

А.Н. Потехина*, П.Г. Алексюк, И.А. Зайцева, Н.С. Соколова, Э.С. Омиртаева,
М.С. Алексюк, А.П. Богоявленский, А.С. Кензина, В.Э. Березин

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан

*Автор для корреспонденции: virprot@mail.ru

Способность экстрактов некоторых съедобных грибов подавлять репродукцию вируса гриппа

В статье описаны способы получения экстрактов из мицелия некоторых ксилитных грибов: *Pleurotus eryngii*, *Auricularia auricula-judae*, *Tremella fuciformis*, дана оценка токсичности полученных экстрактов, а также исследована их противовирусная активность. Вирус гриппа выращивали в аллантоисной полости куриных эмбрионов. Инфекционный титр вируса гриппа определяли титрованием на куриных эмбрионах, наличие вируса — по реакции гемагглютинирующей активности. Гемагглютинирующая активность вирусов выявлялась исходя из стандартной методики с применением 0,75 % взвеси куриных эритроцитов. Титр инфекционности вируса рассчитывался с использованием методики Рида и Менча. Главным показателем при исследовании специфического противовирусного эффекта соединений являлся показатель ТИ (терапевтический индекс), определяемый отношением среднетоксичной концентрации вещества (ТК₅₀) к среднеэффективной вирусингибирующей концентрации (ЭК₅₀). Противовирусная активность полученных экстрактов была изучена на модели вирусов гриппа человека, животных и птиц, в интервале доз от 0,025 мкг/мл до 1,25 мкг/мл с использованием методических приёмов «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств». При исследовании 3-х полученных экстрактов ксилитных грибов на острую токсичность было установлено, что все исследуемые соединения грибов, при однократном внутрижелудочном введении белым беспородным мышам, не проявляли токсического действия в исследуемом интервале доз. При проведении исследования по способности подавления репродукции различных штаммов вируса гриппа было выявлено, что экстракты грибов *Auricularia auricula-judae* и *Tremella fuciformis* обладают выраженными противовирусными свойствами и превосходят по показателю химико-терапевтического индекса коммерческие противогриппозные препараты.

Ключевые слова: *Pleurotus eryngii*, *Auricularia auricula-judae*, *Tremella fuciformis*, мицелий, экстракция, противовирусная активность, вирус гриппа, токсичность.

Введение

Вирус гриппа является самым известным и широко распространенным возбудителем заболеваний из сотни вирусов, поражающих верхние дыхательные пути. Эпидемии гриппа носят сезонный характер, способны поражать до 20 % жителей и уносить 25 000–50 000 человеческих жизней в год [1]. Вирус гриппа А способен образовывать точечные мутации в двух поверхностных гликопротеинах (гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА)), в связи с этим он обретает способность обходить защитные механизмы иммунной системы человеческого организма [2].

Перед инфекционистами и фармакологами стоит задача — обеспечить контроль над инфекцией вируса, которую можно решить посредством применения вакцин и противовирусных препаратов. Кроме высокой результативности и хорошей переносимости, новые противовирусные препараты должны иметь широкий спектр действия, действовать на лекарственно-устойчивые штаммы.

Ввиду недостаточной эффективности существующих противовирусных лекарственных средств, а также их возможной токсичности ученые-вирусологи всего мира вынуждены проводить исследования для поиска новых, более перспективных препаратов. Важное значение имеет не только аспект поиска принципиально новых механизмов действия соединений, но и источник их происхождения. Одним из актуальных направлений исследований в последнее время является создание довольно перспективных лекарственных средств, полученных на основе биологически активных соединений растительного или микробного происхождения [3–5].

Несмотря на многочисленные исследования в направлении создания безопасных и эффективных противовирусных препаратов, в терапии гриппозной инфекции применяются лишь отдельные препараты, такие как Тамифлю, Ремантадин, Рибавирин, Ксофлюза, Азидотимидин [6–8]. Одной из сложнейших целей является поиск антивирусных препаратов, способных блокировать вирус гриппа, не

повреждая структуру клетки организма-хозяина. По этой причине результаты многолетних поисков противовирусных веществ оказались весьма скудными, остались на уровне открытия лишь единичных химиопрепаратов, имеющих узкий спектр действия. Мало изучены механизмы взаимодействия антивирусных препаратов с мишенями клетки-хозяина, связь между антивирусной активностью и структурными параметрами лекарств.

Лекарственные свойства высших грибов известны с древних времен. К завершению XX столетия был накоплен опыт, показывающий, что грибы, ввиду биохимических особенностей, являются одними из основных продуцентов в биотехнологии, способны стать заменой бактериям и растительным объектам [9, 10], в том числе как источники сырья для создания препаратов, имеющих ранозаживляющий, иммуномодулирующий, противовирусный и антираковый эффект [11–14].

Цель нашего исследования — изучить противовирусную активность некоторых ксиллофитных съедобных грибов.

Материалы и методы

Вирус гриппа. В экспериментальных исследованиях был использован эпидемически значимый штамм вируса гриппа человека А/Алматы/8/98 (H3N2), вирус гриппа человека (пандемический вариант, устойчивый к тамифлю) А/Владивосток/2/09 (H1N1), вирус гриппа птиц, А/FPV/36/1 (H7N1).

В работе рассматривались экстракты некоторых съедобных грибов (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Представители некоторых порядков базидиальных грибов, задействованных в эксперименте

Порядок	Семейство	Вид	Название	Краткое обозначение
Агарикоидные базидиомицеты (<i>Agaricales s. lato</i>)	<i>Agaricaceae</i>	<i>Pleurotus eryngii</i>	Вешенка степная (белый степной гриб)	РЕ
Аурикуляриевые базидиомицеты (<i>Auriculariales</i>)	<i>Auriculariaceae</i>	<i>Auricularia auricula-judae</i>	Свиное, или иудово, ухо	АА
Тремеллоидные базидиомицеты (<i>Tremellales s. lato</i>).	<i>Tremellaceae</i>	<i>Tremella fuciformis</i>	Серебряное ухо	ТФ

Культивирование вируса осуществляли на модели куриных эмбрионов в течение 24–48 ч при 37 °С. Для экспериментов использовали аллантоисный вирус в дозе 10⁸–10⁹ ЭИД₅₀/мл. Инфекционный титр вируса гриппа определяли методом предельных разведений по методу Рида и Менча [15]. Наличие вирусов определяли гемагглютинирующим способом при использовании эритроцитов курицы или морской свинки [15].

Мицелий грибов после отмычки среды подвергали спиртовой экстракции с последующим лиофильным обезвоживанием.

Токсичность и специфическая противовирусная активность исследуемых экстрактов была изучена согласно методическим указаниям «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [16] с расчётом химико-терапевтического индекса (ХТИ), выявляемого отношением среднетоксичной концентрации вещества (ТК₅₀) к среднеэффективной вирусингибирующей концентрации (ЭК₅₀).

Острая токсичность определялась с использованием методики «доза–эффект», после внутрижелудочного введения готовых экстрактов, аутбредным лабораторным мышам, в разных вариантах дозировок. Учёт результатов проводился согласно Методическим рекомендациям [16–18].

Вирусингибирующие свойства анализируемых препаратов изучали методом построения кривых «доза–активность» [18].

Статистическая обработка была проведена с использованием пакета программ «Microsoft Office». Для табличного и графического изображений полученных результатов использовалась программа Microsoft Office Excel.

Результаты и их обсуждение

Острую токсичность 3-х полученных экстрактов грибов изучали на модели белых беспородных мышей. Отобранные препараты вводили внутривентриально с помощью специализированного металлического атравматического зонда в максимально допустимом объеме для мышей весом 18–20 г (0,5 мл). Мышам в контрольной группе вводили фосфатный буфер в аналогичном объеме. Доза для всех препаратов составляла 1, 3, 5 мг.

Наблюдение за животными осуществляли в течение 2-х недель. При вскрытии мышей патологических изменений в органах и тканях, вызванных воздействием исследуемых препаратов, не обнаружено. Установлено, что все исследуемые соединения при однократном внутривентриальном введении не проявляли токсического действия в исследуемом интервале доз.

Согласно «Согласованной на глобальном уровне системе классификации опасности и маркировки химической продукции» (СГС) (IV пересм. изд., ООН, 2011 г.), исследуемые противовирусные препараты можно отнести к V классу — «Малотоксичные препараты».

Таким образом, при выявлении острой токсичности на модели белых беспородных мышей показано, что полученные экстракты грибов не проявляли острой токсичности при однократном внутривентриальном введении в дозе до 5 мг.

Изучение противовирусной активности полученных на модели вирусов гриппа человека животных и птиц проводили в интервале доз от 0,025 мкг/мл до 1,25 мкг/мл согласно методическим приемам «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [18].

На рисунке представлены результаты способности исследуемых экстрактов грибов подавлять репродукцию вирусов. Показано, что все исследуемые экстракты съедобных грибов способны в заданном интервале доз полностью блокировать воспроизводство вируса гриппа независимо от его антигенной структуры. При этом максимальной активностью обладали экстракты *Auricularia auricula-judae* и *Tremella fuciformis*.

Сравнительное изучение противовирусного действия 2-х отобранных экстрактов в сопоставлении с противовирусной активностью коммерческих противогриппозных синтетических препаратов — Осельтамивир (Тамифлю) и Ремантадин при испытании на различных штаммах вируса гриппа представлено в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

Сравнительная оценка ХТИ грибных экстрактов и коммерческих препаратов с противовирусной активностью

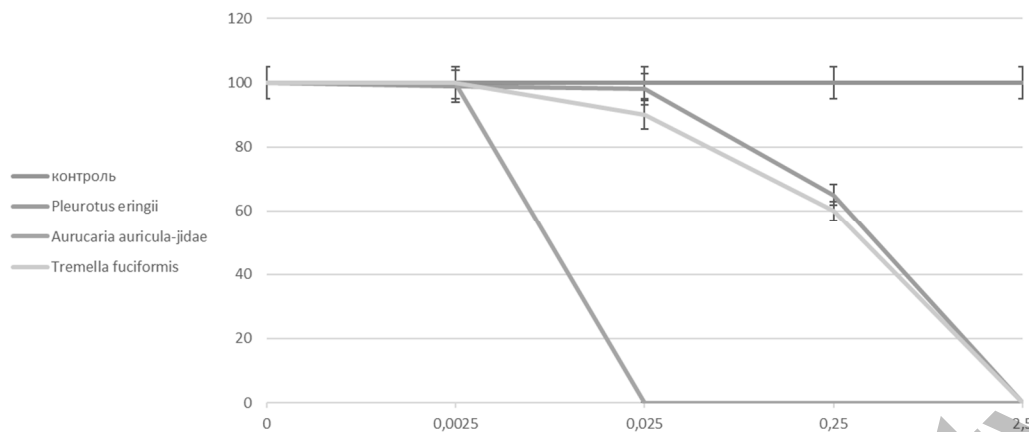
Штамм вируса гриппа	Осельтамивир	Ремантадин	<i>Auricularia auricula-judae</i>	<i>Tremella fuciformis</i>
А/Владивосток/2/09 (H1N1)	10,3	11,0	>100	>100
А/Алматы/8/98 (H3N2)	29,9	30,1	>100	>100
А/FPV/36/1 (H7N1)	15,3	15,2	>100	>100

В результате сравнительного изучения показателей ХТИ установлено, что исследуемые экстракты грибов превосходят по показателю ХТИ коммерческие противогриппозные препараты при тестировании на различных штаммах вируса.

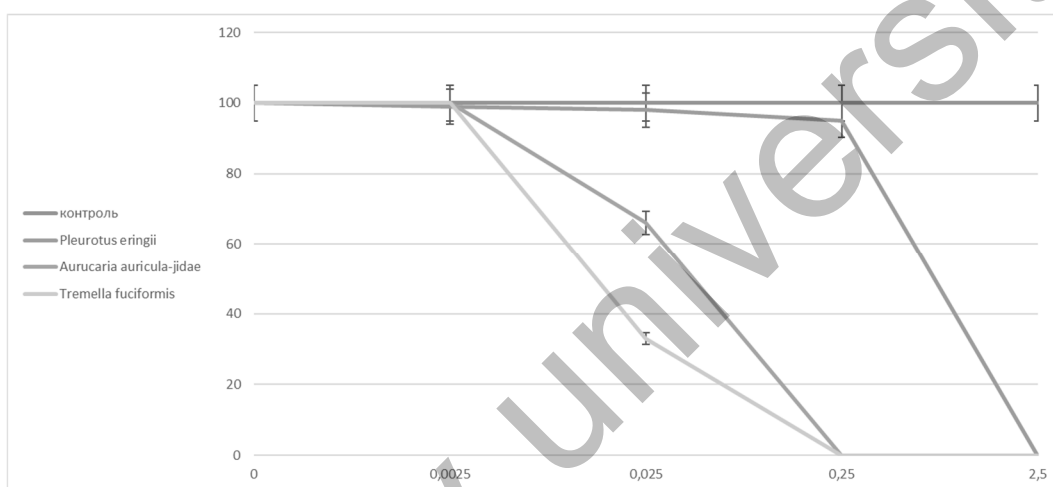
Заключение

Поиск соединений растительного происхождения, способных подавлять репродукцию вирусов, остается весьма перспективным направлением научных исследований. Это можно объяснить рядом причин, главными из которых являются доступность сырья и низкая токсичность. В наших исследованиях изучена возможность применения экстрактов некоторых съедобных грибов подавлять репродукцию вирусов гриппа.

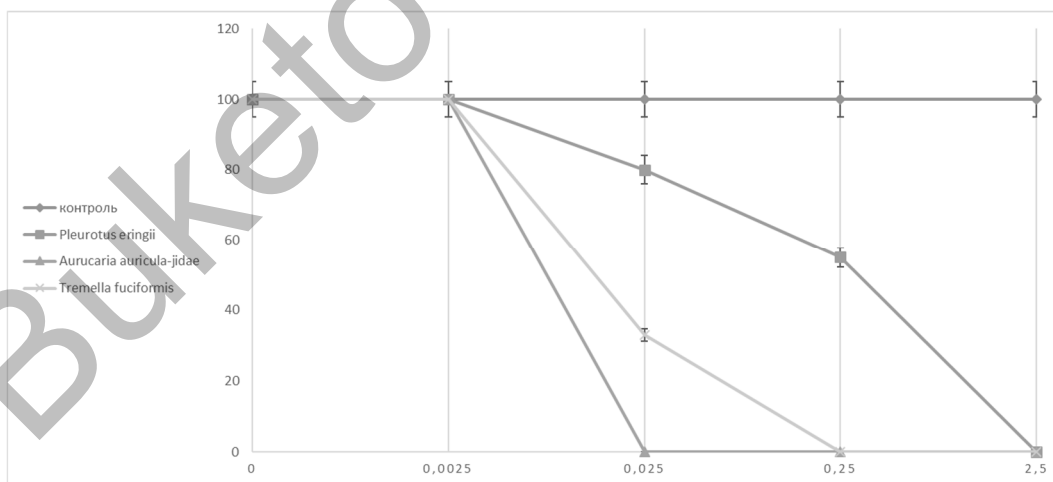
Показано, что экстракты грибов *Auricularia auricula-judae* и *Tremella fuciformis* обладают выраженными противовирусными свойствами, сопоставимыми с коммерческими препаратами.



Вирус гриппа А/Алматы/8/98 (H3N2)



Вирус гриппа А/FPV/36/1 (H7N1)



Вирус гриппа А/Владивосток/2/09 (H1N1)

По оси ординат — подавление репродукции в %, по оси абсцисс — доза препарата, мкг/мл

Рисунок. Изучение дозозависимого эффекта вирусингибирующей активности исследуемых препаратов на модели вируса гриппа человека (пандемический вариант, устойчивый к Тамифлю)

Работа выполнена в рамках проекта грантового проекта Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан № AP08855630.

Список литературы

- 1 World Health Organization (WHO), World Health Statistics 2018. Электронный ресурс. URL: http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS2018_TOC.pdf (дата обращения: 10.11.2020).
- 2 Influenza Antiviral Drug Resistance. Centers for Disease Control and Prevention. Электронный ресурс. URL: <https://www.cdc.gov/flu/about/qa/antiviralresistance.htm> (дата обращения: 10.11.2020).
- 3 Teplyakova T.V. Antiviral activity of polyporoid mushrooms (higher basidiomycetes) from Altai mountains (Russia) / T.V. Teplyakova, N.V. Psurtseva, T.A. Kosogova, N.A. Mazurkova, V.A. Khanin, V.A. Vlasenko // Int. J. for Med. Mushrooms. — 2012. — Vol. 14 (1). — P. 37–45. <https://doi.org/10.1615/intjmedmushr.v14.i1.40>
- 4 Sanghai Vaijwade D.N. Screening of antiviral compounds from plants — a review / D.N. Sanghai Vaijwade, S.R. Kulkarni, N.N. Sanghai // Journal of Pharmacy Research. — 2014. — Vol. 8(8). — P. 1050–1058. <http://jprsolutions.info>
- 5 Lin L.T. Antiviral Natural Products and Herbal Medicines / L.T. Lin, W.Ch. Hsu, Ch. Ch. Lin // J Tradit Complement Med. — 2014. — Vol. 4, No. 1. — P. 24–35. <https://doi.org/10.4103/2225-4110.124335>
- 6 Magano J. Synthetic approaches to the neuraminidase inhibitors zanamivir (Relenza) and oseltamivir phosphate (Tamiflu) for the treatment of influenza / J. Magano // Chemical Reviews. — 2009. — Vol. 109, No. 9. — P. 4398–4438. <https://doi.org/10.1021/cr800449m>
- 7 Pagadala N.S. AZT acts as an anti-influenza nucleotide triphosphate targeting the catalytic site of A/PR/8/34/H1N1 RNA dependent RNA polymerase / N.S. Pagadala // J Comput Aided Mol Des. — 2019. — Vol. 33, No. 4. — P. 387–404. <https://doi.org/10.1007/s10822-019-00189-w>
- 8 Noshi T. *In vitro* characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit / T. Noshi, M. Kitano, K. Taniguchi, A. Yamamoto, Sh. Omoto, K. Baba, T. Hashimoto, K. Ishida, Y. Kushima, K. Hattori, M. Kawai, R. Yoshida, M. Kobayashi, T. Yoshinaga, A. Sato, M. Okamoto, Y. Sakoda, H. Kida, T. Shishido, A. Naito // Antiviral Res. — 2018. — Vol. 160. — P. 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.10.008>
- 9 Lindequist U. The Pharmacological Potential of Mushrooms / U. Lindequist, T.H.J. Niedermeyer, W.D. Jülich // Evid Based Complement Alternat Med. — 2005. — Vol. 2, No. 3. — P. 285–299. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh107>
- 10 Кароматов И.Д. Грибы — лечебные свойства (обзор литературы) / И.Д. Кароматов, Ш.К. Такаева // Биология и интегративная медицина. — 2019. — № 11 (39). — С. 72–131.
- 11 Quang D.N. Inedible mushrooms: a good source of biologically active substances / D.N. Quang, T. Hashimoto, Y. Asakawa // Chem Rec. — 2006. — Vol. 6, No. 2. — P. 79–99. <https://doi.org/10.1002/tcr.20074>
- 12 Chunchao H. A Hypothesis: Supplementation with Mushroom-Derived Active Compound Modulates Immunity and Increases Survival in Response to Influenza Virus (H1N1) Infection / H. Chunchao, J. Guo // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. — 2010. — Vol. 2011. Article ID 252501, 3 pages. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/neq037>
- 13 Wasser S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides / S.P. Wasser // Appl Microbiol Biotechnol. — 2002. — Vol. 60. — P. 258–274. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-002-1076-7>
- 14 Ivanova T.S. Anticancer Substances of Mushroom Origin / T.S. Ivanova, T.A. Krupodorova, V.Y. Barshteyn, A.B. Artamonova, V.A. Shlyakhovenko // Experimental Oncology. — 2014. — Vol. 36. — P. 58–66. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24980757/>
- 15 Balammal G. Analysis of herbal medicines by modern chromatographic techniques / G. Balammal, M. Sekar Babu, P. Jayachandra Reddy // International Journal of Preclinical and Pharmaceutical Research. — 2012. — Vol. 3, No. 1. — P. 50–63.
- 16 Aminoff D. Method for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids / D. Aminoff // Biochem. Journal. — 1961. — Vol. 81. — P. 384–392.
- 17 Klimov A. Influenza virus titration, antigenic characterization, and serological methods for antibody detection / A. Klimov, A. Balish, V. Veguilla, H. Sun, J. Schiffer, X. Lu, J.M. Katz, K. Hancock // Influenza Virus. — 2012. — Vol. 865. — P. 25–51. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-621-0_3
- 18 Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А.Н. Миронов. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.

А.Н. Потехина, П.Г. Алексюк, И.А. Зайцева, Н.С., Соколова, Э.С. Омиртаева,
М.С. Алексюк, А.П. Богоявленский, А.С. Кензина, В.Э. Березин

Кейбір жеуге жарамды саңырауқұлақтардың тұмау вирусының репродукциясын басу қабілеті

Мақалада *Pleurotus eryngii*, *Auricularia auricula-judae*, *Tremella fuciformis* сияқты кейбір ксилофитті саңырауқұлақтардың мицелийлерінен сығындылар алынды, алынған сығындылардың уыттылығы бағаланды, сонымен қатар вирусқа қарсы белсенділік қасиеті зерттелген. Тұмау вирусы тауық эмбриондарының аллантоид қуысында өсірілді. Тұмау вирусының инфекциялық титрі тауық эмбриондарында титрлеу арқылы анықталды. Вирустың бар болуы гемагглютинациялық белсенділік реакциясы арқылы бағаланды. Вирустың инфекциялық титрі Рид және Менч әдісімен есептелді.

Вирустардың гемагглютинациялық белсенділігі тауық эритроциттерінің 0,75 % суспензиясын қолдана отырып, стандартты әдіс бойынша зерттелген. Қосылыстардың вирусқақарсы ерекше әсерін зерделеу кезінде негізгі критерий заттың орташа уытты концентрациясының (TK₅₀) орташа тиімді вирусингибирлеуші концентрациясына (ЭК₅₀) қатынасымен айқындалатын ТИ (терапиялық индекс) көрсеткіші болды. Алынған сығындылардың вирусқақарсы белсенділігі «Дәрілік заттардың клиника алды зерттеулерін жүргізу жөніндегі нұсқаулықтың» әдістемелік ұсынымдарын пайдалана отырып, 0,025 мкг/мл-ден 1,25 мкг/мл-ге дейінгі дозалар аралығында адамдар, жануарлар мен құстардың тұмауы вирусының моделінде зерттелді. Алынған 3 саңырауқұлақ сығындысының өткір уыттылығын зерттеу кезінде барлық зерттелген саңырауқұлақтар қосылыстары ақ тұқымсыз тышқандарға бір рет интрагастралық енгізу кезінде зерттелетін дозалар аралығында уытты әсер көрсетпегені анықталды. Тұмау вирусының әртүрлі штамдарының көбеюін басу қабілеті бойынша зерттеу жүргізу кезінде *Auricularia auricula-judae* және *Tremella fuciformis* саңырауқұлақтарының сығындылары айқын вирусқақарсы қасиеттерге ие екендігі және химиялық-терапиялық индекс көрсеткіші бойынша тұмауғақарсы коммерциялық препараттардан асып түсетіні белгілі болды.

Кілт сөздер: *Pleurotus eryngii*, *Auricularia auricula-judae*, *Tremella fuciformis*, мицелий, экстракция, вирусқақарсы белсенділік, тұмау вирусы, уыттылық.

A.N. Potekhina, P.G. Aleksyuk, I.A. Zajceva, N.S. Sokolov, E.S. Omirtayeva,
M.S. Aleksyuk, A.P. Bogoyavlenskij, A.S. Kenzina, V.E. Berezin

The ability of extracts of some edible fungi to suppress the reproduction of influenza virus

In this work, extracts from the mycelium of some xylophytic fungi: *Pleurotus eryngii*, *Auricularia auricula-judae*, *Tremella fuciformis* were obtained, the toxicity of the obtained extracts was evaluated, and the antiviral activity was researched. The influenza virus was grown in the allantois cavity of chicken embryos. The infectious titer of the influenza virus was determined by titration on chicken embryos. The presence of the virus was judged by the reaction of hemagglutinating activity. The virus infectivity titer was calculated using the Reed-Muench method. The hemagglutinating activity of viruses was determined by a standard method using 0.75 % suspension of chicken red blood cells. The main criterion for studying the specific antiviral effect of compounds was the CTI (chemical-therapeutic index), that is determined by the ratio of the average toxic concentration of the substance (TC₅₀) to the average effective viral inhibitory concentration (EC₅₀). The antiviral activity of the obtained extracts was studied on a model of human, animal and bird influenza viruses, in the dose range from 0.025 mcg/ml to 1.25 mcg/ml using the methodological recommendations of the “Guidelines for conducting Preclinical studies of medicines”. While studying the acute toxicity of 3 obtained fungi extracts, it was found that all studied fungi compounds with a single intragastric injection to white mongrel mice, did not show a toxic effect in the studied dose range. During the study of the ability to suppress the reproduction of various strains of the influenza virus, it was found that extracts of the fungi *Auricularia auricula-judae* and *Tremella fuciformis* have possessed antiviral properties, and extracts exceed in terms of CTI to commercial anti-influenza drugs.

Keywords: *Pleurotus eryngii*, *Auricularia auricula-judae*, *Tremella fuciformis*, mycelium, extraction, antiviral activity, influenza virus, toxicity.

References

- 1 World Health Organization (WHO), World Health Statistics (2018). Retrieved from: http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS2018_TOC.pdf.
- 2 Influenza Antiviral Drug Resistance. Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved from: <https://www.cdc.gov/flu/about/qa/antiviralresistance.htm>
- 3 Teplyakova, T.V., Psurtseva, N.V., Kosogova, T.A., Mazurkova, N.A., Khanin, V.A., & Vlasenko, V.A. (2012). Antiviral activity of polyporoid mushrooms (higher basidiomycetes) from Altai Mountains (Russia). *Int. J. for Med. Mushrooms*, 14(1), 37–45. <https://doi.org/10.1615/intjmedmushr.v14.i1.40>
- 4 Sanghai Vajjwade, D.N., Kulkarni, S.R., & Sanghai, N.N. (2014). Screening of antiviral compounds from plants — a review. *Journal of Pharmacy Research*, 8 (8); 1050–1058. <http://jprsolutions.info>
- 5 Lin, L.T., Hsu, W.Ch., & Lin, Ch.Ch. (2014). Antiviral Natural Products and Herbal Medicines. *J Tradit Complement Med.*, 4, 1, 24–35. <https://doi.org/10.4103/2225-4110.124335>
- 6 Magano, J. (2009). Synthetic approaches to the neuraminidase inhibitors zanamivir (Relenza) and oseltamivir phosphate (Tamiflu) for the treatment of influenza. *Chemical Reviews*, 109, 9, 4398–4438. <https://doi.org/10.1021/cr800449m>
- 7 Pagadala, N.S. (2019). AZT acts as an anti-influenza nucleotide triphosphate targeting the catalytic site of A/PR/8/34/H1N1 RNA dependent RNA polymerase. *J Comput Aided Mol Des.*, 33, 4, 387–404. <https://doi.org/10.1007/s10822-019-00189-w>

- 8 Noshi, T., Kitano, M., Taniguchi, K., Yamamoto, A., Omoto, Sh., & Baba, K., et al. (2018). *In vitro* characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit. *Antiviral Res.*, 160, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.10.008>
- 9 Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J., & Jülich, W.D. (2005). The Pharmacological Potential of Mushrooms. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2, 3, 285–299. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh107>
- 10 Karomatov, I.D., & Takayeva, Sh.K. (2019). Griby — lechebnye svoistva (obzor literatury) [Mushrooms — medicinal properties]. *Biologiya i integrativnaya meditsina — Biology and integrative medicine*, 11 (39), 72–131 [in Russian].
- 11 Quang, D.N., Hashimoto, T., & Asakawa, Y. (2006). Inedible mushrooms: a good source of biologically active substances. *Chem Rec.*, 6, 2, 79–99. <https://doi.org/10.1002/tcr.20074>
- 12 Chunchao, H., & Guo, J. (2010). A Hypothesis: Supplementation with Mushroom-Derived Active Compound Modulates Immunity and Increases Survival in Response to Influenza Virus (H1N1) Infection. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, Article ID 252501, 3. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/neh037>
- 13 Wasser, S.P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 60, 258–274. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-002-1076-7>
- 14 Ivanova, T.S., Krupodorova, T.A., Barshteyn, V.Y., Artamonova, A.B., & Shlyakhovenko, V.A. (2014). Anticancer Substances of Mushroom Origin. *Experimental Oncology*, 36, 58–66. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24980757/>
- 15 Balammal, G., Sekar Babu, M., & Jayachandra Reddy, P. (2012). Analysis of herbal medicines by modern chromatographic techniques. *International Journal of Preclinical and Pharmaceutical Research*, 3, 1, 50–63.
- 16 Aminoff, D. (1961). Method for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem. Journal*, 81, 384–392.
- 17 Klimov, A., Balish, A., Veguilla, V., Sun, H., Schiffer, J., Lu, X., Katz, J.M., & Hancock, K. (2012). Influenza virus titration, antigenic characterization, and serological methods for antibody detection. *Influenza Virus*, 865, 25–51. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-621-0_3
- 18 Mironov, A.N. (2012). *Rukovodstvo po provedeniiu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast pervaya [Guidelines for preclinical drug research. Part One]*. Moscow: Grif & Co [in Russian].