

ОБЗОРЫ



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Перспектива создания специфических противогриппозных препаратов на основе синтетических малых интерферирующих РНК

Пашков Е.А.^{1,2}, Файзулов Е.Б.², Свитич О.А.^{1,2}, Сергеев О.В.^{1,3}, Зверев В.В.^{1,2}¹ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия;² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Минздрава России, 105064, Москва, Россия;³ ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия

Грипп является одной из самых актуальных проблем здравоохранения во всём мире. Ежегодно гриппом болеют до 15% населения земли, из них около 500 тыс. человек умирают. Особую клиническую значимость представляют вирусы гриппа А и В, имеющие высокий эпидемический и пандемический потенциал. Помимо поражения дыхательных путей, грипп способен вызвать осложнения со стороны сердечно-сосудистой и центральной нервной системы. Несмотря на широкий спектр специфически направленных на различные стадии вирусной репродукции противогриппозных препаратов, наиболее остро стоит проблема формирования вирусной резистентности к традиционным лекарственным препаратам, что требует поиска новых технологий для её преодоления. Перспективным представляется создание лекарственных препаратов, действие которых основано на ингибировании активности вирусных или клеточных генов под влиянием механизмов РНК-интерференции. РНК-интерференция – это каскад регуляторных реакций в эукариотических клетках, вызванный чужеродной экзогенной двухцепочечной РНК, в результате чего происходит расщепление целевой матричной РНК. В настоящем обзоре рассматриваются использование механизма РНК-интерференции при разработке специфически направленных противогриппозных средств, а также перспективы, преимущества и недостатки данного подхода. Необходимо учитывать, что важным фактором, снижающим эффективность РНК-интерференции, является формирование резистентности вирусов к действию малых интерферирующих РНК, направленных к вирусным генам. Ввиду этого для преодоления лекарственной устойчивости вируса гриппа наиболее пристального внимания заслуживает исследование применения малых интерферирующих РНК, направленных непосредственно к факторам клетки-хозяина, которые необходимы для репродукции вируса гриппа.

Ключевые слова: грипп; РНК-интерференция; малые интерферирующие РНК; лекарственная резистентность; вирусы гриппа А и В; нокдаун гена.

Для цитирования: Пашков Е.А., Файзулов Е.Б., Свитич О.А., Сергеев О.В., Зверев В.В. Перспектива создания специфических противогриппозных препаратов на основе синтетических малых интерферирующих РНК. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(4): 182-190. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-182-190>

Для корреспонденции: Пашков Евгений Алексеевич, мл. науч. сотр. ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия. E-mail: pashckov.j@yandex.ru

Участие авторов: Пашков Е.А., Файзулов Е.Б. – сбор и обработка материалов; Зверев В.В., Сергеев О.В., Свитич О.А. – написание текста, заключение; Сергеев О.В., Свитич О.А. – научное редактирование; Зверев В.В. – резюме, общая редакция.

Финансирование. Авторы благодарят «Сеченовский Университет» за финансирование в рамках проекта «Университетский грант – 2020».

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

Поступила 29.07.2020

Принята в печать 04.08.2020

The potential of synthetic small interfering RNA-based antiviral drugs for influenza treatment

Evgeny A. Pashkov^{1,2}, Evgeny B. Faizuloev², Oxana A. Svitich^{1,2}, Oleg V. Sergeev^{1,3}, Vitaliy V. Zverev^{1,2}

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

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

³ National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia

Influenza is a worldwide public health problem. Annually, this infection affects up to 15% of the world population; and about half a million people die from this disease every year. Moreover, influenza A and B viruses tend to garner most of the attention, as these types are a major cause of the epidemics and pandemics. Although the influenza virus primarily affects the respiratory tract, it may also affect the cardiovascular and central nervous systems. Several antiviral drugs, that target various stages of viral reproduction, have been considered effective for the treatment and prevention of influenza, but some virus strains become resistant to these medications. Thus, new strategies and techniques should be developed to overcome the antiviral drug resistance. Recent studies suggest that new drugs based on RNA interference (RNAi) appear to be a promising therapeutic approach that regulates the activity of viral or cellular genes. As it is known, the RNAi is a eukaryotic gene regulatory mechanism that can be triggered by a foreign double-stranded RNA (dsRNA) and results in the cleavage of the target messenger RNA (mRNA). This review discusses the prospects, advantages, and disadvantages of using RNAi in carrying out a specific treatment for influenza infection. However, some viruses confer resistance to small interfering RNAs (siRNA) targeting viral genes. This problem can significantly reduce the effectiveness of RNAi. Therefore, applying siRNAs targeting host cell factors required for influenza virus reproduction can be a way to overcome the antiviral drug resistance.

Keywords: influenza; RNA-interference; small interfering RNA; drug resistance; influenza virus A and B; gene knockdown.

For citation: Pashkov E.A., Faizuloev E.B., Svitich O.A., Sergeev O.V., Zverev V.V. The potential of synthetic small interfering RNA-based antiviral drugs for influenza treatment. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2020; 65(4): 182-190. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-182-190>

For correspondence: Evgeniy A. Pashkov, junior researcher of I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia. E-mail: pashckov.j@yandex.ru

Information about the authors:

Pashkov E.A., <https://orcid.org/0000-0002-5682-4581>

Faizuloev E. B., <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

Svitich O.A., <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

Zverev V.V., <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

Sergeev O.V., <https://orcid.org/0000-0003-3407-2224>

Contribution: Pashkov E.A., Faizuloev E.B. – collection and processing of materials; Zverev V.V., Sergeev O.V. – writing a text, conclusion; Faizuloev E.B., Svitich O.A. – scientific editing; Zverev V.V. – resume, general edition.

Acknowledgments. The authors are grateful to I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) for financing within the framework of the University Grant 2020 project.

Conflict of interests. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Received 27 July 2020

Accepted 04 August 2020

Грипп является одной из самых актуальных проблем мирового здравоохранения. Ежегодно гриппом болеют до 15% населения земли, из них около 500 тыс. человек умирают [1]. Вирус гриппа поражает дыхательные пути человека, но осложнения гриппа могут затронуть не только респираторную, но и сердечно-сосудистую, и центральную нервную систему [2–4]. Особую клиническую значимость представляют вирусы рода *Alphainfluenzavirus* (*Influenza A virus*, вирус гриппа А, ВГА) и *Betainfluenzavirus* (*Influenza B virus*, вирус гриппа В, ВГВ), принадлежащие к семейству *Orthomyxoviridae* (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>), поскольку они являются причиной тяжёлых заболеваний и имеют высокий эпидемический и пандемический потенциал [5].

Терапия гриппа проблематична, поскольку вирус, в силу присущей ему высокой изменчивости, способен быстро вырабатывать резистентность к специфическим противогриппозным препаратам. Альтернативным перспективным подходом к созданию противогриппозных препаратов является использование специфических малых интерферирующих РНК (миРНК), которые могут быть нацелены на вирусные гены, либо на мРНК клеточных генов, важных для репродукции вирусов гриппа.

Цель данного обзора – оценка перспектив применения метода РНК-интерференции при разработке специфических противогриппозных препаратов.

Для лечения гриппа применяется широкий спектр этиотропных, патогенетических, симптоматических

и специфических препаратов. Особый интерес представляют специфические препараты, направленные на подавление репродукции вируса гриппа и разрешённые для клинического применения.

Производные адамантана (амантадин и ремантадин). В результате действия препаратов этого ряда эндосома, содержащая вирус гриппа, не сливается с оболочкой вируса и выход вирусного рибонуклеопротеина из неё вследствие блокировки ионного канала, сформированного белком M2, не происходит. Однако ионный канал, формируемый белком M2, у вируса гриппа В выстлан полярными аминокислотами, соответственно применение препаратов адамантанового ряда в отношении ВГВ неоправданно, поскольку присутствие полярных (гидрофильных) остатков аминокислот уменьшает эффект гидрофобного препарата – адамантана [6]. Недостатком этих препаратов является то, что практически все циркулирующие в настоящее время штаммы вирусов гриппа приобрели устойчивость к ним. Если у циркулировавших до 2004 г. ВГА наблюдалась резистентность менее 1%, то с 2004 по 2016 г. в Австралии, Азии, Европе и США у таких штаммов, как A/California/07/2009 (H1N1), A/Texas/04/2009 (H1N1), A/Denmark/524/2009 (H1N1), A/Denmark/528/2009 (H1N1) и A/WSN/33 (H1N1) была выявлена более чем 95%-ная устойчивость к производным адамантана, в результате появления у них мутации S31N в гене M2 [7].

Ингибиторы нейраминидазы (озельтамивир, занамивир, перамивир). Препараты этого ряда подавляют проникновение вирусов в клетку путём отщепления остатков сиаловой кислоты с поверхности клеточной стенки. В разные эпидемические сезоны чувствительность штаммов ВГА и ВГВ по отношению к ним сильно различалась. Так, в сезон 2008–2009 гг. почти все циркулирующие вирусы гриппа А (H1N1) были устойчивы к озельтамивиру [8, 9]. С 2017 по 2018 г. циркулирующие вирусы гриппа А (H1N1) были восприимчивы к озельтамивиру и перамивиру на 99%, а к занамивиру – на 100% [10].

Ингибитор слияния умифеновир (Арбидол®). Данный препарат блокирует слияние липидной оболочки вируса с мембранами эндосомы, что предотвращает выход vРНК из эндосомы [11]. Известно, что некоторые циркулирующие штаммы резистентны к данному препарату. Так, у реассортантов, образованных от штаммов A/Singapore/1/57 и A/chicken/Germany/27/Weybridge, лишь на 50% снижалась репродукция при дозировке арбидола 10 мкг/мл [12].

Ингибиторы вирусных полимераз (фавипиравир и пр.). Они эффективны в отношении штаммов вируса гриппа, резистентных к препаратам адамантанового ряда и ингибиторам нейраминидазы [13]. Механизм действия фавипиравира заключается в том, что в клетке под воздействием протеаз он фосфорилируется в свою активную форму – фавипиравир-рибофуранозил-5'-трифосфат (F-RTP), что приводит к ингибированию РНК-зависимой РНК-полимеразы, в результате чего тормозится репродукция вируса гриппа [14]. Установлено, что замена Lys229 на Arg в белке PB1 приво-

дит к формированию устойчивости в отношении фавипиравира, что было продемонстрировано на штамме вируса гриппа A/England/195/2009 (H1N1) [15].

Таким образом, несмотря на широкий спектр специфических противогриппозных препаратов, остро стоит проблема формирования вирусной резистентности к ним [16]. Для её преодоления необходимы принципиально новые противовирусные препараты. Одна из перспективных технологий создания специфических противовирусных препаратов основана на механизме РНК-интерференции.

РНК-интерференция – это регуляторный путь эукариотических клеток, индуцированный двухцепочечной молекулой РНК [17]. Явление РНК-интерференции было открыто Э. Файром и К. Мелло в 1998 г. у нематоды *Caenorhabditis elegans*. Этими исследователями также были описаны основные особенности РНК-интерференции, которые доказывают, что при ней расщепляется матричная РНК (мРНК); двухцепочечная РНК (дцРНК), определяющие узнавание комплементарного участка мРНК-мишени, эффективнее, чем одноцепочечная РНК (оцРНК); для подавления экспрессии гена необходим короткий фрагмент дцРНК [18]. В 2006 г. Э. Файр и К. Мелло получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине за открытие явления РНК-интерференции – механизма сайленсинга генов при участии дцРНК.

Сущность РНК-интерференции заключается в подавлении экспрессии гена-мишени под влиянием миРНК (*siRNA*) [19–21]. Механизм РНК-интерференции состоит в том, что эндонуклеаза Dicer расщепляет экзогенную чужеродную дцРНК на отдельные двухцепочечные последовательности длиной от 21 до 25 пар нуклеотидов, которые и есть миРНК. Далее миРНК связывается с белковым комплексом *RISC (RNA-induced silencing complex)*, в состав которого входит белок *Ago2* из семейства *Argonaute*, белок *PACT* и белок *TRBP*, который распознает и расщепляет мРНК-мишень [22, 23].

Создание лекарственных препаратов, действие которых основано на ингибировании активности целевых генов путём РНК-интерференции, представляется перспективным направлением, эффективность которого исследуется в отношении широкого спектра заболеваний различной этиологии, в том числе инфекционных. На данный момент разработаны и проходят стадии клинических испытаний такие препараты, как *Miravirsen* (против гепатита С), *ARC-520* и *ARC-521* (против гепатита В), *ALN-RSV01* (против респираторно-синцитиальной вирусной инфекции), *pHIV7-sh1-TAR-CCR5RZ* (против ВИЧ-инфекции) [22, 24–26].

Традиционный подход к разработке противовирусных препаратов – дизайн миРНК, мишенью которых является вирусный геном. Метод РНК-интерференции был успешно испытан в одной из ранних работ Q. Ge и соавт. на двух модельных штаммах вируса гриппа: A/PR/8/34 (PR8) и A/WSN/33 (WSN) на разных клеточных культурах (Vero и MDCK). Были подобраны и исследованы около 20 миРНК, но наибольший эффект показали те, которые были направлены к мРНК вирусных

белков NP и PA. При наличии в клетке миРНК, специфичных к последовательностям мРНК белков NP и PA, приостанавливался синтез этих белков, что приводило к подавлению репродукции вируса, так как прекращались репликация и транскрипция вирусного генома [27].

В дальнейшем эти авторы исследовали эффективность данного подхода на модели *in vivo*. Исследование проводили с использованием штамма вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) на мышах. Вводили смесь, содержащую миРНК, путём эндотрахеального аэрозольного распыления. Были выбраны миРНК к генам NP, PA и PB1. В работе было показано, что использование миРНК как в терапевтических, так и в профилактических целях способно снижать репродукцию ВГА у мышей в эпителиальных клетках дыхательных путей. Доказан дозозависимый эффект препарата миРНК: при введении мышам 60 мкг миРНК к мРНК последовательности вирусного белка NP титр вируса в лёгких снижался на один порядок, тогда как при введении 120 мкг той же миРНК – в 1000 раз [28].

Успешное использование миРНК, направленных к вирусному геному, было показано в работе W. Zhiqiang и соавт. [29]. Авторы провели выравнивание последовательностей 8 сегментов РНК вируса гриппа A/Beijing/01/2009 (H1N1) и выбрали для конструирования миРНК наиболее консервативные области генов. Эффективность синтезированных миРНК оценивали по экспрессии вирусных генов при полимеразной цепной реакции (ПЦР) и с помощью титрования по цитопатическому действию. За 6 ч до инфицирования клеток A549 вирусом гриппа с множественностью заражения (МОИ), равной 0,001, авторы проводили на них трансфекцию выбранными миРНК. Из 35 созданных миРНК было отобрано 10, которые снижали экспрессию целевых генов ВГА на 70% и более: PB2-912, PB1-851, PB1-1067, PB1-1789, PA-1274, NP-574, NP-571, NP-1494, M-969, M-559. Через 1 сут определяли содержание вирусной РНК (вРНК) и вирусных белков с помощью ПЦР-РВ и вестерн-блоттинга.

В работе Н.У. Sui и соавт. [30] была определена консервативная последовательность вирусного гена белка M2, подобраны миРНК и продемонстрировано пролонгированное ингибирование репродукции ВГА в культуре клеток MDCK. В исследовании использовали 2 миРНК, направленные к белку M2 и 2 миРНК, направленные к гену NP [27], в качестве положительного контроля. Клетки MDCK были трансфицированы синтетическими миРНК и через 8 ч заражены штаммом вируса гриппа A/New Caledonia/20/1999 (H1N1) при МОИ = 0,005. Вирусосодержащую жидкость собирали через 48 ч и оценивали концентрацию вРНК методом количественной ОТ-ПЦР-РВ. Наибольший противовирусный эффект обеспечивала миРНК M-950, снижая репродукцию вируса гриппа на 80% относительно отрицательного контроля (миРНК к GFP). Кроме того, миРНК, направленные к гену белка M2, ингибировали репродукцию высоковирулентного A/Hong Kong/486/97 (H5N1) при МОИ = 0,5 и 0,05 в 3 раза, при МОИ = 0,005 – в 7 раз.

J. Piasecka и соавт. подобрали 9 миРНК (183, 412, 471, 613, 682, 901, 1008, 1090, 1312), нацеленных на различные участки последовательности мРНК 5-го сегмента вируса гриппа, которая кодирует белок NP. В работе использовали штаммы вируса гриппа A/California/04/2009 (H1N1), A/PR/8/34 (H1N1) и культуры клеток MDCK. В качестве положительного контроля применяли миРНК-1496, направленную к аналогичной последовательности мРНК гена NP [27–29]. Из девяти предложенных авторами последовательностей самый высокий ингибирующий эффект оказали миРНК 613 и 682, при использовании которых концентрация вирусной РНК снижалась от 78 до 85% в зависимости от штамма вируса по сравнению с отрицательным контролем [31].

В табл. 1 представлены наиболее эффективные вирусные гены-мишени, подавление которых с последующим эффективным снижением репродукции вируса гриппа было подтверждено в независимых исследованиях.

Следует отметить, что метод РНК-интерференции имеет ограничения. Помимо необходимости создания эффективного и безопасного средства доставки специфической миРНК в клетки лёгких, существует риск возникновения устойчивых к действию миРНК вирусов. В процессе репродукции популяции вирусов в заражённых клетках образуются квазивиды вирусов, среди которых под селективным влиянием миРНК будут получать преимущества вируса, имеющие нуклеотидные замены в сайте связывания с миРНК. Образование единичной мутации в последовательности РНК-мишени приводит к полной утрате эффекта РНК-интерференции [32]. Способность РНК-содержащих вирусов ускользать от воздействия РНК-интерференции экспериментально доказана на клеточной модели инфекции ВИЧ-1, который способен уходить от миРНК в результате появления нуклеотидных замен в генах *tat*, *nef*, *int* и *att* [33]. Кроме того, остро стоит проблема точной, безопасной и действенной доставки миРНК в клетки-мишени для вируса, поскольку миРНК – неустойчивое соединение и часто подвержена воздействию нуклеаз [34].

Альтернативным подходом к созданию противогриппозных препаратов является использование специфических миРНК, направленных к мРНК клеточных генов, важных для репродукции вирусов гриппа. Вирус гриппа способен к высокой изменчивости посредством не только мутаций и реассортаций, но и путём эпистаза, то есть благодаря парным мутациям, когда появление одной мутации ведёт к возникновению другой [35]. По мнению M. Lesch и соавт. [36], целесообразно влиять непосредственно на внутриклеточные структуры клетки-хозяина, способствующие репродукции вируса гриппа в клетке, поскольку вероятность появления альтернативного пути вирусной репродукции очень низка.

Эффективность использования миРНК, направленных на подавление клеточных факторов, была исследована в работах по полногеномному миРНК-скринингу с целью выявления перспективных мишеней для РНК-интерференции. В одной из первых работ

R. König и соавт. с использованием этого подхода обнаружили 295 клеточных факторов, необходимых для ранних стадий репродукции вируса гриппа. Из них авторами было выделено 23 наиболее эффективных гена-мишени, нокдаун которых не приводил к индукции значительной цитотоксичности. Исследование проведено на клеточных линиях A549 (аденокарцинома лёгкого человека) и штамме вируса гриппа A/WSN/33 [37].

В другой работе A. Karlas и соавт. [38] использовали двухэтапный подход для проведения полногеномного миРНК-скрининга. Первым шагом была трансфекция миРНК культуры клеток A549, через 48 ч их инфицировали штаммом вируса гриппа A/WSN/33, а после окрашивали специфическими антителами к ВГА. Вторым шагом был перенос вирусосодержащего супернатанта с A549 на репортерную культуру клеток почки эмбриона человека 293T, стабильно трансфицированную геном люциферазы, в которой после заражения вирусом гриппа запускается экспрессия транскриптов светляковой люциферазы, фланкированных нетранслируемым участком сегмента нуклеопротеина (NP) вируса гриппа A/WSN/33. Надёжность этого подхода подтвердили с помощью миРНК, направленной к мРНК вирусного белка NP, в результате чего блокировалась репродукция вируса гриппа.

В 2018 г. A. Karlas и соавт. провели масштабный миРНК-скрининг на клеточной модели инфек-

ции ВГА и ВГВ, в том числе A/WSN/1933(H1N1), A/Panama/2007/1999 (H3N2), ВГА птиц (A/Vietnam/1203/2004(H5N1)) и B/Thuringia/02/2006xB/Vienna/33/2006 для определения факторов клетки-хозяина, необходимых для репродукции вирусов гриппа. На основании скрининга установлено, что нокдаун таких генов, как *Nup98*, *Nup205*, *FLT4*, *COPA*, *ARCN1*, *COPG*, *NXF1*, *EIF3A*, *ATP6V0C*, *EIF4A3*, *COPB1*, *NME3*, *AP2M1*, *MAGI2*, *EIF3C*, *ROR2* приводит к достоверному подавлению репродукции ВГА и ВГВ. Затем в базе www.ingenuity.com искали лекарственные препараты, нацеленные на выявленные гены, необходимые для репродукции всех четырёх штаммов. В результате найдены два препарата, регорафениб и сорафениб, нацеленные на *FLT4*, с высокой противовирусной активностью при нетоксичных концентрациях в клетках A549. Эти препараты являются ингибиторами киназ и представляют особый интерес, поскольку ген *FLT4* кодирует белок-рецептор эпидермального фактора роста (EGF), а именно рецептор тирозинкиназы. Известно, что *EGF* принимает активное участие в проникновении вируса гриппа в клетку [39]. Авторами было установлено, что при применении регорафениба и сорафениба внутриклеточный уровень *EGF* оставался неизменным из-за нарушения закисления эндосом. Далее авторы описали влияние регорафениба и сорафениба на слияние вируса гриппа с мембраной эндосомы. Они пометили вирусные частицы двумя липофильными красителя-

Таблица 1. Вирусные гены, нокдаун которых эффективно подавляет репродукцию вируса гриппа*

Table 1. The inhibition of influenza virus reproduction using knockdown of virus genes*

Ген вируса гриппа A Gene of influenza A virus	Функция гена Gene function	Ссылка References
<i>NP</i>	Инкапсидация вирусного генома для осуществления транскрипции, репликации и упаковки вирусной РНК Viral genome encapsidation required for subsequent replication, transcription, and packaging of the viral RNA	[27] ^A [27] ^A [28]** ^B [28]** ^B [29] ^C [29] ^C [31] ^D [31] ^D
<i>PA</i>	Участие в процессе вирусной транскрипции Participation in the process of viral transcription	[27] ^A [27] ^A
<i>PB1</i>	Содержит SDD-последовательность, характерную для вирусных полимераз Contains SDD sequence characteristic of viral polymerases	[28]** ^B [28]** ^B [29] ^C [29] ^C
<i>PB2</i>	Распознавание «cap» на клеточных мРНК Recognition of «cap» on cellular mRNA	[27] ^A [27] ^A [29] ^C [29] ^C
<i>M2</i>	Стабилизация вирусной оболочки, формирование ионных каналов Viral envelope stabilization formation of ion channels	[27] ^A [27] ^A [30] ^E [30] ^E

Примечание. * Приведены вирусные гены-мишени для миРНК, нокдаун которых приводил к достоверному снижению вирусной репродукции в независимых исследованиях; ** в исследовании была использована модель животных; штаммы, использованные при проведении исследования: ^A – A/PR/8/34 (PR8), A/WSN/33 (WSN) subtypes H1N1; ^B – A/PR/8/34 (PR8) – в работе использовали животную модель; ^C – A/Beijing/01/2009 (H1N1); ^D – A/California/04/2009 (H1N1), A/PR/8/34 (H1N1); ^E – A/New Caledonia/ 20/1999 (H1N1), A/Hong Kong/486/97 (H5N1).

Note. * Findings from independent studies revealed that specific knockdown of miRNA-targeted virus genes resulted in the inhibition of viral reproduction; ** an animal model was used in the research. Virus strains used in the study: ^A – A/PR/8/34 (PR8), A/WSN/33 (WSN) subtypes H1N1; ^B – A/PR/8/34 (PR8); ^C – A/Beijing/01/2009 (H1N1); ^D – A/California/04/2009 (H1N1), A/PR/8/34 (H1N1); ^E – A/New Caledonia/ 20/1999 (H1N1), A/Hong Kong/486/97 (H5N1).

ми, красным DiI и зелёным DiOC18, которые генерировали между собой Фёрстеровский перенос энергии. Интактные меченые вирионы становились красными, когда происходил перенос энергии от DiOC18 к DiI, в то время как сдвиг в сторону зелёного DiOC18 свидетельствовал о том, что мембраны вируса и эндосомы сливаются и происходит рассеивание хромофоров, что уменьшает Фёрстеровский перенос энергии. Таким образом, авторами было доказано, что нарушаются процессы, необходимые для слияния. А. Karlas и соавт. также сравнили профилактическую (за 2 ч до заражения) и терапевтическую (через 4 ч после заражения) эффективность обоих препаратов. При профилактическом подходе эти препараты никак не влияли на репродукцию вируса гриппа. При терапевтическом применении сорафениба вирусная нагрузка снижалась в 10^9 раз. В супернатанте клеток, обработанных регорафенибом, вирус не обнаруживался. Данная работа показывает, что внутриклеточный процесс, строго необходимый для репродукции всех штаммов вирусов гриппа, – это нуклеоцитоплазматический транспорт. Следовательно, агенты, блокирующие нуклеоцитоплазматический транспорт, представляют собой пер-

спективных кандидатов для терапии гриппа, направленной на факторы хозяина. Авторами также изучена возможная эффективность подхода для вирусов других штаммов ВГА и ВГВ. Были протестированы шесть человеческих штаммов ВГА (A/WSN/33 (H1N1), A/Puerto Rico (H1N1), A/Hamburg/04/2009 (H1N1), A/Victoria/3/1975 (H3N2), A/Panama/2007/1999 (H3N2), A/England/691/2010/ (H3N2)), три птичьих штамма (A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), A/FPV/Bratislava/1979 (H7N7), A/Mallard/Germany/439/2004 (H3N2)) и два штамма ВГВ (B/Thuringia/02/2006xB/Vienna/33/2006, B/Brisbane/60/2008). Сорафениб был активен в отношении всех штаммов, в то время как регорафениб не показал значительного влияния на репродукцию птичьих штаммов. По мнению авторов, данный результат связан с различием в кислотной стабильности гемагглютинина птичьих и человеческих штаммов. При меньшей стабильности гемагглютинина нужны более высокие значения pH для слияния и образования эндосомы. Особый интерес представляет тот факт, что регорафениб и сорафениб влияют ещё и на вирусы, которые находятся в отдалённых друг от друга филогенетических группах, такие как хантавирусы, вирусы

Таблица 2. Клеточные гены, нокдаун которых эффективно подавляет репродукцию вируса гриппа в культуре клеток*

Table 2. The inhibition of influenza virus reproduction in cell culture using knockdown of cellular genes*

Клеточные гены (группы генов) Cellular gene (group of genes)	Функция гена Gene function	Стадия репродукции вируса гриппа Stage of influenza virus reproduction	Ссылка References
<i>ATP6API</i>	Участие в работе клеточных АТФаз Regulation of cellular ATPase activity	Защисление эндосомы для последующего выхода вирусной РНК Endosome acidification and subsequent release of viral RNA	[40] ^A [40] ^A [37] ^B [37] ^B
<i>COPIA ARCN1</i>	Транспорт белка от эндоплазматической сети к аппарату Гольджи, раннее созревание эндосомы Protein translocation from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. Early endosome maturation	Участие в процессе эндоцитоза Regulation of endocytosis	[38] ^C [38] ^C [40] ^A [40] ^A
<i>Nup98</i>	Участие в работе ядерно-порового комплекса Control of the nuclear pore complex functions	Импорт и экспорт в РНК из нуклеоплазмы Import and export of viral RNA through the nucleoplasm	[36] ^D [36] ^D [38] ^C [38] ^C [40] ^A [40] ^A
<i>NXF1</i>	Участие в работе ядерно-порового комплекса, регуляция сигналов ядерного экспорта Control of the nuclear pore complex functions regulation of nuclear export signals	Импорт и экспорт в РНК из нуклеоплазмы Import and export of viral RNA through the nucleoplasm	[36] ^D [36] ^D [40] ^A [40] ^A
<i>ATP6V0D</i>	Участие в работе клеточных АТФаз и в закислении внутренней среды эндосомы Regulation of cellular ATPase activity the decrease in internal pH of endosomes	Защисление эндосомы для последующего выхода в РНК Endosome acidification and subsequent release of viral RNA	

Примечание. * Приведены клеточные гены-мишени для миРНК, нокдаун которых приводил к достоверному снижению вирусной репродукции в независимых исследованиях.

Штаммы, использованные в исследовании: ^A – A/WSN/1933 (H1N1), A/New-Jersey/8/1976/ (H1N1), A/Netherlands/2629/2009 (H1N1), A/Hong Kong/8/68 (H3N2), A/Nanchang/933/1995 (H3N2), A/Brisbane/10/2007 (H3N2), A/WSN/15/2009 (H3N2), A/NWS/34(HA), A/RI/5/57(-NA) (H1N1), A/harbour seal/New Hampshire/2011 (H3N8), A/mallard/interior Alaska/6MP0758/2006 (H10N8), A/mallard/Interior Alaska/10BM05347R0/2010 (H7N3), Alaska/10BM02980R0/2010 (H9N2); ^B – A/Netherlands/602/2009 (H1N1), A/WSN/33 (H1N1); ^C – A/H1N1 (WSN), A/Panama/2007/1999 (H3N2), A/Vietnam/ 1203/2004 (H5N1), B/Thuringia/02/2006; ^D – A/H1N1 (A/WSN/33).

Note. * Findings from independent studies revealed that specific knockdown of cellular miRNA-targeted genes resulted in the inhibition of viral reproduction.

Virus strains used in the study: ^A – A/WSN/1933 (H1N1), A/New-Jersey/8/1976/ (H1N1), A/Netherlands/2629/2009(pH1N1), A/Hong Kong/8/68(H3N2), A/Nanchang/933/1995(H3N2), A/Brisbane/10/2007(H3N2), A/WSN/15/2009(H3N2), A/NWS/34(HA), A/RI/5/57(NA)(H1N1), A/harbour seal/New Hampshire/2011(H3N8), A/mallard/interior Alaska/6MP0758/2006(H10N8), A/mallard/Interior Alaska/10BM05347R0/2010(H7N3), Alaska/10BM02980R0/2010(H9N2); ^B – A/Netherlands/602/2009 (H1N1), A/WSN/33 (H1N1); ^C – A H1N1 (WSN), A/Panama/2007/1999(H3N2), A/Vietnam/ 1203/2004(H5N1), B/Thuringia/02/2006; ^D – A H1N1 (A/WSN/33).

везикулярного стоматита и простого герпеса 1 [36].

Перспективность подхода, основанного на подавлении активности клеточных генов, необходимых для репродукции вируса гриппа, показана в исследовании М. Estrin и соавт. [40]. Авторы отобрали группу генов, для которых ранее была определена важная роль в цикле репродукции вируса гриппа, и оценили эффективность профилактического и терапевтического применения миРНК, направленных к этим генам как раздельно, так и в виде комбинаций из нескольких миРНК на клетках A549. В работе использовали 12 штаммов ВГА, включая серотипы H1N1, H3N2, H1N2, H3N8, H10N8, H7N3, H9N2 и миРНК, направленные к генам *ATP6API*, *COPA*, *ARCNI*, *NUP98*, *RPS14*, *PGD*. миРНК к мРНК вирусного белка *NP* использовали в качестве положительного контроля. 1-я – 4-я комбинации миРНК ингибировали репродукцию вируса более чем на 70%. Для учёта полученных данных авторы использовали метод бляшкообразования.

В исследовании J. Rupp и соавт. было продемонстрировано, что миРНК, направленные к генам, влияющим на гомеостаз меди, снижают репродукцию вируса гриппа. Чтобы оценить противовирусный эффект, в клеточной линии A549 была проведена трансфекция миРНК к гену *CTR1*, который является высокоаффинным транспортёром меди, в заражённых клетках. Нокдаун *CTR1* привёл к снижению репродукции в 7,3 раза (через 24 ч, $p = 0,04$). Авторы считают, что влияние на внутриклеточный метаболизм меди с помощью миРНК можно использовать для профилактики и лечения гриппа [41].

Известно, что вирус гриппа блокирует процессы аутофагии, что, в свою очередь, приводит к накоплению аутофагосом из-за нарушения их слияния с лизосомами и способствует его репродукции внутри клетки [42]. Одну из ключевых ролей в аутофагии играют гены *ATG5* и *BECN1* [43, 44]. R. Wang и соавт. показали, что подавление образования аутофагосом с помощью миРНК, нацеленных на *ATG5* и *BECN1*, снижает репродукцию вируса гриппа. В клетках A549, инфицированных штаммом вируса гриппа (A/duck/Hubei/Hangmei01/2006 (H5N1)), была снижена экспрессия вирусных генов *PB1*, *PB2*, *PA*, *NP* и *M2*. По результатам вестерн-блоттинга, их экспрессия при использовании миРНК к *ATG5* снизилась в 4 раза относительно контрольной *GAPDH*, тогда как при использовании миРНК к *BECN1*, – в 2 раза [45].

В табл. 2 представлены наиболее эффективные клеточные гены-мишени, эффективность которых была подтверждена в независимых исследованиях.

Анализ научной литературы свидетельствует о большом потенциале механизмов РНК-интерференции для создания специфических противогриппозных препаратов. Учитывая, что на данный момент ни один лекарственный или профилактический препарат не обеспечивает полной защиты от гриппа, метод РНК-интерференции продолжает привлекать внимание исследователей. Однако следует понимать, что важным фактором, снижающим эффективность РНК-интерференции, является формирование резис-

тентности вирусов к действию миРНК, направленных к вирусным генам. С точки зрения преодоления лекарственной устойчивости вируса гриппа большого внимания заслуживает применение миРНК, направленных к факторам клетки-хозяина, которые необходимы для репродукции вируса.

ЛИТЕРАТУРА

- Peteranderl C., Herold S., Schmoldt C. Human influenza virus infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2016; 37(4): 487-500. DOI: <http://doi.org/10.1055/s-0036-1584801>
- Cheng A.C., Holmes M., Dwyer D.E., Senanayake S., Cooley L., Irving L.B., et al. Influenza epidemiology in patients admitted to sentinel Australian hospitals in 2018: the Influenza Complications Alert Network (FluCAN). *Commun. Dis. Intell.* (2018). 2019; 43. DOI: <http://doi.org/10.33321/cdi.2019.43.48>
- Chekkoth S.M., Supreeth R.N., Valsala N., Kumar P., Raja R.S. Spontaneous pneumomediastinum in H1N1 infection: uncommon complication of a common infection. *J. R. Coll Physicians. Edinb.* 2019; 49(4): 298-300. DOI: <http://doi.org/10.4997/JRCPE.2019.409>
- Mastrolia M.V., Rubino C., Resti M., Trapani S., Galli L. Characteristics and outcome of influenza-associated encephalopathy/encephalitis among children in a tertiary pediatric hospital in Italy, 2017-2019. *BMC Infect. Dis.* 2019; 19(1): 1012. DOI: <http://doi.org/10.1186/s12879-019-4636-5>
- Taubenberger J.K., Kash J.C. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic form. *Cell Host Microbe.* 2010; 7(6): 440-51. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.009>
- Pinto L.H., Lamb R.A. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(14): 8997-9000. DOI: <http://doi.org/10.1074/jbc.R500020200>
- 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): 1315-20. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.1216526110>
- Hurt A.C., Ernest J., Deng Y.M., Iannello P., Besselaar T.G., Birch C., et al. The emergence and spread of resistant influenza A (H1N1) viruses in Oceania, Southeast Asia and South Asia. *Antiviral Res.* 2009; (1): 90-3. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.03.003>
- Hurt A.C. The epidemiology and spread of drug resistant human influenza viruses. *Curr. Opin. Virol.* 2014; (8): 22-9. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.04.009>
- Lampejo T. Influenza and antiviral resistance: an overview. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 39(7): 1201-8. DOI: <http://doi.org/10.1007/s10096-020-03840-9>
- Киселев О.И., Малеев В.В., Деева Э.Г., Ленева И.А., Селькова Е.П., Осипова Е.А. и др. Клиническая эффективность препарата Арбидол (умифеновир) в терапии гриппа у взрослых: промежуточные результаты многоцентрового двойного слепого рандомизированного плацебо-контролируемого исследования АРБИТР. *Терапевтический архив.* 2015; 87(1): 88-96. DOI: <http://doi.org/10.17116/terarkh201587188-96>
- Ленева И.А., 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): 132-40. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.10.009>
- Furuta Y., Takahashi K., Kuno-Maekawa M., Sangawa H., Uehara S., Kozaki K., et al. Mechanism of action of T-705 against influenza virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49(3): 981-6. DOI: <http://doi.org/10.1128/AAC.49.3.981-986.2005>
- Sleeman K., Mishin V.P., Deyde V.M., Furuta Y., Klimov A.I., Gubareva L.V. In vitro antiviral activity of favipiravir (T-705) against drug-resistant influenza and 2009 A (H1N1) viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(6): 2517-24. DOI: <http://doi.org/10.1128/AAC.01739-0954>
- Goldhill D.H., Te Velthuis A.J.W., Fletcher R.A., Langat P., Zambon M., Lackenby A., et al. Barclay. The mechanism of resistance to favipiravir in influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018; 115(45): 11613-8. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.1811345115>
- Han J., Perez J., Schafer A., Cheng H., Peet N., Rong L., et al. Influenza virus: small molecule therapeutics and mechanisms of antiviral resistance. *Curr. Med. Chem.* 2018; 25(38): 5115-27. DOI: <http://doi.org/10.2174/0929867324666170920165926>

17. Fire A.Z. Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death Differ.* 2007; 14(12): 1998-2012.
DOI: <http://doi.org/10.1038/sj.sdd.4402253>
18. Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391(6669): 806-11.
DOI: <http://doi.org/10.1002/hep.30594>
19. Park S., Park J., Kim E., Lee Y. The Capicua-ETV 5 axis regulates liver-resident memory CD 8+ T cell development and the pathogenesis of liver injury. *Hepatology*. 2019; 70(1): 358-71.
DOI: <http://doi.org/10.1002/hep.30594>
20. Vaucheret X., Béclin C., Fagard M. Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell Sci.* 2001; 114(Pt. 17): 3083-91.
21. Sharp P.A. RNA-interference – 2001. *Genes Dev.* 2001; 15(5): 485-90.
DOI: <http://doi.org/10.1101/gad.880001>
22. Файзулов Е.Б., Никонова А.А., Зверев В.В. Перспективы создания противовирусных препаратов на основе малых интерферирующих РНК. *Вопросы вирусологии*. 2013; (Спец. 1): 159-69.
23. Haiyong H. RNA interference to knock down gene expression. *Methods Mol. Biol.* 2018; 1706: 293-302.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_16
24. van der Ree M.H., van der Meer A.J., van Nuenen A.C., de Bruijne J., Otossen S., Janssen H.L., et al. Miravirsin dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2016; 43(1): 102-13.
DOI: <http://doi.org/10.1111/apt.13432>
25. Soriano V., Barreiro P., Benitez L., Peña J.M., de Mendoza C. New antivirals for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2017; 26(7): 843-51.
DOI: <http://doi.org/10.1080/13543784.2017.1333105>
26. Qureshi A., Tantray V.G., Kirmani A.R., Ahangar A.G. A review on current status of antiviral siRNA. *Rev. Med. Virology*. 2018; 28(4): 1976.
DOI: <http://doi.org/10.1002/rmv.1976>
27. Ge Q., McManus M.T., Nguyen T., Shen C.H., Sharp P.A., Eisen H.N., et al. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003; 100(5): 2718-23.
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.0437841100>
28. Ge Q., Filip L., Bai A., Nguyen T., Eisen H.N., Chen J. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; 101(23): 8676-81.
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.0402486101>
29. Zhiqiang W., Yaowu Y., Fan Y., Jian Y., Yongfeng H., Lina Z., et al. Effective siRNAs inhibit the replication of novel influenza A (H1N1) virus. *Antiviral Res.* 2010; 85(3): 559-61.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.12.010>
30. Sui H.Y., Zhao G.Y., Huang J.D., Jin D.Y., Yuen K.Y., Zheng B.J. Small interfering RNA targeting M2 gene induces effective and long-term inhibition of influenza A virus replication. *PLoS One*. 2009; 4(5): 5671.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0005671>
31. Piasecka J., Lenartowicz E., Soszynska-Jozwiak M., Szutkowska B., Kierzek R., Kierzek E. RNA Secondary structure motifs of the influenza A virus as targets for siRNA-mediated RNA interference. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2020; 19: 627-42.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.12.018>
32. Presloid J.B., Novella I.S. RNA viruses and RNAi: quasispecies implications for viral escape. *Viruses*. 2015; 7(6): 3226-40.
DOI: <http://doi.org/10.3390/v7062768>
33. Das A.T., Brummelkamp T.R., Westerhout E.M., Vink M., Madireddy M., Bernards R., et al. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J. Virol.* 2004; 78(5): 2601-5.
DOI: <http://doi.org/10.1128/jvi.78.5.2601-2605.2004>
34. Nikam R.R., Gore K.R. Journey of siRNA: clinical developments and targeted delivery. *Nucleic Acid Ther.* 2018; 28(4): 209-24.
DOI: <http://doi.org/10.1089/nat.2017.0715>
35. Lyons D.M., Lauring A.S. Mutation and epistasis in influenza virus evolution. *Viruses*. 2018; 10(8): 407.
DOI: <http://doi.org/10.3390/v10080407>
36. Lesch M., Luckner M., Meyer M., Weege F., Gravenstein I., Rafferty M., et al. RNAi-based small molecule repositioning reveals clinically approved urea-based kinase inhibitors as broadly active antivirals. *PLoS Pathog.* 2019; 15(3): e1007601.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007601>
37. König R., Stertz S., Zhou Y., Inoue A., Hoffmann H.H., Bhattacharyya S., et al. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature*. 2010; 46(7282): 813-7.
DOI: <http://doi.org/10.1038/nature08699>
38. 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): 818-22.
DOI: <http://doi.org/10.1038/nature08760>
39. Eierhoff T., Hrinčius 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.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001099>
40. 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.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0197246>
41. 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. *Virus J.* 2017; 14(1): 11.
DOI: <http://doi.org/10.1186/s12985-016-0671-7>
42. Feizi N., Mehrbod P., Romani B., Soleimanjahi H., Bamdad T., Feizi A., et al. Autophagy induction regulates influenza virus replication in a time-dependent manner. *J. Med. Microbiol.* 2017; 66(4): 536-41.
DOI: <http://doi.org/10.1099/jmm.0.000455>
43. Rossman J.S., Lamb R.A. Autophagy, apoptosis, and the influenza virus M2 protein. *Cell Host Microbe*. 2009; 6(4): 299-300.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.chom.2009.09.009>
44. Romanov J., Walczak M., Ibricic L., Schuchner S., Ogris E., Kraft C., et al. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO J.* 2012; 31(22): 4304-17.
DOI: <http://doi.org/10.1038/emboj.2012.278>
45. 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.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01984-18>

REFERENCES

1. Peteranderl C., Herold S., Schmoldt C. Human influenza virus infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2016; 37(4): 487-500.
DOI: <http://doi.org/10.1055/s-0036-1584801>
2. Cheng A.C., Holmes M., Dwyer D.E., Senanayake S., Cooley L., Irving L.B., et al. Influenza epidemiology in patients admitted to sentinel Australian hospitals in 2018: the Influenza Complications Alert Network (FluCAN). *Commun. Dis. Intell.* (2018). 2019; 43.
DOI: <http://doi.org/10.33321/cdi.2019.43.48>
3. Chekkoth S.M., Supreeth R.N., Valsala N., Kumar P., Raja R.S. Spontaneous pneumomediastinum in H1N1 infection: uncommon complication of a common infection. *J. R. Coll Physicians. Edinb.* 2019; 49(4): 298-300.
DOI: <http://doi.org/10.4997/JRCPE.2019.409>
4. Mastrolia M.V., Rubino C., Resti M., Trapani S., Galli L. Characteristics and outcome of influenza-associated encephalopathy/encephalitis among children in a tertiary pediatric hospital in Italy, 2017-2019. *BMC Infect. Dis.* 2019; 19(1): 1012.
DOI: <http://doi.org/10.1186/s12879-019-4636-5>
5. Taubenberger J.K., Kash J.C. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic form. *Cell Host Microbe*. 2010; 7(6): 440-51.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.009>
6. Pinto L.H., Lamb R.A. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(14): 8997-9000.
DOI: <http://doi.org/10.1074/jbc.R500020200>
7. 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): 1315-20.
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.1216526110>
8. Hurt A.C., Ernest J., Deng Y.M., Iannello P., Besselaar T.G., Birch C., et al. The emergence and spread of resistant influenza A (H1N1) viruses in Oceania, Southeast Asia and South Asia. *Antiviral Res.* 2009; (1): 90-3.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.03.003>
9. Hurt A.C. The epidemiology and spread of drug resistant human influenza viruses. *Curr. Opin. Virol.* 2014; (8): 22-9.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.04.009>
10. Lampejo T. Influenza and antiviral resistance: an overview. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 39(7): 1201-8.
DOI: <http://doi.org/10.1007/s10096-020-03840-9>

11. Kiselev O.I., Maleev V.V., Deeva E.G., Leneva I.A., Sel'kova E.P., Osipova E.A., et al. Clinical efficacy of arbidol (umifenovir) in the therapy of influenza in adults: preliminary results of the multicenter double-blind randomized placebo-controlled study ARBITR. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2015; 87(1): 88-96.
DOI: <http://doi.org/10.17116/terarkh201587188-96> (in Russian)
12. 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): 132-40.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.10.009>
13. Furuta Y., Takahashi K., Kuno-Maekawa M., Sangawa H., Uehara S., Kozaki K., et al. Mechanism of action of T-705 against influenza virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49(3): 981-6.
DOI: <http://doi.org/10.1128/AAC.49.3.981-986.2005>
14. Sleeman K., Mishin V.P., Deyde V.M., Furuta Y., Klimov A.I., Gubareva L.V. In vitro antiviral activity of favipiravir (T-705) against drug-resistant influenza and 2009 A (H1N1) viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(6): 2517-24.
DOI: <http://doi.org/10.1128/AAC.01739-0954>
15. Goldhill D.H., Te Velthuis A.J.W., Fletcher R.A., Langat P., Zambon M., Lackenby A., et al. Barclayb. The mechanism of resistance to favipiravir in influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018; 115(45): 11613-8.
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.1811345215>
16. Han J., Perez J., Schafer A., Cheng H., Peet N., Rong L., et al. Influenza virus: small molecule therapeutics and mechanisms of antiviral resistance. *Curr. Med. Chem.* 2018; 25(38): 5115-27.
DOI: <http://doi.org/10.2174/0929867324666170920165926>
17. Fire A.Z. Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death Differ.* 2007; 14(12): 1998-2012.
DOI: <http://doi.org/10.1038/sj.sdd.4402253>
18. Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391(6669): 806-11.
DOI: <http://doi.org/10.1002/lep.30594>
19. Park S., Park J., Kim E., Lee Y. The Capicua-ETV 5 axis regulates liver-resident memory CD 8+ T cell development and the pathogenesis of liver injury. *Hepatology*. 2019; 70(1): 358-71.
DOI: <http://doi.org/10.1002/lep.30594>
20. Vaucheret X., Béclin C., Fagard M. Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell Sci.* 2001; 114(Pt. 17): 3083-91.
21. Sharp P.A. RNA-interference – 2001. *Genes Dev.* 2001; 15(5): 485-90.
DOI: <http://doi.org/10.1101/gad.880001>
22. Fayzuloev E.B., Nikonova A.A., Zverev V.V. Prospects for the development of antiviral drugs based on small interfering RNA. *Voprosy virusologii*. 2013; (S1): 159-69. (in Russian)
23. Haiyong H. RNA interference to knock down gene expression. *Methods Mol. Biol.* 2018; 1706: 293-302.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_16
24. van der Ree M.H., van der Meer A.J., van Nuenen A.C., de Bruijne J., Ottosen S., Janssen H.L., et al. Miravirsens dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2016; 43(1): 102-13.
DOI: <http://doi.org/10.1111/apt.13432>
25. Soriano V., Barreiro P., Benitez L., Peña J.M., de Mendoza C. New antivirals for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2017; 26(7): 843-51.
DOI: <http://doi.org/10.1080/13543784.2017.1333105>
26. Qureshi A., Tantray V.G., Kirmani A.R., Ahangar A.G. A review on current status of antiviral siRNA. *Rev. Med. Virology*. 2018; 28(4): 1976.
DOI: <http://doi.org/10.1002/rmv.1976>
27. Ge Q., McManus M.T., Nguyen T., Shen C.H., Sharp P.A., Eisen H.N., et al. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003; 100(5): 2718-23.
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.0437841100>
28. Ge Q., Filip L., Bai A., Nguyen T., Eisen H.N., Chen J. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; 101(23): 8676-81.
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.0402486101>
29. Zhiqiang W., Yaowu Y., Fan Y., Jian Y., Yongfeng H., Lina Z., et al. Effective siRNAs inhibit the replication of novel influenza A (H1N1) virus. *Antiviral Res.* 2010; 85(3): 559-61.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.12.010>
30. Sui H.Y., Zhao G.Y., Huang J.D., Jin D.Y., Yuen K.Y., Zheng B.J. Small interfering RNA targeting M2 gene induces effective and long-term inhibition of influenza A virus replication. *PLoS One*. 2009; 4(5): 5671.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0005671>
31. Piasecka J., Lenartowicz E., Soszynska-Jozwiak M., Szutkowska B., Kierzek R., Kierzek E. RNA Secondary structure motifs of the influenza A virus as targets for siRNA-mediated RNA interference. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2020; 19: 627-42.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.12.018>
32. Preslold J.B., Novella I.S. RNA viruses and RNAi: quasispecies implications for viral escape. *Viruses*. 2015; 7(6): 3226-40.
DOI: <http://doi.org/10.3390/v7062768>
33. 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.
DOI: <http://doi.org/10.1128/jvi.78.5.2601-2605.2004>
34. Nikam R.R., Gore K.R. Journey of siRNA: clinical developments and targeted delivery. *Nucleic Acid Ther.* 2018; 28(4): 209-24.
DOI: <http://doi.org/10.1089/nat.2017.0715>
35. Lyons D.M., Lauring A.S. Mutation and epistasis in influenza virus evolution. *Viruses*. 2018; 10(8): 407.
DOI: <http://doi.org/10.3390/v10080407>
36. Lesch M., Luckner M., Meyer M., Weege F., Gravenstein I., Raftery M., et al. RNAi-based small molecule repositioning reveals clinically approved urea-based kinase inhibitors as broadly active antivirals. *PLoS Pathog.* 2019; 15(3): e1007601.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007601>
37. Konig R., Stertz S., Zhou Y., Inoue A., Hoffmann H.H., Bhattacharyya S., et al. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature*. 2010; 466(7282): 813-7.
DOI: <http://doi.org/10.1038/nature08699>
38. 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): 818-22. DOI: <http://doi.org/10.1038/nature08760>
39. Eierhoff T., Hrinčius 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.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001099>
40. 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.
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0197246>
41. 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. *Virology*. 2017; 14(1): 11.
DOI: <http://doi.org/10.1186/s12985-016-0671-7>
42. Feizi N., Mehrbod P., Romani B., Soleimanjahi H., Bamdad T., Feizi A., et al. Autophagy induction regulates influenza virus replication in a time-dependent manner. *J. Med. Microbiol.* 2017; 66(4): 536-41.
DOI: <http://doi.org/10.1099/jmm.0.000455>
43. Rossman J.S., Lamb R.A. Autophagy, apoptosis, and the influenza virus M2 protein. *Cell Host Microbe*. 2009; 6(4): 299-300.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.chom.2009.09.009>
44. Romanov J., Walczak M., Ibricic I., Schuchner S., Ogris E., Kraft C., et al. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO J.* 2012; 31(22): 4304-17.
DOI: <http://doi.org/10.1038/emboj.2012.278>
45. 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.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01984-18>