



Противовирусная активность экстрактов базидиомицетов и гуминовых соединений в отношении вируса иммунодефицита человека (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1*) и вируса простого герпеса (*Herpesviridae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1*)

Носик Д.Н.¹, Носик Н.Н.¹, Теплякова Т.В.², Лобач О.А.¹, Киселева И.А.¹, Кондрашина Н.Г.¹, Бочкова М.С.¹, Ананько Г.Г.²

¹Институт вирусологии имени Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва;

²ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская обл.

Введение. Актуальнейшей проблемой современной медицины является борьба с заболеванием, вызываемым вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), – ВИЧ-инфекцией. Применяемые химические соединения улучшили ситуацию для инфицированных, однако они токсичны, нарушают обмен веществ и не могут избавить организм от интегрированного вируса. Появление резистентных штаммов ВИЧ делает эти лечебные средства неэффективными. Часто смерть ВИЧ-инфицированных наступает в результате развития оппортунистических инфекций, вызванных вирусами семейства *Herpesviridae*. Поэтому актуален поиск новых лечебных и профилактических препаратов, менее токсичных, активных в отношении нескольких вирусов одновременно. Базидиомицеты, высшие грибы, являются источником лекарственных соединений, обладающих антимикробными и противовирусными свойствами. Гуминовые соединения (ГС) различной природы также обладают противовирусной активностью.

Цель исследования – получение и испытание нетоксичных препаратов из базидиомицета *Inonotus obliquus* и ГС из бурых углей в отношении вирусов, патогенных для человека: ВИЧ и вируса простого герпеса (ВПГ).

Материал и методы. На модели лимфобластоидных клетках МТ-4, инфицированных штаммами ВИЧ, тип 1 (ВИЧ-1), и монослойной культуры клеток *Vero*, инфицированной ВПГ, тип 1 (ВПГ-1), изучена противовирусная активность экстрактов меланина, полученных из культивируемой культуры гриба чага *Inonotus obliquus*, и ГС – из бурого угля Канско-Ачинского месторождения с использованием вирусологических и статистических методов исследования.

Результаты и обсуждение. Установлено, что все исследованные соединения не обладали цитотоксическим действием на клетки при концентрации 100 мкг/мл. Показано, что экстракты базидиомицетов и ГС обладают противовирусной активностью в отношении ВИЧ-1 и ВПГ-1. ЭК₅₀ (50% эффективная концентрация) в отношении ВИЧ-1 составила 3,7–5,0 мкг/мл, индекс селективности – 28–35. Противогерпетическая активность обнаружена при дозе 50–100 мкг/мл. Противовирусная эффективность меланиновых соединений установлена как при «профилактической» (за 2 ч до инфицирования клеток), так и при «лечебной» схеме введения препаратов как в отношении ВИЧ-1, так и ВПГ-1. Наличие противовирусной активности меланина и ГС в отношении РНК-содержащего вируса ВИЧ-1 и ДНК-содержащего вируса ВПГ-1 в нашем исследовании совпадает с результатами ряда авторов в отношении вирусов гриппа, герпеса, ВИЧ, гепатита В, Коксаки, осповакцины, что позволяет высказать предположение о том, что тип нуклеиновой кислоты вируса не играет принципиальной роли в антивирусном действии этих препаратов. Очевидно также, что ГС эффективны как в отношении вирусов с оболочкой, так и безоболочечных вирусов.

Заключение. В целом можно заключить, что для меланиновых и гуминовых соединений характерна низкая токсичность при наличии и вирулицидной, и противовирусной активности. Это позволяет рассматривать исследованные соединения как основу для создания безопасных лекарственных средств, эффективных в отношении возбудителей различных вирусных инфекций.

Ключевые слова: противовирусная активность; ВИЧ-1; ВПГ-1; базидиомицеты; гуминовые соединения.

Для цитирования: Носик Д.Н., Носик Н.Н., Теплякова Т.В., Лобач О.А., Киселева И.А., Кондрашина Н.Г., Бочкова М.С., Ананько Г.Г. Противовирусная активность экстрактов базидиомицетов и гуминовых соединений в отношении вируса иммунодефицита человека (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1*) и вируса простого герпеса (*Herpesviridae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1*). *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(5): 276–283. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-4>

Для корреспонденции: Лобач Ольга Александровна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории противовирусных и дезинфекционных средств Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва. E-mail: victoriola@yandex.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Финансирование. Работа была частично поддержана финансированием по теме ГНЦ ВБ «Вектор» 03-02-14.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила 30.04.2020

Принята в печать 17.09.2020

Antiviral activity of extracts of basidiomycetes and humic compounds substances against Human Immunodeficiency Virus (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1*) and Herpes Simplex Virus (*Herpesviridae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1*)

Dmitry N. Nosik¹, Nickolay N. Nosik¹, Tamara V. Teplyakova², Olga A. Lobach¹, Irina A. Kiseleva¹, Nina G. Kondrashina¹, Marina S. Bochkova¹, Grigoriy G. Ananko²

¹The D.I. Ivanovsky Institute of Virology FSBI «National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow;

²FBU State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor, 630559, Koltsovo district, Novosibirsk region.

Introduction. One of the most urgent problem of modern medicine is the fight against the disease caused by the Human Immunodeficiency Virus (HIV) – HIV infection. The chemical compounds have improved the situation for infected people, but they are toxic, disrupt the metabolism and cannot eliminate the integrated virus from the body. The emergence of resistant HIV strains makes these treatments ineffective. Often, the death of HIV-infected people occurs as a result of the development of opportunistic infections caused by viruses of the *Herpesviridae* family. Therefore, the search for new therapeutic and preventive drugs that are less toxic and active against several viruses at the same time is relevant. *Basidiomycetes*, higher fungi, are a source of medicinal compounds that have antimicrobial properties, as well as antiviral ones. Humic compounds (HS) of various nature also have antiviral activity.

The aim of the study was to obtain nontoxic compounds from the basidiomycete *Inonotus obliquus* and humic compounds from brown coals and to test their activity against viruses that are pathogenic to humans: HIV and Herpes Simplex Virus (HSV).

Material and methods. The antiviral activity of melanin extracts obtained from the culture of the chaga fungus *Inonotus obliquus* and HS from the brown coal of the Kansko-Achinsk Deposit was studied using a model of MT-4 lymphoblastoid cells infected with HIV type 1 (HIV-1) strains and a monolayer culture of Vero cells infected with HSV type 1 (HSV-1) using virological and statistical research methods.

Results and discussion. It was found that all the studied compounds did not have a cytotoxic effect on cells at a concentration of 100 mcg/ml. It was shown that extracts of basidiomycetes and HS have antiviral activity against HIV-1 and HSV-1. EC₅₀ (50%-effective concentration) for HIV-1 was 3.7–5.0 mcg/ml, selectivity index 28–35. Antiherpetic activity was detected at a dose of 50–100 mcg/ml. The antiviral effectiveness of melanin compounds was established both in the «preventive» (2 hours before cell infection) and in the «therapeutic» regimen of drug administration, both for HIV-1 and HSV-1. The presence of antiviral activity of melanin and HS in relation to the RNA-containing HIV-1 virus and DNA-containing HSV-1 virus in our study coincides with the results of a number of authors in relation to influenza viruses, herpes virus, HIV, hepatitis B virus, Coxsackievirus, smallpox vaccine virus, which suggests that the type of nucleic acid in the virus does not play a fundamental role in the antiviral action of these drugs. It is also clear that HS is effective against both enveloped and non-enveloped viruses.

Conclusion. In general, it can be concluded that melanin and humic compounds are characterized by low toxicity in the presence of both virucidal and antiviral activity. This allows us to consider the studied compounds as the basis for creating safe medicines that are effective against pathogens of various viral infections.

Keywords: antiviral activity; HIV-1; HSV-1; basidiomycetes; humic compounds.

For citation: Nosik D.N., Nosik N.N., Teplyakova T.V., Lobach O.F., Kiseleva I.A., Kondrashina N.G., Bochkova M.S., Ananko G.G. Antiviral activity of extracts of basidiomycetes and humic compounds against Human Immunodeficiency Virus (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1*) and Herpes Simplex Virus (*Herpesviridae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1*). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2020;65(5): 276-283. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-4>

For correspondence: Olga A. Lobach, Cand. Sci. Biol., senior researcher at the Laboratory of antiviral and disinfection agents of The D.I. Ivanovsky Institute of Virology FSBI «National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow. E-mail: victoriola@yandex.ru

Information about the authors:

Nosik D.N., <http://orcid.org/0000-0001-5757-5671>

Nosik N.N., <http://orcid.org/0000-0003-1943-6536>

Teplyakova T.V., <http://orcid.org/0000-0003-4754-5051>

Lobach O.A., <http://orcid.org/0000-0001-9351-6433>

Kiseleva I.A., <http://orcid.org/0000-0003-3693-6081>

Kondrashina N.G. <http://orcid.org/0000-0003-3985-3839>

Bochkova M.S., <http://orcid.org/0000-0001-9295-8379>

Ananko G.G., <http://orcid.org/0000-0001-6570-5501>

Contribution: the authors contributed equally to this article.

Acknowledgements. The work was partially supported by funding on the topic of FBU VB «Vector» 03-02-14.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 30 April 2020

Accepted 17 September 2020

Введение

Актуальнейшей проблемой современной медицины является борьба с заболеванием, вызываемым вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), – ВИЧ-инфекцией, которая за короткий срок привела к заражению и смерти миллионов человек. Применяемые химические соединения улучшили ситуацию для инфицированных, однако они токсичны для человека, нарушают обмен веществ и не могут избавить организм от интегрированного вируса [1–3]. Появление резистентных штаммов ВИЧ делает эти лечебные средства неэффективными. Течение ВИЧ-инфекции тесно связано с развитием оппортунистических инфекций, и часто смерть больных наступает в результате развития вирусных инфекций, вызванных вирусами семейства *Herpesviridae*.

В связи с этим актуален поиск новых лечебных и профилактических препаратов, менее токсичных, активных в отношении нескольких вирусов одновременно, способных также атаковать резервуары вируса, пока недоступные для проникновения существующих лекарств. Поэтому заявление, прозвучавшее во Всемирной Организации Здравоохранения еще в 1989 г. о необходимости обратить внимание на возможности этномедицины, фитотерапии и использование натуральных продуктов для борьбы с ВИЧ/СПИДом, и сегодня не потеряло своей актуальности [3].

Базидиомицеты, высшие грибы, используемые в пищу, являются источником лекарственных соединений, обладающих антимикробными свойствами, в том числе противовирусными [4]. Большинство исследователей связывают эти эффекты с наличием в грибах меланинов – высокомолекулярных гетерогенных полимеров, представленных в виде черных и коричневых пигментов. Темный цвет меланинов определяется тем, что они не излучают поглощенный видимый или невидимый свет, а преобразуют энергию во вращательную и вибрационную активность внутри молекулы, рассеивая ее в виде тепла. Свободные электроны, способные к обменно-взаимодействию, определяют антиоксидантные свойства меланинов [5].

Меланины повышают толерантность грибов к экологическим стрессам, улучшая их выживаемость. Они защищают грибковые структуры от ультрафиолетового излучения, повышенной температуры, высыхания, окислителей, токсичных соединений и атак микробов благодаря своей хелатирующей способности [5, 6]. Имеется ряд данных о непосредственном взаимодействии молекул меланина с вирионами, находящимися в межклеточной среде [7]. Имеется также предположение, что экстракт чаги ингибировал

репродукцию вируса простого герпеса (ВПГ-1), воздействуя на вирусные гликопротеины [8].

Гуминовые соединения (ГС) (производное от латинского *humus* – «земля» или «почва») различной природы также обладают широким спектром активностей, поскольку сами являются важнейшими компонентами биосферы. Они участвуют в миграции катионов, снижают негативное действие токсичных веществ, влияют на развитие организмов и тепловой баланс планеты [9].

Установлена противовирусная активность ГС в отношении различных вирусов с оболочкой и без липидной оболочки: вируса гриппа А, ВПГ-1, цитомегаловируса, ВИЧ, вируса Коксаки [10, 11].

Целью данных исследований было получение и испытание нетоксичных препаратов из базидиомицета *Inonotus obliquus* и ГС из бурых углей в отношении ряда вирусов, патогенных для человека, таких как ВИЧ-1 и ВПГ-1.

Материал и методы

Вирусы. В качестве источника ВИЧ использовали штамм ВИЧ-1_{899А} (субтип В; Германия), штамм ВИЧ-1_{ИБ735} (субтип В; Россия), штамм ВИЧ-1_{ИБ741} (субтип АЕ; Россия) из коллекции штаммов ВИЧ Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

В работе использовали ВПГ-1, штамм Л2, полученный из Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Клетки. Для работы с ВИЧ использовали перевиваемые лимфобластоидные клетки человека МТ-4. Для работы с ВПГ использовали перевиваемую культуру клеток почки зеленых мартышек *Vero*. Клеточные культуры получены из коллекции культур клеток Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Исследование цитотоксического действия препаратов. Исследуемые образцы добавляли к клеткам в различных концентрациях. Инкубировали клетки при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ и 98% влажности 1–5 дней (в зависимости от типа клеток). Учет результатов: определение жизнеспособности и количества клеток при помощи красителя.

Исследование противовирусного действия образцов в отношении ВИЧ-1. Внесение исследуемого образца в различных дозах проводили одновременно с инфицированием вирусом в дозе 0,01 ТЦИД₅₀/клетку (50% тканевая цитопатическая инфекционная доза) или при предварительной 2-часовой инкуба-

ции. Инкубацию клеток проводили в течение 5 дней при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ и 98% влажности. Учет результатов осуществляли окрашиванием клеток с помощью тетразолиевого красителя (методом МТТ) со спектрофотометрией и световой микроскопией – исследованием цитопатического эффекта вируса (ЦПЭ) и вирус-индуцируемого синцития (синцитий – конгломерат нескольких клеток с общей клеточной оболочкой, образовавшейся в результате слияния их мембран), определением антигена вируса в культуральной жидкости инфицированных клеток.

Степень защиты клеток от цитодеструктивного действия вируса определяли по формуле:

$$\% \text{ защиты} = \frac{A - B}{K - B} \times 100,$$

где А – число жизнеспособных клеток в опытной группе;
В – то же в инфицированной культуре (контроль вируса);

К – то же в неинфицированной культуре (контроль клеток).

Определение антигена вируса в культуральной жидкости инфицированных клеток проводили методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора GENSCREEN™ ULTRA HIV Ag-Ab фирмы BIO-RAD согласно инструкции изготовителя. Результаты учитывали с помощью фотометра Stat Fax-3200 производства США при длине волны 450/630 нм. Чувствительность тест-системы – менее 25 пкг/мл.

Исследование противовирусного действия образцов в отношении ВПГ-1. В монослойную культуру клеток *Vero* вносили испытуемые образцы в различных концентрациях с вирусом в дозе 100 ТЦИД₅₀ одновременно или за 2 ч до инфицирования. Контролем служили клетки, не обработанные исследуемыми веществами и инфицированные ВПГ-1. Опытные и контрольные клетки в 96-луночных панелях помещали в инкубатор при 37°C и 5,0% CO₂ до поражения 100% клеток в контроле. Учет проводили микроскопически и методом МТТ (с помощью тетразолиевого красителя).

Получение культуральных меланинов (образцы 14-23, 15-48, 15-54, 16-32, 16-42). Для получения меланинов в глубинной культуре использовали штамм гриба чага *Inonotus obliquus* F-1244, выращенный на глюкозо-триптонной среде следующего состава, г/л: глюкоза – 30; триптон – 2,5; дрожжевой экстракт – 1,25; КН₂РО₄ – 1,1; К₂НРО₄ – 4,4; MgSO₄ – 0,25; рН 7,0–8,0. Культивирование осуществлялось в 0,75 л колбах на качалке при 200 об./мин, 26°C в течение 12 сут, до максимального накопления меланинов. Для выделения меланинов, секретированных в среду, сначала фильтрованием отделяли мицелий, а затем меланины осаждали соляной кислотой. Меланины из мицелия экстрагировали 2% NaOH, отделяли экстракт центрифугированием, а затем меланины также осаждали соляной кислотой. Меланины подвергали очистке посредством 6-кратного переосаждения. После очистки и высушивания препарат меланина представлял собой черные кристал-

лы с ярким мерцающим блеском. После измельчения кристаллов меланин представлял собой темно-бурый порошок.

Получение образцов ГС (образцы 12-47, 14-46, 14-75, 14-80, 14-82, 16-35). В качестве источника ГС использовали бурый уголь Канско-Ачинского месторождения, предварительно измельченный в мельнице (размер частиц до 0,25 мм). Для получения водорастворимых соединений порошок обрабатывали 2,5% раствором аммиака в гомогенизаторе, с последующим отделением нерастворимой фракции и очисткой ГС методом 6-кратного переосаждения по методике, описанной ранее [12].

Методы статистической обработки результатов. Статистический анализ данных описательной статистики и определения коэффициента Стьюдента проводили с помощью программы BioStat 2009 (AnalystSoft). Уровень значимости (α) был равен 0,05.

Результаты исследования

1. Антитретовирусная активность гуминовых и меланиновых веществ в культуре клеток

Результаты антитретовирусной активности образцов представлены в **табл. 1–2**.

Полученные данные (см. **табл. 1**) показали, что наименьшей цитотоксичностью обладал образец 14-82. При концентрации 50–400 мкг/мл жизнеспособность клеток составила 97,7–95,9% соответственно по сравнению с контролем. Наибольшая цитотоксичность обнаружена у образца 15-54 – при концентрации 400 мкг/мл жизнеспособность клеток составила 69,2%. В целом все исследованные соединения не обладали цитотоксическим действием на клетки при концентрации 100 мкг/мл. СТ₅₀ (50% среднетоксичная концентрация) для соединений 16-32 и 16-35 составила 140 и 130 мкг/мл соответственно.

Противовирусная активность в отношении ВИЧ-1 обнаружена у образцов 12-47, 14-23, 14-46, 14-75, 14-80, 14-82, 16-32, 16-35 при концентрации 10–400 мкг/мл. Наибольшей противовирусной активностью в отношении ВИЧ-1 обладали образцы 16-32, 16-35 – при концентрации 10 мкг/мл отмечена 92,4–94,1% защита клеток от ЦПЭ вируса и отсутствовали вирус-индуцированные синцитии, а также обнаружено снижение на 60,3–81,6% уровня вирусного антигена в культуральной жидкости ВИЧ-инфицированных клеток. ЭК₅₀ (50% эффективная концентрация) препарата 16-32 – 3,7 мкг/мл, 16-35 – 5,0 мкг/мл. Индекс селективности для препарата 16-32 – 35, 16-35 – 28. При этом препараты были эффективны в отношении штаммов ВИЧ-1 разных субтипов, выделенных в разных регионах мира (Западная Европа и Россия) (см. **табл. 2**).

2. Противогерпетическая активность гуминовых и меланиновых веществ в культуре клеток.

Результаты исследования противогерпетической активности гуминовых и меланиновых веществ представлены в **таблицах 3 и 4**.

В отношении ВПГ-1 также наблюдался про-

Таблица 1. Исследование противовирусной активности образцов на модели клеток человека (MT-4), инфицированных ВИЧ-1

Table 1. Study of antiviral activity of samples on a model of human cells (MT-4) infected with HIV-1

Образец Sample	Концентрация, мкг/мл Concentration, mcg/ml	Без вируса (токсичность) No virus (toxicity)	**ВИЧ-инфекция **HIV-infection		
		*жизнеспособность клеток, % *Cell viability, %	ЦПЭ-синцитии, % CPE- syncytia, %	защита клеток, % Cell protection, %	снижение уровня вирусного антигена, % Reduction of the level of viral antigen, %
12-47	150	91,4 ± 0,02	0	68,0 ± 0,01	74,9 ± 0,01
	125	93,2 ± 0,02	0	60,8 ± 0,02	67,6 ± 0,03
	100	98,4 ± 0,03	0	50,4 ± 0,03	65,1 ± 0,02
	75	98,8 ± 0,02	0	46,7 ± 0,02	63,7 ± 0,03
	50	99,2 ± 0,04	10	31,2 ± 0,04	52,0 ± 0,04
	25	99,4 ± 0,05	100	12,8 ± 0,05	34,4 ± 0,05
14-23	150	89,0 ± 0,02	0	73,6 ± 0,01	66,8 ± 0,03
	125	90,4 ± 0,01	0	71,9 ± 0,02	61,0 ± 0,02
	100	97,2 ± 0,03	0	63,4 ± 0,01	58,3 ± 0,04
	75	97,8 ± 0,02	0	63,2 ± 0,02	58,1 ± 0,04
	50	98,6 ± 0,04	10	37,8 ± 0,03	54,9 ± 0,05
	25	99,8 ± 0,05	10	29,5 ± 0,04	5,7 ± 0,02
14-46	150	92,0 ± 0,03	0	79,9 ± 0,01	63,2 ± 0,02
	125	93,0 ± 0,02	0	78,0 ± 0,02	54,7 ± 0,04
	100	97,3 ± 0,02	0	60,7 ± 0,02	51,3 ± 0,05
	75	97,8 ± 0,03	0	59,3 ± 0,04	50,1 ± 0,03
	50	98,4 ± 0,03	0	54,2 ± 0,05	48,6 ± 0,04
	25	98,8 ± 0,04	10	49,9 ± 0,05	36,0 ± 0,05
14-75	400	85,8 ± 0,03	0	89,0 ± 0,02	98,2 ± 0,01
	200	87,4 ± 0,03	0	88,6 ± 0,01	97,7 ± 0,02
	100	87,9 ± 0,04	10	68,9 ± 0,02	58,1 ± 0,05
	50	89,0 ± 0,05	100	47,0 ± 0,03	5,1 ± 0,05
14-80	400	89,9 ± 0,02	0	89,0 ± 0,02	97,3 ± 0,03
	200	91,1 ± 0,03	0	85,8 ± 0,03	96,6 ± 0,04
	100	92,7 ± 0,04	10	68,1 ± 0,04	32,3 ± 0,05
	50	94,3 ± 0,05	100	21,7 ± 0,05	7,2 ± 0,01
14-82	400	95,9 ± 0,03	0	95,6 ± 0,01	98,4 ± 0,02
	200	96,4 ± 0,03	0	86,7 ± 0,02	97,3 ± 0,03
	100	96,8 ± 0,03	0	84,3 ± 0,04	96,4 ± 0,03
	50	97,7 ± 0,04	10	59,1 ± 0,04	23,8 ± 0,02
15-48	400	81,1 ± 0,05	10	27,0 ± 0,03	1,1 ± 0,05
	200	82,2 ± 0,05	100	13,5 ± 0,03	0,8 ± 0,04
	100	83,3 ± 0,03	100	5,7 ± 0,05	0,7 ± 0,03
	50	83,6 ± 0,04	100	5,3 ± 0,05	0,2 ± 0,05
15-54	400	69,2 ± 0,04	100	7,1 ± 0,04	4,4 ± 0,05
	200	70,1 ± 0,02	100	3,2 ± 0,05	3,8 ± 0,05
	100	70,8 ± 0,04	100	0,2 ± 0,05	2,1 ± 0,05
	50	71,2 ± 0,05	100	0	0,5 ± 0,04
Контроль клеток Cell Control		100	0	–	–
Контроль вируса Virus Control		–	100	–	–

Примечание: * – жизнеспособность клеток по отношению к интактному контролю клеток, %; ** – внесение препаратов одновременно с инфицированием.

Note: * – cell viability in comparison to intact control cells, %; ** – introduction of compounds simultaneously with infection.

тивовирусный эффект исследованных соединений: 12-47, 14-46, 15-48, 15-54, 16-32 (см. табл. 3, 4). В контрольных культурах клеток (инфицированных ВПГ-1 и не обработанных исследуемыми соединениями) через 48 ч развивался вирус-индуцированный ЦПЭ. ГС (образцы №12-47 и 14-46) защищали клетки от цитопатического действия ВПГ-1 при ми-

нимальных концентрациях 100 мкг/мл для №12-47 и 150 мкг/мл – для №14-46 (см. табл. 4). В случае меланиновых соединений противовирусный эффект был несколько выше – противогерпетическая активность отмечена уже при дозе препарата 50 мкг/мл. Предварительная инкубация клеток с препаратом в течение 2 ч увеличивала противовирусный эффект.

Таблица 2. Противовирусная активность образцов водного раствора ГС и меланина из жидкой биомассы штамма чаги F-1244 на модели клеток человека, инфицированных различными штаммами ВИЧ-1 (концентрация 10 мкг/мл)

Table 2. Antiviral activity of samples of an aqueous solution of humic compound and melanin from the liquid biomass of the F-1244 chaga strain on a model of human cells infected with various HIV-1 strains (concentration 10 mcg/ml)

Образец Sample	Защита клеток от цитодеструктивного действия вируса, % Protection of cells from the cytodestructive action of the virus, %		
	Штаммы вируса иммунодефицита человека Human Immunodeficiency Virus strains		
	ВИЧ-1 _{899A} (субтип В) HIV-1 _{899A} (subtype B)	ВИЧ-1 _{IB735} (субтип В) HIV-1 _{IB735} (subtype B)	ВИЧ-1 _{IB741} (субтип АЕ) HIV-1 _{IB741} (subtype АЕ)
Гуминовое соединение Humic compound (16-35)	92,7 ± 0,02	93,2 ± 0,02	93,2 ± 0,03
Меланин Melanin (16-32)	81,9 ± 0,03	82,3 ± 0,04	92,4 ± 0,02

Таблица 3. Противогерпетическое действие гуминовых соединений в культуре клеток Vero

Table 3. Antiherpetic effect of humic compounds in Vero cell culture

Концентрации испытуемых веществ, мкг/мл Concentrations of the tested substances, mcg/ml	Защита от цитопатического действия 100 ТЦИД ₅₀ ВПГ-1, % Protection from cytopathic action 100 TCID ₅₀ HSV-1, %		
	№12-47	№14-46	Контроль ВПГ-1 Control HSV-1
100,0	100,0 ± 0,0	75,0 ± 0,04	0,0
150,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	0,0
200,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	0,0
300,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	0,0

Таблица 4. Противогерпетическое действие меланиновых веществ в культуре клеток Vero

Table 4. Antiherpetic effect of melanin substances in Vero cell culture

Схема применения испытуемых веществ Scheme of application of the tested substances	Концентрация веществ, мкг/мл The concentration of substances, mcg/ml	Степень защиты клеток от 100 ТЦИД ₅₀ вируса, % The degree of protection of cells from 100 TCID ₅₀ virus, %			
		контроль Control	15-48	15-54	16-32
Одновременно с инфицированием Simultaneously with the infection	50	0	87,5 ± 0,02	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	100	0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	250	0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
За 2 ч до инфицирования 2 hours before infection	50	0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	100	0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	250	0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0

Обсуждение

Желание использовать возможности природы для борьбы с инфекционными заболеваниями у человечества было всегда. С древних времен люди лечились травами, растениями, грибами, минералами и т.п.

Поэтому в конце прошлого и начале этого века многие грибы исследовали на противовирусную активность и обнаружили в некоторых из них соединения, обладающие противовирусным эффектом в отношении патогенных для человека вирусов [4–7, 13].

Экстракты из базидиальных грибов подавляли репродукцию вирусов гриппа, ортопоксвирусов, ВПГ 1 и 2 типов, вируса Западного Нила, ВИЧ, вируса гепатита В [13–17].

Особый интерес представляют соединения из гриба чага, *Inonotus obliquus*, который содержит широкий спектр биологически активных веществ, основным компонентом которых является меланин.

В разных научных коллективах получены сходные данные о выраженном антиретровирусном и противогерпетическом эффекте соединений из *Inonotus obliquus* [17–20]. Эффективные в отношении ВИЧ-1 ингибирующие концентрации препаратов расположены в пределах 0,5–100 мкг/мл и, несомненно, зависят от технологических моментов получения соединений.

Следует отметить, что противовирусная активность меланиновых соединений установлена как при профилактической (за 2 ч до инфицирования клеток), так и при лечебной схеме введения препаратов как в отношении ВИЧ-1, так и ВПГ-1.

У препаратов, полученных из базидиомицетов, имеется также вирулицидная активность. В работе И.А. Разумова и соавт. (2010) [21] описана противовирусная активность водных экстрактов и полисахаридных фракций, полученных из мицелия и плодовых тел высших грибов. Однако из схемы экспериментов следует, что вирусы первоначально инкубировались с исследуемыми соединениями

ми в течение 1 ч, а затем эту суспензию вносили в культуру клеток. Это означает, что фактически исследована вирулицидная активность веществ, т.к. препараты, действующие на вирус вне клетки, называют вирулицидными, а препараты, действующие внутри клетки, – противовирусными.

Источниками гуминовых кислот служат бурый уголь, торф, лечебные грязи. В этих случаях обнаружена противовирусная активность в отношении вирусов гриппа человека и птиц, вирусов герпеса, ВИЧ [6, 9, 10, 22]. Время добавления препаратов показывает, что ГС обладают противовирусной активностью как на стадии проникновения ВИЧ в клетку, так и на стадии обратной транскрипции РНК в ДНК, а также на стадии интеграции вирусной ДНК в геном клетки-хозяина [11, 23, 24]. Влияние полимера гуминовой кислоты на раннюю стадию репликации герпесвируса было подтверждено результатами экспериментов на животных [25].

Нами также подтверждена противовирусная эффективность ГС, полученных на основе бурого угля Канско-Ачинского месторождения, в отношении ВИЧ-1 и ВПГ-1.

Наличие у ГС из угля вирулицидной активности, по нашему мнению, требует экспериментального уточнения. В работе Г.В. Корнилаевой и соавт. (2010) [26] предлагается применение этих препаратов в качестве микробицидных средств в связи с их высоким индексом селективности. В описании исследований указывается, что клетки предварительно инкубировали с соединениями, затем заражали вирусом (ВИЧ-1) и после 24 ч инкубации клеток с вирусом в присутствии препаратов не связавшийся вирус удаляли низкоскоростным центрифугированием. Это означает, что контакта вируса с препаратом вне клетки не было.

Анализируя наш опыт, а также опыт коллег в исследованиях активности веществ при одновременном инфицировании клеток и добавлении препаратов на определенный период времени, необходимо отметить, что фактически изучались два вида активности: противовирусная и вирулицидная. С одной стороны, действие соединений на вирус вне клетки – вирулицидный эффект, а с другой – на вирус, который попал в клетку, – противовирусный эффект.

Только в случае внесения препарата в уже зараженные клетки можно говорить об «истинно» противовирусном действии. Однако и здесь требуется уточнение – если исследуемое вещество осталось в культуральной среде до момента учета результатов, то вполне вероятно возможность действия препарата вне клетки на вирионы, выходящие из инфицированных клеток, что представляет собой вирулицидный эффект.

Результаты исследования противовирусной активности меланина и ГС в отношении РНК-содержащего вируса ВИЧ-1 и ДНК-содержащего вируса ВПГ-1 в нашем исследовании совпадают с результатами ряда авторов в отношении вирусов гриппа, герпеса, ВИЧ, гепатита В, Коксаки, осповакцины [8, 10, 11, 13–16, 18, 22–25], что позволяет высказать

предположение о том, что тип нуклеиновой кислоты у вируса не играет принципиальной роли в антивирусном действии этих препаратов. Очевидно также, что ГС эффективны как в отношении вирусов с оболочкой, так и безоболочечных вирусов.

Заключение

В целом можно заключить, что для меланиновых и гуминовых соединений характерна низкая токсичность при наличии и вирулицидной, и противовирусной активности. Это позволяет рассматривать исследованные соединения как основу для создания безопасных лекарственных средств, эффективных в отношении возбудителей различных вирусных инфекций.

Литература

1. *Руководство по применению антиретровирусных препаратов у взрослых и подростков, инфицированных ВИЧ-1*. М.: Р.Валент; 2011.
2. Носик Д.Н., Носик Н.Н. *ВИЧ-инфекция: профессиональный риск и экстренная профилактика*. М.; 2004.
3. Смирнов Ю.А., Носик Н.Н., Носик Д.Н. Подходы к фитотерапии ВИЧ-инфекции. *Традиционная медицина*. 2017; 4(51): 26–34.
4. Теплякова Т.В. *Высшие грибы Западной Сибири – перспективные объекты для биотехнологии лекарственных препаратов*. Новосибирск; 2014.
5. Lopusiewicz L. Isolation, characterisation and biological activity of melanin from *Exidia nigricans*. *World Sci. News*. 2018; 91: 111–29.
6. Попов А.И., Зеленков В.Н., Теплякова Т.В. Биологическая активность и биохимия гуминовых веществ. Часть 1. Биохимический аспект (обзор литературы). *Вестник Российской Академии естественных наук*. 2016; 16(1): 11–8.
7. Ананько Г.Г., Казачинская Е.И., Косогова Т.А., Теплякова Т.В. Механизмы антигерпетической активности меланина чаги (*Inonotus obliquus*). В кн.: Дьяков Ю.Т., Сергеев Ю.В., ред. *Современная микология в России. Материалы четвертого съезда микологов России. Том 7*. М.; 2017: 395–7.
8. Pan H.H., Yu X.T., Li T., Wu H.L., Jiao C.W., Cai M.H., et al. Aqueous extract from a Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (higher Basidiomycetes), prevents Herpes Simplex Virus entry through inhibition of viral-induced membrane fusion. *Int. J. Med. Mushrooms*. 2013; 15(1): 29–38. <https://doi.org/10.1615/intjmedmushr.v15.i1.40>
9. Попов А.И., Зеленков В.Н., Теплякова Т.В. Биологическая активность и биохимия гуминовых веществ. Часть 2. Медико-биологический аспект. Обзор литературы. *Вестник Российской Академии естественных наук*. 2016; 16(5): 9–15.
10. Jacob K.K., Prashob P.K.J., Chandramohanakumar N. Humic substances as a potent biomaterials for therapeutic and drug delivery system – a review. *Int. J. App. Pharm.* 2019; 11(3): 1–4. <https://doi.org/10.22159/ijap.2019v11i3.14121>
11. Kornilaeva G.V., Simiavin A.E., Schultz A., Germann A., Moog C., Von Briesen H., et al. The differential Anti-HIV effect of a new humic substance-derived preparation in diverse cells of the immune system. *Acta Naturae*. 2019; 11(2): 68–76. <https://doi.org/10.32607/20758251-2019-11-2-68-76>
12. Теплякова Т.В., Ананько Г.Г., Ильичева Т.Н., Казачинская Е.И., Носик Н.Н., Носик Д.Н. и др. Противовирусное средство на основе гуминовых кислот. Патент РФ №2678986; 2019.
13. Рытик П.Г., Горовой Л.Ф., Кучеров И.И., Сенюк О.Ф. Антиретровирусная активность некоторых видов базидиальных грибов. *СПИД, рак и общественное здоровье*. 2007; 11(1): 59–61.
14. Brandt C.R., Pirano F. Mushroom antiviral. *Recent Res. Dev. Antimicrob. Agent Chemother.* 2000; 4(1): 11–26.
15. Теплякова Т.В., Булычев Л.Е., Косогова Т.А., Ибрагимов 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.
16. Gao Y., Zhou Sh., Huang M., Xu A. Antibacterial and antiviral value of the genus *Ganoderma* P.Karst. Species (Aphylllophoromycetidae): a review. *Int. J. Med. Mushroom*. 2003; 5(3): 235–46. <https://doi.org/10.1615/InterJMedicMush.v5.i3.20>

17. Теплякова Т.В., Гашникова Н.М., Балахнин С.М., Косогова Т.А. Антиретровирусная активность экстрактов из чаги, меланина и гуминовых соединений. В кн.: *Современная микология в России. Материалы 3-го съезда микологов России. Том 3. М.*; 2012: 419–20.
18. Разумов И.А., Казачинская Е.А., Пучкова Л.И., Косогова Т.А., Горбунова И.А., Локтев В.Б. и др. Протективная активность водных экстрактов из высших грибов при экспериментальной герпесвирусной инфекции у белых мышей. *Антибиотики и химиотерапия*. 2013; 58(9-10): 8–12.
19. Полковникова М.В., Носик Н.Н., Гараев Т.М., Кондрашина Н.Г., Финогенова М.П., Шибнев В.А. Изучение противогерпетических свойств экстрактов из березового гриба *Inonotus obliquus*. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(2): 45–8.
20. 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; 60(2): 35–8.
21. Разумов И.А., Косогова Т.А., Казачинская Е.А., Пучкова Л., Щербаклова Н.С., Горбунова И.А. и др. Противовирусная активность водных экстрактов и полисахаридных фракций, полученных из мицелия и плодовых тел высших грибов. *Антибиотики и химиотерапия*. 2010; 55(9-10): 14–8.
22. Ilycheva T.N., Balakhnin S.M., Gashnikova N.M., Durymanov A.G., Anan'ko G.G., Kosogova T.A., et al. Antiviral Activity of Humic Substances. In: Third International Conference of CIS IHSS on Humic Innovative Technologies Tenth International Conference daRostim «Humic Substances and Other Biologically Active Compounds in Agriculture» HIT-daRostim-2014. Moscow; 2014.
23. Schneider J., Weis R., Maenner C., Kary B., Werner A., Stubert B.J., et al. Inhibition of HIV-1 in cell culture by synthetic humate analogues derived from hydroquinone: mechanism of inhibition. *Virology*. 1996; 218(2): 389–95. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0208>
24. Zhernov Y., Karamov E., Perminova I., Khaitov M.R., Khaitov R.M. Humic substance-based antivirals: antiretroviral activity, mechanisms of action, and impact on mucosal immunity. *Allergy*. 2017; 72(S103): 164–5.
25. Neyts J., Snoeck R., Wutzler P., Cushman M., Klöcking R., Helbig B., et al. Poly (hydroxy) carboxylates as selective inhibitors of Cytomegalovirus and Herpes simplex virus replication. *Antivir. Chem. Chemother*. 1992; 3(4): 215–22.
26. Корнилаева Г.В., Перминова И.В., Гилязова А.В., Хаметова К.М., Каратов Э.В. Гуминовые вещества как перспективные соединения для создания микробицидных препаратов. *Российский иммунологический журнал*. 2010; 4(3): 255–60.
27. Теплякова Т.В., Гашникова Н.М., Балахнин С.М., Косогова Т.А. *J. Med. Mushrooms*. 2013; 15(1): 29–38. <https://doi.org/10.1615/intjmedmushr.v15.i1.40>
28. Popov A.I., Zelenkov V.N., Teplyakova T.V. Biological activity and biochemistry of humic substances. Part 2. Medico-biological aspect (a review). *Vestnik Rossiyskoy Akademii estestvennykh nauk*. 2016; 16(5): 9–15. (in Russian)
29. Jacob K.K., Prashob P.K.J., Chandramohanakumar N. Humic substances as a potent biomaterials for therapeutic and drug delivery system – a review. *Int. J. App. Pharm*. 2019; 11(3): 1–4. <https://doi.org/10.22159/ijap.2019v11i3.31421>
30. Kornilava G.V., Siniavin A.E., Schultz A., Germann A., Moog C., Von Briesen H., et al. The differential Anti-HIV effect of a new humic substance-derived preparation in diverse cells of the immune system. *Acta Naturae*. 2019; 11(2): 68–76. <https://doi.org/10.32607/20758251-2019-11-2-68-76>
31. Teplyakova T.V., Anan'ko G.G., Il'icheva T.N., Kazachinskaya E.I., Nosik N.N., Nosik D.N., et al. Antiviral agent based on humic acids. Patent RF № 2678986; 2019. (in Russian)
32. Rytik P.G., Gorovoy L.F., Kucherov I.I., Senyuk O.F. Anti-Retroviral activity of some types of basidial fungi. *SPID, rak i obshchestvennoe zdorov'e*. 2007; 11(1): 59–61. (in Russian)
33. Brandt C.R., Pirano F. Mushroom antiviral. *Recent Res. Dev. Antimicrob. Agent Chemother*. 2000; 4(1): 11–26.
34. 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. (in Russian)
35. Gao Y., Zhou Sh., Huang M., Xu A. Antibacterial and antiviral value of the genus *Ganoderma* P.Karst. Species (Aphyllophoromycetidae): a review. *Int. J. Med. Mushroom*. 2003; 5(3): 235–46. <https://doi.org/10.1615/InterJMedicMush.v5.i3.20>
36. Teplyakova T.V., Gashnikova N.M., Balakhnin S.M., Kosogova T.A. Anti-Retroviral activity of extracts from chaga, melanin and humic compounds. In: *Modern Mycology in Russia. Materials of the 3rd Congress of mycologists of Russia. Volume 3 [Sovremennaya mikologiya v Rossii. Materialy 3-go s'ezda mikologov Rossii. Tom 3]*. Moscow; 2012: 419–20. (in Russian)
37. Razumov I.A., Kazachinskaya E.A., Puchkova L.I., Kosogova T.A., Gorbunova I.A., Loktev V.B., et al. Protective activity of aqueous extracts from higher mushrooms against Herpes simplex virus type-2 on albino mice model. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2013; 58(9-10): 8–12. (in Russian)
38. Polkovnikova M.V., Nosik N.N., Garaev T.M., Kondrashina N.G., Finogenova M.P., Shibnev V.A. A study of the antiherpetic activity of the chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extracts in the vero cells infected with the herpes simplex virus. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(2): 45–8. (in Russian)
39. Shibnev V.A., Garaev T.M., Finogenova M.P., Kalnina L.B., Nosik D.N. Antiviral activity of aqueous extracts of the birch fungus *Inonotus obliquus* on the human immunodeficiency virus. *Voprosy virusologii*. 2015; 60(2): 35–8. (in Russian)
40. Razumov I.A., Kosogova T.A., Kazachinskaya E.A., Puchkova L., Shcherbakova N.S., Gorbunova I.A., et al. Antiviral activity of aqueous extracts and polysaccharide fractions from mycelium and fruit bodies of higher fungi. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2010; 55(9-10): 14–8. (in Russian)
41. Ilycheva T.N., Balakhnin S.M., Gashnikova N.M., Durymanov A.G., Anan'ko G.G., Kosogova T.A., et al. Antiviral Activity of Humic Substances. In: Third International Conference of CIS IHSS on Humic Innovative Technologies Tenth International Conference daRostim «Humic Substances and Other Biologically Active Compounds in Agriculture» HIT-daRostim-2014. Moscow; 2014.
42. Schneider J., Weis R., Maenner C., Kary B., Werner A., Stubert B.J., et al. Inhibition of HIV-1 in cell culture by synthetic humate analogues derived from hydroquinone: mechanism of inhibition. *Virology*. 1996; 218(2): 389–95. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0208>
43. Zhernov Y., Karamov E., Perminova I., Khaitov M.R., Khaitov R.M. Humic substance-based antivirals: antiretroviral activity, mechanisms of action, and impact on mucosal immunity. *Allergy*. 2017; 72(S103): 164–5.
44. Neyts J., Snoeck R., Wutzler P., Cushman M., Klöcking R., Helbig B., et al. Poly (hydroxy) carboxylates as selective inhibitors of Cytomegalovirus and Herpes simplex virus replication. *Antivir. Chem. Chemother*. 1992; 3(4): 215–22.
45. Kornilava G.V., Perminova I.V., Gilyazova A.V., Khametova K.M., Karatov E.V. Humic acids as the promising ingredient for microbicides design. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal*. 2010; 4(3): 255–60. (in Russian)

REFERENCES

1. *Guidelines for the use of antiretroviral drugs in adults and adolescents infected with HIV-1 [Rukovodstvo po primeneniyu antiretrovirusnykh preparatov u vzroslykh i podrostkov, infitsirovannykh VICH-1]*. Moscow: R.Valent; 2011. (in Russian)
2. Nosik D.N., Nosik N.N. *HIV Infection: Occupational Risk and Emergency Prevention [VICH-infektsiya: professional'nyy risk i ekstremnaya profilaktika]*. Moscow; 2004. (in Russian)
3. Smirnov Yu.A., Nosik N.N., Nosik D.N. Approaches to phytotherapy of HIV infection. *Traditsionnaya meditsina*. 2017; 4(51): 26–34. (in Russian)
4. Teplyakova T.V. *Higher Mushrooms of Western Siberia – Promising Objects for Biotechnology of Medicinal Products [Vysshie griby Zapadnoy Sibiri – perspektivnye ob"ekty dlya biotekhnologii lekarstvennykh preparatov]*. Novosibirsk; 2014. (in Russian)
5. Lopusiewicz L. Isolation, characterisation and biological activity of melanin from *Exidia nigricans*. *World Sci. News*. 2018; 91: 111–29.
6. Popov A.I., Zelenkov V.N., Teplyakova T.V. Biological activity and biochemistry of humic substances. Part 1. Biochemical aspect (a review). *Vestnik Rossiyskoy Akademii estestvennykh nauk*. 2016; 16(1): 11–8. (in Russian)
7. Anan'ko G.G., Kazachinskaya E.I., Kosogova T.A., Teplyakova T.V. Mechanisms of antiherpetic activity of chaga melanin (*Inonotus obliquus*). In: D'yakov Yu.T., Sergeev Yu.V., ed. *Modern Mycology in Russia. Materials of the fourth Congress of mycologists of Russia. Volume 7 [Sovremennaya mikologiya v Rossii. Materialy chetvertogo s'ezda mikologov Rossii. Tom 7]*. Moscow; 2017: 395–7. (in Russian)
8. Pan H.H., Yu X.T., Li T., Wu H.L., Jiao C.W., Cai M.H., et al. Aqueous extract from a Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (higher Basidiomycetes), prevents Herpes Simplex Virus entry through inhibition of viral-induced membrane fusion. *Int.*