

БИОХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-16-6-476-489>



УДК 615.275.2

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

Нокдаун клеточных генов *FLT4*, *Nip98* и *Nip205* как супрессор вирусной активности гриппа A/WSN/33 (H1N1) в культуре клеток A549

Е.А. Пашков^{1,2,@}, Е.Б. Файзулов², Е.Р. Корчевая², А.А. Ртищев²,
Б.С. Черепович², А.В. Сидоров², А.В. Поддубиков², Е.П. Быстрицкая²,
Ю.Е. Дронина^{1,3}, А.С. Быков¹, О.А. Свитич^{1,2}, В.В. Зверев^{1,2}

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, 119991 Россия

²Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова Минздрава России, Москва, 105064 Россия

³Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, 123098 Россия

@ Автор для переписки, e-mail: pashkov.j@yandex.ru

Аннотация

Цели. Оценка влияния подавления экспрессии клеточных генов *FLT4*, *Nip98* и *Nip205* на динамику репродукции вируса гриппа А в культуре легочных клеток человека А549.

Методы. Работа выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (Россия). Вирусосодержащую жидкость отбирали в течение трех дней с момента трансфекции и заражения и оценивали интенсивность вирусной репродукции методами титрования по цитопатическому действию и в реакции гемагглютинации. Концентрацию вирусной РНК определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ). Для вычисления статистически значимых различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

Результаты. В клетках, обработанных малыми интерферирующими РНК (миРНК) к генам *FLT4*, *Nip98* и *Nip205*, отмечалось достоверное подавление экспрессии целевых генов и показателей вирусной репродукции (титр вируса, гемагглютинирующая активность, концентрация вирусной РНК) при коэффициенте множественности заражения, равном 0.1. Дополнительно было установлено, что подавление экспрессии целевых генов с помощью миРНК не приводит к значительному снижению выживаемости клеток. Вирусный титр в

клетках, обработанных миРНК FLT4.2, Nup98.1 и Nup205, на первые сутки был меньше в среднем на 1.0 lg, а на вторые и третьи – на 2.2–2.3 lg, по сравнению с клетками, обработанными неспецифической миРНК. При проведении ОТ-ПЦР-РВ отмечено достоверное уменьшение концентрации вирусной РНК с миРНК Nup98.1 (до 190 раз) и Nup205 (до 30 раз) на первые сутки, в 26 и в 29 раз на вторые и в 6 и 30 раз на третьи сутки, соответственно. Для миРНК FLT4.2 количество копий вирусной РНК уменьшилось в 23, 18 и 16 раз на первые, вторые и третьи сутки. Схожие результаты были получены при определении гемагглютинирующей активности вируса. Наиболее сильно, в 16 раз, гемагглютинирующая активность на третьи сутки снизилась в клетках, обработанных миРНК Nup205 и FLT4.2. В клетках, обработанных миРНК FLT4.1, Nup98.1 и Nup98.2, гемагглютинирующая активность уменьшилась в 8 раз.

Выводы. В ходе исследования были выявлены три клеточных гена (FLT4, Nup98 и Nup205), подавление экспрессии которых позволяет эффективно уменьшить вирусную репродукцию, а также получены оригинальные последовательности миРНК. Полученные результаты имеют важное значение для создания терапевтических и профилактических препаратов, чье действие основано на механизме РНК-интерференции.

Ключевые слова: вирус гриппа А, РНК-интерференция, ген, матричная РНК, малые интерферирующие РНК

Для цитирования: Пашков Е.А., Файзулов Е.Б., Корчевая Е.Р., Ртищев А.А., Черепович Б.С., Сидоров А.В., Поддубиков А.В., Быстрицкая Е.П., Дроница Ю.Е., Быков А.С., Свитич О.А., Зверев В.В. Нокдаун клеточных генов FLT4, Nup98 и Nup205 как супрессор вирусной активности гриппа А/WSN/33 (H1N1) в культуре клеток А549. *Тонкие химические технологии.* 2021;16(6):476–489. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-16-6-476-489>

RESEARCH ARTICLE

Knockdown of *FLT4*, *Nup98*, and *Nup205* cellular genes as a suppressor for the viral activity of Influenza A/WSN/33 (H1N1) in A549 cell culture

Evgeny A. Pashkov^{1,2}, Evgeny B. Faizuloev², Ekaterina R. Korchevaya², Artem A. Rtishchev², Bogdan S. Cherepovich², Alexander V. Sidorov², Alexander V. Poddubikov², Elizaveta P. Bystritskaya², Yuliya E. Dronina^{1,3}, Anatoly S. Bykov², Oxana A. Svitich^{1,2}, Vitaliy V. Zverev^{1,2}

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia

²I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064 Russia

³N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, 123098 Russia

@Corresponding author, e-mail: pashkov.j@yandex.ru

Abstract

Objectives. To evaluate the effect of cellular genes *FLT4*, *Nup98*, and *Nup205* on the reproduction of the influenza A virus in A549 human lung cancer cell line.

Methods. The work was carried out using the equipment of the center for collective use of the I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Russia). The virus-containing fluid was collected within three days from the moment of transfection and infection and the intensity of viral reproduction was assessed by viral titration and hemagglutination reaction. The viral RNA concentration was determined by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). To calculate statistically significant differences between groups, the nonparametric Mann–Whitney test was used.

Results. In cells treated with small interfering RNAs (siRNAs) targeted at *FLT4*, *Nup98*, and *Nup205* genes, a significant decrease in their expression and indicators of viral reproduction (virus titer, hemagglutinating activity, viral RNA concentration) was observed at a multiplicity of infection (MOI) = 0.1. Additionally, it was found that a decrease in the expression of target genes using siRNA does not lead to a significant decrease in cell survival. The viral titer in cells treated with siRNA *FLT4.2*, *Nup98.1*, and *Nup205* on the first day was lower by an average of 1.0 lg, and on the second and third days, by 2.2–2.3 lg, compared to cells treated with nonspecific siRNA. During real-time RT-PCR, a significant decrease in the concentration of viral RNA was observed with siRNA *Nup98.1* (up to 190 times) and *Nup205* (up to 30 times) on the first day, 26 and 29 times on the second day, and 6 and 30 times on the third day, respectively. For *FLT4.2* siRNA, the number of viral RNA copies decreased by 23, 18, and 16 times on the first, second, and third days. Similar results were obtained when determining the hemagglutinating activity of the virus. The hemagglutinating activity on the third day most strongly decreased in cells treated with siRNA *Nup205* and *FLT4.2* (16 times). In cells treated with siRNA *FLT4.1*, *Nup98.1*, and *Nup98.2*, hemagglutinating activity decreased by 8 times.

Conclusions. In the present study, three cellular genes (*FLT4*, *Nup98*, and *Nup205*) were identified—the decrease in the expression of which effectively suppresses viral reproduction—and the original siRNA sequences were obtained. The results obtained are important for creating therapeutic and prophylactic medication, whose action is based on the RNA interference mechanism.

Keywords: Influenza A virus, RNA interference, gene, messenger RNA, small interfering RNAs

For citation: Pashkov E.A., Faizuloev E.B., Korchevaya E.R., Rtishchev A.A., Cherepovich B.S., Sidorov A.V., Poddubikov A.V., Bystritskaya E.P., Dronina Yu.E., Bykov A.S., Svitich O.A., Zverev V.V. Knockdown of *FLT4*, *Nup98*, and *Nup205* cellular genes as a suppressor for the viral activity of Influenza A/WSN/33 (H1N1) in A549 cell culture. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2021;16(6):476–489 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-16-6-476-489>

ВВЕДЕНИЕ

Гриппозная инфекция является одной из наиболее значимых проблем на сегодняшний день в мировом здравоохранении. По оценке ВОЗ ежегодно регистрируется до 1 миллиарда новых случаев гриппа, до 3–5 миллионов случаев тяжелых заболеваний и до 500 000 смертей во всем мире [1]. Особую клиническую значимость представляют вирусы гриппа рода *Alphainfluenzavirus* (*Influenza A virus*, вирус гриппа А (ВГА)), имеющие высокую эпидемиологическую значимость и способные вызывать пандемии [2]. Помимо поражения дыхательной системы, грипп способен вызвать осложнения в работе таких систем, как сердечно-сосудистая, центральная нервная и мочеполовая [3–7]. Не является так же исключением риск развития бактериальных и грибковых постгриппозных осложнений [8–10].

Несмотря на имеющиеся в настоящее время специфические противогриппозные препараты, их использование зачастую не оправдывает себя, поскольку ежегодно выявляются новые вирусные

штаммы, имеющие резистентность к этим препаратам. [11, 12]. Также остро стоит проблема применения противогриппозных вакцин, поскольку ежегодно приходится создавать вакцины, адаптированные к новым штаммам вируса гриппа, а работы над созданием универсальной вакцины на сегодняшний день далеки от завершения [13–15]. Помимо этого, вакцинопрофилактика гриппа является затруднительной для людей, страдающих аллергией на куриные яйца [16].

На сегодняшний день для лечения гриппа применяется ряд этиотропных, симптоматических и специфических препаратов. В настоящее время многие штаммы вируса гриппа имеют 95% резистентность к производным адамантанового ряда [17]. Также известно, что некоторые циркулирующие штаммы резистентны к ингибиторам слияния (Умифеновир) [18]. В разные эпидемические сезоны чувствительность штаммов вирусов гриппа А и В сильно различалась по отношению к ингибиторам нейраминидазы. В 2008–2009 гг. все циркулирующие вирусы гриппа А (H1N1) были устойчивы к озельтамивиру, однако в 2018 г. циркулирующие

вирусы гриппа А H1N1 были полностью восприимчивы к озельтамивиру, перамивиру и занамивиру [19–21]. Таким образом, несмотря на широкую осведомленность о молекулярной биологии, структурной организации и патогенезе вируса гриппа, по-настоящему эффективных средств терапии и профилактики гриппозной инфекции не существует [11, 12].

РНК-интерференция (РНКи) – последовательность регуляторных реакций в клетках эукариот, вызванных экзогенной двухцепочечной молекулой РНК [22]. РНКи была открыта Э. Файром и К. Меллом в 1998 г. у нематоды *Caenorhabditis elegans*. Ими было выдвинуто несколько положений о свойствах РНКи: при ней деградирует матричная РНК (мРНК); эффективность двухцепочечной РНК (дцРНК), определяющей узнавание комплементарного участка мРНК-мишени, выше, чем одноцепочечной РНК (оцРНК); для подавления экспрессии гена необходим короткий фрагмент дцРНК [23].

Механизм РНКи состоит в разрезании экзогенной двухцепочечной РНК на небольшие последовательности, размер которых составляет от 21 до 25 пар нуклеотидов, являющихся малыми интерферирующими РНК (миРНК). Такой размер миРНК обусловлен тем, что при их большем размере высок риск выработки интерферонов. После образования миРНК происходит ее связывание с комплексом *RISC* (RNA Induced Silencing Complex), состоящим из трех белков: *AGO2*, *PACT* и *TRBP*. Образовавшийся комплекс распознает и расщепляет мРНК-мишень [24–26].

На данный момент известен ряд противовирусных препаратов, основанных на механизме РНКи и находящихся на разных стадиях клинических испытаний. Положительные результаты испытаний показали такие препараты как *Miravirsen* (*Santaris Pharma*) (терапия гепатита С), *ALN-RSV01* (*Alnylam Pharmaceuticals*) (терапия респираторно-синцитиально вирусной инфекции), *pHIV7-shITAR-CCR5RZ* (*City of Hope Medical Center*) (терапия ВИЧ-инфекции) [27, 28]. Так же одобрение на клиническое использование получили препараты *Patisiran* и *Givosiran* (*Alnylam Pharmaceuticals*), применяемые для лечения амилоидной полинейропатии и острой печеночной порфирии, соответственно¹ [29].

Следует отметить, что важным фактором, снижающим эффективность РНКи, может являться формирование резистентности вирусов к действию

миРНК, направленных к вирусным генам [30]. С точки зрения преодоления лекарственной устойчивости вируса гриппа большого внимания заслуживает поиск миРНК, обладающих противовирусной активностью и направленных к факторам клетки-хозяина, которые необходимы для репродукции вируса.

В настоящем исследовании показано, что использование миРНК, направленных к клеточному гену *FLT4* и к клеточным генам *Nup98* и *Nup205*, способно ингибировать репродукцию вируса гриппа А в культуре клеток легких. При этом клеточный ген *FLT4* играет важную роль в процессе эндоцитоза вируса гриппа. А клеточные гены *Nup98* и *Nup205* кодируют белки ядерно-порового комплекса, участвующего в импорте и экспорте сегментов вирусной РНК в полость ядра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выбор целевых генов для подавления вирусной репродукции

Гены, кодирующие факторы, необходимые для вирусной репродукции, рассматривались по следующим критериям: идентификация в качестве потенциально успешной мишени для использования миРНК в исследованиях, посвященных миРНК скринингу; эффективное применение в ранних независимых исследованиях; низкий цитопатический эффект от временного подавления экспрессии целевых генов [26–28].

миРНК

Подбор миРНК осуществляли с помощью интернет-ресурса siDirect v. 2.0². Олигорибонуклеотиды («Синтол», Россия) разводили водой до концентрации 100 пмоль/мкл. Далее комплементарные олигорибонуклеотиды смешивали, инкубировали в термостате при 60 °С в течение 1 мин, затем охлаждали до комнатной температуры. Готовые РНК-дуплексы хранили при температуре –80 °С. Все работы с готовыми дуплексами проводились с использованием штатива-охладителя. Последовательности используемых миРНК представлены в табл. 1. В качестве неспецифического контроля использовалась миРНК *L2*, специфичная к гену светляковой люциферазы и не влияющая на жизненный цикл клеток A549.

Оценка подавления экспрессии клеточных генов

Уровень экспрессии целевых генов определяли после трансфекции миРНК. Через 24 ч после трансфекции клетки обрабатывали лизирующим раствором и затем с помощью набора «МагноСорб» («Интерлабсервис», Россия) выделяли клеточную РНК. Для постановки реакции обратной транскрипции применяли набор реагентов «ОТ-1» («Синтол»). Изменение

¹ Multi-Discipline Review. Center for Drug Evaluation and Research. Appl. No. 212194Orig1s000. 167 p. URL: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/212194Orig1s000MultidisciplineR.pdf (Дата обращения 24.08.2021 / Accessed August 24, 2021).

² <http://sidirect2.mai.jp/> (Дата обращения 14.02.2021 / Accessed February 02, 2021).

Таблица 1. Последовательности миРНК
Table 1. siRNA sequences

миРНК / siRNA	Последовательность / Sequence
<i>FLT4.1</i>	AAUGACAUCUGAAUCUCAGdGdG CUGAGAUUCAGAUGUCAUdTdA
<i>FLT4.2</i>	UGAAGUUCUGUUGAAAAAGdAdC CUUUUACAACAGAACUUCAdCdA
<i>Nup98.1</i>	AGUCUUUGUUUCAGAAAGCdGdC GCUUUCUGAAACAAAGACUdCdA
<i>Nup98.2</i>	UCCAAAUGUUGAAGUUGUGdCdC CACAACUUCACAUUUGGAdCdA
<i>Nup205</i>	UCAAAAUCUUAUCAAGAAGdGdT CUUCUUGAUAAGAUUUUGAdAdG
<i>L2</i> (неспецифическая миРНК) <i>L2</i> (nonspecific siRNA)	UUUCCGUCAUCGUCUUUCCdTdT GGAAAGACGAUGACGGAAAdTdT

динамики экспрессии генов контролировали с помощью количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с набором праймеров к генам *FLT4*, *Nup98*, *Nup205* и *GAPDH* [32]. Для оценки влияния миРНК на целевые гены проводился расчет относительного уровня экспрессии генов *FLT4*, *Nup98* и *Nup205* по стандартной $2^{-\Delta\Delta CT}$ методике³. Для каждой миРНК были синтезированы праймеры, направленные к участкам генов, подверженным воздействию миРНК. Праймеры подобраны с помощью сайта компании Integrated DNA Technologies⁴ и синтезированы фирмой «Синтол».

Вирус

В работе использован вирус гриппа A/WSN/33 (H1N1) (St. Jude Children's Research Hospital, США). Культивирование и определение титра вируса проводилось на культуре клеток почек собак (англ. Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)).

Культуры клеток

В работе использовались клетки почек корк-спаниеля MDCK (Institut Pasteur, France) и клетки аденокарциномы человеческого легкого A549 (ATCC® CCL-185, USA). Клетки MDCK выращивали в минимальной основной среде (англ. Minimum Essential Medium (MEM)), («ПанЭко», Россия), содержащей 5% эмбриональной сыворотки коров (ЭСК) Gibco (*Thermo Fisher Scientific*, США), 40 мкг/мл гентамицина («ПанЭко»), и 300 мкг/мл L-глутамина («ПанЭко») при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Клетки A549 выращивали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (англ. Dulbecco's modified Eagles medium

(DMEM)) («ПанЭко»), содержащей 5% ЭСК (*Gibco*), 40 мкг/мл гентамицина («ПанЭко») и 300 мкг/мл L-глутамина («ПанЭко») при 37 °C в CO₂-инкубаторе.

МТТ-тест

Выживаемость клеток A549, обработанных миРНК, оценивали с помощью теста МТТ (метил-тиазолилтетразолий бромид). На первые, вторые и третьи сутки после трансфекции в лунки с клетками 96-луночного планшета добавляли по 20 мкл раствора МТТ, 5 мг/мл («ПанЭко») и инкубировали при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в течение 2 ч. Далее культуральную жидкость отбирали и добавляли в каждую лунку по 100 мкл диметилсульфоксида (*Sigma-Aldrich*, кат.номер D4540-1L). С помощью планшетного спектрофотометра Varioscan (*Thermo Fisher Scientific*, США) определяли оптическую плотность лунок при 530 нм с учетом фоновых значений при 620 нм.

Трансфекция клеток миРНК с последующим заражением

Для трансфекции миРНК клетки A549 высевали на 12-луночные планшеты в посевной концентрации 1×10^5 клеток/мл. После образования 80% клеточного монослоя клетки промывались раствором фосфатно-солевого буфера в бессывороточной среде Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*). Далее смесь 24 мкл Lipofectamin 2000 (*Thermo Fisher Scientific*) и 600 мкл Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) добавляли к раствору миРНК в среде Opti-MEM и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Концентрация миРНК, необходимая для нокдауна генов, составила 40 пмоль/мкл на лунку. После инкубации комплексы добавляли к клеткам. В качестве неспецифического контроля была использована миРНК L2. Затем клетки инкубировали при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Спустя 4 ч

³ Bradburn S. How to Perform the Delta-Delta Ct Method. URL: <https://toptipbio.com/delta-delta-ct-pcr/> (Дата обращения 27.08.2021 / Accessed August 27, 2021).

⁴ <https://eu.idtdna.com/> (Дата обращения 02.03.2021 / Accessed March 02, 2021).

культуральную среду удаляли из всех лунок, кроме отрицательного контроля, и добавляли по 1 мл вирусосодержащей жидкости с коэффициентом множественности заражения (англ. Multiplicity of Infection (MOI)), равном 0.1, состоящей из среды DMEM, 0.001% ингибитора химотрипсина (англ. Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK)) (*Sigma-Aldrich*, Германия), 40 мкг/мл гентамицина. После этого клетки вновь помещали в CO₂-инкубатор. В течение трех последующих суток отбирались образцы супернатанта для последующей постановки реакции гемагглютинации, титрования и проведения ПЦР с обратной транскрипцией.

Выделение вирусной РНК

Вирусную РНК (вРНК) выделяли из отобранных супернатантов набором High Pure RNA Isolation Kit (*Roche*, Германия). Для постановки реакции обратной транскрипции применяли набор реагентов «ОТ-1» («Синтол», Россия). Изменение концентрации вирусной РНК в культуральной жидкости контролировали с помощью количественной ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ) с набором праймеров и зондов к М-гену ВГА [33]. Для ПЦР-РВ использовали набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green и референтного

красителя ROX («Синтол») и 2.5-кратную реакционную смесь для проведения ПЦР-РВ («Синтол»). Рабочая концентрация праймеров и зондов составила 10 пмоль/мкл и 5 пмоль/мкл, соответственно. Реакция ПЦР-РВ проводилась в амплификаторе ДТ-96 («ДНК-технология», Россия). Температурно-временной режим составил 95 °С — 5 мин (1 цикл); 62 °С — 40 с, 95 °С — 15 с (40 циклов). В табл. 2 представлены праймеры и зонды, синтезированные фирмой «Синтол».

Определение гемагглютинирующего титра ВГА

В каждую лунку 96-луночного круглодонного планшета вносили физиологический раствор в объеме 50 мкл. Затем в лунки вносили по 50 мкл образцов и делали последующие 2-кратные разведения. После этого в лунки вносили по 50 мкл 0.5% эритроцитарной смеси и оставляли при комнатной температуре на 40 мин. Вирусный титр выражался в агглютинирующих единицах.⁵

Титрование вируса по конечной точке цитопатогенного действия

Вирусный титр определялся по крайней точке визуального проявления цитопатического эффекта в культуре клеток MDCK. Клетки MDCK сеяли в 96-луночные планшеты с посевной концентрацией 1×10^4 клеток/мл. Через двое суток

Таблица 2. Праймеры для выявления в ОТ-ПЦР-РВ М-гена ВГА
Table 2. Primers for real-time RT-PCR for the IAV M-gene

Праймер / Primer	Последовательность / Sequence
<i>FLT4.1F</i>	AAUGACAUCUGAAUCUCAGdGdG
<i>FLT4.1R</i>	CUGAGAUUCAGAUUCAUdTdA
<i>FLT4.2F</i>	UGAAGUUCUGUUGAAAAAGdAdC
<i>FLT4.2R</i>	CUUUUUAACAGAACUUCAdCdA
<i>Nup98.1F</i>	UGAGUAUGUUAGACUAUUGdAdT
<i>Nup98.1R</i>	CAAUAGUCUAACAUACUCAdCdC
<i>Nup98.2F</i>	AUUAAGGUUCUCAAACCCdAdA
<i>Nup98.2R</i>	GGUUUUGAAGAACCuuAAUdAdA
<i>Nup205F</i>	UUAUUCACAUCAAUCUGUGdAdC
<i>Nup205R</i>	CACAGAUUGAUGUGAAUAAdTdG
<i>IAV M F:</i>	GGAATGGCTAAAGACAAGACCAAT
<i>IAV M R:</i>	GGGCATTTTGGACAAAGCGTCTAC
<i>IAV M Pr: FAM</i>	AGTCCTCGCTCACTGGGCACGGTG-BHQ1
<i>GAPDH F</i>	AGCCACATCGCTCAGACAC
<i>GAPDH R</i>	GCCCAATACG ACCAAATCC

⁵ МУ 3.3.2.1758–03 Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа. URL: https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=4727 (Дата обращения 27.08.2021) [МУ 3.3.2.1758–03 Methods for determining the quality indicators of immunobiological drugs for the prevention and diagnosis of influenza. https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=4727 (Accessed August 27,2021).]

питательную среду удаляли из лунок, проводили 10-кратные последовательные разведения вирусного материала в поддерживающей среде без трипсина и инкубировали на протяжении четырех суток в CO₂-инкубаторе при 37 °С. По истечении четырех суток результаты титрования изучали визуально под микроскопом и анализировали на наличие специфического цитопатического эффекта для вируса гриппа (изменение, деформация, открепление мертвых клеток со дна лунки). Вирусный титр рассчитывался по методу, описанному в работе [34], и выражался как логарифм тканевых цитотоксических доз – ТЦД_{50/мл}.

Статистическая обработка данных

Статистическую значимость полученных результатов определяли с помощью критерия Манна–Уитни. Разница считалась достоверной при $0.01 \leq p \leq 0.05$. Показатели достоверности рассчитывались с использованием ресурса Psychol-ok⁶.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Обоснование выбора мишеней для миРНК

Три гена-мишени было отобрано для экспериментов с миРНК. Продукты отобранных генов активно взаимодействуют с вирусом гриппа на нескольких этапах его репродукции. Ген *FLT4* кодирует экспрессию рецепторного белка эпидермального фактора роста (англ. Epidermal Growth Factor (*EGF*)) рецептора тирозинкиназы. По данным Eierhoff, белок *EGF* принимает активное участие в процессе вирусного эндоцитоза [35]. Белки *Nup98* и *Nup205*, кодируемые одноименными генами, обеспечивают импорт и экспорт вирусной мРНК из нуклеоплазмы [36, 37].

Нами была проверена способность полученных синтетических миРНК подавлять экспрессию их целевых генов. В среднем экспрессия гена снижалась на первые сутки для каждой из пяти миРНК более чем на 80% по отношению к клеткам, обработанным неспецифической миРНК *L2*. На рис. 1 показана эффективность нокдауна мРНК в клетках А549. Оценка подавления экспрессии генов проводилась с использованием 2^{-ΔΔCT} метода.⁷

Влияние миРНК на выживаемость трансфицированных клеток

Выживаемость клеток А549, трансфицированных миРНК, оценивали в течение трех суток (табл. 3). По аналогии с работой Estrin [26] пороговое значение выживаемости было установлено на уровне 70%.

⁶ <https://www.psychol-ok.ru/statistics/mann-whitney/> (Дата обращения 05.08.2021 / Accessed August 05, 2021).

⁷ Bradburn S. How to Perform the Delta-Delta Ct Method. URL: <https://toptipbio.com/delta-delta-ct-pcr/> (Дата обращения 27.08.2021 / Accessed August 27, 2021).

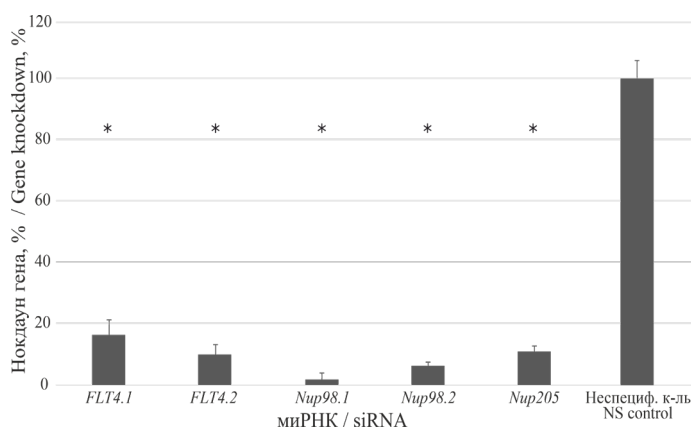


Рис. 1. Влияние миРНК на экспрессию генов *FLT4*, *Nup98* и *Nup205*.

Fig. 1. Influence of siRNA on the expression of genes *FLT4*, *Nup98*, and *Nup205*.

Через 24 ч жизнеспособность клеток, обработанных миРНК, практически не изменилась. На вторые сутки выживаемость клеток, обработанных всеми миРНК, кроме *Nup205* и нецелевой *L2*, снизилась на 14–21%. За 100% была принята выживаемость нетрансфицированных клеток. Все значения были нормализованы по отношению к средней оптической плотности нетрансфицированных клеток в каждый соответствующий временной интервал после трансфекции. Обработка клеток молекулами миРНК не приводила к снижению выживаемости клеток по сравнению с отрицательным контролем.

Влияние миРНК на гемагглютинирующую активность

В табл. 4 представлено изменение гемагглютинирующего титра вируса гриппа на третьи сутки в реакции гемагглютинации (РГА). По результатам РГА гемагглютинирующая активность на третьи сутки снизилась в 16 раз в клетках, обработанных миРНК *Nup205* и *FLT4.2*, а в клетках, обработанных миРНК *FLT4.1*, *Nup98.1* и *Nup98.2*, – в 8 раз.

Влияние миРНК на титр вируса

На следующем этапе проводилось определение изменения инфекционного титра вируса после воздействия миРНК на гены-мишени. В течение трех суток после трансфекции отбирали надосадочную жидкость и затем выполняли ее титрование на монослой клеток MDCK в 96-луночных планшетах. Было установлено, что применение всех миРНК при MOI = 0.1 приводило к достоверному снижению вирусной репродукции по сравнению с миРНК *L2*. Как видно из рис. 1, в нетрансфицированной культуре клеток титры вируса со временем увеличивались, достигая пиковых значений на 48-ой и 72-ой час. То же самое было отмечено и в клетках, трансфицированных неспецифической миРНК *L2*. При подавлении экспрессии

Таблица 3. Выживаемость клеток после трансфекции миРНК, %
Table 3. Cell survival after siRNA transfection in percentage, %

миРНК siRNA	1-е сутки 1st day	2-е сутки 2nd day	3-и сутки 3rd day
<i>FLT4.1</i>	96	81	74
<i>FLT4.2</i>	94	80	81
<i>Nip98.1</i>	100	79	79
<i>Nip98.2</i>	97	86	87
<i>Nip205</i>	94	95	94
<i>L2</i>	94	99	99
К-(нетрансф.) К-(untranslated)	100	100	100

Таблица 4. Вирусная репродукция на третьи сутки по данным РГА
Table 4. Viral reproduction on the 3rd day according to HA data

миРНК siRNA	Вирусная репродукция в РГА (log ₂) Viral reproduction to HA (log ₂)
	A/WSN/33 (MOI = 0.1)
<i>FLT4.1</i>	1:8
<i>FLT4.2</i>	1:4
<i>Nip98.1</i>	1:8
<i>Nip98.2</i>	1:8
<i>Nip205</i>	1:4
К-(L2)	1:64
К-IAV	1:64

гена *FLT4* с использованием миРНК *FLT4.1* титр вируса снизился примерно на 0.9–1.0 lg ТЦД_{50/мл} по сравнению с контролем на первые, вторые и третьи сутки. При применении миРНК *FLT4.2* на первые сутки снижение составило так же 1.0 lg ТЦД_{50/мл}, однако на вторые и третьи отмечалось снижение на 2.2 lg ТЦД_{50/мл} по сравнению с контрольными группами. При трансфекции миРНК к гену *Nip205* титр вируса снизился на 1.0 lg ТЦД_{50/мл} на первые сутки и на 2.3 lg ТЦД_{50/мл} в последующие сутки относительно вирусного и неспецифического контроля. В клетках, обработанных *Nip98.1* и *Nip98.2*, значимое снижение титра вируса при обработке миРНК *Nip98.1* на 2.3 lg ТЦД_{50/мл} отмечалось на вторые сутки, а для *Nip98.2* на 2.2 lg ТЦД_{50/мл} на третьи сутки, соответственно, по отношению к контролям. Динамика изменения вирусного титра показана на рис. 2.

Влияние миРНК на концентрацию вирусной РНК

Влияние миРНК на концентрацию вирусной РНК отражено на рис. 3. При проведении ОТ-ПЦР-РВ отмечено снижение концентрации вирусной РНК с миРНК *Nip98.1* (до 190 раз) и *Nip205* (до 30 раз) на первые сутки. На вторые сутки отмечено снижение

концентрации вРНК для *Nip205* в 29 раз и в 26 раз для *Nip98.1*. На третьи сутки снижение для миРНК *Nip98.1* и *Nip205* составило 6 и 30 раз, соответственно. Для миРНК *FLT4.2* концентрация вирусной РНК снижалась в 23, 18 и 16 раз на первые, вторые и третьи сутки, соответственно. Концентрация вирусной РНК при использовании миРНК *FLT4.1* на первые, вторые и третьи сутки снижалась незначительно.

Грипп – острое инфекционное респираторное заболевание, причиной которого являются вирусы семейства *Orthomyxoviridae*. Заболевания, вызываемые вирусом гриппа, представляют на сегодняшний день одну из наиболее первостепенных проблем для общемирового здравоохранения. Актуальность поиска новых противогриппозных препаратов обусловлена тем, что у вируса гриппа быстро вырабатывается резистентность к известным специфическим противогриппозным препаратам [38].

В настоящей работе проведена серия экспериментов на клеточной культуре по оценке противогриппозной активности малых интерферирующих РНК, направленных к генам *FLT4*, *Nip98* и *Nip205*. Была показана выраженная противовирусная активность миРНК, направленных к мРНК

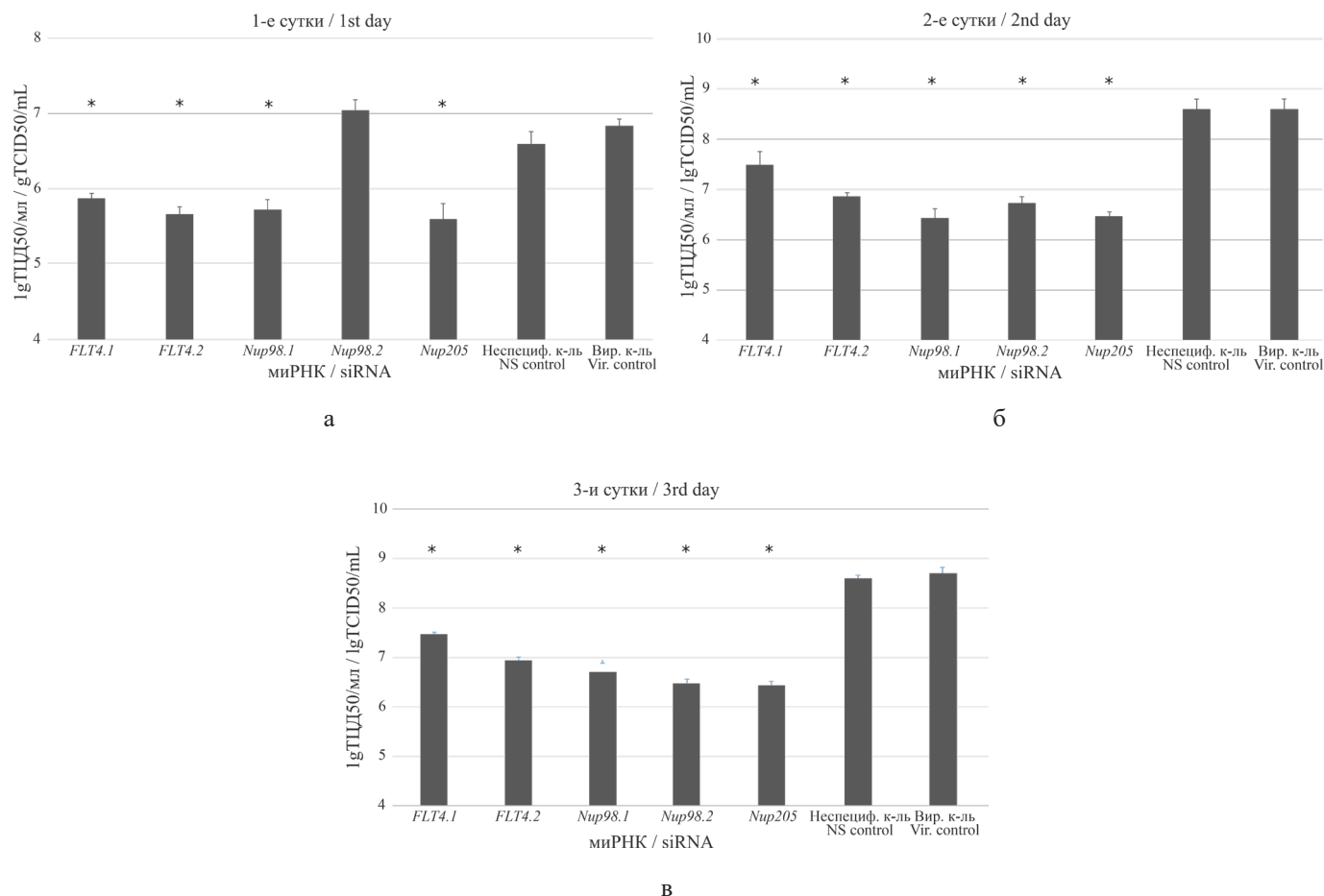


Рис. 2. Влияние миРНК, направленных к генам *FLT4*, *Nup98* и *Nup205* на репродукцию вируса гриппа (MOI = 0.1). (а) 1-е сутки после инфекции (п.и.), (б) 2-е сутки п.и., (в) 3-и сутки п.и.

Fig. 2. Effect of siRNAs directed to the *FLT4*, *Nup98*, and *Nup205* genes on the reproduction of the influenza virus (MOI = 0.1). (a) 1st day post infection (p.i.), (b) 2nd day p.i., and (c) 3rd day p.i.

этих генов и получены данные о корреляции между снижением экспрессии клеточных генов и снижением вирусной репродукции, оцененной разными методами, которые согласовывались между собой (титрование вируса по цитопатогенному действию, ОТ-ПЦР-РВ, РГА).

Важным фактором успешного применения миРНК является то, что нокдаун целевого гена не должен влиять на жизнедеятельность клеток. Направленные к генам *FLT4*, *Nup98* и *Nup205* миРНК не снижали жизнеспособность клеток ниже порогового уровня в 70% по аналогии с работой [26].

Применение миРНК для подавления экспрессии клеточных генов с целью снижения вирусной репродукции имеет преимущество над миРНК, направленными на вирусный геном. Это обусловлено высокой склонностью вирусов гриппа к мутационной изменчивости, приводящей к заменам тех или иных нуклеотидных последовательностей в их геноме [39]. Поэтому ранее подобранная к определенному участку матричной РНК миРНК может стать неэффективной,

и вирус ускользнет от ее действия, поскольку даже единичная замена в последовательности РНК-мишени способна полностью нивелировать эффект от применения миРНК [40]. Например, способность ускользать от миРНК была экспериментально продемонстрирована на модели инфекции ВИЧ-1, где в генах *tat*, *nef*, *int* и *att* происходили нуклеотидные замены, в результате чего эффект применения миРНК не наблюдался [41]. На этом фоне, по мнению А. Karlas и М. Lesch, более оправданным является применение миРНК, направленных к клеточному геному, поскольку риск возникновения альтернативного пути вирусной репродукции очень низок [30]. Перспективность данного подхода, основой которого является подавление активности клеточных генов, необходимых для репродукции вируса гриппа, показана в ряде независимых исследований [26, 30, 42, 43].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время сохраняется потребность в создании высокоэффективных лекарственных

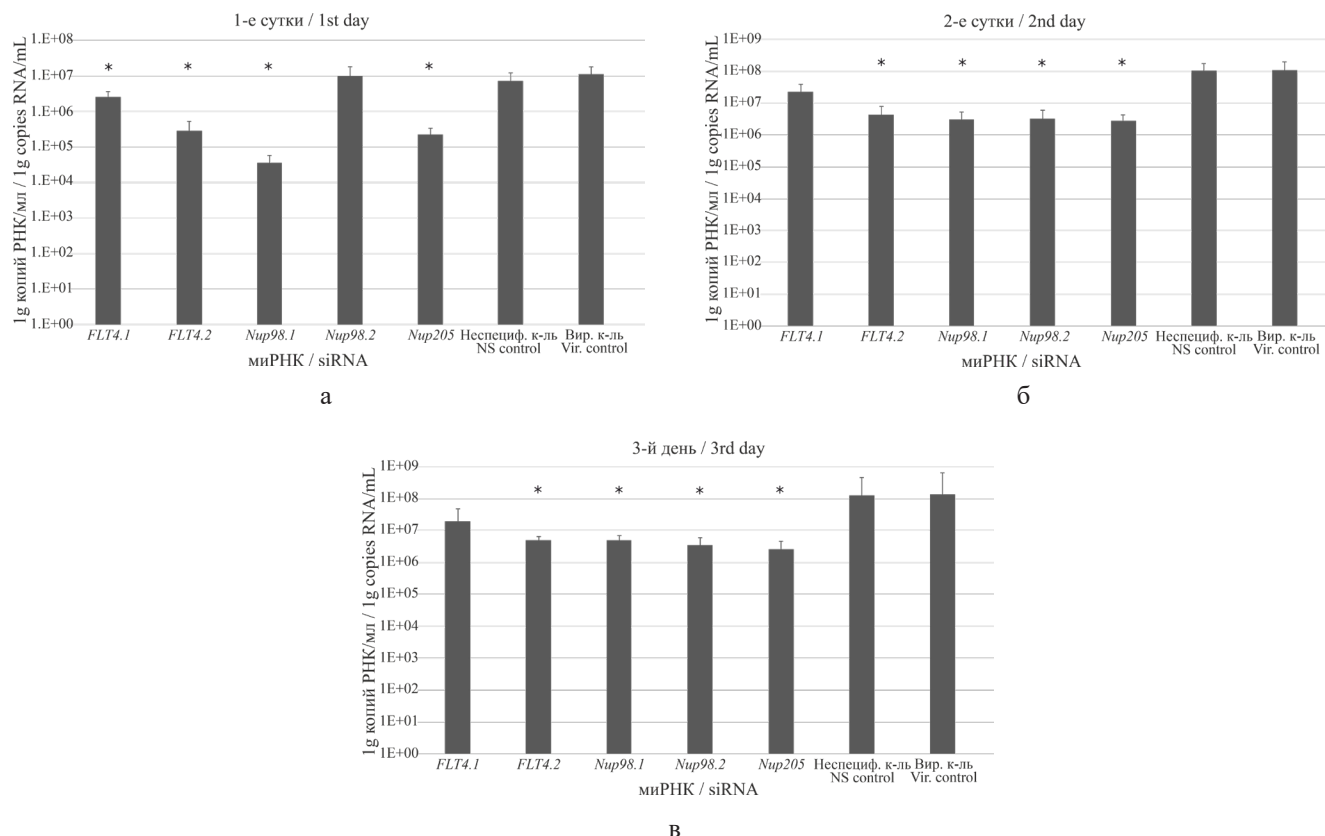


Рис. 3. Влияние миРНК на концентрацию вирусной РНК.
(а) 1-е сутки после инфекции (п.и.), (б) 2-е сутки п.и., (в) 3-и сутки п.и.
Fig. 3. The effect of siRNA on the concentration of viral RNA.
(a) 1st day post infection (p.i.), (b) 2nd day p.i., and (c) 3rd day p.i.

препаратов для лечения гриппа и его осложнений. В исследовании получены данные, показывающие, что миРНК, направленные к клеточным генам, играющим важные роли в процессе эндоцитоза вируса, ядерного импорта и экспорта вРНК, достоверно эффективно снижают репродукцию вируса гриппа *in vitro*. Эти данные подтверждают, что исследованные гены человека *FLT4*, *Nup98* и *Nup205* являются перспективными мишенями для разработки противогриппозных препаратов. Результаты исследования дают надежду на то, что в будущем применение миРНК в качестве лекарственных средств будет реализовано.

Благодарности

Авторы выражают благодарность центру коллективного пользования НИИВС им И.И. Мечникова. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Center for Shared Use of the I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera. The study was not sponsored.

Вклад авторов

Е.А. Пашков, Е.Р. Корчевая, А.А. Ртищев, Б.С. Черепович – выполнение экспериментов;

Е.А. Пашков, Е.П. Быстрицкая, Ю.Е. Дронина – написание текста статьи, анализ полученных результатов;

Е.Б. Файзулов, А.В. Поддубиков, А.В. Сидоров – научное редактирование;

А.С. Быков, О.А. Свитиш, В.В. Зверев – идея исследования, общее руководство.

Authors' contributions

Е.А. Pashkov, Е.Р. Korchevaya, А.А. Rtishchev, and В.С. Cherepovich – conducting the experiments;

Е.А. Pashkov, Е.Р. Bystritskaya, and Yu.E. Dronina – writing the text of the article and the analysis of the obtained results;

Е.В. Fayzuloev, А.В. Poddubikov, and А.В. Sidorov – scientific editing;

А.С. Bykov, О.А. Svitich, and V.V. Zverev – idea of the study and general management.

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

The authors declare no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Hussain M., Galvin H.D., Haw T.Y., Nutsford A.N., Husain M. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management. *Infect. Drug Resist.* 2017 Apr 20;10:121–134. <https://doi.org/10.2147/IDR.S105473>
2. Peasah S.K., Azziz-Baumgartner E., Breese J, Meltzer M.I., Widdowson MA. Influenza cost and cost-effectiveness studies globally – a review. *Vaccine.* 2013;31(46):5339–5348. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.09.013>
3. Rezkalla S.H., Kloner R.A. Influenza-related viral myocarditis. *WMJ.* 2010;109(4):209–213. PMID: 20945722. URL: <https://wmjonline.org/wp-content/uploads/2010/109/4/209.pdf>
4. Nguyen J.L., Yang W., Ito K., Matte T.D., Shaman J., Kinney P.L. Seasonal Influenza Infections and Cardiovascular Disease Mortality. *JAMA Cardiol.* 2016;1(3):274–281. PMID: 27438105; PMCID: PMC5158013 <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2016.0433>
5. Ekstrand J.J. Neurologic complications of influenza. *Semin. Pediatr. Neurol.* 2012;19(3):96–100. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2012.02.004>
6. Edet A., Ku K., Guzman I., Dargham H.A. Acute Influenza Encephalitis/Encephalopathy Associated with Influenza A in an Incompetent Adult. *Case Rep. Crit. Care.* 2020;2020:6616805. <https://doi.org/10.1155/2020/6616805>
7. Err H., Wiwanitkit V. Emerging H6N1 influenza infection: renal problem to be studied. *Ren. Fail.* 2014;36(4):662. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2014.883934>
8. Ленева И.А., Егоров А.Ю., Фалынскова И.Н., Махмудова Н.Р., Карташова Н.П., Глубокова Е.А., Вартанова Н.О., Поддубиков А.В. Индукция вторичной бактериальной пневмонии у мышей при заражении пандемическим и лабораторным штаммами вируса гриппа H1N1. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2019;(1):68–74. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-68-74>
[Ленева И.А., Егоров А.Ю., Фалынскова И.Н., Махмудова Н.Р., Карташова Н.П., Глубокова Е.А., Вартанова Н.О., Поддубиков А.В. Induction of secondary bacterial pneumonia in mice infected with pandemic and laboratory strains of the H1N1 influenza virus. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2019;(1):68–74 (in Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-68-74>]
9. Metersky M.L., Masterton R.G., Lode H., File T.M. Jr., Babinchak T. Epidemiology, microbiology, and treatment considerations for bacterial pneumonia complicating influenza. *Int. J. Infect. Dis.* 2012;16(5):e321–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.01.003>
10. Vanderbeke L., Spriet I., Breynaert C., Rijnders B.J.A., Verweij P.E., Wauters J. Invasive pulmonary aspergillosis complicating severe influenza: epidemiology, diagnosis and treatment. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2018;31(6):471–480. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000504>
11. Van der Vries E., Schutten M., Fraaij P., Boucher C., Osterhaus A. Influenza virus resistance to antiviral therapy. *Adv. Pharmacol.* 2013;67:217–246. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405880-4.00006-8>
12. Han J., Perez J., Schafer A., Cheng H., Peet N., Rong L., Manicassamy B. Influenza Virus: Small Molecule Therapeutics and Mechanisms of Antiviral Resistance. *Curr. Med. Chem.* 2018;25(38):5115–5127. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170920165926>
13. Looi Q.H., Foo J.B., Lim M.T., Le C.F., Show P.L. How far have we reached in development of effective influenza vaccine? *Int. Rev. Immunol.* 2018;37(5):266–276. <https://doi.org/10.1080/08830185.2018.1500570>
14. Pleguezuelos O., James E., Fernandez A., Lopes V., Rosas L.A., Cervantes-Medina A., Cleath J., Edwards K., Neitzey D., Gu W., Hunsberger S., Taubenberger J.K., Stoloff G., Memoli M.J. Efficacy of FLU-v, a broad-spectrum influenza vaccine, in a randomized phase IIb human influenza challenge study. *NPJ Vaccines.* 2020;5(1):22. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0174-9>
15. Wang F., Chen G., Zhao Y. Biomimetic nanoparticles as universal influenza vaccine. *Smart Mater. Med.* 2020;1:21–23. <https://doi.org/10.1016/j.smaim.2020.03.001>
16. Smith M. Vaccine safety: medical contraindications, myths, and risk communication. *Pediatr. Rev.* 2015;36(6):227–238.
17. Wang J., Wu Y., Ma C., Fiorin G., Wang J., Pinto L.H., et al. Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013;110(4):1315–1320. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216526110>
18. Leneva I.A., Russell R.J., Boriskin Y.S., Hay A.J. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: Implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antiviral Res.* 2009;81(2):132–140. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.10.009>
19. Hurt A.C., Ernest J., Deng Y.M., Iannello P., Besselaar T.G., Birch C., et al. Emergence and spread of oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) viruses in Oceania, Southeast Asia and South Asia. *Antiviral Res.* 2009;83(1):90–93. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.03.003>
20. Hurt A.C. The epidemiology and spread of drug resistant human influenza viruses. *Curr. Opin. Virol.* 2014;8:22–29. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.04.009>
21. Lampejo T. Influenza and antiviral resistance: an overview. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020;39(7):1201–1208. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03840-9>
22. Fire A.Z. Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death Differ.* 2007;14(12):1998–2012. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402253>
23. Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mell C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998;391(6669):806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
24. Файзулов Е.Б., Никонова А.А., Зверев В.В. Перспективы создания противовирусных препаратов на основе малых интерферирующих РНК. *Вопросы вирусологии.* 2013;(S1):155–169. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/perspektivy-sozdaniya-protivovirusnyh-preparatov-na-osnove-malyh-interferiruyuschih-rnk>
- [Faizuloev E.B., Nikonova A.A., Zverev V.V. Prospects for the development of antiviral drugs based on small interfering RNAs. *Voprosy virusologii = Problems of Virology.* 2013;(S1):155–169 (in Russ.). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/perspektivy-sozdaniya-protivovirusnyh-preparatov-na-osnove-malyh-interferiruyuschih-rnk/viewer>]
25. McManus M.T., Sharp P.A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* 2002;3(10):737–747. <https://doi.org/10.1038/nrg908>
26. Estrin M.A., Hussein I.T.M., Puryear W.B., Kuan A.C., Artim S.C., Runstadler J.A. Host-directed combinatorial RNAi improves inhibition of diverse strains of influenza A virus in human respiratory epithelial cells. *PLoS One.* 2018;13(5):e0197246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197246>

27. Janssen H.L., Reesink H.W., Lawitz E.J., Zeuzem S., Rodriguez-Torres M., Patel K., van der Meer A.J., Patick A.K., Chen A., Zhou Y., Persson R., King B.D., Kauppinen S., Levin A.A., Hodges M.R. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* 2013;368(18):1685–1394. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1209026>
28. Qureshi A., Tantray V.G., Kirmani A.R., Ahangar A.G. A review on current status of antiviral siRNA. *Rev. Med. Virol.* 2018;28(4):e1976. <https://doi.org/10.1002/rmv.1976>
29. Hoy S.M. Patisiran: First Global Approval. *Drugs.* 2018;78(15):1625–1631. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0983-6>
30. Lesch M., Luckner M., Meyer M., Weege F., Gravenstein I., Raftery M., Sieben C., Martin-Sancho L., Imai-Matsushima A., Welke R.W., Frise R., Barclay W., Schönrich G., Herrmann A., Meyer T.F., Karlas A. RNAi-based small molecule repositioning reveals clinically approved urea-based kinase inhibitors as broadly active antivirals. *PLoS Pathog.* 2019;15(3):e1007601. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007601>
31. Karlas A., Machuy N., Shin Y., Pleissner K.P., Artarini A., Heuer D., et al. Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature.* 2010;463(7282):818–822. <https://doi.org/10.1038/nature08760>
32. Arenas-Hernandez M., Vega-Sanchez R. Housekeeping gene expression stability in reproductive tissues after mitogen stimulation. *BMC Res. Notes.* 2013;6:285. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-285>
33. Lee H.K., Loh T.P., Lee C.K., Tang J.W., Chiu L., Koay E.S. A universal influenza A and B duplex real-time RT-PCR assay. *J. Med. Virol.* 2012;84(10):1646–1651. <https://doi.org/10.1002/jmv.23375>
34. Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016;5(2):85–86. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
35. Eierhoff T., Hrncius E.R., Rescher U., Ludwig S., Ehrhardt C. The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS Pathog.* 2010;6(9):e1001099. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001099>
36. Shaw M.L., Stertz S. Role of Host Genes in Influenza Virus Replication. In: Tripp R., Tompkins S. (Eds.). *Roles of Host Gene and Non-coding RNA Expression in Virus Infection. Current Topics in Microbiology and Immunology.* 2017;419:151–189. https://doi.org/10.1007/82_2017_30
37. Watanabe T., Watanabe S., Kawaoka Y. Cellular networks involved in the influenza virus life cycle. *Cell Host & Microbe.* 2010;7(6):427–439. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.008>
38. Hussain M., Galvin H.D., Haw T.Y., Nutsford A.N., Husain M. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management. *Infect. Drug Resist.* 2017;10:121–134. <https://doi.org/10.2147/IDR.S105473>
39. Sanjuán R., Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016;73(23):4433–4448. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6>
40. Presluid J.B., Novella I.S. RNA viruses and RNAi: quasispecies implications for viral escape. *Viruses.* 2015;7(6):3226–3240. <https://doi.org/10.3390/v7062768>
41. Das A.T., Brummelkamp T.R., Westerhout E.M., Vink M., Madiredjo M., Bernards R., et al. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J. Virol.* 2004;78(5):2601–5. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.5.2601-2605.2004>
42. Rupp J.C., Locatelli M., Grieser A., Ramos A., Campbell P.J., Yi H., et al. Host cell copper transporters CTR1 and ATP7A are important for Influenza A virus replication. *Virol. J.* 2017;14(1):11. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0671-7>
43. Wang R., Zhu Y., Zhao J., Ren C., Li P., Chen H., et al. Autophagy Promotes Replication of Influenza A Virus *In Vitro*. *J. Virol.* 2019;93(4):e01984–18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01984-18>

Об авторах:

Пашков Евгений Алексеевич, аспирант, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), (119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, с. 2); младший научный сотрудник, лаборатория молекулярной иммунологии, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (105064, Россия, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5А). E-mail: pashckov.j@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5682-4581>

Файзулов Евгений Бахтиёрович, к.б.н., заведующий лабораторией молекулярной вирусологии, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (105064, Россия, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5А). E-mail: faizulov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

Корчевая Екатерина Романовна, младший научный сотрудник, лаборатория молекулярной вирусологии, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (105064, Россия, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5А). E-mail: c.korchevaya@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

Ртищев Артём Андреевич, младший научный сотрудник, лаборатория РНК-содержащих вирусов, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (105064, Россия, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5А). E-mail: rtishchevartyom@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4212-5093>

Черепович Богдан Сергеевич, младший научный сотрудник, лаборатория РНК-содержащих вирусов, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (105064, Россия, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5А). E-mail: bogdancherepovich@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5803-6263>

Сидоров Александр Викторович, к.б.н., заведующий лабораторией ДНК-содержащих вирусов, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (105064, Россия, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5А). E-mail: sashasidorov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>

Поддубиков Александр Владимирович, к.б.н., заведующий лабораторией микробиологии условно-патогенных бактерий, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (105064, Россия, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5А). E-mail: poddubikov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>

Быстрицкая Елизавета Петровна, младший научный сотрудник, лаборатория молекулярной вирусологии, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (105064, Россия, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5А). E-mail: lisabystritskaya@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8430-1975>

Дроница Юлия Евгеньевна, к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), (119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, с. 2); старший научный сотрудник, лаборатория легионеллеза, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: droninayu@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6269-2108>

Быков Анатолий Сергеевич, д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), (119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, с. 2). E-mail: 9153183256@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8099-6201>

Свитич Оксана Анатольевна, чл.-корр. РАН, д.м.н., директор, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (105064, Россия, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5А); профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), (119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, с. 2). E-mail: svitichoa@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

Зверев Виталий Васильевич, академик РАН, д.б.н., научный руководитель Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (105064, Россия, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5А); заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), (119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, с. 2). E-mail: vitalyzverev@outlook.com, <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

About the authors:

Evgeny A. Pashkov, Postgraduate Student, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) (8, Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russia); Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution "I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera" (5A, Malyi Kazennyi pereulok, Moscow, 105064, Russia). E-mail: pashkov.j@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5682-4581>

Evgeny B. Faizuloev, Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Molecular Virology, Federal State Budgetary Scientific Institution "I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera" (5A, Malyi Kazennyi pereulok, Moscow, 105064, Russia). E-mail: faizuloev@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

Ekaterina R. Korchevaya, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Virology, Federal State Budgetary Scientific Institution "I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera" (5A, Malyi Kazennyi pereulok, Moscow, 105064, Russia). E-mail: c.korchevaya@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

Artem A. Rtishchev, Junior Researcher, Laboratory of RNA viruses, Federal State Budgetary Scientific Institution "I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera" (5A, Malyi Kazennyi pereulok, Moscow, 105064, Russia). E-mail: rtishchevartyom@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4212-5093>

Bogdan S. Cherepovich, Junior Researcher, Laboratory of RNA viruses, Federal State Budgetary Scientific Institution "I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera" (5A, Malyi Kazennyi pereulok, Moscow, 105064, Russia). E-mail: bogdancherepovich@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5803-6263>

Alexander V. Sidorov, Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of DNA viruses, Federal State Budgetary Scientific Institution "I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera" (5A, Malyi Kazennyi pereulok, Moscow, 105064, Russia). E-mail: sashasidorov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>

Alexander A. Poddubikov, Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Microbiology of Opportunistic Pathogenic Bacteria, Federal State Budgetary Scientific Institution "I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera" (5A, Malyi Kazennyi pereulok, Moscow, 105064, Russia). E-mail: poddubikov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>

Elizaveta P. Bystritskaya, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution "I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera" (5A, Malyi Kazennyi pereulok, Moscow, 105064, Russia). E-mail: lisabystritskaya@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8430-1975>

Yuliya E. Dronina, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) (8, Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russia); Senior Researcher, Laboratory of Legionellosis, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center) (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: droninayu@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6269-2108>

Anatoly S. Bykov, Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) (8, Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: 9153183256@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8099-6201>

Oxana A. Svitich, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Med.), Head of the Federal State Budgetary Scientific Institution "I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera," Head of the Laboratory of Molecular Immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution "I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera" (5A, Malyi Kazennyi pereulok, Moscow, 105064, Russia); Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) (8, Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: svitichoa@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

Vitaliy V. Zverev, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biol.), Scientific Director of the Federal State Budgetary Scientific Institution "I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera" (5A, Malyi Kazennyi pereulok, Moscow, 105064, Russia); Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) (8, Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: vitalyzverev@outlook.com, <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

*Поступила: 30.10.2021; получена после доработки: 12.11.2021; принята к опубликованию: 03.12.2021.
The article was submitted: October 30, 2021; approved after reviewing: November 13, 2021; accepted for publication: December 03, 2021.*