



Исследование противовирусной активности водорастворимого меланина из аптечной чаги (*Inonotus obliquus*) в отношении вируса гриппа А субтипов H5N1, H3N2 и H1N1pdm09 в экспериментах *in vitro*

Филиппова Е.И., Макаревич Е.В., Проценко М.А.✉, Мазурков О.Ю.,
Теплякова Т.В., Мазуркова Н.А.

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия

Аннотация

Актуальность. Вирус гриппа А является причиной возникновения эпидемий и пандемий, наносящих колоссальный вред здоровью и социально-экономическому положению населения. В связи с необходимостью разработки новых методов этиотропной терапии, а также с возрастающей способностью вирусов противодействовать применяемым препаратам поиск новых фармакологически активных веществ и последующее изучение их лекарственных свойств обладает неоспоримой актуальностью.

Цель — изучение противовирусных свойств меланина, полученного из аптечной чаги (*Inonotus obliquus*), в отношении разных субтипов вируса гриппа.

Материалы и методы. Образец водорастворимого меланина *Inonotus obliquus*, полученный методом щелочного гидролиза и высушенный при 40°C, был исследован на токсичность и противовирусную активность. В качестве референс-препарата использован коммерческий противогриппозный препарат Тамифлю®. Статистическая обработка полученных данных проведена по методу Спирмена–Кербера.

Результаты. Для культуры клеток MDCK были установлены маркеры токсичности меланина из чаги (образец 20–24), такие как максимально переносимая концентрация, составляющая 237 мкг/мл, а также 50% цитотоксическая концентрация (ЦТД₅₀), равная 153,45 мкг/мл. Под действием исследуемого образца в отношении субтипов вируса гриппа А H5N1, H3N2 и H1N1pdm09 обнаружено снижение инфекционности вируса гриппа на 2,5–3,5 lg, а также установлены 50% эффективные дозы (ЭД₅₀), составляющие 1,55–9,52 мкг/мл. На основании полученных значений ЦТД₅₀ и ЭД₅₀ были рассчитаны химиотерапевтические индексы образца, характеризующие его перспективность для дальнейших исследований.

Заключение. Меланин, полученный из аптечной чаги, проявил наибольшую активность против штамма пандемического вируса гриппа человека A/California/04/2009 (H1N1)pdm09, вызывал снижение его инфекционности на 3,5 lg и обладал ЭД₅₀, равной 1,6 мкг/мл. Полученные результаты указывают на перспективность создания противовирусного препарата на основе меланинов из чаги в отношении вируса гриппа.

Ключевые слова: меланин, агарикомицеты, противовирусное средство, вирус гриппа А

Источник финансирования. Статья подготовлена в рамках выполнения государственного задания ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Филиппова Е.И., Макаревич Е.В., Проценко М.А., Мазурков О.Ю., Теплякова Т.В., Мазуркова Н.А. Исследование противовирусной активности водорастворимого меланина из аптечной чаги (*Inonotus obliquus*) в отношении вируса гриппа А субтипов H5N1, H3N2 и H1N1pdm09 в экспериментах *in vitro*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100:online-first.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-316>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-316>

Research on the antiviral activity of water-soluble melanin from the pharmaceutical chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) against influenza A virus subtypes H5N1, H3N2 and H1N1pdm09 in experiments *in vitro*

Ekaterina I. Filippova, Elena V. Makarevich, Maria A. Protsenko[✉], Oleg Yu. Mazurkov, Tamara V. Teplyakova, Natalya A. Mazurkova

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia

Abstract

Introduction. Influenza A virus is the cause of epidemics and pandemics that severely affect the health and socioeconomic status of the world's population. The need to develop new methods of etiotropic therapy, and the increasing ability of viruses to counteract the antiviral drugs makes extremely relevant the search for new pharmacologically active substances and the subsequent study of their medicinal properties.

The **aim** of the study is to conduct research into the antiviral properties of melanin obtained from the pharmaceutical chaga mushroom in relation to different subtypes of the influenza A virus.

Materials and methods. A sample of water-soluble melanin from *Inonotus obliquus* obtained by alkaline hydrolysis and dried at 40°C was tested for toxicity and antiviral activity. The commercial anti-influenza drug Tamiflu® was used as a reference drug. Statistical processing of the obtained data was carried out according to the Spearman-Kärber method.

Results. *Inonotus obliquus* melanin (sample 20-24) toxicity markers, such as a maximum tolerable concentration (MTC) of 237.0 µg/mL, and a 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) of 153,45 µg/mL were established for MDCK cell culture. The assessment of antiviral activity of test sample against three subtypes of the influenza A virus (H5N1, H3N2 and H1N1pdm09) demonstrated a decrease in the infectivity of the influenza virus by 2.5–3.5 lg with 50% virus-inhibiting concentrations (IC₅₀) of 1.55–9.52 µg/mL. Based on the obtained values of CC₅₀ and IC₅₀, the selectivity indices (SI) of the sample were calculated, characterizing its prospects for further research.

Conclusions. Melanin obtained from the pharmaceutical chaga mushroom showed the highest activity against the strain of the human pandemic influenza virus A/California/04/2009 (H1N1)pdm09, caused a decrease in its infectivity by 3.5 lg and had an IC₅₀ of 1.6 µg/ml. The obtained results indicate the prospects for creating an antiviral drug based on *Inonotus obliquus* melanins against the influenza virus.

Keywords: *melanins, agaricales, antiviral agents, influenza A virus*

Funding source. The article was prepared as part of the state task of the State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector".

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Filippova E.I., Makarevich E.V., Protsenko M.A., Mazurkov O.Yu., Teplyakova T.V., Mazurkova N.A. Research on the antiviral activity of water-soluble melanin from the pharmaceutical chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) against influenza A virus subtypes H5N1, H3N2 and H1N1pdm09 in experiments *in vitro*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2023;100:online-first. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-316>

Введение

Широкое разнообразие зоонозных вирусов, способных преодолевать межвидовой барьер, ведёт к появлению в человеческой популяции новых, потенциально пандемических вирусов. За последние 10 лет человечество столкнулось с двумя пандемиями: гриппа свиного происхождения А/Н1N1pdm09 в 2009 г. и COVID-19 в 2019 г. Совместно с вирусами, имеющими пандемическое значение, циркулирует множество сезонных респираторных вирусов, которые вносят свой вклад в структуру заболеваемости людей, а сочетанные инфекции отягчают состояние заболевших [1].

Вирус гриппа характеризуется активной сезонной циркуляцией, затрагивающей большую часть населения Земли (до 1 млрд случаев гриппа ежегодно), группы риска — дети раннего возраста, пожилые люди, лица с сопутствующими хроническими заболеваниями и ослабленным иммунитетом [2]. Высокий уровень генетической изменчивости вирусов гриппа обуславливает отсутствие 100% эффективной вакцины, а также возникновение резистентности штаммов вируса к имеющимся противовирусным препаратам [3].

В настоящее время в мире активно проводятся поиск и разработка противовирусных препаратов

на основе соединений природного происхождения, обладающих более мягким терапевтическим действием и низкой токсичностью по сравнению с синтетическими лекарственными средствами. В этом отношении базидиальные грибы представляют значительный интерес как источники лечебных и профилактических средств с противоопухолевой, иммуностимулирующей и противовирусной активностью.

С 2008 г. в ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» проводятся изучение противовирусной активности плодовых тел грибов Юго-Западной Сибири и выделение их в чистую культуру. На основе скрининга полисахаридов и меланина из грибов, самый широкий спектр противовирусной активности обнаружен у чаги (*Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pilát; трутовик скошенный) [4, 5].

Известна высокая протективная активность образцов меланинов из чаги *in vitro* в отношении вируса гриппа субтипа H1N1pdm09, вируса иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1), вируса простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2), вируса Западного Нила, вируса натуральной оспы и вируса осповакцины [6].

Показана высокая противовирусная активность в отношении SARS-CoV-2 водных экстрактов чаги, содержащих меланин и гуминовые вещества. Данные экстракты обладали низкой токсичностью, 50% эффективной дозой ($ЭД_{50}$) 0,75 мкг/мл, высоким химиотерапевтическим индексом (ХТИ) — 155,5 [7].

Водные экстракты, полученные из склероция чаги, ингибировали инфекционность штаммов вируса гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и A/Moscow/226/2009(H1N1)pdm09 с индексами нейтритализации 4,7 и 3,2 Ig соответственно. Противогриппозное действие данных образцов было сопоставимо с активностью препарата Тамифлю® [6].

Целью настоящего исследования является изучение противогриппозных свойств меланина, полученного из аптечной чаги. Задачи исследования: получение водорастворимого меланина, определение токсичности полученного образца, тестирование способности меланина подавлять инфекционность вируса гриппа, определение 50% токсических и 50% ингибирующих вирус гриппа концентраций образцов.

Материалы и методы

Культура клеток

Для определения токсичности и противовирусной активности грибных меланинов использовали перевиваемую линию клеток MDCK, полученную из коллекции культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор». Клетки выращивали в среде DMEM (ООО «Биолот») в присутствии 10% инактивированной сыворотки крови плодов коровы (ООО «Биолот») и антибиотиков (пенициллин 100 МЕ/мл, стрепто-

мицин 100 мкг/мл). Клеточную суспензию вносили в 96-луночные планшеты по 100 мкл в лунку в концентрации $1,0-1,5 \times 10^5$ клеток/мл. Планшеты с клетками помещали в термостат при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности на 2–3 сут до образования клеточного монослоя.

Вирусы

В работе использовали штаммы вируса гриппа А: штамм вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) с инфекционным титром $7,25 \pm 0,49 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$; штамм адаптированного к лабораторным мышам вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2) с инфекционным титром $4,50 \pm 0,69 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$; штамм пандемического вируса гриппа человека A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 с инфекционным титром $5,00 \pm 0,57 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$. Все используемые штаммы получены из Государственной коллекции микроорганизмов ГНЦ ВБ «Вектор».

Концентрацию вируса каждого субтипа определяли путём титрования в культуре клеток MDCK при культивировании в течение 3 сут в термостате при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности. Титры вируса рассчитывали по методу Спирмена–Кербера, выражали в десятичных логарифмах 50% тканевых цитопатических доз в 1 мл ($\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$) и представляли в виде $M \pm I_{95}$ для (где M — среднее значение, I_{95} — 95% доверительный интервал) и сравнивали по методу Спирмена–Кербера с помощью пакета компьютерных программ «Statistica 6.0» [8, 9].

Исследуемые образцы

Для получения водорастворимого меланина из аптечной чаги (образец 20-24) к 5 г сухого измельчённого (до 1 мм) природного сырья чаги добавляли 100 мл 2% NaOH и выдерживали в автоклаве 30 мин при избыточном давлении 0,7 атм. Далее полученный раствор фильтровали через капроновый и бумажный фильтры. Меланин осаждали концентрированной соляной кислотой и центрифугировали (центрифуга «Centra CL3») 20 мин при 4000 об/мин. Далее проводили 3-кратное переосаждение 1Н соляной кислотой и трижды промывали осадок дистиллированной водой (1 : 10). Полученный препарат не растворяется в воде, но хорошо растворяется в щелочах. Водорастворимую форму меланина получали путём растворения полученного пигмента в 10% водном растворе аммиака (значение pH от 7 до 8) с последующим мягким выпариванием остаточного аммиака и воды до сухого состояния при температуре воздушного потока 30°C. Полученный препарат полностью растворим в воде. Для проведения экспериментов по изучению токсичности и противовирусной активности сухой меланин был растворён в дистиллированной воде до концентрации 2 мг/мл.

В качестве референс-препарата использовали Тамифлю® («Hoffmann-La Roche Ltd.»).

Определение максимально переносимых концентраций образцов и изучение их способности подавлять инфекционность вируса гриппа in vitro

При определении токсических концентраций меланина из чаги исходную концентрацию образца (800 мкг/мл) разводили в 1,5; 2,3; 3,4; 5,0; 7,6; 11,4; 17,1; 25,6; 38,5; 57,5; 86,5; 129,7 раза (с шагом 1,5) средой DMEM, вносили по 100 мкл разведений меланина в лунки 96-луночного планшета с клеточным монослоем (по 4 лунки на каждое разведение образца) и убирали в термостат на 2 сут при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности. Спустя 2 сут с помощью инвертированного микроскопа производили оценку деструктивных изменений монослоя клеток MDCK, инкубированных с различными концентрациями исследуемого образца. Параллельно, в качестве клеточного контроля, использовали монослой культуры MDCK без внесения препарата. За максимально переносимую концентрацию (МПК) принимали ту концентрацию, при которой не было выявлено цитотоксического эффекта.

Исследование способности грибного меланина 20-24 влиять на инфекционную активность (титр) вируса гриппа А в монослое клеток было проведено при использовании МПК для данной клеточной культуры. Препарат сравнения Тамифлю® был использован в концентрации 100 мкг/мл. В лунки 96-луночных планшетов с клеточным монослоем за 1 ч до заражения вносили по 100 мкл образца, разведённого до необходимой концентрации средой DMEM, содержащей 2 мкг/мл трипсина TPCK («Sigma»). Инфицирование монослоя клеток осуществляли десятикратными разведениями вируса гриппа, приготовленными на этой же среде, в объёме 100 мкл/лунку (по 4 лунки на каждое разведение вируса). Клетки инкубировали 2 сут при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности. Далее определяли наличие вируса гриппа в культивируемой среде по реакции гемагглютинации с 1% суспензией куриных эритроцитов. Титр вируса гриппа в опыте (с исследуемым образцом), а также в соответствующем контроле (без образца) определяли в Ig ТЦД₅₀/мл и рассчитывали индекс нейтрализации (ИН), составляющий разницу между титрами вируса в контроле и опыте (Ig) [10]. В соответствии с руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [10] вещество обладает высокой активностью, если подавляет инфекционность вируса в 100 и более раз (ИН ≥ 2,0 Ig).

Определение 50% цитотоксических и 50% ингибирующих вирус гриппа концентраций образцов in vitro

Изучали изменение оптической плотности (ОП) раствора красителя, поглощённого живыми клетками в монослое культуры клеток MDCK,

определяли 50% цитотоксические (ЦТД₅₀) и 50% вирусингибирующие (ЭД₅₀) концентрации препаратов колориметрическим методом [11]. В эксперименте использовали ряд 12-кратных и последовательных 2-кратных разведений водного раствора меланина из чаги: в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2051, 4000 раз средой DMEM (диапазон исследуемых концентраций составлял 0,38–800 мкг/мл). Препарат сравнения Тамифлю® разводили 8 раз с шагом 3 средой DMEM (диапазон исследуемых концентраций составлял 0,046–100,0 мкг/мл).

Для определения ЦТД₅₀ ряд полученных разведений вносили на монослой клеток в объёме 100 мкл/лунку 96-луночного планшета и ставили в термостат при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности на 3 сут. В качестве клеточного контроля использовали интактный монослой (без внесения исследуемого образца).

Для определения ЭД₅₀ в отношении 3 штаммов вируса гриппа А в лунки 96-луночных планшетов с монослоем клеток вносили ряд разведений образцов в объёме 100 мкл/лунку, через 2 ч инкубирования при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности препарат удаляли из лунок и вносили по 100 мкл разведения вируса с множественностью инфицирования 0,1 ТЦД₅₀/клетку. Спустя 1 ч адсорбции вируса на клетках удаляли вирусосодержащую жидкость и снова вносили исследуемые образцы на монослой. В качестве контроля вируса использовали инфицированный монослой клеток (без внесения препарата). Планшеты помещали в термостат при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности на 3 сут.

После инкубирования в лунки планшета, содержащие культуральную среду, вносили витальный (прижизненный) краситель нейтральный красный (50 мкл/лунку) и инкубировали 2 ч при 37°C. Далее клетки промывали двукратно физиологическим раствором в объёме 400 мкл/лунку, вносили лизирующий буфер (смесь равных частей этилового спирта и 0,01 М раствора моноаммонийфосфата, pH 3,5) и через 30 мин определяли ОП. Величину ОП измеряли с помощью многофункционального спектрофотометра «xMark Microplate Absorbance Reader» при длине волны 540 нм, которая является показателем количества жизнеспособных клеток в монослое, сохранившихся при цитопатическом действии вируса или токсического действия исследуемого образца. Затем при помощи компьютерной программы «SoftMaxPro 4.0» результаты ОП представляли в полулогарифмической системе координат. На основании полученных данных рассчитывали ЦТД₅₀ и ЭД₅₀ для исследуемых препаратов. ЦТД₅₀ — величина концентрации определённого образца препарата в лунке планшета, под воздействием которого разрушается 50% клеточного монослоя, ЭД₅₀ — величина концентрации определённого образца препарата в

лунке планшета, под воздействием которого сохраняется 50% жизнеспособного клеточного монослоя. Полученные данные дают возможность рассчитать химиотерапевтический индекс (ХТИ) препарата по формуле: $ХТИ = ЦТД_{50} / ЭД_{50}$. Активными считаются соединения с $ХТИ \geq 8 [10]$.

Результаты

При визуальном изучении цитотоксичности водного раствора меланина из чаги установлено, что МПК данного препарата, не оказывающая на клетки токсического действия, составила 237,0 мкг/мл. Результаты определения противовирусной активности экспериментального образца 20-24, снижающего инфекционность (титры) 3 штаммов вируса гриппа в культуре клеток MDCK, представлены в табл. 1.

Под действием исследуемого образца чаги наблюдалось снижение титра вируса гриппа A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 в 3162 раза, титра вируса A/Aichi/2/68 (H3N2) — в 1000 раз, титра вируса A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) — в 316 раз относительно соответствующих контролей (без образца). ИН составляли 2,5–3,5 Ig.

Определены ЦТД₅₀ и ЭД₅₀ для образца 20-24 и Тамифлю® в отношении 3 штаммов вируса гриппа А и рассчитаны соответствующие значения ХТИ (табл. 2). ЭД₅₀ образца 20-24 для 3 субтипов вируса

гриппа находились в пределах от 1,6 до 9,5 мкг/мл. В отношении пандемического вируса гриппа A/H1N1pdm09 исследуемый образец оказался наиболее активным, т.к. проявил 50% вирусингибирующую активность при наименьшей концентрации (ЭД₅₀ = 1,6 мкг/мл).

Обсуждение

Проведённые исследования показали, что образец меланина 20-24, полученный из чаги, обладает противовирусным действием в системе *in vitro* в отношении исследуемых штаммов вируса гриппа: A/California/04/2009 (H1N1)pdm09, A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1). В исследовании по изучению снижения инфекционности под действием меланина из чаги для 3 субтипов вируса гриппа А выявлены статистические отличия от соответствующих контролей вируса (без внесения образца), установленные по методу Спирмена–Кербера (табл. 1). В данном эксперименте обнаружено, что противовирусное действие образца 20-24 в отношении всех исследуемых штаммов вируса гриппа было сопоставимо с действием Тамифлю®. Разница индексов нейтрализации между референс-препаратом и тестируемым образцом не превышала 1,0 Ig.

При сравнении значений ХТИ для меланина, полученного из чаги, в отношении 3 штаммов виру-

Таблица 1. Снижение инфекционности вируса гриппа А в культуре клеток MDCK под действием водорастворимого меланина из чаги и референс-препарата Тамифлю®

Table 1. Reduction of the influenza A virus infectivity under the influence of water-soluble melanin 20-24 obtained from *Inonotus obliquus* and reference drug Tamiflu®

Штамм вируса гриппа Influenza virus strain	Опыт/контроль Experiment/control	Титр вируса гриппа, Ig TCID ₅₀ /мл Virus titer, Ig TCID ₅₀ /mL ($M \pm I_{95}; n = 4$)	ИН, Ig Neutralization index (IN), Ig
A/California/04/2009 (H1N1)pdm09	Образец 20-24 Sample 20-24	1,50 ± 0,00*	3,50
	Тамифлю® Tamiflu®	2,25 ± 0,49	2,75
	Контроль вируса Virus control	5,00 ± 0,57	–
A/Aichi/2/68 (H3N2)	Образец 20-24 Sample 20-24	1,50 ± 0,00*	3,00
	Тамифлю® Tamiflu®	0,50 ± 0,00*	4,00
	Контроль вируса Virus control	4,50 ± 0,69	–
A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1)	Образец 20-24 Sample 20-24	4,75 ± 0,49*	2,50
	Тамифлю® Tamiflu®	5,00 ± 0,57*	2,25
	Контроль вируса Virus control	7,25 ± 0,49	–

Примечание. *n* — число лунок с монослоем клеток, инфицированных разными разведениями вируса. **p* ≤ 0,05 по сравнению с контролем (без образца) по методу Спирмена–Кербера.

Notes. TCID₅₀ — 50% tissue culture infectious doses; *M* (mean) and SD (standard deviation) for 95% confidence interval calculated by the Spearman–Kerberman method; *n* means the number of wells with the cell monolayer infected with viruses in different concentrations. **p* ≤ 0.05 compared to the control (sample-free) by the Spearman–Kerberman method.

Таблица 2. Противовирусная активность водорастворимого меланина 20-24 из чаги и референс-препарата Тамифлю® в отношении вируса гриппа А в культуре клеток MDCK**Table 2.** Antiviral activity of water-soluble melanin 20-24 obtained from *Inonotus obliquus* and reference drug Tamiflu® against influenza A virus in MDCK cell culture

Штамм вируса гриппа Influenza virus strain	Опыт/контроль Experiment/control	ЦТД ₅₀ , мкг/мл CC ₅₀ , µg/mL	ЭД ₅₀ , мкг/мл IC ₅₀ , µg/mL	ХТИ SI
A/California/04/ 2009 (H1N1)pdm09	Образец 20-24 Sample 20-24	153,45	1,55	99,00
	Тамифлю® Tamiflu®	> 100,00	0,94	> 106,38
A/Aichi/2/68 (H3N2)	Образец 20-24 Sample 20-24	153,45	5,70	26,92
	Тамифлю® Tamiflu®	> 100,00	0,06	> 1666,67
A/chicken/Kurgan/ 05/2005 (H5N1)	Образец 20-24 Sample 20-24	153,45	9,52	16,07
	Тамифлю® Tamiflu®	> 100,00	0,02	> 5000,00

Note. CC₅₀ — 50% cytotoxic concentration; IC₅₀ — 50% inhibitory (effective) concentration; SI — selectivity index.

са гриппа установлено, что самое высокое значение данного показателя, составляющее 99,0 (сопоставимое со значением ХТИ Тамифлю®), было обнаружено для вируса гриппа А/California/04/2009 (H1N1)pdm09. Т.В. Тепляковой и соавт. установлено высокое значение ХТИ меланинов, выделенных из культуральной жидкости и биомассы культивируемого мицелия чаги (штамм F-1244), которое достигало 160 в отношении этого же штамма вируса гриппа [6, 12]. В отношении вируса гриппа А субтипов H3N2 и H5N1 нами были получены значения ЭД₅₀ 5,7 и 9,52 мкг/мл, а ХТИ — 26,92 и 16,07 соответственно.

Таким образом, меланин из чаги 20-24 проявил высокую активность в отношении вируса гриппа А разных субтипов (H1N1pdm09, H3N2, H5N1). При этом наибольшую активность образец меланина оказал против пандемического вируса гриппа А/H1N1pdm09 (снижал его инфекционность на 3,5 lg и обладал ЭД₅₀ 1,6 мкг/мл) [6].

Полученные результаты указывают на перспективность создания противогриппозного препарата на основе меланина *Inonotus obliquus* широкого спектра, снижающего вирусную нагрузку.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Киселева И.В., Ларионова Н.В., Григорьева Е.П., Ксенафонтов А.Д., Фаррух М.А., Руденко Л.Г. Особенности циркуляции респираторных вирусов в пред- и пандемические по гриппу и COVID-19 периоды. *Инфекция и иммунитет*. 2021; 11(6): 1009–19. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-SFO-1662>
2. Lampejo T. Influenza and antiviral resistance: an overview. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 39(7): 1201–08. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03840-9>
3. Зырянов С.К., Бутранова О.И., Гайдай Д.С., Крышень К.Л. Фармакотерапия острых респираторных инфекций, вызванных вирусами гриппа. *Терапевтический архив*. 2021; 93(1): 114–24. <https://doi.org/10.26442/00403660.2021.01.200551>
4. Косогова Т.А. Штаммы базидиальных грибов юга Западной Сибири — перспективные продуценты биологически активных препаратов: дисс. ... канд. биол. наук. Кольцово; 2013.
5. Теплякова Т.В., Косогова Т.А. Высшие грибы Западной Сибири — перспективные объекты для биотехнологии лекарственных препаратов. Новосибирск; 2014.

6. Теплякова Т.В., Ильичева Т.Н., Маркович Н.А. Перспективы создания препаратов против гриппа на основе лекарственных грибов (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. 2020; 56(5): 409–18. <https://doi.org/10.31857/S0555109920050141>
7. Teplyakova T.V., Pyankov O.V., Safatov A.S., Ovchinnikova A.S., Kosogova T.A., Skarnovich M.O., et al. Water extract of the chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (Agaricomycetes), inhibits SARS-CoV-2 replication in Vero E6 and Vero cell culture experiments. *Int. J. Med. Mushrooms*. 2022; 24(2): 23–30. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2021042012>
8. Закс Л. *Статистическое оценивание*. Пер. с нем. М.: Статистика; 1976.
9. Халафян А.А. *Statistica 6. Статистический анализ данных*. М.: Бином-Пресс; 2010.
10. Хабриев Р.У., ред. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. М.: Медицина; 2005.
11. Paragas J., Whitehouse C.A., Endy T.P., Bray M. A simple assay for determining antiviral activity against Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Antiviral. Res.* 2004; 62(1): 21–5. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2003.11.006>
12. Теплякова Т.В., Косогова Т.А., Ильичева Т.Н., Гражданцева А.А., Даниленко Е.Д., Лебедев Л.Д. и др. Штамм базидиального гриба *Inonotus obliquus* — продуцент пигмента меланина, обладающего противовирусной и противоопухолевой активностью. Патент РФ № 2716590C1; 2020.

REFERENCES

1. Kiseleva I.V., Larionova N.V., Grigor'eva E.P., Ksenafontov A.D., Farrukh M.A., Rudenko L.G. Salient features of circulating respiratory viruses in the pre- and pandemic influenza and Covid-19 seasons. *Infektsiya i immunitet*. 2021; 11(6): 1009–19. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-SFO-1662> (in Russian)
2. Lampejo T. Influenza and antiviral resistance: an overview. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 39(7): 1201–08. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03840-9>
3. Zyryanov S.K., Butranova O.I., Gayday D.S., Kryshen' K.L. Pharmacotherapy for acute respiratory infections caused by influenza viruses: current possibilities. *Terapevicheskiy arkhiv*. 2021; 93(1): 114–24. <https://doi.org/10.26442/00403660.2021.01.200551> (in Russian)
4. Kosogova T.A. *Strains of basidial fungi of the south of Western Siberia – promising producers of biologically active drugs*: Diss. Kolt'sovo; 2013. (in Russian)
5. Teplyakova T.V., Kosogova T.A. *Higher fungi of Western Siberia — Promising Objects for Biotechnology of Medicines*

- [*Vysshie griby Zapadnoy Sibiri — perspektivnye ob"ekty dlya biotekhnologii lekarstvennykh preparatov*]. Novosibirsk; 2014. (in Russian)
6. Teplyakova T.V., Il'icheva T.N., Markovich N.A. Future developing medicines against influenza on the basis of medicinal mushrooms (review). *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2020; (5): 409–18. <https://doi.org/10.31857/S0555109920050141> (in Russian)
 7. Teplyakova T.V., Pyankov O.V., Safatov A.S., Ovchinnikova A.S., Kosogova T.A., Skarnovich M.O., et al. Water extract of the chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (Agaricomycetes), inhibits SARS-CoV-2 replication in Vero E6 and Vero cell culture experiments. *Int. J. Med. Mushrooms*. 2022; 24(2): 23–30. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2021042012>
 8. Sachs L. *Statistische Auswertungsmethoden*. Berlin: Springer-Verlag; 1972.
 9. Khalafyan A.A. *Statistica 6. Statistical Data Analysis [Statistica 6. Statisticheskii analiz dannykh]*. Moscow: Binom-Press; 2010. (in Russian)
 10. Khabriev R.U., ed. *Guidelines for Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv]*. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
 11. Paragas J., Whitehouse C.A., Endy T.P., Bray M. A simple assay for determining antiviral activity against Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Antiviral. Res.* 2004; 62(1): 21–5. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2003.11.006>
 12. Teplyakova T.V., Kosogova T.A., Il'icheva T.N., Grazhdantseva A.A., Danilenko E.D., Lebedev L.D., et al. The strain of the basidial fungus *Inonotus obliquus* is a producer of melanin pigment with antiviral and antitumor activity. Patent RF No. 2716590C1; 2020. (in Russian)

Информация об авторах

Филиппова Екатерина Игоревна — н.с. отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9554-4462>

Макаревич Елена Викторовна — н.с. отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5146-8979>

Проценко Мария Анатольевна — к.б.н., с.н.с. отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, protsenko_ma@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1995-7588>

Мазурков Олег Юрьевич — к.б.н., с.н.с. отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8164-4091>

Теплякова Тамара Владимировна — д.б.н., профессор, в.н.с. отдела биофизики и экологических исследований ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4754-5051>

Мазуркова Наталья Алексеевна — д.б.н., в.н.с. отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1896-2684>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 22.05.2022;
принята к публикации 29.11.2022;
опубликована 14.02.2022

Information about the authors

Ekaterina I. Filippova — researcher, Department of prevention and treatment of especially dangerous infections, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9554-4462>

Elena V. Makarevich — researcher, Department of prevention and treatment of especially dangerous infections, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5146-8979>

Maria A. Protsenko — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of prevention and treatment of especially dangerous infections, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, protsenko_ma@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1995-7588>

Oleg Yu. Mazurkov — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of prevention and treatment of especially dangerous infections, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8164-4091>

Tamara V. Teplyakova — D. Sci. (Biol.), Professor, leading researcher, Department of Biophysics and Ecological Research, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4754-5051>

Natalya A. Mazurkova — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Department of prevention and treatment of especially dangerous infections, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1896-2684>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 22.05.2022;
accepted for publication 29.11.2022;
published 14.02.2022