Journal of Stress Physiology & Biochemistry, Vol. 12, No. 4, 2016, pp. 62-71 ISSN 1997-0838
Original Text Copyright © 2016 by Borovskaya, Gornostay and Borovskii

OPEN ACCESS

ORIGINAL ARTICLE

Antioxidant and Cytotoxic Activity of Water Ethanol Extracts from the Mycelium of *Inonotus rheades* (Pers.) Bondartsev & Singer

Borovskaya M.K.[2], Gornostay T.G.[1,2], Borovskii G.B.[1]*

[1] *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of RAS, ul. Lermontova, 132, 664033, Irkutsk, Russia*

[2] *The Irkutsk Scientific Center of SB RAS, Siberian Branch of RAS, ul. Lermontova, 134, 664033, Irkutsk, Russia*

*E-Mail: ***borovskii@sifibr.irk.ru***

Received October 26, 2016

The important problem of current research is the search for bioactive natural compounds. We have previously demonstrated high in vitro antiradical activity of water ethanol extracts (WEE) from the mycelium species of the genus *Inonotus rheades*. In the present study we evaluated the effect of 30% and 70% of WEE from mycelium *I. rheades* on the cell culture of human tumor cells HEp-2.

50% cell death is achieved after incubation in 53 mkg/ml 70% WEE (dry weight), whereas 30% WEE at 550 mkg/ml only, i.e. an order of magnitude difference between the concentrations, which indicates that high cytotoxic activity was shown WEE a radical change in the qualitative composition of extractives with increasing ethanol concentration. Incubation of cells with 250 mM H_2O_2 resulted in approximately 40% cell death, whereas pre-incubation with both 30% and 70% of WEE resulted in 100% survival of cells in a large range of concentrations. This is indicate a WEE protective effect under oxidative stress. In the case of simultaneous incubation of the cells with 30% and 70% WEE and H_2O_2 the effect was different with described earlier. Complete cell survival was not achieved at all concentrations of the extract of mushroom. However, significant dilution of WEE leads to significantly protective antioxidant effect on HEp-2.

Thus, water ethanol extracts of the mycelium *I. rheades* in high concentrations exhibit cytotoxic activity. At the same time, a wide range of concentrations extracts can neutralize the oxidative stress and cell death caused by the addition of hydrogen peroxide when making extracts to oxidative influences.

Key words: antioxidant activity, cytotoxic activity, Inonotus rheades, mycelium

В настоящее время постоянно ведется поиск новых природных соединений, способных проявлять антиоксидантную, противоопухолевую и другие, представляющие интерес, активности. Основной задачей антиоксиданта является перехват свободных радикалов, возникающих в результате многих процессов в клетке и способных атаковать жизненно важные молекулы. Достаточно часто организм не способен самостоятельно эффективно снижать содержание активных форм кислорода (АФК) к допустимому уровню, что ведет к развитию патологии. В этих случаях природные антиоксиданты являются наиболее перспективными соединениями для воздействия на организм человека, поскольку оказывают щадящее влияние на клетки. Противоопухолевая активность проявляется через цитотоксическое или цитостатическое действие. Цитостатическое воздействие выражается в нарушении процессов роста, развития и механизма деления клеток, тем самым инициируя апоптоз. При этом поражаются преимущественно клетки, обладающие высоким митотическим индексом. Цитотоксические вещества повреждают компоненты клетки, что ведет к запуску процесса некроза и клеточной смерти. Высшие базидиомицеты вызывают повышенный интерес многих ученых в качестве продуцентов с широким спектром соединений, обладающих разной биологической активностью (Babu, Rao, 2013; Kim *et al.*, 2013; Lee, Yun, 2011; Yurkiv *et al*., 2015),

Наиболее изученным и широко распространенным объектом многих исследований является стерильный склероций трутовика скошенного – *Inonotus obliquus,* который развивается в виде бесформенных наростов на живых стволах берез. Экстракты и индивидуальные компоненты данного гриба проявляют высокую биологическую активность различной направленности (Zhong *et al*., 2009; Zheng *et al*., 2010; Balandaykin, Zmitrovich, 2015). На основе *I. obliquus* сделан ряд препаратов (Kuznetsova, 2016; Alyautdin *et al*., 2009). Препараты на его основе используют как активные биогенные стимуляторы, которые повышают защитные силы организма, стимулируют центральную нервную и нейрогуморальную (повышение активности эстрогенов) системы организма, улучшают обмен веществ, в том числе в мозговой ткани, восстанавливают активность заторможенных ферментных систем, регулируют деятельность сердечно-сосудистой и дыхательной систем, стимулируют кроветворение (повышают уровень лейкоцитов), действуют как общеукрепляющие средства, повышают сопротивляемость организма к инфекционным заболеваниям, обладают противовоспалительными свойствами при внутреннем и местном применении, усиливают цитостатическую активность противоопухолевых препаратов, задерживают рост опухолей, вызывают их постепенную регрессию и замедляют развитие метастазов, т.е. сами обладают цитостатическим действием (Saakyan *et al*., 2004). Другие же представители рода *Inonotus,* распространенные как в Евразии, так и в Северной Америке (Ryvarden, 1986; Gilbertson, 1993), остаются малоизученными. Следовательно, изучение близких видов представителей данного рода, как потенциальных продуцентов биологически активных веществ является актуальным. Ранее нами была показана высокая антирадикальная активность водно-этанольных экстрактов из мицелия *I. rheades in vitro* по отношению к стабильным радикалам $DPPH^{\cdot}$ и $ABTS^{\cdot+}$

(Gornostay *et al*., 2014). В продолжение этого исследования, мы оценивали действие водно-водно-этанольных экстрактов *I. rheades* на модельную культуру клеток человека HEp-2, в том числе, в эксперименте с индуцированной перекисью водорода гибелью клеток.

MATERIALS AND METHODS

В работе использовали 30%-й и 70%-й водно-этанольные экстракты (ВЭЭ) из мицелия *I. rheades* (Pers.) Bondartsev & Singer (штамм № 0186, из лаборатории LE-BIN), полученные, как описано ранее (Gornostay *et al*., 2014). Концентрацию сухих веществ в экстрактах определяли весовым методом.

В качестве тестовой клеточной культуры нами была использована эпителиоподобная монослойная культура клеток человека HEp-2, происходящая из эпидермоидной карциномы гортани (Toolan, 1954). Культура была приобретена у ООО "БиолоТ", и поддерживается согласно рекомендациям производителя. Клетки культивировали при 37 °C и 5% CO_2 в среде DMEM с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки (БиолоТ, Россия).

Эксперименты по воздействию экстрактов из мицелия и перекиси водорода проводили в стандартных 96-луночных планшетах (Sarstedt, Германия) при достижении монослоя. Для оценки влияния экстрактов из мицелия, монослой клеток HEp-2 инкубировали с тестируемым образцом в серии двукратных разведений в течение 24 часов. Параллельно инкубировали контрольные образцы клеток, в которых вместо экстрактов использовали стерильный фосфатно-солевой буфер. Эксперимент воспроизводили в 3 независимых повторностях.

В экспериментах по оценке антиоксидантного эффекта экстрактов при индукции гибели клеток перекисью водорода монослой клеток инкубировали с тестируемым образцом в серии двукратных разведений в течение часа. Затем монослой промывали стерильным фосфатно-солевым буфером и оставляли в среде DMEM с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки и 250 мМ H_2O_2 на 24 часа. Концентрация H_2O_2, вызывающая гибель клеток, была подобрана в серии предварительных экспериментов. В качестве контроля действия перекиси использовали монослой клеток, в которых вместо экстрактов использовали стерильный фосфатно-солевой буфер. Контролем отсутствия воздействий служили клетки, которые инкубировали в течение часа в фосфатно-солевом буфере и затем оставляли на 24 часа в свежей среде DMEM с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки. Для определения эффекта действия перекиси водорода и экстрактов из мицелия по истечении 24 часов монослой клеток промывали стерильным фосфатно-солевым буфером и фиксировали 4.5% формалином в PBS в течение 4 ч. Фиксированные монослои клеток окрашивали в течение 30 мин. кристаллическим фиолетовым (0,05% водный раствор). Для сравнительной оценки количества жизнеспособных клеток, проводили элюцию красителя в 100 мкл метанола и измеряли оптическую плотность (ОП) растворов при длине волны 595 нм. Измерения производили с помощью спектрофотометра Immunochem 2100 (High Technology Inc., США).

Выживаемость клеток при контакте с исследуемым экстрактом в заданной концентрации рассчитывали как отношение ОП раствора кристаллического фиолетового в лунке с препаратом к ОП раствора

кристаллического фиолетового в лунке с контрольным монослоем в соответствующем разведении и выражали в процентах.

Данные представляли в виде средних значений показателя по результатам как минимум трех независимых повторов эксперимента. Для оценки вариабельности результатов, рассчитывали стандартное отклонение. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SigmaPlot 12.5., при этом нормальность распределения определяли с помощью теста Шапиро-Уилка, далее было проведено множественное сравнение средних против контрольной группы по методу Холма-Сидака для уровня вероятности не менее 95 %.

RESULTS AND DISCUSSION

Как видно из табл. 1, 2 первоначальные разбавления грибных экстрактов проявляют выраженный цитотоксический эффект на раковые клетки, однако 30% ВЭЭ мицелия менее активен, чем 70%, при том что исходное содержание сухого вещества в нем немного выше (2,1 мг/мл против 1,7 мг/мл). Если же оценивать влияние концентрации активных веществ, то 50% гибель клеток достигается у 70% ВЭЭ мицелия при содержании 53.1 мкг/мл, тогда как у 30% ВЭЭ мицелия при 550 мкг/мл, т.е разница в концентрациях практически составляет порядок, что указывает на радикальное изменение качественного состава экстрагируемых веществ.

Известно, что склероций *I. obliquus* содержит широкий спектр различных БАВ: 1) водорастворимые пигменты в большом количестве (20%), которые образуют хромогенный полифенолкарбоновый комплекс, проявляющий противоопухолевую активность, обусловленную тем, что фенольные соединения регулируют активность цитоплазматических и митохондриальных АТФ-аз и понижают образование АДФ, а поскольку магнилизированные клетки в большей степени, чем нормальные, зависят от гликолиза, то нарушение этого процесса негативно отражается на их развитии; 2) птерины (производные птеридина), наличием которых обусловливается цитостатическое действие склероция; 3) полисахариды (6–8%); 4) агарициновая и гуминоподобная чаговые кислоты (до 60%); 5) органические кислоты, суммарное содержание которых составляет 0,5–1,3% (щавелевая, уксусная, муравьиная, ванилиновая, сиреневая, п-оксибензойная, а также инонотовая и обликвиновая); 6) липиды (ди- и триглицериды); 7) стероидные вещества (стерины – эргостерол, а также тетрациклические тритерпены – ланостерол и инотодиол, проявляющий антибластическую активность); 8) свободные фенолы и флавоноиды; 9) кумарин пеуцеданин; а также ряд других (Saakyan *et al*., 2004). Можно предположить, что ВЭЭ мицелия гриба *I. rheades* в своем составе имеет сходные химические соединения, обуславливающие его цитотоксические и иные свойства.

Согласно данным табл. 3 и 4, инкубация клеток с перекисью водорода (К1) приводит примерно к 40% гибели клеток, тогда как предварительная (перед введением H_2O_2) инкубация с как с 30%, так и 70% ВЭЭ мицелия в большом диапазоне концентраций показывает практически 100% выживаемость клеток, что позволяет говорить о четко выраженном защитном эффекте грибного экстракта при окислительном стрессе. Гибель клеток при высоких концентрациях 30% и 70% ВЭЭ мицелия обусловлена цитотоксическим эффектом, она меньше, чем данные для тех же концентраций, приведенные в табл. 1 и 2, но,

возможно, это является следствием более кратковременного воздействия на культуру клеток.

Характер же влияния концентрации активных веществ как антиоксидантов проявил себя схожим образом с цитотоксическим. Т.е более высокое содержание спирта при экстракции из мицелия приводит к извлечению активных веществ, проявляющих лучшие защитные свойства при окислительном стрессе. Наиболее вероятно, что это обусловлено обогащением данной фракции фенольными соединениями, малорастворимыми в воде, которые обладают сильными антирадикальными свойствами (Gornostay *et al*., 2016).

Ранее нами было показано методом ВЭЖХ-УФ-МС, что в мицелии *I. rheades* происходит накопление стирилпиронов, в составе которых были идентифицированы гиспидин, 3,14'-бигиспидинил, гифоломин В и 1,1-дистирилпирилметан (Gornostay *et al*., 2016). Известно, что гиспидин и его производные могут проявлять сильные антирадикальные свойства, что подтверждается исследованиями, проведенными в последнее время. Так обработка MIN6N β-клеток с помощью 0,5 мМ пероксида водорода в течение 4 часов, вызвала значительную потерю жизнеспособности и увеличение числа апоптотических клеток. Предварительная же инкубация MIN6N β-клеток с гиспидином в течение 24 часов снизила потерю жизнеспособности и уменьшило количество апоптотических клеток. 70 мкМ гиспидин значительно уменьшал количество внутриклеточных АФК, подавлял рост активности каспазы-3, индуцированный перекисью водорода, также снижалось количество ТБК-реактивных продуктов. Эти результаты свидетельствуют о том, что гиспидин может быть эффективным при защите MIN6N β-клеток от вызванной АФК гибели (Lee *et al*., 2011).

Согласно данным Zan с соавторами выделенный из метанольного экстракта плодовых тел *Inonotus hispidus* гиспидин и его производные продемонстрировали значительную антиоксидантную активность против ABTS катион-радикала (Zan *et al*., 2011).

В исследовании Kim с соавторами также было показано, что гиспидин из *Phellinus linteus* обладал защитным эффектом от апоптоза, индуцированного окислительным стрессом в клетках H9c2 (кардиомиобласты) крысы. Оказалось, что гиспидин значительно защищал клетки от индуцированной гибели клеток без проявления цитотоксичности. Кроме того, гиспидин заметно усиливал экспрессию антиоксидантных ферментов, таких как гемоксигеназа-1 и каталаза (Kim *et al*., 2014).

В случае одновременной инкубации клеток с 30% и 70% ВВЭ мицелия и H_2O_2 в течении суток (табл. 5, 6) характер влияния данных реагентов значительно отличается от показанного ранее последовательного введения означенных соединений. Как видно из таблиц, 100% выживаемости клеток при всех концентрациях грибного экстракта достичь не удалось, причем она существенно отличалась от контроля (К). Однако, при больших разведениях экстракта мицелия уже весомо проявлялся защитный антиоксидантный эффект грибных экстрактов на клетки HEp-2 относительно контроля (К1), что говорит о снижении концентрации цитотоксических веществ в растворах, перекрывающих по своему действию благоприятную для клеток антирадикальную активность. Как можно заметить, совместное действие экстрактов из мицелия и

прооксиданта H_2O_2 приводит к увеличению количества погибших клеток, причем при малых разведениях и сопоставимых концентрациях сухого вещества, это различие весьма велико и особенно сильно оно проявляется для 30% ВЭЭ мицелия (см. табл. 1 и 3). Из чего следует, что перекись водорода является фактором, значительно усиливающим цитотоксический эффект экстракта при длительном контакте клеток с указанными растворами. Однако, если введение данных растворов было последовательным (см. выше) и воздействие экстракта было кратковременным, то полученные результаты позволяют предположить, что биологически активные вещества или успевают связаться с рецепторами клетки и активировать антиоксидантную и противоапоптозную системы клетки. Или они успевают проникнуть внутрь и там достигнуть, достаточной для защиты концентрации и, таким образом, предотвратить гибель клетки от окислительного стресса, индуцируемого H_2O_2. При одновременном добавлении - процесс протекает несколько иначе. Так как молекулы перекиси водорода обладают малыми размерами, высокой подвижностью и проницаемостью для мембран, то они значительно легче попадают в клетку, чем конкурирующие с ними биоактивные молекулы экстракта с антирадикальными свойствами. Перекись индуцирует развитие окислительного стресса, который к тому же усугубляется цитотоксическими соединениями ВЭЭ мицелия.

Table 1. Действие 30% водно-этанольного экстракта из мицелия *I. rheades* на жизнеспособность культуры клеток HEp-2

Конц. (мкг/мл)	K	1,1	2,2	4,3	8,6	17,2	34,4	68,7	137,5	275,0	550,0	1100
% живых клеток	100	92,5	97,0	91,1	91,8	95,0	96,6	93,5	84,6	**72,2**	**56,1**	**41,8**
SD	7,4	4,9	4,4	3,6	2,2	0,2	2,3	5,8	4,6	2,3	16,2	10,5

Экстракт с указанной концентрацией сухого вещества инкубировали в течение суток с монослоем культуры клеток. Достоверные отличия от контроля выделены жирным шрифтом и подчеркиванием. Приведены средние значения (n=3) и стандартные отклонения (SD).

Table 2. Действие 70% водно-этанольного экстракта из мицелия *I. rheades* на жизнеспособность культуры клеток HEp-2

Конц. (мкг/мл)	K	0,4	0,8	1,7	3,3	6,6	13,3	26,6	53,1	106,3	212,5	425
% живых клеток	100	93,2	95,3	93,0	94,6	86,7	82,9	**76,5**	**40,5**	**21,5**	**20,4**	**24,2**
SD	7,4	7,6	8,5	3,9	5,3	3,3	8,3	10,6	5,0	0,8	2,9	4,1

Экстракт с указанной концентрацией сухого вещества инкубировали в течение суток с монослоем культуры клеток. Достоверные отличия от контроля выделены жирным шрифтом и подчеркиванием. Приведены средние значения (n=3) и стандартные отклонения (SD).

Table 3. Действие 30% водно-этанольного экстракта из мицелия *I. rheades* на жизнеспособность культуры клеток HEp-2 при индукции гибели клеток перекисью водорода

Конц. (мкг/мл)	К	К1	1,1	2,2	4,3	8,6	17,2	34,4	68,7	137,5	275,0	550,0	1100
% живых клеток	100	**63,3**	99,9	100,6	95,1	102,5	94,4	93,1	93,2	94,8	97,5	91,0	85,5
SD	6,8	3,2	5,6	5,7	10,9	6,1	8,0	7,4	6,1	9,5	4,7	2,1	1,9

Экстракт с указанной концентрацией сухого вещества в фосфатно-солевом буфере или чистый фосфатно-солевой буфер (К1) инкубировали в течение часа с монослоем культуры клеток. После этого клетки промывали стерильным фосфатно-солевым буфером и оставляли в среде DMEM с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки и 250 мМ H_2O_2 на 24 часа. Контролем отсутствия воздействий (К) служили клетки, которые инкубировали в течение часа в фосфатно-солевом буфере и затем оставляли на 24 часа в свежей среде DMEM с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки. Достоверные отличия от контроля (К) выделены жирным шрифтом и подчеркиванием. Приведены средние значения (n=3) и стандартные отклонения (SD).

Table 4. Действие 70% водно-этанольного экстракта из мицелия *I. rheades* на жизнеспособность культуры клеток HEp-2 при индукции гибели клеток перекисью водорода

Конц. (мкг/мл)	К	К1	0,4	0,8	1,7	3,3	6,6	13,3	26,6	53,1	106,3	212,5	425
% живых клеток	100	**63,3**	89,6	86,4	95,3	95,0	84,9	91,1	87,7	89,6	84,8	**65,2**	**35,6**
SD	6,8	3,2	4,3	3,5	4,4	8,5	9,9	1,2	4,0	4,6	1,8	3,2	2,0

Экстракт с указанной концентрацией сухого вещества в фосфатно-солевом буфере или чистый фосфатно-солевой буфер (К1) инкубировали в течение часа с монослоем культуры клеток. После этого клетки промывали стерильным фосфатно-солевым буфером и оставляли в среде DMEM с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки и 250 мМ H_2O_2 на 24 часа. Контролем отсутствия воздействий (К1) служили клетки, которые инкубировали в течение часа в фосфатно-солевом буфере и затем оставляли на 24 часа в свежей среде DMEM с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки. Достоверные отличия от контроля (К) выделены жирным шрифтом и подчеркиванием. Приведены средние значения (n=3) и стандартные отклонения (SD).

Table 5. Действие 30% водно-этанольного экстракта из мицелия *I. rheades* на жизнеспособность культуры клеток HEp-2 при индукции гибели клеток перекисью водорода (одновременное введение с экстрактом)

Конц. (мкг/мл)	К	К1	1,1	2,2	4,3	8,6	17,2	34,4	68,7	137,5	275,0	550,0	1100
% живых клеток	100	62,4	**86,4**	**75,2**	**79,5**	**80,4**	**77,4**	**76,1**	**71,4**	69,2	50,6	**35,8**	**14,1**
SD	6,8	4,1	6,3	1,6	5,2	3,4	2,6	3,8	1,6	4,2	2,4	6,0	0,05

Экстракт с указанной концентрацией сухого вещества в фосфатно-солевом буфере или чистый фосфатно-солевой буфер (К1) инкубировали в течение часа с монослоем культуры клеток. После этого клетки промывали стерильным фосфатно-солевым буфером и оставляли в среде DMEM с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки и 250 мМ H_2O_2 на 24 часа. Контролем отсутствия воздействий (К) служили клетки, которые инкубировали в течение часа в фосфатно-солевом буфере и затем оставляли на 24 часа в свежей среде DMEM с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки. Достоверные отличия от К1 выделены жирным шрифтом и подчеркиванием. Все значения достоверно отличались от К. Приведены средние значения (n=3) и стандартные отклонения (SD).

Table 6. Действие 70% водно-этанольного экстракта из мицелия *I. rheades* на жизнеспособность культуры клеток HEp-2 при индукции гибели клеток перекисью водорода (одновременное введение с экстрактом)

Конц. (мкг/мл)	К	К1	0,4	0,8	1,7	3,3	6,6	13,3	26,6	53,1	106,3	212,5	425
% живых клеток	100	62,4	**82,8**	**76,7**	**74,2**	**76,9**	**79,1**	**74,2**	65,6	**51,2**	**37,4**	**14,9**	**11,5**
SD	6,8	4,1	0,46	5,5	1,5	1,5	2,9	3,9	2,8	4,3	9,9	1,4	0,8

Экстракт с указанной концентрацией сухого вещества в фосфатно-солевом буфере или чистый фосфатно-солевой буфер (К1) инкубировали в течение часа с монослоем культуры клеток. После этого клетки промывали стерильным фосфатно-солевым буфером и оставляли в среде DMEM с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки и 250 мМ H_2O_2 на 24 часа. Контролем отсутствия воздействий (К1) служили клетки, которые инкубировали в течение часа в фосфатно-солевом буфере и затем оставляли на 24 часа в свежей среде DMEM с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки. Достоверные отличия от К1 выделены жирным шрифтом и подчеркиванием. Все значения достоверно отличались от К. Приведены средние значения (n=3) и стандартные отклонения (SD).

Концентрационная зависимость действия биологически активных компонентов в 30% и 70% ВЭЭ, остается сходным с вышеуказанными данными, т.е. 70% ВЭЭ мицелия более активен при значительно меньших концентрациях.

Следовательно, исходя из вышесказанного, можно предположить наличие в экстрактах мицелия химических соединений, проявляющих разные биологические активности, часто противоположно действующих на жизнеспособность клеток. В связи с этим возникает необходимость анализа биохимических составляющих данных экстрактов и выделения чистых веществ или их групп, обладающих теми или иными свойствами, с целью уже направленного воздействия на клетки или организм в целом.

CONCLUSION

Таким образом, водно-этанольные экстракты мицелия *I. rheades* в высоких концентрациях проявляют цитотоксическую активность. В то же время в широком диапазоне концентраций экстракты могут нивелировать окислительный стресс и гибель клеток, вызванный добавлением перекиси водорода при внесении экстрактов до окислительного воздействия. Полученные результаты позволяют предполагать перспективность дальнейшего изучения химического состава экстрактов *I. rheades* и исследования его составляющих в качестве антиоксидантных или цитотоксических препаратов.

ACKNOWLEDGMENTS

Работа выполнена при поддержке Интеграционной программы «Фундаментальные исследования и прорывные технологии как основа опережающего развития Байкальского региона и его межрегиональных связей».

REFERENCES

Alyautdin R.N., Kabatskaya G.I., Romanov B.K. (2009) «Chagovit» pri saharnom diabete II tipa. *Vestnik novyih meditsinskih tehnologiy*, **16(4)**, [In Russian], 169–170.

Babu D.R., Rao G.N. (2013) Antioxidant properties and electrochemical behavior of cultivated commercial Indian edible mushrooms *J Food Sci Technol.*, **50(2)**, 301–308.

Balandaykin M.E., Zmitrovich I.V. (2015) Review on Chaga medicinal mushroom, *Inonotus*

obliquus (Higher Basidiomycetes): realm of medicinal applications and approaches on estimating its resource potential. International *Journal of Medicinal Mushrooms,* **17(2)**, 95–104.

Gilbertson R.L., Ryvarden L. (1986) North American Polypores. Abortiporus Lindtneria. – Oslo: Fungiflora, **1**, 433 s; (1987) Megasporoporia – Thelephora, **2**, 434–885 s.

Gornostaj T.G., Olennikov D.N., Zaharov YU.B., Penzina T.A., Borovskij G.B. (2016) Vliyanie sveta na sintez stirilpironov v micelii Inonotus rheades (Pers.) Bondartsev & Singer. Mater. vseros. nauch. konf. s mezh. uch. i shkoly molod. uch. «Faktory ustojchivosti rastenij i mikroorganizmov v ehkstremal'nyh prirodnyh usloviyah i tekhnogennoj srede». Irkutsk. [In Russian], 71–72.

Gornostay T.G., Chkhenkeli V.A., Penzina T.A., Polyakova M.S., Borowski G.B. (2014) Research of antioxidant and antimicrobial activity of aqueous-alcoholic extracts from mycothallus and mycelium of *Inonotus rheades* (Pers.) Bondartsev & Singer. *Bulletin ESSC SB RAMS*, **5(99)**, 76–79.

Kim D.E., Kim B., Shin H.S., Kwon H.J., Park E.S. (2014) The protective effect of hispidin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells through Akt/GSK-3β and ERK1/2 signaling pathway. *Experimental Cell Research,* **327**, 264–275

Kim S.P., Park S.O., Lee S.J., Nam S.H., Friedman M. (2013). A polysaccharide isolated from the liquid culture of *Lentinus edodes* (Shiitake) mushroom mycelia containing black rice bran protects mice against a Salmonella lipopolysaccharide-induced endotoxemia. *J Agric Food Chem*., **61(46)**, 10987–10994.

Kuznetsova O.Yu. (2016) Obzor sovremennyih preparatov s biologicheski aktivnyimi kompozitsiyami berezovogo griba Chagi. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennyih sredstv*, **1(14)**, [In Russian], 128–141.

Lee I.K., Yun B.S. (2011) Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance. *The Journal of Antibiotics,* **64(5)**, 349–359.

Lee J.H., Lee J.S., Kim Y.R., Jung W.C., Lee K.E., Lee S.Y., Hong E.K. (2011) Hispidin Isolated from Phellinus linteus Protects Against Hydrogen Peroxide–Induced Oxidative Stress in Pancreatic MIN6N β-Cells. *Journal of Medicinal Food,* **14(11)**, 1431–1438.

Ryvarden L., Gilbertson R.L. (1993) European Polypores. Part 1. Synopsis Fungorum. Oslo: Fungiflora, 387 s.

Saakyan K.R., Vaschenko K.F., Darmogray R.E. (2004) Chaga (chernyiy berezovyiy grib) Fungus betulinus. *Provizor* [Elektronnyiy resurs], **16**.

Toolan H.W. (1954) Transplantable human neoplasms maintained in cortisone-treated laboratory animals: H.S. #1; H.Ep. #1; H.Ep. #2; H.Ep. #3; and H.Emb.Rh. #1. *Cancer Res.,* **14(9)**, 660–666.

Yurkiv B., Wasser S.P., Nevo E., Sybirna N.O. (2015) The Effect of *Agaricus brasiliensis* and *Ganoderma lucidum* Medicinal Mushroom Administration on the L-arginine/Nitric Oxide System and Rat Leukocyte Apoptosis in Experimental Type 1 Diabetes Mellitus. *Int J Med Mushrooms*, **17(4)**, 339–350.

Zan L., Qin J., Zhang Y., Yao Y., Bao H., Li X. (2011) Antioxidant hispidin derivatives from medicinal mushroom I*nonotus hispidus*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **59(6)**, 770–772.

Zheng W., Miao K., Liu Y., Zhao Y., Zhang M., Pan

S., Dai Y. (2010) Chemical diversity of biologically active metabolites in the sclerotia of *Inonotus obliquus* and submerged culture strategies for up-regulating their production. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **87**, 1237–1254.

Zhong X., Ren K., Lu S. (2009) Progress of research on *Inonotus obliquus*. *Chin J Integr Med.*, **15(2)**, 156–160.