

УДК 615.322:582.284:579.2

ПРОДУКЦИЯ МЕЛАНИНА ГРИБОМ *Inonotus obliquus* F-1375 ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В ЖИДКОЙ СРЕДЕ И ЕГО АНТИРЕТРОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА

© 2023 г. Т. В. Теплякова¹, *, Н. А. Маркович¹, **, Н. М. Гашникова¹, М. П. Гашникова¹

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора, Кольцово
Новосибирской области, 630559 Россия

*e-mail: teplyakova@vector.nsc.ru

**e-mail: namark@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.02.2023 г.

После доработки 20.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

Исследовано влияние на продукцию меланина новым штаммом гриба *Inonotus obliquus* (Ach.:Pers.) Pilat (*Basidiomycota*) F-1375 в глюкозо-триптонной среде добавления препаратов бетулина и тирозина при электрическом освещении и в темноте. Препарат бетулина в исследуемых концентрациях практически не влиял на продукцию меланина, тогда как высокие концентрации тирозина стимулировали образование меланина как в условиях освещения, так и в темноте. Все изученные образцы меланина гриба имели низкую токсичность для культуры клеток МТ-4: как выделенные из природного сырья ($TC_{50} = 96 \pm 8$ мкг/мл), так и при культивировании гриба в жидкой среде с добавлением бетулина и тирозина (TC_{50} от 164 до 400 мкг/мл). Препараты меланина были активны против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в культуре клеток МТ-4, подавляли синтез р24 антигена ВИЧ-1 по результатам ИФА, индекс селективности варьировал от 17 до 192. Наиболее высоким индексом селективности обладал меланин, выделенный из культивированного на свету гриба в присутствии 10 и 20 мМ тирозина (192). Индексы селективности изученных препаратов меланина культивируемого гриба в отношении ВИЧ-1 субтипа А были на уровне 33–192, что позволяло рекомендовать их для разработки противовирусных средств.

Ключевые слова: *Basidiomycota*, *Inonotus obliquus*, антиретровирусный, ВИЧ-1, культивирование в жидкой среде, меланин, мицелий, чага

DOI: 10.31857/S0555109923040165, **EDN:** QZRDOY

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), распространенный по всему миру, вызывает синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД). В настоящее время около 38.4 миллиона человек живут с ВИЧ, в 2021 г. вновь заразилось 1.5 млн человек, что делает ВИЧ серьезной угрозой для здоровья населения (HIV gov. Global statistics, <https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/data-and-trends/global-statistics>, 2022). В дополнение к химически синтезированным антиретровирусным препаратам возник интерес к противовирусным природным соединениям.

Так, было показано, что тритерпены гриба *Ganoderma lucidum* ингибируют протеазу ВИЧ-1 и цитопатические эффекты, индуцированные ВИЧ-1, в клетках МТ-4 [1]. Другие вещества против ВИЧ-1, такие как ганодериол F, ганодерманонтриол и ганодеровая кислота В из *G. lucidum*, лентинан из *Lentinus edodes*, велютин из *Flammulina velutipes*, лакказа из *Volvarellia volvacea*, *n*-гидроксibenзой-

ная кислота, *n*-кумариновая кислота и коричная кислота из *Pleurotus sajor-caji* также проявляли активность против протеазы и обратной транскриптазы ВИЧ-1 [2–4]. Из *G. colossum* были выделены ланостановые тритерпеноиды шизанлактон А, колосолактон Е, колосолактон V и колосолактон VII, активные в отношении протеазы ВИЧ-1 со значениями IC_{50} от 5.0 до 13.8 пг/мл [5–7].

Меланизированные макроскопические грибы привлекают все большее внимание. Одним из таких грибов является лекарственный гриб *Inonotus obliquus* (Ach.:Pers.) Pilat (*Basidiomycota*), также называемый чага. Этот гриб растет в основном на березах и широко распространен в северных широтах Европы, Азии и Северной Америки.

После разносторонних клинических и биохимических исследований гриб *I. obliquus* был разрешен Фармакологическим комитетом Министерства здравоохранения СССР в 1955 г. к использованию в медицине. Одним из активных

компонентов аптечного сырья и склероция чаги является пигмент меланин, обладающий фото- и радиопротекторным, антиоксидантным и генопротекторным свойствами [8–10], противовирусной и противоопухолевой активностью [11].

Показана эффективность меланина природной чаги *I. obliquus* в отношении подавления вирусов гриппа, вируса простого герпеса 2 типа, вируса осповакцины, вируса иммунодефицита человека [12]. Установлено ингибирование репликации коронавируса SARS-CoV-2, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром COVID-19, при профилактическом введении меланина в культуру клеток *Vero* [13].

Из культивируемых грибов *I. obliquus* показал себя лучшим продуцентом меланинов среди трутовых грибов согласно исследованиям белорусских ученых [14], причем индекс селективности у меланина культивируемого гриба *I. obliquus* в отношении вируса гриппа A/H1N1pdm09n в 2.5 раза выше по сравнению с меланином природной чаги [15]. Противовирусная эффективность соединений меланина культивируемого гриба была установлена в профилактическом (за 2 ч до инфицирования клеток) и в терапевтическом режиме введения лекарств как для ВИЧ-1, так и для вируса герпеса HSV-1 [16].

В связи с актуальностью получения меланина из культивируемого березового гриба для разработки лекарственных препаратов важным шагом является оптимизация такого культивирования с целью повышения выхода биомассы, содержащей активные в отношении ингибирования вирусных компоненты.

Цель исследования – стимуляция накопления биомассы мицелия и продукции меланина при культивировании нового штамма *I. obliquus* F-1375 в жидкой среде и оценка полученных образцов меланина в отношении подавления репродукции ВИЧ-1.

МЕТОДИКА

Материалы и реактивы. Для работы использовали следующие реактивы: глюкоза, K_2HPO_4 ; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, квалификации “ч. д. а.”, KH_2PO_4 квалификации “х. ч.”, агар-агар и триптон (Bacto™ agar, Bacto™ Tryptone, “BO Becton, Dickinson and Company”, Франция), дрожжевой экстракт (“BO Becton, Dickinson and Company”, Бельгия). В качестве добавок в среду для культивирования вносили либо экстрагированный изопропиловым спиртом бетулин (содержание не менее 85%) производства ООО “Сады Алтая Агро” (Россия), либо химически чистый L-Tyrosine (“Vega Biochem, Tucson”, США). Использовали дистиллированную и деионизованную воду.

Глюкозо-триптонная среда (ГТС), которая была использована для выращивания гриба, имела

следующий состав (г/л): глюкоза – 30; триптон – 10.0; дрожжевой экстракт – 5.0; KH_2PO_4 – 1.1; $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ – 4.4; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ – 0.25; вода – 1 л, pH 7–8. Агаризованную среду готовили на основе ГТС с добавлением 20 г агар-агара на 1 л раствора [11].

Культивирование гриба. В работе использовали штамм базидиального гриба *I. obliquus* F-1375, депонированный в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора (Новосибирская обл., Россия).

Первый этап культивирования проводили на чашках Петри, затем в стационарных условиях в 50 мл ГТС во флаконах объемом 500 мл. Из колоний в чашках Петри стерильным пробочным сверлом диаметром 5 мм вырезали блоки и вносили по 1 шт. во флаконы с 50 мл жидкой среды ГТС. В среду ГТС вносили в качестве добавки либо бетулин в виде спиртового 10%-ного раствора в 96°-ном этиловом спирте до концентраций 2 и 5 мг/л (4.5 и 11.2 мкМ), либо тирозин (L-Tyr) до конечной его концентрации в среде 2, 10 и 20 мМ.

Получение меланина. Гриб выращивали в течение 69 сут: 9 сут – в чашках Петри при комнатной температуре, 48 сут культивировали во флаконах при электрическом освещении и комнатной температуре, затем хранили в бытовом холодильнике и выделяли меланин. Кроме того, культивирование во флаконах проводили в течение 60 сут в темноте, а затем хранили в бытовом холодильнике и выделяли меланин.

Выделение меланина из культуральной жидкости. Содержимое флаконов фильтровали последовательно через капроновый и бумажный фильтры, определяли объем, pH и оптическую плотность (ОП) фильтратов при длине волны 465 нм.

Полученную культуральную жидкость (КЖ) подкисляли до pH 1.5–2.0, центрифугировали при 3200 g 10 мин в центрифуге Centra CL3 (“Thermo IEC”, США). Надосадочную жидкость отбрасывали, осадок растворяли в 0.1 М NaOH, доводили до pH 1.5–2.0 и снова центрифугировали. Осаждение повторяли трижды, затем осадок промывали дважды 0.1 н HCl с последующим центрифугированием. Очищенный осадок растворяли в деионизованной воде, доводили pH до 7.0–8.0 и сушили в предварительно взвешенных стеклянных чашках Петри при 30°C в сушильном шкафу ШС-80-01 СПУ производства ОАО “Смоленское специализированное конструкторско-технологическое бюро систем программного управления”, (Россия) в течение ночи. Чашки Петри взвешивали на весах OHAUS Pioneer PA64 (США).

Выделение меланина из мицелия. Мицелий отделяли от КЖ на капроновом фильтре, взвешивали на весах “SHINKO AJH” (Япония), измельчали скальпелем и добавляли 2%-ную NaOH в соотношении 1 : 10. Гидролиз биомассы мицелия прово-

дили в 2%-ной NaOH в течение 3 ч в водяной бане при 100°C.

Для проверки принадлежности выделенных пигментов к меланинам проводили три качественных теста на присутствие в них хиноидных и фенольных структур. Для проведения качественных реакций к 5 мл 0.1%-ного раствора пигмента в 0.1 М NaOH добавляли 0.5 мл 10%-ной H₂O₂ (положительная реакция — обесцвечивание раствора) или 0.1 мл 0.1 М KMnO₄ (положительная реакция — раствор зеленеет). При дополнительном внесении 0.5 мл 0.1 М KMnO₄ раствор обесцвечивался, а в осадок выпадали коричневые хлопья. Кроме того, использовали добавление 0.1 мл 5%-ного раствора FeCl₃, в этом случае при положительной реакции образовывались крупные коричневые хлопья, при этом в растворе с избытком хлорида железа осадок растворялся.

Спектры 0.01%-ных препаратов меланина при 240–700 нм регистрировали на цифровом спектрофотометре UV5Nano производства “Mettler Toledo” (Швейцария).

Анализ противовирусной активности меланина в отношении ВИЧ-1. В качестве чувствительных к ВИЧ-1 клеток использовали лимфоидную культуру клеток человека MT-4, полученную из коллекции клеточных культур ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора. Клетки MT-4 культивировали на среде RPMI-1640 (“Gibco”, США) с добавлением 10%-ной фетальной сыворотки, 2 мМ L-глутамин и 20 мкг/мл гентамицина. В работе использовали лабораторный штамм ВИЧ-1 субтипа А (при репродукции на MT-4 вызывает 100%-ную гибель клеток) из лабораторной коллекции ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора. Определение токсичности исследуемых препаратов проводили методом МТТ в 96-луночной планшете. В лунки планшета вносили по 40000 клеток MT-4 в 100 мкл полной среды RPMI-1640 (“Gibco”). Исследовали препараты с начальной концентрацией меланина 500 мкг/мл с шагом разведения два, по 3 повторности для каждого разведения препарата. По результату тестирования токсичности препаратов для культуры клеток MT-4 определяли для каждого препарата TC₅₀ (концентрация, при которой жизнеспособными остаются 50% клеток).

Клетки инфицировали постоянной дозой вируса, соответствующей 300 CCID₅₀ (50% инфекционная доза вируса, определенная титр-методом Рида–Менча). Инкубирование клеток MT-4 с исследуемыми разведениями препарата и вирусом проводили 5 сут в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C и 5%-ном CO₂. Исследование способности препаратов ингибировать размножение ВИЧ-1 проводили с начальной концентрации, равной TC₅₀. На первом этапе подавление репродукции ВИЧ исследуемыми препаратами оцени-

вали в 96-луночной планшете путем определения изменения концентрации живых клеток MT-4, инфицированных ВИЧ-1. Жизнеспособность клеток оценивали по интенсивности превращения ими растворимого МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) в кристаллы формазана [17]. После растворения кристаллов в изопропанол интенсивность синего окрашивания измеряли с помощью спектрофотометра (“ThermoFisherScientific”, США) на двух длинах волн — 540 и 690 нм. Дополнительно определяли способность препарата блокировать размножение ВИЧ по степени снижения репродукции вирусного белка р24 в культуральной жидкости. Пробы культуральной жидкости для количественного исследования белка р24 методом ИФА отбирались на 5 сут инкубации. Для количественного определения белка р24 ВИЧ-1 использовали иммуноферментные наборы ВектоВИЧ-1 р24-антиген-подтверждающий тест производства ЗАО “Вектор-Бест” (Россия).

Обработка результатов. Учет и обработку полученных результатов проводили с помощью специальной программы SoftMax Pro 4.0. Достоверность результатов оценивали с применением *t*-критерия Стьюдента MS Excel 2010. Уровень значимости (α) был ≤ 0.05 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние тирозина и бетулина на накопление меланина культурой *I. inonotus* F-1375. Добавление к среде препарата бетулина чаги (возможного фактора синтеза меланина) в концентрации 4.5 и 11.2 мкМ несколько повышало (~в 1.3 раза) общую массу меланина при культивировании *I. obliquus* при электрическом освещении. Добавление L-Туг в концентрации 2 мМ повышало выход меланина на 40%, а его концентрации 10 мМ и 20 мМ приводили к двукратному увеличению выхода меланина по сравнению с контролем (табл. 1).

Внесение препарата бетулина увеличивало выход меланина в 2.3 раза по сравнению со средой ГТС без добавок через 60 сут инкубации в темноте, в то время как препарат L-Туг увеличивал общую массу меланина культуры в два (2 мМ), 3.7 (10 мМ) и 4.6 раза (20 мМ) (табл. 2).

Дальнейшие исследования проводили со следующими образцами меланина: образец № 21-13 — меланин из природной чаги *I. obliquus* (экстракция 2%-ным NaOH в автоклаве в течение 30 мин при избыточном давлении 0.5–0.7 атм.). Образец № 21-36 — меланин из штамма *I. obliquus* F-1375, выращенного с добавлением 4.5 и 11.2 мкМ бетулина на свету, образец № 21-37 — меланин из штамма *I. obliquus* F-1375 с добавлением 4.5 и 11.2 мкМ бетулина, выращенного в темноте, № 21-38 — меланин из штамма *I. obliquus* F-1375 с добавлением 10 и 20 мМ L-Туг, выращенного в темноте, № 21-39 —

Таблица 1. Количество меланина в КЖ и мицелии *I. obliquus* штамм F-1375 на свету после инкубации в глубинных условиях в среде ГТС в течение 48 сут при 25–26°C

Добавка к ГТС	Масса внеклеточного меланина, г/л	Масса меланина мицелия, г/л	Общая масса меланина, г/л	Увеличение общей массы меланина по сравнению с контролем
Без добавок	0.10	0.58	0.68	1.0
Бетулин, 4.5 мкМ	0.21	0.72	0.93	1.4
Бетулин, 11.2 мкМ	0.20	0.62	0.82	1.2
2 мМ L-Туг	0.33	0.65	0.98	1.4
10 мМ L-Туг	0.63	0.77	1.41	2.1
20 мМ L-Туг	0.55	0.81	1.36	2.0

Таблица 2. Количество меланина в КЖ и мицелии *I. obliquus* штамм F-1375 в темноте после инкубации в глубинных условиях на среде ГТС в течение 60 сут при 25–26°C

Добавка к ГТС	Масса внеклеточного меланина, г/л	Масса меланина мицелия, г/л	Общая масса меланина, г/л	Повышение общей массы меланина по сравнению с контролем
Без добавок	0.38	0.08	0.46	1.0
Бетулин, 4.5 мкМ	0.28	0.8	1.08	2.3
Бетулин, 11.2 мкМ	0.34	0.74	1.08	2.3
2 мМ L-Туг	0.38	0.56	0.94	2.0
10 мМ L-Туг	0.73	0.95	1.68	3.7
20 мМ L-Туг	1.12	1	2.12	4.6

меланин из штамма *I. obliquus* F-1375, выращенного с добавлением 10 и 20 мМ L-Туг на свету.

Спектры и соотношение оптических плотностей в ультрафиолетовом и видимом свете, а также выход меланина отличались у препаратов из природной чаги и из культуры гриба в среде ГТС в присутствии в качестве эффекторов бетулина и тирозина (рис. 1, табл. 3). Аналогичные различия спектров меланина из природной и культивируемой чаги были описаны и ранее [11, 18, 19], что позволило предположить, что исследуемые препараты содержали меланины разного типа: меланин

из природной чаги относят к алломеланинам, а полученный из культуры гриба — к эумеланинам.

В связи с истощением природных источников *I. obliquus* (чага) широкое распространение получило культивирование выделенных из нее штаммов твердофазным или глубинным способами в лабораторных и заводских условиях для создания лекарственных препаратов на их основе. Однако физико-химические свойства пигментов пирокатехинового типа, меланинов, образуемых *I. obliquus* в природных условиях и искусственной культуре, такие как элементный состав, функциональные группы, спектральные и парамагнитные свойства,

Таблица 3. Оптическая плотность при 240 и 465 нм 0.01%-ных препаратов меланина природного и полученного в результате культивирования штамма *I. obliquus* F-1375

Показатель	Препараты меланина из природной и культивированной чаги*				
	21–13	21–36	21–37	21–38	21–39
ОП ₂₄₀	3.618	1.546	1.876	2.403	2.109
ОП ₄₆₅	0.556	0.295	0.386	0.583	0.474
ОП ₂₄₀ /ОП ₄₆₅	6.51	5.24	4.86	4.12	4.44
Выход, %	32.36	0.088	0.108	0.190	0.138

* Обозначения как на рис. 1.

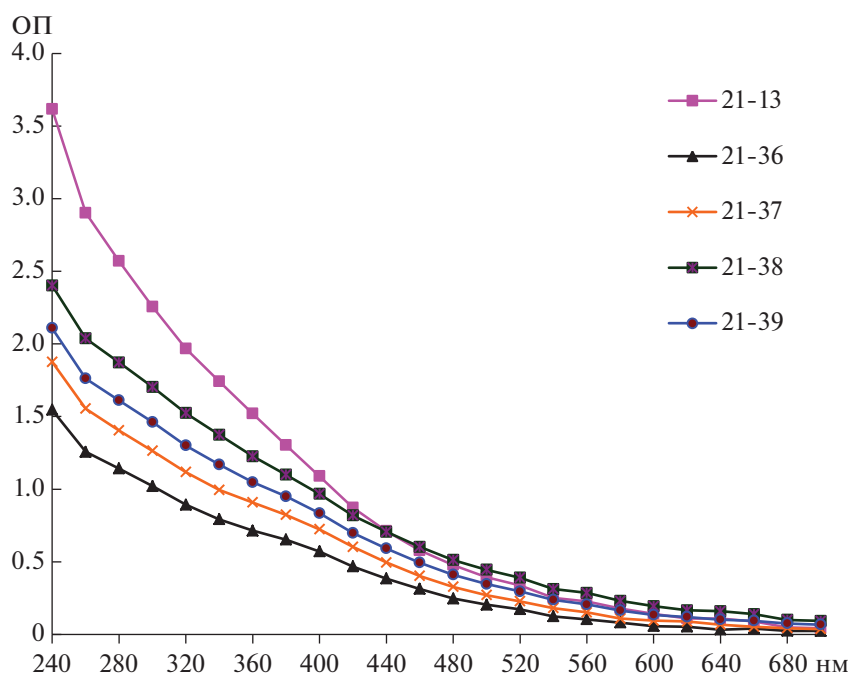


Рис. 1. Спектры 0.01%-ных препаратов меланина природного и полученного из культуры штамма F-1375 *I. obliquus*, выращенного в жидкой среде: 21-13 — меланин из природной чаги; 21-36 — меланин из штамма *I. obliquus* F-1375, выращенного с добавлением 4.5 и 11.2 мкМ бетулина на свету, 21-37 — меланин из штамма *I. obliquus* F-1375 с добавлением 4.5 и 11.2 мкМ бетулина, выращенного в темноте, 21-38 — меланин из штамма *I. obliquus* F-1375 с добавлением 10 и 20 мМ L-Тур, выращенного в темноте, 21-39 — меланин из штамма *I. obliquus* F-1375, выращенного с добавлением 10 и 20 мМ L-Тур на свету.

особенности термодеструкции свидетельствовали о структурных различиях между пигментами, что и позволило отнести их к разным видам [18–20].

Исследование токсичности для клеток человека МТ-4 и анализ антиретровирусной активности полученных образцов меланина. Цитотоксичность препаратов меланина оценивали по их влиянию на лимфоидные клетки человека культуры МТ-4. После пяти дней культивирования клеток с добавлением в питательную среду разных концентраций препаратов меланина было показано, что токсич-

ность меланина варьировала от 96 до 400 мкг/мл. Антиретровирусная активность, определяемая двумя различными методами, была выявлена для всех исследуемых препаратов меланина. В табл. 4 представлены данные по активности образцов меланина в отношении ВИЧ-1.

Исследование препаратов показало, что минимальной токсичностью и противовирусной активностью обладал меланин, выделенный щелочной экстракцией из природной чаги.

Таблица 4. Оценка противовирусной активности препаратов меланина в отношении ВИЧ-1 и токсичности для клеток МТ-4

Исследуемый параметр	Препараты меланина из природной и культивированной чаги, шифр препарата**				
	21-13	21-36	21-37	21-38	21-39
Цитотоксичность (TC_{50} , мкг/мл)	96 ± 8	400 ± 24	272 ± 18	164 ± 12	250 ± 12
Противовирусная активность (IC_{50} , метод МТТ, мкг/мл)	4.3 ± 0.6	3.0 ± 0.9	4.1 ± 1.0	4.0 ± 1.2	1.0 ± 0.6
Противовирусная активность (IC_{50} , метод ИФА, мкг/мл)	5.6 ± 1.0	10.5 ± 1.3	6.4 ± 0.6	5.0 ± 0.8	1.3 ± 0.3
Индекс селективности ($SI = TC_{50}/IC_{50}$)*	17	38	43	33	192

* Индекс селективности ($SI = TC_{50}/IC_{50}$), где TC_{50} — 50%-ная токсическая концентрация, IC_{50} — 50%-ная ингибирующая концентрация. ** Обозначения как на рис. 1.

Меланин, выделенный из гриба, культивируемого на свету с добавлением тирозина, обладал наибольшей противовирусной активностью, подавляя репродукцию ВИЧ-1 в клетках человека. Этот препарат имел также средние характеристики по цитотоксичности, а его индекс селективности составил 192 и был выше аналогичных показателей других изучаемых меланинов в 4–11 раз. При расчете показателя отношения TC_{50}/IC_{50} использовали данные по концентрации меланина, способной блокировать репродукцию ВИЧ-1, полученные методом ИФА, так как этот метод позволяет выполнить количественную оценку концентрации вирусного белка, присутствующего в культуральной жидкости при культивировании инфицированных ВИЧ-1 клеток МТ-4.

Ранее были предложены несколько способов интенсификации продукции биомассы и меланина при культивировании: с помощью света низкой интенсивности [21], укрывания колб черной бумагой, которое повышало выход биомассы через 10 сут до 12.9 г/л в темноте, по сравнению с контролем 11.8 г/л при дневном свете [22], добавление ионов меди и тирозина [18].

Кроме того, рост мицелия и синтез меланинов в глубинных условиях в культуре гриба увеличивали окислительным стрессом, индуцируемым постоянным добавлением пероксида водорода [23], в результате кратковременного воздействия на вегетативный мицелий когерентного синего света низкой интенсивности [21], добавлением к культуре *I. obliquus* коллоидных наночастиц металлов Ag и Mg [24].

По полученным результатам добавление в ГТС L-Туг в концентрациях 2, 10 и 20 мМ повышало при культивировании выход меланина как в темноте, так и при электрическом освещении (табл. 1, 2). По-видимому, влияние на синтез меланина происходило через тирозиназу грибов (КФ1.14.18.1), катализирующую окисление L-Туг до 3,4-дигидроксифенилаланина (DOPA) и окисление DOPA до допахинона [19, 21, 25]. При анализе тирозиназы гриба бетулин являлся неконкурентным ингибитором активности этого фермента с $K_i = 0.4$ мкМ, показывая IC_{50} 5.13 мкМ [26]. Однако сравнимые с ингибирующими концентрации препарата бетулина (4.5 и 11.2 мкМ) в настоящей работе не снижали выход меланина при культивировании ни при электрическом свете, ни в темноте, что связано скорее всего с различием препаратов и различием систем анализа (табл. 1, 2). Общий выход меланина в жидкой среде без эффекторов зависел от условий и продолжительности культивирования *I. obliquus* F-1375: 0.68 г/л на свету и 0.46 г/л в темноте без встряхивания (табл. 1, 2).

В опытах концентрации тирозина 10 и 20 мМ практически одинаково стимулировали меланогенез в темноте (табл. 2), тогда как при культиви-

ровании с электрическим освещением меланогенез был выше при более высокой концентрации тирозина (табл. 1), что совпадало с результатами Бабицкой с соавт. [18], полученными при обычном освещении.

Меланин, полученный из природного лекарственного гриба чаги *I. obliquus*, а также выделенный из мицелия и КЖ глубинной культуры гриба, может быть перспективен в качестве компонента антиретровирусного препарата, а также других лекарственных препаратов. Однако частично его активность могла быть обусловлена присутствием в препаратах меланина терпеновых соединений [8, 27].

Необходимы дальнейшие исследования по безопасности и эффективности меланина и других биологически активных веществ природной и культивируемой чаги (*I. obliquus*) в доклинических и клинических исследованиях.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора.

Список литературы

1. El-Mekkawy S., Meselhy M.R., Nakamura N., Tezuka Y., Hattori M., Kakiuchi N., Shimotohno K., Kawahata T., Otake T. // Phytochem. 1998. V. 49. № 6. P. 1651–1657. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(98\)00254-4](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(98)00254-4)
2. Choengpanya K., Ratanabunyong S., Seetaha S., Tabtimmai L., Choowongkamon K. // Saudi J. Biol. Sci. 2021. V. 28. № 5. P. 2807–2815. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.02.012>
3. Duru K.C., Kovaleva E.G., Danilova I.G., van der Bijl P. // Phytother. Res. 2019. V. 33. № 8. P. 1966–1980. <https://doi.org/10.1002/ptr.6384>
4. Lindequist U., Niedermeyer T.H.J., Julich W.D. // Evid. Based Complement Alternat. Med. 2005. V. 2. № 3. P. 285–299. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh107>
5. Duru M.E., Çayan G.T. // Rec. Nat. Prod. 2015. V. 9. № 4. P. 456–483.
6. El Dine R.S., El Halawany A.M., Ma C.M., Hattori M. // J. Nat. Prod. 2008. V. 71. № 6. P. 1022–1026. <https://doi.org/10.1021/np8001139>
7. El Dine R.S., El Halawany A.M., Nakamura N., Ma Ch.-M., Hattori M. // Chem. Pharm. Bull. 2008. V. 56. № 5. P. 642–646. <https://doi.org/10.1248/cpb.56.642>
8. Burmasova M.A., Utebaeva A.A., Sysoeva E.V., Sysoeva M.A. // Biomolecules. 2019. V. 9. № 6. P. 248. <https://doi.org/10.3390/biom9060248>
9. Сушинская Н.В., Курченко В.П., Горовой Л.Ф., Сенюк О.Ф. // Успехи медицинской микологии. 2005. Т. 6. С. 255–259.
10. Щерба В.В., Бабицкая В.Г., Курченко В.П., Иконникова Н.В., Кукулянская Т.А. // Прикл. биохимия микробиология. 2000. Т. 36. № 5. С. 569–574.

11. Патент РФ. 2020. № 2716590.
12. Патент РФ. 2013. № 2480227 С2.
13. Патент РФ. 2021. № 2747018.
14. Щерба В.В., Бабицкая В.Г., Иконникова Н.В., Бисько Н.А. // Успехи медицинской микологии. 2005. Т. 6. С. 263–265.
15. Ильичева Т.Н., Ананько Г.Г., Косогова Т.А., Олькин С.Е., Омигов В.В., Таранов О.С., Теплякова Т.В. // Химия растительного сырья. 2020. № 2. С. 283–289. <https://doi.org/10.14258/JCPRM>
16. Носик Д.Н., Носик Н.Н., Теплякова Т.В., Лобач О.А., Киселева И.А., Кондрашина Н.Г., Бочкова М.С., Ананько Г.Г. // Вопросы вирусологии. 2020. Т. 65. № 5. С. 276–283. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-4>
17. Pannecouque C., Daelemans D., De Clercq E. // Nat. Protoc. 2008. V. 3. № 3. P. 427–434. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.517>
18. Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Иконникова Н.В. // Прикл. биохимия микробиология. 2000. Т. 36. №4. С. 439–444.
19. Кукулянская Т.А., Курченко Н.В., Курченко В.П., Бабицкая В.Г. // Прикл. биохимия микробиология. 2002. Т. 38. № 1. С. 68–72.
20. Бабицкая В.Г., Щерба В.В. // Прикл. биохимия микробиология. 2002. Т. 38. № 3. С. 286–291.
21. Poyedinok N., Mykhaylova O., Tugay T., Tugay A., Negriyko A., Dudka I. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2015. V. 176. № 2. P. 333–343. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1577-3>
22. Zheng W., Zhang M., Zhao Y., Miao K., Jiang H. // Biore-source Technol. 2009. V. 100. № 19. P. 4481–4487. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.027>
23. Zheng W., Zhao Y., Zhang M., Wei Z., Miao K., Sun W. // Med Mycol. 2009. V. 47. № 8. P. 814–823. <https://doi.org/10.3109/13693780802653933>
24. Poyedinok N., Mykhaylova O., Sergiichuk N., Tugay T., Tugay A., Lopatko S., Matvieieva N. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2020. V. 191. № 3. P. 1315–1325. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03281-2>
25. Chen Q.-X., Song K.-K., Qiu L., Liu X.-D., Huang H., Guo H.-Y. // Food Chem. 2005. V. 91. № 2. P. 269–274. <https://doi.org/10.1080/14756360310001613094>
26. Yan Z.-F., Yang Y., Tian F.-H., Mao X.-X., Li Y., Li C.-T. // Evid. Based Complement Alternat. Med. 2014. 2014:259836. <https://doi.org/10.1155/2014/259836>
27. Бурмасова М.А., Сысоева М.А. // Хим.-фарм. журн. 2017. Т. 51. № 4. С. 46–48.

Melanin Production by the Medicinal Mushroom *Inonotus obliquus* F-1375 in Submerged Liquid Cultivation and its Antiretroviral Properties

T. V. Teplyakova^{a, *}, N. A. Markovich^{a, **}, N. M. Gashnikova^a, and M. P. Gashnikova^a

^aState Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”,
Rosпотребнадзор, Koltsovo, Novosibirsk Oblast, 630559 Russia

*e-mail: teplyakova@vector.nsc.ru

**e-mail: namark@yandex.ru

We have explored the effect of a new strain of the mushroom *Inonotus obliquus* (Ach.:Pers.) Pilat (*Basidiomycota*) F-1375 on melanin production in a glucose-tryptone medium, adding the preparation of betulin, chemically pure tyrosine, under electric lighting and under dark conditions. The betulin preparation in the examined concentrations had practically no effect on the production of melanin, while high concentrations of tyrosine stimulated the production of melanin both under illumination and in the dark. All studied samples of mushroom melanin are non-toxic: both isolated from natural ($TC_{50} = 96 \pm 8 \mu\text{g/mL}$) and cultured in a liquid medium with the addition of betulin and tyrosine (TC_{50} from 164 to 400 $\mu\text{g/mL}$); active against HIV-1 in MT-4 cell culture (IC_{50} 1 to 4.3 $\mu\text{g/mL}$, SI 17 to 192). The selectivity indices of the learned preparations of melanin of cultivated *Inonotus obliquus* F-1375 against the human immunodeficiency virus subtype A were at the level of 33–192, which makes it possible to recommend them for the development of antiviral agents. Melanin from mushroom *Inonotus obliquus* F-1375 cultured in the electrical light with the addition of 10 and 20 mM tyrosine has the highest selectivity index for retrovirus HIV-1 (SI 192).

Keywords: antiretroviral, *Basidiomycota*, chaga, Human immunodeficiency virus 1, *Inonotus obliquus*, melanin, mycelium, selectivity index, submerged liquid cultivation