

**Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр вирусологии и
биотехнологии «Вектор», Россия**

**State Research Center of Virology and Biotechnology
«Vector»**

**БАЗИДИАЛЬНЫЕ ГРИБЫ ЮГА ЗАПАДНОЙ СИБИРИ –
ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ
противовирусных препаратов**

**Теплякова Т.В.
доктор биологических наук , профессор**



Грибы в питании ,профилактике и лечении

- Съедобные грибы представляют собой ценный питательный продукт, имеющий в своем составе белки с набором незаменимых аминокислот, углеводов, жиров, минеральных солей и микроэлементов, а также пищевых волокон.
- Тысячелетия дикорастущие грибы применяются человеком в пищу и в народной медицине различных стран. Известно, что животные и птицы в природных условиях активно используют дикорастущие грибы в качестве средства от паразитарных и других заболеваний (различные трутовики, мухомор).
- Научные исследования показали, что грибы содержат в плодовых телах и мицелии биологически активные вещества, такие как полисахариды, гликопротеины, терпены, стеролы, пигменты и др., которые могут проявлять антибактериальные, противовирусные, противоопухолевые, противопаразитарные и иммуномодулирующие свойства.
- Грибные экстракты и некоторые индивидуальные соединения (полисахариды, меланины, белки) оказывают комплексное воздействие на процесс протекания вирусной инфекции: непосредственное связывание вирусных частиц, ингибирование репликации вируса в клетке, иммуномодулирующее действие на организм хозяина. Воздействие нескольких механизмов противовирусной активности будет препятствовать возникновению резистентных штаммов вирусов.

- Высшие базидиальные грибы являются одним из перспективных источников получения лекарственных препаратов. В странах юго-восточной Азии из базидиальных грибов выпускают препараты, содержащие полисахариды и их комплексы с белками, которые широко используются при лечении онкологических заболеваний. Многие исследователи отмечают связь противоопухолевой и противовирусной активностей водных экстрактов и полисахаридов из грибов.
- В растительных сообществах юга Западной Сибири и Алтая известно более 2000 видов макромицетов, многие из которых могут представлять большой интерес для изучения и применения их в медицине.
- В немногочисленных зарубежных и отечественных исследованиях по базидиальным грибам показано, что грибы содержат биологически активные вещества, обладающие антивирусными свойствами. Литературные данные свидетельствуют о том, что разные классы биологических соединений, полученные из грибов, способны ингибировать развитие вируса в организме. Это дает возможность разрабатывать более эффективные препараты на комплексной основе, влияющие на различные этапы репродукции вируса.
- Поиск и выделение новых видов и штаммов лекарственных грибов из природных местообитаний Западной Сибири в культуру открывает перспективы пополнения коллекций активными продуцентами для развития медицинской биотехнологии и разработки новых фармакологических препаратов против онкологических заболеваний и вирусных инфекций.

Задачи исследования

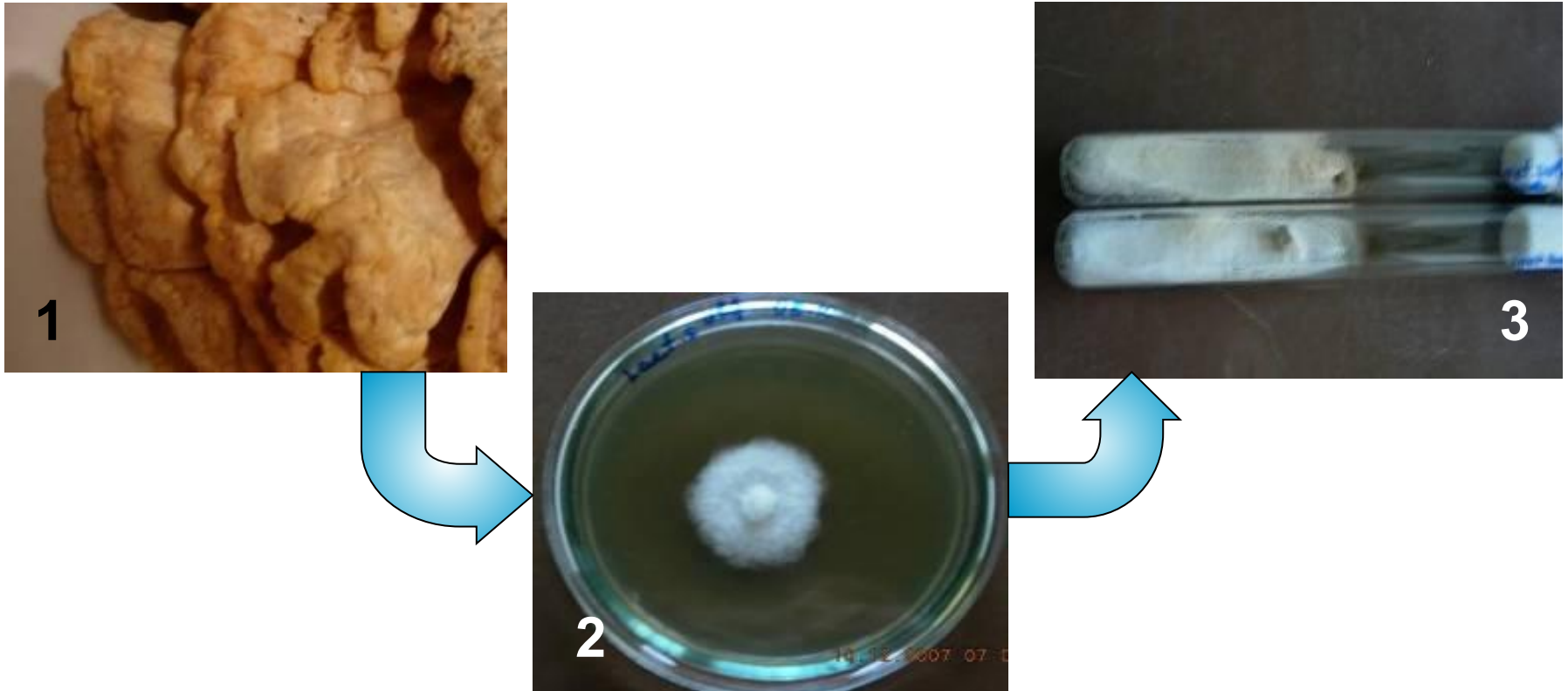
Отбор базидиальных грибов из природных местообитаний юга Западной Сибири, выделение в чистую культуру и изучение их морфолого-культуральных и микроморфологических особенностей.

Подбор условий культивирования для базидиальных грибов с целью получения биомассы мицелия.

Получение водных экстрактов, полисахаридных фракций и меланина из плодовых тел и культивируемого мицелия грибов и оценка их противовирусной активности в отношении ряда вирусов, патогенных для человека.

Характеризация перспективных штаммов базидиальных грибов для разработки противовирусных препаратов.

Выделение грибов в чистую культуру

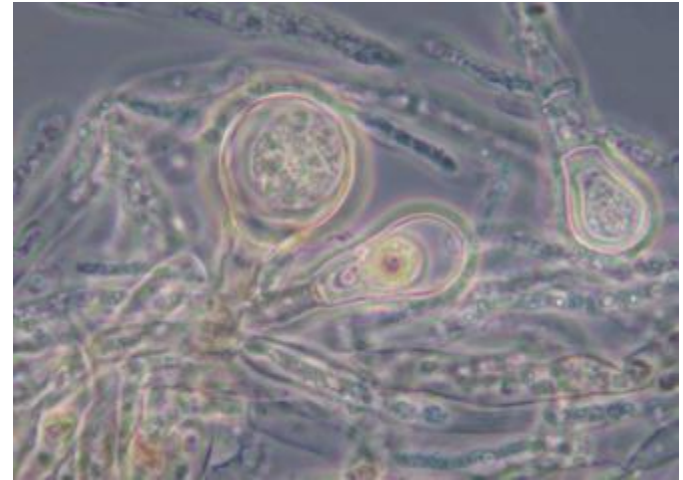


- 1 – Трутовик серно-желтый *Laetiporus sulphureus*, плодовое тело;
- 2 – Молодая колония после очистки от микромицетов-контаминантов
- 3 – Чистая культура на пробирках

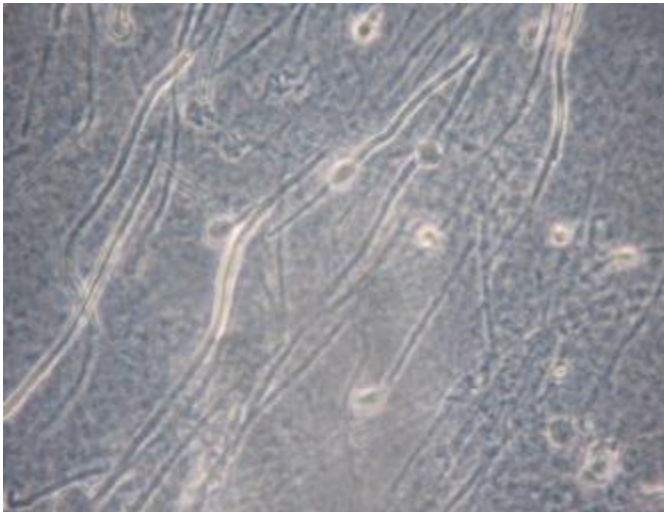
Микроморфологические признаки при идентификации видов базидиальных грибов



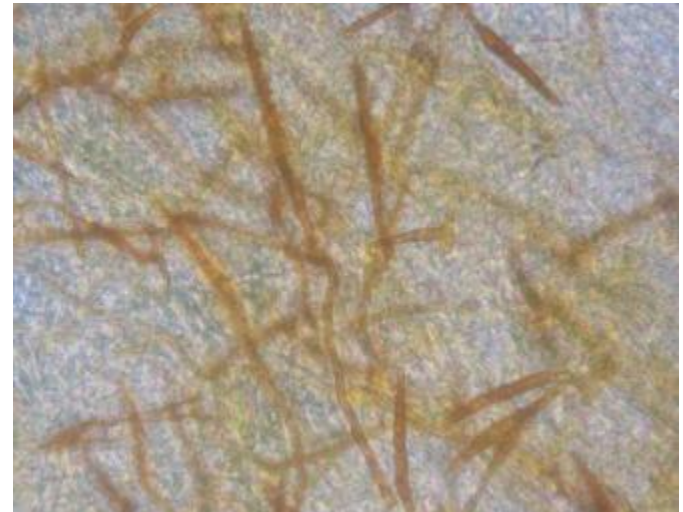
Пряжка на гифе трутовика плоского
Ganoderma applanatum M-8, ×1000



Бластоконидии трутовика серно-желтого
Laetiporus sulphureus O-9, ×1000



Хламидоспоры трутовика плоского
Ganoderma applanatum M-8, ×400



Щетинковидные гифы чаги
Inonotus obliquus T-9, ×400

Получение стадии телеоморфы (плодовых тел) в культуре



Плодовые тела
вешенки легочной
*Pleurotus
pulmonarius* K-96
на березовых
опилках



Колония опенка зимнего
Flammulina velutipes
с плодовыми телами в чашке
Петри



Плодовые тела
вешенки устричной
Pleurotus ostreatus
БШ-08/1
на лузге подсолнечника



Научные достижения лаборатории микологии

- Во всем мире широкое развитие получают биотехнологии на основе грибов, для развития которых важное значение имеет наличие высокопродуктивных и эффективных штаммов – продуцентов биологически активных соединений. В ГНЦ ВБ Вектор за период с 2008 г. по настоящее время из природных местообитаний Сибири выделены из плодовых тел в чистую культуру 132 штамма из 60 видов базидиальных грибов, имеющих пищевое и лекарственное назначение. К съедобным относятся *Pleurotus ostreatus* (вешенка обыкновенная или устричная), *Pleurotus pulmonarius* (вешенка легочная), *Coprinus comatus* (навозник белый или лохматый), *Laetiporus sulphureus* (трутовик серно-желтый), *Flammulina velutipes* (опенок зимний), *Lycoperdon perlatum* (дождевик шиповатый), *Lycoperdon utriforme* (дождевик мешковидный), *Grifola frondosa* (грифола курчавая), *Phallus impudicus* (веселка обыкновенная), *Piptoporus betulinus* (трутовик березовый) и другие. К чисто лекарственным грибам (с твердыми плодовыми телами): *Fomitopsis officinalis* (лиственничная губка, трутовик лиственничный), *Ganoderma applanatum* (трутовик плоский), *Fomes fomentarius* (трутовик обыкновенный), *Trametes versicolor* (траметес разноцветный), *Inonotus obliquus* (чага).

Список базидиальных грибов, выделенных в культуру (82 штамма 44 видов грибов, 2014)

Виды грибов	Количество штаммов	Виды грибов	Количество штаммов
Астерофора звездчато-споровая <i>Asterophora lycoperdoides</i> (Bull.) Ditmar	1	Дождевик шиповатый, жемчужный <i>Lycoperdon perlatum</i> Pers.	2
Баттареа веселковидная <i>Battarrea phalloides</i> (Dicks.) Pers.	1	Головач мешковидный <i>Lycoperdon utriforme</i> Bull.	1
Головач сиреневатый <i>Calvatia lilacina</i> (Mont. & Berk.) Henn.	1	Пилолистник чешуйчатый, шпальный гриб <i>Neolentinus lepideus</i> (Fr.) Redhead & Ginns	1
Церрена многоцветная <i>Cerrena unicolor</i> (Bull.) Murrill	1	Панеллюс вяжущий <i>Panellus stipticus</i> (Bull.) P. Karst.	2
Хлорофиллум агарикоидный <i>Chlorophyllum agaricoides</i> (Czern.) Vellinga	1	Веселка обыкновенная <i>Phallus impudicus</i> L.	1
Говорушка серая, дымчатая <i>Clitocybe nebularis</i> (Batsch) P. Kumm.	1	Трутовик ложный, дубовый <i>Phellinus igniarius</i> (L.) Quél.	1
Навозник белый, лохматый <i>Coprinus comatus</i> (O.F. Müll.) Pers.	2	Трутовик осиновый <i>Phellinus tremulae</i> (Bondartsev) Bondartsev & P.N. Borisov	1
Бокальчик Олла <i>Cyathus olla</i> (Batsch) Pers.	1	Трутовик березовый <i>Piptoporus betulinus</i> (Bull.) P. Karst.	3
Дедалеопсис шершавый <i>Daedaleopsis confragosa</i> (Bolton) J. Schröt.	2	Вешенка покрытая <i>Pleurotus calyptratus</i> (Lindblad ex Fr.) Sacc.	2

Список базидиальных грибов, выделенных в культуру (продолжение)

Виды грибов	Количество штаммов	Виды грибов	Количество штаммов
Трутовик настоящий, обыкновенный <i>Fomes fomentarius</i> (L.) Fr.	2	Вешенка устричная, обыкновенная <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	9
Трутовик лиственничный <i>Fomitopsis officinalis</i> (Vill.) Bondartsev & Singer	1	Вешенка легочная <i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fr.) Quél.	2
Трутовик окаймленный <i>Fomitopsis pinicola</i> (Sw.) P. Karst.	5	Полипорус клубненосный <i>Polyporus tuberaster</i> (Jacq. ex Pers.) Fr.	2
Трутовик плоский <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.	5	Трутовик каштановый <i>Royoporus badius</i> (Pers.) A. B. De	1
Ежовик кудрявый <i>Hericium cirrhatum</i> (Pers.) Nikol.	1	Строфария сине-зеленая <i>Stropharia aeruginosa</i> (Curtis) Quél.	1
Корневая губка <i>Heterobasidion annosum</i> (Fr.) Bref.	1	Трутовик горбатый <i>Trametes gibbosa</i> (Pers.) Fr.	3
Трутовик скошенный, чага <i>Inonotus obliquus</i> (Ach. ex Pers.) Pilát	3	Траметес жестковолосистый <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Lloyd	1
Ишнодерма смолистая <i>Ischnoderma benzoinum</i> (Wahlenb.) P. Karst.	1	Траметес охряный <i>Trametes ochracea</i> (Pers.) Gilb. & Ryvarden	1
Трутовик серно-желтый <i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murrill	2	Траметес опушенный <i>Trametes pubescens</i> (Schumach.) Pilát	1
Пилолистник бокаловидный <i>Lentinus cyathiformis</i> (Schaeff.) Bres.	1	Траметес пахучий <i>Trametes suaveolens</i> (L.) Fr.	1
Пилолистник тигровый <i>Lentinus tigrinus</i> (Bull.) Fr.	1	Траметес Трога <i>Trametes trogii</i> Berk.	1
Ленцитес березовый <i>Lenzites betulina</i> (L.) Fr.	1	Траметес разноцветный <i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd	6
Дождевик умбровый <i>Lycoperdon umbrinum</i> Pers.	1	Трихептум двоякий <i>Trichaptum biforme</i> (Fr.) Ryvarden	1



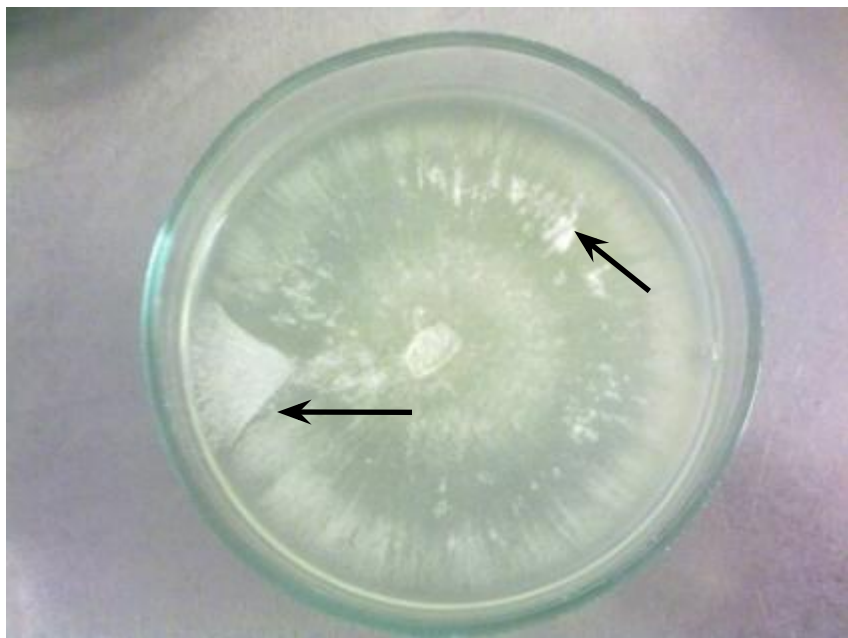
Применительно к таким видам грибов , как шампиньон , вешенка , фламмулина , шиитаке , кольцевик апробированы технологии их выращивания на разных субстратах , представляющих собой отходы сельскохозяйственного производства (солома, подсолнечная лузга, шелуха гречки, костра льна).

Выращивание грибов является мало- или безотходной технологией , так как субстрат после плодоношения содержит ценные питательные компоненты и может быть использован в качестве кормовой добавки или стимулятора роста овощных культур.

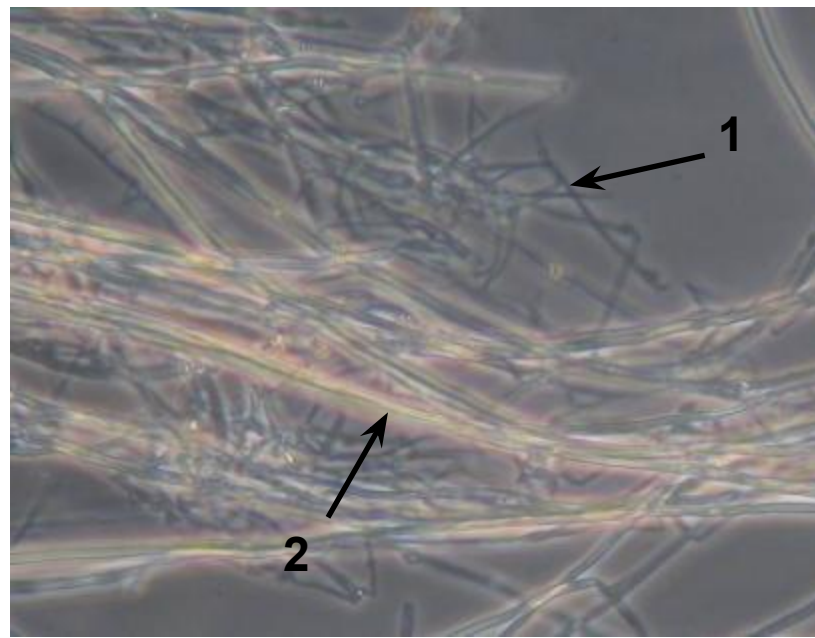
Данные виды по сокращенной технологии могут использоваться для обогащения грубых кормов ,например, соломы для крупного рогатого скота. Такой опыт проводился в НИИ животноводства СО ВАСХНИЛ.

Плодовые тела съедобных грибов , выращенных в контролируемых условиях , кроме пищевого назначения, могут быть использованы для получения из них кормовых добавок , лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище человека (БАД) .

Выявление микофильных грибов в культурах базидиомицетов и разработка методики контроля и очистки от них на разных этапах роста



Колония **дихомитуса полевого**
Dichomitus campestris 2255 с
пятнами и секторами
микофильного гриба



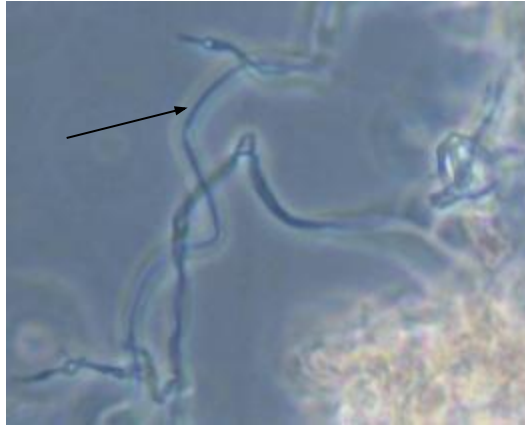
Тонкие гифы микофила (1)
и скелетные гифы (2)
дихомитуса полевого
D. campestris 2255

Микофильные грибы в культурах базидиомицетов, ×1000

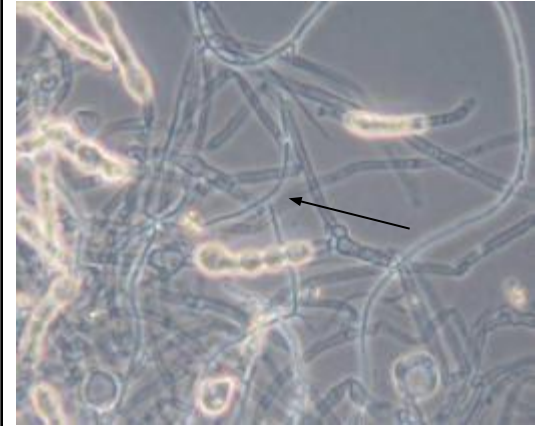
Церрена одноцветная
Cerrena unicolor C-08/8



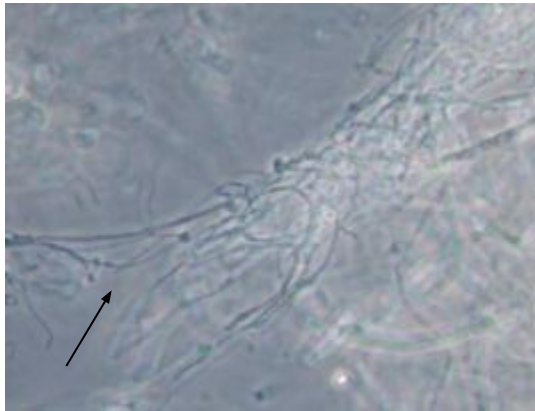
Дедалеопсис шершавый
Daedaleopsis confragosa
2266



Трутовик плоский
Ganoderma applanatum M-8



Грифола курчавая
Grifola frondosa PSt



Чага
Inonotus obliquus T-9



Вешенка устричная
Pleurotus ostreatus K-09-26



Микофильные грибы показаны стрелками

- Из микофильных грибов, имеющих спороношение, нами отмечены грибы из родов *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium*.
- С целью предотвращения использования ложных продуцентов биомассы, была разработана стандартная операционная процедура «Контроль культур базидиальных грибов на наличие микофилов на разных этапах (хранение, посев, выращивание биомассы)».

Поверхностное и глубинное культивирование на жидких средах

- При подготовке экстрактов биомассу вновь выделенных грибов получали путем поверхностного культивирования на жидких питательных средах, содержащих отвары овса, пшеницы, пригодные для культивирования многих грибов.
- Для перспективных штаммов подбирали питательные среды на основе глюкозы, пептона, свекловичной мелассы и кукурузного экстракта с целью получения биомассы в глубинных условиях.



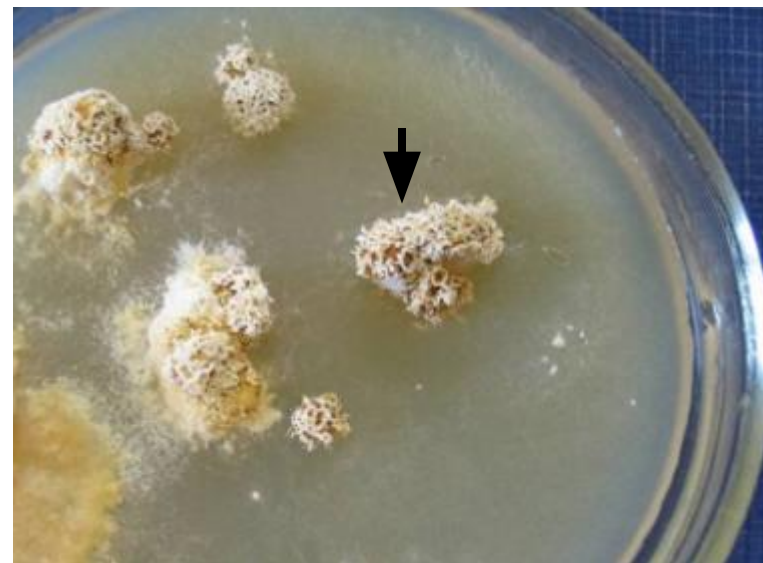
Результаты по изучению культурально-морфологических характеристик выделенных штаммов трутовика скошенного *Inonotus obliquus* (чаги)



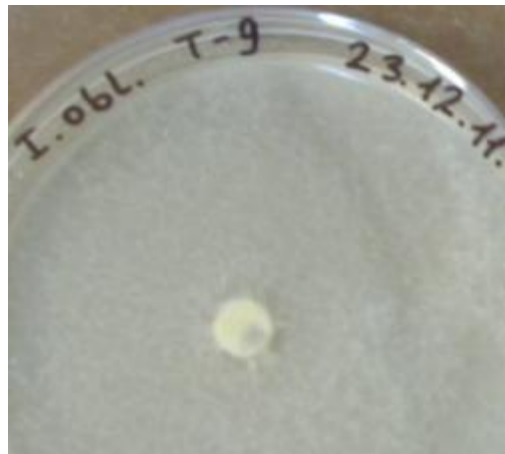
Выделены 3 штамма *Inonotus obliquus*

1 штамм VKM F-1656 получен из Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино

Плодовые тела *Inonotus obliquus* T-9 на агаризованном овсяном отваре в пробирке и чашке



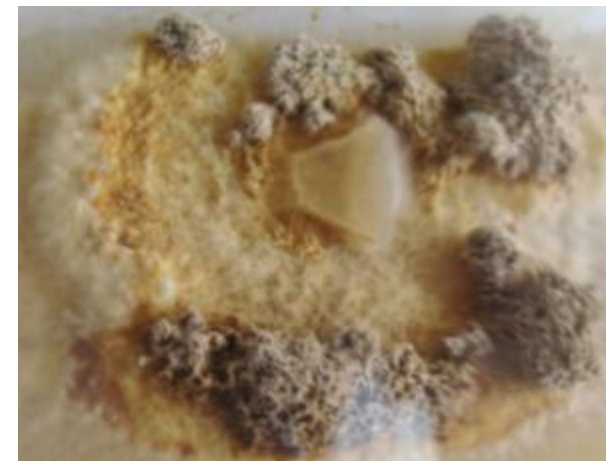
Морфологические и микроморфологические особенности *I. obliquus* T-9 в поверхностной культуре



10 суток



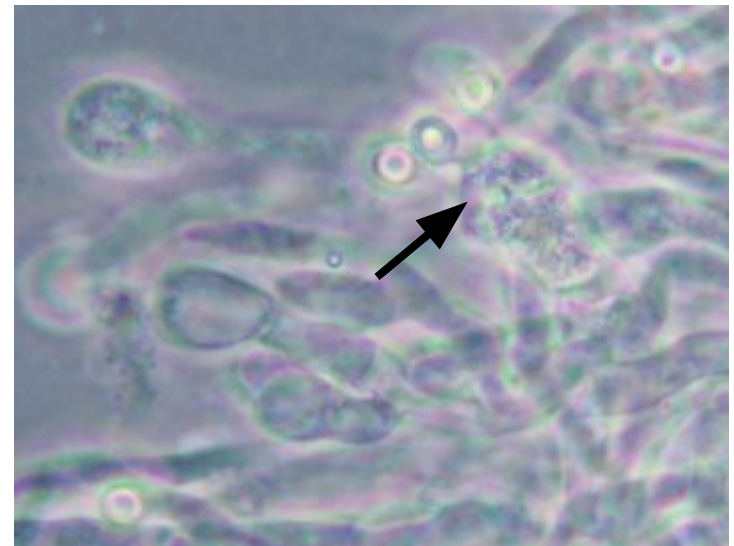
20 суток



30 суток



Высыпание базидиоспор



Базидии с базидиоспорами, ×1000

Отбор наиболее продуктивного штамма *I. obliquus* для наработки биомассы мицелия и меланинов

Продуктивность мицелия штаммов *Inonotus obliquus*, 9 суток роста на агаризованном овсяном отваре в чашках Петри

Штаммы <i>I. obliquus</i>	Диаметр колонии ($M \pm S_m$), мм	Высота колонии, мм	Плотность колонии, балл	Ростовой коэффициент
F-1656	65,8±5,3	3	1	22,0
B-09-23	55±4,7	3	1	18,3
C-09-01	76,7±3,3	2	2	34,2
T-9	72,4±4,5	3	2	48,0

Примечания:

M – среднее арифметическое; S_m – стандартное отклонение

Выход биомассы *I. obliquus* T-9 в жидких средах в поверхностной культуре ($M \pm S_m$), г/л

Вид и штамм гриба	ОО	МК	ГПС
<i>I. obliquus</i> T-9	2,9±0,2	3,2±0,2	10,5±0,1

Примечания:

M – среднее арифметическое; S_m – стандартное отклонение; ОО – овсяной отвар;

МК – среда на основе мелассы и кукурузного экстракта;

ГПС – глюкозо-пептонная среда

Выход биомассы по сухому веществу (г/л) в глюкозо-пептонной среде составил:

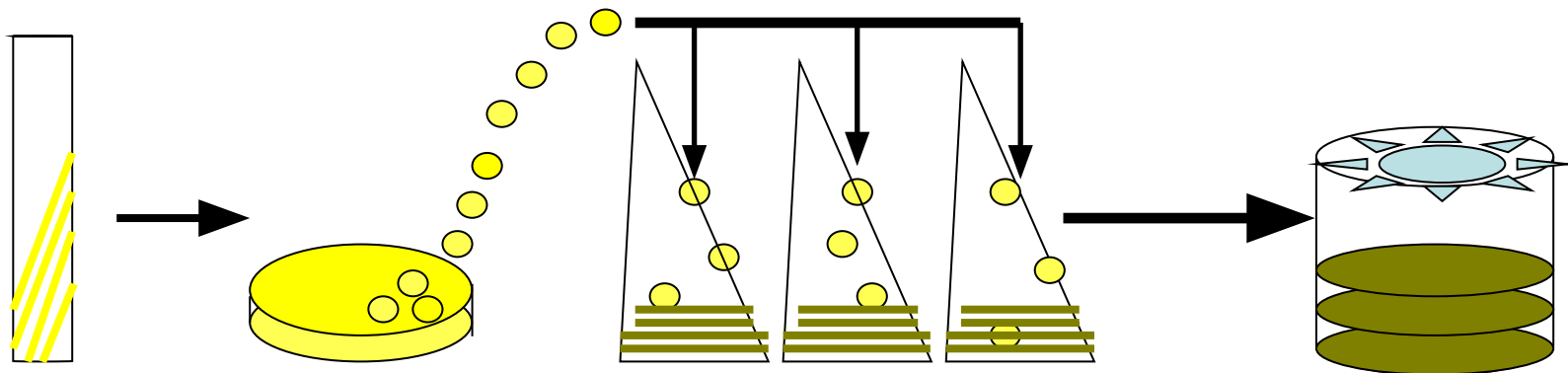
- В поверхностной культуре – 10,5±0,1 г/л
- В погруженной культуре на качалке – 17,2±0,8 г/л
- В погруженной культуре в ферментере – 22,3±1,2 г/л



I. obliquus T-9, 5 суток культивирования в глюкозо-пептонной среде в газо-вихревом ферментере БИОК

Процесс получения биомассы в глубинной культуре

Засев колб блоками диаметром 8 мм,
10 блоков на 100 мл жидкой среды



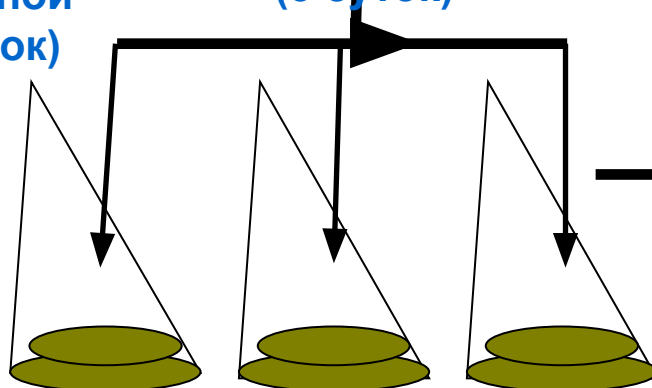
Исходная
культура

Получение колоний
гриба
на агаризованной
среде (5-7 суток)

Выращивание посевного
материала на качалках
(3 суток)

Получение биомассы в
ферментере (4-9 суток)

Получение биомассы
гриба,
начиная от пробирки,
занимает 2-3 недели



Получение биомассы в колбах
на качалке (6-12 суток)

Получение
биологически
активных
компонентов
из биомассы и КЖ

Засев жидкой культурой, 5-10 % от объема среды

Подготовка образцов для оценки на противовирусную активность

- **Водные экстракты из плодовых тел –**
прогревание их суспензии в воде в кипящей водяной бане.
- **Водные экстракты из мицелия –**
разрушение биомассы мицелия с помощью ультразвука или прогревание их суспензии в воде в кипящей водяной бане.
- **Суммарные полисахариды –**
осаждение этиловым спиртом 96 % (соотношение 1:1) из экстрактов в течение 18 часов при температуре от 4 до 8 °С.
- **Меланин из природной и культивированной чаги –**
щелочной гидролиз.
- **Меланин из культуральной жидкости –**
осаждение кислотой.

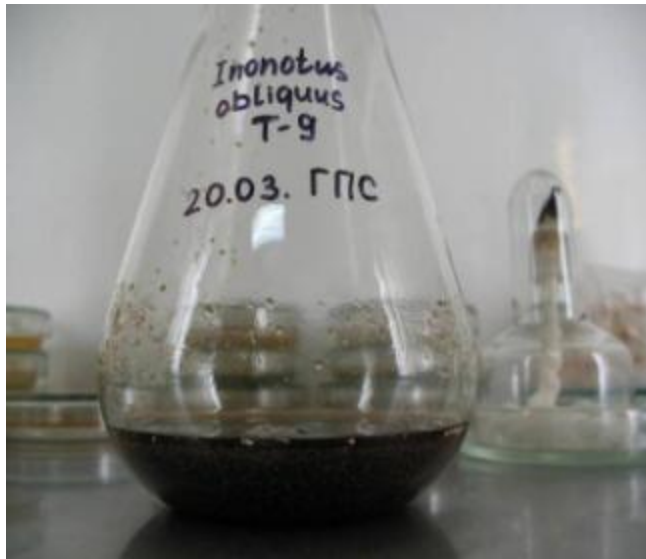
Повышение выхода меланинов из природного сырья *I. obliquus*

Размеры частиц чаги разных способов подготовки	№ варианта	Условия экстракции	Выход меланина, ($M \pm S_m$, n=4), %
Размеры частиц до 7 мм (аптечное сырье)	1	2 суток при 50 °С	11,0 ± 1,0
	2	30 минут при 112 °С	13,3 ± 1,6
Размеры частиц до 2 мм (мельница ИКА MF 10)	3	2 суток при 50 °С	21,3 ± 1,1
	4	30 минут при 112 °С	24,4 ± 1,8
Размеры частиц 70-80 мкм, механохимическая обработка, (мельница РМ-1)	5	2 суток при 50 °С	28,2 ± 2,3
	6	30 минут при 112 °С	30,1 ± 2,0

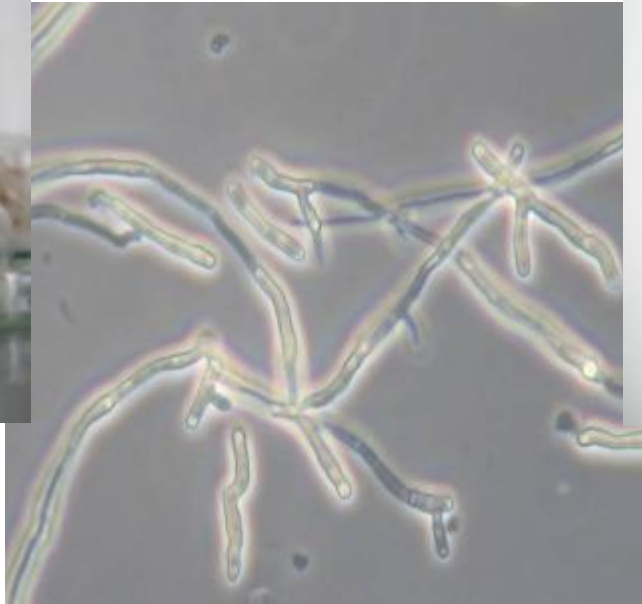
П р и м е ч а н и я:

M – среднее арифметическое; S_m – стандартное отклонение; n – число опытов

Получение меланинов на основе штамма *I. obliquus* T-9



Темно-коричневое
окрашивание
культуральной
жидкости при росте чаги
на качалке
на 9-е сутки



Появление коричневатых
фрагментов гиф
при выделении меланинов
в культуральную жидкость



Меланины из культуральной
жидкости и биомассы гриба

Выход меланинов из мицелия чаги составил $4,0 \pm 0,1$ г/л по сухому веществу или 20 % от сухой массы мицелия

Скрининг образцов из грибов на противовирусную активность (количество образцов)

ВПГ-2	ВЗН	ВИЧ-1	Вирус гриппа (ВГ)		Ортопоксвирусы		
			Chicken (H5N1)	Aichi (H3N2)	ВНО	ВОВ	ВОО
111	75	57	161		43		

ВПГ-2 - вирус простого герпеса 2 типа

ВЗН - вирус Западного Нила

ВИЧ-1 - вирус иммунодефицита человека 1 типа

ВГ - вирус гриппа

ВНО - вирус натуральной оспы

ВОВ - вирус осповакцины

ВОО - вирус оспы обезьян

Перспективные виды базидиальных грибов Сибири

Наименование видов грибов	для разработки противовирусных препаратов						Ортопоксвирусы		
	ВПГ-2	ВЗН	ВИЧ-1	Вирусы гриппа			ВНО	ВОВ	ВОО
				H5N1	H3N2	(H1N1)v			
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	●	●		●	●				
<i>Fomes fomentarius</i>	●			●	●				
<i>Fomitopsis officinalis</i>				●	●		●	●	
<i>Ganoderma applanatum</i>	●		●	●		●	●		
<i>Inonotus obliquus</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●
<i>Laetiporus sulphureus</i>	●	●		●	●	●			
<i>Lycoperdon perlatum</i>				●	●	●			
<i>Phallus impudicus</i>	●			●	●				
<i>Pleurotus ostreatus</i>	●	●	●	●					
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	●	●	●	●	●				
<i>Trametes versicolor</i>	●	●	●	●	●				

Эффективные виды и штаммы базидиальных грибов, проявляющие противовирусную активность

Вид гриба, штамм	Источник получения биомассы гриба, наименование образца	ВИЧ-1	ВПГ-2	ВЗН	ВГ	ВОВ	ВНО	ВОО
Дедалеопсис шершавый <i>D. confragosa</i> К-116	Мицелий	—	•	•	•			
Трутовик настоящий <i>F. fomentarius</i> Кр-112	Плодовое тело				•			
	Мицелий	—	•	—	•			
	Полисахариды		•	—				
Трутовик лиственничный <i>F. officinalis</i> СА-8	Плодовое тело		—		•	•	•	
	Мицелий				•			
	Полисахариды				•		•	
Трутовик плоский <i>G. applanatum</i> М-8	Плодовое тело	•	•		•		•	
	Полисахариды		•		•		•	
Трутовик скошенный, чага <i>I. obliquus</i> Т-9	Склероций	•	•	•	•		•	•
	Мицелий	—	•	•	•	—		
	Полисахариды		•	•				
	Меланин	•	•		•	•		•

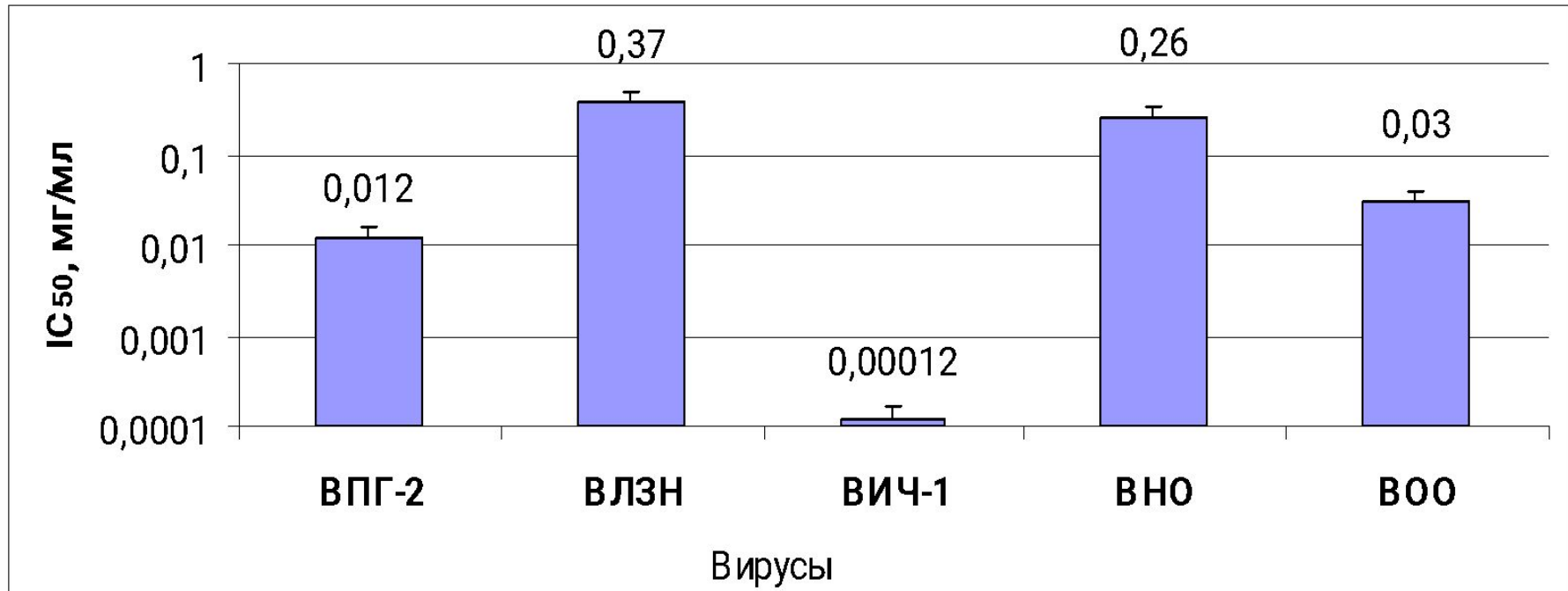
• — отмечена активность, — нет активности, пустые ячейки — исследования не проводили

Эффективные виды и штаммы базидиальных грибов, проявляющие противовирусную активность (продолжение)

Вид гриба, штамм	Источник получения биомассы гриба, наименование образца	ВИЧ-1	ВПГ-2	ВЛЗН	ВГ	ВОВ	ВНО	ВОО
Трутовик серно-желтый <i>L. sulphureus</i> O-9	Плодовое тело	–	–		●	–		
	Мицелий		●	–	●			
	Полисахариды		●	●	●			
Веселка обыкновенная <i>P. impudicus</i> K-917	Плодовое тело	–	●		●	–		
	Мицелий		●		●			
	Полисахариды		●		●	–		
Вешенка устричная <i>P. ostreatus</i> БШ-08-01	Мицелий	●	●	●	●			
	Полисахариды		●	●				
Вешенка легочная <i>P. pulmonarius</i> K-96	Мицелий	●	●	●	●			
	Полисахариды		●	●	●	–		
Траметес разноцветный <i>T. versicolor</i> K-817	Плодовое тело		●	●				
	Мицелий	●			●			

● – отмечена активность; – нет активности; пустые ячейки – исследования не проводили 27

Спектр противовирусной активности гриба *I. obliquus*



Примечание: IC₅₀ – 50 % ингибирующая концентрация образца

Водные экстракты *I. obliquus* в концентрации $0,050 \pm 0,016$ мг/мл подавляли $4,7 \pm 1,2$ lg вируса гриппа (H5N1) (титр вируса гриппа в контроле $7,8 \pm 1,0$ lg)

Токсичность и противовирусная активность образцов на основе чаги в отношении ВПГ-2, профилактическая схема применения

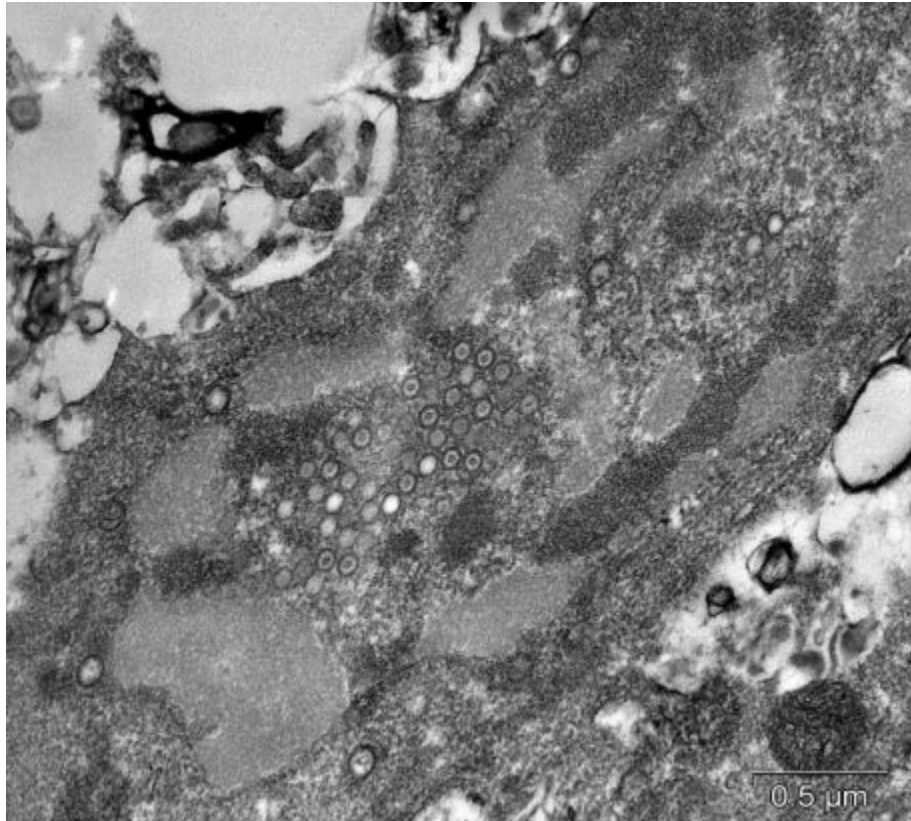
(однократное внутрибрюшинное введение)

Водные растворы	Исходная концентрация раствора по сухому веществу, ($M \pm S_m$), мг/мл	Нетоксичная концентрация для мышей, ($M \pm S_m$), мг/мышь	Количество выживших животных, %
Чага	20,0±2,1	2,0±0,21	90
Меланин	25,0±2,4	0,5±0,048	88
Бефунгин	10,7±1,1	0,0005±0,00005	66

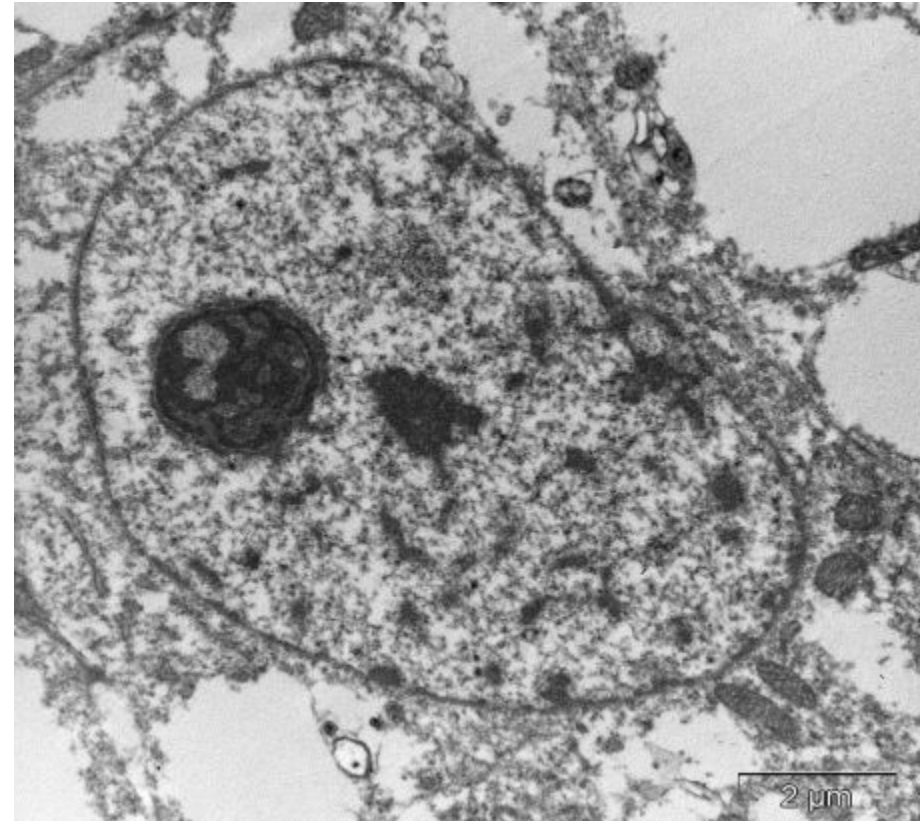
П р и м е ч а н и я:

М – среднее арифметическое; S_m – стандартное отклонение

Подавление репродукции вируса герпеса экстрактом чаги



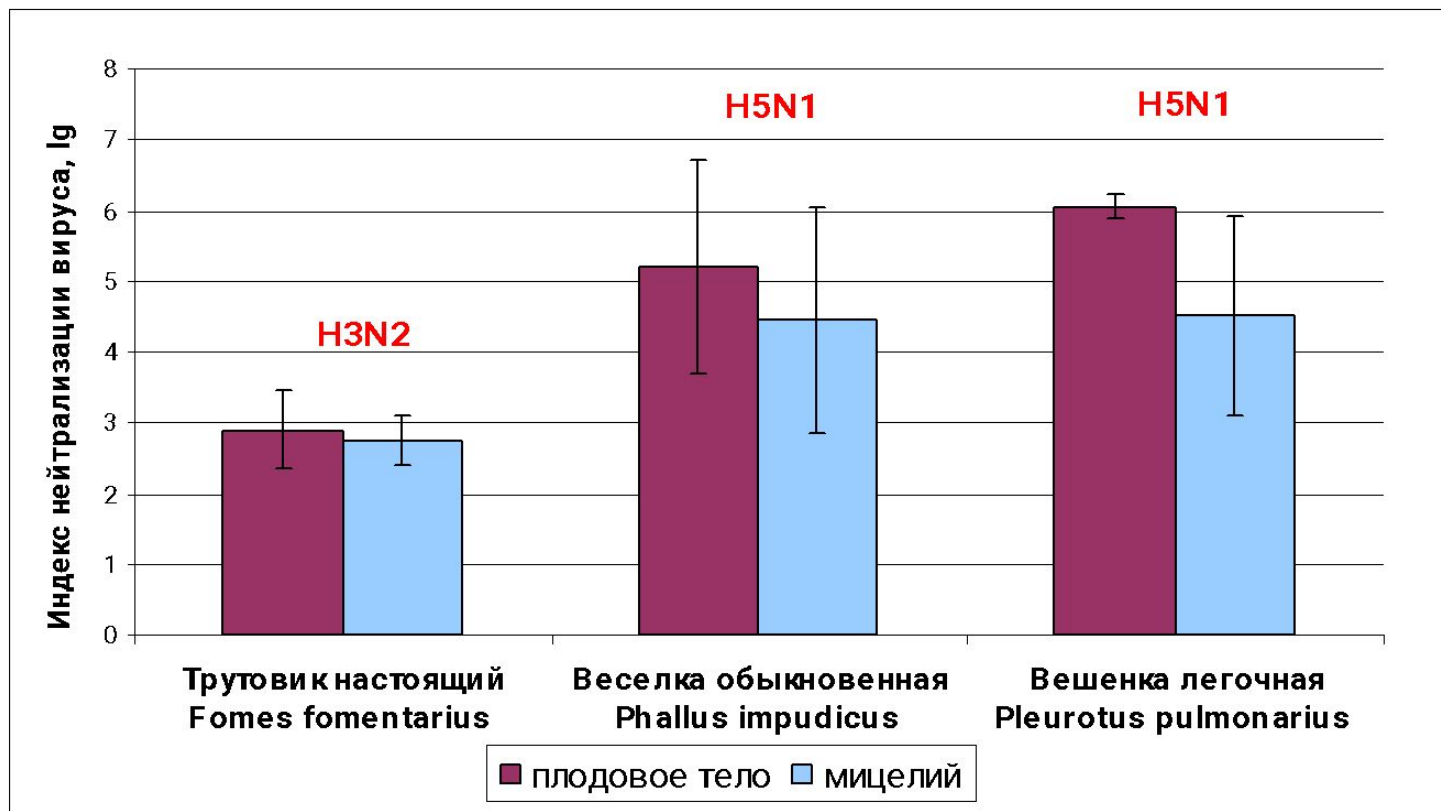
Нуклеокапсиды вируса герпеса и нарушение структуры ядра клетки Vero, «спекание» хроматина, 24 часа после заражением вирусом



48 часов инкубации после обработки экстрактом, отсутствие признаков инфекции

Фото Рябчиковой Е.И.

Сравнительная эффективность водных экстрактов из плодовых тел и биомассы мицелия грибов в отношении вируса гриппа субтипов H5N1 и H3N2



Примечание: IC_{50} – 50 % ингибирующая концентрация образца

Титр вируса в контроле составил
для H3N2 – $7,5 \pm 0,5$ Ig,
для H5N1 – $7,8 \pm 1,0$ Ig

Выход биомассы базидиальных грибов при культивировании в ферментере на ГПС

Вид, штамм гриба	Время культивирования, сутки	Выход биомассы сухого мицелия, ($M \pm S_m$), г/л
<i>Laetiporus sulphureus</i> , О-9	6	12,10±0,45
<i>Inonotus obliquus</i> , Т-9	7	22,29±2,1
<i>Pleurotus pulmonarius</i> , К-96	6	17,5±1,6

П р и м е ч а н и я:

М – среднее арифметическое; S_m – стандартное отклонение

Противовирусная активность образцов экстрактов высших грибов *in vivo* в отношении вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005(H5N1) (профилактическая схема)

№ образца	Наименование образца	Концентрация сухого вещества, мг/мл	Количество выживших животных, %	СПЖ, (M±S _m), сутки
11-65	<i>Cyathus olla</i>	0,6	3 (50,0 %)	12,24±0,86
11-115	<i>Lycoperdon perlatum</i>	0,1	1 (16,6 %)	11,23±1,52
11-103	<i>Ganoderma applanatum</i>	0,1	2 (33,3 %)	11,55±1,08
11-106	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	0,1	2 (33,3 %)	12,62±1,16
11-118	<i>Fomes fomentarius</i>	0,1	4 (66,6 %)	12,29±0,76
Тамифлю	–	0,4	2 (33,3 %)	12,52±1,10
Контроль	Дистиллированная вода	–	1 (16,6 %)	11,90±1,51

Примечания:

СПЖ – средняя продолжительность жизни;

M – среднее арифметическое; S_m – стандартное отклонение

Эффективность водных экстрактов из мицелия и суммарных полисахаридных фракций

Вид, штамм гриба	Вирус простого герпеса 2 типа IC ₅₀ (M±S _m), мг/мл по сухому веществу		Вирус натуральной оспы IC ₅₀ (M±S _m), мг/мл по сухому веществу	
	Водный экстракт	Суммарные полисахариды	Водный экстракт	Суммарные полисахариды
Трутовик лиственничный <i>Fomitopsis officinalis</i> CA-8	н.и.	н.и.	0,07±0,02	0,0040±0,0012
Трутовик плоский <i>Ganoderma applanatum</i> M-8	н.и.	н.и.	1,0±0,3	0,0050±0,0015
Трутовик настоящий <i>Fomes fomentarius</i> Кр-112	0,20±0,06	0,010±0,003	н.и.	н.и.
Трутовик скошенный, чага <i>Inonotus obliquus</i> Т-9	0,3±0,1	0,12±0,04	н.и.	н.и.
Веселка обыкновенная <i>Phallus impudicus</i> К-917	0,030±0,009	0,003±0,001	н.и.	н.и.
Вешенка устричная <i>Pleurotus ostreatus</i> БШ-08-01	0,150±0,045	0,050±0,014	н.и.	н.и.
Вешенка легочная <i>Pleurotus pulmonarius</i> К-96	0,48±0,16	0,25±0,08	н.и.	н.и.

Примечания:

н.и. – не исследовали; IC₅₀ – 50 % ингибирующая концентрация образца;

М – среднее арифметическое; S_m – стандартное отклонение

Эффективность водных экстрактов из мицелия грибов рода Вешенка (*Pleurotus*) в отношении ВИЧ-1

Виды и штаммы	Содержание сухого вещества в водном экстракте, (M±S _m), мг/мл	Концентрация полисахаридов в экстракте, % от сухого вещества	ТС ₅₀ , (M±S _m), мг/мл	IC ₅₀ , (M±S _m), мг/мл
Вешенка королевская <i>Pleurotus eryngii</i> PSt	2,50±0,06	н.и.	0,025±0,007	0,00004±0,00001
Вешенка устричная <i>Pleurotus ostreatus</i> БШ-08-01	3,50±0,07	91,98	0,044±0,009	0,00011±0,00003
Вешенка розовая <i>Pleurotus djamor</i> PSt	2,40±0,11	н.и.	0,060±0,011	0,00008±0,00001
Вешенка легочная <i>Pleurotus pulmonarius</i> К-96	7,30±0,14	29,94	0,200±0,050	0,023±0,007

Примечания

ТС₅₀ – 50 % токсическая концентрация экстракта;

IC₅₀ – 50 % ингибирующая концентрация экстракта;

M – среднее арифметическое; S_m – стандартное отклонение; н.и. – не исследовали

Противовирусная активность меланинов из *I. obliquus*

Вирус, штамм	Культура клеток	Концентрации меланинов, ингибирующие вирус ($M \pm S_m$, $n=3$), мг/мл	
		Природная чага	Культивированная чага
ВИЧ-1, ГКВ 4046	MT-4	0,00200±0,00065	0,038±0,011
ВПГ-2, MS	VERO	0,0030±0,0009	0,0025±0,0008
ВГ, A/Chicken/Kurgan05/2005	MDCK	0,020±0,006	н.и.
ВОВ, Л-ИВП	VERO	0,125±0,038	н.и.
ВОО, V79-1-005	VERO	0,071±0,021	н.и.

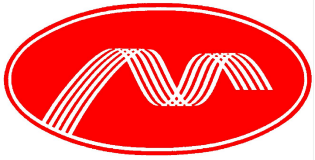
Примечания:

для ВИЧ-1, ВПГ-2, ВОВ, ВОО – концентрации меланинов, ингибирующие 50 % вируса (IC_{50}), мг/мл;

для ВГ – концентрации меланинов, подавляющие $2,2 \lg$ вируса гриппа;

н.и. – не исследовали; М – среднее арифметическое; S_m – стандартное отклонение;

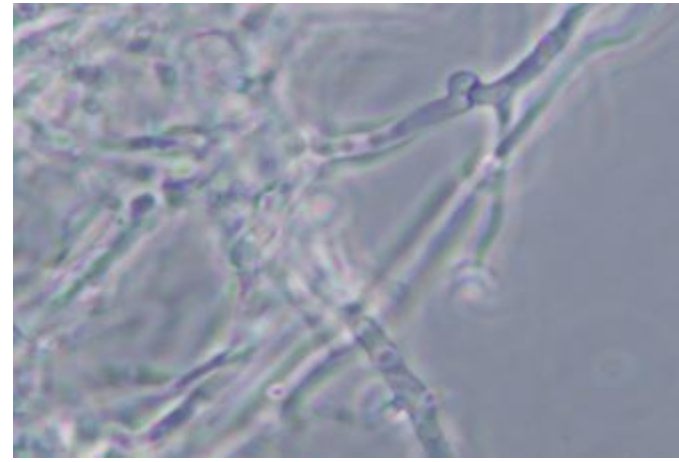
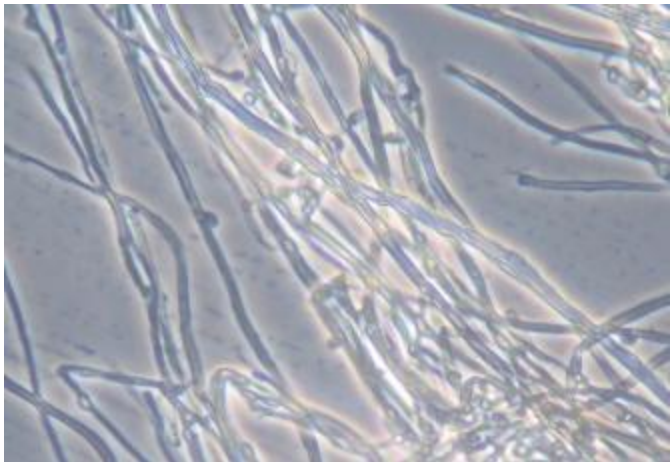
n – число опытов.



Продуценты кормовых добавок и препаратов

- Для разработки кормовых профилактических добавок и лекарственных препаратов предполагается использовать съедобные грибы: вешенка устричная (*Pleurotus ostreatus*), вешенка легочная (*Pleurotus pulmonarius*), трутовик серно-желтый (*Laetiporus sulphureus*), дождевик шиповатый (*Lycoperdon perlatum*), а также чисто лекарственные, такие как чага (*Inonotus obliquus*), трутовик плоский (*Ganoderma applanatum*), трутовик обыкновенный (*Fomes fomentarius*), и нематофаговый гриб *Duddingtonia flagrans*, обладающий противовирусной и противопаразитарной активностью.
- Для большинства из этих грибов подобраны среды и условия культивирования, позволяющие получать до 15-20 г сухой биомассы гриба на 1 л среды в условиях глубинного культивирования, имеются заделы по выращиванию на разных субстратах. Все перечисленные грибы обладают противовирусной активностью в отношении вирусов, патогенных для сельскохозяйственной птицы.

Daedaleopsis confragosa (Bolton) J. Schröt., штамм К-116
дедалеопсис шершавый



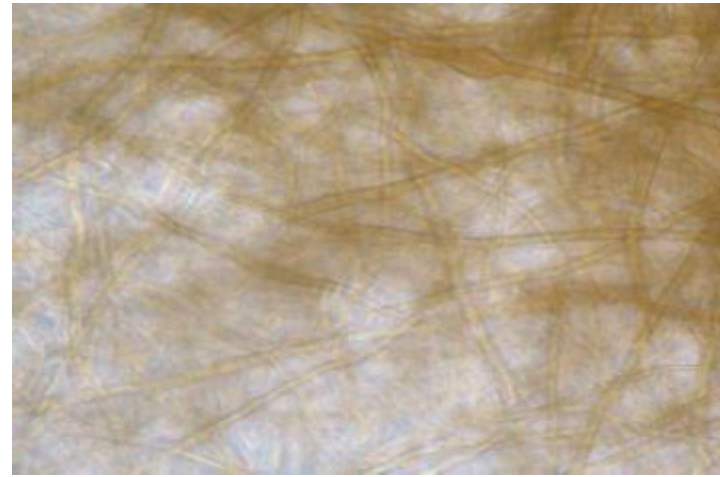
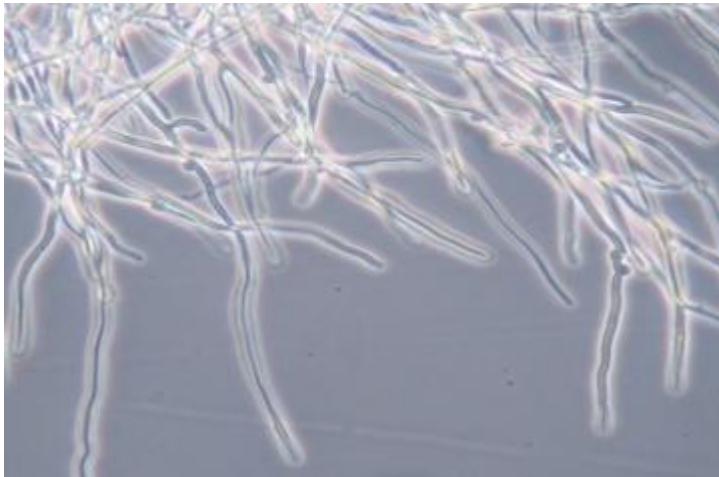
В культуре образует плотные колонии сначала белого, затем песочного до коричневого цвета. Мицелий слабо разветвленный, септированный, с многочисленными пряжками одиночного типа. Генеративные гифы бесцветные.

Биологическая активность *Daedaleopsis confragosa*

Известные лекарственные свойства	Источники	Собственные исследования	Публикации
<p>Полисахариды ингибируют рост саркомы 180 и карциномы Эрлиха на 90 %. Метанольный экстракт из гриба цитотоксически активен в отношении лимфолейкоза мышей</p>	<p>UK Patent 1331513, 1973 S. Tomasi et al, 2004</p>	<p>Противовирусная активность в отношении ВПГ-2 ($IC_{50}=0,04\pm 0,01$) и ВГ для H5N1 IN=2,5±0,14 lg; для H3N2 IN=6,3±0,07 lg</p>	<p>Т. В. Теплякова и др., 2010 Т. V. Teplyakova at al., 2012</p>

Fomes fomentarius (L.) Fr., штамм Кр-112

трутовик настоящий



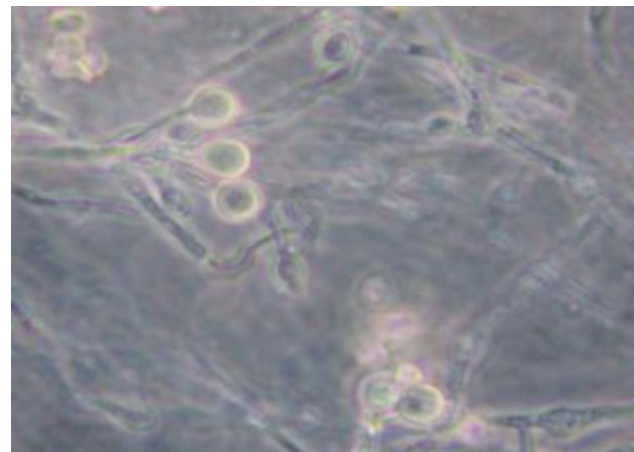
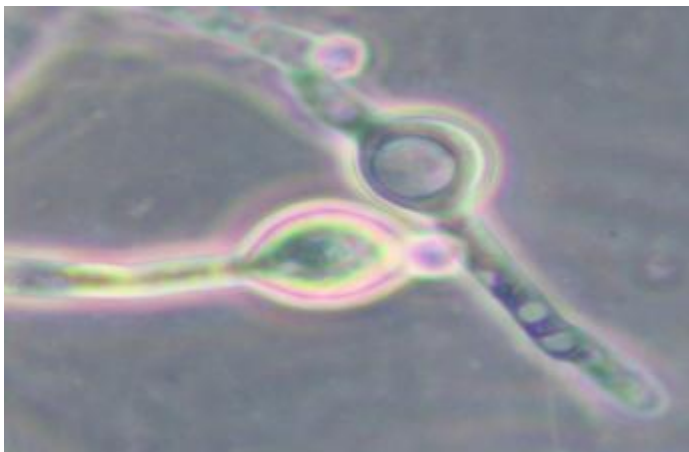
В культуре образует колонии сначала белого цвета, затем от светло-коричневого до коричневого.

Мицелий ветвящийся с многочисленными пряжками одиночного типа.

Биологическая активность *Fomes fomentarius*

Известные лекарственные свойства	Источники	Собственные исследования	Публикации
<p>Метанольный экстракт обладает противоопухолевой и антиоксидантной активностями.</p> <p>Показана активность в отношении ВИЧ-1 в диапазоне от 0,0008 до 0,1 мг/мл.</p> <p>Полисахариды из культивированного мицелия показали противоопухолевые свойства на клетках <i>in vitro</i> против рака желудка.</p>	<p>Y. M. Park et al. 2004</p> <p>П. Г. Рытик и др., 2007</p>	<p>Показана активность в отношении ВПГ-2 ($IC_{50}=0,20\pm 0,06$ мг/мл) и ВГ (H5N1 и H3N2) на культурах клеток и на мышах.</p> <p>Установлена цитотоксичность в отношении культуры клеток эпидермальной карциномы гортани Нер-2 ($IC_{50}=0,2$ мг/мл)</p>	<p>Т. В. Теплякова и др., 2010</p> <p>Т. V. Teplyakova et al., 2011, 2012</p> <p>Т. А. Косогова и др., 2012</p>

***Fomitopsis officinalis* (Vill.) Bondartsev & Singer, штамм СА-8 – трутовик листовенничный, листовенничная губка**

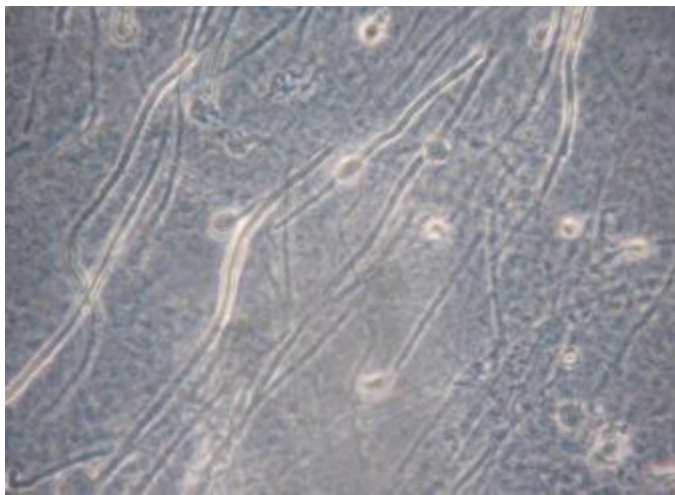


Колонии белого цвета, пушистые, гифы разветвленные, образует толстостенные хламидоспоры эллипсоидной формы, размером 8-19×4,5-12(-16) мкм, бластоконидии.

Биологическая активность *Fomitopsis officinalis*

Известные лекарственные свойства	Источники	Собственные исследования	Публикации
<p>Экстракты из гриба активны в отношении Рох вирусов – вируса оспы коров (Cowpox) и вакцинных вирусов (Vaccinia).</p> <p>Гриб обладает антибактериальной активностью в отношении бактерий <i>Bacillus anthracis</i> (водный экстракт), <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> и <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.</p> <p>Оказывает цитопатическое действие на опухолевые клетки асцитной карциномы Эрлиха.</p>	<p>P. Stamets, 2005</p> <p>У. С. Ооржак, 2006</p> <p>Г. К. Ковалева, 2009</p>	<p>Водный экстракт из мицелия активен в отношении вируса гриппа (H5N1 H3N2). В отношении вируса натуральной оспы активность водного экстракта из плодового тела составила $IC_{50}=0,068$ мг/мл, а полисахарида - $IC_{50}=0,004$ мг/мл.</p> <p>В отношении вируса осповакцины – $IC_{50}=0,054$ мг/мл.</p> <p>Цитотоксичность в отношении культуры клеток эпидермальной карциномы гортани Нер-2 ($IC_{50}=0,1$ мг/мл)</p>	<p>Т. В. Теплякова и др., 2010</p> <p>Т. В. Теплякова и др., 2011</p> <p>T. V. Teplyakova et al., 2011, 2012</p> <p>Т. А. Косогова и др., 2012</p> <p>Т. В. Теплякова и др., 2012</p>

Ganoderma applanatum (Pers.) Pat., штамм М-8
трутовик плоский

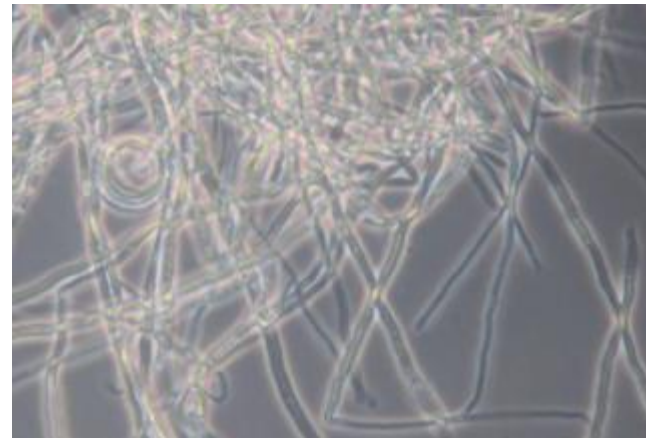
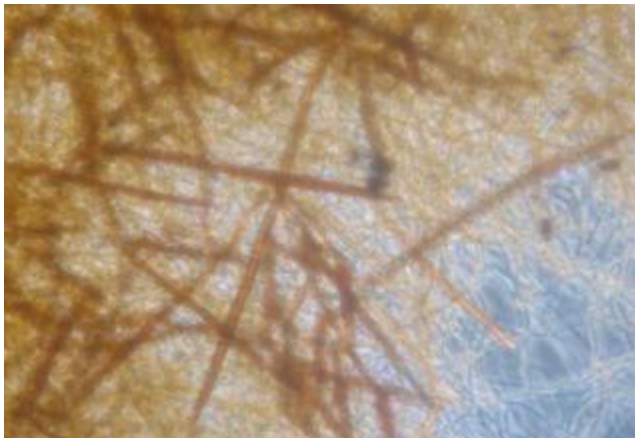


Колонии белого цвета, мицелий разветвленный, септированный, с многочисленными пряжками. Генеративные гифы бесцветные, изредка буроватые. В культуре формируются многочисленные хламидоспоры.

Биологическая активность *Ganoderma applanatum*

Известные лекарственные свойства	Источники	Собственные исследования	Публикации
<p>Водные экстракты проявляют активность в отношении вируса везикулярного стоматита серотипа Indiana VSV (IND). Экстракты из плодовых тел <i>G. applanatum</i> проявляют активность в отношении ВИЧ-1 в диапазоне от 0,0008 до 0,1 мг/мл.</p>	<p>J. K. Zjawiony, 2004 П. Г. Рытик др., 2007</p>	<p>Водные экстракты из плодового тела <i>G. applanatum</i> М-8 эффективны в отношении ВИЧ-1 ($IC_{50}=0,0008\pm 0,00009$ мг/мл), вируса гриппа (H5N1 IN=5,0\pm0,15 lg) Полисахариды из плодового тела активны в отношении ВПГ-2 ($IC_{50}=0,019\pm 0,006$ мг/мл), ВНО ($IC_{50}=0,005\pm 0,0015$ мг/мл). Цитотоксичность в отношении Нер-2 ($ИК_{50}$) составила 0,15 мг/мл.</p>	<p>Н. М. Гашникова и др., 2011 А. С. Кабанов и др., 2008 Т. В. Теплякова и др., 2011; 2012</p>

***Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pilát, штамм Т-9**
трутовик скошенный, трутовик косотрубчатый, чага

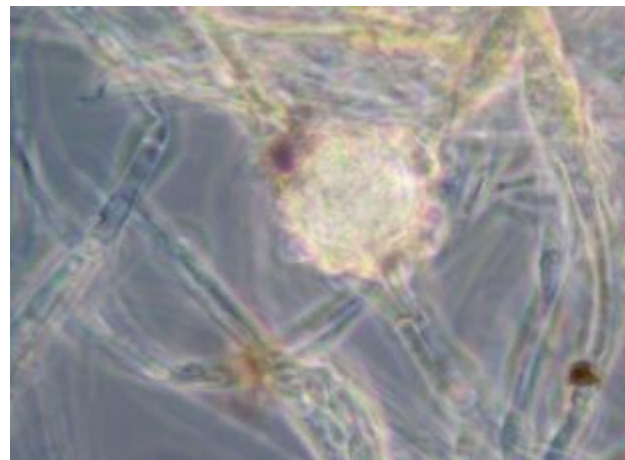
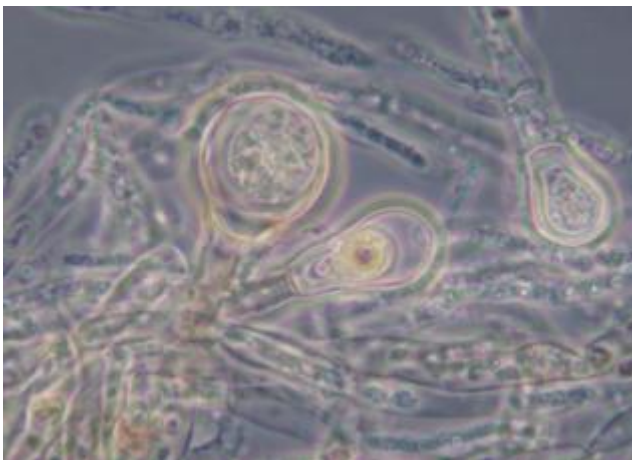


Колонии ватообразные, сначала белого цвета, затем желто-соломенного, песочного и затем коричневого цвета, гифы без пряжек. В культуре образует плодовые тела.

Биологическая активность *Inonotus obliquus*

Известные лекарственные свойства	Источники	Собственные исследования	Публикации
<p>Гриб был введен в Фармакопею СССР в 1959 году. Содержит широкий спектр различных БАВ, основным компонентом является хромоген-полифенолоксикарбоновый комплекс.</p> <p>Чага задерживает рост опухолей разной этиологии</p> <p>Проявляет противовирусный эффект против вируса иммунодефицита человека.</p>	<p>J. K. Zjawiony, 2004</p> <p>T. Ichimura at al., 1998</p> <p>П. Г. Рытик и др., 2007</p> <p>М. Я. Шашкина и др., 2008.</p>	<p>Широкий спектр активности проявил гриб чага как в виде экстрактов, так и меланина.</p> <p>В отношении ВИЧ-1 ингибирующая концентрация водного экстракта из склероция составила $IC_{50}=0,00012\pm 0,00005$ мг/мл; в отношении вируса гриппа (H5N1) в среднем $0,05\pm 0,016$ мг/мл ($IN=4,7\pm 1,2$ lg). В отношении ВНО и ВОО $0,259$ и $0,029$ мг/мл соответственно.</p> <p>Мицелий и полисахариды из глубинной культуры были активны в отношении ВПГ-2 с $IC_{50}=0,28\pm 0,008$ и $0,12\pm 0,04$ мг/мл соответственно.</p> <p>Цитотоксичность в отношении Hep-2 $IC_{50}=0,15$ мг/мл</p>	<p>Н. М. Гашникова и др. 2009, 2011</p> <p>А. С. Кабанов и др., 2008, 2009, 2011</p> <p>Т. В. Теплякова и др., 2011</p> <p>Патент RU 2375073 С1, 2009</p> <p>Патент RU 480227 С2, 2013</p>

Laetiporus sulphureus (Bull.) Murrill, штамм О-9
трутовик серно-желтый

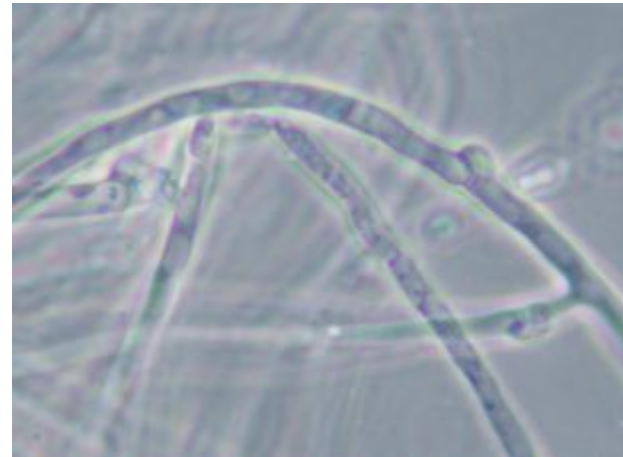
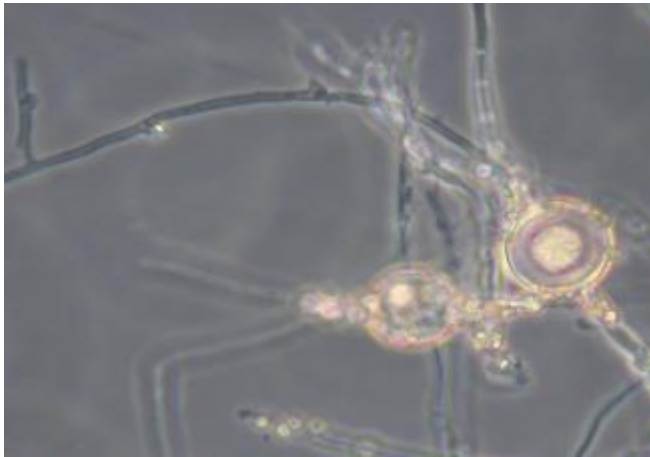


Колонии бледного розовато-оранжеватого цвета, мицелий клеток образует бластоконидии и хламидоспоры.

Биологическая активность *Laetiporus sulphureus*

Известные лекарственные свойства	Источники	Собственные исследования	Публикации
<p>Показано антиоксидантное, радиозащитное и противовирусное действие экстрактов из мицелия гриба. В плодовых телах обнаружены полисахариды, каротиноиды, алкалоиды и фенолы. Полисахарид <i>laetirobin</i> входит в клетки опухоли, блокирует клеточное деление на последней стадии митоза, вызывает апоптоз.</p>	<p>О. В. Тихонова и др., 2001, 2002 А. Н. Капич и др., 2004 З. Б. Квачева и др., 2005 С. Е. Агафонова, 2007 M. J. Lear et al., 2009</p>	<p>Экстракты проявляют вируснейтрализующий эффект в отношении двух субтипов вируса гриппа (H5N1 IN=5,0±1,67 lg, H3N2 IN=6,16±0,14 lg при концентрации 0,4 ±0,12 и 0,33±0,1 мг/мл соответственно. Полисахариды из плодовых тел цитотоксичны в отношении культуры клеток Нер-2 (ИК₅₀=0,1 мг/мл).</p>	<p>А. С. Кабанов и др., 2008, 2009, 2011 Т. В. Теплякова и др., 2011 Патент RU 2475530 C2, 2013</p>

Phallus impudicus L., штамм К-917
веселка обыкновенная

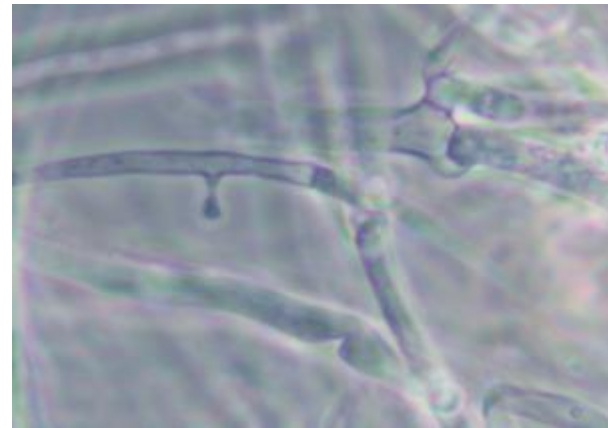


Колонии белого цвета с тяжистым мицелием. Мицелий разветвленный, септированный, с многочисленными пряжками и хламидоспорами.

Биологическая активность *Phallus impudicus*

Известные лекарственные свойства	Источники	Собственные исследования	Публикации
<p>Метаболиты гриба оказывают антибактериальное, противовирусное, противоопухолевое, антиоксидантное действие.</p>	<p>А. Н. Разин, 2011 В. Г. Бабицкая и др., 2006</p>	<p>Водные экстракты из плодового тела и мицелия активны в отношении ВГ (H5N1 IN=5,2±1,5 lg и H3N2 IN=5,65±0,9 lg в концентрации 0,084 ±0,025 мг/мл. Полисахариды из мицелия эффективны в отношении ВПГ-2 (IC₅₀=0,003±0,001 мг/мл) и ВГ (H5N1 IN=3,94±1,6 lg). Цитотоксичны в отношении культуры клеток Нер-2 (ИК₅₀=0,2 мг/мл).</p>	<p>Т. В. Теплякова и др., 2011 Патент RU 2475529 С2, 2012</p>

Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm., штамм БШ-08-01
вешенка устричная, обыкновенная

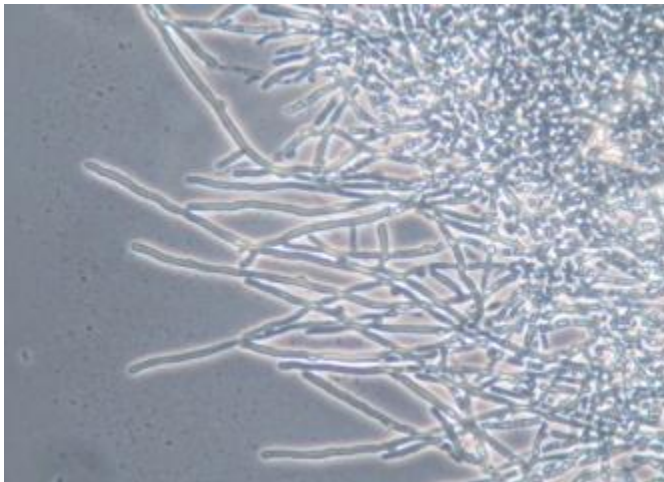


Колонии белого цвета, высокие, пушистые, с расходящимися радиально мицелиальными тяжами. Мицелий с многочисленными пряжками, расположенными как группами, так и одиночно, образует каплевидные выросты

Биологическая активность *Pleurotus ostreatus*

Известные лекарственные свойства	Источники	Собственные исследования	Публикации
<p>Экстракт показывает антимикробные, антитоксические, радиопротекторные и радиосорбционные свойства.</p> <p>На его основе создана биологически активная добавка «Экстракт мицелия вешенки «ОВО-Д».</p> <p>Полисахариды обладают противораковым действием, убиквитинподобный гликопротеин ингибирует развитие вируса иммунодефицита человека.</p>	<p>В. П. Герасименя и др., 2007</p> <p>Н.Х. Wang at al., 2000</p>	<p>Водные экстракты и полисахаридные фракции из мицелия показали эффективность в отношении ВПГ-2 ($IC_{50}=0,15\pm 0,045$ и $0,05\pm 0,014$ мг/мл соответственно), ВЗН ($IC_{50}=0,08\pm 0,02$ и $0,06\pm 0,02$ мг/мл соответственно).</p> <p>Водные экстракты из мицелия были активны в отношении ВИЧ-1 ($IC_{50}=(1,1\pm 0,1)\times 10^{-4}$ мг/мл) и ВГ (H5N1) $IN=5,0\pm 0,3$ lg.</p> <p>Водные экстракты из мицелия глубинной культуры проявлял цитотоксичность в отношении культуры клеток Нер-2 ($ИК_{50}=0,2$ мг/мл).</p>	<p>И. А. Разумов и др., 2010</p> <p>А. С. Кабанов и др., 2008, 2009</p> <p>Н. А. Гашникова и др., 2011</p> <p>Т. В. Теплякова и др., 2011</p>

Pleurotus pulmonarius (Fr.) Quél., штамм К-96
вешенка легочная

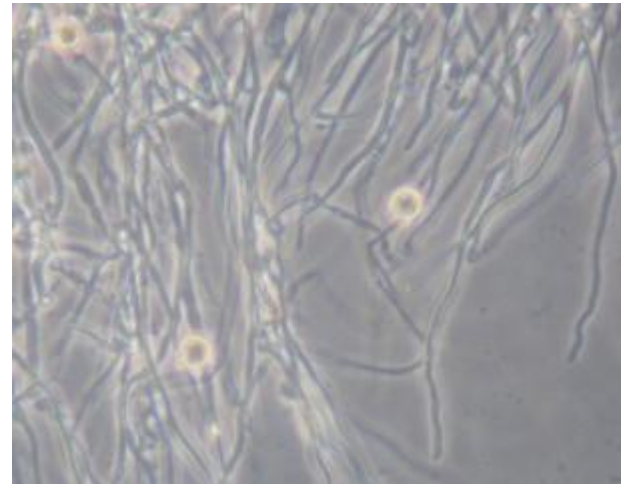
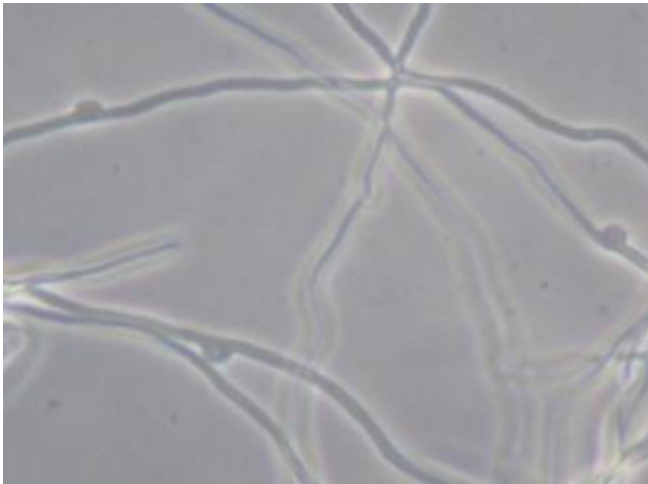


Колонии белого цвета, пушистые, мицелий с многочисленными пряжками

Биологическая активность *Pleurotus pulmonarius*

Известные лекарственные свойства	Источники	Собственные исследования	Публикации
<p>Показана противогрибковая, нематцидная и цитотоксическая, антиоксидантная активности. Экстракты плодовых тел активны по отношению к ВИЧ-1.</p>	<p>K. Lorenzen at al., 1998 W. Jianbin at al., 2007 N. Jose at al., 2002 Э. Ф. Соломко и др., 2011</p>	<p>Водные экстракты и полисахаридные фракции из мицелия показали эффективность в отношении ВПГ-2 ($IC_{50}=0,48\pm0,16$ и $0,25\pm0,08$ мг/мл соответственно), ВЗН ($IC_{50}=0,03\pm0,01$ и $0,015\pm0,005$ мг/мл соответственно). ВИЧ-1 ($IC_{50}=0,023\pm0,007$ мг/мл) и ВГ (H5N1) $IN=4,5\pm1,41$ lg. Показана цитотоксичность в отношении культуры клеток Hep-2 ($IC_{50}=0,2$ мг/мл).</p>	<p>И. А. Разумов и др., 2010 А. С. Кабанов и др., 2008, 2009, 2011 Т. В. Теплякова и др., 2011</p>

Trametes versicolor (L.) Lloyd, штамм К-817
траметес разноцветный



Плотные прижатые колонии белого цвета, мицелий с пряжками

Биологическая активность *Trametes versicolor*

Известные лекарственные свойства	Источники	Собственные исследования	Публикации
<p>Содержит полисахаридно-белковый комплекс. Отмечается антимикробная активность водных экстрактов из мицелия. У противоопухолевых препаратов из гриба (PSK и PSP) <i>in vitro</i> обнаружены антивирусные свойства в отношении ВИЧ-1.</p>	<p>R. A. Collins at al., 1997 P. Stamets, 2002 В. А. Чхенкели, 2006 Г. К. Ковалева, 2009</p>	<p>Водные экстракты из мицелия проявляли вируснейтрализующий эффект в отношении ВИЧ-1 ($IC_{50}=0,000023\pm 0,000006$ мг/мл) и двух субтипов вируса гриппа (H5N1) $IN=2,5\pm 0,09$ lg и (H3N2) $IN=0,5\pm 0,11$ lg. Показана цитотоксичность в отношении культуры клеток Hep-2 ($ИК_{50}=0,2$ мг/мл).</p>	<p>Т. В. Теплякова и др., 2011 Т. V. Teplyakova at al., 2012</p>

ВЫВОДЫ

1. В чистую культуру впервые выделены 132 штамма из 60 видов базидиальных грибов, произрастающих на юге Западной Сибири, большинство из которых относится к съедобным или лекарственным грибам.
2. В колониях 24-х видов грибов обнаружены микофильные грибы. Разработана стандартная операционная процедура по контролю культур базидиальных грибов на наличие грибов-микофилов с целью предотвращения использования ложных продуцентов биомассы.
3. Определены 10 кандидатных штаммов базидиомицетов, которые при низкой токсичности показали противовирусный эффект в отношении 3-х и более вирусов, и могут являться основой для разработки противовирусных препаратов:
 - в отношении вируса иммунодефицита человека 1 типа – чага *Inonotus obliquus* Т-9, вешенка устричная *Pleurotus ostreatus* БШ-08-01, трутовик разноцветный *Trametes versicolor* К-817;
 - в отношении вируса простого герпеса 2 типа – дедалеопсис шершавый *Daedaleopsis confragosa* К-116, чага *Inonotus obliquus* Т-9, веселка обыкновенная *Phallus impudicus* К-917, вешенка устричная *Pleurotus ostreatus* БШ-08-01, трутовик плоский *Ganoderma applanatum* М-8;

ВЫВОДЫ (продолжение)

- в отношении вируса Западного Нила – вешенка устричная *Pleurotus ostreatus* БШ-08-01, вешенка легочная *P. pulmonarius* К-96, трутовик серно-желтый *Laetiporus sulphureus* О-9;
 - в отношении ортопоксвирусов – чага *Inonotus obliquus* Т-9, лиственничная губка *Fomitopsis officinalis* СА-8;
 - в отношении вирусов гриппа – трутовик плоский *Ganoderma applanatum* М-8, трутовик серно-желтый *Laetiporus sulphureus* О-9, веселка обыкновенная *Phallus impudicus* К-917, чага *Inonotus obliquus* Т-9, дедалеопсис шершавый *Daedaleopsis confragosa* К-116, вешенка легочная *Pleurotus pulmonarius* К-96, трутовик обыкновенный *Fomes fomentarius* Кр-112, вешенка устричная *Pleurotus ostreatus* БШ-08-01.
4. Установлено, что гриб чага *Inonotus obliquus* обладает самым широким спектром противовирусной активности.

ВЫВОДЫ (продолжение)

- 5. Впервые проведены исследования на вирусе натуральной оспы. Показано, что штаммы базидиальных грибов чага *Inonotus obliquus* T-9, трутовик листовенничный *Fomitopsis officinalis* CA-8, трутовик плоский *Ganoderma applanatum* M-8 проявляют противовирусный эффект в отношении этого патогена.**
- 6. Для эффективного штамма чаги *Inonotus obliquus* T-9 подобраны условия, позволяющие получать в погруженной культуре от 17,2 до 22,3 г/л сухой биомассы гриба. Выделен пигмент меланин, выход которого из культивируемой чаги составил 20 %. Из природного чаги был повышен выход пигмента на 19 % за счет механохимической обработки сырья.**
- 7. Установлено, что основными действующими веществами базидиомицетов, проявляющими противовирусную активность:**
 - в отношении вируса простого герпеса 2 типа, вируса Западного Нила и вируса натуральной оспы, являются суммарные полисахариды (от 0,003 до 0,3 мг/мл),**
 - в отношении вирусов иммунодефицита человека 1 типа, простого герпеса 2 типа, гриппа, осповакцины и оспы обезьян - меланины (от 0,002 до 0,125 мг/мл).**



Спасибо за внимание!