,9 mg/g for *Fomitopsis pinicola* to 451,3 mg/g for *Daedaleopsis tricolor*. Total protein content is from 3.0 mg/g in aqueous extract of *Amanita muscaria* to 44.1 mg/g in ethanol extract of *Lycoperdon pyriforme*. Aqueous extracts of *Coprinus comatus* and *Trametes trogii* and ethanol extracts of *Lycoperdon pyriforme*, *Phallus impudicus*, *Steccherinum ochraceum* and *Bjerkandera adusta* showed antiviral activity against orthopoxviruses (vaccinia and mousepox viruses) and herpes simplex virus type 2. Quantification of groups of biologically active substances (BAS) in the extracts has prognostic value in the evaluation of their biological effects, including anti-viral activity. Evaluation of quantitative content of biologically active substances (BAS) in extracts has the prognostic importance in the analysis of their biological activities, including antiviral activity, and plays an important role in establishing integrated antivirals against DNA-containing viruses.

Key words: higher fungi, aqueous and ethanol extracts, biologically active substances, orthopoxviruses, herpes virus, cell culture Vero, antiviral properties.

Введение

В Новосибирской области произрастает широкий спектр высших грибов, лишь незначительная доля которых традиционно используется в качестве лекарственного сырья. Поиск эффективных лекарственных средств природного происхождения актуален с древних времен и по сей день.

Известны многочисленные примеры выявления противовирусного эффекта как у цельных экстрактов, так и отдельных белковых и полисахаридных фракций некоторых видов базидиальных грибов [1; 5; 6; 8]. Наряду с белками и полисахаридами, противовирусную активность проявляют такие группы БАВ, как тритерпены и каротиноиды [2; 4; 6]. Например, экстрагированные метанолом из *Ganoderma lucidum* (трутовик лакированный) тритерпены, в частности ганодермадиол, люцидадиол, аппланоксидеявая кислота G, ингибировали *in vitro* вирус гриппа А и проявляли выраженную активность в отношении ВИЧ-1 [6].

Из *Laetiporus sulphureus* (трутовик серно-жёлтый) были выделены каротиноиды, проявляющие, наряду с антиоксидантной и иммуномодулирующей активностью, противовирусную активность [2].

Ряд флавоноидов растительного происхождения наряду с антиаллергенными, антибактериальными, противоопухолевыми и антиоксидантными свойствами проявляет и противовирусную активность [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**].

С целью изучения биохимического состава и противовирусной активности были получены и охарактеризованы экстракты более двух десятков высших грибов лесного происхождения.

Материалы и методы

Объектом исследования служили плодовые тела высших грибов: *Flammulina velutipes*, *Coprinus comatus*, *Amanita muscaria*, *Lycoperdon pyriforme*, *Phallus impudicus*, *Fomitopsis pinicola*, *Laetiporus sulphureus*, *Trametes suaveolens*, *Trametes versicolor*, *Daedaleopsis tricolor*, *Daedaleopsis confragosa*, *Ganoderma applanatum*, *Trametes ochracea*, *Trametes trogii*, *Piptoporus betulinus*, *Phellinus igniarius*, *Cerrena unicolor*, *Steccherinum ochraceum*, *Bjerkandera adusta*, *Trichaptum biforme*, *Fomes fomentarius*, собранные осенью 2012 г. на территории Новосибирской области.

Для получения экстрактов использовали воздушно-сухое измельченное сырье. Экстракцию БАВ из подготовленного сырья проводили водой и водно-этанольной смесью. При получении из грибов сухих этанольных экстрактов использовали метод четырехкратной

ремацерации при температуре 60 °С и соотношении сырья к экстрагенту 1:50, общее время экстракции составило 8 часов, экстрагент – 70%-ный этанол. При получении из грибов сухих водных экстрактов сырье с водой нагревали при 95 °С в колбе с обратным холодильником в течение часа, отделяли экстракт, и процедуру повторяли. Охлажденные экстракты фильтровали, упаривали и сушили при температуре 60 °С.

В сухих экстрактах физико-химическими методами анализировали содержание суммарного белка методом Бредфорд, полисахаридов - модифицированным антроновым методом Дрейвуда, флавоноидов по реакции комплексообразования с хлоридом алюминия в пересчете на дигидрокверцетин, наличие тритерпенов и каротиноидов определяли по подвижности в тонкослойной хроматографии [3].

Для тестирования токсичности и противовирусной эффективности грибных экстрактов использовали перевиваемую культуру клеток Vero, полученных из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Суспензию клеток с концентрацией 1×10^5 кл./мл питательной среды DMEM 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 DMEM, вносили по 100 мкл/лунку экстрактов и планшеты ставили в термостат на 4 сут. при температуре 37 °С, 5% CO₂ и 100% влажности. Через 4 сут. с помощью инвертированного микроскопа оценивали деструктивные изменения в монослое клеток Vero, инкубированных с разными концентрациями экстрактов. В качестве контроля использовали монослой культуры клеток Vero без экстракта. Определяли минимальную токсическую концентрацию (МТК) и максимальную 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.

В работе использовали ортопоксвирусы: вирус осповакцины (штамм Л-ИВП) и вирус оспы мышей (штамм К-1), а также вирус простого герпеса 2-го типа (штамм MS), полученные из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Для определения противовирусной активности грибных экстрактов *in vitro* применяли МПК препаратов. В среде DMEM готовили 8 разведений вирусодержащей культуральной жидкости (ВКЖ) с десятикратным шагом. На монослой клеток Vero вносили разведения экстракта в объеме 100 мкл/лунку и разведения ВКЖ (с 1-го по 8-е) в объеме 100 мкл/лунку. Клетки инкубировали 4 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. Определяли инфекционность вирусов в клетках, то есть титры вирусов в Ig ТЦД₅₀/мл в опыте и контроле (ИД₅₀ in vitro с экстрактом и без него), а затем высчитывали индекс нейтрализации (ИН) вирусов под влиянием экстракта: $ИН = \frac{ИД_{50} \text{контроль}}{ИД_{50} \text{опыт}} (Ig)$.

Результаты и обсуждение

Получены водные и этанольные экстракты более двадцати наименований грибов, перечисленных в разделе **Материалы и методы**. В таблице 1 показано, что доля экстрактивных веществ в грибах независимо от типа экстрагента варьирует в широком интервале: от 61,9% в *Coprinus comatus* до 5,6% в *Fomes fomentarius* и 8,4% в *Daedaleopsis tricolor*.

Сухие экстракты охарактеризованы по содержанию белков, полисахаридов и флавоноидов. Показано, что полисахариды и белки присутствуют во всех 23 образцах водных и 23 образцах этанольных грибных экстрактов (табл. 1). Диапазон содержания полисахаридов достаточно широк и составляет в водных экстрактах от 8,5 мг/г для *Flammulina velutipes* до 373 мг/г для *Trichaptum biforme* и в этанольных экстрактах от 37,9 мг/г для *Fomitopsis pinicola* до 451,3 мг/г для *Daedaleopsis tricolor*. Не всегда водный экстракт содержит больше полисахаридов, чем этанольный. Например, содержание полисахаридов в этанольном экстракте *Amanita muscaria* 190 мг/г, а в его же водном экстракте 100 мг/г. Это же относится и к *Lycoperdon pyriforme*, *Trametes versicolor*, *Daedaleopsis tricolor*, *Ganoderma applanatum* и *Bjerkandera adusta* (табл. 1). Содержание суммарного белка составляет от 3,0 мг/г в водном экстракте *Amanita muscaria* до 44,1 мг/г в этанольном экстракте *Lycoperdon pyriforme*.

Каротиноиды обнаружены практически во всех этанольных экстрактах (в 19 из 21 исследованного образца); тритерпены обнаружены в 3 из 20 водных экстрактов и в 10 из 21 образца этанольных экстрактов (табл. 1).

Флавоноиды в большинстве водных и этанольных экстрактов присутствуют в следовых количествах, кроме 4 этанольных экстрактов: *Fomes fomentarius* (304 мг/г), *Fomitopsis pinicola* (18,0 мг/г), *Trametes ochracea* (16,7 мг/г) и *Trametes trogii* (15,9 мг/г). В водных экстрактах заметное содержание флавоноидов обнаружено только в 2 образцах: *Fomes fomentarius* (35,5 мг/г) и *Fomitopsis pinicola* (47,5 мг/г), причем группа флавоноидов представлена в основном дигидрокверцетином и лютеолин-7-гликозидом (табл. 1).

Изучение противовирусных свойств водных и спиртовых экстрактов базидиомицетов в перевиваемой линии клеток Vero показало их активность в отношении ДНК-содержащих вирусов (осповакцины, оспы мышей и простого герпеса 2-го типа).

В таблице 2 приведены данные противовирусной активности для водных и этанольных экстрактов базидиомицетов, обнаруживших наибольшую активность в отношении этих вирусов. Показано, что все экстракты, проявившие выраженную противовирусную активность, содержат каротиноиды и тритерпены.

Таблица 1

Характеристика экстрактов высших грибов Западной Сибири

Наименование	Водный экстракт					Этанольный экстракт					
	ЭВ,%	ПС, мг/г	Белки, мг/г	ФЛ, мг/г	Три-терпены	ЭВ,%	ПС, мг/г	Белки, мг/г	ФЛ, мг/г	Каротиноиды	Три-терпены
<i>Flammulina velutipes</i>	42,2	8,5	3,0	≤ 5	–	50,1	49,1	6,7	≤ 5	+	–
<i>Coprinus comatus</i>	61,9	202,0	17,2	≤ 5	–	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
<i>Amanita muscaria</i>	21,8	100,0	4,5	≤ 5	–	44,8	190,3	3,0	≤ 5	–	–
<i>Lycoperdon pyriforme</i> перезрелый	24,5	221,0	24,5	≤ 5	–	23,0	354,7	44,1	≤ 5	+	+
<i>Lycoperdon pyriforme</i> молодой	31,5	224	3,9	≤ 5	–	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
<i>Phallus impudicus</i> шляпки	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	42,3	356,1	8,0	≤ 5	+	+
<i>Phallus impudicus</i> ножки	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	51,4	151,2	2,4	≤ 5	+	–
<i>Fomes fomentarius</i>	5,6	279,6	1,4	35,5	–	5,7±0,1	123±4	9±1	304±15	+	+
<i>Fomitopsis pinicola</i>	8,8	135,4	8,5	47,5	–	23,3	37,9	5,8	18,0	–	+
<i>Laetiporus sulphureus</i>	16,6	87,2	2,5	≤ 5	–	11,2	85,0	4,1	≤ 5	+	–
<i>Trametes suaveolens</i>	17,1	238,8	0,8	≤ 5	–	6,1	119,0	5,4	≤ 5	+	–
<i>Trametes versicolor</i>	16,6	154,3	2,2	≤ 5	–	6,1	293,6	4,3	≤ 5	+	–
<i>Daedaleopsis tricolor</i>	8,4	177,4	7,9	≤ 5	+	6,4	451,3	5,0	≤ 5	+	–
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	12,6	193,5	4,4	≤ 5	–	6,3	233,9	4,1	≤ 5	+	–
<i>Ganoderma applanatum</i>	10,8	124,4	15,9	≤ 5	–	7,7	261,2	14,0	≤ 5	+	+
<i>Trametes ochracea</i>	23,6	53,6	2,2	≤ 5	–	6,3	217,2	8,5	16,7	+	+
<i>Trametes trogii</i>	9,6	237,4	6,6	≤ 5	–	4,8	233,0	3,3	15,9	+	–
<i>Piptoporus betulinus</i>	20,1	187,1	3,6	≤ 5	–	23	100,3	1,7	≤ 5	+	–
<i>Phellinus igniarius</i>	15,2	220,4	15,5	≤ 5	+	5,7	166,3	9,3	≤ 5	+	–
<i>Cerrena unicolor</i>	16,2	215,6	9,2	≤ 5	–	10,2	216,4	10,4	≤ 5	+	+
<i>Steccherinum ochraceum</i>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	11	129,7	7,4	≤ 5	+	+
<i>Bjerkandera adusta</i>	21,3	104,5	37,0	≤ 5	–	15,9	202,5	7,1	≤ 5	+	+
<i>Trichaptum bifforme</i>	8,8	373,2	11,3	≤ 5	+	6,1	124,4	14,0	≤ 5	+	+

Примечание: + присутствуют; - отсутствуют; ЭВ – экстрактивные вещества; ПС – полисахариды; ФЛ – флавоноиды; н/о - не определяли

Водные экстракты *Coprinus comatus* и *Trametes trogii*, не содержащие тритерпены, обнаруживают по сравнению с экстрактами, имеющими эти биологически активные соединения в своем составе, сниженную противовирусную активность в отношении вируса оспы мышей и вируса простого герпеса 2-го типа (табл. 2). Водный экстракт *Lycoperdon pyriforme*, проявляющий активность только в отношении одного ДНК-содержащего вируса - вируса простого герпеса 2-го типа (данные не представлены), содержит незначительные количества белков, каротиноидов и тритерпенов. Известно, что каротиноиды и терпеноиды участвуют в повышении сопротивляемости организма к воздействию инфекционных агентов, в том числе вирусов [2; 4]. Следовательно, присутствие в экстракте групп веществ каротиноидов и терпеноидов увеличивает вероятность наличия противовирусной активности исследуемого экстракта.

С другой стороны, ни для одного экстракта, содержащего флавоноиды, в том числе и этанольного экстракта гриба *Fomes fomentarius*, содержащего наибольшее количество флавоноидов (304 мг/г), нами не обнаружена противовирусная активность в отношении ДНК-содержащих вирусов, используемых в работе (данные не приведены).

Таблица 2

Противовирусная активность водных и этанольных экстрактов высших базидиальных грибов в культуре клеток Vero в отношении ДНК-содержащих вирусов

№№	Название гриба	Обозначение экстракта [•]	Индекс нейтрализации вирусов семейства, lg		
			ортопоксвирусов		герпеса
			Вирус осповакцины, штамм Л-ИВП	Вирус оспы мышей, штамм К-1	Вирус простого герпеса 2-го типа, штамм MS
1.	Навозник белый <i>Coprinus comatus</i>	2W [▲]	2,9	2,0	3,3
2.	Дождевик грушевидный <i>Lycoperdon pyriforme</i>	4AE [■]	3,3	3,3	5,5
3.	Весёлка обыкновенная <i>Phallus impudicus</i>	5AE	2,5	3,0	4,5
4.	Траметес Трога <i>Trametes trogii</i>	14W	2,5	2,5	2,5
5.	Стекхеринум охристый <i>Steccherinum ochraceum</i>	18E	2,4	3,1	3,0
6.	Трутовик опаленный <i>Bjerkandera adusta</i>	19E	2,1	2,9	3,2

Примечание: • - экстракты использовали в концентрации 5 мг/мл; ▲ – водный экстракт; ■ - этанольный экстракт.

Выводы

Характеристика грибных экстрактов по содержанию групп БАВ может иметь прогностическое значение их биологического действия, в том числе противовирусной активности. Максимальный терапевтический эффект может быть достигнут при сочетании суммы биологически активных веществ из разных грибов, т.е. при объединении БАВ из нескольких грибов в одном лекарственном препарате. Водные экстракты грибов *Coprinus comatus* и *Trametes trogii*, а также этанольные экстракты грибов *Lycoperdon pyriforme*, *Phallus impudicus*, *Steccherinum ochraceum* и *Vjerkandera adusta*, содержащие комплекс БАВ, могут стать основой противовирусных препаратов в отношении ДНК-содержащих вирусов.

Список литературы

1. Власенко В.А., Теплякова Т.В., Мазуркова Н.А., Косогова Т.А., Бардашова А.В., Псурцева Н.В. Изучение противовирусной активности лекарственных грибов рода *Phellinus* S.L. в Западной Сибири // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2012. - № 4 (90). - С. 29-31.
2. Капич А.Н., Гвоздкова Т.С., Квачева З.Б., Николаева С.Н., Шишкина Л.Н., Галкин С., Хатакка А., Конопля Е.Ф., Верещако Г.Г., Ходосовская А.М., Рутковская Ж.А. Антиоксидантные, радиозащитные и противовирусные свойства экстрактов мицелия гриба *L. sulphureus* в условиях глубинного культивирования // Успехи медицинской микологии. – 2004. – Т. 3. – С. 146.
3. Трошкова Г.П., Костина Н.Е., Проценко М.А., Скарнович М.А. Оптимизация технологии получения сухого экстракта из гриба *Fomes fomentarius* // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 4. - URL: <http://www.science-education.ru/104-6885> (дата обращения: 01.06.2013).
4. Chairul J.C., Tokuyama T., Hayashi Y., Nishizawa M., Tokuda H., Chairul S.M. et al. Applanoxidic acids A, B, C and D, biologically active tetracyclic triterpenes from *Ganoderma applanatum* // *Phytochemistry*. - 1991. – V. 30. - P. 4105-4109.
5. Collins R.A., Ng T.B. Polysaccharopeptide from *Trametes versicolor* has potential for use against human immunodeficiency virus type 1 infection // *Life Science*. - 1997. - V. 60. - N 25. - P. 383-387.
6. El-Mekawy S., Meselhy M.R., Nakamura N., Tezuka Y., Hattori M., Kakiuchi N. Anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum* // *Phytochemistry*. – 1998. – V. 49. – P. 1651-1657.

7. Jiang Du, Zhen-Dan He, Ren-Wang Jiang, Wen-Cai Ye, Hong-Xi Xu, Paul Pui-Hay But. Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. // *Phytochemistry* – 2003. - V. 62. – P. 1235–1238.
8. Teplyakova T.V., Psurtseva N.V., Kosogova T.A., Mazurkova N.A., Khanin V.A., Vlasenko V.A. Antiviral Activity of Polyporoid Mushrooms (Higher Basidiomycetes) from Altai Mountains (Russia) // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2012. - V. 14, № 1. - P. 37-45.

Рецензенты:

Теплякова Т.В., д.б.н., профессор, заведующая лабораторией микологии, Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская область.

Белявская В.А., д.б.н., профессор, заведующая сектором отдела научно-методической подготовки персонала по работе с возбудителями особо опасных инфекций, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская область.