

acterization of a fundamental passage-dependent transformation of a cell line. J. Pharm. Sci. 2011; 100: 3751–62.

18. Chiapponi C., Zanni I., Garbarino C. et al. Comparison of the usefulness of the CaCo-2 cell line with standart substrates for isolation of swine influenza A viruses. J. Virol. Meth. 2010; 163: 162–5.
19. Jahangir A., Ruenphet S., Hara K. et al. Evaluation of human intestinal epithelial differentiated cells (CaCo-2) for replication, plaque formation and isolation of avian influenza viruses. J. Virol. Meth. 2010; 169: 232–8.
20. Li I.W.S., Chan K.H., To K.W.K. et al. Differential susceptibility of different cell lines to swine-origin influenza A H1N1, seasonal human influenza A H1N1, and avian influenza A H5N1 viruses. J. Clin. Virol. 2009; 46 (4): 325–30.

REFERENCES

1. WHO manual on influenza diagnosis and surveillance. 2011. http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090_eng.pdf - 10.11.2011
2. Mochalova L., Gambaryan A., Romanova J. et al. Receptor-binding properties of modern human influenza viruses primarily isolated in Vero and MDCK cells and chicken embryonated eggs. Virology. 2003; 313: 473–80.
3. Madin S.H., Darby N.B. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1958; 98: 574–6.
4. Tobita K., Sugiura A., Enomoto C., Furuyama M. Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. Med. Microbiol. Immunol. 1975; 162: 9–14.
5. Bouvier N., Palese P. The biology of influenza viruses. Vaccine. 2008; 26 (Suppl. 4): D49–53.
6. Matrosovich M., Matrosovich J., Carr N.A et al. Overexpression of the α -2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. J. Virol. 2003; 77: 8418–25.
7. Hatakeyama S., Sakai-Tagawa Y., Kiso M. et al. Enhanced expression of an α -2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves isolation of human influenza viruses and evaluation of their sensitivity to a neuraminidase inhibitor. J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 4139–46.
8. Chu C., Lugovtsev V., Lewis A. et al. Production and antigenic properties of influenza virus from suspension MDCK-siat7e cells in

a bench-scale bioreactor. Vaccine. 2010; 28: 7193–201.

9. Li N., Zhang F.Y., Yu X.H. et al. Overexpression of α -2,6 sialyltransferase stimulates propagation of human influenza viruses in Vero cells. Acta Virol. 2011; 55: 147–53.
10. Pinto M., Robin-Leon S., Appay M.T. et al. Enteroocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line CaCo-2 in culture. Biol. Cell. 1983; 7: 323–30.
11. Yoshino S., Yamamoto S., Kawabata N. Use of CaCo-2 cells for isolation of influenza virus. Kansenshogaku Zasshi. 1998; 72: 347–51.
12. Zhirnov O., Klenk H.D. Human influenza A viruses are proteolytically activated and do not induce apoptosis in CaCo-2 cells. Virology. 2003; 15: 198–212.
13. Jackman M.R., Shurety W., Ellis J.A. et al. Inhibition of apical but not basolateral endocytosis of ricin and folate in CaCo-2 cells by cytochalasin D. J. Cell Sci. 1994; 107: 2547–56.
14. Danilenko D.M., Smirnova T.D., Gudkova T.M. et al. Voprosy virusologii. 2011; 56 (6): 14–9 (in Russian).
15. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 1938; 27: 493–7.
16. Woodcock S., Williamson L., Hassan I. et al. Isolation and characterization of clones from the CaCo-2 cell line displaying increased taurocholic acid transport. J. Cell Sci. 1991; 98: 323–32.
17. Jahn K.A., Biazik J.M., Braet F. GM1 expression in CaCo-2 cells: characterization of a fundamental passage-dependent transformation of a cell line. J. Pharm. Sci. 2011; 100: 3751–62.
18. Chiapponi C., Zanni I., Garbarino C. et al. Comparison of the usefulness of the CaCo-2 cell line with standart substrates for isolation of swine influenza A viruses. J. Virol. Meth. 2010; 163: 162–5.
19. Jahangir A., Ruenphet S., Hara K. et al. Evaluation of human intestinal epithelial differentiated cells (CaCo-2) for replication, plaque formation and isolation of avian influenza viruses. J. Virol. Meth. 2010; 169: 232–8.
20. Li I.W.S., Chan K.H., To K.W.K. et al. Differential susceptibility of different cell lines to swine-origin influenza A H1N1, seasonal human influenza A H1N1, and avian influenza A H5N1 viruses. J. Clin. Virol. 2009; 46 (4): 325–30.

Поступила 16.01.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 615.281.8.03:616.98:578.825.12].015.44

М.В. Полковникова, Н.Н. Носик, Т.М. Гараев, Н.Г. Кондрашина, М.П. Финогенова, В.А. Шибнев

Изучение противогерпетических свойств экстрактов из березового гриба *Inonotus Obliquus*

фГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского», Минздрава России, 123098, г. Москва

Разработаны различные схемы получения экстрактов березового гриба – чаги (*Inonotus obliquus*), обладающего высоким содержанием биологически активных веществ. Установлено, что водные, водно-спиртовые и щелочные экстракты мало токсичны для клеток и обладают способностью защищать культуру клеток Vero от цитодеструктивного действия вируса простого герпеса. Изученная более детально фракция IV, полученная методом щелочной экстракции, в концентрации 5,0 мкг/мл полностью защищала клетки при внесении до или в течение часа после инфицирования вирусом простого герпеса, тип 1.

Ключевые слова: березовый гриб чага; вирус простого герпеса; противовирусное действие; культура клеток Vero.

A study of the antiherpetic activity of the chaga mushroom (*Inonotus Obliquus*) extracts in the Vero cells infected with the herpes simplex virus

M. V. Polkovnikova, N. N. Nosik, T. M. Garaev, N. G. Kondrashina, M. P. Phinogenova, V. A. Shibnev

D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) contains a wide range of excellent bioactive compounds. However, limited information exists on the antiviral activity of the compounds extracted from chaga. A number of subfractions of chaga were obtained using different solvents and different procedures. The subfractions of chaga extracted with water, alcohol, alkali were tested for their toxicity for the Vero cell culture and antiviral effect in the Vero cells infected with the Herpes simplex virus (HSV), Type 1. It was shown that most of the subfractions were not toxic for the Vero cells and had protective effect on the Vero cells infected with HSV. The subfraction IV in the concentration 5 μ g/ml protected the Vero cells from cytodestructive action of HSV and no viral DNA was detected in infected cells treated with chaga extracts. Best protective effect was observed when compound was added before or within one hour after the Vero cells were infected with HSV.

Key words: chaga mushroom (*Inonotus obliquus*); herpes simplex virus; protective effect, Vero cells.

Введение

Березовый гриб, известный на Руси как чага, с древних времен используется в народной медицине [1]. Впервые чага всесторонне изучена в СССР специалистами Ботанического института им. В.Н. Комарова АН СССР и Первого Ленинградского медицинского института им. И.П. Павлова в середине XX столетия (П.К. Булагов, М.П. Березина, Г.А. Якимов, Е.Я. Мартынова и др.). Эти исследования не потеряли своей актуальности до настоящего времени [2, 3].

Лечебными свойствами обладает та чага, которая растет на березе. Для медицинских целей используют только гриб, растущий на живых стволах. Чага распространена в европейской части России, Западной Сибири, на Дальнем Востоке, Северном Кавказе и Урале [4, 5].

Особенностью этого гриба-паразита является высокое содержание биологически активных веществ. Их идентификация и выделение до настоящего времени изучены мало.

Известно лишь то, что основная масса их относится к так называемым полифенол-карболовым кислотам, в чаге также содержатся жирные кислоты, полисахариды, лигнин, клетчатка, стерин [6].

Установлено, что чага повышает защитные реакции организма, активизирует обмен веществ в мозговых тканях, снижает артериальное и венозное давление, оказывает противовоспалительное действие не только при внутреннем, но также и при наружном применении. Наибольшую известность получил водный экстракт чаги в качестве противоопухолевого средства [6].

Такой широкий спектр биологической активности позволил предположить наличие в чаге противовирусных свойств. На это указывают и данные японских исследователей, установивших эффект ингибирования протеазы ВИЧ [7].

Нами были получены экстракты из березового гриба с использованием различных схем экстракции, которые были испытаны на их способность оказывать противовирусное действие.

Материалы и методы.

Получение экстрактов чаги. Наружный слой березового гриба, собранного в Подмосковье, подвергался измельчению и экстракции. Были разработаны различные схемы экстракции.

Вирус. В качестве модельного вируса использовали вирус простого герпеса (ВПГ), 1-го типа (ВПГ-1) штамм Л2, полученный из Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского». Вирус культивировали в перевиваемых клетках Vero. Титр вируса $4,5 \lg$ ТЦИД₅₀.

Клетки. Исследования проводили в перевиваемой культуре фибробластов почки зеленой маргаритки (Vero). Клетки культивировали в 96-луночных культуральных планшетах в среде Игла MEM с 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Панэко).

Критерии определения противовирусного действия. Противовирусную активность экстрактов чаги определяли цитомикроскопическим методом по степени защиты инфицированных клеточных культур от цитодеструктивного действия 100 ТЦИД₅₀/0,2мл вируса герпеса (от 0 до 100% – полная защита). В качестве подтверждающего теста отсутствия репликации ВПГ использовали полимеразную цепную реакцию.

Схема получения экстрактов из березового гриба *Inonotus obliquus*

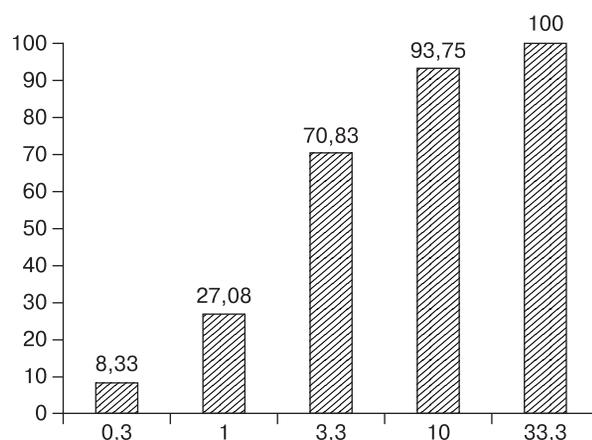
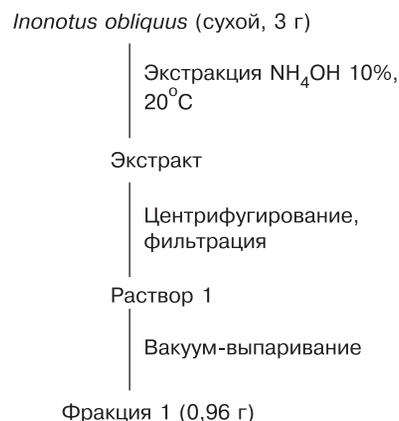


Рис. 2. Противогерпетический эффект разной концентрации фракции IV.

По оси ординат – степень (в %) защиты клеток от цитодеструктивного действия ВПГ-1; по оси абсцисс – концентрация (в мкг/мл) экстракта чаги.

Результаты и обсуждения

Получение экстрактов чаги. Для получения экстрактов чаги использовали следующую общую схему: из измельченного и высушенного верхнего слоя гриба проводили экстракцию различными растворителями. Полученный экстракт центрифугировали, фильтровали и выпаривали под вакуумом (рис.1). По такой схеме были получены водные, спиртовые, щелочные и кислотные экстракты.

Определение цитотоксичности экстрактов чаги. Полученные фракции чаги испытывали на токсичность для клеток Vero. Для этого на монослой клеток вносили водные растворы экстрактов в концентрации 5, 10 или 50 мкг/мл и инкубировали в течение 48 ч при 37°C и 5% CO₂. Все испытанные экстракты, за исключением одного (табл.1), в концентрации до 50 мкг/мл не оказывали токсического действия на культуру клеток Vero. Фракция, полученная спиртовой экстракцией, в концентрации 50 мкг/мл вызывала деструкцию клеток.

Для корреспонденции:

Носик Николай Николаевич, проф.; e-mail: nosiknn@yandex.ru

Таблица 1

Цитотоксическое действие различных фракций экстрактов чаги

Способ получения фракции	Исследуемая фракция	Цитодеструктивное действие фракций на клетки, %		
		5 мкг/мл	10 мкг/мл	50 мкг/мл
Водная экстракция	I	0	0	0
	II	0	0	0
Спиртовая экстракция (этиловым спиртом)	III	0	0	100
	IV	0	0	0
Щелочная экстракция (гидроксидом аммиака)	51	0	0	0
	53	0	0	0
	54	0	0	0
Экстракция гидрокарбонатом аммония	V	0	0	0
	52	0	0	0
	54	0	0	0
Экстракция уксусной кислотой	VI	0	0	0
	VII	0	0	0

Исследование противовирусной активности экстрактов чаги. Исследование противовирусной активности проводили при внесении фракций чаги на монослой клеток за 2 ч до инфицирования вирусом – оптимальная схема для выявления противовирусных свойств большинства противовирусных агентов при проведении скрининга. Определяли способность экстрактов в концентрации 5, 10 и 50 мкг/мл (спиртовой экстракт 5 и 10 мкг/мл) защищать клетки от цитодеструктивного действия 100 ТЦИД₅₀ ВПГ. Как видно из представленных данных (табл. 2), уже при концентрации 5 мкг/мл большинство фракций экстрактов обеспечивает защиту клеток от 87,5 до 100%. Исключение составляют фракции, полученные экстракцией кислотой. Однако при концентрации 50 мкг/мл все фракции обеспечивали полную защиту клеток от цитодеструктивного действия ВПГ.

Таким образом, фракции чаги, полученные водной и щелочной экстракцией, обладали наиболее выраженными противовирусными свойствами. Ниже представлены данные, полученные при исследовании фракции

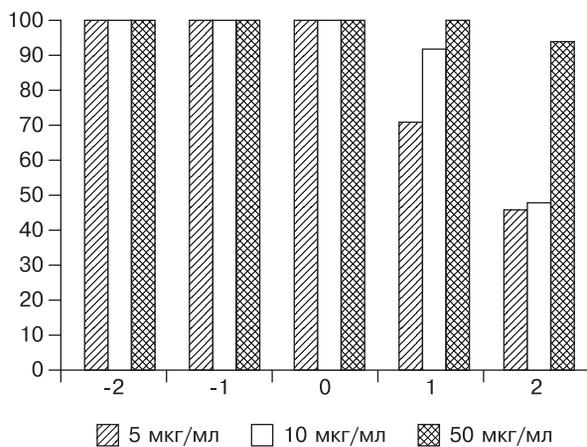


Рис. 3. Зависимость защитного эффекта экстракта чаги (фракция IV) от времени введения относительно инфицирования клеток ВПГ-1.

По оси ординат – степень (в %) защиты клеток; по оси абсцисс – время (в ч) введения фракции чаги относительно времени инфицирования.

Таблица 2

Противогерпетический эффект фракций экстрактов чаги

Способ получения фракции	Исследуемая фракция	Степень защиты клеток от цитодеструктивного действия ВПГ, %		
		5 мкг/мл	10 мкг/мл	50 мкг/мл
Водная экстракция	I	91,66	93,75	100
	II	100	100	100
Спиртовая экстракция (этиловым спиртом)	III	87,5	100	Н.и.
	IV	100	100	100
Щелочная экстракция (гидроксидом аммиака)	51	89,58	100	100
	53	87,5	100	100
	54	100	100	100
Экстракция гидрокарбонатом аммония	V	100	100	100
	52	25	93,75	100
	54	6,25	81,25	100
Экстракция уксусной кислотой	VI	6,25	75	100
	VII	0	0	100

Примечание. Н.и. – не исследовали.

IV, полученной щелочной экстракцией 10% раствором гидроксида аммиака.

Определение эффективной дозы фракции IV экстракта чаги. Исследовали эффективность защиты клеток Vero при одновременном инфицировании клеток 100 ТЦИД₅₀ вируса герпеса и внесении экстракта чаги в концентрациях 0,3, 1, 3,3, 10 и 33,3 мкг/мл. Полученные результаты представлены на рис.2. Таким образом, ЭД₅₀ составила 3,3 мкг/мл, а ЭД₉₀ – 10 мкг/мл.

Исследование оптимальных схем защитного действия экстрактов чаги, фракция IV. Исследовали эффективность защитного действия фракции IV экстракта чаги при внесении его в клеточную культуру клеток Vero в различное время по отношению ко времени инфицирования клеток вирусом герпеса в дозе 100 ТЦИД₅₀. Экстракт чаги вносили за 2 или 1 ч до инфицирования клеток, одновременно с инфицированием или через 1 или 2 ч после него. Введение экстракта чаги до инфицирования клеток (за 2 или 1 ч) и одновременно с инфицированием обеспечивало полную защиту клеток от цитодеструктивного действия ВПГ (рис.3) при всех использованных концентрациях экстракта, и ДНК вируса герпеса не обнаруживалась. При внесении экстракта чаги (фракция IV) через час после инфицирования защита составляла 70,83% при дозе 5 мкг/мл, 91,67% при дозе 10 мкг/мл и 100% при дозе 50 мкг/мл. При внесении экстракта чаги через 2 ч после заражения защита клеток от цитодеструктивного действия вируса герпеса была еще меньше: при дозе 5 и 10 мкг/мл – менее 50% (45,83 и 47,92% соответственно). При дозе 50 мкг/мл защита клеток приближалась к 100% и составила 93,75%.

Таким образом, максимальный защитный эффект экстракта чаги (фракция IV) наблюдается при профилактическом его применении при сохранении дозовой зависимости.

Противовирусная активность фракции IV экстракта чаги была исследована в течение 10 нед, хранение при комнатной температуре в темноте не приводило к снижению противовирусной активности.

Заключение

Разработанные схемы получения экстрактов березового гриба *Inonotus obliquus* показали, что фракции верхнего слоя березового гриба (чага), полученные водной,

спиртовой или щелочной экстракцией, обладают способностью защищать чувствительные клетки от цитодеструктивного действия ВПГ. Более детально изученная фракция IV, полученная щелочной экстракцией, обладала способностью защищать клетки при концентрации 5 мкг/мл. Максимальный защитный эффект наблюдали при внесении экстрактов до инфицирования клеток или в течение часа после него.

Проведенные исследования показали, что березовый гриб *Inonotus obliquus*, имеющий широкий спектр биологической активности, в том числе и противоопухолевой [8, 9, 10], также обладает и противовирусной активностью в отношении ДНК-содержащего вируса – ВПГ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березина М.П., Булатов П.К. Чага и ее лечебное применение. Медгиз; 1959: 160–87.
2. Березина М.П., Булатов П.К., Вандышева Ф.Я. Чага и ее лечебное применение при раке IV стадии. Медгиз; 1959: 119–26.
3. Шапкина М.Я., Шапкин П.Н., Сергеев А.В., Горяйнова Л.К. Чага, чаговит, чагалокс в лечебной и профилактической практике. М.: РОНЦ им. Н.Н. Блохина, ОАО «Холдинг «ЭДАС», М. 2008, 64.
4. Мартынова Е.Я. Высшие грибы и их физиологически активные соединения. Л.: Наука; 1973: 83–94, 108–15.
5. Шапкина М.Я., Шапкин П.Н., Сергеев А.В. Химические и медико-биологические свойства сухого экстракта чаги. Химико-фармацевтический журнал. 2006; 40 (10): 37–44.
6. Рыжова Г.Л., Кравцова С.С., Матасова С.А., Грибель Н.В. и др. Химические и фармакологические свойства сухого экстракта чаги. Химико-фармацевтический журнал. 1997; 10: 44–7.
7. Ichimura T., Watanabe O., Maruyama S. Inhibition of HIV-1 protease by water-soluble lignin-like substances from edible mushroom *Fuscoporia obliqua*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 1998; 62 (3): 575–7.
8. Ham S.S., Oh S.W., Kim Y.K., Shin K.S., Chang H.Y., Chung G.H. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extract from the *Inonotus obliquus*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2003; 32: 1088–94.
9. Lee S.H., Hwang H.S., Yun J.W. Antitumor activity of water extract of a mushroom, *Inonotus obliquus*, against HT-29 human colon can-

- cer cells. *Phytother. Res.* 2009; 23: 1784–9.
10. Mi Ja Chung, Cha Kwon Chung, Yoonhwa Jeong, Seung Shi Ham. Anticancer activity of subfractions containing pure compounds of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract in human cancer cells and in Balbc/c mice bearing Sarcoma-180 cells. *Nutr. Res. Pract.* 2010; 4 (3): 177–82.

REFERENCES

1. Berezina M.P., Bulatov P.K. Chaga and its medical application. M.: Medgiz; 1959: 160–87 (in Russian).
2. Berezina M.P., Bulatov P.K., Vandysheva F.Ja. Chaga and its medical application at a cancer of the IV stage. M.: Medgiz. 1959: 119–26 (in Russian).
3. Shashkina M.Ja., Shashkin P.N., Sergeev A.V., Gorjajnova L.K. Chaga, chagovit, chagalux in medical and preventive practice. M.: RONC im. N.N. Blohina, OAO «Holding «JeDAS»; 2008: 64 (in Russian).
4. Martynova E.Ja. Higher fungi and their physiologically active compounds. Leningrad: Nauka; 1973: 83–94; 108–15 (in Russian).
5. Shashkina M.Ja., Shashkin P.N., Sergeev A.V. Chemical and medicobiological properties of chaga. *Himiko-farmatsevticheskij zhurnal.* 2006; 40 (10): 37–44 (in Russian).
6. Ryzhova G.L., Kravtsova S.S., Matasova S.A., Gribel' N.V. et al. Chemical and pharmacological properties of the dry chaga's extract. *Himiko-farmatsevticheskij zhurnal.* 1997; 10: 44–7 (in Russian).
7. Ichimura T., Watanabe O., Maruyama S. Inhibition of HIV-1 protease by water-soluble lignin-like substances from edible mushroom *Fuscoporia obliqua*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998; 62 (3): 575–7.
8. Ham S.S., Oh S.W., Kim Y.K., Shin K.S., Chang H.Y., Chung G.H. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extract from the *Inonotus obliquus*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2003; 32: 1088–94.
9. Lee S.H., Hwang H.S., Yun J.W. Antitumor activity of water extract of a mushroom, *Inonotus obliquus*, against HT-29 human colon cancer cells. *Phytother. Res.* 2009; 23: 1784–9.
10. Mi Ja Chung, Cha Kwon Chung, Yoonhwa Jeong, Seung Shi Ham. Anticancer activity of subfractions containing pure compounds of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract in human cancer cells and in Balbc/c mice bearing Sarcoma-180 cells. *Nutr. Res. Pract.* 2010; 4 (3): 177–82.

Поступила 21.03.13

Журнал "Вопросы вирусологии" входит в Перечень ведущих научных журналов и изданий ВАК, в которых должны быть опубликованы значимые результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук

Уважаемые читатели!

Подписаться на журнал "Вопросы вирусологии" можно во всех отделениях связи.

Индивидуальные подписчики могут подписаться на журнал и получать его непосредственно в ОАО «Издательство "Медицина"» без наценок за доставку. Доставка через издательство осуществляется в пределах РФ.

Тел. для справок: 8 (499) 264-57-92.

Подписные индексы на журнал

в каталоге «Роспечать»:

Индекс 71416

в каталоге «Пресса России»:

Индекс 40798

Электронная подписка на журнал осуществляется через сайт Научной электронной библиотеки www.elibrary.ru.