

МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ MICROBIOLOGY AND VIROLOGY

ВЛИЯНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ СУБСТРАТНОЙ ДРЕВЕСИНЫ НА ФОРМИРОВАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СВОЙСТВ ЭКСТРАКТОВ МИЦЕЛИЯ *INONOTUS RHEADES* PERS. P. KARST. (1882) В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Хаснатинов М.А.¹,
Горноста́й Т.Г.²,
Солова́ров И.С.¹,
Полякова М.С.²,
Данчинова Г.А.¹,
Боровский Г.Б.²

¹ ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16, Россия)

² ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН (664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Хаснатинов Максим Анатольевич,
e-mail: khasnatinov@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), передающийся человеку при укусах иксодовых клещей, является одним из наиболее опасных и эпидемиологически значимых возбудителей инфекционных заболеваний в Российской Федерации. При этом существует потребность в эффективных противовирусных средствах для лечения и профилактики этой инфекции. Нам установлено, что мицелий *Inonotus rheades*, выращенный на древесине берёзы, содержит водорастворимые вещества, обладающие сильными вирулицидными свойствами в отношении ВКЭ. Необходимо проверить, возможен ли синтез мицелием *I. rheades* вирулицидных веществ из древесины других пород.

Цель исследования. Изучить противовирусные свойства экстрактов мицелия *I. rheades*, выращенного на древесине хвойных пород деревьев, как при наличии, так и в отсутствие освещения синим светом при культивировании.

Методы. Мицелий *I. rheades* выращивали на древесине берёзы, сосны и пихты. Прямое вирулицидное действие экстракта определяли по снижению титра инфекционного вируса, инкубированного в присутствии экстракта. Токсичность экстрактов для клеток оценивали на основе расчёта 50%-й цитотоксичной концентрации. Способность экстракта ингибировать репродукцию вируса в заражённых клетках оценивали на основе расчёта 50%-й эффективной концентрации (EC50).

Результаты. Экстракты мицелия, выращенного на хвойных породах при освещении синим светом, не вызывают статистически значимого снижения концентрации инфекционного ВКЭ ($p = 0,2563$). Экстракт ВР10 (сосна, синий свет) ингибирует репродукцию ВКЭ в заражённых клетках (EC50 = $0,28 \pm 0,06$ мг/мл). Токсичность для культуры клеток СПЭВ низкая. У экстрактов хвойных пород, выращенных в темноте, вирулицидного действия не обнаружено.

Заключение. Компонентный состав и механизм противовирусного действия экстрактов *I. rheades* определяются видовой принадлежностью древесного субстрата. Наиболее перспективными источниками новых лекарственных средств в отношении ВКЭ представляются экстракты мицелия *I. rheades*, выращенного на субстратах древесины берёзы и сосны.

Ключевые слова: противовирусная активность, *Inonotus rheades*, вирус клещевого энцефалита, *Betula pendula*, *Pinus sylvestris*, *Abies sibirica*

Для цитирования: Хаснатинов М.А., Горноста́й Т.Г., Солова́ров И.С., Полякова М.С., Данчинова Г.А., Боровский Г.Б. Влияние видовой принадлежности субстратной древесины на формирование противовирусных свойств экстрактов мицелия *Inonotus rheades* Pers. P. Karst. (1882) в отношении вируса клещевого энцефалита. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(1): 19-27. doi: 10.29413/ABS.2022-7.1.3

Статья поступила: 24.01.2022

Статья принята: 17.02.2022

Статья опубликована: 21.03.2022

INFLUENCE OF SUBSTRATE WOOD SPECIES ON THE FORMATION OF ANTIVIRAL PROPERTIES OF *INONOTUS RHEADES* PERS. P. KARST. (1882) MYCELIUM EXTRACTS REGARDING TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

Khasnatinov M.A.¹,
Gornostai T.G.²,
Solovarov I.S.¹,
Polyakova M.S.²,
Danchinova G.A.¹,
Borovskii G.B.²

¹ Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (Timiryazeva str. 16, Irkutsk 664003, Russian Federation)

² Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (Lermontova str. 132, Irkutsk 664033, Russian Federation)

Corresponding author:
Maxim A. Khasnatinov,
e-mail: khasnatinov@yandex.ru

ABSTRACT

Background. The tick-borne encephalitis virus (TBEV) is one of the most dangerous and epidemiologically significant vector-borne pathogens. There is a need for effective antiviral agents for the treatment and prevention of this infection. Previously we found that the mycelium of *Inonotus rheades* grown on birch wood contains water-soluble substances with strong virulicidal properties against TBEV. It is necessary to check whether the mycelium of *I. rheades* can synthesize virulicidal substances from wood of other species.

The aim: to study the antiviral properties of extracts of *I. rheades* mycelium grown on coniferous wood, both in the presence and in the absence of blue light during cultivation.

Materials and methods. The mycelium of *I. rheades* was grown on birch, pine, and fir wood. The direct virulicidal effect of the extract was evaluated by the decrease in the titer of the infectious virus incubated in the presence of the extract. The ability of the extract to inhibit the reproduction of the virus in infected cells was studied by the calculation of 50 % effective concentration (EC50). The toxicity of extracts for cells was evaluated based on the calculation of 50 % cytotoxic concentration.

Results. Mycelium extracts grown on conifers under blue light do not cause a statistically significant decrease in the concentration of infectious TBEV ($p = 0.2563$). However, the BP10 extract (pine, blue light) inhibits TBEV reproduction in infected cells ($EC50 = 0.28 \pm 0.06$ mg/mL). Toxicity for SPEV cell culture is low. In the extracts of conifers grown in the dark, no antiviral effect was found at all.

Conclusions. The component composition and mechanism of the antiviral action of *I. rheades* extracts are determined by the species of the wood substrate. The most promising sources of new drugs in relation to TBEV appear to be extracts of *I. rheades* mycelium grown on birch and pine.

Key words: antiviral activity, *Inonotus rheades*, tick-borne encephalitis virus, *Betula pendula*, *Pinus sylvestris*, *Abies sibirica*

Received: 24.01.2022

Accepted: 17.02.2022

Published: 21.03.2022

For citation: Khasnatinov M.A., Gornostai T.G., Solovarov I.S., Polyakova M.S., Danchinova G.A., Borovskii G.B. Influence of substrate wood species on the formation of antiviral properties of *Inonotus rheades* Pers. P. Karst. (1882) mycelium extracts regarding tick-borne encephalitis virus. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(1): 19-27. doi: 10.29413/ABS.2022-7.1.3

ОБОСНОВАНИЕ

Флавивирусы – опасные патогены человека. Возбудители лихорадки Денге, жёлтой лихорадки, японского и клещевого энцефалита являются флавивирусами. Специфических лекарственных средств против них не существует. Наиболее эпидемически значимым флавивирусом в Российской Федерации является вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), передающийся людям при укусах иксодовых клещей [1, 2]. Широкое распространение природных очагов клещевого энцефалита (КЭ) на территории РФ, низкий уровень вакцинации населения и недостаток специфических противовирусных препаратов делают актуальной разработку новых лекарственных средств против КЭ. Одним из активно развивающихся направлений в разработке новых противовирусных препаратов является поиск активных химических соединений в продуктах естественного происхождения.

К числу потенциальных источников природных метаболитов с противовирусной активностью относят ксилотрофные базидиомицеты [3–9], из которых наиболее изученным и широко распространённым объектом является склероций трутовика скошенного *Inonotus obliquus* (чага) [3, 6, 7]. Ранее нами было установлено, что один из представителей рода *Inonotus* – трутовик лисий *Inonotus rheades* (Pers.) P. Karst. (1882) – содержит в мицелии водорастворимые вещества, обладающие сильными вирулицидными свойствами в отношении ВКЭ [10], проявляющие противовирусную и антипролиферативную активность, а также имеющие антиоксидантные свойства [11]. Выявлено, что накопление биологически активных веществ индуцируется освещением мицелия *I. rheades* синим светом во время культивации, тогда как в темноте эти соединения не накапливаются [11]. Кроме того, оказалось, что субстрат выращивания *I. rheades* играет определяющую роль в синтезе грибом веществ, обладающих противовирусной активностью. Так, экстракты мицелия, выращенного на стандартной культуральной среде, не проявляли антивирусных свойств ни в темноте, ни при освещении, тогда как экстракты мицелия, выращенного на древесине берёзы при облучении синим светом, обладали ярко выраженными вирулицидными качествами [12]. Было высказано предположение, что активные вещества не являются основными метаболитами мицелия исследуемого гриба, а могут быть побочными продуктами разложения специфического древесного субстрата [12]. Для дальнейшего изучения природы противовирусного действия экстрактов *I. rheades* необходимо проверить, возможен ли синтез мицелием *I. rheades* вирулицидных веществ из древесины других пород, или же накопление этих веществ определяется именно компонентами древесины берёзы. Для этого в параллельных экспериментах как при стимуляции синим светом, так и в темноте исследованы экстракты мицелия, выращенного на древесине двух новых видов деревьев – сосны и пихты. Для контроля качества экспериментальных процедур был параллельно приготовлен и изучен экстракт мицелия, выращенного на дисках берёзы при облучении синим светом, показатели противовирусной активности которого уже охарактеризованы ра-

нее [12]. Хотя древесные субстраты хвойных пород и не характерны для *I. rheades* в природе, технически на нём можно добиться роста мицелия *in vitro*. Поскольку древесина хвойных пород богата различными биологически активными соединениями, особенно терпеноидной природы (например, см. обзор [13]), можно надеяться на получение экстрактов с высокой биологической активностью.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Исследовать противовирусные свойства экстрактов мицелия *I. rheades*, выращенного на древесине хвойных пород деревьев, как при наличии, так и в отсутствие индукции биосинтеза синим светом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение экстрактов. Объектом исследования был базидиальный гриб *I. rheades*, штамм 287, из коллекции грибных культур ЦКП «Биоресурсный центр» СИФИБР СО РАН, который культивировали на древесных дисках берёзы *Betula pendula* Roth. (Betulaceae), сосны *Pinus sylvestris* L. (Pinaceae) и пихты *Abies sibirica* Ledeb. (Pinaceae). Диски были стерилизованы и после этого инокулированы мицелием *I. rheades*. Культивирование на древесине проводили в течение 60 дней, при 25 ± 1 °С, в темноте или при освещении синими светодиодами мощностью 12,8 Вт/м² (SMD-5050, «Рубикон», Барнаул).

Из полученных в ходе культивирования мицелия и культуральной жидкости выделяли фракции водорастворимых полисахаридов с использованием методики В.Г. Бабицкой и соавт. [14]. Перерастворение делали с использованием стерильной бидистиллированной воды и после пропускали через бактериальный фильтр с порами диаметром 22 мкм. Для раствора полисахаридной фракции определяли общую концентрацию сухих веществ и хранили при –20 °С. Перед проведением исследования экстракты размораживали и приводили к стоковой концентрации 2 мг/мл путём разбавления расчётного количества экстракта стерильным фосфатно-солевым буфером (рН = 7,4). Для каждого экстракта приготавливали 5 мл стокового раствора.

Для оценки противовирусной активности использовали охарактеризованный ранее изолят ВКЭ 92М [15]. Культивирование ВКЭ производили в клеточной линии почки эмбриона свиньи СПЭВ (ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Миздрава России, Санкт-Петербург). Инфекционную активность ВКЭ определяли методом титрования бляшкообразующих единиц (БОЕ) в культуральной среде в соответствии с ранее описанным способом [16] и выражали в виде lg БОЕ/мл. Поддержание культур клеток осуществляли на среде RPMI1640 (БиоЛот, Москва) с добавлением 100 У/мл пенициллина (БиоЛот, Москва), 100 мкг/мл стрептомицина (БиоЛот, Москва) и 5%-й эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) HyClone (ThermoScientific, Великобритания).

Определение прямого вирулицидного действия. Вирулицидную активность определяли в соответствии

с ранее описанным способом [16] с модификациями. Для оценки вирулицидного действия экстрактов на ВКЭ 100 мкл среды RPMI 1640 (без сыворотки), содержащей 30000 БОЕ ВКЭ, смешивали с равным объёмом тестируемого экстракта в концентрации 2 мг/мл. Таким образом, рабочая концентрация экстрактов составляла 1 мг/мл. Референс-образец приготавливали, смешивая 100 мкл вирусной суспензии с равным объёмом стерильной бидистиллированной воды. В качестве положительного контроля использовали донорский иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России (Томск). Исходный препарат иммуноглобулина разбавляли стерильной бидистиллированной водой до рабочей концентрации 1 мг/мл. Смеси инкубировали при 37 °С в течение 30 мин и затем определяли концентрацию инфекционного ВКЭ в каждом образце методом бляшкообразования. Вирулицидную активность оценивали как разницу титров ВКЭ (в логарифмическом выражении) в референс-образце и в образце, обработанном исследуемым экстрактом.

Оценка цитотоксического действия. Для каждого экстракта приготавливали серийные двукратные разведения от 2 до 0,015 мг/мл в лунках 96-луночной планшеты в среде RPMI 1640. Затем в каждую лунку добавляли равный объём среды RPMI 1640, содержащей 10000 клеток СПЭВ. Рабочая концентрация экстрактов составляла, таким образом, от 1 до 0,0075 мг/мл, концентрация сыворотки соответствовала среде поддержки (2 %). В качестве референс-образца использовали серийные разведения стерильного фосфатно-солевого буфера. Планшеты инкубировали при 37 °С в атмосфере 5%-го CO₂ в течение 3 суток. После этого культуральную среду со всех лунок удаляли. На монослои клеток наносили 100 мкл чистой среды поддержки с 2%-й ЭТС и инкубировали 4 часа при 37 °С в атмосфере 5%-го CO₂, после чего определяли количество выживших клеток. Цитотоксическое действие выражали в виде 50%-й цитотоксической концентрации экстракта (CC50) – концентрации, при которой погибает 50 % клеток СПЭВ. Расчёт выполняли по методу Рида – Менча [17].

Определение вирусингибирующей активности. Для каждого экстракта приготавливали серийные двукратные разведения от 2 до 0,015 мг/мл в лунках 96-луночной планшеты в среде RPMI 1640. Затем в каждую экспериментальную лунку вносили 5 мкл суспензии ВКЭ в количестве 50000 БОЕ и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Далее в каждую экспериментальную лунку вносили равный объём среды RPMI 1640, содержащей 10000 клеток СПЭВ. Рабочая концентрация экстрактов составляла, таким образом, от 1 до 0,0075 мг/мл, концентрация ЭТС соответствовала среде поддержки (2 %). В качестве референс-образца использовали 4 лунки, содержащие серийные разведения стерильного фосфатно-солевого буфера и 5 мкл суспензии ВКЭ в количестве 50000 БОЕ, в качестве отрицательного контроля – 4 лунки, содержащие серийные разведения стерильного фосфатно-солевого буфера и 5 мкл чистой среды. Планшеты инкубировали при 37 °С в атмосфере 5%-го CO₂ в течение 3 суток. После этого культуральную среду со всех лунок собирали и замораживали при –80 °С для последующего определения инфекцион-

ности ВКЭ. Концентрацию инфекционного ВКЭ определяли титрованием БОЕ. Титрование выполняли в 2–4 технических повторях. Вирусингибирующее действие экстрактов выражали в виде 50%-й эффективной концентрации (EC50) – концентрации, при которой концентрация БОЕ ВКЭ снижается на 50 % по сравнению с референс-образцами. Расчёт EC50 выполняли по методу Рида – Менча [17].

Определение количества выживших клеток. Количество выживших клеток определяли с использованием рутинного метода окраски кристаллическим фиолетовым. После инкубирования среду поддержки удаляли, монослои клеток промывали однократно стерильным фосфатно-солевым буфером и фиксировали формолом (10%-й раствор формалина в ФСБ; pH = 7,4). Фиксированные монослои окрашивали 0,05%-м водным раствором кристаллического фиолетового в течение 30 мин, инкубировали со 100 мкл метанола в течение 10 мин и оценивали количество выживших клеток спектрофотометрическим способом при длине волны 590 нм.

Обработка результатов и представление данных. Для каждого экстракта и контрольных образцов проводили три независимых биологических повтора эксперимента, результаты представляли в виде среднего значения трёх наблюдений. Для оценки внутригрупповой вариабельности результатов рассчитывали стандартное отклонение. Статистическую значимость снижения концентрации ВКЭ по сравнению с референс-образцом оценивали с помощью непарного одностороннего U-теста Манна – Уитни. Снижение концентрации считали статистически значимым при $p < 0,05$. Обработку результатов производили с помощью программы MS Office Excel (Microsoft Corp., США). Исследования проводились в лаборатории трансмиссивных инфекций, лицензированной для работ с возбудителями инфекционных заболеваний II–IV группы патогенности, на базе ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (Иркутск).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе в растворенном виде получены пять экстрактов мицелия *I. rheades* (табл. 1). Содержание сухих веществ в экстрактах варьировало от 2,5 до 6 мг/мл. Отмечено, что в экстрактах мицелия, выращенного при стимуляции синим светом, концентрация сухих веществ на 30–40 % выше, чем в соответствующих образцах, выращенных в темноте.

Определение прямого вирулицидного действия

При инкубации с экстрактом ВР5 (берёза, синий свет) в концентрации 1 мг/мл проявляется выраженное вирулицидное действие (разница титров – 3,9; $p = 0,0248$), что соответствует полученным ранее результатам [12]. Для экстрактов ВР9 (сосна, темнота) и ВР11 (пихта, темнота) вирулицидного действия не обнаружено. Экстракты ВР10 и ВР12 (синий свет, сосна и пихта соответственно) не вызывали статистически значимого снижения концентрации инфекционного ВКЭ ($p = 0,2563$), однако для обоих экстрактов воспроизводимо отмечались признаки слабого вирулицидного действия (разница титров – 0,3–0,4; рис. 1).

ТАБЛИЦА 1
ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСТРАКТОВ *I. RHEADES*
ИЗ МИЦЕЛИЯ, ВЫРАЩЕННОГО НА РАЗНЫХ СУБСТРАТАХ

Экстракт	Субстрат	Освещение	Концентрация, мг/мл	Объём экстракта, мл
BP5	берёза	синий свет	6	8
BP9	сосна	темнота	2,5	9
BP10	сосна	синий свет	4	11
BP11	пихта	темнота	4	4,5
BP12	пихта	синий свет	6	7

TABLE 1
CHARACTERISTICS OF EXTRACTS OF *I. RHEADES*
MYCELIUM GROWN ON DIFFERENT SUBSTRATES

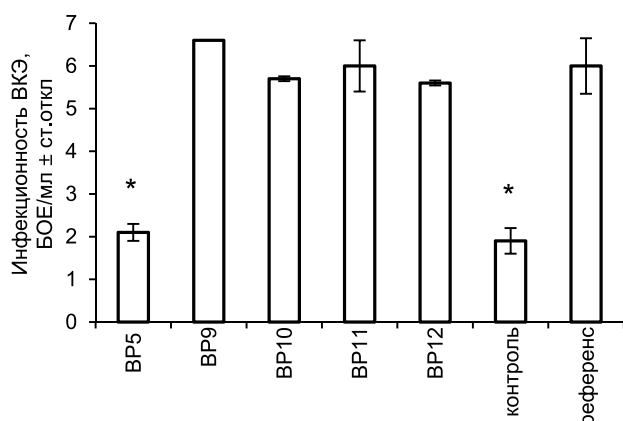


РИС. 1.
Вирулицидное действие экстрактов *Inonotus rheades*, выращенных на разных субстратах и в разных условиях освещения: BP5 – экстракт *I. rheades*, выращенный на древесине берёзы при освещении синим светом; BP9 и BP10 – экстракты *I. rheades*, выращенные на древесине сосны в темноте и при освещении синим светом соответственно; BP11 и BP12 – экстракты *I. rheades*, выращенные на древесине пихты в темноте и при освещении синим светом соответственно; «контроль» – иммуноглобулин человека против КЭ; «референс» – фосфатно-солевой буфер (pH = 7,4). Остаточную инфекционную активность ВКЭ определяли методом бляшкообразования (БОЕ) и выражали в виде lg БОЕ/мл. Вирулицидное действие определяли по снижению инфекционной активности в сравнении с референс-образцом. * – выявлены статистически значимые отличия от референс-образца ($p < 0,05$)

FIG. 1.
Virucidal action of the extracts of *Inonotus rheades* grown on different substrates and under different light conditions. BP5 – extract of *I. rheades* grown on birch wood under blue light; BP9 and BP10 – extracts of *I. rheades* grown on pine wood in the dark and under blue light respectively; BP11 and BP12 – extracts of *I. rheades* grown on fir wood in the dark and under blue light respectively; “control” – human immunoglobulin against TBE; “reference” – phosphate-buffered saline (pH = 7.4). Residual infectious activity of TBEV was determined by the plaque forming units (PFU) assay and expressed as lg PFU/ml. The virucidal effect was determined by the decrease in infectious activity in comparison to the reference sample. * – statistically significant differences from the reference sample were detected ($p < 0.05$)

Оценка цитотоксического действия.

Наиболее токсичным для клеток СПЭВ оказался экстракт BP5, наименее токсичным – BP12, который не проявлял угнетающего действия на рост клеток. Экстракты BP9, BP10 и BP11 обладали умеренной или низкой цитотоксичностью (табл. 2).

Таким образом, наиболее токсичным для культуры клеток млекопитающих оказался экстракт мицелия, выращенного на древесине берёзы. Экстракты мицелия, выращенного на древесине сосны, обладали умеренной и низкой цитотоксичностью, а при выращивании мицелия на древесине пихты получались наименее токсичные экстракты.

Определение вирусингибирующей активности

При инкубации заражённых клеток в присутствии экстрактов два экстракта – BP5 и BP10 – проявляли выраженное ингибирующее действие на инфекционный процесс ВКЭ в культуре клеток млекопитающих в концентрациях 0,18 и 0,28 мг/мл соответственно (табл. 2). Это проявлялось в существенном снижении вирусных титров после 3 дней инкубации заражённых клеток в среде, содержащей экстракты в концентрациях 0,125, 0,25, 0,5 и 1 мг/мл (рис. 2). Ингибирующее действие имело значимую сильную прямую зависимость от концентрации экстрактов ($R^2 = 0,908$ и $R^2 = 0,898$ соответственно). Для экстрактов BP9, BP11 и BP12 статистически значимых признаков ингибирующего действия на вирусную инфекцию при совместной инкубации в течение 3 суток не наблюдалось (рис. 2).

В полном соответствии с ранее полученными результатами [11, 12] экстракт BP5, выращенный на древесине берёзы в условиях освещения синим светом, проявляет выраженные вирулицидные и вирусингибирующие свойства, однако также является наиболее токсичным для клеток млекопитающих. Действительно, концентрация экстракта, необходимая для снижения концентрации инфекционного ВКЭ на 50 %, в 6 раз выше, чем концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток (табл. 2). Это, на первый взгляд, делает бесперспективным использование данного экстракта в качестве основы для разработки лекарственных средств. Однако необходимо принимать во внимание, что экстракт мицелия является многокомпонентной смесью большого количества химических веществ и соединений. При этом на насто-

ТАБЛИЦА 2
БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ *I. RHEADES*

TABLE 2
BIOLOGICAL ACTIVITY OF *I. RHEADES* EXTRACTS

Экстракт	CC50, мг/мл (M ± ст. откл.)	Относительная цитотоксичность	EC50, мг/мл (M ± ст. откл.)
BP5	0,03 ± 0,002	высокая	0,18 ± 0,14
BP9	0,58 ± 0,09	низкая	Не обнаружено
BP10	0,31 ± 0,16	умеренная	0,28±0,06
BP11	0,64 ± 0,3	низкая	Не обнаружено
BP12	0,7 ± 0,06	низкая	Не обнаружено

Примечание. CC50 – концентрация экстракта, при которой погибает 50 % незаражённых клеток; EC50 – концентрация экстракта, при которой титр вируса в культуральной среде снижается на 50 % по сравнению с необработанными клетками.

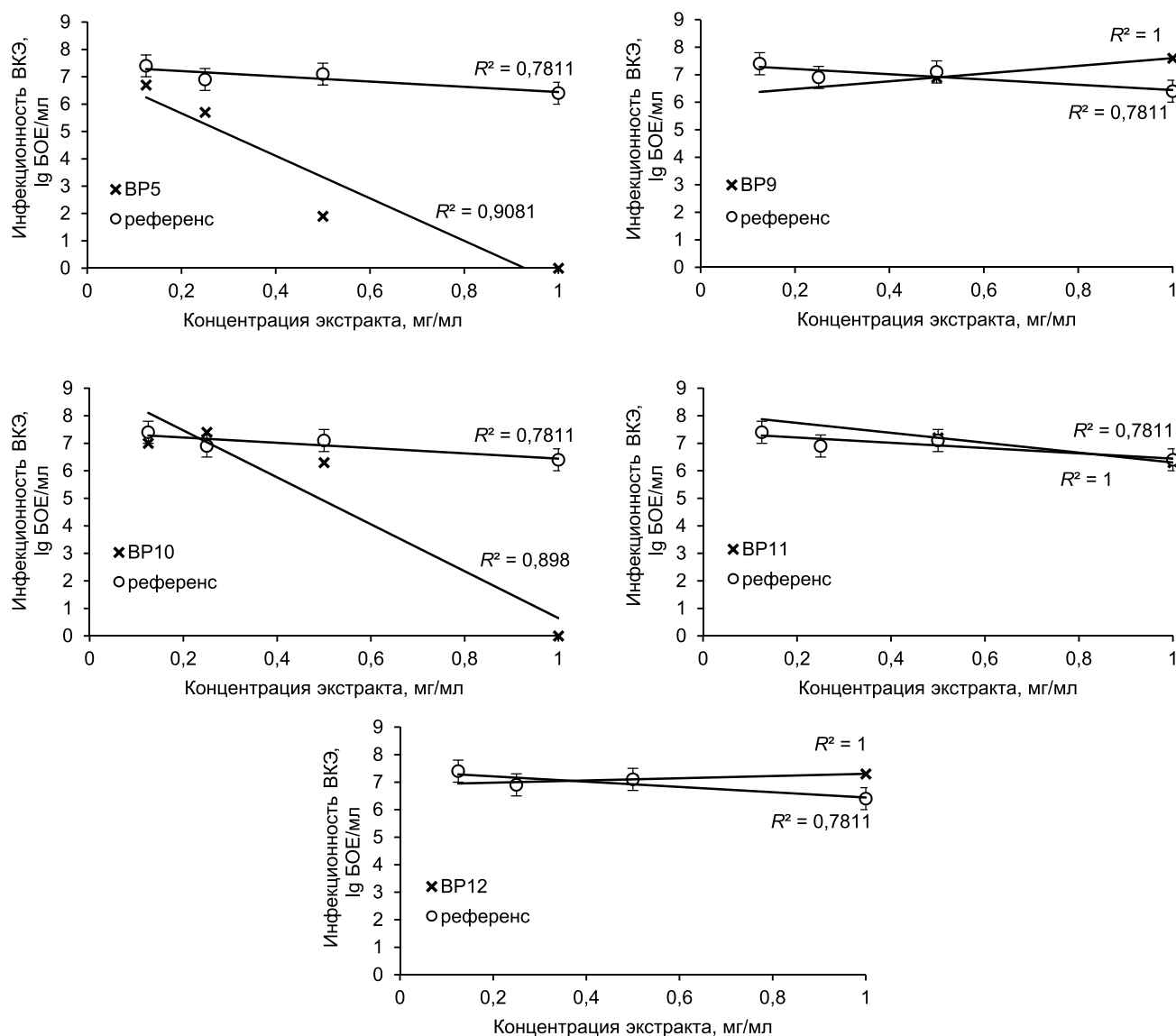


РИС. 2.
Изменение инфекционной активности ВКЭ в клеточной культуре при инкубировании в присутствии экстрактов BP5, BP9, BP10, BP11 и BP12 в концентрациях 0,125, 0,25, 0,5 и 1 мг/мл. Активность вируса измеряли титрованием БОЕ через 3 суток после заражения. Референт-образец инкубировали в течение 3 суток в присутствии стерильного фосфатно-солевого буфера. Планки погрешностей отображают стандартное отклонение средних значений титров ВКЭ

FIG. 2.
Change in TBEV infectivity in cell culture upon incubation in the presence of BP5, BP9, BP10, BP11 and BP12 extracts at concentrations of 0.125, 0.25, 0.5 and 1 mg/ml. The infectivity of the virus was measured by PFU titration 3 days after infection. The reference sample was incubated for 3 days in the presence of sterile phosphate-buffered saline. Error bars display the standard deviation of the mean values of TBEV titers

ящий момент неизвестно ни то, какие из компонентов экстракта являются токсичными для клеток, ни то, какие компоненты обуславливают противовирусную активность ВР5. Гипотетически нельзя исключить вероятность того, что эти свойства – цитотоксичность и вирулицидность – обусловлены разными веществами, соединениями или комбинацией веществ, входящих в состав экстракта. В этом случае очищенные и сконцентрированные компоненты, обладающие противовирусными свойствами, могут быть менее токсичны для клеток млекопитающих, чем цельный экстракт. Для проверки этого предположения требуется прежде всего провести химическое фракционирование экстракта, идентификацию индивидуальных его компонентов и исследовать их биологические свойства *in vitro*.

Экстракты ВР9 и ВР10 из мицелия, выращенного на древесине сосны, не проявляют существенного вирулицидного действия. Однако оба «сосновых» экстракта малотоксичны для клеток, а также обладают выраженными протективными свойствами, увеличивая выживаемость заражённых клеток в течение 3 суток более чем на 50 % в минимальной концентрации 0,1 мг/мл. Более того, при индукции синим светом (ВР10) в «сосновом» экстракте появлялись вещества, обеспечивающие ингибирование вирусной инфекции в заражённых клетках при их культивировании в присутствии экстракта. Экстракт ВР10 не проявляет прямого вирулицидного действия на ВКЭ при внеклеточном воздействии (рис. 1), но при инкубации заражённых клеток в присутствии этого экстракта отмечено снижение концентрации инфекционного вируса в культуральной жидкости (рис. 2). С учётом низкой цитотоксической активности ВР10 объяснить это снижение можно, по нашему мнению, только влиянием экстракта на внутриклеточные процессы вирусной репликации, что, возможно, и приводит к снижению продукции инфекционного ВКЭ.

Влияние света на метаболизм и содержание различных веществ у грибов является известным фактом [18, 19]. У *I. rheades* также обнаружена зависимость химического состава мицелия от длины волны света при росте. Так, ранее нами было обнаружено влияние освещения на жирнокислотный состав мицелия [20], а также увеличение содержания стирилпиранов при освещении мицелия синим светом [21].

Экстракты мицелия, выращенного на древесине пихты, ВР11 и ВР12 обладают самой низкой биологической активностью. Оба экстракта нетоксичны для клеток млекопитающих, не имеют вирулицидных или вирусингибирующих свойств, обладают умеренным защитным действием, увеличивая выживаемость заражённых клеток в течение 3 суток более чем на 50 % в минимальной концентрации более 0,22 мг/мл. В отличие от роста на субстрате из древесины сосны, при культивировании на древесине пихты облучение мицелия синим светом не изменяет противовирусные свойства экстракта настолько, чтобы их удалось зарегистрировать.

Безусловно, для оценки терапевтического потенциала и возможности применения результатов исследования в клинической практике требуется проведение зна-

чительного объёма дополнительных исследований, прежде всего определение конкретных соединений в составе экстракта, обладающих противовирусной активностью в отношении ВКЭ, установление механизма их действия. Кроме того, необходима индивидуальная оценка токсичности этих соединений для культур клеток организма человека, а также для лабораторных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мицелий гриба *I. rheades* способен при росте образовывать водорастворимые вещества, обладающие выраженной противовирусной активностью. Субстрат выращивания мицелия играет определяющую роль в образовании этих веществ. Полученные данные позволяют предположить, что многокомпонентный состав, а следовательно, и механизмы противовирусного действия экстрактов обусловлены видовой принадлежностью древесного субстрата. Кроме того, необходимым, но не полностью определяющим, условием образования активных веществ *I. rheades* является облучение мицелия синим светом в процессе культивирования. Более перспективными источниками новых лекарственных средств в отношении ВКЭ могут быть экстракты мицелия *I. rheades* выращенного на субстратах древесины берёзы и сосны, для чего необходимо проведение углублённых исследований компонентного состава этих экстрактов.

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Иркутской области в рамках научного проекта № 20-44-380010.

Выражение признательности

В работе использовано оборудование ЦКП «Бионалитика».

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козлова И.В., Ткачев С.Е., Савинова Ю.С., Демина Т.В., Дорошенко Е.К., Лисак О.В., и др. Особенности экологии вируса клещевого энцефалита европейского субтипа на территории Сибири. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 16-1(92): 22-25. doi: 10.31631/2073-3046-2017-16-1-22-25
2. Аитов К.А., Бурданова Т.М., Верхозина М.М., Демина Т.В., Джигоев Ю.П., Козлова И.В., и др. Клещевой энцефалит в Восточной Сибири: этиология, молекулярная эпидемиология, особенности клинического течения. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2018; 7-3(26): 31-40. doi: 10.24411/2305-3496-2018-13005
3. Zhong X, Ren K, Lu S, Yang S, Sun D. Progress of research on *Inonotus obliquus*. *Chin J Integr Med*. 2009; 15(2): 156-160. doi: 10.1007/s11655-009-0156-2

4. Филиппова Е.И., Мазуркова Н.А., Кабанов А.С., Теплякова Т.В., Ибрагимова Ж.Б., Макаревич Е.В., и др. Противовирусные свойства водных экстрактов, выделенных из высших базидиомицетов, в отношении пандемического вируса гриппа А(H1N1)2009. *Научное обозрение. Биологические науки*. 2014; 1: 129-130.

5. Гашникова Н.М., Косогова Т.А., Пучкова Л.И., Балахнин С.М., Теплякова Т.В. Противовирусная активность экстрактов из базидиальных грибов в отношении вируса иммунодефицита человека. *Наука и современность*. 2011; 12-1: 12-18.

6. Шибнев В.А., Гараев Т.М., Финогенов М.П., Калнина Л.Б., Носик Д.Н. Противовирусное действие водных экстрактов березового гриба *Inonotus obliquus* на вирус иммунодефицита человека. *Вопросы вирусологии*. 2015; 2: 37-40.

7. Pan HH, Yu XT, Li T, Wu HL, Jiao CW, Cai MH, et al. Aqueous extract from a Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (higher basidiomycetes), prevents herpes simplex virus entry through inhibition of viral-induced membrane fusion. *Int J Med Mushrooms*. 2013; 15(1): 29-38. doi: 10.1615/IntJMedMushr.v15.i1.40

8. Теплякова Т.В., Булычев Л.Е., Косогова Т.А., Ибрагимова Ж.Б., Юрганова И.А., Кабанов А.С., и др. Противовирусная активность экстрактов из базидиальных грибов в отношении ортопоксвирусов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012; 3(113): 99-101. doi: 10.21055/0370-1069-2012-3-99-101

9. Разумов И.А., Казачинская Е.И., Пучкова Л.И., Косогова Т.А., Горбунова И.А., Локтев В.Б., и др. Протективная активность водных экстрактов из высших грибов при экспериментальной герпесвирусной инфекции у белых мышей. *Антибиотики и химиотерапия*. 2013; 58(9-10): 8-12.

10. Горностай Т.Г., Хаснатинов М.А., Соловаров И.С., Данчинова Г.А., Боровский Г.Б. Противовирусные свойства водных экстрактов мицелия *Inonotus rheades* в отношении вируса клещевого энцефалита *in vitro*. *Актуальные проблемы науки Прибайкалья*. 2020; 3: 21-25.

11. Боровский Г.Б., Горностай Т.Г., Полякова М.С., Боровская М.К., Хаснатинов М.А., Соловаров И.С., и др. Влияние синего света при культивировании мицелия *Inonotus rheades* на биологические свойства водных экстрактов. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021; 11(1): 80-89.

12. Хаснатинов М.А., Горностай Т.Г., Соловаров И.С., Полякова М.С., Данчинова Г.А., Боровский Г.Б. Противовирусные свойства водных экстрактов мицелия *Inonotus rheades* (Pers.) P. Karst. (1882) в отношении вируса клещевого энцефалита *in vitro* определяются субстратом выращивания. *Acta biomedica scientifica*. 2021; 6(1): 55-59. doi: 10.29413/ABS.2021-6.1.8

13. Горбылева Е.Л., Боровский Г.Б. Биостимуляторы роста и устойчивости растений терпеноидной природы и другие биологически активные соединения, полученные из хвойных пород. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2018; 8(4): 32-41. doi: 10.21285/2227-2925-2018-8-4-32-41

14. Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Пучкова Т.А., Смирнов Д.А., Поединок Н.Л. Влияние условий глубинного культивирования лекарственного гриба *Ganoderma lucidum* (Рейши) на образование полисахаридов. *Биотехнология*. 2007; 6: 34-41.

15. Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Злобин В.И., Ляпунов А.В., Арбатская Е.В., Чапоргина Е.А., и др. Вирус клещевого энцефалита в Монголии. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2012; 111(4): 9-12.

16. Gould EA, Clegg JCS. Growth, titration and purification of togaviruses. In: Mahy BWJ (ed.). *Virology: A practical approach*. 1985: 43-48.

17. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg*. 1938; 27: 493-497. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408

18. Tisch D, Schmolli M. Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010; 85: 1259-1277. doi: 10.1007/s00253-009-2320-1

19. Nakano Y, Fujii H, Kojima M. Identification of blue-light photoresponse genes in Oyster Mushroom mycelia. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010; 74(10): 2160-2165. doi: 10.1271/bbb.100565

20. Горностай Т.Г., Полякова М.С., Боровский Г.Б., Оленников Д.Н. Липиды *Inonotus rheades* (Hymenochaetaceae): влияние субстрата и светового режима на жирнокислотный профиль мицелия. *Химия растительного сырья*. 2018; 1: 105-111. doi: 10.14258/jcprm.2018012713

21. Gornostai TG, Borovskii GG, Kashchenko NI, Olennikov DN. Phenolic compounds of *Inonotus rheades* (Agaricomycetes) mycelium: RP-UPLC-DAD-ESI/MS profile and effect of light wavelength on the styrylpyrone content. *Int J Med Mushrooms*. 2018; 20(7): 637-645. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.2018026595

REFERENCES

1. Kozlova IV, Tkachev SE, Savinova YuS, Demina TV, Doroshchenko EK, Lisak OV, et al. Features of tick-borne encephalitis virus of European subtype in Siberia. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2017; 16-1(92): 22-25. (In Russ.). doi: 10.31631/2073-3046-2017-16-1-22-25

2. Aitov KA, Burdanova TM, Verkhovina MM, Demina TV, Dzhiyoev YuP, Kozlova IV, et al. Tick-borne encephalitis in Eastern Siberia: Etiology, molecular epidemiology and peculiarities of the clinical course. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2018; 7-3(26): 31-40. (In Russ.). doi: 10.24411/2305-3496-2018-13005

3. Zhong X, Ren K, Lu S, Yang S, Sun D. Progress of research on *Inonotus obliquus*. *Chin J Integr Med*. 2009; 15(2): 156-160. doi: 10.1007/s11655-009-0156-2

4. Filippova EI, Mazurkova NA, Kabanov AS, Teplyakova TV, Ibragimova ZhB, Makarevich EV, et al. Antiviral properties of aqueous extracts isolated from higher basidiomycetes as respect to pandemic influenza virus A(H1N1)2009. *Scientific Review. Biological Science*. 2014; 1: 129-130. (In Russ.).

5. Gashnikova NM, Kosogova TA, Puchkova LI, Balakhnin SM, Teplyakova TV. Antiviral activity of extracts from basidiomycetes against human immunodeficiency virus. *Nauka i sovremennost'*. 2011; 12-1: 12-18. (In Russ.).

6. Shibnev VA, Garaev TM, Finogenov MP, Kalnina LB, Nosik DN. Antiviral activity of aqueous extracts of the birch fungus *Inonotus obliquus* on the human immunodeficiency virus. *Problems of Virology*. 2015; 2: 37-40. (In Russ.).

7. Pan HH, Yu XT, Li T, Wu HL, Jiao CW, Cai MH, et al. Aqueous extract from a Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (higher basidiomycetes), prevents herpes simplex virus entry through inhibition of viral-induced membrane fusion. *Int J Med Mushrooms*. 2013; 15(1): 29-38. doi: 10.1615/IntJMedMushr.v15.i1.40

8. Teplyakova TV, Bulychev LE, Kosogova TA, Ibragimova ZhB, Yurganova IA, Kabanov AS, et al. Antiviral activity of extracts from basidiomycetes for orthopoxviruses. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2012; 3(113): 99-101. (In Russ.). doi: 10.21055/0370-1069-2012-3-99-101
9. Razumov IA, Kazachinskaya EI, Puchkova LI, Kosogova TA, Gorbunova IA, Loktev VB, et al. Protective activity of aqueous extracts from higher mushrooms against Herpes simplex virus type 2 on albino mice model. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2013; 58(9-10): 8-12. (In Russ.).
10. Gornostai TG, Khasnatinov MA, Solovarov IS, Danchinova GA, Borovsky GB. Antiviral properties of aqueous extracts of *Inonotus rheades* mycelium against tick-borne encephalitis virus in vitro. *Aktual'nye problemy nauki Pribaykal'ya*. 2020; 3: 21-25. (In Russ.).
11. Borovskii GB, Gornostai TG, Polyakova MS, Borovskaja MK, Khasnatinov MA, Solovarov IS, et al. Impact of blue light on the biological properties of aqueous extracts during the cultivation of the *Inonotus rheades* mycelium. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021; 11(1): 80-89. (In Russ.).
12. Khasnatinov MA, Gornostai TG, Solovarov IS, Polyakova MS, Danchinova GA, Borovskii GV. Antiviral properties of water extracts of mycelium of *Inonotus rheades* (Pers.) P. Karst. (1882) against the virus of tick-borne encephalitis virus *in vitro*. *Acta biomedica scientifica*. 2021; 6(1): 55-59. (In Russ.). doi: 10.29413/ABS.2021-6.1.8
13. Gorbyleva EL, Borovskii GB. Growth and stability biostimulators for plants containing terpenoids and other biologically-active compounds. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2018; 8(4): 32-41. (In Russ.). doi: 10.21285/2227-2925-2018-8-4-32-41
14. Babitskaya VG, Shcherba VV, Puchkova TA, Smirnov DA, Poedinok NL. Effect of conditions of submerged culturing of a medicinal fungus *Ganoderma Lucidum* (reishi) on polysaccharide production. *Biotechnology in Russia*. 2007; 6: 34-41. (In Russ.).
15. Khasnatinov MA, Danchinova GA, Zlobin VI, Lyapunov AV, Arbatskaya EV, Chaporgina EA, et al. Tick-borne encephalitis virus in Mongolia. *Siberian Medical Journal (Irkutsk)*. 2012; 111(4): 9-12. (In Russ.).
16. Gould EA, Clegg JCS. Growth, titration and purification of togaviruses. In: Mahy BWJ (ed.). *Virology: A practical approach*. 1985: 43-48.
17. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg*. 1938; 27: 493-497. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
18. Tisch D, Schmoll M. Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010; 85: 1259-1277. doi: 10.1007/s00253-009-2320-1
19. Nakano Y, Fujii H, Kojima M. Identification of blue-light photoreponse genes in Oyster Mushroom mycelia. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010; 74(10): 2160-2165. doi: 10.1271/bbb.100565
20. Gornostai TG, Poliakova MS, Borovskii GB, Olenikov DN. Lipids of *Inonotus rheades* (Hymenochaetaceae): Influence of substrate and light mode on fatty acid profile of mycelium. *Khimiya rastitel'nogo syr'ja*. 2018; 1: 105-111. (In Russ.). doi: 10.14258/jcprm.2018012713
21. Gornostai TG, Borovskii GG, Kashchenko NI, Olenikov DN. Phenolic compounds of *Inonotus rheades* (*Agaricomycetes*) mycelium: RP-UPLC-DAD-ESI/MS profile and effect of light wavelength on the styrylpyrone content. *Int J Med Mushrooms*. 2018; 20(7): 637-645. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.2018026595

Сведения об авторах

Хаснатинов Максим Анатольевич – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: khasnatinov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8441-3640>

Горностай Татьяна Геннадьевна – кандидат фармацевтических наук, научный сотрудник лаборатории физиологической генетики, ФГБНУ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, e-mail: t.g.gornostay@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1120-2148>

Соловаров Иннокентий Сергеевич – младший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: keschass@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9936-5330>

Полякова Марина Станиславовна – ведущий инженер лаборатории физиологической генетики, ФГБНУ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, e-mail: poljakova.m@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4125-0212>

Данчинова Галина Анатольевна – доктор биологических наук, руководитель лаборатории трансмиссивных инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: dan-chin@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6705-3070>

Боровский Геннадий Борисович – доктор биологических наук, профессор; главный научный сотрудник лаборатории физиологической генетики, ФГБНУ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5089-5311>

Information about the authors

Maxim A. Khasnatinov – Dr. Sc. (Biol.), Leading Researcher at the Laboratory of Transmissible Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: khasnatinov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8441-3640>

Tatyana G. Gornostai – Cand. Sc. (Pharm.), Research Officer at the Laboratory of Physiological Genetics, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, e-mail: t.g.gornostay@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1120-2148>

Innokentii S. Solovarov – Junior Research Officer at the Laboratory of Transmissible Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: keschass@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9936-5330>

Marina S. Polyakova – Leading Engineer at the Laboratory of Physiological Genetics, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, e-mail: poljakova.m@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4125-0212>

Galina A. Danchinova – Dr. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory of Arthropod-Borne Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: dan-chin@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6705-3070>

Gennadii B. Borovskii – Dr. Sc. (Biol.), Professor, Chief Research Officer at the Laboratory of Physiological Genetics, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5089-5311>