

Шибнев В.А., Гараев Т.М., Финогонова М.П., Калнина Л.Б., Носик Д.Н.

Противовирусное действие водных экстрактов березового гриба *Inonotus obliquus* на вирус иммунодефицита человека

Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

Фракции водного и водно-спиртового экстрактов березового гриба *Inonotus obliquus* дают противовирусный эффект в отношении вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1). Противовирусные свойства низкотоксичных экстрактов проявлялись в концентрации 5,0 мкг/мл при одновременном внесении с вирусом в культуру лимфобластоидных клеток МТ-4. Полученные экстракты березового гриба могут быть применены для создания новых противовирусных препаратов, ингибиторов репликации ВИЧ-1 при использовании как в виде индивидуального лекарства, так и в составе комплексной терапии.

Ключевые слова: противовирусная активность; ВИЧ-1; культура клеток; *Inonotus obliquus*.
Для цитирования: *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(2): 35–38.

Shibnev V.A., Garaev T.M., Finogenova M.P., Kalnina L.B., Nosik D.N.

Antiviral activity of aqueous extracts of the birch fungus *Inonotus obliquus* on the human immunodeficiency virus

The D.I. Ivanovsky Institute of Virology Federal State Budgetary Institution "Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia

Fractions of aqueous and water-alcohol extracts of the birch fungus *Inonotus obliquus* have antiviral effect against the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Antiviral properties of low toxic extracts were manifested in the concentration of 5.0 µg/ml upon simultaneous application with the virus in the lymphoblastoid cells culture MT-4. The extract of the birch fungus can be used for development of new antiviral drugs, inhibitors of HIV-1 replication when used both in the form of individual drugs and as a part of complex therapy.

Key words: antiviral activity; HIV-1; cell culture; *Inonotus obliquus*.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60 (2): 35–38. (In Russ.)

For correspondence: Timur Garaev, e-mail: gtim@fmradi.ru

Мир грибов является уникальным источником биологически активных соединений, которые нашли широкое применение в современной медицине. Это связано прежде всего с тем, что они представляют собой промежуточную живую форму между животным и растительным миром [1]. Многие десятилетия внимание медицины и биологической химии привлекают грибы трутовики, в частности чага, которая относится к классу базидиомицетов типа фунги, *Inonotus obliquus*.

О биологических свойствах низкотоксичных водных экстрактов *I. obliquus* и применении их в медицине известно многое [2]. Однако и по сей день до конца не ясно, что представляют собой эти экстракты с точки зрения их химического состава. На данный момент установлено, что водный экстракт *I. obliquus* включает растворимые хромогены, производные полифенолов, оксифенилкарбоновые кислоты, а также структурно сложную гуминовую кислоту, которая, возможно, появляется в процессе взаимодействия ферментной системы *I. obliquus* с лигнином древесины березы. Не исключено, что вся эта гамма низкотоксичных фенолсодержащих соединений возникает в результате мягкой деструкции в процессе водного выделения или длительного хранения экстракта.

Ранее нами было обнаружено, что вещества водного экстракта *I. obliquus* обладают ярко выраженной противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа А/Н1N1, А/Н1N1/dm2009, А/Н3N2 и А/Н5N1. Более того, была обнаружена высокая степень активности и против вирусов герпеса [3] и гепатита С [4].

Такая «неразборчивость» водных экстрактов *I. obliquus*

в отношении вирусов с различной структурной организацией может указывать на неселективный характер взаимодействия с вирусом или, возможно, с клеточной мембраной. Взаимодействие экстрактов *I. obliquus* с клеткой может приводить к цитопротекторному действию.

Было интересно выяснить, насколько эффективны водные экстракты *I. obliquus* из поверхностного слоя гриба в отношении процессов ингибирования репликации вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Параллельно с нашими исследованиями в НПО «ВЕКТОР» было проведено обстоятельное изучение ряда базидиальных грибов, в том числе *I. obliquus*, и была показана активность против ряда вирусов [5]. Нас же интересовали фракции из минимально тонкого поверхностного слоя гриба. Мы исходили из следующей предпосылки. Известно, что *I. obliquus* как гриб-паразит живет 15–20 лет в экологической системе леса, которая включает растительные вирусы, споры, различные другие микроорганизмы и токсины, и, следовательно, поверхностный слой тела гриба *I. obliquus* может иметь специфическую и неспецифическую защиту от них. Поэтому если и есть в *I. obliquus* вещества, защищающие этот гриб, они должны находиться в его тонком поверхностном слое, соприкасающемся с окружающей его средой. Более того, поверхностный слой тела гриба в перспективе представлял особый интерес для хроматографического исследования химического состава.

Поиск новых антиретровирусных средств сегодня очень актуален. Быстро возникающая резистентность

вируса к применяемым препаратам, а также их высокая токсичность требуют постоянного расширения лекарственного арсенала [6, 7]. Поэтому исследование антиретровирусных возможностей водных фракций *I. obliquus* нам представлялось перспективным направлением поиска.

Целью настоящей работы было изучение активности экстрактов березового гриба *I. obliquus* в отношении ВИЧ типа I (ВИЧ-1).

Материалы и методы

Клетки. В работе были использованы перемываемые лимфобластоидные клетки человека МТ-4, полученные из коллекции культур клеток человека ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России. Клетки культивировали в среде RPMI 1640 (производства ФГБУ «НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов» РАМН) с 10% сыворотки эмбрионов коров (производства ФГБУ «НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова» РАМН), 5 мМ L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина в виде суспензии в атмосфере, содержащей 5% CO₂, при 37°C и 98% влажности.

Вирусы. В качестве источника вируса использовали штамм ВИЧ-1_{899А} из коллекции штаммов ВИЧ ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского».

Препараты. В качестве антиретровирусного референс-препарата использовали препарат ретровир (азидотимидин) производства «GlaxoSmithKline» (Великобритания).

Получение фракций гриба. Для получения фракции, наиболее богатой полифенилкарбонowymi кислотами, с гриба был снят тонкий слой поверхности (1–2 мм), после чего материал механически измельчали. В 100 мл воды экстрагировали 3 г полученного порошка при перемешивании быстросходной мешалкой в течение 2 сут при 20°C. Затем раствор центрифугировали при 5000 об/мин в течение 1 ч, фильтровали через фильтр (Filtrak № 91, Германия) для отделения очень мелких дисперсных частиц. Воду упаривали в вакууме при температуре не выше 45°C и получали фракцию I. Аналогичным способом была проведена экстракция 70% спиртом (фракция II). Эти две фракции оказались очень близкими по времени удержания на биогеде Р-2 и положению пятен веществ в условиях тонкослойной хроматографии.

Для сравнения были получены водный экстракт *I. obliquus*, включающий значительное количество деструктивной целлюлозы и лигнина (фракция III), а также образец, полученный экстракцией 12% аммиаком (фракция IV).

Структура исследования. Оценку цитотоксического действия препаратов проводили на модели лимфобластоидных клеток в пластиковой 96-луночной панели («Costar», США). К клеткам добавляли исследуемый препарат в различных концентрациях. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ при 98% влажности 6 дней до момента учета результатов с помощью метилтетразолиевого теста (МТТ). Токсичность различных концентраций препарата выражали в процентном отношении к принятому за 100% контролю интактных клеток.

Противовирусную активность препаратов в отношении ВИЧ оценивали на модели лимфобластоидных клеток в пластиковой 96-луночной панели. К клеткам

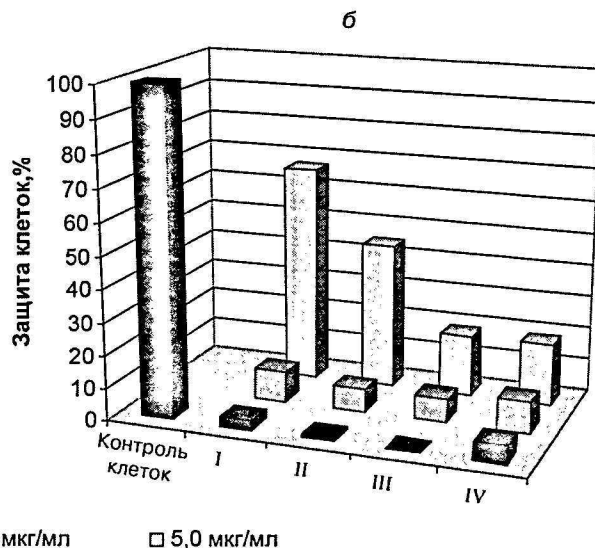
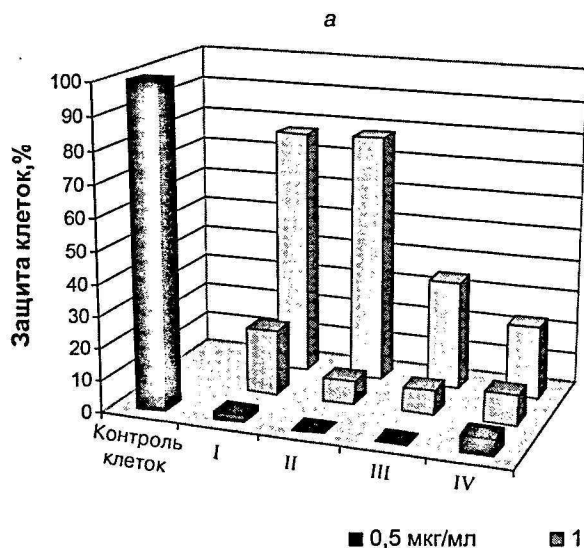
Исследование цитотоксического и противовирусного действия экстрактов *I. obliquus* в отношении ВИЧ-1 на модели клеток

| Условия опыта | Множественность инфекции, ТЦИД ₅₀ /кл. | Концентрация, мкг/мл | Без вируса (токсичность) | ВИЧ-инфекция | | |
|-----------------|---|----------------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------------|-----|
| | | | жизнеспособность клеток, %* | цитопатический эффект вируса** | Защита клеток, %*** | |
| Фракция I | 0,01 | 0,5 | 100,0 | +++ | 2,0 | |
| | | 1,0 | 98,9 | +++ | 20,5 | |
| | | 5,0 | 95,0 | + - | 77,3 | |
| | | 0,1 | 0,5 | 99,1 | ++++ | 3,0 |
| | | 1,0 | 99,7 | +++ | 9,5 | |
| Фракция II | 0,01 | 0,5 | 96,9 | + | 66,9 | |
| | | 1,0 | 94,3 | ++++ | 0 | |
| | | 1,0 | 98,9 | +++ | 7,5 | |
| | | 5,0 | 94,1 | - | 77,9 | |
| | | 0,1 | 0,5 | 94,8 | ++++ | 1,0 |
| Фракция III | 0,01 | 1,0 | 97,2 | ++++ | 7,0 | |
| | | 5,0 | 95,4 | ++ | 44,9 | |
| | | 0,5 | 100,0 | ++++ | 0,0 | |
| | | 1,0 | 99,2 | ++++ | 7,7 | |
| | | 5,0 | 98,7 | ++ | 34,2 | |
| Фракция IV | 0,01 | 0,1 | 94,9 | ++++ | 0,0 | |
| | | 1,0 | 92,7 | +++ | 7,2 | |
| | | 5,0 | 96,3 | +++ | 18,8 | |
| | | 0,5 | 95,4 | ++++ | 5,0 | |
| | | 1,0 | 93,2 | ++++ | 9,6 | |
| Ретровир | 0,01 | 5,0 | 96,4 | +++ | 22,7 | |
| | | 0,1 | 0,5 | 95,4 | ++++ | 5,7 |
| | | 1,0 | 94,6 | ++++ | 9,5 | |
| | | 5,0 | 95,5 | +++ | 18,8 | |
| | | 0,003 | 100,0 | ++ | 57,0 | |
| Контроль клеток | 0,01 | 0,03 | 99,5 | - | 93,0 | |
| | | 0,3 | 98,0 | - | 100,0 | |
| | | 0,003 | 100,0 | +++ | 38,0 | |
| | | 0,03 | 100,0 | ++ | 82,0 | |
| | | 0,3 | 98,0 | - | 100,0 | |
| Контроль вируса | 0,01 | - | 100 | - | - | |
| | | 0,1 | - | - | ++++ | - |

Примечание. * – жизнеспособность клеток по отношению к интактному контролю клеток; ** – цитопатический эффект вируса (6-е сутки); *** – по данным МТТ.

добавляли исследуемые образцы экстрактов и инфицировали вирусом в дозе 0,01 или 0,1 ТЦИД₅₀/кл. Культуры клеток инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ при 98% влажности 6 дней. Исследование репродукции ВИЧ проводили путем оценки вирусиндуцированного цитопатического действия в культурах клеток. Степень деструкции оценивали под световым микроскопом по общепринятой четырехкрестовой системе соответственно количеству погибших клеток в каждой из трех лунок.

Учет результатов проводили посредством окрашивания клеток с использованием тетразолиевого красителя



Исследование противовирусного действия экстрактов *I. obliquus* в отношении ВИЧ-1 на модели клеток при вирусной нагрузке 0,01 (а) и 0,1 ТЦИД₅₀/кл. (б).

Римскими цифрами обозначены фракции.

(МТТ) со спектрофотометрией при длине волны 630 нм. Степень защиты клеток от цитодеструктивного действия вируса определяли по формуле, описанной ранее [8].

Результаты и обсуждение

Для исследования цитотоксического действия полученных фракций их добавляли в культуральную среду неинфицированных клеток в концентрации 0,5, 1,0, 4, 5,0 мг/мл. Обнаружено, что в этих дозах экстракты не оказывали цитотоксического действия на клетки культуры МТ-4 (см. таблицу). Исследование противовирусной активности полученных фракций (см. таблицу) показало, что все они обладали противовирусной активностью в отношении ВИЧ-1. Наибольшая активность отмечена у фракций I и II в концентрации 5 мг/мл (77,3 и 77,9% защиты клеток соответственно). Увеличение вирусной нагрузки в 10 раз несколько снижало этот эффект (см. рисунок, а, б). При этом для фракции II увеличение концентрации вируса было более чувствительным, чем для фракции I (66,9 и 44,9% соответственно). Фракции III и IV давали значительно меньший противовирусный эффект. Низкую активность фракции III можно объяснить тем, что для экстракта была использована деструктивная целлюлоза из центрального тела гриба. Вероятно, в глубине тела гриба концентрация противовирусных веществ значительно ниже, чем на поверхности. В случае фракции IV недостаток противовирусной активности, видимо, связан со слабыми экстрагируемыми свойствами аммиачного раствора, который недостаточно полно извлекает противовирусную субстанцию из поверхности гриба. Следует отметить, что противовирусные свойства препаратов *I. obliquus* оказывали ярко выраженное цитостатическое (антипролиферативное) действие на клетки. Возможно, данное обстоятельство связано с интенсивностью вирусной репродукции в этих клетках и отчасти объясняет неспецифическое антивирусное действие экстрактов гриба. В качестве референс-препарата был использован азидотимидин в составе коммерческого препарата ретровир. Таким образом, вещества, полученные из фракций I–IV из *I. obliquus* обладали противовирусной активностью в отношении ВИЧ-1 *in vitro* и

были нетоксичны для клеток. Данные экстракты березового гриба могут быть применены для создания новых противовирусных препаратов, ингибиторов репликации ВИЧ-1 при использовании как в виде индивидуального лекарственного средства, так и в составе высокоактивной антиретровирусной терапии, применяемой сейчас для лечения ВИЧ-инфицированных больных.

ЛИТЕРАТУРА

- Горленко М.В., Соколов Д.В. ред. Грибы. В кн.: Федоров А.А., ред. *Жизнь растений*. М.: Просвещение; 1976; т. 2: 235–47.
- Shashkina M.Ya., Shashkin P.N., Sergeev A.V. et al. Chemical and medicobiological properties of chaga. *Pharm. Chem. J.* 2006; 40(10): 560–568.
- Носик Н.Н., Полковников М.В., Кондрашина Н.Г. Гагаев Т.М., Финогенова М.П., Шибнев В.А. Противогерпетические свойства экстрактов Чаги (*Inonotus obliquus*). В кн.: *Материалы Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням*. Москва; 2013; 11: 289.
- Шибнев В.А., Мишин Д.В., Гагаев Т.М. и др. Противовирусная активность экстрактов гриба *Inonotus Obliquus* в отношении инфекции, вызванной вирусом гепатита С в культурах клеток. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2011; 151(5): 547–51.
- Гашникова 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. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2009; 2: 170–1.
- Галегов Г.А. Синтетические ингибиторы протеазы ВИЧ и новые возможности лекарственной терапии ВИЧ-инфекции и СПИДа. *Вопросы вирусологии*. 1997; 6: 284–6.
- Носик Д.Н., Носик Н.Н. *ВИЧ-инфекция: профессиональный риск и экстренная профилактика*. М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН; 2004.
- Носик Д.Н., Лялина И.К., Калинин Л.Б., Лобач О.А., Чатаева М.С., Роснецов Л.В. Антиретровирусный препарат фуллевир. *Вопросы вирусологии*. 2009; 54(5): 41–3.

REFERENCES

- Gorlenko M.V., Sokolov D.V., eds. Mushrooms. In: *Fedorov A.A., ed. Plant Life [Zhizn' Rasteniy]*. Moscow: Prosveshchenie; 1976; Vol. 2: 235–47. (in Russian)
- Shashkina M.Ya., Shashkin P.N., Sergeev A.V. et al. Chemical and medicobiological properties of chaga. *Pharm. Chem. J.* 2006; 40(10): 560–8.

3. Nosik N.N., Polkovnikova M.V., Kondrashina N.G. Garaev T.V., Finogenova V.P., Shibaev V.A. Antihyperthetical properties of extracts Chaga (Inonotus Obliquus). In: *Materials of V Annual All-Russian Congress on Infectious Diseases [Ezhegodnyy Vserossiyskiy kongress po infektsionnym boleznyam]*. Moscow; 2013; 11: 289. (in Russian)
4. Shibnev V.A., Mishin D.V., Garaev T.M., Finigenova N.P., Botikov A.G., Deryabin P.G. Antiviral activity of extracts of the fungus Inonotus Obliquus against infection by the hepatitis C virus in cell cultures. *Byulleten' Eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2011; 151 (5): 549–51. (in Russian)
5. Gashnikova N.M., Teplyakova T.V., Pronyaeva T.R., Puchkova L.I., Kosogova T.A., Sergeev A.N. The results of research to identify the anti-HIV activity of extracts from higher basidiomycetes. *Immunopatologiya, Allergologiya, Infektologiya*. 2009; 2: 170–1. (in Russian)
6. Galegov G.A. Synthetic HIV protease inhibitors and new opportunities of drug therapy of HIV infection and AIDS. *Voprosy virusologii*. 1997; 6: 284–6. (in Russian)
7. Nosik D.N., Nosik N.N. HIV-infection: An Occupational Hazard Prevention and Emergency [VICh-infekciya: professional'nyy risk i Ekstrennaya Profilaktika]. Moscow; NTSSSK im. A.N. Bakuleva RAMN; 2004. (in Russian)
8. Nosik D.N., Lyalina I.K., Kalnina L.B., Lobach O.A., Chataeva M.S., Rasnetsov L.D. Antiretroviral drug fulevir. *Voprosy virusologii*. 2009; 54(5): 41–3. (in Russian)

Поступила 21.11.13

Received 21.11.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.98:578.891]-092.12-078

Михайлов М.И.¹, Мамедов М.К.², Дадашева А.Э.³

Вирусологические показатели повышенной эпидемической опасности у лиц с высоким риском парентерального инфицирования вирусом гепатита С

¹ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» РАН, 142782, г. Москва; ²Национальный центр онкологии Минздрава Азербайджанской Республики, AZ1012, г. Баку; ³Республиканский центр по борьбе со СПИД Минздрава Азербайджанской Республики, AZ1022, г. Баку

Авторы определили присутствие РНК вируса гепатита С (ВГС) и ее концентрацию в содержащих антитела к ВГС сыворотках крови, полученных у лиц из пяти различных групп с высоким риском парентерального инфицирования (ГВРПИ) и группы клинически здоровых лиц, инфицированных ВГС.

Доля реконвалесцентов после острого гепатита С, сохраняющих антитела к ВГС, среди лиц из ГВРПИ оказалась меньше, чем среди инфицированных клинически здоровых лиц. Кроме того, средняя доля сывороток с более высокой вирусной нагрузкой, полученных у лиц из ГВРПИ, оказалась почти в 2 раза больше доли таких сывороток, полученных у инфицированных клинически здоровых лиц.

Ключевые слова: вирус гепатита С; группы с высоким риском парентерального инфицирования.

Для цитирования: *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(2): 38–40.

Mikhaylov M.I.¹, Mamedov M.K.², Dadasheva A.E.³

Viral indicators of the increased epidemiological hazard of subjects from high risk groups of hepatitis C virus parenteral infection

¹Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, 142782, Moscow, Russia; ²National Center of Oncology, Ministry of Healthcare of the Azerbaijan Republic, AZ1012, Baku, Azerbaijan Republic; ³Republican Center of the Struggle Against AIDS, Ministry of Healthcare of the Azerbaijan Republic, AZ1022, Baku, Azerbaijan Republic

The author detected RNA of the hepatitis C virus (HCV) and estimated its concentration in sera of subjects from groups with high risk of parenteral infection (GHRPI) and clinically healthy subjects infected with the hepatitis C virus (HCV). The results show that the share of the acute hepatitis C reconvalescents with antibodies to HCV among people from GHRPI appeared to be smaller than among infected healthy subjects. The average fraction of sera with high virus load from subjects in GHRPI was nearly two times higher than the fraction number of such sera received from infected clinically healthy subjects.

Key words: hepatitis C virus; groups with high risk of parenteral infection.

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60 (2): 38–40. (In Russ.)

For correspondence: Mikhail Mikhaylov, MD, PhD, DSc, Prof., corresponding member of RAS; e-mail: michmich2@yandex.ru

Введение

Инфекция, вызванная вирусом гепатита С (ГС), в эпидемиологическом отношении причисляется к строгим антропонозам, а сам вирус ГС (ВГС) сохраняется в природе лишь за счет его непрерывной циркуляции среди людей, которая на современном этапе развития общества и медицины осуществляется в основном

посредством парентерального (гемоконтактного) механизма инфицирования [1, 2]. Именно поэтому особое значение в поддержании вызванного ВГС эпидемического процесса сегодня придается достаточно многочисленным группам с высоким риском парентерального инфицирования (ГВРПИ) ВГС (лица с ВИЧ-инфекцией, больные туберкулезом легких (ТБЛ), гемобластоза-

Для корреспонденции: Михайлов Михаил Иванович, д-р мед. наук проф., член-корр. РАН, акад. РАЕН; e-mail: michmich2@yandex.ru