Grzyby kapeluszowe jako źródło substancji o aktywności przeciwwirusowej

MARTYNA KANDEFER-SZERSZEŃ, ZBIGNIEW KAWECKI,
BOGUSŁAW SALATA, MARIA WITEK

Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Zakład Botaniki Ogólnej
Uniwersytetu im. Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Kandefer-Szerszeń M., Kaweckie Z., Salata B., Witek M.:
(Department of Applied Microbiology, Department of General Botany Maria
Curie-Skłodowska University, 20-033 Lublin, Akademicka 19, Poland). *Mush-
rooms as a source of substances with antiviral activity*. Acta Mycol. 16(2):
215-220, 1980.

Water extracts the fructifications of 56 species of fungi were examined
as a source of antiviral substances with activity against VS and vaccinia
viruses. Extracts from 16 fungal species exhibited the antiviral activity.
Water extracts from *Boletus edulis* active against vaccinia virus and extract
from *Armillariella mellea* active against VS virus are particularly worth
nothing. Both of them in applied concentrations were not toxic in chick
embryo fibroblasts tissue culture.

WSTĘP

Wiele substancji stanowiących produkty metabolizmu *Basidiomycetes*
posiada aktywność biologiczną. Znanych jest szereg substancji przeciw-
nowotworowych pochodzących z *Irpex flavus*, *Poria corticola*, *Hericium
erinaceum*, *Tricholoma panaeolum* (Gregory i in. 1960), czy *Lentinus
edodes*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pholiota nameko* i
Tricholoma matsutake (Ikegawa i in. 1969). Produkty podstawczaków
wykazują również działanie przeciwwirusowe: szereg z nich inaktywuje
wirusy roślinne (Kadela i in. 1976; Signoret, Alliot 1969;
Utech, Johnson 1950), inne z kolei, jak produkty *Piptoporus
betulinus*, inaktywują wirusy zwierzęce (Kandefer-Szerszeń,
Kaweckie 1974), a jeszcze inne hamują replikację wirusów zwierzę-
cych (Chardonnet i in. 1972; Kandefer-Szerszeń, Ka-
wecki 1974). W tej pracy przedstawiono wyniki screeningowych ba-
dań grzybów kapeluszowych pod względem zawartości substancji prze-
ciwwirusowych.

MATERIAŁ I METODY

Badano owocniki 56 gatunków grzybów zebranych w 1975 r. w okolicy Lublina (tab. 1). Świeże, oczyszczone owocniki grzybów przechowywano w temperaturze -20°C .

Do badań użyto wirus krowianki, szczep izolowany ze szczepionki przeciwospowej w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej UMCS. Miano wirusa krowianki określone w hodowli fibroblastów zarodka kury wynosiło $10^{5.3}$ PFU/ml. Wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VS), szczep Indiana, otrzymano z ITD we Wrocławiu. Miano wirusa określone w hodowli fibroblastów zarodka kury wynosiło $10^{6.2}$ TCID₅₀/ml. Wirusy namnażano w hodowli fibroblastów zarodka kury i przechowywano w -20°C . Pierwotną hodowlę fibroblastów zarodka kury (FZK) przygotowywano metodą standardową z 9-dniowych zarodków kurzych. Do hodowli używano płynu Parkera z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej. Roztwór trypsyny, płyn Parkera i surowicę bydlęcą otrzymano z Lubelskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek.

Tabela 1—Table 1

Toksyczność i przeciwwirusowa aktywność ekstraktów wodnych z grzybów w hodowli tkankowej fibroblastów zarodka kury

The toxicity and antiviral activity of fungal water extracts in the chick embryo fibroblast tissue culture

Grzyb Fungus	Strefa toksyczności w mm Toxic zone in mm	Strefa zahamowania w mm Inhibition zone in mm	
		wirus — virus	
		VS	krowianki (Vaccinia)
<i>Amanita rubescens</i> (Pers. ex Fr.) S.F. Gray	18	—	—
<i>A. phalloides</i> (Vaill. ex Fr.) Secr.	30	—	—
<i>A. muscaria</i> (L. ex Fr.) Pers. ex Hooker	18	—	—
<i>A. citrina</i> (Schaeff. ex) S.F. Gray	26	—	—
<i>A. pantherina</i> (DC. ex Fr.) Kummer	—	—	+/-
<i>A. spissa</i> (Fr.) Kummer	—	+/-	—
<i>A. fulva</i> (Schaeff. ex) Pers.	19	—	—
<i>A. vaginata</i> (Bull. ex Fr.) Vitt.	22	—	—
<i>Armillariella mellea</i> (Vahl. ex Fr.) Karst.	—	21	—
<i>Boletus edulis</i> Bull. ex Fr.	—	—	25
<i>Cantharellus cibarius</i> Fr.	—	—	+/-
<i>Collybia dryophila</i> (Bull. ex Fr.) Kummer	18	20	20
<i>C. butyracea</i> (Bull. ex Fr.) Quél.	16	23	—
<i>C. distorta</i> (Fr.) Quél.	16	—	—
<i>C. peronata</i> (Bolt. ex Fr.) Kummer	—	—	—

<i>Clitocybe odora</i> (Bull. ex Fr.) Kummer	16	—	—
<i>C. flaccida</i> (Sov. ex Fr.) Kummer	26	—	—
<i>C. nebularis</i> (Batsch ex Fr.) Kummer	16	+/-	+/-
<i>C. discolor</i> (Pers.) Lge.	25	—	—
<i>C. gibba</i> (Pers. ex Fr.) Kummer	32	—	—
<i>C. vibecina</i> (Fr.) Quéf.	—	—	—
<i>C. cerussata</i> (Fr.) Kummer	25	—	—
<i>C. tuba</i> (Fr.) Gillet	30	—	—
<i>Craterellus cornucopioides</i> (L. ex Fr.) Pers.	25	—	—
<i>Cystoderma amianthinum</i> (Scop. ex Fr.) Fayod	12	+/-	—
<i>C. carcharias</i> (Pers. ex Secr.) Fayod	—	—	—
<i>Gymnopilus penetrans</i> (Fr. ex Fr.) Murr.	17	—	23
<i>Hygrophorus eburneus</i> (Bull. ex Fr.) Fr.	—	—	—
<i>Lactarius volemus</i> (Fr.) Fr.	—	+/-	+/-
<i>L. necator</i> (Bull. em. Pers. ex Fr.) Karst.	20	25	+/-
<i>L. piperatus</i> (L. ex Fr.) S.F. Gray	—	—	—
<i>L. mitissimus</i> Fr.	—	—	+/-
<i>Leccinum griseum</i> (Quéf.) Sing.	—	—	—
<i>L. aurantiacum</i> (Bull. ex St.-Am.) S.F. Gray	—	+/-	—
<i>Lepista gilva</i> (Pers. ex Fr.) Roze	35	—	—
<i>L. inversa</i> (Scop. ex Fr.) Pat.	37	—	—
<i>L. nuda</i> (Bull. ex Fr.) Cooke	19	—	—
<i>Lycoperdon perlatum</i> Pers. ex Pers.	18	—	—
<i>Marasmius oreades</i> (Bolt. ex Fr.) Fr.	—	+/-	+/-
<i>Macrolepiota procera</i> (Scop. ex Fr.) Sing.	18	—	21
<i>Mycena zephirus</i> (Fr. ex Fr.) Kummer	16	—	+/-
<i>Mycena pura</i> (Pers. ex Fr.) Kummer	—	+/-	+/-
<i>Naematoloma capnoides</i> (Fr.) Karst.	17	—	—
<i>Naematoloma fasciculare</i> (Huds. ex Fr.) Karst.	16	18	—
<i>Paxillus involutus</i> (Batsch ex Fr.) Fr.	—	+/-	—
<i>Pholiota lenta</i> (Fr.) Sing.	14	—	—
<i>Russula cyanozantha</i> (Schaeff. ex Schw.) Fr.	—	—	—
<i>R. fellea</i> (Fr.) Fr.	14	+/-	+/-
<i>R. vesca</i> Fr.	—	—	—
<i>Ramaria apiculata</i> (Fr.) Donk	20	+/-	—
<i>Scleroderma citrinum</i> Pers.	18	—	—
<i>Suillus granulatus</i> (L. ex Fr.) O. Kuntze	—	—	—
<i>Sparassis crispa</i> (Wulf. ex Fr.)	—	—	—
<i>Suillus granulatus</i> (L. ex Fr.) O. Kuntze	—	—	—
<i>Tricholoma portentosum</i> (Fr.) Quéf.	22	—	24
<i>Tricholomopsis rutilans</i> (Schaeff. ex Fr.) Sing.	21	+/-	+/-
<i>Xerocomus chrysenteron</i> (Bull. ex St.-Am.) Quéf.	—	—	—

+/- zmniejszenie wielkości lysinek wirusa wokół cylinderka z badanym ekstraktem;
the size reduction of viral plaques around the well with fungal water extract;

— brak toksyczności lub aktywności przeciwwirusowej;
lack of toxicity or antiviral activity.

Bezpośrednio przed użyciem owocniki odmrażano i płukano w 50% etanolu w celu sterylizacji. Po odsączeniu od etanolu i przepłukaniu w wodzie destylowanej owocniki homogenizowano w jałowym płynie fizjologicznym w proporcji: 1 część wagowa mokrej masy owocników i 1 część objętościowa 0,9% roztworu NaCl. Po dokładnej homogenizacji zawiesinę wirowano przy 2000 obr/min. Do supernatantu dodawano antybiotyki: 200 j penicyliny i 200 µg streptomycyny na 1 ml ekstraktu.

Wyrośniętą 48-godzinną hodowlę tkankową FZK zakażano wirusem krowianki w dawce 400 PFU/płytkę Petriego lub VS w dawce 100 PFU/płytkę i pokrywano odżywczym podłożem agarowym (0,8% agar). W agarze wycinano studzienki i wkładano w nie cylinderki, do których wlewano po 0,3 ml badanego ekstraktu. Płytki inkubowano w zamkniętych pojemnikach z 5% CO₂ w 37°C przez 48 godz. w przypadku wirusa VS i 72 godz. w przypadku wirusa krowianki. Po upływie tego czasu na powierzchnię agaru odżywczego nanoszono drugą warstwę agaru barwiącego z dodatkiem czerwieni obojętnej i inkubowano dodatkowo 6 godz. Wyniki odczytywano mierząc strefę toksyczności wokół cylinderka i strefę zahamowania tworzenia lysin wirusów. Doświadczenia wykonano w 3 powtórzeniach.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Ekstrakty wodne z 24 gatunków grzybów okazały się toksyczne dla hodowli tkankowej FZK (tab. 1). Szczególnie wiele toksycznych ekstraktów, dających strefy toksyczności powyżej 25 mm, pochodziło z gatunków rodzaju *Amanita* i *Clitocybe*.

Aktywność przeciwwirusową określano wobec dwóch wirusów: wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV) i wirusa krowianki. Wobec wirusa VS aktywne okazały się ekstrakty z 16 gatunków grzybów. Najsilniejsze działanie, dające strefy całkowitego zahamowania tworzenia lysinek wirusa w hodowli tkankowej FZK, wykazywały ekstrakty z owocników: *Armillariella mellea*, *Collybia dryophila*, *C. butyracea*, *Lactarius necator*, *Naematoloma fasciculare*. Pozostałych 11 aktywnych ekstraktów z różnych gatunków grzybów dawało strefy zmniejszenia wielkości lysin wirusa VS wokół cylinderka z badanym ekstraktem.

Wobec wirusa krowianki aktywne były również ekstrakty z 16 gatunków grzybów. Najsilniejsze właściwości przeciwwirusowe wykazywały ekstrakty z: *Boletus edulis*, *Collybia dryophila*, *Gymnopilus penetrans*, *Macrolepota procera* i *Tricholoma portentosum*. Redukcję wielkości lysinek wirusa krowianki wokół cylinderka stwierdzono przy 11 badanych ekstraktach.

Spośród 24 ekstraktów z różnych gatunków grzybów, wykazujących aktywność przeciwwirusową, jedynie 8 było aktywnych w stosunku do obu wirusów (krowianki i VS). Na podkreślenie zasługuje fakt, że jedynie ekstrakt wodny z *Collybia dryophila* dawał strefę średnicy 20 mm całkowitego zahamowania tworzenia łysinek obu stosowanych do badań wirusów. Drugi, z aktywnych wobec obu wirusów, ekstrakt z *Lactarius necator* znacznie silniej hamował replikację wirusa VS niż wirusa krowianki. Wśród 24 aktywnych przeciwwirusowo ekstraktów 11 było nietoksycznych dla hodowli tkankowej FZK. Na uwagę zasługują ekstrakty z *Armillariella mellea*, aktywny wobec wirusa VS i z *Boletus edulis*, aktywny przeciw wirusowi krowianki. Obydwa były nietoksyczne dla hodowli tkankowej FZK.

DYSKUSJA

Wstępne, screeningowe badania substancji przeciwwirusowych z grzybów kapeluszowych metodą dyfuzji w agarze wykazały, że grzyby te mogą być źródłem substancji przeciwwirusowych.

Spośród 56 badanych ekstraktów z różnych gatunków grzybów 24 ekstrakty wykazywały słabszą lub silniejszą aktywność przeciwwirusową, wywołując całkowite zahamowanie tworzenia łysinek wirusów lub zmniejszenie wielkości łysinek wirusowych wokół cylinderka z badanym ekstraktem. Większość aktywnych ekstraktów wykazywało specyficzność przeciwwirusowego działania hamując replikację jednego z wirusów używanych do badań, krowianki lub VSV.

Wiele znanych substancji przeciwwirusowych hamuje wybiórczo replikację wirusów RNA (Naficy 1965) lub wirusów DNA (Cohen i in. 1960). Niektóre z substancji przeciwwirusowych pochodzenia naturalnego hamują replikację jedynie niektórych szczepów wirusowych nie działając na inne szczepy (Goulet i in. 1960). Związane jest to przede wszystkim z mechanizmem działania poszczególnych substancji przeciwwirusowych, z których wiele inaktywuje wirusy zwierzęce lub roślinne (Kucera, Herrmann 1967; Utech, Johnson 1950); inne z kolei działają hamująco na poszczególne etapy replikacji wirusów będąc inhibitorami enzymów zaangażowanych w replikację kompletnych cząstek wirusowych (Zunino i in. 1975). W naszych doświadczeniach 34 ekstrakty z różnych gatunków grzybów, szczególnie gatunków *Amanita* i *Clitocybe*, wykazywały toksyczne działanie dla hodowli tkankowej FZK.

Szereg toksyn grzybowych wykazuje również działanie przeciwwirusowe, np. α -amanityna (Chardonnet i in. 1972), hamująca replikację adenowirusa typu 5, czy gliotoksyna hamująca replikację wirusa poliomyelitis i wirusa grypy (Richtsels i in. 1964). Toksyny grzybo-

we hamując replikację wirusów są również inhibitorami syntezy makromolekuł komórki gospodarza, jednakże ich działanie przy odpowiednim doborze dawki może być silniejsze w stosunku do syntezy makromolekuł wirusa niż w stosunku do syntezy makromolekuł komórki gospodarza. Wymaga to ustalenia indeksu terapeutycznego, czyli proporcji minimalnej dawki toksycznej do minimalnej dawki wykazującej aktywność przeciwwirusową.

W celu dokładniejszego określenia aktywności przeciwwirusowej i poznania mechanizmu działania zarówno toksyn grzybowych, jak i substancji nietoksycznych dla hodowli tkankowych, konieczna jest izolacja chemiczna aktywnych substancji.

LITERATURA

- Chardonnet Y., Gazzolo L., Pogo B.G.T., 1972, Effect of α -amanitin on adenovirus 5 multiplication. *Virology* 48: 300-304.
- Cohen A., Harley E.H., Rees K.R., 1969, Antiviral effect of daunomycin. *Nature* 222: 36-37.
- Goulet N.R., Cochran K.W., Brown G.C., 1960, Differential and specific inhibition of ECHO viruses by plant extracts. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 103: 96-100.
- Gregory F.J., Healy E.M., Franklin S.D., Agersoory H.P.K., Warren G.H., 1966, Antitumor activity of *Basidiomycetes* fermentation products. *Proc. Am. Ass. Cancer Res.*, 7: 25-27.
- Ilekawa T., Uehara N., Maeda Y., Nskanishi M., Fukuoka F., 1969, Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Res.* 29: 734-737.
- Kadela U., Kolmünzer S., Wajda L., 1976, Wpływ wodnego wyciągu z owocników grzyba *Tylopilus felleus* (Bull. ex Fr.) Karst. na zakaźność wirusa mozaiki tytoniu (TMV) i wirusa ziemniaka x (PVX). *Zesz. probl. Post. Nauk rol.* 182: 105-110.
- Kandefer-Szerszeń M., Kawecki Z., 1974, Ether extracts from the fruiting body of *Piptoporus betulinus* as interference inducers. *Acta Microb. Polon.* 6: 197-200.
- Kucera S., Herrmann E.C., 1967, Antiviral substances in plants of the Mint family (*Labiatae*) I. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124: 865-869.
- Naficy K., 1965, *Cyclopin.* Ann. N.Y. Acad. Sci., 130: 449-459.
- Richtsel W.A., Schneider H.G., Sloan B.J., Graf P.R., Miller F.A., Bartz Q.P., Ehrlich J., 1964, Antiviral activity of gliotoxin and gliotoxin acetate. *Nature* 204: 1333-1334.
- Signoret P.A., Alliot B., 1969, Etude de l'effect inhibiteur des extraits de champignons superieurs basidiomycetes a l'egard de virus de veegetaux. *Ann. Phytopath.* 1: 533-535.
- Utech N.M., Johnson J., 1950, The inactivation of plant viruses by substances obtained from bacteria and fungi. *Phytopathol.* 40: 247-249.
- Zunino F., Gambetta R., Di Marco A., Zaccara A., Luoni G., 1975, A comparison of the effect of daunomycin and adriamycin on various DNA polymerases. *Cancer Res.* 35: 754-760.