

УДК 615.322; 615.281.8

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕЛАНИНА ИЗ ЧАГИ (*INONOTUS OBLIQUUS*), ПОЛУЧЕННОГО НА ОСНОВЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА F-1244, ВЫДЕЛЕННОГО В ЧИСТУЮ КУЛЬТУРУ

© *Т.Н. Ильичева**, *Г.Г. Ананько*, *Т.А. Косогова*, *С.Е. Олькин*, *В.В. Омигов*, *О.С. Таранов*,
Т.В. Теплякова

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»,
р.п. Кольцово, 630559 (Россия), e-mail: ilicheva_tn@vector.nsc.ru*

Целью данной работы явилось сравнительное исследование противовирусной активности меланинов, выделенных из глубинной культуры базидиального гриба чага *Inonotus obliquus* F-1244, и меланинов, полученных из природной чаги. Показано, что по своим ИК-спектрам и антивирусным свойствам меланины, полученные из культивированной чаги, близки к меланинам из природной чаги. В то же время активность образцов зависела не только от источника меланинов, но и от способа их выделения и очистки: токсическая доза (CC₅₀) образцов варьировала от 300 до 2500 мкг/мл, эффективная противовирусная доза в отношении вируса гриппа А/Н1N1pdm09 (ED₅₀) – от 10 до 47 мкг/мл. Наибольший терапевтический индекс, равный 160, показан для меланинов культивированной чаги, очищенных диализом, что в 2.5 раза выше, чем для меланинов из природной чаги.

Меланины из культивируемой чаги являются перспективными веществами для разработки лекарственных препаратов природного происхождения.

Ключевые слова: *Inonotus obliquus*, лекарственное растительное сырье, биологическая активность, противовирусная активность.

Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания 2/17 (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

Введение

Спектр медицинских препаратов для лечения вирусных заболеваний крайне ограничен. Поскольку вирусы являются строгими внутриклеточными паразитами и используют клеточные структуры для своей репродукции, сложно найти мишени для направленного синтеза соединений, которые нейтрализовали бы вирус и были бы безвредны для эукариотической клетки и организма человека. Поэтому практическое здраво-

Ильичева Татьяна Николаевна – доктор биологических наук, доцент, заведующая лабораторией,
e-mail: ilicheva_tn@vector.nsc.ru

Ананько Григорий Григорьевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
e-mail: ananko_gg@vector.nsc.ru

Косогова Татьяна Алексеевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
e-mail: kosogova@vector.nsc.ru

Олькин Сергей Евгеньевич – кандидат химических наук, заведующий лабораторией, e-mail: olkin@vector.nsc.ru

Омигов Владимир Вилорьевич – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией,
e-mail: omigov_vv@vector.nsc.ru

Таранов Олег Святославович – заведующий отделом,
e-mail: taranov@vector.nsc.ru

Теплякова Тамара Владимировна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией,
e-mail: teplyakova@vector.nsc.ru

охранение имеет весьма скудный набор противовирусных препаратов широкого спектра действия. Это, в первую очередь, интерфероны, ламивудин, рибавирин, инозин. Проблема усугубляется тем, что многие РНК-содержащие вирусы, например, вирусы гриппа, отличаются высокой генетической изменчивостью, что приводит к появлению мутантов, устойчивых к широко используемым противовирусным препаратам.

В связи с этим исследование новых подходов к созданию лекарственных средств с противовирусной активностью является весьма важной и востребованной областью современной биомедицинской науки.

* Автор, с которым следует вести переписку.

Меланины – собирательное название для группы высокомолекулярных черных и коричневых полимерных соединений, образующихся при окислительной полимеризации фенолов, главным образом пирокатехина и тирозина [1]. Меланины встречаются у животных, растений, бактерий и грибов, придавая им темную окраску. Они участвуют в репарации ДНК, процессах функционирования дыхательной цепи как акцептор электронов, являются модулятором таких важных систем клеточного метаболизма, как фото- и радиопротекция, нейтрализуют продукты перекисного окисления липидов и участвуют в нейромедиаторных процессах при многочисленных патологических нарушениях функциональных структур нейронов [2].

Трутовик скошенный (*Inonotus obliquus*) – вид грибов рода *Inonotus*, семейства *Hymenochaetaceae*, класса *Basidiomycetes*. Стерильная (бесплодная) форма гриба имеет название чага, или черный березовый гриб. Он обитает как паразит на стволах березы, реже поражает некоторые другие живые деревья – ольху, рябину, бук, клен, встречается в Азии, Европе и Северной Америке.

Установлено, что меланины из природной чаги обладают активностью против разных вирусов [3–8]. Для задач биотехнологии особый интерес представляют исследования по оценке биологической активности меланинов чаги, полученных из биомассы штамма, культивируемого в глубинных условиях. Ранее мы показали противовирусную активность культуральных меланинов против вируса простого герпеса II типа [9].

Цель настоящей работы – исследование противовирусной активности меланинов из глубинной культуры базидиального гриба чага *Inonotus obliquus*, штамм F-1244, депонированного в Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ Вектор Роспотребнадзора [10] против пандемического вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1 pdm09).

Экспериментальная часть

Получение меланинов из природной чаги. Для получения меланинов использовалось сухое измельченное сырье чаги из аптеки, которое соответствует требованиям [11].

Гриб, измельченный до размера частиц не более 0.5 мм, заливали раствором 0.1 М NaOH из расчета 1 : 10 и инкубировали при 50 °С в течение 5 ч. Полученный экстракт отделяли от твердого остатка центрифугированием и затем меланины осаждали добавлением соляной кислоты. Очистку меланинов от примесей осуществляли посредством 6-кратного переосаждения по следующей схеме: меланины, выпавшие в осадок, ресуспендировали в растворе 0.1 М NaOH в объемном соотношении 1 : 10 и снова осаждали путем закисления среды соляной кислотой до pH < 2.0 с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об./мин. Раствор очищенных меланинов нейтрализовали до значения pH = 7 и высушивали при температуре 50 °С.

Культивирование штамма Inonotus obliquus F-1244. Культивирование проводили в глюкозо-триптонной среде (ГТС) следующего состава, г/л: глюкоза – 30; триптон – 2.5; дрожжевой экстракт – 1.25; KH_2PO_4 – 1.1; K_2HPO_4 – 4.4; г/л MgSO_4 – 0.25; pH 7.0–8.0. Культивирование осуществлялось в 0.75 л колбах на качалке при 200 об./мин, 26 °С в течение 12 суток, до максимального накопления меланинов.

Контроль накопления меланинов. Для контроля динамики накопления меланинов в глубинной культуре использовали спектрофотометрический метод. Для этого делали разведения культуральной жидкости в 0.1 М NaOH так, чтобы при длине волны 465 нм значение оптической плотности раствора находилось в диапазоне от 0.1 до 0.4 единиц. Поглощение УФ и видимого света водными растворами меланинов регистрировали на спектрофотометре (PD-303UV, APEL).

ИК-спектрометрия образцов меланинов. ИК-спектры меланинов регистрировали на спектрометре Varian «Scimitar 1000 FT-IR». Пробоподготовку осуществляли прессованием таблеток с бромидом калия, как рекомендует Центр коллективного пользования (НОЦ) РУДН.

Выделение меланинов из культивированной чаги, штамм F-1244. Для полного выделения меланинов из глубинной культуры использовали следующие методики: выделение меланинов из культуральной жидкости (КЖ) и выделение меланинов из мицелия, с последующей очисткой от примесей переосаждением и диализом и ферментативной модификацией меланина.

Выделение меланинов из КЖ: культуральную жидкость отделяли от мицелия посредством фильтрации глубинной культуры на бумажном фильтре; меланины осаждали путем закисления среды соляной кислотой до pH < 2.0 с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об./мин.

Выделение меланинов из мицелия: мицелий, отделенный от КЖ фильтрованием, заливали раствором 2% NaOH (1 : 10) и прогревали на водяной бане в течение 2 ч; экстракт отделяли от мицелия фильтрованием и осаждали меланины путем закисления среды соляной кислотой до pH < 2.0 с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об./мин. Очистку меланинов от примесей осуществляли посредством 6-ти кратного переосаждения по схеме, описанной выше.

Ферментативная обработка меланинов. Меланины, очищенные переосаждением, подвергали ферментативной обработке трипсином: 1 мг/мл трипсина кристаллического (ООО Самсон-Мед, Россия), pH раствора 7.5, экспозиция 6 ч при 37 °С. Реакцию останавливали закислением раствора; затем нейтрализовали до значения pH=7 и высушивали.

Очистка диализом. Раствор меланина, очищенного переосаждением, диализовали через мембрану с размером пор 6–8 кДа против дистиллированной воды в течение 2 суток.

Исследование противовирусного действия меланинов. Для анализа противовирусной активности *in vitro* использовали метод измерения поглощения клетками прижизненного красителя – нейтрального красного. Для этого заседали лунки 96-луночного планшета культурой клеток MDCK (клетки почки собаки) в среде DMEM (Invitrogen) с добавлением 5% сыворотки плодов коровы (Gibco) и антибиотиков. Посевная доза – 2×10^4 клеток на лунку. После формирования 90% монослоя (20 ч инкубации при 37 °С в атмосфере 5% CO₂) клетки отмывали бессывороточной средой и вносили вирус гриппа A/California/07/09 (H1N1 pdm09) в дозе 100 ТЦИД₅₀ на лунку. Через 30 мин после заражения в лунки вносили разведения меланинов в концентрации 1–5000 мкг/мл в среде MEM (Invitrogen) с добавлением антибиотиков (Anti-Anti, Gibco) и 2 мкг/мл ТРСК-трипсина (Sigma). Клетки инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 72 ч. Затем в каждую лунку планшета был добавлен нейтральный красный (конечная концентрация 0.34%), через 1.5 ч клетки отмыты, добавлен раствор для экстракции красителя (0.1 М NH₄H₂PO₄ и 96% этанол в равных объемах) и определена оптическая плотность высвободившегося красителя на микропланшетном ридере BioRad 680 при длине волны 490 нм с использованием программы Земфира 2.0.

Эффективную дозу противовирусной активности меланинов, EC₅₀, рассчитывали как дозу (концентрацию) экспериментального препарата, которая на 50% ингибирует вирусную репродукцию.

Для анализа токсичности меланинов заседали лунки 96-луночного планшета культурой клеток MDCK, с посевной дозой 2×10^4 клеток на лунку. Через 20 ч инкубации при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ ростовую среду удаляли и вносили меланины, растворенные в среде MEM (Gibco), содержащей 5% сыворотки плодов коровы (Gibco) в концентрации 50–5000 мкг/мл. После 3 дней инкубации оценивали процент ингибирования пролиферации клеток с использованием нейтрального красного, как описано выше. Токсичность рассчитывали как дозу (концентрацию) меланинов, при которой погибает 50% клеток, или CC₅₀.

Индекс селективности, или терапевтический индекс IS, рассчитывали как отношение токсической дозы к эффективной: CC₅₀/EC₅₀. Обработку данных проводили с помощью Microsoft Office Excel 2003. В таблице приведены средние статистически достоверные данные при 95% вероятности.

Электронно-микроскопические исследования. Для изучения механизма действия меланина чаги на вирус гриппа проводились электронно-микроскопические исследования. Клетки MDCK, зараженные и незараженные вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1 pdm09), были отделены с помощью резинового шпателя и зафиксированы в равном объеме 8% раствора параформальдегида в течение суток. После центрифугирования (1500 об./мин, 10 мин) и трехкратной промывки, осадок дополнительно фиксировали 1% раствором четырехоксида осмия. Обезвоживание, пропитывание и заливку в смеси эпон-аралдит проводили по общепринятой методике. Ультратонкие срезы готовили на микротоме Райхерт-Янг (Австрия), окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца. Срезы исследовали в электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония). Фото съемку и анализ изображения проводили с помощью цифровой камеры бокового вывода Veleta (SIS, Германия) и программного пакета iTEM (SIS, Германия).

Обсуждение результатов

Характеризация полученных образцов меланинов из культивируемой и природной чаги выполнена методом ИК-спектроскопии на спектрометре Varian «Scimitar 1000 FT-IR». Спектры поглощения в ИК-области часто применяются для подтверждения наличия в пробах меланиновых пигментов. Они не несут в себе прямых сведений о структуре меланинов, но информируют о наличии в молекуле определенных связей и характерных функциональных групп. Так, характерными для меланинов являются полосы поглощения в области 1690–1590 см⁻¹, свидетельствующие о наличии в их структуре сопряженных, в том числе и ароматических связей, а широкая полоса в области 3430–3100 см⁻¹ обусловлена наличием ОН-групп, в том числе и полифенольных [12]. Результаты анализа ИК-спектров образцов меланина из природной и культивируемой чаги представлены на рисунках 1–2.

Выполненное исследование проб показало, что ИК-Фурье спектры меланинов содержат различные полосы поглощения с разными интенсивностями, что связано, по-видимому, с различной природой соединений, которым они соответствуют. Наряду с этим каждый спектр исследуемых проб содержит полосы поглощения, характерные для полифенольных соединений: 3100–3430 см⁻¹ (структуры, содержащие гидроксильные группы); 1580–1690, 1400–1420 см⁻¹ (сопряженные и ароматические структуры); 1300–1400 см⁻¹ (структуры с полосами С-ОН групп фенолов и С-О групп эфиров); 1000–1100 см⁻¹ (структуры с полосами С-ОН спиртовых групп полисахаридов). Вид ИК-спектров исследованных нами образцов достаточно хорошо соответствует виду ИК-спектров, полученных для очищенных различными способами меланинов чаги [13]. Все изложенное доказывает, что исследованные пробы содержат меланины.

Нами была проведена сравнительная оценка противовирусной активности меланинов (табл.), четыре образца были получены из культивированной чаги (14-34, 14-37, 13-61, 16-42) и один образец – из природной чаги (16-43).

Как следует из таблицы, все меланины проявляли высокую противогриппозную активность при низкой токсичности. Что касается меланинов из штамма чаги, культивируемого в глюкозо-триптонной среде, то данные таблицы свидетельствуют, что меланины, полученные в культуре, проявляют выраженную активность против вируса гриппа А/California/07/09 (H1N1 pdm09). Было показано, что очистка меланинов многократным переосаждением позволяет избавиться от части примесей, однако при этом повышается токсичность образцов. Для дополнительной очистки образцов культурального меланина использовали два разных способа. Хорошие результаты были достигнуты с помощью диализа через полупроницаемую мембрану с размером пор 6–8 кДа. Снижения токсичности образцов можно добиться также посредством ферментативной обработки. Так, обработка протеазой (трипсином) позволила снизить токсичность образца в 8 раз, это дает основания предположить, что основной причиной токсичности для клеток являются примеси белков. Высокий терапевтический индекс (IS=160), показанный для меланинов, полученных в глубинной культуре, позволяет характеризовать его как перспективный экспериментальный препарат.

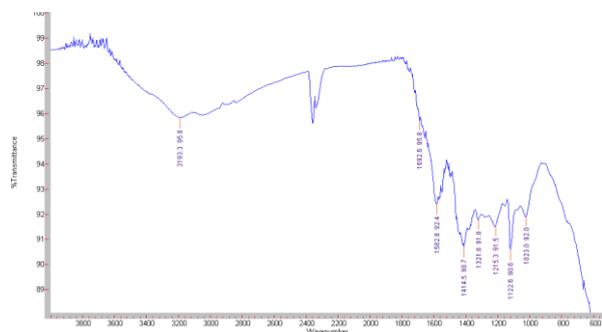


Рис. 1. ИК-Фурье спектр меланинов из КЖ, полученных из глубинной культуры штамма чаги F-1244

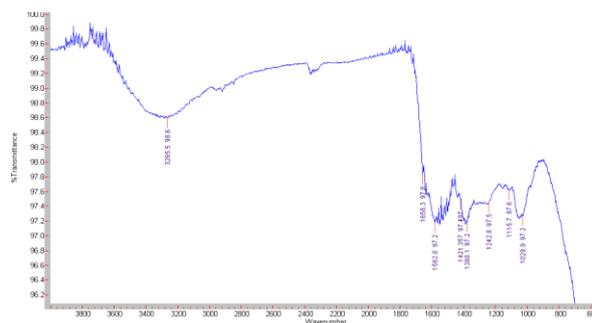


Рис. 2. ИК-Фурье спектр меланина из природного сырья чаги

Сравнительная оценка противовирусной активности меланинов разного происхождения в отношении вируса гриппа А/California/07/09 (H1N1 pdm09)

№ образца	Происхождение меланинов	Способ очистки меланинов	CC ₅₀ , мкг/мл	EC ₅₀ , мкг/мл	IS
14-34	Культура <i>I. obliquus</i> F-1244 (КЖ)	–	2363±266	47±12	50±15
14-37	Культура <i>I. obliquus</i> F-1244 (мицелий)	переосаждение	313±58	9.8±1.6	32±7
13-61	Культура <i>I. obliquus</i> F-1244 (мицелий)	диализ	2000±188	12.5±2.0	160±30
16-42	Культура <i>I. obliquus</i> F-1244 (мицелий)	ферментативная обработка (трипсином)	2500±240	40±4.4	62.5±21
16-43	Контроль – меланины из природного сырья чаги	переосаждение	2500±240	40±4.4	62.5±21

Электронно-микроскопическими исследованиями, проведенными нами ранее, было установлено, что при обработке клеток *Vero* экстрактом чаги, в который входили меланины, отсутствовали признаки размножения вируса простого герпеса 2-го типа в ядре, в то время как в контроле наблюдались многочисленные нуклеокапсиды вируса герпеса в ядре клеток и нарушение структуры ядра [14].

Для проведения аналогичного исследования на вирусе гриппа использовали меланины, полученные на основе глубинной культуры чаги. Клетки MDCK выращивали в культуральных флаконах, противовирусный эффект оценивали в отношении вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1 pdm09). Результаты, полученные на серии срезов, свидетельствовали о влиянии меланинов на морфогенез вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1 pdm09) в культуре клеток MDCK. Репродукция вируса при воздействии меланинов была снижена. В опытном образце, в присутствии меланинов, наблюдались преимущественно шаровидные мелкие вирусные частицы в межклеточном пространстве (рис. 3). В контрольных клетках (без меланина) преобладали нитевидные формы вируса на поверхности клетки (рис. 4), что коррелирует с более высоким цитопатическим действием вируса гриппа. Наиболее вероятным механизмом противовирусной активности представляется непосредственное взаимодействие меланинов с вирионами в межклеточном пространстве.

Природные ресурсы чаги быстро истощаются. Наши данные свидетельствуют о возможности получения качественных и биологически эффективных меланинов на основе биотехнологии. Повышение активности меланинов из глубинной культуры чаги может происходить за счет отбора более эффективных штаммов продуцентов меланинов, подбора сред и условий культивирования, оптимальных методов очистки.

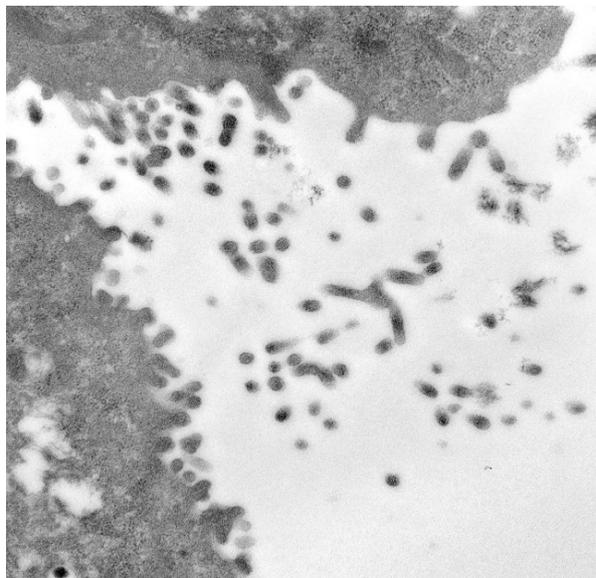


Рис. 3. Воздействие меланинов на вирус гриппа

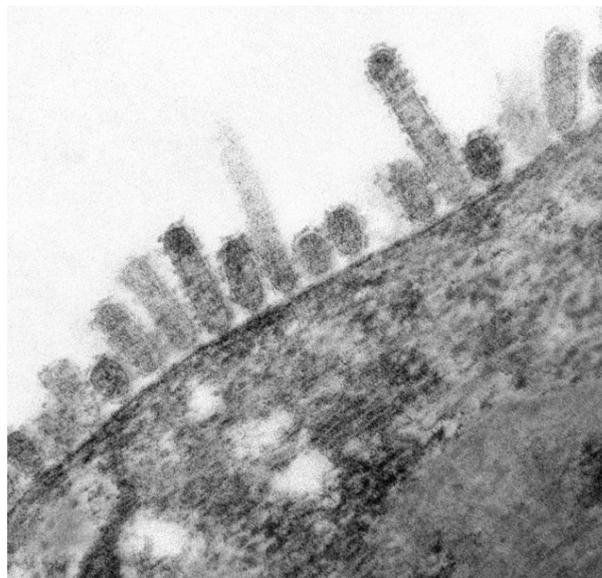


Рис. 4. Вирус гриппа A/California/07/09 (H1N1 pdm09). Контроль

Заключение

Результаты работы показывают, что меланины, полученные в глубинной культуре *Inonotus obliquus*, штамм F-1244, близки к природным меланинам (полученным из чаги) по своим ИК-спектрам и противовирусным свойствам. Показано, что культуральные меланины проявляют выраженную противовирусную активность в отношении вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1 pdm09) в культуре клеток MDCK. В то же время работа демонстрирует, что активность образцов зависит не только от источника меланинов, но и от способа их выделения и очистки. Так, токсическая доза (CC_{50}) образцов варьировала от 300 до 2500 мкг/мл, эффективная доза (EC_{50}) – от 10 до 47 мкг/мл, наибольший терапевтический индекс был равен 160.

Список литературы

1. Лях С.П. Микробный меланиногенез и его функции. М., 1981. 274 с.
2. Борщевская М.И., Васильева С.М. Развитие представлений о биохимии и фармакологии меланиновых пигментов // Вопросы медицинской химии. 1999. №4. С. 54–66.

3. Патент №2480227 (РФ). Противовирусное средство на основе меланина / Т.В. Теплякова, Л.И. Пучкова, Т.А. Косогова. 2013.
4. Гашикова Н.М., Балахнин С.М., Теплякова Т.В., Ананько Г.Г., Косогова Т.А., Сухих А.С. Антиретровирусная активность меланинов из природной и культивируемой чаги (*Inonotus obliquus*) // Успехи медицинской микологии. 2014, №12. С. 299–301.
5. Теплякова Т.В., Косогова Т.В. Высшие грибы Западной Сибири – перспективные объекты для биотехнологии лекарственных препаратов. Новосибирск, 2014. 298 с.
6. Teplyakova T., Kosogova T. Fungal Bioactive Compounds with Antiviral Effect // Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2015. Vol. 3, N8. Pp. 357–371. DOI: 10.17265/2328-2150/2015.08.001.
7. Tian J., Hu X., Liu D., Wu H., Qu L. Identification of *Inonotus obliquus* polysaccharide with broad-spectrum antiviral activity against multi-feline viruses // Int J Biol Macromol. 2017. Vol. 95. Pp. 160–167. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.054.
8. Шибнев В.А., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Калнина Л.Б., Носик Д.Н. Противовирусное действие водных экстрактов березового гриба *Inonotus obliquus* на вирус иммунодефицита человека // Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60, №2. С. 35–38.
9. Ананько Г.Г., Теплякова Т.В., Бардашева А.В., Ильичева Т.Н. Меланины из глубинной культуры *Inonotus obliquus* и их противовирусная активность в отношении вируса простого герпеса 2 типа // Успехи медицинской микологии. 2015. Т. 14. С. 384–388.
10. Косогова Т.А. Штаммы базидиальных грибов юга Западной Сибири – перспективные продуценты биологически активных препаратов: дисс. ... канд. биол. наук. Кольцово, 2013. 172 с.
11. Государственная фармакопея СССР. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. 1-е изд. М.: Медицина, 1990. Т. 2, вып. 2. С. 187–209.
12. Paim S., Linhares F., Mangrich A.S., Martin J.P. Characterization of fungal melanins and soil humic acids by chemical analysis and IR spectroscopy // Biol. Fertil. Soils. 1990. N10. Pp. 72–76. DOI: 10.1007/BF00336128.
13. Грачева Н.В. Химическая модификация природных полимеров меланинов гриба *Inonotus obliquus* (чага) с целью получения высокоактивных антиоксидантов: автореф. дисс. ... канд. техн. наук. Волгоград, 2014. 24 с.
14. Теплякова Т.В., Казачинская Е.И., Рябчикова Е.И., Косогова Т.А., Таранов О.С., Омигов В.В., Локтев В.Б. Противовирусная активность водных экстрактов и некоторых препаратов из гриба чага (*Inonotus obliquus*) в отношении вируса простого герпеса 2 типа // Современная микология в России: материалы 3-го Съезда микологов России. М.: Национальная академия микологии, 2012. Т. 3. С. 418–419.

Поступила в редакцию 13 февраля 2019 г.

После переработки 19 декабря 2019 г.

Принята к публикации 28 января 2020 г.

Для цитирования: Ильичева Т.Н., Ананько Г.Г., Косогова Т.А., Олькин С.Е., Омигов В.В., Таранов О.С., Теплякова Т.В. Противовирусная активность меланина из чаги (*Inonotus obliquus*), полученного на основе культивирования штамма F-1244, выделенного в чистую культуру // Химия растительного сырья. 2020. №2. С. 283–289. DOI: 10.14258/jcprm.2020025167.

Ilyicheva T.N.*, Anan'ko G.G., Kosogova T.A., Olkin S.E., Omigov V.V., Taranov O.S., Teplyakova T.V. ANTIVIRAL ACTIVITY OF THE MELANIN FROM BIRCH FUNGUS (*INONOTUS OBLIQUUS*) OBTAINED BY CULTIVATING F-1244 STRAIN ISOLATING TO PURE CULTURE

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, 630559 (Russia),
e-mail: ilicheva_tn@vector.nsc.ru

The aim of the work was a comparative study of the antiviral activity of the melanin isolated from submerged culture of basidiomycete birch fungus *Inonotus obliquus* F-1244 and melanin obtained from natural birch fungus. We showed that the melanin isolated from cultivated birch fungus is similar to the melanin from natural birch fungus in respect of its physicochemical and antiviral properties. Although, the sample's activity depended not only on the source of melanin, but also on the method of isolating and purification. The toxic dose (CD₅₀) varied from 300 to 2500 µg/ml. The effective antiviral dose in the case of A/H1N1pdm09 (ID50) was one from 10 to 47 µg/ml. The highest therapeutic index was for the melanin of the cultivated birch fungus, purified by dialysis. The index made 160; it is higher in 2, 5 times in comparison with natural birch fungus.

The melanin from cultivated birch fungus is a promising substance for the developing of naturally occurring medication.

Keywords: *Inonotus obliquus*, herbal drug, bioactivity, antiviral activity.

References

1. Lyakh S.P. *Mikrobnny melaninogenez i yego funktsii*. [Microbial melaninogenesis and its functions]. Moscow, 1981, 274 p. (in Russ.).
2. Borshchevskaya M.I., Vasil'yeva S.M. *Voprosy meditsinskoy khimii*, 1999, no. 4, pp. 54–66. (in Russ.).
3. Patent 2480227 (RU), 2013. (in Russ.).
4. Gashnikova N.M., Balakhnin S.M., Teplyakova T.V., Anan'ko G.G., Kosogova T.A., Sukhikh A.S. *Uspekhi meditsinskoy mikologii*, 2014, no. 12, pp. 299–301. (in Russ.).
5. Teplyakova T.V., Kosogova T.V. *Vysshiyе griby Zapadnoy Sibiri – perspektivnyye ob'yekty dlya biotekhnologii lekarstvennykh preparatov*. [Higher mushrooms of Western Siberia – promising objects for biotechnology of drugs]. Novosibirsk, 2014, 298 p. (in Russ.).
6. Teplyakova T., Kosogova T. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2015, vol. 3, no. 8, pp. 357–371. DOI: 10.17265/2328-2150/2015.08.001.
7. Tian J., Hu X., Liu D., Wu H., Qu L. *Int J Biol Macromol.*, 2017, vol. 95, pp. 160–167. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.054.
8. Shibnev V.A., Garayev T.M., Finogenova M.P., Kalnina L.B., Nosik D.N. *Voprosy virusologii*, 2015, vol. 60, no. 2, pp. 35–38. (in Russ.).
9. Anan'ko G.G., Teplyakova T.V., Bardasheva A.V., Il'icheva T.N. *Uspekhi meditsinskoy mikologii*, 2015, vol. 14, pp. 384–388. (in Russ.).
10. Kosogova T.A. *Shtammy bazidial'nykh gribov yuga Zapadnoy Sibiri – perspektivnyye produtsenty biologicheskii aktivnykh preparatov: diss. ... kand. biol. nauk*. [Strains of basidiomycetes of the south of Western Siberia – promising producers of biologically active drugs: Diss. ... cand. biol. of sciences]. Koltsovo, 2013, 172 p. (in Russ.).
11. *Gosudarstvennaya farmakopeya SSSR. Obshchiye metody analiza. Lekarstvennoye rastitel'noye syr'ye. 11 izd.* [The State Pharmacopoeia of the USSR. General methods of analysis. Medicinal plant material. 11th ed.]. Moscow, 1990, vol. 2, no. 2, pp. 187–209. (in Russ.).
12. Paim S., Linhares F., Mangrich A.S., Martin J.P. *Biol. Fertil. Soils*, 1990, no. 10, pp. 72–76. DOI: 10.1007/BF00336128.
13. Gracheva N.V. *Khimicheskaya modifikatsiya prirodnykh polimerov melaninov griba Inonotus obliquus (chaga) s tsel'yu polucheniya vysokoaktivnykh antioksidantov: avtoref. diss. ... kand. tekhn. nauk*. [Chemical modification of natural polymers of melanins of the fungus *Inonotus obliquus* (chaga) in order to obtain highly active antioxidants: author. diss. ... cand. tech. sciences]. Volgograd, 2014, 24 p. (in Russ.).
14. Teplyakova T.V., Kazachinskaya Ye.I., Ryabchikova Ye.I., Kosogova T.A., Taranov O.S., Omigov V.V., Loktev V.B. *Sovremennaya mikologiya v Rossii. Materialy 3-go S'yezda mikologov Rossii*. [Modern mycology in Russia. Materials of the 3rd Congress of Mycologists of Russia]. Moscow, 2012, vol. 3, pp. 418–419. (in Russ.).

Received February 13, 2019

Revised December 19, 2019

Accepted January 28, 2020

For citing: Ilyicheva T.N., Anan'ko G.G., Kosogova T.A., Olkin S.E., Omigov V.V., Taranov O.S., Teplyakova T.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2020, no. 2, pp. 283–289. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2020025167.

* Corresponding author.

