

Экспериментальная оценка лечебных свойств мази на основе меланинов из природного сырья и глубинной культуры чаги

Е.А. Ставский¹, Т.В. Теплякова², И.С. Андреева², Е.С. Давыдова¹, А.А. Ставская¹,
А.Л. Потешкина²

¹ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

²ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, пос. Кольцово, Россия

АННОТАЦИЯ

В в е д е н и е . В связи с приобретением устойчивости к антибиотикам гноеродной микробиоты обострилась проблема местного (медикаментозного) лечения ран.

Ц е л ь . Экспериментальная оценка антибиотических свойств меланина из природного сырья и глубинной культуры чаги (*Inonotus obliquus*) *in vitro* и лечебных свойств мазей, приготовленных на основе указанных меланинов, *in vivo*.

М а т е р и а л ы и м е т о д ы . Меланины получали методом щелочного гидролиза. Антибиотическую активность меланинов определяли при совместном культивировании в жидкой среде исследуемых образцов с шестью культурами тест-штаммов грамотрицательных и грамположительных бактерий и двух дрожжевых грибов. Мази на основе меланина из природного сырья и глубинной культуры чаги штамма *Inonotus obliquus* F-1244 получали с использованием двух составов мазевых основ. Ранозаживляющую эффективность мазей оценивали на трех группах мышей. Контрольными являлись группы мышей, ничем не леченных и леченных мазью сравнения Левомикон-ТФФ. Лечение мышей продолжали до момента заживления у них резаных кожных ран. Ежедневно у мышей во всех группах оценивали площади ран, двигательную активность, аппетит, динамику и характер заживления ран, а также через каждые три суток изменение у них массы тела.

Р е з у л ь т а т ы . Меланины из природного сырья и глубинной культуры чаги полностью подавляли размножение грамположительной спорообразующей бактерии *Bacillus cereus* в совместной культуре. Меланин из природного сырья чаги в среднем на порядок подавлял рост золотистого стафилококка штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Меланин из глубинной культуры чаги полностью подавлял рост клинического изолята высокопатогенного штамма *Candida sp.* Ft-5 от умершего больного с генерализованной кандидозной инфекцией и в среднем на два порядка активнее ингибировал рост коллекционного штамма дрожжей *Candida albicans* 620.

Было установлено, что мази на основе меланина из природного сырья и глубинной культуры чаги, а также мазь, содержащая пятикратно увеличенную концентрацию меланина из природной чаги, не обладают токсичностью для экспериментальных животных. Мази, содержащие по 0.4 мг меланина из природного сырья и глубинной культуры чаги на 0.2 г одноразовой дозы мази, обладали одинаковой ранозаживляющей эффективностью, при этом не только не уступали по этому показателю комбинированному противомикробному препарату сравнения Левомикон-ТФФ, но и продемонстрировали тенденцию более ускоренного заживления ран (на 15–18-е сутки наблюдения) по сравнению с процессом регенерации ран у группы животных, леченных препаратом сравнения. Был продемонстрирован более ускоренный эффект заживления ран у экспериментальных животных (уже на 12-е сутки наблюдения), леченных с пятикратно увеличенным содержанием меланина из природного сырья чаги, по сравнению с мышами, леченными препаратом сравнения.

З а к л ю ч е н и е . Мази, содержащие меланин чаги (*Inonotus obliquus*), обладают противовоспалительными, регенеративными свойствами и могут рассматриваться в качестве перспективных для местного лечения ран.

Ключевые слова: высшие базидиомикеты, гриб чага (*Inonotus obliquus*), мазь, мазевая основа, состав, пропись, поверхностная кожная рана.

Образец цитирования: Ставский Е.А., Теплякова Т.В., Андреева И.С., Давыдова Е.С., Ставская А.А., Потешкина А.Л. Экспериментальная оценка лечебных свойств мази на основе меланинов из природного сырья и глубинной культуры чаги // Journal of Siberian Medical Sciences. 2022;6(1):93–105. doi: 10.31549/2542-1174-2022-6-1-93-105

Поступила в редакцию 16.06.2021
Прошла рецензирование 27.09.2021
Принята к публикации 15.10.2021

Автор, ответственный за переписку
Ставский Евгений Александрович: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.
E-mail: stavskiyngmu@mail.ru

Received 16.06.2021
Revised 27.09.2021
Accepted 15.10.2021

Corresponding author
Evgeniy A. Stavsky: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny prosp., Novosibirsk, 630091, Russia.
E-mail: stavskiyngmu@mail.ru

Experimental evaluation of therapeutic properties of ointment based on melanins from natural raw material and a submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus*)

E.A. Stavsky¹, T.V. Teplyakova², I.S. Andreeva², E.S. Davydova¹, A.A. Stavskaya¹, A.L. Poteshkina²

¹Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

²State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk Region, Koltsovo village, Russia

ABSTRACT

I n t r o d u c t i o n . Due to the acquisition of antibiotic resistance by pyogenic microbiota, the problem of topical (drug) treatment of wounds has worsened.

A i m . Experimental evaluation of the antibiotic properties of melanin from natural raw material and a submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus*) *in vitro* and the therapeutic properties of ointments prepared on the basis of these melanins *in vivo*.

M a t e r i a l s a n d M e t h o d s . Melanins were obtained by alkaline hydrolysis. The antibiotic activity of melanins was determined by co-cultivation in a liquid medium of the studied samples with six cultures of test strains of gram-negative and gram-positive bacteria and two of yeast fungi. Ointments based on melanin from natural raw material and the submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus* F-1244 strain) were obtained using two compositions of ointment base. The wound-healing efficacy of ointments was evaluated on three groups of mice. The control groups were mice untreated and treated with a comparison drug (Levomikon-TFF). The treatment of mice was continued until their incised skin wounds healed. Wound areas, motor activity, appetite, dynamics and character of wound healing were assessed daily in mice of all groups, as well as changes in their body weight every three days.

R e s u l t s . Melanins from natural raw materials and the submerged culture of chaga completely suppressed the growth of gram-positive spore-forming *Bacillus cereus* bacterium in a co-culture. Melanin from natural raw material of chaga on average suppressed the growth of the *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 strain by an order of magnitude. Melanin from the submerged chaga culture completely suppressed the growth of a clinical isolate of the highly pathogenic *Candida* sp. Ft-5 strain from a deceased patient with generalized candida infection and, on average, inhibited the growth of the collection strain of yeast *Candida albicans* 620 by two orders of magnitude more intensively.

It was found that ointments based on melanin from natural raw materials and the submerged culture of chaga, as well as ointment containing a fivefold increased concentration of melanin from natural chaga, do not have toxicity to experimental animals. Ointments containing 0.4 mg of melanin from natural raw material and the submerged chaga culture per 0.2 g of a single dose of ointment had the same wound healing efficacy, while not only were not inferior in this indicator to the combined antimicrobial comparison drug Levomikon-TFF, but also showed a tendency to more accelerated wound healing (on the 15–18th day of observation) compared with the process of wound regeneration in the group of animals treated with the drug of comparison. A more accelerated wound healing effect was demonstrated in experimental animals (already on the 12th day of observation) treated with a fivefold increased content of melanin from natural raw material of chaga, compared with mice treated with the comparison drug.

C o n c l u s i o n . Ointments containing melanin of chaga (*Inonotus obliquus*) have anti-inflammatory, regenerative properties and can be considered promising for topical treatment of wounds.

Keywords: higher basidiomycetes, chaga mushroom (*Inonotus obliquus*), ointment, ointment base, formulation, prescription, superficial wound.

Citation example: Stavsky E.A., Teplyakova T.V., Andreeva I.S., Davydova E.S., Stavskaya A.A., Poteshkina A.L. Experimental evaluation of therapeutic properties of ointment based on melanins from natural raw material and a submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus*). *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2022;6(1):93–105. doi: 10.31549/2542-1174-2022-6-1-93-105

ВВЕДЕНИЕ

Исследования показали, что высшие базидиомицеты способны синтезировать широкий комплекс биологически активных веществ, таких как полисахариды, гликопротеины, терпены, стеролы, пигменты и др. [1–5], которые могут проявлять антибактериальные [1, 6], противовирус-

INTRODUCTION

Studies have shown that higher basidiomycetes are able to synthesize a wide range of biologically active substances, such as polysaccharides, glycoproteins, terpenes, sterols, pigments, etc. [1–5], which can exhibit antibacterial [1, 6], antiviral [1, 7–12], antitumor, antiparasitic, and immunomodulatory

ные [1, 7–12], противоопухолевые, антипаразитарные и иммуномодулирующие свойства [1–3]. При этом указанные комплексы из базидиомицетов, как правило, не являются токсичными или малотоксичными для человека или животных [1–7]. В связи с нарастающей бактериальной устойчивостью к применяющимся антибиотикам, большим количеством нежелательных побочных последствий антибиотиков для организма человека и животных, измененной реактивностью организма, прежде всего человека, обусловившими актуальность проблемы как общей антибиотикотерапии, так и местного (медикаментозного) лечения ран из-за растущей резистентности гноеродной микробиоты, возник заметный интерес к созданию на основе высших базидиомицетов и представителей других систематических групп грибов [1] новых антибиотиков. Известно большое количество различных лекарственных препаратов для лечения гнойных ран. По характеру своего действия эти препараты могут быть объединены в следующие основные группы: препараты отсасывающего действия, включающие солевые растворы, сорбенты и др.; раневые бактериофаги, микробные ассоциации и др.; препараты некролитического действия, включающие протеолитические ферменты, кислоты, антисептики; препараты антимикробного действия, в состав которых входят антибиотики и др. [13–16]. Учитывая тот факт, что высшие базидиальные грибы продуцируют широкий спектр биологически активных веществ, представляется актуальным оценить, в частности, перспективность использования и практическую значимость меланинов указанных грибов [4–5], а также возможность создания на их основе мазей для местного лечения ран.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная оценка антибиотических свойств меланина из природного сырья и глубинной культуры чаги *in vitro* и лечебных свойств мазей, приготовленных на основе указанных меланинов, *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью оценки биологических свойств меланинов чаги определяли их антибактериальную и антигрибковую активности при совместном культивировании в жидкой среде исследуемых образцов с культурами тест-штаммов грамотрицательных и грамположительных бактерий и дрожжевых грибов, являющихся, наряду с другими микробами, наиболее частой причиной развития

properties [1–3]. At the same time, these complexes from basidiomycetes, as a rule, are not toxic or low-toxic to humans or animals [1–7]. Due to the increasing bacterial resistance to the antibiotics used, a large number of adverse effects of antibiotics for the human and animal body, the altered reactivity of the body, primarily human, which caused the urgency of the problem of both general antibiotic therapy and topical (drug) treatment of wounds due to the growing resistance of the pyogenic microbiota, there was a noticeable interest in the creation of new antibiotics based on higher basidiomycetes and representatives of other systematic groups of fungi [1]. A large number of different medications for the treatment of purulent wounds are known. By the nature of their action, these medicines can be combined into the following main groups: sump action preparations, including saline solutions, sorbents, etc.; wound bacteriophages, microbial associations, etc.; necrolytic drugs, including proteolytic enzymes, acids, antiseptics; antimicrobial drugs, which include antibiotics, etc. [13–16]. Considering the fact that higher basidiomycetes fungi produce a wide range of biologically active substances, it seems relevant to assess, in particular, the prospects for the use and practical significance of melanins of these fungi [4–5], as well as the possibility of creating ointments based on them for topical wound treatment.

AIM OF THE RESEARCH

Experimental evaluation of the antibiotic properties of melanin from natural raw material and a submerged culture of chaga *in vitro*, and the therapeutic properties of ointments prepared on the basis of these melanins *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

In order to assess the biological properties of the melanins of chaga, their antibacterial and antifungal activity was determined when the studied samples were co-cultured in a liquid medium with cultures of test strains of gram-negative and gram-positive bacteria and yeast fungi, which, along with other microbes, are the most common cause of wound infection. These strains of microorganisms are deposited in the museum collection of the State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” (Vector Research Center) and belong to the 3–4th group of pathogenicity for humans [17]. The studied 0.5 ml chaga samples were introduced into test tubes with 4.5 ml of LB medium (Difco, USA), and 0.1 ml of 24 hour culture of the test strain of the microorganism suspended in saline solution was added to gain optical density of 10^{5-6} cell/ml. Fur-

раневой инфекции. Указанные штаммы микроорганизмов депонированы в музейной коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (научный центр «Вектор») и относятся к 3–4-й группе патогенности для человека [17]. Исследуемые образцы чаги по 0.5 мл вносили в пробирки с 4.5 мл среды LB (Difco, USA) и добавляли 0.1 мл суточной культуры тест-штамма микроорганизма, суспендированной в физиологическом растворе, до оптической плотности 10^{5-6} кл/мл. Далее пробирки с культурами и образцами выдерживали в аэрируемых условиях на термостатируемой качалке при температуре 37°C в течение 18–24 ч. Полученные культуральные жидкости (КЖ) и их десятикратные разведения (до 10^{-7}) высевали методом микротитрования по 10 мкл, в 3 повторах на агаризованную среду LB. Инкубировали высевы в термостате при температуре 37°C в течение 18–24 ч, после чего подсчитывали количество выросших колоний для определения КОЕ/мл в неразведенной («исходной») суспензии. В качестве контроля определяли титр клеток в суспензии тест-штаммов, инкубированных в аналогичных условиях, без добавления исследуемых образцов.

Для оценки лечебных свойств меланина *in vivo* получали мази на основе меланина из природного сырья чаги (*Inonotus obliquus*) и мази на основе меланина из глубинной культуры оригинального штамма чаги *Inonotus obliquus* F-1244, полученного в научном центре «Вектор» и депонированного в его музейной коллекции. Из измельченного природного сырья березового гриба (чаги) меланин получали методом щелочного гидролиза [8], а из глубинной культуры *Inonotus obliquus* F-1244 – согласно [10] и лабораторному регламенту на получение меланина на основе штамма *Inonotus obliquus* F-1244 (ЛР 056640012-037-16), разработанному в лаборатории микологии научного центра «Вектор». Полученные пигменты идентифицировали при помощи качественных реакций [5, 8, 10]. Свойства обоих видов указанных меланинов соответствовали предъявляемым требованиям на субстанцию «Меланин чаги» (ЛР 056640012-037-16): внешний вид – порошок темно-коричневого цвета; массовая доля влаги – не более $9.0 \pm 1.0\%$; водородный показатель 0.001 % раствора pH – 7.5 ± 0.5 ; оптическая плотность 0.001% раствора при длине волны 465 нм – не менее 0.04 ед. оптической плотности.

Для получения 25.0 г меланинсодержащей мази использовали по 50 мг обоих видов меланина, растворенных в 12 мл изотонического рас-

ther, the tubes with cultures and samples were kept in aerated conditions on a shaking bath at a temperature of 37°C for 18–24 h. The obtained culture fluids and their tenfold dilutions (up to 10^{-7}) were plated by microtitering by 10 μl , in 3 repetitions on LB agar medium. The inoculations were incubated in a thermostat at 37°C for 18–24 h, after which the number of grown colonies was calculated to determine CFU/ml in an undiluted (initial) suspension. As a control, the cell titer was determined in a suspension of test strains incubated under similar conditions without adding the test samples.

To assess the health benefits of melanin *in vivo*, ointments based on melanin from natural raw material of chaga (*Inonotus obliquus*) and ointments based on melanin from a submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus* F-1244 original strain), obtained at the Vector Research Center and deposited in its museum collection, were obtained. Melanin was obtained from crushed natural raw material of chaga mushroom by alkaline hydrolysis [8], and from the submerged culture of *Inonotus obliquus* F-1244 according to [10] and laboratory regulations for the production of melanin based on the *Inonotus obliquus* F-1244 strain (LR 056640012-037-16), developed in the Laboratory of Mycology of the Vector Research Center. The obtained pigments were identified using qualitative reactions [5, 8, 10]. The properties of both types of these melanins corresponded the requirements for the substance “Chaga Melanin” (LR 056640012-037-16): appearance – dark brown powder; mass fraction of moisture – no more than $9.0 \pm 1.0\%$; 0.001% solution pH – 7.5 ± 0.5 ; optical density 0.001% solution at a wavelength of 465 nm – at least 0.04 units of optical density.

To obtain 25.0 g of melanin-containing ointment, 50 mg of both types of melanin dissolved in 12 ml of isotonic solution were used. Whereas two formulations of ointment bases were used.

According to the first formulation [18], the ointment bases were obtained at $50\text{--}60^{\circ}\text{C}$ and with thorough mixing 7.0 g of vaseline oil and 3.0 g of T-2 and Twin-60 emulsifiers. The obtained bases were cooled to a temperature of $30\text{--}35^{\circ}\text{C}$, and solutions of natural and submerged melanins (formulations 1 and 2 respectively) were introduced into them with stirring. The obtained ointments were mixed to a state of homogeneity and packaged. The second formulation of the ointment base also included vaseline, but lanolin was used as an emulsifier. To obtain 25.0 g of ointment, 0.15 g melanin from natural raw material was ground to the impalpable powder in a porcelain mortar, then dissolved in 2.5 ml of saline solution,

твора. При этом мазевые основы использовали двух составов.

Согласно первому составу [18] мазевые основы получали при 50–60 °С и тщательном перемешивании 7.0 г вазелинового масла и по 3.0 г эмульгаторов Т-2 и Твин-60. Полученные основы охлаждали до температуры 30–35 °С и вносили в них при перемешивании растворы природного и «глубинного» меланинов (прописи мазей 1 и 2 соответственно). Полученные мази перемешивали до состояния гомогенности и расфасовывали. Второй состав мазевой основы включал также вазелин, но в качестве эмульгатора использовали ланолин. Для получения 25.0 г мази 0.15 г меланина из природного сырья чаги растирали до мельчайшего порошка в фарфоровой ступке, затем растворяли в 2.5 мл физиологического раствора, добавляли в качестве эмульгатора 2.5 г ланолина, затем 20.0 г вазелина, продолжая при этом растирание смеси в ступке при 50–60 °С до получения гомогенной мази, а затем расфасовывали (пропись мази 3). Полученные меланиновые мази указанных выше трех прописей представляли собой гомогенные темно-коричневого цвета смеси, аналогичные по своей консистенции мазевым лекарственным формам.

В качестве препарата сравнения применяли мазь Левомикон-ТФФ – серия 140718 (ООО «Тулская фармацевтическая фабрика», Россия, срок годности – до 01.2022). Препарат представляет собой однородный желеобразный продукт, используется в качестве комбинированного средства для местного применения. Действующим началом мази являются метилурацил – 4.00 г и хлорамфеникол – 0.75 г. Вспомогательные компоненты: макрогол-1500 – 19.05 г, макрогол-400 – 76.20 г. Мазь оказывает антимикробное действие, прежде всего за счет антибиотика широкого спектра действия хлорамфеникола. Метилурацил обладает анаболической активностью. Оказывает противовоспалительное, иммуностимулирующее, гемопоэтическое, лейкопоэтическое действие. Нормализуя нуклеиновый обмен, стимулирует процессы регенерации в ранах, рост, грануляционное созревание ткани и эпителизацию [19].

В опыте использовали здоровых неинбредных мышей массой тела 17–19 г колонии ICR обоего пола из питомника научного центра «Вектор». Животных распределяли по следующим группам (по 20 мышей в каждой):

- группа 1 – контрольная: мыши, ничем не леченные;

2.5 g of lanolin was added as an emulsifier, then 20.0 g of vaseline, while continuing to paste the mixture in the mortar at 50–60 °С until a homogeneous ointment is obtained, and then packaged (ointment formulation 3). The resulting melanin ointments of the above three prescriptions were homogeneous dark brown mixtures similar in consistency to ointment dosage forms.

Levomikon-TFF ointment (batch 140718) was used as a comparison drug (Tula Pharmaceutical Factory, LLC, Russia, shelf life: up to 01.2022). The preparation is a homogeneous jelly-like product, used as a combined agent for topical application. The active ingredients of the ointment are methyluracil – 4.00 g and chloramphenicol – 0.75 g. Auxiliary components: macrogol-1500 – 19.05 g, macrogol-400 – 76.20 g. The ointment has an antimicrobial effect, primarily due to the broad-spectrum antibiotic agent chloramphenicol. Methyluracil has anabolic activity. It has an anti-inflammatory, immunostimulating, hematopoietic, leukopoietic effect. Normalizing nucleic metabolism, it stimulates regenerative processes in wounds, growth, maturation of granulation tissue and epithelization [19].

In the experiment, healthy non-inbred mice weighing 17–19 g of an ICR colony of both sexes from the nursery of the Vector Research Center were used. The animals were divided into the following groups (20 mice each):

- group 1 – control: untreated mice;
- group 2 – control: mice treated with the comparison drug;
- group 3 – experimental: animals treated with ointment containing melanin from natural raw material of chaga (*Inonotus obliquus*);
- group 4 – experimental: animals treated with ointment with melanin obtained on the basis of the submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus* F-1244 strain);
- group 5 – experimental: animals treated with ointment with a 5-fold increased concentration of melanin from natural raw material of *Inonotus obliquus* compared with ointments for animals of groups 3–4.

After premedication of white mice with chloroform, on the back of the animals a flat incised wound was applied with non-sterile scissors without observing the rules of asepsis. Experimental animals of groups 2–4 were treated daily by applying 0.2 g of Levomikon-TFF ointment to wounds with a spatula (group 2) and 0.2 g of melanin ointment containing 0.4 mg of melanin (groups 3 and 4), for group 5 0.2 g of ointment with 2.0 mg of melanin was used. The treatment of mice was continued until their incised

- группа 2 – контрольная: мыши, леченные препаратом сравнения;
- группа 3 – опытная: животные, леченные мазью с меланином из природного сырья чаги (*Inonotus obliquus*);
- группа 4 – опытная: животные, леченные мазью с меланином, полученным на основе глубоинной культуры штамма чаги *Inonotus obliquus* F-1244;
- группа 5 – опытная: животные, леченные мазью с увеличенной в 5 раз концентрацией меланина из природного сырья чаги по сравнению с мазями для животных групп 3–4.

После премедикации белых мышей хлороформом животным на спине наносили нестерильными ножницами без соблюдения правил асептики плоскую резаную рану. Экспериментальных животных групп 2–4 лечили ежедневно путем нанесения на раны шпателем 0.2 г мази Левомикон-ТФФ (группа 2) и по 0.2 г мази с меланином с содержанием в ней 0.4 мг меланина (группы 3 и 4), для группы 5 – 0.2 г мази с 2.0 мг меланина. Лечение мышей продолжали до момента заживления у них резаных ран. Ежедневно у мышей во всех группах оценивали площади ран по методу Л.Н. Поповой [20], двигательную активность, аппетит, динамику и характер заживления ран, а также через каждые трое суток – изменение у них массы тела.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экспериментальной оценки антибиотических свойств меланина из природного сырья и глубоинной культуры чаги *in vitro* представлены в табл. 1.

В ходе эксперимента было установлено, что водный экстракт чаги, меланины из природного сырья чаги и ее глубоинной культуры штамма *Inonotus obliquus* F-1244 проявили высокую антибиотическую активность в отношении штамма грамположительной спорообразующей бактерии *Bacillus cereus*, полностью подавив ее размножение в совместной культуре. Меланин из природного сырья чаги в среднем на порядок с достоверностью 95 % подавлял рост золотистого стафилококка, штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Водный экстракт из природного сырья чаги и меланин из глубоинной культуры штамма чаги *Inonotus obliquus* F-1244 проявили антагонистическую активность в отношении штаммов дрожжей – как коллекционного штамма *Candida albicans* 620, так и клинического изолята штамма *Candida sp.* Ft-5 от умершего больного с генерализованной кандидозной

wounds healed. The wound areas were evaluated daily in mice of all groups using the L.N. Popova method [20], then motor activity, appetite, dynamics and character of wound healing, as well as changes in their body weight were evaluated every three days.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the experimental evaluation of the antibiotic properties of melanin from natural raw material and the submerged culture of chaga *in vitro* are presented in Table 1.

During the experiment, it was found that the aqueous extract of chaga, melanins from natural raw material of chaga and its submerged culture (*Inonotus obliquus* F-1244 strain) showed high antibiotic activity against the strain of the gram-positive spore-forming bacterium *Bacillus cereus*, completely suppressing its growth in a co-culture. Melanin from natural chaga raw material with 95% confidence suppressed the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 strain more actively, on average, by an order of magnitude. An aqueous extract from natural chaga raw material and melanin from the submerged culture of the *Inonotus obliquus* F-1244 strain showed antagonistic activity against yeast strains, both the collection *Candida albicans* 620 strain and the clinical isolate of the *Candida sp.* Ft-5 strain from a deceased patient with generalized candida infection. In particular, the first sample reduced the number of viable cells of the *Candida albicans* 620 strain, compared to the control suspension, by an order of magnitude, on average; the second sample – by two orders of magnitude with 95% confidence. It should be particularly noted that the same chaga samples in the conditions of the experiment completely suppressed the growth of the highly pathogenic *Candida sp.* Ft-5 strain. However, samples of melanins isolated both from natural raw material and from the submerged culture of *Inonotus obliquus* F-1244, were expected to be inferior in their antibiotic effect on the studied cultures of test strains than the effect of the antibiotic chloramphenicol, since it has a pronounced bacteriostatic effect on at least 16 types of gram-positive and gram-negative bacteria [19]. Nevertheless, taking into account the experimental data obtained on the antibiotic activity of chaga melanins *in vitro*, as well as literature data on the presence and manifestation *in vivo* of a wide range of useful and positive properties by biologically active substances from higher basidiomycetes, it is possible and promising to include melanins in the composition of experimental ointments.

The results of an *in vivo* experimental evaluation of the therapeutic properties and toxicity of oint-

Таблица 1. Антибиотическая активность меланинов, выделенных из природного сырья чаги и ее глубоинной культуры чаги штамма *Inonotus obliquus* F-1244
Table 1. Antibiotic activity of melanins isolated from natural raw material and the submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus* F-1244 strain)

Тест-штаммы Test strains of microorganisms	Группа патоген- ности Patho- genicity group	Окраска по Граму Gram staining	Водный экст- ракт из природ- ного сырья чаги Aqueous extract from natural raw material of chaga	Меланин из природного сырья чаги Melanin from natural raw material of chaga	Меланин из глу- бинной культуры чаги F-1244 Melanin from the submerged culture of chaga F-1244	Хлорамфе- никол Chloramph- nicol	Контроль культуры тест- штамма Control of test strain culture
<i>Бактерии / Bacteria</i>							
<i>Salmonella typhimurium</i> 2606	3	–	(1.4 ± 0.4) · 10 ⁹	(1.6 ± 0.3) · 10 ⁹	(1.3 ± 0.3) · 10 ⁹	Нет роста No growth	(1.8 ± 0.5) · 10 ⁹
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	4	+	(3.7 ± 1.1) · 10 ⁶	(1.3 ± 0.4) · 10⁵	(5.9 ± 1.8) · 10 ⁶	Нет роста No growth	(4.0 ± 1.2) · 10 ⁶
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	–	(2.6 ± 0.8) · 10 ⁹	(2.2 ± 0.7) · 10 ⁹	(1.6 ± 0.5) · 10 ⁹	(1.9 ± 0.6) · 10 ⁹	(2.9 ± 0.8) · 10 ⁹
<i>Bacillus cereus</i>	4	+	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	4.0 · 10 ⁵
<i>Proteus mirabilis</i> 160205	4	–	(3.1 ± 0.9) · 10 ⁹	(3.0 ± 0.8) · 10 ⁹	(2.9 ± 0.8) · 10 ⁹	Нет роста No growth	(3.1 ± 0.9) · 10 ⁹
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 378	4	–	(2.1 ± 0.6) · 10 ⁹	(2.1 ± 0.7) · 10 ⁹	(1.5 ± 0.4) · 10 ⁹	Нет роста No growth	(1.4 ± 0.5) · 10 ⁹
<i>Дрожжи / Yeast</i>							
<i>Candida albicans</i> 620	4	*	(1.7 ± 0.5) · 10⁶	(1.8 ± 0.5) · 10 ⁷	(2.8 ± 0.8) · 10⁵	(2.2 ± 0.5) · 10 ⁷	(3.0 ± 0.9) · 10 ⁷
<i>Candida</i> sp. Ft-5 (клинический образец) (clinical sample)	4	*	Нет роста No growth	(2.4 ± 0.7) · 10 ⁷	Нет роста No growth	(1.0 ± 0.8) · 10 ⁷	(1.6 ± 0.5) · 10 ⁷

П р и м е ч а н и я : Жирным шрифтом выделены показатели подавления с достоверностью 95 % меланинами чаги роста культур тест-штаммов микроорганизмов в сравнении с их значениями для контрольных культур.

* Элементы грибов *Candida* хорошо окрашиваются при использовании широко распространенных методов окраски – по Граму, Романовскому – Гимзе, Цилю – Нильсену, раствором Люголя, метиленовым синим и др., но признаки качественного окрашивания в этом случае не являются основными дифференциально-диагностическими показателями для идентификации этих дрожжей.

N o t e s . The indicators of suppression with 95% confidence of the growth of test strains' cultures of microorganisms in comparison with their values for control cultures by melanins are highlighted in bold.

* Elements of *Candida* fungi are well stained with widely used methods: Gram, Romanovsky-Giemsa, Ziehl-Nielsen, Lugol's solution, methylene blue, etc., but signs of high-quality staining in this case are not the main differential diagnostic indicators for the identification of these yeasts.

инфекцией. В частности, первый образец снизил численность жизнеспособных клеток штамма *Candida albicans* 620 по сравнению с контрольной суспензией в среднем на порядок, второй образец – на два порядка с достоверностью 95 %. Следует особо отметить, что эти же образцы чаги в условиях проведенного опыта полностью подавляли рост высокопатогенного штамма *Candida sp.* Ft-5. Однако образцы меланинов, выделенных как из природного сырья, так и из глубинной культуры чаги *Inonotus obliquus* F-1244, ожидаемо уступали по своему антибиотическому действию на исследованные культуры тест-штаммов воздействию антибиотика хлорамфеникола, поскольку он обладает выраженным бактериостатическим действием в отношении не менее 16 видов грамположительных и грамотрицательных бактерий [19]. Тем не менее с учетом полученных экспериментальных данных по антибиотической активности меланинов чаги *in vitro*, а также данных литературы о наличии и проявлении *in vivo* широкого спектра практически полезных и положительных свойств биологически активными веществами из высших базидиомицетов делают возможным и перспективным включение меланинов в состав опытных мазей.

Результаты экспериментальной оценки *in vivo* лечебных свойств, а также токсичности мазей, содержащих меланины из природного сырья березового гриба (чаги) и глубинной культуры гриба чаги *Inonotus obliquus* F-1244, представлены в табл. 2, 3.

Из данных, представленных в табл. 2, следует, что динамика изменения показателей прироста массы тела у мышей как в экспериментальных группах, так и в контрольных группах животных была положительной. При этом значения этих показателей были очень близкими и не различались с достоверностью 95 % между группами. Имеющиеся различия в абсолютных показателях прироста массы тела у животных, в частности, на третьи сутки и при дальнейшем наблюдении были обусловлены различиями исходных масс тела у мышей, поскольку формирование опытных групп для возможного максимального нивелирования значимости этого показателя в последующем осуществлялось случайным образом без учета массы тела животных. В ходе эксперимента подопытные животные в группах 1 и 2 в течение первых пяти дней выглядели менее активными по сравнению с мышами групп 3–5. Последние охотнее поедали свой корм, более того, после нанесения мази мыши частично съедали мела-

ments containing melanins from natural raw material of chaga mushroom and the submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus* F-1244 strain) are presented in Tables 2, 3.

From the data presented in Table 2, it follows that the dynamics of changes in body weight gain in mice in both experimental and control groups of animals was positive. At the same time, the values of these indicators were very close and did not differ with 95% confidence between the groups. The differences in absolute values of body weight gain in animals, in particular, on the third day and further observation were due to differences in the initial body weights in mice, since the formation of experimental groups for the possible maximum leveling of the significance of this indicator was subsequently carried out randomly without taking into account the body weight of animals. During the study, the experimental animals in groups 1 and 2 looked less active during the first five days compared to mice in groups 3–5. The latter were more willing to eat their food, moreover, after applying the ointment, the mice partially ate melanin preparation from each other's wounds. On the 18th day of observation, the body weight gain in mice reached comparable values that did not differ between groups with 95% confidence. Thus, the data obtained indicated the absence of a negative effect of melanin ointments of different formulation on the body of mice.

Dynamics of wound healing in the experimental groups of animals (see Table 3) differed from that in the control groups. Visually, in mice of experimental group 5 treated by ointment with a fivefold increased concentration of melanin from natural chaga, the crusts on the wounds fell off on the 12th day, the wounds scarred; on the surface of scars covered along periphery with growing hair, only traces of crusts of 0.01–0.02 cm² remained. At the same time, in mice of control groups 1 and 2, as well as experimental groups 3 and 4, a similar result of wound healing was obtained only on the 21st day. It should also be noted that from the moment of wounding and for the first few days, the surface of the wounds in animals of all groups was plastered with a significant amount of fine wood chips of bedding. However, this circumstance did not negatively affect the wound healing process in experimental mice. On the 21st day of observation, visually at the site of former wounds in animals of groups 1–4, only traces of crusts ranging in size from 0.01 to 0.03 cm² were noted together with pink scars of regenerated skin, covered along the periphery with growing hair. In addition, it should be noted that in groups 3–4 there was a tendency for faster wound healing (from the

Таблица 2. Динамика показателей прироста массы тела у мышей (г)
Table 2. Dynamics of body weight gain in mice (g)

Группа Group	Сроки наблюдения, сутки / Observation time, days						Общий прирост массы тела мышей от исходной The total increase in body weight of mice as compared with baseline
	3-и / 3rd	6-е / 6th	9-е / 9th	12-е / 12th	15-е / 15th	18-е / 18th	
1 (контрольная / control) (n = 20)	1.7 ± 0.5	2.1 ± 0.6	2.2 ± 0.7	3.3 ± 1.05	2.1 ± 1.3	1.0 ± 1.7	12.4 ± 5.85
2 (контрольная / control) (n = 20)	2.6 ± 0.5	2.7 ± 0.9	0.6 ± 0.9	1.4 ± 1.03	1.3 ± 1.2	1.5 ± 1.7	10.1 ± 6.23
3 (опытная / experimental) (n = 20)	1.2 ± 0.4	3.2 ± 0.6	3.3 ± 0.6	3.3 ± 0.7	1.1 ± 0.5	0.9 ± 1.1	13.0 ± 7.32
4 (опытная / experimental) (n = 20)	1.3 ± 0.6	2.6 ± 0.5	2.7 ± 1.1	3.4 ± 1.1	1.0 ± 0.8	1.1 ± 0.8	12.1 ± 6.12
5 (опытная / experimental) (n = 20)	2.4 ± 0.5	0.7 ± 0.5	2.1 ± 0.7	2.0 ± 0.8	1.4 ± 0.9	2.1 ± 1.0	10.7 ± 4.4

П р и м е ч а н и е . Представлены средние показатели прироста массы тела у мышей с их доверительными интервалами для вероятности 95 % ($\bar{X} \pm p_{0.05}$, где $\bar{X}$ – среднее арифметическое; $p_{0.05}$ – доверительный интервал для вероятности 95 %).

N o t e . Average indicators of body weight gain in mice are shown with their confidence intervals for a 95% probability ($\bar{X} \pm p_{0.05}$, where $\bar{X}$ – the arithmetic mean; $p_{0.05}$ – a confidence interval for a 95% probability).

Таблица 3. Динамика изменения площади ран у мышей (см²)
Table 3. Dynamics of changes in the wound area in mice (cm²)

Группа Group	Сроки наблюдения, сутки / Observation time, days							
	0	3-и / 3rd	6-е / 6th	9-е / 9th	12-е / 12th	15-е / 15th	18-е / 18th	21-е / 21st
1 (контрольная / control) (n = 20)	1.61 ± 0.27	1.15 ± 0.25	0.75 ± 0.22	0.25 ± 0.08	0.25 ± 0.07	0.14 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.02 ± 0.01
2 (контрольная / control) (n = 20)	1.43 ± 0.19	1.32 ± 0.17	1.22 ± 0.2	0.94 ± 0.12	0.23 ± 0.05	0.23 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.03 ± 0.01
3 (опытная / experimental) (n = 20)	1.57 ± 0.23	1.49 ± 0.18	1.46 ± 0.27	0.64 ± 0.21	0.19 ± 0.08	0.19 ± 0.08	0.04 ± 0.04	0.01 ± 0.01
4 (опытная / experimental) (n = 20)	1.66 ± 0.18	1.95 ± 0.23	1.13 ± 0.21	0.97 ± 0.37	0.30 ± 0.14	0.30 ± 0.17	0.09 ± 0.09	0.03 ± 0.03
5 (опытная / experimental) (n = 20)	1.28 ± 0.16	0.80 ± 0.15	0.46 ± 0.15	0.17 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0	0

П р и м е ч а н и е . Представлены средние показатели площадей ран у мышей с их доверительными интервалами для вероятности 95 % ($\bar{X} \pm p_{0.05}$, где $\bar{X}$ – среднее арифметическое; $p_{0.05}$ – доверительный интервал для вероятности 95 %).

N o t e . Average indicators of the wound area in mice are shown with their confidence intervals for a 95% probability ($\bar{X} \pm p_{0.05}$, where $\bar{X}$ – is the arithmetic mean; $p_{0.05}$ – is a confidence interval for a 95% probability).

ниновую мазь с ран друг у друга. На 18-е сутки наблюдения прирост массы тела по группам у мышей достиг сопоставимых величин, не различавшихся между группами с достоверностью 95 %. Полученные данные, таким образом, свидетельствовали об отсутствии негативного влияния меланиновых мазей разных прописей на организм мышей.

Динамика заживления ран в опытных группах животных (см. табл. 3) по сравнению с контрольными группами различалась. Визуально у мышей опытной группы 5, леченных мазью с пятикратно увеличенной концентрацией меланина из природной чаги, корочки на ранах уже на 12-е сутки отпали, раны зарубцевались, на поверхности рубцов, покрытых по периферии отрастающей шерстью, остались только следы от корочек размерами 0.01–0.02 см². В то же время у мышей контрольных групп 1 и 2, а также опытных групп 3 и 4 аналогичный результат заживления ран был получен только на 21-е сутки. Следует также отметить, что с момента нанесения ран и на протяжении нескольких первых дней поверхность ран у животных всех групп была облеплена значительным количеством мелкой древесной стружки подстилки. Однако это обстоятельство не повлияло отрицательно на процесс заживления ран у подопытных мышей. На 21-е сутки наблюдения визуально на месте бывших ран у животных групп 1–4 отмечались только следы от корочек размерами от 0.01–0.03 см² на фоне розовых рубцов регенерировавшей кожи, покрытые по периферии отрастающей шерстью. Кроме этого, необходимо отметить, что в группах 3–4 была выявлена тенденция более быстрого заживления ран (начиная с 15-х суток наблюдения в группе 3, а в группе 4 – с 18-х суток) по сравнению с животными контрольной группы 2, леченных мазью Левомикон-ТФФ.

Установленная в ходе настоящей работы более высокая эффективность ранозаживления у мышей экспериментальными мазями в сравнении с Левомиконом-ТФФ продемонстрировала как противовоспалительные, так и регенеративные свойства меланина (особенно в прописи мази с пятикратным содержанием меланина), не уступающие таковым у хлорамфеникола и метилурацила, которые являются основой мази сравнения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное экспериментальное исследование позволяет сделать следующие выводы:

1. Меланины из природного сырья и глубоинной культуры чаги штамма *Inonotus obliquus*

15th day of observation in group 3, and from the 18th day in group 4) compared with animals of control group 2 treated with Levomikon-TFF ointment.

The higher efficiency of wound healing in mice with experimental ointments, in comparison with Levomikon-TFF, established in the course of this work, demonstrated both anti-inflammatory and regenerative properties of melanin (especially in the ointment formulation with a fivefold melanin content), not inferior to those of chloramphenicol and methyluracil, which are the basis of the comparison preparation.

CONCLUSION

The conducted experimental study allows us to draw the following conclusions:

1. Melanins from natural raw material and the submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus* F-1244 strain) completely suppressed the growth of gram-positive spore-forming *Bacillus cereus* bacterium in a co-culture. Melanin from natural chaga raw material, on average, suppressed the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 strain by an order of magnitude more actively. Melanin from the submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus* F-1244 strain) completely suppressed the growth of the clinical isolate of the highly pathogenic *Candida* sp. Ft-5 strain from a deceased patient with generalized candida infection, and inhibited the growth of the collection *Candida albicans* 620 yeast strain, on average, by two orders of magnitude more intensively.

2. The components of the ointment bases of the two tested formulations (melanin from natural chaga raw material and melanin obtained on the basis of the submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus* F-1244 strain), as well as an ointment containing a fivefold increased concentration of melanin from natural chaga, have no toxicity to experimental animals.

3. Ointments containing 0.4 mg of melanin from natural raw material and the submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus* F-1244 strain) in 0.2 g of a single dose of ointment had the same wound healing efficacy, while not only were not inferior in wound healing efficacy to the combined antimicrobial comparison drug Levomikon-TFF, but showed a tendency to more accelerated wound healing (on the 15th–18th day of observation) compared with the process of wound regeneration in a group of animals treated with the comparison drug.

4. A more accelerated wound healing effect was demonstrated in experimental animals (already on the 12th day of observation) treated with a fivefold

F-1244 полностью подавляли размножение грамположительной спорообразующей бактерии *Bacillus cereus* в совместной культуре. Меланин из природного сырья чаги в среднем на порядок подавлял рост золотистого стафилококка штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Меланин из глубинной культуры штамма чаги *Inonotus obliquus* F-1244 полностью подавлял рост клинического изолята высокопатогенного штамма *Candida sp.* Ft-5 от умершего больного с генерализованной кандидозной инфекцией и в среднем на два порядка ингибировал рост коллекционного штамма дрожжей *Candida albicans* 620.

2. Компоненты мазевых основ двух прописей испытанных мазей (меланин из природного сырья чаги и меланин, полученный на основе глубинной культуры штамма чаги *Inonotus obliquus* F-1244), а также мазь, содержащая пятикратно увеличенную концентрацию меланина из природной чаги, не обладают токсичностью для экспериментальных животных.

3. Мази, содержащие по 0.4 мг меланина из природного сырья чаги и ее глубинной культуры штамма *Inonotus obliquus* F-1244 в 0.2 г одноразовой дозы мази, обладали одинаковой ранозаживляющей эффективностью, при этом не только не уступали по ранозаживляющей эффективности комбинированному противомикробному препарату сравнения Левомикон-ТФФ, но продемонстрировали тенденцию более ускоренного заживления ран (на 15–18-е сутки наблюде-

increased content of melanin from natural raw material of *Inonotus obliquus* in the ointment formulation, compared with mice treated with the drug of comparison.

Thus, ointments containing melanin of the chaga *Inonotus obliquus* have anti-inflammatory, regenerative properties, and can be considered as promising drugs for topical treatment of wounds.

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

ния) по сравнению с процессом регенерации ран у группы животных, леченных указанным препаратом сравнения.

4. Продемонстрирован более ускоренный эффект заживления ран у экспериментальных животных (уже на 12-е сутки наблюдения), леченных с пятикратно увеличенным содержанием меланина из природного сырья чаги в прописи мази, по сравнению с мышами, лечеными препаратом сравнения.

Таким образом, мази, содержащие меланин чаги, обладают противовоспалительными, регенеративными свойствами и могут рассматриваться в качестве перспективных препаратов для местного лечения ран.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Теплякова Т.В., Косогова Т.А. Высшие грибы Западной Сибири – перспективные объекты для биотехнологии лекарственных препаратов. Новосибирск, 2014. 298 с.
2. Сакович В.В., Жерносеков Д.Д. Базидиомицеты как источники биологически активных веществ // Вестн. Полесск. гос. ун-та. 2018;1:3–13.
3. Саерова К.В., Мухтарова А.Р. Извлечение биологически активных компонентов из водного экстракта чаги // Молодежь и наука: шаг к успеху: сб. статей 2-й Всерос. науч. конф. перспективных разработок молодых ученых: в 3 т. Курск, 2018. С. 254–257.
4. Сушинская Н.В., Курченко В.П., Горовой Л.Ф., Сенюк О.Ф. Получение и использование в медицине меланинов из трутовых грибов // Успехи медицинской микологии. 2005;6:255–259.
5. Кукулянская Т.А., Курченко Н.В., Курченко В.П., Бабицкая В.Г. Физико-химические свойства меланинов, образуемых чагой в природных условиях и при культивировании // Прикладная биохимия и микробиология. 2002;38(1):68–72.
6. Цветкова В.А., Пугач О.А., Андреева И.С., Ставский Е.А., Теплякова Т.В. Определение антибио-

REFERENCES

1. Teplyakova T.V., Kosogova T.A. (2014). *Higher fungi of Western Siberia are Promising Objects for the Biotechnology of Drugs*. Novosibirsk. 298 p. (In Russ.)
2. Sakovich V.V., Zhernossekov D.D. Basidiomycetes as sources of biologically active substances. *Bull. of the Polesky State University*. 2018;1:3–13. (In Russ.)
3. Saerova K.V., Mukhtarova A.R. (2018). Extraction of biologically active components from an aqueous extract of chaga. In *Youth and Science: a Step Towards Success*: collection of articles of the 2nd All-Russia scientific conf. promising developments of young scientists: in 3 vol. (pp. 254–257). Kursk. (In Russ.)
4. Sushinskaya N.V., Kurchenko V.P., Gorovoy L.F., Senyuk O.F. Obtaining and using melanins from polypore fungi in medicine. *Advances in Medical Mycology*. 2005;6:255–259. (In Russ.)
5. Kukulyanskaya T.A., Kurchenko N.V., Kurchenko V.P., Babitskaya V.G. Physicochemical properties of melanins produced by the sterile form of *Innotus obliquus* ("Chagi") in natural and cultivated fungus. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2002;38(1):68–72. doi: 10.1023/A:1013204706055.

- тической активности грибов из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора // Совр. проблемы фитотерапии и травничества: материалы 5-го междунар. съезда фитотерапевтов и травников (Москва, 19–20 января 2019 г.). М.: Русские, 2019. С. 390–394.
7. Teplyakova T.V., Ilyicheva T.N., Andreeva I., Solovyanova N. The activity of components of true tinder mushroom, chaga *Inonotus obliquus* (Fr.) Pil. against viruses, bacteria and fungi // 10th International Medicinal Mushroom Conference: abstract (September 19–22, 2019, Nantong, China). P. 11.
8. Противовирусное средство на основе меланина: Патент RU 2 480 227 C2 / Т.В. Теплякова, Л.И. Пучкова, Т.А. Косогова и др.; ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Оpubл. 27.04.2013. Бюл. № 12. 11 с.
9. Ильичева Т.Н., Ананько Г.Г., Косогова Т.А. и др. Противовирусная активность меланина из чаги (*Inonotus obliquus*), полученного на основе культивирования штамма F-1244, выделенного в чистую культуру // Химия растительного сырья. 2020;2:283–289. doi: 10.14258/jcprm.2020025167.
10. Штамм базидиального гриба *Inonotus obliquus* – продуцент пигмента меланина, обладающего противовирусной и противоопухолевой активностью. Патент RU 2 716 590 C1 / Т.В. Теплякова, Т.А. Косогова, Т.Н. Ильичева и др.; ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Оpubл. 12.03.2020. Бюл. № 8. 13 с.
11. Teplyakova T.V., Ilyicheva T.N., Kosogova T.A., Wasser S.P. Medicinal mushrooms against influenza viruses // Int. J. Med. Mushrooms. 2021;23(2):1–11. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.2020037460.
12. Ингибитор репликации коронавируса SARS-CoV-2 на основе водного экстракта гриба *Inonotus obliquus*: Патент RU 2 741 714 C1 / Т.В. Теплякова, О.В. Пьянков, М.О. Скарнович и др.; ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Оpubл. 28.01.2021. Бюл. № 4. 12 с.
13. Радаева И.Ф., Костина Г.А. Гиалуроновая кислота: очистка, свойства, применение // Биотехнология. 1996;5:44–47.
14. Гончар А.М., Коган А.С., Салганик Р.И. Раневый процесс и иммобилизованные протеолитические ферменты. Новосибирск, 1986. 118 с.
15. Сандахчиев Л.С., Ставский Е.А., Зиновьев В.В. и др. Оценка воздействия мази, содержащей коллагеназу камчатского краба, на инфицированную рану в эксперименте // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. 1997;124(10):421–424.
16. Сандахчиев Л.С., Ставский Е.А., Зиновьев В.В. и др. Экспериментальное изучение лечебных свойств и токсичности мази, содержащей коллагеназу камчатского краба // Вестн. РАМН. 1998;4:50–55.
17. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности): Санитарные правила. СП 1.3.3118-13. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2013. 145 с.
18. Вязовая Е.А., Ананько Г.Г., Теплякова Т.В. Оценка солнцезащитного потенциала грибного меланина, полученного из чаги (*Inonotus obliquus*) // Успехи медицинской микологии. 2018;19:265–272.
6. Tsvetkova V.A., Pugach O.A., Andreeva I.S., Stavsky E.A., Teplyakova T.V. (2019). Determination of antibiotic activity of fungi from the collection of the Vector Research Center. In *Modern Problems of Phytotherapy and Herbalism: materials of the 5th Int. Congress of Phytotherapists and Herbalists* (Moscow, January 19–20, 2019) (pp. 390–394). Moscow. (In Russ.)
7. Teplyakova T.V., Ilyicheva T.N., Andreeva I., Solovyanova N. (2019). The activity of components of true tinder mushroom, chaga *Inonotus obliquus* (Fr.) Pil. against viruses, bacteria and fungi. In 10th International Medicinal Mushroom Conference: abstract (September 19–22, 2019, Nantong, China (p. 11)).
8. Teplyakova T.V., Puchkova L.I., Kosogov T.A. et al. Melanin-based antiviral agent: Patent RU 2 480 227 C2. State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector.” Publ. 04/27/2013. Bull. No. 12. 11 p.
9. Ilyicheva T.N., Ananko G.G., Kosogova T.A. et al. Antiviral activity of the melanin from birch fungus (*Inonotus obliquus*), obtained by cultivating F-1244 strain, isolating to pure culture. *Chemistry of Plant Raw Materials*. 2020;2:283–289. doi: 10.14258/jcprm.2020025167. (In Russ.)
10. Teplyakova T.V., Kosogova T.A., Ilyichev T.N. et al. The strain of the basidiomycete *Inonotus obliquus* is a producer of the melanin pigment, which has antiviral and antitumor activity. Patent RU 2 716 590 C1. State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector.” Publ. 03/12/2020. Bull. No. 8. 13 p.
11. Teplyakova T.V., Ilyicheva T.N., Kosogova T.A., Wasser S.P. Medicinal mushrooms against influenza viruses. *Int. J. Med. Mushrooms*. 2021;23(2):1–11. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.2020037460.
12. Teplyakova T.V., Pyankov O.V., Skarnovich M.O. et al. SARS-CoV-2 coronavirus replication inhibitor based on an aqueous extract of fungus *Inonotus obliquus*: Patent RU 2 741 714 C1. State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector.” Publ. 01/28/2021. Bull. No. 4. 12 p.
13. Radaeva I.F., Kostina G.A. Hyaluronic acid: purification, properties, application. *Biotechnology*. 1996;5:44–47. (In Russ.)
14. Gonchar A.M., Kogan A.S., Salganik R.I. (1986). *Wound Process and Immobilized Proteolytic Enzymes*. Novosibirsk. 118 p.
15. Sandakhchiev L.S., Stavsky E.A., Zinoviev V.V. Evaluation of the impact of an ointment containing red king crab collagenase on an infected wound in the experiment. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1997;124(10):421–424. (In Russ.)
16. Sandakhchiev L.S., Stavsky E.A., Zinoviev V.V. Experimental study of therapeutic properties and toxicity of an ointment containing red king crab collagenase. *Annals of Russ. Academy of Medical Sciences*. 1998;4:50–55. (In Russ.)
17. *Safety of Work with Microorganisms of I–II Groups of Pathogenicity (Danger): Sanitary Rules. SP 1.3.3118-13* (2013). Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation. 145 p. (In Russ.)
18. Vyazovaya E.A., Ananko G.G., Teplyakova T.V. Evaluation of the sun protection potential of fungal melanin obtained from chaga (*Inonotus obliquus*). *Advances in Medical Mycology*. 2018;19:265–272. (In Russ.)

19. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России. М.: Видаль Рус, 2019, 1200 с.
20. Савченко Ю.П., Федосова С.Р. Методы определения размеров раневой поверхности // Вестн. хирургии им. И.И. Грекова. 2007;166(1):102–105.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ставский Евгений Александрович – д-р мед. наук, доцент, заведующий кафедрой нормальной физиологии и основ безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия.

Теплякова Тамара Владимировна – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией микологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, пос. Кольцово, Россия.

Андреева Ирина Сергеевна – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, пос. Кольцово, Россия.

Давыдова Екатерина Сергеевна – студентка 6-го курса ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия.

Ставская Анастасия Александровна – студентка 4-го курса ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия.

Потешкина Алевтина Леонидовна – старший лаборант лаборатории микологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, пос. Кольцово, Россия.

19. *The Vidal Handbook. Medicines in Russia* (2019). Moscow: Vidal Rus. 1200 p. (In Russ.)
20. Savchenko Yu.P., Fedosova S.R. Methods for determination of sizes of the wound surface. *Grekov's Bulletin of Surgery*. 2007;166(1):102–105. (In Russ.)

ABOUT THE AUTHORS

Evgeniy A. Stavsky – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Department of Normal Physiology and Fundamentals of Life Safety, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia.

Tamara V. Teplyakova – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head, Laboratory of Mycology, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Novosibirsk Region, Koltsovo village, Russia.

Irina S. Andreeva – Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Department of Biophysics and Ecological Research, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Novosibirsk Region, Koltsovo village, Russia.

Ekaterina S. Davydova – 6th-year Student, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia.

Anastasia A. Stavskaya – 4th-year Student, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia.

Alevtina L. Poteshkina – Senior Laboratory Assistant, Laboratory of Mycology, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Novosibirsk Region, Koltsovo village, Russia.