

Zbigniew KAWECKI,  
Martyna KANDEFER-SZERSZEŃ, Józef KACZOR

**Ekstrakty z grzybów jako źródło substancji o aktywności przeciwwirusowej. I. Zastosowanie rozpuszczalników organicznych do ekstrakcji substancji przeciwwirusowych**

Экстракты из грибов как источник получения вещества с антивирусной активностью. I. Применение органических растворителей в экстракции антивирусных веществ

Fungal Extracts as a Source of Antiviral Substances. I. Application of Organic Solvents for Extraction of Antiviral Substances

Trudności w uzyskaniu aktywnego leku przeciwwirusowego na drodze syntezy chemicznej spowodowały wzrost zainteresowania biologicznie aktywnymi substancjami, występującymi w produktach mikroorganizmów, roślin i zwierząt.

W poprzednich pracach podejmowaliśmy próby izolacji substancji przeciwwirusowych z niektórych gatunków grzybów (5, 6, 7). Owocniki badanych grzybów po rozdrobnieniu ekstrahowano wodą. Metoda ta nie pozwalała jednakże na ekstrakcję substancji nierozpuszczalnych w wodzie, dlatego podjęto próby izolacji czynników przeciwwirusowych z grzybów przy pomocy rozpuszczalników organicznych.

MATERIAŁY I METODY

Gatunki grzybów. Do badań użyto następujących gatunków grzybów z rzędu *Aphylliphorales*: *Phellinus igniarius* (L. ex Fr.) Quel., *Ganoderma applanatum* (Pers. ex Wallr.) Pat., *Fomes fomentarius* (L. ex Fr.) Kickx., *Piptoporus betulinus* (Bull. ex Fr.) P. Karst., *Fomitopsis pinicola* (Sw. ex Fr.) P. Karst., *Daedalea confragosa* (Bolt. ex Fr.) Pers. ex Fr., *Trametes hirsuta* (Wulf. ex Fr.) Pil., *Hirschioporus abietinus* (Dicks, ex Fr.)

Donk. Owocniki grzybów zebrano w okolicach Lublina i przechowywano w temperaturze pokojowej w stanie wysuszonym.

Szczepki wirusów. Do badań użyto wirusa kleszczowego zapalenia mózgu (KZM), szczepu  $K_3$  izolowanego przez Kaweckiego z larw kleszcza *Ixodes ricinus*, o mianie  $10^{7.77}LD_{50}/ml$ , adaptowanego do myszek. Materiałem wyjściowym był 10% homogenat mózgowi myszy padłych z objawami porażenia. Wirus krowianki izolowano w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej ze szczepionki przeciwospowej. Miano wirusa określone w hodowli fibroblastów zarodka kury wynosiło  $10^{6.3}PFU/ml$ . Wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV), szczep Indiana otrzymano z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Miano wirusa określone w hodowli fibroblastów zarodka kury wynosiło  $10^{6.2}PFU/ml$ .

Hodowle komórek. FZK-pierwotna hodowla fibroblastów zarodka kury. Hodowlę FZK przygotowywano standardową metodą z 9-dniowych zarodków kurzych. Do hodowli używano płynu Parkera z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej. Płyny do hodowli tkankowej otrzymano z Wytwórni Surowic i Szczepionek w Lublinie.

Zwierzęta doświadczalne. Badania *in vivo* wykonano na białych 13 g myszkach Swiss.

Metodyka ekstrakcji grzybów. Wysuszoną i mechanicznie rozdrobnioną grzybnię ekstrahowano rozpuszczalnikami organicznymi w aparacie Soxhleta lub przez długotrwałe przetrzymywanie w rozpuszczalniku w temperaturze pokojowej. Sposób otrzymania ekstraktów z poszczególnych gatunków grzybów przedstawiono w tab. 1. Kolejne ekstrakty po 100  $\mu g$  badanej substancji наносzono na krążki bibułowe o średnicy 10 mm.

Metodyka chemicznego rozdziału. Oprócz opisanej wyżej metodyki do izolacji substancji z *Piptoporus betulinus* zastosowano inne rozpuszczalniki organiczne: aceton, eter naftowy, benzen i przy ich użyciu izolowano poszczególne frakcje na podstawie różnic w rozpuszczalności. Zastosowano również metodę Crossa (1) do otrzymania kwasu poliporenowego A, B i C (tab. 2). W celu identyfikacji poszczególnych substancji zastosowano chromatografię cienkowarstwową na Silica gel 1500 (Schleicher) w układzie rozwijającym: benzen:metanol (9:1). Płytki wywoływano parami jodu.

Metoda dyfuzji w agarze. Wyrośniętą 48-godzinną hodowlę komórkową FZK na płytkach Petriego zakażano wirusem krowianki w dawce ok. 250 PFU na płytkę lub VSV w dawce 80 PFU/płytkę. Hodowlę inkubowano 1 godz. w temperaturze pokojowej w celu adsorpcji wirusa, po czym płytki pokrywano odżywczym podłożem agarowym (0,8% agar Special Noble). Po skrzepnięciu agaru na powierzchnię nakładano krążki bibułowe nasycone badanymi substancjami w dawce 100  $\mu g$ /krążek i inkubowano w 37°C aż do wystąpienia wyraźnie widocznych łyśin wirusa. Płytki następnie pokrywano warstwą agaru z czerwieńią obojętną w celu zabarwienia tkanki żywej, nie uszkodzonej przez wirus. Wyniki odczytywano, określając strefę toksyczności wokół krążka i strefę zahamowania tworzenia łyśinek wirusowych przez badaną substancję.

Metoda interferencji. Aktywność przeciwwirusową ekstraktów określano stopniem zahamowania tworzenia łyśinek wirusa w hodowli komórkowej FZK potraktowanej badaną substancją rozpuszczoną w płynie hodowlanym, w porównaniu z kontrolą zakażoną wirusem. Ekstrakty w odpowiednich, nietoksycznych dla hodowli komórkowej stężeniach, inkubowano z wyrośniętą hodowlą FZK przez czas określony warunkami doświadczenia. Po usunięciu ekstraktów hodowle tkan-

kowe zakażano odpowiednimi rozcieńczeniami wirusa krowianki (40 PFU/probówkę). Po 48 godz. hodowle barwiono czerwienią obojętną i liczono łyśinki wirusa. Wyniki doświadczeń przedstawiono jako procent ochrony hodowli komórkowej potraktowanej badanymi substancjami w porównaniu z kontrolą zakażoną taką samą dawką wirusa. Aktywność przeciwwirusową ekstraktów z grzybów badano również *in vivo* na białych myszkach, określając stopień obniżenia śmiertelności zwierząt potraktowanych badanymi substancjami w porównaniu z myszkami kontrolnymi zakażonymi taką samą dawką wirusa.

Badanie wirusobójczej aktywności. Badane substancje rozpuszczano w DMSO, a następnie w płynie Parkera (9) do końcowego stężenia ekstraktów 100 µg/ml i inkubowano przez 4 godz. z zawiesiną wirusa KZM lub krowianki. W przypadku wirusa KZM zawiesinę po inkubacji rozcieńczano i zakażano myszki domózgowo. Wyniki przedstawiono jako procent obniżenia śmiertelności zwierząt w porównaniu z kontrolą wirusa. W przypadku wirusa krowianki zawiesinę po inkubacji rozcieńczano i zakażano nią hodowle FZK. Wyniki przedstawiono jako procent obniżenia efektu cytopatycznego w hodowlach w porównaniu z kontrolą wirusa.

Tab. 1. Metodyka otrzymywania ekstraktów z grzybów  
Preparation method of fungal extracts

| Symbol          | Grzyb<br>Fungus                   | Metoda izolacji<br>Method of preparation  |
|-----------------|-----------------------------------|---|
| GA              | <i>Ganoderma<br/>applanatum</i>   | ekstrakcja eterem etylowym  |
| GA I            |                                   | ekstrakcja etanolem   |
| GA II           |                                   | ekstrakcja powtórna etanolem  |
| GA III          |                                   | ekstrakcja eterem wyciągu etanolowego   |
| GA IV<br>GA V   |                                   | ekstrakcja wodą wyciągu etanolowego<br>pozostałość nierozpuszczalna w eterze i wodzie z wyciągu etanolowego |
| PB              | <i>Piptoporus<br/>betulinus</i>   | ekstrakcja eterem etylowym  |
| PB I            |                                   | ekstrakcja etanolem   |
| PB II           |                                   | ekstrakcja eterem wyciągu etanolowego   |
| PB III<br>PB IV |                                   | ekstrakcja wodą wyciągu etanolowego<br>pozostałość nierozpuszczalna w eterze i wodzie z wyciągu etanolowego |
| DC I            | <i>Daedalea<br/>confragosa</i>    | ekstrakcja eterem etylowym  |
| DC II           |                                   | ekstrakcja etanolem   |
| Th I            | <i>Trametes<br/>hirsuta</i>       | ekstrakcja eterem etylowym  |
| Th II           |                                   | ekstrakcja etanolem   |
| FF I            | <i>Fomes<br/>fomentarius</i>      | ekstrakcja eterem etylowym  |
| FF II           |                                   | ekstrakcja etanolem   |
| F I             | <i>Phellinus<br/>igniarius</i>    | ekstrakcja eterem etylowym  |
| F II            |                                   | ekstrakcja etanolem   |
| FP I            | <i>Fomitopsis<br/>pinicola</i>    | ekstrakcja eterem etylowym  |
| FP II           |                                   | ekstrakcja etanolem   |
| HA I            | <i>Hirshioporus<br/>abietinus</i> | ekstrakcja eterem etylowym  |
| HA II           |                                   | ekstrakcja etanolem   |

Tab. 2. Metodyka otrzymywania ekstraktów z *Piptoporus betulinus*  
 Préparation method of the extracts from *Piptoporus betulinus*

| Symbol ekstraktu<br>Symbol of extracts | Metoda izolacji<br>Method of preparation   |
|--|--|
| PBA                                    | ekstrakcja acetonem ekstraktu etanolowego  |
| PBB                                    | ekstrakcja eterem etylowym po ekstrakcji eterem naftowym                         |
| PBC                                    | ekstrakcja etanolem po ekstrakcji eterem naftowym                                |
| PBD                                    | ekstrakcja eterem naftowym   |
| PBE                                    | pozostałość po ekstrakcji etanolem, eterem i benzenem                            |
| PB I C <sub>1</sub>                    | ekstrakt etanolowy hydrolizowany KOH   |
| PB I C <sub>2</sub>                    | pozostałość po hydrolizie ekstrahowana eterem etylowym                           |
| PB I C <sub>3</sub>                    | osad otrzymany z hydrolizatu PB I C <sub>1</sub> po dodaniu CH <sub>3</sub> COOH |
| PB I C <sub>4</sub>                    | PB I C <sub>3</sub> krystalizowany z alkoholu propylowego                        |

#### WYNIKI BADAŃ

W tab. 3 zestawiono wyniki wstępnych badań substancji przeciw-wirusowych z grzybów metodą dyfuzji w agarze. Aktywnymi okazały się ekstrakty z *G. applanatum* GA, GA I, GA II oraz GA V w stosunku do wirusa VS, a także GA I i GA III w stosunku do wirusa krowianki. Z ekstraktów otrzymanych z *P. betulinus* aktywność wykazywały ekstrakty: PB, PB I w stosunku do wirusa VS i ekstrakty PB i PB II w stosunku do wirusa krowianki. Z pozostałych badanych gatunków grzybów aktywne były ekstrakty DC II z *D. confragosa* wobec wirusa krowianki, podobnie jak FI II z *P. igniarius*, FP II z *F. pinicola* i HA II z *H. abietinus*. Wobec wirusa VS aktywny był tylko FF I z *F. fomentarius*. Przed przystąpieniem do dalszych doświadczeń przebadano wpływ rozpuszczalnika DMSO na hodowlę FZK zakażoną wirusem krowianki. Stwierdzono jedynie niewielki wpływ na tworzenie łąsinek wirusa krowianki, zmniejszenie o ok. 10% ilości tworzonych łąsinek wirusa, w porównaniu z kontrolą. DMSO podawany myszom dożylnie nie chronił zwierząt przed śmiertelną infekcją wirusem KZM, szczepem K<sub>5</sub>. Następnie przebadano stopień bezpośredniej inaktywacji wirusa krowianki przez DMSO. Po inkubacji 2, 4, 6 i 12 godz. nie stwierdzono inaktywacji wirusa krowianki przez DMSO w odpowiednim rozcieńczeniu w porównaniu z kontrolą inkubowaną w takich samych warunkach. Natomiast ekstrakt eterowy z *P. betulinus* (PB) inaktywował wirus krowianki przy bezpośrednim kontakcie, obniżając jego miano o ponad 2 log już po 3 godz. inkubacji, przy stężeniu ekstraktu 100 µg/ml (tab. 4), a po 5 godz. inkubacji również stężenie 10 µg/ml ekstraktu PB obniżało miano wirusa o 2 log.

Tab. 3. Aktywność przeciwwirusowa substancji z różnych gatunków grzybów badana metodą dyfuzji w agarze  
 Antiviral activity of the substances from various species of fungi examined by the agar diffusion test

| Symbol substancji<br>Symbol of substance | Toksyczność w mm<br>Toxicity in mm | Aktywność wobec wirusa<br>Activity against virus |                    |
|--|------------------------------------|--|--------------------|
|  |                                    | VS   | krowianki vaccinia |
| GA                                       | —                                  | +  | +                  |
| GA I                                     | —                                  | +  | —                  |
| GA II                                    | —                                  | +  | —                  |
| GA III                                   | —                                  | —  | +                  |
| GA IV                                    | —                                  | —  | —                  |
| GA V                                     | —                                  | +  | —                  |
| PB                                       | 12                                 | +  | +                  |
| PB I                                     | 17                                 | +  | —                  |
| PB II                                    | 16                                 | —  | +                  |
| PB III                                   | —                                  | —  | —                  |
| PB IV                                    | —                                  | —  | —                  |
| DC I                                     | 70                                 | —  | —                  |
| DC II                                    | —                                  | —  | +                  |
| Th I                                     | 34                                 | —  | —                  |
| Th II                                    | —                                  | —  | —                  |
| FF I                                     | —                                  | +  | —                  |
| FI I                                     | 12                                 | —  | —                  |
| FI II                                    | —                                  | —  | +                  |
| FP I                                     | 14                                 | —  | —                  |
| FP II                                    | 13                                 | —  | +                  |
| HA I                                     | 26                                 | —  | —                  |
| HA II                                    | —                                  | —  | +                  |

+ — zmniejszenie ilości lub wielkości łysin wirusa wokół cylinderka z badaną substancją.

+ — reduction in quantity or diameter of the virus plaques around the cylinder with the tested substance.

Drugi z badanych, eterowy ekstrakt z *G. applanatum* (GA) nie wykazywał zdolności do bezpośredniej inaktywacji wirusa krowianki (tab. 5). Badanie wpływu ekstraktów eterowych PB i GA na wewnątrzkomórkową replikację wirusa krowianki ujawniło, że zarówno ekstrakt eterowy PB, jak i GA wpływają hamująco na replikację wirusa krowianki w hodowli komórkowej FZK. Wyniki zestawiono w tab. 6 i 7.

Jak wynika z tab. 6 ekstrakt PB w stężeniu 10  $\mu\text{g/ml}$  obniżał zbiór wirusa krowianki o ok. 2 log. Wyniki zestawione w tab. 7 wskazują na obniżenie zbioru wirusa krowianki przez ekstrakt eterowy GA. Stężenie ekstraktu 100  $\mu\text{g/ml}$  obniżało zbiór wirusa o ok. 2 log. Z kolei inkubacja wirusa KZM, szczepu  $K_5$  w postaci 10% homogenatu mózgowi myszy z ekstraktem PB przez 4 godz. w 37° C powodowała spadek miana wirusa o ponad 3 log. Miano wirusa określone po 4 godz. inkubacji kontrolnej próbki wynosiło  $10^{6.3}$ , natomiast po inkubacji ze 100  $\mu\text{g/ml}$  ekstraktu PB miano

Tab. 4. Bezpośrednia inaktywacja wirusa krowianki przez ekstrakt eterowy PB z *Piptoporus betulinus*Virucidal activity of ether extract PB from *Piptoporus betulinus* against vaccinia virus

| Czas inkubacji z ekstraktem (godz.)<br>Time of incubation with extract (hrs.) | Stężenie ekstraktu w $\mu\text{g/ml}$<br>Concentration of extract in $\mu\text{g/ml}$ | Miano wirusa/ml<br>Virus titer/ml |
|---|---|-----------------------------------|
|   | —   | $10^{6,39}$                       |
| 3   | 100   | $10^{4,00}$                       |
|   | 10  | $10^{5,71}$                       |
|   | 1   | $10^{6,04}$                       |
|   | 0,1   | $10^{6,4}$                        |
|   | —   | $10^{6,39}$                       |
| 4   | 100   | $10^{4,00}$                       |
|   | 10  | $10^{5,96}$                       |
|   | 1   | $10^{5,95}$                       |
|   |   |                                   |
|   | —   | $10^{6,11}$                       |
| 5   | 100   | $10^{4,00}$                       |
|   | 10  | $10^{4,00}$                       |
|   | 1   | $10^{5,30}$                       |
|   | 0,1   | $10^{5,55}$                       |
| Kontrola ekstraktu  | 100   | —                                 |
| Extract control   | 10  | —                                 |
|   | 1   | —                                 |
| Kontrola komórek  | 0,1   | —                                 |
| Cells control   | —   | —                                 |

wirusa wynosiło  $10^{3,0}$  LD<sub>50</sub>/ml. Natomiast ekstrakt GA nie posiadał zdolności do bezpośredniej inaktywacji wirusa KZM.

W dalszej części pracy przystąpiono do badania przeciwwirusowych właściwości substancji z *P. betulinus*, otrzymanych na drodze ekstrakcji rozdrobnionej grzybni różnymi rozpuszczalnikami organicznymi, a także substancji otrzymanych na różnych etapach metodyki Crossa przeznaczonej do izolacji kwasów poliporenowych. Ekstrakty PB I C<sub>2</sub>, PBD i PB I C<sub>4</sub> zostały przebadane pod względem zdolności do inaktywacji wirusa krowianki (tab. 8). Kolejne badane ekstrakty wykazywały znacznie słabsze zdolności do bezpośredniej inaktywacji wirusa krowianki niż pełny ekstrakt z *P. betulinus* (PB). Ekstrakt PB I C<sub>2</sub> po 12 godz. inkubacji z wirusem inaktywował wirus krowianki jedynie wtedy, gdy był obecny w stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$ , obniżając miano wirusa o ok. 0,3 log. Ekstrakty PBD i PB I C<sub>4</sub> również nie wykazywały większych zdolności do inaktywacji wirusa krowianki, obniżając jego miano odpowiednio o 0,2 log dla ekstraktu PBD i o 0,15 log dla ekstraktu PB I C<sub>4</sub>. Ekstrakty z *P. betulinus* badano również pod względem zdolności do bezpośredniej inaktywacji

Tab. 5. Bezpośrednia inaktywacja wirusa krowianki przez ekstrakt eterowy GA z *Ganoderma applanatum*Virucidal activity of the ether extract GA from *Ganoderma applanatum* against vaccinia virus

| Czas inkubacji z ekstraktem (godz.)<br>Time of incubation with extract (hrs.) | Stężenie ekstraktu w $\mu\text{g/ml}$<br>Concentration of extract in $\mu\text{g/ml}$ | Miano wirusa/ml<br>Virus titer/ml |
|---|---|-----------------------------------|
| 3   | —   | $10^{6,20}$                       |
|   | 10  | $10^{6,07}$                       |
|   | 1   | $10^{5,98}$                       |
|   | 0,1   | $10^{6,04}$                       |
|   | 0,01  | $10^{6,20}$                       |
| 4   | —   | $10^{6,18}$                       |
|   | 10  | $10^{6,11}$                       |
|   | 1   | $10^{6,04}$                       |
|   | 0,1   | $10^{6,10}$                       |
|   | 0,01  | $10^{6,19}$                       |
| 5   | —   | $10^{6,32}$                       |
|   | 10  | $10^{6,10}$                       |
|   | 1   | $10^{6,14}$                       |
|   | 0,1   | $10^{6,25}$                       |
|   | 0,01  | $10^{6,00}$                       |
| Kontrola ekstraktu<br>Extract control   | 10<br>1<br>0,1  | —<br>—<br>—                       |
| Kontrola komórek<br>Cells control   | 0,01<br>—   | —<br>—                            |

Tab. 6. Hamowanie replikacji wirusa krowianki w hodowli komórkowej FZK przez ekstrakt PB z *Piptoporus betulinus*Inhibition of the replication of vaccinia virus in CEF tissue culture by PB extract from *Piptoporus betulinus*

| Stężenie ekstraktu w $\mu\text{g/ml}$<br>Concentration of extract in $\mu\text{g/ml}$ | Miano wirusa/ml<br>Virus titer/ml |
|---|-----------------------------------|
| —   | $10^{6,27}$                       |
| 10  | $10^{4,77}$                       |
| 1   | $10^{5,30}$                       |
| 0,1   | $10^{5,05}$                       |
| 0,01  | $10^{6,00}$                       |
| 0,001   | $10^{5,99}$                       |
| Kontrola komórek<br>Cells control   | —                                 |

Tab. 7. Hamowanie replikacji wirusa krowianki w hodowli komórkowej FZK przez ekstrakt eterowy GA z *Ganoderma applanatum*Inhibition of the replication of vaccinia virus in CEF tissue culture by ether extract GA from *Ganoderma applanatum*

| Stężenie ekstraktu w $\mu\text{g/ml}$<br>Concentration of extract in $\mu\text{g/ml}$ | Miano wirusa/ml<br>Virus titer/ml |
|---|-----------------------------------|
| —   | $10^{6,43}$                       |
| 100   | $10^{4,77}$                       |
| 10  | $10^{5,30}$                       |
| 1   | $10^{6,18}$                       |
| 0,1   | $10^{6,23}$                       |
| 0,01  | $10^{6,36}$                       |
| 0,001   | $10^{6,36}$                       |
| Kontrola komórek<br>Cells control   | —                                 |

Tab. 8. Bezpośrednia inaktywacja wirusa krowianki przez różne ekstrakty z *Piptoporus betulinus*Virucidal activity of various extracts from *Piptoporus betulinus* against vaccinia virus

| Symbol ekstraktu<br>Symbol of extract | Czas inkubacji z ekstraktem (godz.)<br>Time of incubation with extract (hrs.) | Stężenie ekstraktu w $\mu\text{g/ml}$<br>Concentration in $\mu\text{g/ml}$ | Miano wirusa/ml<br>Virus titer/ml |
|---------------------------------------|---|--|-----------------------------------|
| PB I C <sub>2</sub>                   | 12  | —  | 10 <sup>5.63</sup>                |
|                                       |   | 100  | 10 <sup>5.62</sup>                |
|                                       |   | 10   | 10 <sup>5.59</sup>                |
|                                       |   | 1  | 10 <sup>5.61</sup>                |
| PBD                                   | 12  | —  | 10 <sup>5.68</sup>                |
|                                       |   | 100  | 10 <sup>5.43</sup>                |
|                                       |   | 10   | 10 <sup>5.43</sup>                |
|                                       |   | 1  | 10 <sup>5.52</sup>                |
| PB I C <sub>4</sub>                   | 12  | —  | 10 <sup>5.54</sup>                |
|                                       |   | 100  | 10 <sup>5.40</sup>                |
|                                       |   | 10   | 10 <sup>5.45</sup>                |
|                                       |   | 1  | 10 <sup>5.54</sup>                |

Tab. 9. Bezpośrednia inaktywacja wirusa KZM przez ekstrakty z *Piptoporus betulinus*Virucidal activity of the extracts from *Piptoporus betulinus* against TBE virus

| Symbol ekstraktu<br>Symbol of extract | Śmiertelność myszy<br>Padły/Traktowane<br>Mortality<br>Dead/Treated | Obniżenie śmiertelności<br>Reduction in mortality<br>% |
|---------------------------------------|---|--|
| PB I                                  | 2/9   | 77   |
| PBA                                   | 1/6   | 83   |
| PBC                                   | 4/9   | 55   |
| PBD                                   | 1/9   | 88   |
| PBE                                   | 2/9   | 77   |
| PB I C <sub>2</sub>                   | 9/9   | 0  |
| PB I C <sub>4</sub>                   | 4/9   | 55   |
| Kontrola wirusa<br>Virus control      | 18/18   | —  |
| Kontrola myszy<br>Mice control        | 0/18  | 0  |

Stopień bezpośredniej inaktywacji badano na białych myszczach.

Stężenie ekstraktów 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Czas inkubacji z wirusem KZM 4 godz. w 4°C.

Rozcieńczenie końcowe wirusa KZM 10<sup>-3</sup>.

Virucidal activity was tested on the white mice.

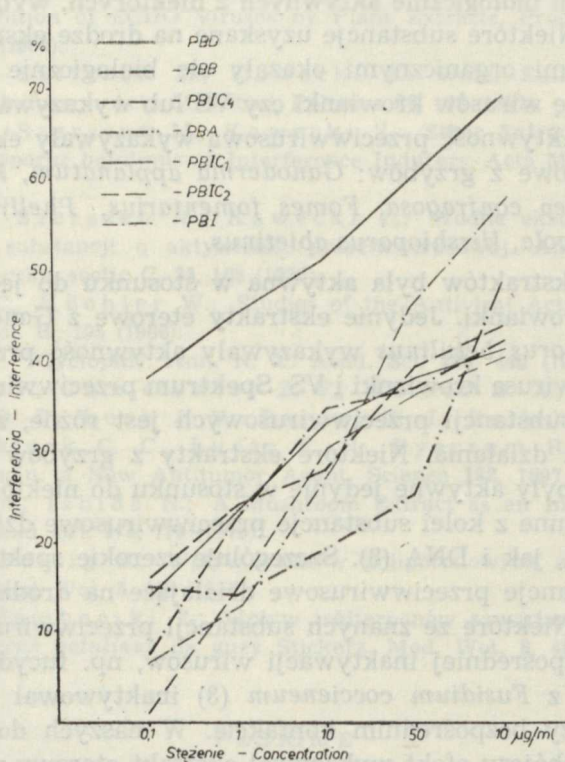
Concentration of extracts 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Time of incubation with TBE virus for 4 hrs. in 4°C.

Final dilution of TBE virus 10<sup>-3</sup>.



wirusa KZM. Kolejne substancje w stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$  inkubowano 4 godz. z 10% homogenatem mózgowi myszy padłych z objawami porażen, następnie rozcieńczano je w PBS do  $10^{-3}$  i podawano domózgowo kolejnym grupom myszy. Wyniki zestawiono w tab. 9. Najsilniejsze właściwości wirusobójcze wykazywały ekstrakty PBA i PBD. Przebadano również niektóre z ekstraktów z *P. betulinus* pod względem zdolności do ochrony hodowli FZK przed wirusem krowianki. Odpowiednimi rozcieńczeniami ekstraktów traktowano hodowlę FZK w 24 godz. przed zakażeniem wirusem krowianki. Uzyskane wyniki przedstawiono na ryc. 1, wskazując na zdolność ekstraktów do ochrony hodowli FZK przed wirusem krowianki. Najwyższą aktywność wykazywały ekstrakty PBD oraz PB I, stosowane w stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$ . Pozostałe ekstrakty chroniły hodowlę FZK w znacznie mniejszym stopniu.



Ryc. 1. Aktywność interferencyjna ekstraktów z *Piptoporus betulinus* w hodowli komórkowej FZK. Wirus dokazający — wirus krowianki

Interference activity of the extracts from *Piptoporus betulinus* in CEF tissue culture. Challenge virus — vaccinia virus

## DYSKUSJA

Wiele gatunków grzybów jest źródłem aktywnych biologicznie substancji. Obok znanych antybiotyków przeciwbakteryjnych, jak penicylina, czy mniej znanych antybiotyków przeciwwirusowych, jak cyklopina (9) czy fucydyna (3), znane są substancje o działaniu przeciwnowotworowym, np. substancje z *Piptoporus betulinus* (12, 13) czy kalwacyna z *Calvatia gigantea* (10). Niektóre z tych substancji są nierozpuszczalne w wodzie lub rozpuszczają się słabo, dobrze natomiast rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak eter, benzen, aceton, etanol czy DMSO. Różne metody chemiczne, takie jak ekstrakcja przeciwprądowa, chromatografia cienkowarstwowa czy kolumnowa przy różnych układach rozpuszczalników, używane są do oczyszczania substancji biologicznie aktywnych. W przedstawionej pracy podjęto próbę izolacji i wstępnego rozdziału substancji biologicznie aktywnych z niektórych, wybranych gatunków grzybów. Niektóre substancje uzyskane na drodze ekstrakcji grzybni rozpuszczalnikami organicznymi okazały się biologicznie aktywne, hamując replikację wirusów krowianki czy VS lub wykazywały właściwości wirusobójcze. Aktywność przeciwwirusową wykazywały ekstrakty eterowe lub alkoholowe z grzybów: *Ganoderma applanatum*, *Piptoporus betulinus*, *Daedalea confragosa*, *Fomes fomentarius*, *Phellinus igniarius*, *Fomitopsis pinicola*, *Hirshioporus abietinus*.

Większość ekstraktów była aktywna w stosunku do jednego z wirusów: VS lub krowianki. Jedynie ekstrakty eterowe z *Ganoderma applanatum* i *Piptoporus betulinus* wykazywały aktywność przeciwwirusową w stosunku do wirusa krowianki i VS. Spektrum przeciwwirusowego działania znanych substancji przeciwwirusowych jest różne, zależy głównie od mechanizmu działania. Niektóre ekstrakty z grzybów badane przez G o u l e t a (4) były aktywne jedynie w stosunku do niektórych szczepów wirusa ECHO, inne z kolei substancje przeciwwirusowe działały zarówno na wirusy RNA, jak i DNA (8). Szczególnie szerokie spektrum działania posiadały substancje przeciwwirusowe działające na drodze indukcji interferonu (11). Niektóre ze znanych substancji przeciwwirusowych miały zdolność do bezpośredniej inaktywacji wirusów, np. fucydyna, steroidowy antybiotyk z *Fusidium coccineum* (3) inaktywował wirusy grypy i krowianki przy bezpośrednim kontakcie. W naszych doświadczeniach wyraźny wirusobójczy efekt wykazywał ekstrakt eterowy z *P. betulinus*.

Ekstrakty uzyskane z grzybów, jak wykazano w chromatografii cienkowarstwowej, były niejednorodne, składały się z szeregu substancji. Próba prostego rozdziału tych substancji na podstawie różnic rozpuszczalności w rozpuszczalnikach organicznych wykazywała, że aktywność przeciwwirusowa po ekstrakcji różnymi rozpuszczalnikami występuje

w kolejnych frakcjach, lecz żadna z tych frakcji nie cechuje się aktywnością przeciwwirusową wyższą niż substancja wyjściowa. Zastosowanie technik chromatograficznych do rozdziału substancji przeciwwirusowych z grzybów będzie przedmiotem następnej pracy.

## PISMIENNICTWO

1. Cross L. C., Eliot C. G., Heilbron J. M., Jones E. R. H.: Constituents of the Higher Fungi. Part I. The Triterpene Acids of *Polyporus betulinus* Fr. J. Chem. Soc. 632 (1940).
2. Efimienko O. T.: O fizjologiczeski aktywnych wieszczestwach trutowego griba *Polyporus betulinus* (Bull.) Karst. Mikrobiologija 29, 548 (1960).
3. Gonczarskaja T. J., Nowaszyn S. M.: Protiwowirusnyje swojstwa fucydina. Antibiotiki I, 57, (1971).
4. Goulet N. R., Cochran K. W., Brown G. C.: Differential and Specific Inhibition of ECHO Viruses by Plant Extracts. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 103, 96 (1960).
5. Kandefier-Szerszeń M., Kawecki Z.: Water Extract of Fungi as Interference Inducers. Acta Microbiol. Polonica 22, 163 (1973).
6. Kandefier-Szerszeń M., Kawecki Z.: Ether Extracts from Fruiting Body of *Piptoporus betulinus* as Interference Inducers. Acta Microbiol. Polonica 23, 197 (1974).
7. Kandefier-Szerszeń M., Kawecki Z.: Wodne ekstrakty z grzybów jako źródło substancji o aktywności przeciwwirusowej. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C, 34, 163 (1979).
8. Kuchler C., Kuchler W.: Studies of the Antiviral Activity of Virothricin. Acta Virol. 10, 195 (1966).
9. Naficy K.: "Cyclopin". Ann. N. Y. Acad. Sci. 130, 449 (1965).
10. Roland J. F., Chmielewicz Z. F., Weiner B. A., Gross A. M., Boening O. P., Luck J. V., Bardos T. J., Reilely H. Ch., Siugura K., Stock C. C., Lucas E. H., Byerrum R. U., Stevens J. A.: Calvacin: a New Antitumor Agent. Science 132, 1897 (1960).
11. Tsunoda A., Ishida N.: A Mushroom Extract as an Interferon Inducer. Ann. N. Y. Acad. Sci. 173, 719 (1970).
12. Utzig J., Fertig S.: Wpływ kwasów poliporenowych na wzrost pałeczki *Brucella*. Med. Wet. 5, 268 (1957).
13. Utzig J., Samborski Z.: Wpływ trójterpenów zawartych w żagwi brzozowej *Polyporus betulinus* na guzy Stickera. Med. Wet. 8, 481 (1957).

## РЕЗЮМЕ

Исследована антивирусная активность веществ, полученных путем экстракции плодового тела 8 видов грибов рода *Aphyllophorales* органическими растворителями. Несколько из полученных экстрактов проявляли активность против вируса осповакцины и везикулярного стоматита (VS). Вещества активные против вируса осповакцины, были полученные из *Ganoderma applanatum*, *Piptoporus betulinus*, *Daedalea confragosa*, *Phellinus igniarius*, *Fomitopsis pinicola*, *Hirschioporus*

*abietinus*. Вещества, активные против вируса VS, получены из *Ganoderma applanatum*, *Piptoporus betulinus*, *Fomes fomentarius*. Некоторые из этих экстрактов, например эфирный экстракт из *Piptoporus betulinus* обладали вирусоцидной активностью, инактивируя вирусы осповакцины и клещевого энцефалита. Эфирные экстракты из *Piptoporus betulinus* и *Ganoderma applanatum* также тормозили репликацию вируса осповакцины, влияли на тканевую культуру фибробластов курицы, снижая её восприимчивость к последующим заражениям вирусом осповакцины. Вещества, полученные путем экстрагирования размельченного плодового тела органическими растворителями, состояли из многих веществ, но разделить их на основе разниц в растворимости не удалось.

#### SUMMARY

Examinations were made of antiviral substances obtained by extraction of fruiting bodies of 8 fungal species of the order of *Aphylophorales* with organic solvents. Some of the obtained extracts proved to show activity against vaccinia virus and vesicular stomatitis virus. Active substances against vaccinia virus were obtained from *Ganoderma applanatum*, *Piptoporus betulinus*, *Daedalea confragosa*, *Phellinus igniarius*, *Fomitopsis pinicola* and *Hirschioporus abietinus*. The active substances against vaccinia virus in agar diffusion test, came from *Ganoderma applanatum*, *Piptoporus betulinus* and *Fomes fomentarius*. Some of the extracts, such as ether extract from *Piptoporus betulinus*, had virucidal activity and inactivated vaccinia virus and vesicular stomatitis virus. Ether extracts from *Piptoporus betulinus* and *Ganoderma applanatum* inhibited the replication of vaccinia virus and influenced also the culture of chick embryo fibroblast (CEF) making it less sensitive to the next infection with vaccinia virus. The substances, obtained by the extraction method of ground fruiting bodies with organic solvents, contained many components which proved impossible to be separated on the basis of differences in solubility.