

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXXVI, 1

SECTIO C

1981

Institut Mikrobiologii UMCS
Zakład Mikrobiologii Stosowanej

Martyna KANDEFER-SZERSZEŃ, Józef KACZOR,
Zbigniew KAWECKI

**Ekstrakty z grzybów jako źródło substancji o aktywności
przeciwwirusowej. II. Zastosowanie metod chromatograficznych
do izolacji substancji przeciwwirusowych z *Piptoporus betulinus*
(Bull. ex Fr.)**

Грибные экстракты как источник вещества с антивирусной активностью. II.
Применение хроматографических методов в выделении антивирусных веществ
из *Piptoporus betulinus* (Bull. ex Fr.)

Fungal Extracts as Source of Antiviral Substances. II. Application
of the Chromatography Methods for the Isolation of Antiviral Substances
from *Piptoporus betulinus* (Bull. ex Fr.)

Owocniki grzyba *Piptoporus betulinus* (Bull. ex Fr.) zawierają szereg substancji biologicznie aktywnych: o właściwościach przeciwbakteryjnych (6, 18), hamujących mitozę komórek roślinnych (24), stymulujących wzrost grzybów (6) i działających przeciwwirusowo (11). Niektóre z tych substancji zostały izolowane z grzybni i określono ich strukturę chemiczną. Uzyskano kilka związków o charakterze trójterpenów, takich jak kwasy poliporenowe A, B i C (2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 17, 21), kwas eburikowy (6), kwasy tłuszczowe, kwas olejowy, neosterol, fitosterol (17) i inne bliżej nie znane trójterpeny. Przy otrzymywaniu tych związków ekstrahowano je z grzybni rozpuszczalnikami organicznymi i rozdzielano przez estryfikację, hydrolizę i frakcjonowaną krystalizację. Stosowano również chromatografię kolumnową i cienkowarstwową do oczyszczania tych związków.

Celem tej pracy była izolacja substancji przeciwwirusowych z owocników *Piptoporus betulinus* przy zastosowaniu metod chromatograficznych.

MATERIAŁY I METODY

Grzyb. Do badań użyto wysuszone i rozdrobnione owocniki *Piptoporus betulinus* (Bull. ex Fr.), zebrane w okolicach Lublina.

Szczepki wirusów. Wirus kleszczowego zapalenia mózgu (KZM) szczep K_8 o mianie $10^{7.0}LD_{50}^*/ml$ adaptowany do myszy. Wirus ten używano do doświadczeń *in vivo*. Wirus krowianki (*Vaccinia*), szczep szczepionkowy. Miano wirusa określone w hodowli tkankowej fibroblastów zarodka kury wynosiło $10^{6.3}PFU^{**}/ml$. Wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV) szczep Indiana. Miano wirusa określone w hodowli tkankowej fibroblastów zarodka kury wynosiło $10^{7.0}TCID_{50}^{***}/ml$. Wirus krowianki i VS jako wirusy dokażające używano w doświadczeniach *in vitro*.

Hodowle tkankowe. FZK — pierwotną hodowlę fibroblastów zarodka kury otrzymywano standardową metodą trypsynizacji 9-dniowych zarodków kurzych. Do hodowli używano płynu Eagle'a z 10% surowicy bydlęcej.

Szczepki bakterii. Poszczególne, użyte w doświadczeniach szczepki bakteryjne otrzymano z Zakładu Fizjologii Roślin UMCS. Namnażano je na skosach z agarem odżywcym lub w bulionie odżywcym.

Zwierzęta. Do badań *in vivo* użyto myszki białe Swiss-Albino wagi ok. 13 g.

Podłoża do hodowli tkankowych. Płyny do hodowli tkankowych, surowicę bydlęcą i cielęcą oraz trypsynę otrzymano z Lubelskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek.

Wzorce kwasów poliporenowych. Wzorce kwasów poliporenowych A i B otrzymano dzięki uprzejmości prof. dr Ireny Małunowicz z Instytutu Podstaw Chemii Akademii Rolniczej we Wrocławiu.

Metody izolacji substancji biologicznie aktywnych z *Piptoporus betulinus*. Rozdrobnione owocniki huby ekstrahowano alkoholem etylowym w temperaturze pokojowej przez kilka tygodni. Ekstrakt etanolowy odparowano do suchości pod próżnią i wytrząsano z mieszaniną woda: eter etylowy (1:1). Część ekstraktu nie rozpuszczała się ani w wodzie, ani w eterze. Kolejne frakcje oznaczono symbolami:

PB I — ekstrakt etanolowy,

PB II — ekstrakt eterowy ekstraktu etanolowego,

PB III — ekstrakt wodny ekstraktu etanolowego,

PB IV — nierozpuszczalna pozostałość.

Z wymienionych ekstraktów jedynie ekstrakty PB I i PB II wykazywały aktywność przeciwwirusową (11). Ekstrakt eterowy PB II odparowano i rozdzielono przy pomocy ciśnieniowych chromatografii kolumnowych. Kolejne etapy preparatyki zestawiono na schemacie 1 i w tab. 1. Poszczególne frakcje chromatograficzne łączono dobierając substancje o podobnym R_f . Wartość R_f określano w chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na żelu krzemionkowym przy zastosowaniu odpowiednich układów eluentów (metanol:benzen — 0—50%). Chromatogramy wy-

* LD_{50} (lethal dose) — 50% dawka śmiertelna, czyli takie rozcieńczenie wirusa, które powoduje śmierć 50% zakażonych zwierząt.

** PFU (plaque forming units) — jednostka łyśinkowa wirusa. Jest to największe rozcieńczenie wirusa, w którym spostrzega się łyśinki.

*** $TCID_{50}$ (tissue culture infections dose) — 50% dawka zakaźna dla hodowli komórek, czyli takie rozcieńczenie badanego wirusa, które wywołuje w 50% zakażonych próbek efekt cytopatyczny.

Tab. 1. Chromatograficzny rozdział ekstraktu eterowego z *Piptoporus betulinus*.
 Warunki chromatografii
 Chromatographic separation of the ether extracts from *Piptoporus betulinus*.
 Chromatography conditions

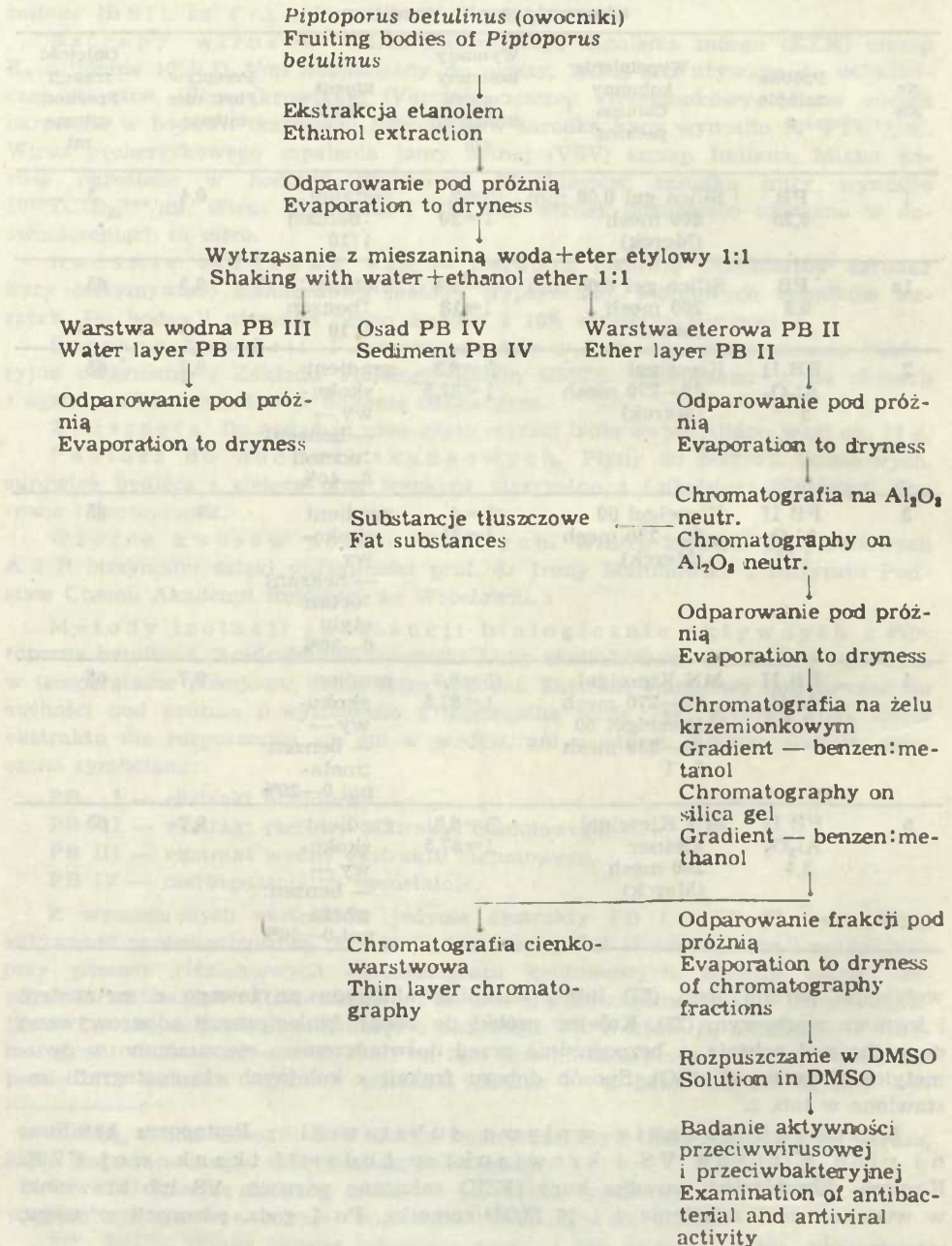
Nr No	Próbka Sample g	Wypełnienie kolumny Column packing	Wymiary kolumny Column dimension cm	Eluent Eluent	Przepływ Flow rate ml/min.	Objętość frakcji Fraction volume ml
1	PB 0,25	Silica gel 0,08 mm 200 mesh (Merck)	$\Phi=2$ 1=20	metanol: :benzen 1:10	0,4	3
1a	PB 0,2	Silica gel 0,08 mm 200 mesh (Merck)	$\Phi=1,4$ 1=18	metanol: :benzen 1:10	0,5	65
2	PB II Al ₂ O ₃ 5	Kieselgel 70—270 mesh (Merck)	$\Phi=6,3$ 1=87,5	gradient skokowy — — benzen: :acetone 0—40%	9,7	65
3	PB II Al ₂ O ₃ 1,25	Kieselgel 60 70—230 mesh (Merck)	$\Phi=4$ 1=35	gradient skokowy — — heksan: :octan etylu 0—30%	7	65
4	PB II Al ₂ O ₃ 4,2	MN Kieselgel 70—270 mesh Kieselgel 60 70—230 mesh 5:1	$\Phi=6,3$ 1=87,5	gradient skokowy — — benzen: :metanol 0—20%	9,7	65
5	PB II Al ₂ O ₃ 3,4	MN Kieselgel kleiner 200 mesh (Merck)	$\Phi=6,3$ 1=87,5	gradient skokowy — — benzen: :metanol 0—50%	9,7	65

woływano parami jodu (23) lub mieszaniną aldehydu anyżowego z metanolem i kwasem siarkowym (23). Kolejne próbki do badań biologicznych odparowywano do sucha pod próżnią, a bezpośrednio przed doświadczeniem rozpuszczano w dwumetylosulfotlenku (DMSO). Sposób doboru frakcji z kolejnych chromatografii zestawiono w tab. 2.

Metodyka badania wpływu substancji z *Piptoporus betulinus* na plon wirusów VS i krowianki w hodowli tkankowej FZK. Komórki fibroblastów zarodka kury (FZK) zakażano wirusem VS lub krowianki w wielokrotności zakażenia 1 i 10 MOI*/komórkę. Po 1 godz. adsorpcji wirusów,

* MOI (multiplicity of infection) — wielokrotność zakażenia, czyli liczba cząstek zakaźnych wirusa przypadająca na 1 komórkę gospodarza.

Schemat 1. Izolacja substancji biologicznie aktywnych z *Piptoporus betulinus*
 Isolations of substances with biological activity from *Piptoporus betulinus*



komórki wirowano, płukano, zawieszano w płynie Eagle'a z 2% surowicy bydlęcej (1 mln komórek/ml) i dodawano badanych substancji w dawce 10 µg/ml. Zawiesinę inkubowano 24 godz. w 37°C, a następnie określano plon wirusów, miareczkując próbki w hodowli tkankowej FZK.

Metodyka badania aktywności przeciwbakteryjnej. Zastosowano metodę krążków bibułowych ($\Phi=10$ mm) nasyconych badanymi sub-

Tab. 2. Dobór frakcji chromatograficznych do badań aktywności biologicznej
Selection of the chromatographic fractions for determination of biological activity

Nr chromatografii No chromatography	Symbol frakcji Symbol of fractions	Nr frakcji No fraction
1	A	6—8
	B	9
	C	11—13
	D	14
	E	16—20
	F	26—38
	G	40—52
2	PB II-A	1—18
	PB II-B	19—54
	PB II-IX	55—74
	PB II-X	75—81
	PB II-XI	82—120
	PB II-XII	121—146
	PB II-XIII	147—162
	PB II-XIV	163—188
	PB II-XV	189—238
PB II-XVI	239—250	
3	PB II-IH	7—32
	PB II-IIH	33—50
	PB II-IIIH	51—68
	PB II-IVH	69—80
	PB II-VH	81—90
	PB II-VIH	91—103
4	PB II-WA	36—42
	PB II-WB	43—66
	PB II-WC	67—115
	PB II-WD	116—126
5	PB II-1	13—55
	PB II-2	56—79
	PB II-3	80—90
	PB II-4	93—106
	PB II-5	107—124
	PB II-6	125—128
	PB II-7	129—140
	PB II-8	141—146
	PB II-9	147—162
	PB II-10	164—171
	PB II-11	172—196
	PB II-12	197—216
	PB II-13	217—230
	PB II-14	231—250

stancjami (100 µg/krażek). Krążki nanoszono na 1,5% agar odżywczy, do którego przed skrzepnięciem dodano 24-godziną hodowlę bulionową różnych szczepów bakteryjnych. Po inkubacji 24 godz. w 4°C i 24—48 godz. w 37°C i uzyskaniu obfitego wzrostu bakterii, mierzono średnice stref zahamowania wzrostu bakterii wokół krążka z badaną substancją.

Badanie aktywności przeciwwirusowej substancji z *Piptoporus betulinus* metodą dyfuzji w agarze i metodą interferencji w hodowli tkankowej FZK i *in vivo* na białych myszkach opisano wcześniej (11, 15).

WYNIKI BADAŃ

W tab. 3 zestawiono wyniki badania przeciwbakteryjnej aktywności ekstraktów z *Piptoporus betulinus*. Ekstrakty otrzymano przy zastosowaniu różnych rozpuszczalników organicznych. Najsilniejszą przeciwbakteryjną aktywność wykazywał pełny ekstrakt eterowy — PB oraz PBE — ekstrakt benzenowy z ekstraktu eterowego PB. W przypadku zastosowania metodyki Crossa (3) do rozdziału substancji biologicznie aktywnych z *Piptoporus betulinus* stwierdzono, że zdolność do hamowania wzrostu drobnoustrojów *Sarcina lutea* i *Bacillus subtilis* zachowuje jedynie frakcja PB I C₁, czyli ekstrakt etanolowy, hydrolizowany KOH w metanolu.

Do następnych doświadczeń użyto substancji uzyskanych z rozdziału chromatograficznego. Kolejne frakcje, otrzymane po chromatografii nr 1 i oznaczone literami alfabetu, przebadano na właściwość zapobiegania zakażeniu hodowli tkankowej FZK wirusem krowianki. Frakcje chromatograficzne w dawce 10 µg/ml inkubowano 24 godz. z hodowlą FZK przed zakażeniem wirusem krowianki. Wyniki przedstawiono na ryc. 1. Najaktywniejsze okazały się frakcje F i G, które powodowały spadek ilości lysinek wirusa krowianki o ponad 50%. Badano również aktywność interferencyjną frakcji chromatograficznych *in vivo*. W tym celu myszkom podawano dożylnie badane substancje 24 godz. przed domózgowym zakażeniem wirusem K₅ dawką 10⁴ LD₅₀/mysz. Wyniki zestawiono w tab. 4. Stwierdzono, że nieznaczną aktywność ochronną posiadały frakcje C i D.

W tab. 5 zebrano wyniki badania aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwwirusowej poszczególnych frakcji uzyskanych z chromatografii nr 2, 3, 4 i 5. W chromatografii nr 2 frakcje PB II-A i PB II-B były aktywne zarówno wobec wirusa krowianki, jak i VS. Frakcje te w dawce 100 µg/krażek nie wykazywały toksyczności dla hodowli tkankowej FZK. Z kolei bardzo słabą aktywność przeciwbakteryjną wykazywały jedynie frakcje PB II-B i PB II—X wobec *Bacillus circulans* szczep 5121. W chromatografii nr 3 zauważono rozdział substancji wykazujących aktywność przeciw wirusowi krowianki od substancji aktywnych przeciw wiruso-

Tab. 3. Przeciwbakteryjna aktywność ekstraktów z *Piptoporus betulinus*
 Antibacterial activity of the extracts from *Piptoporus betulinus*

Symbol ekstraktu Symbol of extract	Metoda izolacji Method of isolation	Średnica zahamowania wzrostu Diameter of growth inhibition (mm)	
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. lutea</i>
PB A	Ekstrakcja acetonem ekstraktu etanolowego	13,3	14,4
PB B	Ekstrakcja eterem etylowym huby po ekstrakcji eterem naftowym	14,3	14,0
PB C	Ekstrakcja etanolem huby po ekstrakcji eterem naftowym	11,2	13,0
PB D	Ekstrakcja eterem naftowym	12,0	12,5
PB E	Ekstrakt benzenowy z ekstraktu eterowego PB	17,2	17,4
PB	Ekstrakcja huby eterem etylowym	16,6	15,5
PB I	Ekstrakcja huby etanolem	13,5	12,9
PB I C ₁	PB I hydrolizowany KOH	13,0	13,7
PB I C ₂	Pozostałość po hydrolizie ekstrahowana eterem etylowym	—	—
PB I C ₃	Osad otrzymany z hydrolizatu PB I C ₁ po dodaniu CH ₃ COOH	n	n
PB I C ₄	PB I C ₁ rekrytalizowany z propanolu	—	—

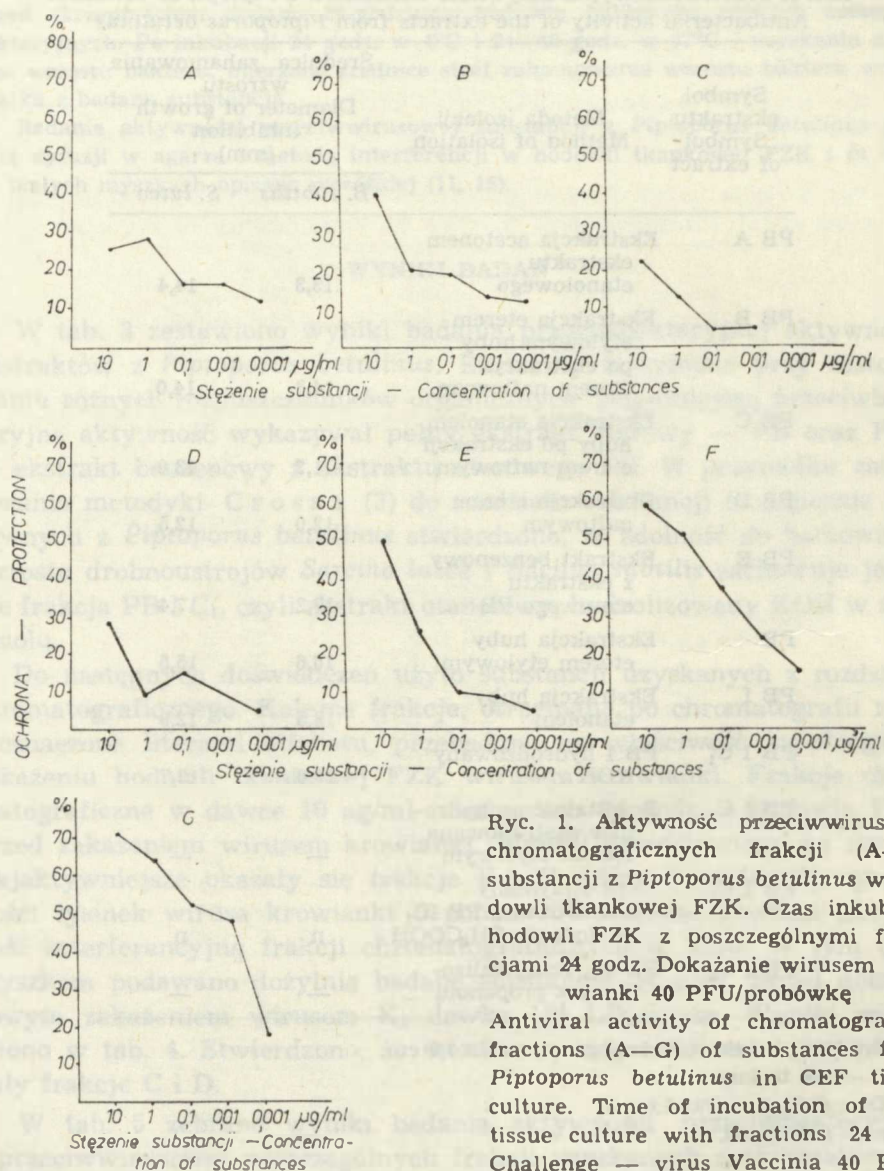
Średnica krążka bibułowego wynosiła 1,0 cm.

n — nie badano.

Disc diameter was 1.0 cm.

n — not tested.

wi VS. Aktywne frakcje wykazywały jednak toksyczność dla hodowli tkankowej FZK. Wyraźną aktywność przeciwbakteryjną w tej chromatografii wykazywały frakcje PB II—IV-H aktywne wobec siedmiu z badanych jedenastu szczepów bakterii, w tym największą strefę zahamowania wzrostu obserwowano w przypadku *Staphylococcus aureus* (szczep Copenhaga). W chromatografii nr 4 dwie frakcje wykazywały aktywność biologiczną. Jedną z nich PB II-WB była aktywna wobec



Ryc. 1. Aktywność przeciwwirusowa chromatograficznych frakcji (A—G) substancji z *Piptoporus betulinus* w hodowli tkankowej FZK. Czas inkubacji hodowli FZK z poszczególnymi frakcjami 24 godz. Dokazanie wirusem krwiarki 40 PFU/probówkę

Antiviral activity of chromatographic fractions (A—G) of substances from *Piptoporus betulinus* in CEF tissue culture. Time of incubation of CEF tissue culture with fractions 24 hrs. Challenge — virus Vaccinia 40 PFU/tube

wirusa VS, a druga PB II-WD wobec dwu szczepów bakterii: *Bacillus subtilis* (szczep Oxford) i *Bacillus subtilis* (szczep 6633). W chromatografii nr 5 uzyskano najlepszy rozdział substancji aktywnych. Stwierdzono obecność dwu grup substancji posiadających aktywność przeciwwirusową. Frakcje o wysokim R_f , nr 4, 5 i 6 w stosowanych dawkach były

Tab. 4. Ochrona myszy przed letalną infekcją wirusa kleszczowego zapalenia mózgu (szczep K₅) 10⁴ LD₅₀/mysz. Induktor: frakcje z chromatografii nr 1 podawane dożylnie w 24 godz. przed wirusem

Protection of mice against lethal infection of Tick borne encephalitis virus (K₅ strain) 10⁴ LD₅₀/mouse. Inducer: No 1 chromatography fractions injected intravenously 24 hrs before virus inoculation

Frakcja Fraction	Dawka w µg/mysz Dose µg/mouse	Padły/Trak- towane Dead/Treated	Procent ochrony Percentage of protection
A	100	6/6	0
	10	6/6	0
	1	5/6	16,6
	0,1	6/6	0
B	100	6/6	0
	10	6/6	0
	1	6/6	0
	0,1	6/6	0
C	100	5/6	16,6
	10	6/6	0
	1	5/6	16,6
	0,1	5/6	16,6
D	100	5/6	16,6
	10	6/6	0
	1	5/6	16,6
	0,1	6/6	0
E	100	6/6	0
	10	6/6	0
	1	6/6	0
	0,1	6/6	0
F	100	6/6	0
	10	6/6	0
	1	6/6	0
	0,1	6/6	0
G	100	6/6	0
	10	6/6	0
	1	6/6	0
	0,1	6/6	0
H	100	5/6	16,6
	10	6/6	0
	1	6/6	0
	0,1	6/6	0
KV	—	6/6	—
K DMSO	100	6/6	0
KM	—	0/6	—

nietoksyczne dla hodowli tkankowej FZK i aktywne wobec obu testowych wirusów: krowianki i VS. Aktywność przeciwbakteryjna tej grupy frakcji była niska i dotyczyła czterech szczepów bakteryjnych *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis* Oxford, *Sarcina lutea* i *Staphylococcus epidermidis* szczep 200.

Druga grupa frakcji: nr 12, 13, 14, 15+16 o niskim R_f , posiadających aktywność przeciwwirusową, wykazywała toksyczność dla hodowli tkankowej FZK i charakteryzowała się aktywnością przeciwbakteryjną wobec ośmiu z jedenastu badanych szczepów bakterii.

Frakcje posiadające aktywność przeciwwirusową przebadano pod względem zdolności do bezpośredniej inaktywacji wirusów. Wirus VS był częściowo inaktywowany przez frakcję 13 (spadek miana o ok. 1 log), natomiast nie obserwowano inaktywacji wirusa krowianki żadną z badanych frakcji. Wyniki zestawiono w tab. 6.

Badano również wpływ substancji na replikację wirusów krowianki i VS w komórkach FZK przy niskiej (1 MOI/komórkę) i wysokiej (10 MOI/komórkę) wielokrotności zakażenia. Po adsorpcji wirusów zakażone hodowle tkankowe FZK traktowano frakcjami posiadającymi aktywność przeciwwirusową ($10 \mu\text{g}/10^6$ komórek). Po 24 godz. badano plon wirusów. Przy wielokrotności zakażenia 1 MOI/komórkę (tab. 7) aktywna w hamowaniu replikacji obu wirusów okazała się frakcja nr 13 (obniżenie zbioru wirusa VS o ok. 2 log i wirusa krowianki o ponad 2 log). Pozostałe frakcje wykazywały znacznie niższą aktywność (np. frakcja nr 4) lub nie wpływały na plon wirusów testowych (np. frakcja nr 12).

W tab. 8 porównano wpływ frakcji PB II-4 i PB II-13 na plon wirusów przy niskiej i wysokiej wielokrotności zakażenia. W warunkach wysokiej wielokrotności zakażenia (10 MOI/komórkę) frakcje PB II-4 i PB II-13 okazały się mniej skuteczne w hamowaniu replikacji zarówno wirusa VS, jak i krowianki.

Tab. 6. Wirusobójcza aktywność frakcji chromatograficznych substancji z *Piptoporus betulinus*

Virucidal activity of chromatographic fractions substances from *Piptoporus betulinus*

Wirus Virus	Dośw. Exp.	Nr frakcji No fraction						
		3	4	6	11	12	13	—
VS	I	$10^{5.24}$	$10^{5.23}$	$10^{5.22}$	$10^{5.13}$	$10^{5.23}$	$10^{4.18}$	$10^{5.24}$
	II	n	$10^{5.5}$	n	n	n	$10^{4.33}$	$10^{5.5}$
Vacc	I	$10^{4.89}$	$10^{4.72}$	$10^{4.78}$	$10^{4.81}$	$10^{4.78}$	$10^{4.74}$	$10^{4.86}$
	II	n	$10^{6.71}$	n	n	n	$10^{6.30}$	$10^{6.77}$

n — nie badano.

Do badań użyto frakcje chromatografii nr 5.

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

Czas inkubacji 4 godz. w 4°C .

n — not tested.

Fractions of chromatography No 5 were used in this experiment.

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

Time of incubation 4 hrs in 4°C .

Tab. 7. Wpływ substancji z *Piptoporus betulinus* na plon wirusów w hodowli tkankowej FZK przy niskiej wielokrotności zakażenia
 Effect of substances from *Piptoporus betulinus* on yields of viruses in CEF tissue culture at low multiplicity of infection

Wirus Virus	Dośw. exp.	Nr frakcji No fraction					
		3	4	6	12	13	—
VS	I	10 ^{7.0}	10 ^{6.5}	n	10 ^{7.5}	10 ^{5.07}	10 ^{7.5}
	II	n	n	10 ^{6.0}	n	n	10 ^{6.0}
Vacc	I	10 ^{6.0}	n	n	n	n	10 ^{6.5}
	II	n	10 ^{4.5}	10 ^{6.0}	10 ^{5.5}	10 ^{3.7}	10 ^{5.33}

n — nie badano.

Stężenie substancji 10 µg/10⁶ komórek.

Czas inkubacji 24 godz.

Wielokrotność zakażenia — 1 PFU/komórkę.

n — not tested.

Concentration of substances 10 µg/10⁶ cells.

Time of incubation 24 hrs.

Multiplicity of infection 1 PFU/cell.

Tab. 8. Wpływ substancji z *Piptoporus betulinus* na plon wirusów w hodowli tkankowej FZK
 Effect of substances from *Piptoporus betulinus* on yields of viruses in CEF tissue culture

Frakcja Fraction	Wielokrotność zakażenia (MOI/komórkę) Multiplicity of infections (MOI/cell)							
	VSV				Vacc			
	10 MOI/ /komórkę 10 MOI per cell	Zahamo- wanie Inhibition	1 MOI/ /komórkę 1 MOI per cell	Zahamo- wanie Inhibition	10 MOI/ /komórkę 10 MOI per cell	Zahamo- wanie Inhibition	1 MOI/ /komórkę 1 MOI per cell	Zahamo- wanie Inhibition
—	10 ^{6.33}	—	10 ^{7.5}	—	10 ^{6.62}	—	10 ^{5.33}	—
PB II-4	10 ^{6.77}	0,56	10 ^{6.5}	1,0	10 ^{6.63}	0	10 ^{4.5}	0,88
PB II 13	10 ^{5.5}	0,83	10 ^{5.67}	1,83	10 ^{6.5}	0,1	10 ^{3.0}	2,33

Stężenie substancji 10 µg/10⁶ komórek.

Czas inkubacji 24 godz.

Concentration of substances 10 µg/10⁶ cells.

Time of incubation 24 hrs.

Badano wpływ PB II-4 i PB II-13 na plon wirusów VS i krowianki w obecności inhibitorów syntezy białka, tj. chloramfenikolu i cykloheksymidu, oraz w obecności dużych dawek penicyliny i streptomycyny. Wyniki zestawiono w tab. 9. Sam cykloheksymid wykazywał hamujący wpływ na replikację wirusa VS, lecz nie wzmacniał przeciwwirusowego działania substancji z *Piptoporus betulinus*. Chloramfenikol z kolei nie hamował replikacji wirusów, ale wyraźnie wzmacniał przeciwwirusowy efekt PB II-4 przeciw wirusowi VS i krowianki, a także substancji PB II-13 przeciw wirusowi VS. Penicylina i streptomycyna w użytych dawkach nie wykazywały wyraźnego wspomagającego wpływu na aktywność PB II-4 lub PB II-13. Obydwie badane substancje wykazywały silniejszą aktywność przeciwwirusową po podawaniu ich do hodowli tkankowej FZK w 2 lub 4 godz. przed zakażeniem wirusem aniżeli po wprowadzeniu do hodowli tkankowej po adsorpcji wirusów (tab. 10). Potraktowanie hodowli tkankowej FZK substancją PB II-4 w 4 godz. przed zakażeniem wirusem powodowało najsilniejszy efekt ochronny. Wynik ten obserwowano niezależnie od tego, czy substancja znajdowała się w płynie hodowlanym po adsorpcji wirusów, czy tylko była obecna

Tab. 9. Wpływ substancji z *Piptoporus betulinus* na plon wirusów w obecności antybiotyków
Effect of substances from *Piptoporus betulinus* on yields of viruses in presence of the antibiotics

Antybiotyki Antibiotics	Wirusy Viruses					
	VSV			Vacc		
	—	PB II-4	PB II-13	—	PB II-4	PB II-13
—	10 ^{6.33}	10 ^{5.77}	10 ^{5.50}	10 ^{6.62}	10 ^{6.63}	10 ^{6.66}
Chloramfenikol	10 ^{6.0}	10 ^{4.67}	10 ^{4.00}	10 ^{6.71}	10 ^{5.85}	10 ^{6.67}
Penicylina + streptomycyna	10 ^{6.33}	10 ^{5.58}	10 ^{5.00}	10 ^{6.17}	10 ^{6.40}	10 ^{6.50}
Cykloheksymid	10 ^{5.00}	10 ^{6.17}	10 ^{6.40}	10 ^{6.00}	10 ^{6.00}	10 ^{6.08}

Stężenie substancji=10 µg/10⁶ komórek.

Stężenie antybiotyków: chloramfenikol=1 µg/10⁶ komórek, penicylina+streptomycyna=1000 µg/10⁶ komórek, cykloheksymid=1 µg/10⁶ komórek.

Czas inkubacji — 24 godz.

Wielokrotność zakażenia (MOI)=10/komórkę.

Concentration of substances=10 µg/10⁶ cells.

Concentration of antibiotics: chloramphenicol=1 µg/10⁶ cells, penicillin+streptomycin=1000 µg/10⁶ cells, cycloheximid=1 µg/10⁶ cells.

Time of incubation — 24 hrs.

Multiplicity of infection (MOI)=10 per cell.

Tab. 10. Wpływ substancji z *Piptoporus betulinus* na replikację wirusów w hodowli FZK. Zależność hamowania wirusów od czasu potraktowania hodowli FZK przed lub po zakażeniu komórek wirusem

Effect of substances from *Piptoporus betulinus* on virus replication in CEF tissue culture. Dependence of virus inhibition on time of CEF tissue culture treatment before or after virus inoculation

Wirus		VSV			Vacc		
Czas podania subst. przed lub po wirusie (godz.) Treatment with subst. before or after virus inoculation (hrs.)		-4*	-2	+1	-4	-2	+1
Substancje Substances	Stężenie Concentration µg/ml	Procent zahamowania CPE Percentage inhibition of CPE					
PB II-4	25	25	12,5	0	90,2	87,4	63,8
	10	25	12,5	0	54,7	77,0	66,5
	1	0	12,5	0	6,0	29,0	0
	0,1	0	12,5	0	—	—	0
	—	0	0	0	0	0	0
PB II-13	25	12,5	37,5	12,5	44,4	96	75,8
	10	12,5	25	0	0	89,4	0
	1	0	0	0	0	81,6	5,8
	0,1	0	0	0	0	74,5	8,3
	—	0	0	0	0	0	0

* Hodowle tkankowe FZK traktowano substancjami przez 4 godz., po czym substancje usuwano, w pozostałych doświadczeniach substancje obecne były przez cały czas replikacji wirusów.

* CEF tissue cultures were treated 4 hrs with substances before virus inoculation and after that substances were removed from tissue culture. In residual experiments substances were present in tissue culture media during whole experiment.

w płynie przez 4 godz. przed adsorpcją, a następnie usunięta. Natomiast PB II-13 wykazywała najsilniejsze właściwości przeciwwirusowe wówczas, gdy była w kontakcie z hodowlą tkankową FZK przez 4 godz. przed dodaniem wirusa i pozostawała w hodowli przez cały okres replikacji wirusów VS i krowianki. Wpływ substancji na replikację wirusów nie był spowodowany działaniem toksycznym dla hodowli tkankowej FZK. Metodą barwienia błękitem trypanu określono toksyczność PB II-4 i PB II-13. Wyniki zestawiono w tab. 11. Substancje okazały się toksyczne w dawkach 100, 75 i 50 µg/ml. Natomiast dawka 10 µg/ml zwiększała jedynie o ok. 10% ilość komórek martwych w porównaniu z kontrolą. Obie badane substancje PB II-4 i PB II-13 wykazywały podobną toksyczność dla hodowli tkankowej FZK.

Badano wpływ PB II-4 i PB II-13 na plon wirusów VS i krowianki w obecności inhibitorów syntezy białka, tj. chloramfenikolu i cykloheksymidu, oraz w obecności dużych dawek penicyliny i streptomycyny. Wyniki zestawiono w tab. 9. Sam cykloheksymid wykazywał hamujący wpływ na replikację wirusa VS, lecz nie wzmacniał przeciwwirusowego działania substancji z *Piptoporus betulinus*. Chloramfenikol z kolei nie hamował replikacji wirusów, ale wyraźnie wzmacniał przeciwwirusowy efekt PB II-4 przeciw wirusowi VS i krowianki, a także substancji PB II-13 przeciw wirusowi VS. Penicylina i streptomycyna w użytych dawkach nie wykazywały wyraźnego wspomagającego wpływu na aktywność PB II-4 lub PB II-13. Obydwie badane substancje wykazywały silniejszą aktywność przeciwwirusową po podawaniu ich do hodowli tkankowej FZK w 2 lub 4 godz. przed zakażeniem wirusem aniżeli po wprowadzeniu do hodowli tkankowej po adsorpcji wirusów (tab. 10). Potraktowanie hodowli tkankowej FZK substancją PB II-4 w 4 godz. przed zakażeniem wirusem powodowało najsilniejszy efekt ochronny. Wynik ten obserwowano niezależnie od tego, czy substancja znajdowała się w płynie hodowlanym po adsorpcji wirusów, czy tylko była obecna

Tab. 9. Wpływ substancji z *Piptoporus betulinus* na plon wirusów w obecności antybiotyków
Effect of substances from *Piptoporus betulinus* on yields of viruses in presence of the antibiotics

Antybiotyki Antibiotics	Wirusy Viruses					
	VSV			Vacc		
	—	PB II-4	PB II-13	—	PB II-4	PB II-13
—	$10^{6.33}$	$10^{5.77}$	$10^{5.50}$	$10^{6.62}$	$10^{6.63}$	$10^{6.50}$
Chloramfenikol	$10^{6.0}$	$10^{4.67}$	$10^{4.00}$	$10^{6.71}$	$10^{5.85}$	$10^{6.67}$
Penicylina + streptomycyna	$10^{6.33}$	$10^{5.58}$	$10^{5.00}$	$10^{6.17}$	$10^{6.40}$	$10^{6.50}$
Cykloheksymid	$10^{5.00}$	$10^{6.17}$	$10^{6.40}$	$10^{6.00}$	$10^{6.00}$	$10^{6.00}$

Stężenie substancji = $10 \mu\text{g}/10^6$ komórek.

Stężenie antybiotyków: chloramfenikol = $1 \mu\text{g}/10^6$ komórek, penicylina + streptomycyna = $1000 \mu\text{g}/10^6$ komórek, cykloheksymid = $1 \mu\text{g}/10^6$ komórek.

Czas inkubacji — 24 godz.

Wielokrotność zakażenia (MOI) = 10/komórkę.

Concentration of substances = $10 \mu\text{g}/10^6$ cells.

Concentration of antibiotics: chloramphenicol = $1 \mu\text{g}/10^6$ cells, penicillin + streptomycin = $1000 \mu\text{g}/10^6$ cells, cycloheximid = $1 \mu\text{g}/10^6$ cells.

Time of incubation — 24 hrs.

Multiplicity of infection (MOI) = 10 per cell.

Tab. 10. Wpływ substancji z *Piptoporus betulinus* na replikację wirusów w hodowli FZK. Zależność hamowania wirusów od czasu potraktowania hodowli FZK przed lub po zakażeniu komórek wirusem

Effect of substances from *Piptoporus betulinus* on virus replication in CEF tissue culture. Dependence of virus inhibition on time of CEF tissue culture treatment before or after virus inoculation

Wirus		VSV			Vacc		
Czas podania subst. przed lub po wirusie (godz.)							
Treatment with subst. before or after virus inoculation (hrs.)		-4*	-2	+1	-4	-2	+1
Substancje Substances	Stężenie Concentration µg/ml	Procent zahamowania CPE Percentage inhibition of CPE					
PB II-4	25	25	12,5	0	90,2	87,4	63,8
	10	25	12,5	0	54,7	77,0	66,5
	1	0	12,5	0	6,0	29,0	0
	0,1	0	12,5	0	—	—	0
	—	0	0	0	0	0	0
PB II-13	25	12,5	37,5	12,5	44,4	96	75,8
	10	12,5	25	0	0	89,4	0
	1	0	0	0	0	81,6	5,8
	0,1	0	0	0	0	74,5	8,3
	—	0	0	0	0	0	0

* Hodowle tkankowe FZK traktowano substancjami przez 4 godz., po czym substancje usuwano, w pozostałych doświadczeniach substancje obecne były przez cały czas replikacji wirusów.

* CEF tissue cultures were treated 4 hrs with substances before virus inoculation and after that substances were removed from tissue culture. In residual experiments substances were present in tissue culture media during whole experiment.

w płynie przez 4 godz. przed adsorpcją, a następnie usunięta. Natomiast PB II-13 wykazywała najsilniejsze właściwości przeciwwirusowe wówczas, gdy była w kontakcie z hodowlą tkankową FZK przez 4 godz. przed dodaniem wirusa i pozostawała w hodowli przez cały okres replikacji wirusów VS i krowianki. Wpływ substancji na replikację wirusów nie był spowodowany działaniem toksycznym dla hodowli tkankowej FZK. Metodą barwienia błękitem trypanu określono toksyczność PB II-4 i PB II-13. Wyniki zestawiono w tab. 11. Substancje okazały się toksyczne w dawkach 100, 75 i 50 µg/ml. Natomiast dawka 10 µg/ml zwiększała jedynie o ok. 10% ilość komórek martwych w porównaniu z kontrolą. Obie badane substancje PB II-4 i PB II-13 wykazywały podobną toksyczność dla hodowli tkankowej FZK.

Tab. 11. Wpływ substancji PB II-4 i PB II-14 na żywotność komórek FZK
Effect of fractions PB II-4 and PB II-13 on viability of CEF cells

Frakcja Fraction	Stężenie Concentration µg/ml	Procent żywotności Percentage of viability	Procent w porównaniu żywotności z kontrolą Percentage of viability in comparison with control
PB II-4	100	0	0
	75	7,4	7,6
	50	74,85	77,3
	25	79,75	82,4
	10	90,65	93,7
	1	95,15	98,3
	0,1	99,5	102,9
	—	96,8	100,0
PB II-13	100	0	0
	75	22,0	23,8
	50	63,4	68,6
	25	83,3	90,1
	10	89,9	97,3
	1	96,9	100,9
	0,1	96,0	103,9
	—	92,4	100

Komórki barwiono błękitem trypanu.

Viability determined using the trypan blue dye exclusion test.

DYSKUSJA

Z wielu przebadanych pod względem aktywności przeciwwirusowej gatunków grzybów (4, 11, 13) szczególnie interesujący jest *Piptoporus betulinus*. Ekstrakty wodne uzyskane z owocników tego grzyba nie tylko hamowały replikację wirusów VS i krowianki, ale również posiadały zdolność do inaktywacji tych wirusów. Za aktywność biologiczną ekstraktów wodnych, jak wykazano w badaniach poprzednich (14), odpowiedzialnych jest kilka substancji o różnych właściwościach biologicznych i chemicznych. Są to kwasy nukleinowe RNA i DNA, które izolowane z owocników posiadają zdolność do indukcji interferonu zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* (15) i hamują replikację wirusów za pośrednictwem interferonu. Ponadto występują substancje niskocząsteczkowe, inaktywujące wirusy VS i krowianki oraz posiadające właściwość hamowania replikacji wirusów, jednak mechanizm ich działania nie jest jeszcze poznany.

Substancje niskocząsteczkowe są słabo rozpuszczalne w wodzie, natomiast dobrze rozpuszczalne w wielu rozpuszczalnikach organicznych w tym również w DMSO. Stąd też zastosowano rozpuszczalniki organicz-

ne, takie jak alkohol etylowy i eter etylowy, do ekstrakcji substancji z grzybni, a do doświadczeń biologicznych izolowane substancje rozpuszczano w DMSO. Zastosowanie chromatografii kolumnowej adsorpcyjnej z różnymi układami eluentów pozwoliło na dobranie warunków chromatografii i uzyskanie możliwie dobrego rozdzielania aktywnych substancji. W doświadczeniach badano dwie aktywności biologiczne, tj. aktywność przeciwbakteryjną i przeciwwirusową. Oba ekstrakty — etanolowy i eterowy posiadały aktywność przeciwbakteryjną, zarówno w stosunku do *Sarcina lutea*, jak i *Bacillus subtilis*. W piśmiennictwie jest kilka doniesień dotyczących aktywności przeciwbakteryjnej substancji z *Piptoporus betulinus* (6, 18), a za posiadające aktywność taką uważa się substancje o charakterze trójterpenów: kwasy poliporenowe A, B i C. W naszych doświadczeniach substancje z *Piptoporus betulinus* rozdzielane wg metody Crossa (3) posiadały właściwości przeciwbakteryjne. Cała aktywność przeciwbakteryjna zlokalizowana była w hydrolizacie KOH (PB I C₁), gdzie wg Crossa znajdują się kwasy poliporenowe. Również z analizy substancji uzyskanych po rozdziale chromatograficznym wynika, że R_f frakcji PB II-13 nieznacznie różnił się od R_f kwasu poliporenowego A, natomiast R_f kwasu poliporenowego B można porównać z R_f frakcji PB II-10 lub PB II-11. Wszystkie te frakcje w naszych badaniach wykazywały aktywność przeciwbakteryjną. W warunkach chromatografii nr 3 i 4 rozdzielono aktywność przeciwbakteryjną od przeciwwirusowej, natomiast w chromatografii nr 5 uzyskano dwie grupy substancji posiadających zdolność do hamowania replikacji wirusów VS i krowianki. Z uzyskanych w chromatografii nr 5 frakcji najsilniejszą aktywność przeciwwirusową posiadały frakcje PB II-4 i PB II-13, z tym, że aktywność wirusobójcza i hamująca replikację wirusów była niższa niż przy pełnym ekstrakcie eterowym uzyskanym z wysuszonych owocników *Piptoporus betulinus*. W literaturze znane są przypadki, gdy surowy, zawierający szereg składników, materiał posiada wyższą aktywność biologiczną niż jego izolowane chemicznie składniki. Tak jest np. z kompleksem streptowarycyny, produktem fermentacji *Streptomyces spectabilis* (1, 9, 19) hamującym rozwój bakterii gram dodatnich i gram ujemnych oraz kwasoopornych, a także pokswirusów i onkogennych wirusów RNA. Natomiast jego składniki, jak streptowarycyna A, C i E, w mniejszym stopniu hamują splenomegalię wywołaną wirusem białaczki Rauscher'a (5). Przypuszcza się, że w tym preparacie przeciwwirusowa aktywność nie musi być spowodowana tylko znanymi i już opisanymi streptowarycynami, zakłada się istnienie szeregu innych składników dotychczas nieokreślonych odpowiedzialnych za tę aktywność (9). Prawdopodobnie mechanizm przeciwwirusowego działania frakcji PB II-4 i PB II-13 jest różny. Świadczą o tym doświadczenia nad hamowaniem replikacji wi-

rusów VS i krowianki w obecności chloramfenikolu. W przypadku wirusa VS silniejszy efekt synergistyczny obserwowano przy frakcji PB II-13, natomiast frakcja PB II-4 silniej hamowała replikację wirusa krowianki. Obserwowano również różnice w hamowaniu replikacji wirusów VS i krowianki w zależności od momentu podania badanych frakcji. Frakcja PB II-4 prawdopodobnie posiadała zdolność adsorpcji na komórkach FZK lub wywoływania ich niewrażliwości na działanie wirusów. Podana w 4 godz. przed wirusem i usunięta z płynem hodowlanym działała silniej niż wtedy, gdy podana była w 2 godz. przed wirusem i pozostawała cały czas w płynie hodowlanym. Natomiast w przypadku PB II-13 wymagana była stała obecność substancji, szczególnie w czasie początkowych etapów replikacji wirusów. Prawdopodobnie działa ona na wczesne etapy replikacji: na adsorpcję i penetrację wirusa. Można przypuszczać, że związane to jest również ze zdolnością PB II-13 do inaktywacji wirusów zwłaszcza VSV. Wiele substancji pochodzenia naturalnego wykazuje działanie profilaktyczne, są one aktywne pod warunkiem użycia przed zakażeniem lub łącznie z wirusem. Tak działa cały szereg substancji zwanych induktorami interferonu (15), substancji przeciwwirusowych pochodzenia naturalnego, jak ekstrakty z morskich glonów (5, 22) lub niektóre preparaty przeciwwirusowe, np. amantadyna (16), która hamuje penetrację wirusa grypy do komórki.

PIŚMIENNICTWO

1. Borden E. C., Carter W. A., Sensenbrenner L. L., Owens A. H., Lichtenstein J., Gray G. D., Neil G. L., Nichol F. R., Li L. H.: Inhibition by Streptovarinins of Rauscher Virus Splenomegaly. *Int. J. Cancer* **14**, 817—825 (1974).
2. Bowers A., Halsall T. G., Jones E. R. H., (in part) Lemin A. J.: The Chemistry of the Triterpenes and Related Compounds. Part XVIII. Elucidation of the Structure of Polyporenic Acid C. *J. Chem. Soc.* 2548—2560 (1953).
3. Cross L. C., Eliot C. G., Heilbron I. M., Jones E. R. H.: Constituents of the Higher Fungi. Part I. The Triterpene Acids of *Polyporus betulinus* Fr. *J. Chem. Soc.* 632—636, (1940).
4. Curtis R. G., Heilbron I., Jones E. R. H., Woods G. F.: The Chemistry of the Triterpenes. Part XIII. The Further Characterisation of Polyporenic Acid A. *J. Chem. Soc.* 457—464 (1953).
5. Deig E., Ehresmann W., Hatch M. T., Riedlinger D. J.: Inhibition of *Herpesvirus* Replication by Marine Algae Extracts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 524—525 (1974).
6. Efimienko O. T.: O fiziologiczeski aktywnych wieszczestwach trutogo griba *Polyporus betulinus* (Bull.) Karst. *Mikrobiologija* **29**, 548—550 (1960).
7. Halsall T. G., Hodges R., Jones E. R. H.: The Chemistry of the Triterpenes and Related Compounds. Part XIX. Further Evidence Concerning the Structure of Polyporenic Acid A. *J. Chem. Soc.* 3019—3024 (1953).

8. Halsall T. G., Jones E. R. H., Lemin A. J.: The Chemistry of the Triterpenes. Part XV. The Environment of the Unreactive Double Bond of Polyporenic Acid A. J. Chem. Soc. 468—475 (1953).
9. Horoszewicz J. S., Rinehart K. L., Jr., Leong S. S., Carter W. A.: Activity of Pure Streptovaricins and Fractionated Streptovaricin Complex Against Friend Virus. Antimicrob. Agents Chemother, 281—284 (1975).
10. Jones E. R. H., Woods G. F.: The Chemistry of the Triterpenes. Part XIV. Further Evidence Concerning the Unsaturated Centres of Polyporenic Acid A. J. Chem. Soc. 464—468 (1953).
11. Kawecki Z., Kandefler-Szerszeń M., Kaczor J.: Ekstrakty z grzybów jako źródło substancji o aktywności przeciwwirusowej. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C, 35, 1 (1980).
12. Kandefler-Szerszeń M., Kawecki Z.: Ether Extracts from the Fruiting Body of *Piptoporus betulinus* as Interference Inducers. Acta Microbiol. Polonica 6, 197—200 (1974).
13. Kandefler-Szerszeń M., Kawecki Z., Sałata B., Witek M.: Grzyby kapeluszowe jako źródło substancji o aktywności przeciwwirusowej. Acta Mycol. (w druku).
14. Kandefler-Szerszeń M., Kawecki Z.: Wodne ekstrakty z grzybów jako źródło substancji o aktywności przeciwwirusowej. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C 34, 163 (1979).
15. Kandefler-Szerszeń M., Kawecki Z., Guz M.: Fungal Nucleic Acids as Interferon Inducers, Acta Microbiol. Polonica (w druku).
16. Kaufman H. E.: Antiviral Drugs. Dermatology 16, 464—475 (1977).
17. Kocór M., Małunowicz I., Szwed K.: Chemical Composition of Petrol Extract of *Polyporus betulinus*. Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Chim. 8, 337—343 (1960).
18. Marcus S.: Antibacterial Activity of the Triterpenoid Acid (Polyporenic Acid C) and of Ungulinic Acid. Metabolic Products of *Polyporus betulinus*. Biochemistry J. 50, 516—517 (1952).
19. Milavetz I., Carter W. A.: Streptovaricins. Pharmac. Ther. 1, 289—305 (1977).
20. Pasich B.: Związki trójterpenowe w materiale roślinnym. Część I. Chromatografia bibułowa kwasów trójterpenowych. Dissert Pharmac. 23, 23—29 (1959).
21. Pan S. C., Laskin A. I., Principe P.: Paper Chromatography of Triterpenoid and Steroid Acids. J. Chromatogr. 8, 32—36 (1962).
22. Richards J. T., Kern E. R., Glasgow L. A., Overall J. C., Deign E. F., Hatch M. T.: Antiviral Activity of Extracts from Marine Algae. Antimicrob. Agents Chemother. 24—30 (1978).
23. Sthal E.: Chromatographische und mikroskopische Analyse von Drogen. Gustav Fischer Verlag, 182—184 (1970).
24. Wandokanty F., Kocór M., Utzig J., Małunowiczowa I.: Ciała hamujące mitozę zawarte w żagwi brzozej *Polyporus betulinus*. Medycyna Weterynaryjna 5, 289—290 (1954).

РЕЗЮМЕ

Применены методы колонной абсорбционной хроматографии для выделения антивирусного вещества из *Piptoporus betulinus*. Выполнен ряд хроматографий в разных системах носителей и элюентов, затем полученные фракции иссле-

довались с точки зрения противобактерийной и антивирусной активности. Установлено, что некоторые из полученных хроматографических фракций обладают противобактерийной активностью, особенно по отношению к *Sarcina lutea*, *Staphylococcus epidermidis* и к разным штаммам *Bacillus*. Определена вирулицидная активность полученных хроматографических фракций и изучалось их влияние на разные этапы репликации вирусов. Установлено, что некоторые хроматографические фракции активны против вирусов везикулярного стоматита (ВВС), осповакцины (ВОВ) и клещевого энцефалита.

SUMMARY

The application of adsorption column chromatography for the isolation of antiviral substances from *Piptoporus betulinus* is presented. A number of chromatograms in various carrier — eluent systems were made and the fractions obtained were examined in respect to their antibacterial and antiviral activities. It was found that some of the obtained chromatographic fractions had antibacterial activity against *Sarcina lutea*, *Staphylococcus epidermidis* and various strains of *Bacillus*. The virucidal activity of the obtained chromatographic fractions was determined as well as their effects on different stages of virus replication. It was found that some chromatographic fractions were active against the viruses of vesicular stomatitis (VSV), vaccinia, and thick borne encephalitis (TBE).