



## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



### ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-174>

© ТЕПЛЯКОВА Т.В., КАБАНОВ А.С., ОВЧИННИКОВА А.С., ОДНОШЕВСКИЙ Д.А., ПЕТРОВСКАЯ И.Ф., НЕПОМНЯЩИХ Т.С., ПЬЯНКОВ О.В., 2023

# Скрининг противовирусной активности образцов из чаги *Inonotus obliquus* и гуминовой кислоты из бурого угля на культуре клеток *Vero* в отношении вируса эктромелии (Poxviridae: *Orthopoxvirus*; ECTV)

Теплякова Т.В., Кабанов А.С., Овчинникова А.С., Одношевский Д.А., Петровская И.Ф., Непомнящих Т.С., Пьянков О.В.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

**Введение.** Специфичный для мыши ортопоксвирус – вирус эктромелии – является одной из лучших моделей, которую можно использовать для изучения основных вопросов патогенеза, профилактики и лечения оспы, а также разработки мер для повышения вирулентности, трансмиссивности или способности преодолевать вакцинный иммунитет.

**Целью работы** является скрининг противовирусной активности образцов из чаги *Inonotus obliquus* и гуминовой кислоты из бурого угля *in vitro* в отношении вируса эктромелии.

**Материалы и методы.** В работе использовали вирус эктромелии, штамм К-1 (рег. номер V-142), полученный из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора; культуру клеток *Vero E6* (шифр коллекционный 70), полученную из Коллекции культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Для 9 образцов из чаги *I. obliquus* и гуминовой кислоты из бурого угля была проведена оценка изменения инфекционности вируса эктромелии на культуре клеток при использовании двух схем внесения препаратов и вируса (профилактической и лечебной), а также определение их цитотоксичности и противовирусной активности.

**Результаты.** Для всех образцов были определены 50% цитотоксическая концентрация, 50% эффективные дозы и химиотерапевтические индексы образцов. Было показано, что исследуемые образцы не являются токсичными для монослоя культуры клеток *Vero E6* в разведении 300 мкг/мл и более, продемонстрировали высокую противовирусную активность в отношении штамма К-1 вируса эктромелии в двух схемах применения – профилактической и лечебной.

**Заключение.** Все образцы, проверенные в отношении вируса эктромелии *in vitro*, могут рассматриваться как перспективные для дальнейшей разработки препаратов против заболеваний, вызываемых ортопоксвирусами.

**Ключевые слова:** чага; *Inonotus obliquus*; меланин; гуминовая кислота; вирус эктромелии; *in vitro*; противовирусная активность

**Для цитирования:** Теплякова Т.В., Кабанов А.С., Овчинникова А.С., Одношевский Д.А., Петровская И.Ф., Непомнящих Т.С., Пьянков О.В. Скрининг противовирусной активности образцов из чаги *Inonotus obliquus* и гуминовой кислоты из бурого угля на культуре клеток *Vero* в отношении вируса эктромелии (Poxviridae: *Orthopoxvirus*; ECTV). *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(3): 277-282. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-174> EDN: <https://elibrary.ru/scsivx>

**Для корреспонденции:** Теплякова Тамара Владимировна, д-р биол. наук, профессор, в.н.с. отдела биофизики и экологических исследований, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: [terlyakova@vector.nsc.ru](mailto:terlyakova@vector.nsc.ru)

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

**Финансирование.** Статья подготовлена в рамках выполнения государственного задания ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.

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

Поступила 12.05.2023  
Принята в печать 22.06.2023  
Опубликована 30.06.2023

## ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-174>

## Screening of antiviral activity of samples from chaga *Inonotus obliquus* and humic acid from brown coal on *Vero* cell culture against ectromelia virus (Poxviridae: *Orthopoxvirus*; ECTV)

Tamara V. Teplyakova, Aleksey S. Kabanov, Alena S. Ovchinnikova, Dmitry A. Odnoshevsky, Irina F. Petrovskaya, Tatiana S. Nepomnyashchikh, Oleg V. Pyankov

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

**Introduction.** The mouse-specific orthopoxvirus, ectromelia virus, is one of the best models that can be used to study key issues of pathogenesis, prevention, and treatment of smallpox, and to develop measures to increase virulence, transmissibility, or the ability to overcome vaccine immunity.

**The aim of the work** is to screen the antiviral activity of samples from *Inonotus obliquus* chaga and humic acid from brown coal *in vitro* against ectromelia virus.

**Materials and methods.** We used ectromelia virus, strain K-1 (reg. No V-142), obtained from the State Collection of Pathogens of Viral Infections and Rickettsioses of the State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector"; *Vero E6* cell culture (No 70) from the Collection of cell cultures of the State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector". Nine samples from chaga *I. obliquus* and humic acid from brown coal were used to evaluate the changes in the infectivity of the ectromelia virus on cell culture using 2 schemes of application of drugs and virus (preventive and therapeutic schemes), and to assess their cytotoxicity and antiviral activity.

**Results.** 50% cytotoxic concentration, 50% virus-inhibiting concentrations and selectivity index were determined for all samples. The studied samples were shown to be non-toxic to the monolayer of *Vero* cell culture in a dilution of 300 and more micrograms/ml, while demonstrated high antiviral activity against strain K-1 of ectromelia virus in two application schemes – preventive and curative.

**Conclusion.** All samples tested for ectromelia virus *in vitro* can be considered promising for further development of drugs against diseases caused by orthopoxviruses.

**Keywords:** *chaga; Inonotus obliquus; melanin; humic acid; ectromelia virus; in vitro; antiviral activity*

**For citation:** Teplyakova T.V., Kabanov A.S., Ovchinnikova A.S., Odnoshevsky D.A., Petrovskaya I.F., Nepomnyashchikh T.S., Pyankov O.V. Screening of antiviral activity of samples from chaga *Inonotus obliquus* and humic acid from brown coal on *Vero* cell culture against ectromelia virus (Poxviridae: *Orthopoxvirus*; ECTV). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(3): 277-282 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-174> EDN: <https://elibrary.ru/scsvix>

**For correspondence:** Tamara V. Teplyakova, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Leading Researcher, Department of Biophysics and Ecological Research, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: [teplyakova@vector.nsc.ru](mailto:teplyakova@vector.nsc.ru)

**Information about the authors:**

Teplyakova T.V., <https://orcid.org/0000-0002-0621-8698>

Kabanov A.S., <https://orcid.org/0000-0002-6287-0912>

Ovchinnikova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-1745-7643>

Odnoshevsky D.A., <https://orcid.org/0000-0003-0616-7488>

Petrovskaya I.F., <https://orcid.org/0000-0002-9833-0555>

Nepomnyashchikh T.S., <https://orcid.org/0000-0003-0592-8273>

Pyankov O.V., <https://orcid.org/0000-0003-3340-8750>

**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.

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

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

Received 12 May 2023  
Accepted 22 June 2023  
Published 30 June 2023

## Введение

Натуральная оспа – высококонтагиозная вирусная инфекция, характеризующая тяжёлым течением, лихорадкой, сыпью на коже и слизистых оболочках, нередко оставляющая после себя рубцы. Вирус, вызывающий заболевание, относится к семейству *Poxviridae* подсемейства *Chordopoxvirinae* рода *Orthopoxvirus*. Семейство *Poxviridae* включает в себя большое количество вирусов, в том числе патогенных для человека: вирус натуральной оспы, вирус оспы обезьян, вирус оспы коров, вирус экстремелии (ВЭ) и др. После завершения беспрецедентной международной программы глобальной ликвидации оспы, проходившей под эгидой Всемирной организации здравоохранения, прошло более 40 лет. За это время по всему миру резко возросло количество людей, утративших специфический иммунитет против данного заболевания. Несмотря на искоренение оспы, угроза её возникновения существует и сегодня, поскольку невозможно исключить наличие нелегального хранения вируса натуральной оспы и преднамеренного использования данного патогена в целях биотерроризма. Не следует также забывать, что существует множество мест погребения умерших от неё людей, часть из которых находится на территории вечной мерзлоты, что не исключает возможности оттаивания данных регионов в условиях резко меняющегося климата и дальнейшего распространения вируса. При этом близкие по структуре к вирусу натуральной оспы зоонозные ортопоксвирусы также представляют опасность для человека.

ВЭ – это специфичный для мыши ортопоксвирус, который вызывает летальную инфекцию у некоторых линий мышей. ВЭ – возбудитель мышьяной оспы – впервые был описан в Англии в 1930 г. и вызвал смертельную болезнь у лабораторных мышей. Восприимчивость к ВЭ зависит от факторов хозяина, таких как линия мыши, возраст, пол и иммунный статус, а также от вирусных факторов [1].

Инфекция ВЭ у мышей была тщательно изучена, её патогенез с локализованной репликацией и системным распространением аналогичен патогенезу вируса натуральной оспы у людей [2]. ВЭ, возможно, является лучшей моделью для изучения оспы на мелких лабораторных животных. Эта модель может использоваться для изучения основных вопросов патогенеза, оценки профилактических и терапевтических методов лечения оспы, а также разработки контрмер против ортопоксвирусов, созданных с помощью биоинженерии, для повышения вирулентности, трансмиссивности или способности преодолевать вакцинный иммунитет [3].

**Цель работы** – скрининг противовирусной активности образцов из чаги *Inonotus obliquus* и гуминовой кислоты из бурого угля на культуре клеток *Vero* в отношении ВЭ с определением противовирусной эффективности препаратов при использовании двух схем внесения препаратов и ВЭ – профилактической и лечебной. Образцы, проверенные в отношении ВЭ *in vitro*, будут рассматриваться как перспективные для

разработки препаратов от ортопоксвирусов и в дальнейшем исследованы в отношении ВЭ *in vivo*.

## Материалы и методы

### Вирусы

В работе использовали ВЭ, штамм К-1 (рег. номер V-142), полученный из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии (ГНЦ ВБ) «Вектор» Роспотребнадзора. Вирус нарабатывали в культуре клеток *Vero*, его концентрацию в культуральной жидкости определяли путём титрования методом бляшек на культуре клеток *Vero* (шифр коллекционный 70), рассчитывали и выражали в десятичных логарифмах бляшкообразующих единиц в миллилитрах (lg БОЕ/мл). Концентрация вируса, использованного в работе, составляла 6,4 lg БОЕ/мл. В предварительных экспериментах на культуре клеток *Vero* была подобрана минимальная доза ВЭ, вызывающая 100% цитопатическое действие в лунке. Такая доза составила 1000 БОЕ/лунка. Нароботанный и использованный в исследовании вирус с указанным титром хранили при –70 °С.

### Клеточные культуры

В работе использовали клетки почки взрослой африканской зелёной мартышки (*Vero E6*), полученные из Коллекции культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Монослой клеток *Vero* выращивали в среде Игла (ООО «БиолоТ», Россия) в присутствии 5% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США) с добавлением пенициллина (100 МЕ/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). В качестве поддерживающей при культивировании клеток с вирусом использовали ту же среду, но с добавлением 2% сыворотки [4].

### Исследуемые образцы

Для исследования были использованы водные экстракты природной чаги, меланин из чаги, а также гуминовая кислота из бурого угля. Масса сухого вещества каждого из экстрактов составляла 2 мг/мл. В целом было исследовано 3 водных экстракта чаги, 3 образца меланина и 3 образца гуминовой кислоты. Подробное описание образцов, приведенных в **таблице**, представлено в патентах [5–7].

### Определение 50% цитотоксических и 50% ингибирующих вирус экстремелии концентраций образцов *in vitro*

Противовирусная эффективность исследуемых препаратов оценивалась по изменению инфекционности ВЭ (титра) в монослое клеток *Vero E6* при использовании двух схем внесения препаратов и ВЭ – профилактической и лечебной [4].

**Профилактическая схема.** На монослой культуры клеток вносили по 0,1 мл соединений и помещали в термостат на 2 ч при температуре 37 °С. После двухчасовой обработки монослоя препаратами вносили

**Таблица. Противовирусная активность образцов из чаги и гуминовой кислоты из бурого угля в отношении вируса экстремелии штамма К-1 в двух схемах применения**

**Table. The antiviral activity of samples from chaga and humic acid from brown coal against strain K-1 of ectromelia virus in 2 application schemes**

Код образца Sample code	Масса сухого вещества, мг/мл Dry matter weight, mg/mL	Вещество Substance	Схема применения, культура клеток Application scheme, Cell culture	ЦТД <sub>50</sub> , мкг/мл CC <sub>50</sub> , µg/mL	ЭД <sub>50</sub> , мкг/мл IC <sub>50</sub> , µg/mL	ХТИ SI
20-13	2,0	Экстракт чаги Chaga extract	Профилактическая, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Preventive, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	2,84	105,6
			Лечебная, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Therapeutic, <i>Vero E6</i> , 6 days	300	2,25	133,3
20-15	2,0	Экстракт чаги Chaga extract	Профилактическая, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Preventive, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	2,08	144,2
			Лечебная, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Therapeutic, <i>Vero E6</i> , 6 days	300	1,97	152,3
20-17	2,0	Экстракт чаги Chaga extract	Профилактическая, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Preventive, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	2,91	103
			Лечебная, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Therapeutic, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	2,89	103,8
20-24	2,0	Меланин Melanin	Профилактическая, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Preventive, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	2,33	128,7
			Лечебная, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Therapeutic, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	3,38	88,7
20-29	2,0	Меланин Melanin	Профилактическая, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Preventive, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	3,41	88
			Лечебная, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Therapeutic, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	3,58	83,8
20-30	2,0	Меланин Melanin	Профилактическая, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Preventive, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	3,17	94,6
			Лечебная, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Therapeutic, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	3,02	99,3
20-50	2,0	Гуминовая кислота Humic acid	Профилактическая, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Preventive, <i>Vero E6</i> , 6 days	300	2,24	134
			Лечебная, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Therapeutic, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	2,29	131
20-51	2,0	Гуминовая кислота Humic acid	Профилактическая, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Preventive, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	2,88	104
			Лечебная, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Therapeutic, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	3,14	95,5
20-55	2,0	Гуминовая кислота Humic acid	Профилактическая, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Preventive, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	3,05	98,4
			Лечебная, <i>Vero E6</i> , 6 сут. Therapeutic, <i>Vero E6</i> , 6 days	>300	3,51	85,5

**Примечание.** ЦТД<sub>50</sub> – 50% цитотоксическая концентрация; ЭД<sub>50</sub> – 50% эффективные дозы; ХТИ – химиотерапевтический индекс.

**Note.** CC<sub>50</sub> – 50% cytotoxic concentration; IC<sub>50</sub> – 50% inhibitory (effective) concentration; SI –selectivity index.

по 0,1 мл вируса в дозе 1000 БОЕ/лунка. При профилактической схеме конечная концентрация препаратов в лунке была 300; 100; 33,33; 11,11 и 3,70 мкг/мл.

**Лечебная схема.** Заражение клеточного монослоя осуществляли тройным разведением ВЭ (1000 БОЕ/лунка) в объеме 0,1 мл. Планшет с внесённым вирусосодержащим материалом помещали в термостат на 1 ч при 37 °С для адсорбции вируса на культуру клеток. После адсорбции в лунки вносили разведения препарата в объеме 0,1 мл. При лечебной схеме конечная концен-

трация препаратов в лунке была 300; 100; 33,33; 11,11 и 3,70 мкг/мл. Каждая схема применения препаратов *in vitro* была воспроизведена в 4 повторах.

*Метод определения 50% цитотоксических и 50% ингибирующих вирус экстремелии концентраций образцов*

Оценку противовирусной эффективности препаратов проводили по адаптированной и модифицированной нами методике [8]. В лунки 96-луночных

планшетов, содержащих монослой клеток *Vero*, сначала вносили по 100 мкл серийных разведений исследуемых соединений и по 100 мкл разведения штамма ВЭ в дозе 1000 БОЕ/лунка в соответствии со схемой внесения. Токсическая активность соединений определялась по гибели клеток под воздействием препарата в лунках планшета, в которые вирус не вносили. В качестве контроля использовали монослой клеток в лунках планшета, в которые вносили вирус без соединений (контроль вируса) и монослой клеток в лунках, в которые не вносили ни вирус, ни соединения (контроль культуры клеток). После инкубирования в течение 6 суток монослой клеток прокрашивали витальным красителем (нейтральным красным) в течение 2 ч. После удаления красителя и отмывки лунок от его несвязавшейся фракции добавляли лизирующий буфер. Количество красителя, адсорбированное живыми клетками монослоя, оценивали по оптической плотности, которая является показателем количества неразрушенных под влиянием вируса клеток в монослое. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Emax (Molecular Devices, США) при длине волны 490 нм. Учёт результатов проводили с использованием планшетного спектрофотометра Emax и компьютерной программы SoftMaxPro 4.0, результаты оптической плотности представляли в полулгарифмической системе координат. На основании полученных данных рассчитывали 50% цитотоксическую концентрацию (ЦТД<sub>50</sub>) и 50% эффективные дозы (ЭД<sub>50</sub>) для исследуемых препаратов, где ЦТД<sub>50</sub> – величина концентрации определённого образца препарата в лунке планшета, под воздействием которого разрушается 50% клеточного монослоя; ЭД<sub>50</sub> – величина концентрации определённого образца препарата в лунке планшета, под воздействием которого сохраняется 50% жизнеспособного клеточного монослоя. Полученные данные дают возможность рассчитать химиотерапевтический индекс препарата (ХТИ) по формуле:  $ХТИ = ЦТД_{50} / ЭД_{50}$ . Активными считаются соединения с  $ХТИ \geq 8$  [9].

#### Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами [10]. В случаях, когда при титровании на монослое клеток ВЭ не выявлялся из-за существующего порога чувствительности метода, использовали значение минимального титра ВЭ, выявляемого при данном методе титрования (10 БОЕ/мл, т.е. 1 Ig БОЕ/мл). Сравнение показателей средних титров ВЭ в монослое клеток *Vero* проводили с применением непараметрического U-критерия Манна–Уитни [10]. Различия считали достоверными при 95% уровне надежности ( $p \leq 0,05$ ). Результаты представлены в таблице.

#### Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы, исследуемые образцы не являются токсичными для монослоя культуры клеток *Vero E6* в разведении 300 мкг/мл и более. Все образцы

показали высокую противовирусную активность в отношении ВЭ штамма К-1 в двух схемах применения – профилактической и лечебной.

В 4 из 9 исследованных экстрактов ХТИ в двух схемах применения был выше 100, это образцы 20-13, 20-15, 20-17 и 20-50. Водный экстракт чаги под номером 20-15 проявил выраженное противовирусное действие. В лечебной схеме применения при концентрации соединения всего 1,97 мкг/мл он вызывал 50% ингибирующее действие. Следует отметить, что ХТИ у этого соединения был самым высоким и составил в профилактической схеме применения 144,2, а в лечебной – 152,3. Образец меланина из чаги 20-24 и образец гуминовой кислоты из бурого угля 20-51 также показали противовирусное действие с высоким ХТИ при профилактической схеме применения. Остальные три соединения под номерами 20-29, 20-30 и 20-55 показали сравнительно высокую противовирусную активность в двух схемах применения. Данные эксперименты проводились в четырёх повторениях с интервалом в 1 неделю. Все результаты были сопоставимы.

#### Заключение

Все образцы, проверенные в отношении ВЭ *in vitro*, могут рассматриваться как перспективные для разработки препаратов от ортопоксвирусов. Ранее мы имели возможность провести исследования по оценке водных экстрактов грибов и некоторых гуминовых соединений на вирус натуральной оспы и осповакцины [11]. Нами было отмечено, что чага содержит широкий спектр различных биологически активных веществ. Основным компонентом является хромоген-полифенолоксикарбоновый комплекс, близкий по физико-химическим характеристикам к гуминовой кислоте. Водные экстракты чаги и меланин проявляли противовирусный эффект ко всем исследуемым нами вирусам, в том числе ко многим штаммам вируса гриппа и коронавирусу SARS-CoV-2, вызвавшему эпидемию COVID-19 [12].

Безусловно, необходимо дальнейшее изучение гриба чаги и некоторых его компонентов с целью разработки на их основе лекарственных и профилактических препаратов против заболеваний, вызываемых ортопоксвирусами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Fenner F., Buller R.M. Mousepox. In: Nathanson R.A.N., Gonzalez-Scarano F., Griffin D.E., Holmes K.V., Murphy F.A., Robinson H.L., eds. *Viral Pathogenesis*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven; 1997: 535–53.
2. Jordan R., Hruby D. Smallpox antiviral drug development: satisfying the animal efficacy rule. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2006; 4(2): 277–89. <https://doi.org/10.1586/14787210.4.2.277>
3. Buller R.M. Mousepox: a small animal model for biodefense research. *Appl. Biosaf.* 2004; 9(1): 10–9.
4. Кабанов А.С., Сергеев Ал.А., Булычев Л.Е., Бормотов Н.И., Шишкина Л.Н., Сергеев Ар.А. и др. Изучение противовирусной активности химически синтезированных соединений в отношении ортопоксвирусов в экспериментах *in vitro*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; (2): 54–9. <https://elibrary.ru/qbzekx>
5. Теплякова Т.В., Пьянков О.В., Скарнович М.О., Бормотов Н.И., Косогова Т.А., Овчинникова А.С. и др. Ингибитор репликации

- коронавируса SARS-CoV-2 на основе водного экстракта гриба *Inonotus obliquus*. Патент РФ № 2741714; 2021.
6. Теплякова Т.В., Пьянков О.В., Скарнович М.О., Бормотов Н.И., Потешкина А.Л., Овчинникова А.С. и др. Ингибитор репликации коронавируса SARS-CoV-2 на основе меланина из гриба *Inonotus obliquus*. Патент РФ № 2747018; 2021.
  7. Теплякова Т.В., Пьянков О.В., Скарнович М.О., Бормотов Н.И., Потешкина А.Л., Овчинникова А.С. и др. Ингибитор репликации коронавируса SARS-CoV-2 на основе гуминовых веществ. Патент РФ № 2752872; 2021.
  8. Baker R.O., Bray M., Huggins J.W. Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections. *Antiviral Res.* 2003; 57(1-2): 13–23. [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(02\)00196-1](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(02)00196-1)
  9. Хабриев Р.У., ред. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. М.: Медицина; 2005.
  10. Закс Л. *Статистическое оценивание*. Пер. с нем. М.: Статистика; 1976.
  11. Теплякова Т.В., Булычев Л.Е., Косогова Т.А., Ибрагимова Ж.Б., Юрганова И.А., Кабанов А.С. и др. Противовирусная активность экстрактов из базидиальных грибов в отношении ортопоксвирусов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012; (3): 99–101. <https://elibrary.ru/pekrceb>
  12. 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>
  3. Buller R.M. Mousepox: a small animal model for biodefense research. *Appl. Biosaf.* 2004; 9(1): 10–9.
  4. Kabanov A.S., Sergeev A.I.A., Bulychev L.E., Bormotov N.I., Shishkina L.N., Sergeev Ar.A., et al. Studies of anti-viral activity of chemically synthesized compounds against orthopoxviruses *in vitro*. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2013; (2): 54–9. <https://elibrary.ru/qbzekx> (in Russian)
  5. Teplyakova T.V., P'yankov O.V., Skarnovich M.O., Bormotov N.I., Kosogova T.A., Ovchinnikova A.S., et al. Inhibitor of SARS-CoV-2 coronavirus replication based on an aqueous extract of *Inonotus obliquus* fungus. Patent RF № 2741714; 2021. (in Russian)
  6. Teplyakova T.V., P'yankov O.V., Skarnovich M.O., Bormotov N.I., Poteshkina A.L., Ovchinnikova A.S., et al. A melanin-based inhibitor of SARS-CoV-2 coronavirus replication from the fungus *Inonotus obliquus*. Patent RF № 2747018; 2021. (in Russian)
  7. Teplyakova T.V., P'yankov O.V., Skarnovich M.O., Bormotov N.I., Poteshkina A.L., Ovchinnikova A.S., et al. Inhibitor of SARS-CoV coronavirus replication-2 based on humic substances. Patent RF № 2752872; 2021. (in Russian)
  8. Baker R.O., Bray M., Huggins J.W. Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections. *Antiviral Res.* 2003; 57(1-2): 13–23. [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(02\)00196-1](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(02)00196-1)
  9. Khabriev R.U., ed. *Guidelines for the Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv]*. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
  10. Sachs L. *Statistische auswertungsmethoden*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 1972.
  11. Teplyakova T.V., Bulychev L.E., Kosogova T.A., Ibragimova Zh.B., Yurganova I.A., Kabanov A.S., et al. Antiviral activity of extracts from basidiomycetes for orthopoxviruses. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2012; (3): 99–101. <https://elibrary.ru/pekrceb> (in Russian)
  12. 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>

## REFERENCES

1. Fenner F., Buller R.M. Mousepox. In: Nathanson R.A.N., Gonzalez-Scarano F., Griffin D.E., Holmes K.V., Murphy F.A., Robinson H.L., eds. *Viral Pathogenesis*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven; 1997: 535–53.
2. Jordan R., Hraby D. Smallpox antiviral drug development: satisfying the animal efficacy rule. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2006; 4(2): 277–89. <https://doi.org/10.1586/14787210.4.2.277>