

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXIV, 13

SECTIO C

1979

Instytut Mikrobiologii UMCS
Zakład Mikrobiologii Stosowanej

Martyna KANDEFER-SZERSZEŃ,
Zbigniew KAWECKI

Wodne ekstrakty z grzybów
jako źródło substancji o aktywności przeciwwirusowej

Водный эстракт из грибов как основа вещества с антивирусной активностью

Water Extracts of Fungi as a Source of Antiviral Substances

Grzyby obok promieniowców są bardzo bogatym źródłem substancji przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych. Do bardziej znanych substancji przeciwwirusowych z grzybów należą: cyklopina izolowana przez Naficy z *Penicillium cyclopium* (10, 11), fumagillina z *Aspergillus fumigatus* (8), kwas tenuazonowy z *Aspergillus* sp. (9), fucydyna z *Fusidium coccineum* (3), kalwacyna z *Calvatia gigantea* (13), czy toksyny, takie jak gliotoksyna i octan gliotoksyny (12) oraz α -amanityna, znana również jako wybiórczy inhibitor syntezy białka (7).

W poprzednich publikacjach (4, 5) opisywaliśmy aktywność przeciwwirusową ekstraktów wodnych z grzybów z rodzaju *Aspergillus* oraz ekstraktów eterowych z *Piptoporus betulinus*. Obecnie przedstawione wyniki dotyczą dalszych prób poszukiwania aktywnych przeciwwirusowych substancji z różnych gatunków grzybów.

MATERIAŁY I METODY

Gatunki grzybów. Do badań użyto grzybów z rzędu *Aphyllophorales*: *Phellinus igniarius* (L. ex Fr.) Quel. — czyreń ogniowy, *Ganoderma applanatum* (Pers. ex Wallr.) Pat. — lakownica spłaszczona, *Fomes fomentarius* (L. ex Fr.) Kickx — hubiak pospolity, *Piptoporus betulinus* (Bull. ex Fr.) P. Karst. — porek brzozy, *Fomitopsis pinicola* (Sw. ex Fr.) P. Karst. — pniarek obrzęzony, *Xanthochrous pini* (Thore ex Fr.) Pat. — czyreń sosnowy.

Owocniki pierwszych czterech gatunków hub zebrano w okolicach Lublina. Owocniki przechowywano w temperaturze pokojowej w stanie wysuszonym. Gatunki *Fomitopsis pinicola* i *Xanthochrous pini* otrzymano z Zakładu Biochemii UMCS jako hodowlę grzybni na podłożach sztucznych. Do doświadczeń grzybnię hodowano w temperaturze pokojowej w butlach Roux na podłożach płynnych: *Fomitopsis pinicola* na podłożu Malto, a *Xanthochrous pini* na pożywce Lindenberga.

Szczepy wirusów. Wirus kleszczowego zapalenia mózgu, szczep K₅ izolowany przez Kaweckiego z larw kleszcza *Ixodes ricinus*, o mianie 10^{7.77} LD₅₀/ml, adaptowany do myszek. Materiałem wyjściowym była 10% rozcierka mózgow myszy padłych z objawami porażenia. Wirus krowianki izolowano w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej UMCS ze szczepionki przeciwospowej. Miano wirusa określone w hodowli fibroblastów zarodka kury (FZK) wynosiło 10^{6.3} PFU/ml. Wirusy przechowywano w temp. -20°C.

Hodowle tkankowe. FZK-pierwotną hodowlę fibroblastów zarodka kury przygotowywano standardową metodą z dziewięciodniowych zarodków kurzych. Do hodowli używano płynu Parkera z dodatkiem 10% surowicy cielęcej i antybiotyków: penicyliny 100 j/ml i streptomycyny 100 µg/ml. Płyn Parkera otrzymano z Lubelskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek.

Zwierzęta. Doświadczenia *in vivo* wykonano na białych myszkach Swiss wagi ok. 13 g, które otrzymano od hodowców myszy liniowych w Warszawie.

Metodyka otrzymywania ekstraktów wodnych z grzybów. Owocniki hub lub wyrośniętą na podłożu płynnym i dokładnie odplukaną od podłoża grzybnię rozdrabniano mechanicznie, a następnie homogenizowano z wodą destylowaną i zawieszinę wirowano. W otrzymanych klarownych ekstraktach wodnych oznaczano ilość białka metodą Lowry. Ekstrakty rozcieńczano tak, aby otrzymać 1 mg białka w 1 ml ekstraktu. Do ekstraktów wodnych dodawano 500 j/ml penicyliny, 500 j/ml streptomycyny i 200 j/ml nystatyny.

Metodyka interferencji *in vitro*. Aktywność przeciwwirusową wodnych ekstraktów określano stopniem zahamowania tworzenia łysek wirusa w hodowlach tkankowych potraktowanych tymi substancjami w porównaniu z kontrolnymi. Odpowiednie, nietoksyczne rozcieńczenia badanych ekstraktów inkubowano z wyrośniętą 48-godz. hodowlą tkankową FZK przez czas określony warunkami doświadczenia. Po usunięciu ekstraktów hodowle tkankowe zakażano wirusem krowianki w dawce 40 PFU/probówkę. Po 48 godz. inkubacji w temp. 37°C hodowlę tkankową barwiono 0,1% czerwienią obojętną i liczono łyseki wirusa krowianki. Wyniki doświadczeń przedstawiono jako procent ochrony. Jest to wyrażone w procentach obniżenia liczby łysek w hodowlach tkankowych potraktowanych badanymi substancjami w porównaniu z kontrolną hodowlą tkankową FZK zakażoną taką samą dawką wirusa.

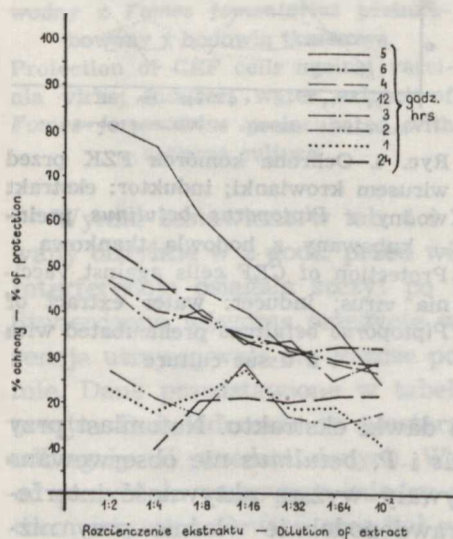
Metodyka interferencji *in vivo*. Aktywność przeciwwirusową wodnych ekstraktów z grzybów badano na białych myszkach, określając stopień obniżenia śmiertelności zwierząt potraktowanych badanymi substancjami w porównaniu z myszkami kontrolnymi zakażonymi taką samą dawką wirusa kleszczowego zapalenia mózgu.

Otrzymywanie i miareczkowanie interferonu. Ekstrakty wodne z *Piptoporus betulinus* i *Ganoderma applanatum* rozcieńczone 1:4 płynem Parkera z 2% surowicy cielęcej, inkubowano z wyrośniętą 48 godz. hodowlą FZK przez 4 godz. w przypadku ekstraktu z *P. betulinus* i 5 godz. w przypadku *G. applanatum* w 37°C. Po usunięciu induktora hodowle tkankowe zalewano świeżym płynem Parkera z 2% surowicy cielęcej i dodatkowo inkubowano 24 godz. w 37°C. Po tym

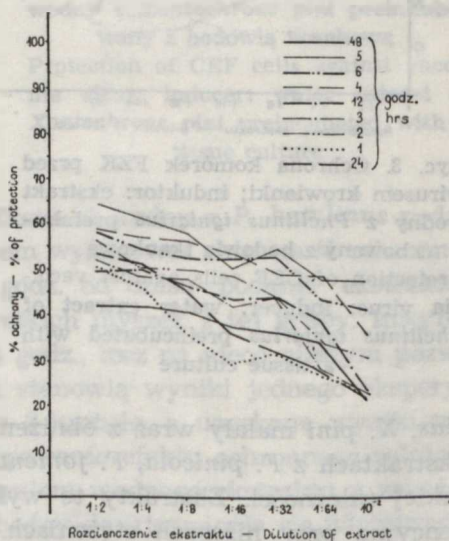
czasie hodowle zamrażano w temp. -20°C , szybko odmrażano i wirowano przy 3000 rpm/15 min., a supernatant badano na aktywność interferonową. Sporządzono kolejne rozcieńczenia interferonu co 0,3 log w płynie Parkera i traktowano nimi przez 24 godz. w temp. 37°C hodowle tkankowe FZK w próbkach. Po usunięciu interferonu hodowle pokrywano świeżym płynem Parkera z 2% surowicy cielęcej i zakażano wirusem krowianki w dawce 40 PFU/probówkę. Zakażone hodowle tkankowe inkubowano 48 godz., barwiono czerwienią obojętną i liczone łąsinki wirusa. Za jednostkę interferonu przyjmowano to rozcieńczenie, które hamuje 50% łąsinek wirusa w porównaniu z kontrolą zakażoną taką samą dawką wirusa. Miano interferonu przeliczano na 1 ml płynu (ok. 2 mln komórek hodowli tkankowej).

WYNIKI BADAŃ

Na wstępie ustalono nietoksyczne dla hodowli tkankowej FZK dawki ekstraktów wodnych z grzybów. Do dalszych badań używano tylko rozcieńczeń nietoksycznych, czyli takich, które nie wywoływały widocznego w mikroskopie efektu toksycznego w komórkach. Ekstrakty wodne z *F. pinicola*, *G. applanatum*, *Ph. igniarius*, *P. betulinus*, *X. pini* i *F. fomenta-*

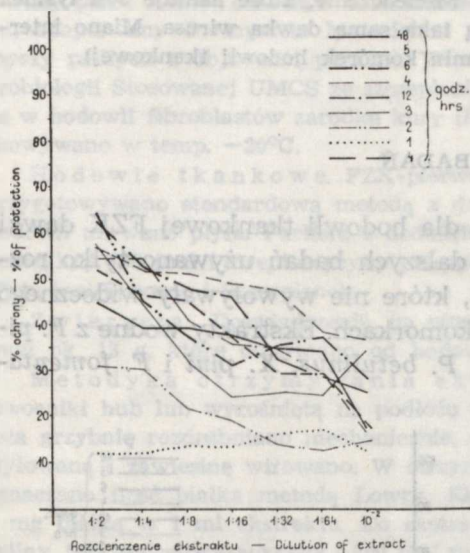


Ryc. 1. Ochrona komórek FZK przed wirusem krowianki; induktor: ekstrakt wodny z *Fomitopsis pinicola* preinkubowany z hodowlą tkankową
Protection of chick embryo fibroblast cells (CEF) against vaccinia virus; inducer: water extract of *Fomitopsis pinicola* preincubated with a tissue culture



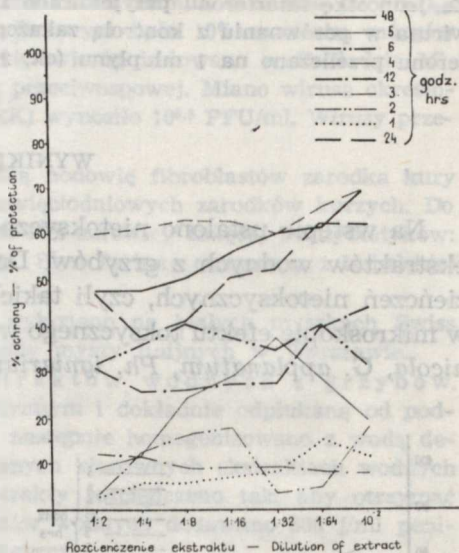
Ryc. 2. Ochrona komórek FZK przed wirusem krowianki; induktor: ekstrakt wodny z *Ganoderma applanatum* preinkubowany z hodowlą tkankową
Protection of CEF cells against vaccinia virus; inducer: water extract of *Ganoderma applanatum* preincubated with a tissue culture

rius wykazywały aktywność interferencyjną w hodowli tkankowej FZK. Wyniki doświadczeń przedstawiono na ryc. 1—6. Optymalny czas potrzebny do wystąpienia zjawiska interferencji u wszystkich ekstraktów wynosił 4—6 godz. inkubacji ekstraktów z hodowlą tkankową FZK. Właściwości interferencyjne wodnych ekstraktów z *G. applanatum*, *Ph. ignia-*



Ryc. 3. Ochrona komórek FZK przed wirusem krowianki; induktor: ekstrakt wodny z *Phellinus igniarius* preinkubowany z hodowlą tkankową

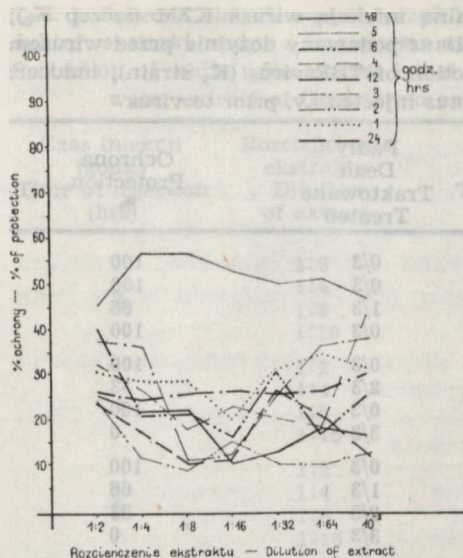
Protection of CEF cells against vaccinia virus; inducer: water extract of *Phellinus igniarius* preincubated with a tissue culture



Ryc. 4. Ochrona komórek FZK przed wirusem krowianki; induktor: ekstrakt wodny z *Piptoporus betulinus* preinkubowany z hodowlą tkankową

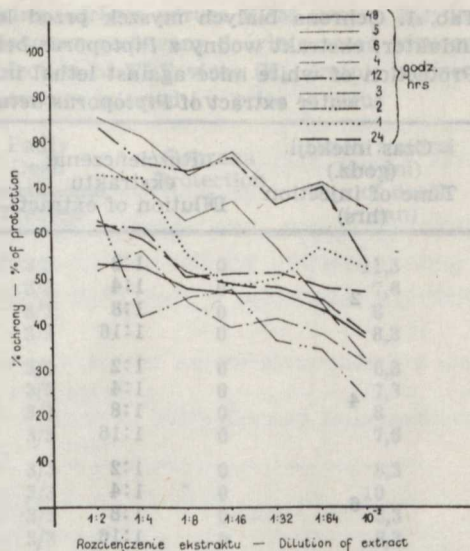
Protection of CEF cells against vaccinia virus; inducer: water extract of *Piptoporus betulinus* preincubated with a tissue culture

rius, *X. pini* malały wraz z obniżeniem dawki ekstraktu. Natomiast przy ekstraktach z *F. pinicola*, *F. fomentarius* i *P. betulinus* nie obserwowano takiej zależności. Ekstrakty te wykazywały wyższą aktywność interferencyjną przy niższych stężeniach. Prawdopodobnie właśnie przy niższych dawkach ustalały się optymalne warunki do wystąpienia interferencji. Do dalszych badań wybrano dwa gatunki grzybów, których ekstrakty wodne charakteryzowały się wysoką aktywnością interferencyjną w hodowli tkankowej FZK: *P. betulinus* i *G. applanatum*. Aktywność przeciwwirusową *in vivo* badano, podając myszkom dożylnie po 0,1 ml kolejnego rozcieńczenia wodnego ekstraktu z *P. betulinus* i *G. applanatum* w różnym czasie przed domózgowym zakażeniem 100 LD₅₀ wirusa KZM, szczep K₅.



Ryc. 5. Ochrona komórek FZK przed wirusem krowianki; induktor: ekstrakt wodny z *Fomes fomentarius* preinkubowany z hodowlą tkankową

Protection of CEF cells against vaccinia virus; inducer: water extract of *Fomes fomentarius* preincubated with a tissue culture



Ryc. 6. Ochrona komórek FZK przed wirusem krowianki; induktor: ekstrakt wodny z *Xanthochrous pini* preinkubowany z hodowlą tkankową

Protection of CEF cells against vaccinia virus; inducer: water extract of *Xanthochrous pini* preincubated with a tissue culture

Wyniki zestawiono w tab. 1 i 2. Ekstrakt wodny z *P. betulinus* podawany dożylnie w 2 godz. przed wirusem wykazywał aktywność ochronną. Interferencja osiągała szczyt po 12 godz. od czasu podania ekstraktu. Stwierdzono wówczas przeżycie wszystkich myszek z tej grupy. Interferencja utrzymywała się jeszcze po 24 godz., lecz na nieco niższym poziomie. Dane przedstawione w tabelach stanowią wyniki jednego eksperymentu. Doświadczenia te powtarzano 3-krotnie, a uzyskane wyniki nie odbiegały od przedstawionych. Występowanie efektu ochronnego zależało od przedziału czasowego między podaniem wodnego ekstraktu a zakażeniem wirusem. Pewien czas był niezbędny do ujawnienia się właściwości ochronnych ekstraktu wodnego z *P. betulinus*. Wiele spośród znanych przeciwwirusowych substancji, zwłaszcza induktorów interferonu, wykazuje działanie profilaktyczne, nie wpływając na przebieg zapoczątkowanych już infekcji, zwłaszcza wirusów neurotropowych. Wprawdzie stwierdzono lecznicze działanie induktorów interferonu przy neurotropowych infekcjach, jednakże induktory te, np. statolon czy poli I · poli C podawano domózwowo (1) lub podawano wielokrotnie (14, 15).

Tab. 1. Ochrona białych myszek przed letalną infekcją wirusa KZM (szczep K₆); induktor: ekstrakt wodny z *Piptoporus betulinus* podawany dożylnie przed wirusem
 Protection of white mice against lethal infection of TBE virus (K₆ strain); inducer: water extract of *Piptoporus betulinus* injected i.v. prior to virus

Czas iniekcji (godz.) Time of injection (hrs)	Rozcieńczenie ekstraktu Dilution of extract	Padły Dead Traktowane Treated	Ochrona Protection %
2	1:2	0/3	100
	1:4	0/3	100
	1:8	1/3	66
	1:16	0/3	100
4	1:2	0/3	100
	1:4	2/3	33
	1:8	0/3	100
	1:16	3/3	0
6	1:2	0/3	100
	1:4	1/3	66
	1:8	2/3	33
	1:16	3/3	0
8	1:2	1/3	66
	1:4	0/3	100
	1:8	0/3	100
	1:16	0/3	100
12	1:2	0/3	100
	1:4	0/3	100
	1:8	0/3	100
	1:16	0/3	100
24	1:2	0/3	100
	1:4	1/3	66
	1:8	0/3	100
	1:16	1/3	66
Kontrola wirusa Virus control	—	3/3	—
Kontrola ekstraktu Extract control	1:2	0/3	—
	1:4	0/3	—
	1:8	0/3	—
	1:16	0/3	—
Kontrola myszy Mice control	—	0/3	—

Ekstrakt wodny z *G. applanatum* nie wykazywał tak wysokiej aktywności interferencyjnej jak ekstrakt z *P. betulinus*, tym niemniej w 8, 12, 24 i 48 godz. po dożylnym jednorazowym podaniu ekstraktu wodnego z *G. applanatum* i następnie domózkowym zakażeniu myszy wirusem K₆, obserwowano niewielką, ale wyraźną ochronę myszy przed śmiercią. Dalejsza część doświadczenia miała na celu określenie miejsca działania ekstraktów wodnych z *P. betulinus* i *G. applanatum* na replikację wirusa krowianki. Badano bezpośrednią inaktywację wirusa krowianki przez ekstrakty z grzybów. Ekstrakty wodne rozcieńczone płynem Parkera 1:16

Tab. 2. Ochrona białych myszek przed letalną infekcją wirusa KZM (szczep K₅); induktor: ekstrakt wodny z *Ganoderma applanatum* podawany dożylnie przed wirusem
 Protection of white mice against lethal infection of TBE virus (K₅ strain); inducer: water extract of *Ganoderma applanatum* injected i.v. prior to virus

Czas iniekcji (godz.) Time of injection (hrs)	Rozcieńczenie ekstraktu Dilution of extract	Fadły Dead Traktowane Treated	Ochrona Protection (%)	Dzień śmierci (średni) Day of death (mean)
2	1:2	3/3	0	11,3
	1:4	3/3	0	7,6
	1:8	3/3	0	8
	1:16	3/3	0	8,3
4	1:2	3/3	0	8,3
	1:4	3/3	0	7,3
	1:8	3/3	0	8
	1:16	3/3	0	7,6
6	1:2	3/3	0	8,3
	1:4	3/3	0	10
	1:8	3/3	0	8,3
	1:16	3/3	0	8,3
8	1:2	1/3	66	—
	1:4	0/3	100	—
	1:8	2/3	33	—
	1:16	2/3	33	—
12	1:2	1/3	66	—
	1:4	1/3	66	—
	1:8	2/3	33	—
	1:16	3/3	0	8,6
24	1:2	2/3	33	—
	1:4	1/3	66	—
	1:8	3/3	0	8,6
	1:16	2/3	33	—
48	1:2	2/3	33	—
	1:4	2/3	33	—
	1:8	1/3	66	—
	1:16	2/3	33	—
Kontrola wirusa Virus control	—	3/3	—	8
Kontrola ekstraktu Extract control	1:2	0/3	—	—
	1:4	0/3	—	—
	1:8	0/3	—	—
	1:16	0/3	—	—
Kontrola myszy Mice control	--	0/3	—	—

mieszano z równą objętością wirusa krowianki namnożonego w hodowli tkankowej FZK. Mieszaninę inkubowano w 37°C. Równolegle jako kontrolną próbę inkubowano wirus w płynie Parkera. Próbkę pobierano po 4, 6 i 12 godz., rozcieńczano 10⁻³ i zakażano hodowlą tkankową FZK. Efekt cytotatyczny odczytywano po 48 godz. inkubacji w 37°C. Wyniki przedstawiono w tab. 3.

Ekstrakt wodny z *G. applanatum* nie inaktywował bezpośrednio wirusa krowianki, a ekstrakt wodny z *P. betulinus* po 12 godz. inkubacji z wirusem powodował jego częściową inaktywację. Obserwowano wówczas słabszy efekt cytotatyczny w próbach badanych w porównaniu z kontrolą wirusa inkubowaną w tych samych warunkach.

Następnie przebadano wpływ ekstraktów wodnych z *P. betulinus* i *G. applanatum* na wewnątrzkomórkową replikację wirusa krowianki. Po 1 godz. adsorpcji wirusa hodowle zadawano odpowiednim rozcieńczeniem wodnego ekstraktu. Wyniki, wyrażone jako procent obniżenia liczby łyśin

Tab. 3. Inaktywacja wirusa krowianki przez ekstrakty wodne *Piptoporus betulinus* i *Ganoderma applanatum*
Inactivation of vaccinia virus by water extracts of *Piptoporus betulinus* and *Ganoderma applanatum*

Czas inkubacji (godz.) Time of incubation (hrs)	<i>P. betulinus</i> ochrona hodowli tkankowej protection of tissue culture (%)	<i>G. applanatum</i> ochrona hodowli tkankowej protection of tissue culture (%)
2	0	0
4	0	0
6	0	0
12	54	0
Kontrola ekstraktu Extract control	0	0
Kontrola tkanki Tissue culture control	0	0

Tab. 4. Ekstrakty wodne z *Piptoporus betulinus* i *Ganoderma applanatum* jako inhibitory replikacji wirusa krowianki w hodowli tkankowej FZK
Water extracts of *Piptoporus betulinus* and *Ganoderma applanatum* as inhibitors of vaccinia virus replication in CEF tissue culture

Rozcieńczenie ekstraktu Dilution of extract	<i>P. betulinus</i> ochrona hodowli tkankowej protection of tissue culture (%)	<i>G. applanatum</i> ochrona hodowli tkankowej protection of tissue culture (%)
1:4	79	52
1:8	65	33
1:16	28	33
1:32	3	25
1:64	0	25
Kontrola wirusa Virus control	0	0
Kontrola ekstraktu Extract control	0	0
Kontrola tkanki Tissue culture control	0	0

Tab. 5. Charakterystyka substancji interferonopodobnych indukowanych przez ekstrakty wodne z grzybów w hodowli tkankowej FZK
 Characteristics of interferon-like substances induced in CEF tissue culture by water extracts from fungi

Induktor Inducer	Miano interferonu /ml Interferon titer U/ml		Wrażliwość Susceptibility	
	tkanka homologiczna tissue culture	tkanka heterologiczna heterologous tissue culture	pH 2	Trypsyna Trypsin
Ekstrakt Extract of <i>P. betu- linus</i>	5	0	5	0
Ekstrakt Extract of <i>G. appla- natum</i>	27	0	27	0

wirusa krowianki w porównaniu z hodowlami tkankowymi potraktowanymi jedynie wirusem, stanowiącymi kontrolę wirusa zestawiono w tab. 4.

Jak wynika z doświadczeń, ekstrakt wodny z *P. betulinus* hamował replikację wirusa krowianki, redukując liczbę łąsin w ok. 80% w porównaniu z kontrolą, a ekstrakt wodny z *G. applanatum* hamował tworzenie łąsin w 50%. Aktywność interferencyjna wodnych ekstraktów z badanych grzybów dotyczyła więc prawdopodobnie wewnątrzkomórkowego etapu replikacji wirusa krowianki. Można przypuszczać, że wodny ekstrakt z *P. betulinus* przy wielocyklicznej w tych warunkach doświadczenia replikacji wirusa również bezpośrednio inaktywował uwalniającego się z komórek wirusa, ograniczając jego rozprzestrzenianie się i w efekcie ograniczając wywołany przez wirusa efekt cytotatyczny w hodowli tkankowej. W celu uzyskania pełniejszego obrazu przeciwwirusowego działania ekstraktów wodnych z grzybów przebadano ich zdolność do indukcji interferonu w hodowli tkankowej FZK.

Ekstrakt wodny z *P. betulinus* i *G. applanatum* rozcieńczony 1:4 w płynie Parkera z 2% surowicy cielęcej inkubowano w przypadku ekstraktu z *P. betulinus* 4 godz., a *G. applanatum* 5 godz. z hodowlą tkankową FZK. Po usunięciu induktora hodowle zalewano świeżym płynem utrzymującym, a następnie po 24 godz. płyn hodowlany zbierano i określano miano i właściwości nagromadzonego w płynie inhibitora wirusowego.

Indukowane przez ekstrakty wodne z *P. betulinus* i *G. applanatum* substancje interferonopodobne miały różne miano, ale właściwości wspólne z interferonem: nie dializowały, nie były wrażliwe na pH 2, lecz reagowały na trypsynę i nie wykazywały aktywności przeciwwirusowej w heterologicznej hodowli tkankowej komórek L. (tab. 5).

DYSKUSJA

Przedstawione wyniki badań potwierdzają domiesienia wielu autorów, którzy wykazali, że produkty grzybów mogą być źródłem aktywnych substancji przeciwwirusowych. Wykryto cały szereg substancji o różnej strukturze chemicznej i różnorodnej aktywności (3, 7—13) biologicznej. Niektóre z tych substancji wykazują aktywność przeciw wielu wirusom, na przykład stwierdzono to w przypadku cyklopiny (10, 11), lub są aktywne jedynie wobec niektórych szczepów wirusowych. Kalwacyna aktywna jest w stosunku do niewielu szczepów wirusów ECHO (13). Ekstrakty wodne z badanych przez nas gatunków grzybów nie wykazywały wyraźnie zaznaczonej przeciwwirusowej specyficzności, interferując z replikacją zarówno RNA wirusów (wirus KZM), jak i wirusów DNA (wirus krowianki).

Mechanizm działania znanych przeciwwirusowych substancji, otrzymywanych z grzybów, jest różnorodny, niektóre z nich (7, 12) są substancjami toksycznymi, inhibitorami syntezy makromolekuł komórkowych i na tej drodze hamują również replikację wirusów. Inne z kolei działają przeciwwirusowo na drodze indukcji interferonu. Są to takie produkty grzybów, jak polisacharydy (16) czy kwasy nukleinowe, szczególnie dwuniciowe (2, 6, 17).

Charakterystyczną cechą substancji przeciwwirusowych działających na drodze indukcji syntezy interferonu jest działanie przede wszystkim profilaktyczne, gdyż niezbędny jest pewien okres na wyprodukowanie interferonu, który działając na komórki uodporni je na zakażenie wirusem. Czas indukcji waha się w dość szerokich granicach 2—24 godz. w zależności od induktora i komórek-producentów. Dwuniciowe kwasy nukleinowe z grzybów, jak stwierdzono, indukują interferon w zakresie 3—12 godz., lecz ogólnie biorąc indukują one interferon wcześniej niż całe cząsteczki wirusów zakażających grzyby, z których głównie te dwuniciowe kwasy nukleinowe pochodzą.

Czas optymalnej interferencji badanych ekstraktów, zawierających kwasy nukleinowe, z wirusem krowianki w doświadczeniach *in vitro* wahał się w zależności od stosowanego ekstraktu 4—6 godz., a w przypadku doświadczeń na zwierzętach — najwyższą ochronę myszy przed śmiertelną infekcją wirusa KZM stwierdzono po 8—12 godz. od dożylnego podania ekstraktów. Uzyskane wyniki świadczyły o tym, że badane ekstrakty wodne z grzybów działały prawdopodobnie na drodze indukcji interferonu. Rzeczywiście wykazano obecność niewielkich, ale wykrywalnych ilości substancji interferonopodobnej po inkubacji hodowli tkankowej FZK z ekstraktami wodnymi z *P. betulinus* i *G. applanatum*. Indukowana substancja interferonopodobna wykazywała cechy interferonu, była ak-

tywna tylko w homologicznej hodowli tkankowej, wykazywała wrażliwość na trawienie trypsyną, a brak wrażliwości na pH 2.

Również próby określenia miejsca działania wodnych ekstraktów z grzybów na replikację wirusa krowianki wykazały, że działają one głównie na drodze hamowania wewnątrzkomórkowej replikacji wirusów. Jedynie ekstrakt z *P. betulinus* wykazywał zdolność bezpośredniej inaktywacji wirusa krowianki, co świadczy raczej o obecności w tym ekstrakcie wodnym obok induktorów interferonu innych substancji wywołujących bezpośrednią inaktywację wirusa krowianki.

PIŚMIENNICTWO

1. Allen L. B., Cochran K. W.: Target — Organ Treatment of Neurotropic Virus Disease with Interferon Inducers Infect. Immun. **6**, 819 (1972).
2. Banks G. T., Buck K. W., Chain E. B., Himmelweit F., Marks J. E., Tyler J. M., Hollings M., Last F., Stone O.: Viruses of Fungi and Interferon Stimulation. Nature **218**, 542 (1968).
3. Gonczarskaja T., Nowashin S. M.: Protiwowirusnyje swojstwa fuzidina. Antibiotiki **16**, 57 (1971).
4. Kandefer-Szerszeń M., Kawecki Z.: Water Extracts of Fungi as Interference Inducers. Acta Microbiol. Pol. **5**, 163 (1973).
5. Kandefer-Szerszeń M., Kawecki Z.: Ether Extract from Fruiting Body of *Piptoporus betulinus* as Interference Inducers. Acta Microbiol. Pol. **6**, 197 (1974).
6. Kleinschmidt W. J., Ellis L., Van Frank R. M., Murphy E. B.: Interferon Stimulation by a Double-Stranded RNA of a Mycophage in Statolon Preparation. Nature **220**, 167 (1968).
7. Mahy B. W. J., Hastie N. D., Armstrong S. J.: Inhibition of Influenza Virus Replication by Amanitin: Mode of Action. Prof. Natl. Acad. Sci. USA **69**, 1421 (1972).
8. McCowen M. C., Callander M. E., Lawlis J. E.: Fumagillin (H-3) A New Antibiotic with Amoebicidal Properties. Science **113**, 202 (1951).
9. Miller F. A., Richtsel W. A., Sloan B. J., Ehrlich J., French J. C., Bartz Q. R., Dixon G. J.: Antiviral Activity of Tenuazonic Acid. Nature **200**, 1338 (1963).
10. Naficy K., Carver D. H.: „Cyclopin” a Trypsin Sensitive Constituent of *Penicillium cyclopium* with Antiviral Properties. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **114**, 175 (1963).
11. Naficy K.: „Cyclopin”. Ann. N. Y. Acad. Sci. **130**, 449 (1965).
12. Richtsel W. A., Schneider H. G., Sloan B. J., Graf P. R., Miller F. A., Bartz Q. R., Ehrlich J.: Antiviral Activity of Gliotoxin and Gliotoxin Acetate. Nature **204**, 1333 (1964).
13. Roland J. F., Chmielewicz Z. F., Weiner B. A., Gross A. M., Boening O. P., Luck J. V., Bardos T. J., Reilly H. Ch., Sugiura K., Stock C. C., Lucas E. H., Byerrum R. U., Stevens J. A.: Calvacin: a New Antitumor Agent. Science **132**, 1897 (1960).
14. Stringfellow D. A., Overall J. C., Glasgow L. A.: Interferon

- Inducers in Therapy of Infection with Encephalomyocarditis Virus in Mice. I. Effect of Single Doses of Polyribonucleosinic-polyribocytidylic Acid and Tilorone Hydrochloride on Viral Pathogenesis. *J. Infect. Dis.* **130**, 470 (1974).
15. Stringfellow D. A., Overall J. C., Glasgow L. A.: Interferon Inducers in Therapy of Infection with Encephalomyocarditis Virus in Mice. II. Effect of Multiple Doses of Polyribonucleosinic-polyribocytidylic Acid on Viral Pathogenesis. *J. Infect. Dis.* **130**, 481 (1974).
16. Suzuki S., Suzuki M., Imaya M.: Interferon — Inducing Activity of Acidic Polysaccharides. I. Induction in Rabbit Serum Interferon by *Hansenula phosphomannans* Japan. *J. Microbiol.* **15**, 485 (1971).
17. Tsunoda A., Ishida N.: A Mushroom Extract as an Interferon Inducer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **173**, 719 (1970).

РЕЗЮМЕ

Исследована антивирусная активность водных экстрактов из разных видов грибов ряда *Aphylophorales*. Водные экстракты из *Phellinus igniarius*, *Ganoderma applanatum*, *Fomes fomentarius*, *Piptoporus betulinus*, *Fomitopsis pinicola*, *Xanthochrous pini* индуцировали явление интерференции, защищая тканевую культуру фибробластов зародышей курицы от вируса оспенной лимфы. Водные экстракты из *Piptoporus betulinus* и *Ganoderma applanatum* защищали мышей от летальной инфекции вируса клещевого инфекционного энцефалита.

SUMMARY

Water extracts of various *Aphylophorales* fungi species as a source of antiviral substances were examined. Water extracts of *Phellinus igniarius*, *Ganoderma applanatum*, *Fomes fomentarius*, *Piptoporus betulinus*, *Fomitopsis pinicola* and *Xanthochrous pini* induced interference in chick embryo fibroblast (CEF) tissue cultures and protected them against vaccinia virus. Water extracts of *P. betulinus* and *G. applanatum* protected mice against lethal infection of thick-borne encephalitis (TBE) virus.