



## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-159>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

### Влияние комплексов миРНК на репродукцию вируса гриппа А (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) *in vivo*

Пашков Е.А.<sup>1,2</sup>, Момот В.Ю.<sup>1</sup>, Пак А.В.<sup>1</sup>, Самойликов Р.В.<sup>2</sup>, Пашков Г.А.<sup>1</sup>, Усатова Г.Н.<sup>1</sup>, Кравцова Е.О.<sup>1</sup>, Поддубиков А.В.<sup>2</sup>, Нагиева Ф.Г.<sup>2</sup>, Сидоров А.В.<sup>2</sup>, Пашков Е.П.<sup>1</sup>, Свитич О.А.<sup>1,2</sup>, Зверев В.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУН «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Минздрава России, 105064, г. Москва, Россия

**Введение.** Грипп является одной из самых актуальных проблем мирового здравоохранения. Несмотря на широкий спектр противогриппозных препаратов, остро стоит проблема формирования вирусной резистентности, что требует поиска новых возможностей её преодоления. Перспективным решением представляется создание лекарственных препаратов, действие которых основано на ингибировании активности клеточных генов посредством РНК-интерференции.

**Цель** – оценка профилактического потенциала миРНК, направленных к клеточным генам *FLT4*, *Nup98* и *Nup205 in vivo*, в отношении гриппозной инфекции.

**Материалы и методы.** В исследовании использован штамм вируса гриппа A/California/7/09 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>), мыши BALB/c. Введение миРНК и заражение животных выполняли интраназально. Учёт результатов выполняли посредством молекулярно-генетических и вирусологических методов.

**Результаты.** Применение комплексов миРНК *Nup98.1* и *Nup205.1* приводило к достоверному снижению вирусной репродукции и вРНК на третьи сутки после заражения. Параллельно с этим выполнялась одно-временная трансфекция двух комплексов миРНК (*Nup98.1* и *Nup205.1*). При использовании данного комплекса также отмечалось достоверное снижение вирусного титра и вРНК по сравнению с контрольными группами.

**Выводы.** Применение миРНК *in vivo* способно приводить к противовирусному эффекту как при одиночном, так и при одновременном подавлении активности нескольких клеточных генов. Результаты свидетельствуют о том, что использование миРНК, направленных к клеточным генам, чьи продукты экспрессии участвуют в процессе вирусной репродукции, является одним из потенциально перспективных методов профилактики и терапии не только гриппозной, но и других респираторных инфекций.

**Ключевые слова:** РНК-интерференция; вирус гриппа А; экспрессия генов; миРНК; вирусная РНК; вирусная репродукция; *Nup98*; *Nup205*

**Для цитирования:** Пашков Е.А., Момот В.Ю., Пак А.В., Самойликов Р.В., Пашков Г.А., Усатова Г.Н., Кравцова Е.О., Поддубиков А.В., Нагиева Ф.Г., Сидоров А.В., Пашков Е.П., Свитич О.А., Зверев В.В. Влияние комплексов миРНК на репродукцию вируса гриппа А (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) *in vivo*. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(2): 95-104. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-159> EDN: <https://elibrary.ru/rheuqd>

**Для корреспонденции:** Пашков Евгений Алексеевич, младший научный сотрудник ФГБУН «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Россия. E-mail: [rashckov.j@yandex.ru](mailto:rashckov.j@yandex.ru)

**Участие авторов:** Пашков Е.А., Момот В.Ю., Пак А.В., Самойликов Р.В., Пашков Г.А. – выполнение экспериментов; Пашков Е.А., Усатова Г.Н., Кравцова Е.О. – написание текста, заключение; Поддубиков А.В., Нагиева Ф.Г., Сидоров А.В. – научное редактирование; Пашков Е.П., Свитич О.А., Зверев В.В. – резюме, общая редакция.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке проекта Российской Федерацией в лице Министерства образования и науки России, соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность центру коллективного пользования ФГБУН «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова». Исследование выполнено с использованием научного оборудования центра коллективного пользования ФГБУН «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Этическое утверждение.** Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES, July 23, 2010). Исследование одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 04-21 от 18.02.2021).

Поступила 16.02.2023  
Принята в печать 10.04.2023  
Опубликована 30.04.2023

## ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-159>

## Influence of siRNA complexes on the reproduction of influenza A virus (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) *in vivo*

Evgenij A. Pashkov<sup>1,2</sup>, Viktoriia Yu. Momot<sup>1</sup>, Anastasia V. Pak<sup>1</sup>, Roman V. Samoilkov<sup>2</sup>, George A. Pashkov<sup>1</sup>, Galina N. Usatova<sup>1</sup>, Elena O. Kravtsova<sup>1</sup>, Alexander V. Poddubikov<sup>2</sup>, Firaya G. Nagieva<sup>2</sup>, Alexander V. Sidorov<sup>2</sup>, Evgenij P. Pashkov<sup>1</sup>, Oxana A. Svitich<sup>1,2</sup>, Vitaliy V. Zverev<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>I.I. Mechnikov Scientific and Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia

**Introduction.** Influenza is one of the most pressing global health problems. Despite the wide range of available anti-influenza drugs, the viral drug resistance is an increasing concern and requires the search for new approaches to overcome it. A promising solution is the development of drugs with action that is based on the inhibition of the activity of cellular genes through RNA interference.

**Aim.** Evaluation *in vivo* of the preventive potential of miRNAs directed to the cellular genes *FLT4*, *Nup98* and *Nup205* against influenza infection.

**Materials and methods.** The A/California/7/09 strain of influenza virus (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) and BALB/c mice were used in the study. The administration of siRNA and experimental infection of animals were performed intranasally. The results of the experiment were analyzed using molecular genetic and virological methods.

**Results.** The use of siRNA complexes Nup98.1 and Nup205.1 led to a significant decrease in viral reproduction and concentration of viral RNA on the 3rd day after infection. When two siRNA complexes (Nup98.1 and Nup205.1) were administered simultaneously, a significant decrease in viral titer and concentration of viral RNA was also noted compared with the control groups.

**Conclusions.** The use of siRNAs *in vivo* can lead to an antiviral effect when the activity of single or several cellular genes is suppressed. The results indicate that the use of siRNAs targeting the cellular genes whose expression products are involved in viral reproduction is one of the promising methods for the prevention and treatment of not only influenza, but also other respiratory infections.

**Keywords:** RNA interference; influenza A virus; gene expression; siRNA; viral RNA; viral reproduction; Nup98; Nup205

**For citation:** Pashkov E.A., Momot V.Yu., Pak A.V., Samoilkov R.V., Pashkov G.A., Usatova G.N., Kravtsova E.O., Poddubikov A.V., Nagieva F.G., Sidorov A.V., Pashkov E.P., Svitich O.A., Zverev V.V. Influence of siRNA complexes on the reproduction of influenza A virus (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) *in vivo*. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(2): 95-104 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-159> EDN: <https://elibrary.ru/rheuqd>

**For correspondence:** Evgeny A. Pashkov, Junior Researcher, I.I. Mechnikov Scientific and Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia. E-mail: [pashckov.j@yandex.ru](mailto:pashckov.j@yandex.ru)

### Information about authors:

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

Momot V.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-3476-5485>

Pak A.V., <https://orcid.org/0000-0003-4295-7858>

Samoilkov R.V., <https://orcid.org/0000-0001-6405-1390>

Pashkov G.A., <https://orcid.org/0000-0003-0392-9969>

Usatova G.N., <https://orcid.org/0000-0002-8955-3570>

Kravtsova E.O., <https://orcid.org/0000-0002-9100-0422>

Poddubikov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>

Nagieva F.G., <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>

Sidorov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-3561-8295>

Pashkov E.P., <https://orcid.org/0000-0002-4963-5053>

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

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

**Contribution:** Pashkov E.A., Momot V.Yu., Pak A.V., Samoilikov R.V., Pashkov G.A. – execution of experiments; Pashkov E.A., Usatova G.N., Kravtsova E.N. – text writing, conclusion; Poddubikov A.V., Nagieva F.G., Sidorov A.V. – scientific editing; Pashkov E.P., Svitich O.A., Zverev V.V. – summary, general edition.

**Funding.** The research was carried out with the financial support of the project by the Russian Federation represented by the Ministry of Education and Science of Russia, agreement No. 075-15-2021-676 dated July 7, 2021.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to the Center for Collective Use of the I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera. The study was carried out using the scientific equipment of the Center for Collective Use of the I.I. Mechnikov Scientific and Research Institute of Vaccines and Sera.

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

**Ethical statement.** Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus author guidelines for animal use (IAVES, July 23, 2010). The study was approved by the Ethics Committee of Sechenov University (Minutes No. 04-21 dated February 18, 2021).

Received 16 February 2023

Accepted 10 April 2023

Published 30 April 2023

## Введение

Данная статья является продолжением работ по созданию эффективных и безопасных средств терапии вирусных инфекций, начатых в 2019 г. группой ученых Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (НИИ ВС им. И.И. Мечникова, Россия) [1–3].

Одними из наиболее распространённых инфекционных заболеваний верхних дыхательных путей и лёгких являются инфекции, вызванные вирусом гриппа А. Ежегодно от гриппа страдает до 20% мирового населения, а также отмечается до 650 000 случаев летальных исходов [4]. Появление новых вирулентных штаммов способно спровоцировать развитие пандемий, что, в свою очередь, может привести к многомиллионным жертвам, как это было во время пандемий гонконгского и испанского гриппа [5, 6]. Использование вакцинных препаратов в качестве профилактической меры не способно полностью предотвратить заболеваемость среди населения ввиду формирования иммунитета лишь к определённым штаммам вирусов, что снижает эффективность их применения по отношению к новым эмерджентным штаммам. Помимо этого, есть и другие причины, снижающие положительный эффект от применения вакцин: низкий уровень доверия населения к вакцинопрофилактике, антипрививочная пропаганда, а также пациенты, чья вакцинация не представляется возможной по причине определённых противопоказаний [7–9]. Использование иных противогриппозных препаратов несёт профилактический и терапевтический эффект, однако их широкое применение ограничено постоянным появлением резистентных к ним вариантов вирусов и риском развития нежелательных побочных эффектов [10–13].

Исходя из этого, на сегодняшний день существует острая потребность в принципиально новом противовирусном препарате, для которого не будет иметь значения образование новых резистентных штаммов. Разрабатываемые препараты, чей механизм действия основан на явлении РНК-интерференции, могут стать решением проблемы вирусной резистентности.

РНК-интерференция – внутриклеточный процесс, в результате которого происходит деградация матричной РНК (мРНК) посредством молекул малых

интерферирующих РНК (миРНК). В клетках млекопитающих РНК-интерференция может быть запущена как синтетическими миРНК, так и полученными в результате нарезки эндонуклеазой Dicer чужеродной двухцепочечной РНК [14]. РНК-интерференция протекает в несколько этапов: экзогенная мРНК разделяется белком-эндонуклеазой Dicer на короткие (20–25 п.н.) последовательности, которые являются миРНК. Далее миРНК связывается с белковым комплексом RISC (RNA-induced silencing complex). Полученный комплекс миРНК и RISC подвергает целевую мРНК деградации [15].

Ввиду того что миРНК обеспечивают снижение экспрессии любого выбранного гена, в настоящее время они представляют собой класс молекул, имеющих важное медицинское значение. В ряде независимых исследований уже был показан противовирусный эффект в отношении таких заболеваний, как респираторно-синцитиальная вирусная инфекция, ВИЧ-инфекция, гепатит В и С, грипп [16–20]. Был также показан терапевтический эффект от применения препаратов Патисиран (Patisiran) и Гивосиран (Givosiran), применяемых в терапии генетически обусловленных заболеваний – амилоидной полинейропатии и острой печеночной порфирии [21, 22]. Точно также ранее нами было показано, что миРНК, направленные к клеточным генам *FLT4*, *Nup98* и *Nup205*, играющим важную роль в процессах эндоцитоза вируса гриппа и в импорте и экспорте сегментов вирусной РНК (вРНК) в полость ядра, способны ингибировать репродукцию вируса гриппа А в культуре клеток лёгких A549 [1–3]. Для разработки и создания препаратов миРНК, допустимых к применению у людей, необходимо провести оценку противовирусного действия миРНК на животной модели. Дополнительно препараты миРНК не должны обладать выраженным токсическим действием и побочным эффектом на фоне подавления экспрессии генов клетки-хозяина.

Резюмируя вышесказанное, следует отметить, что вирусные респираторные инфекции на сегодняшний день являются одним из наиболее актуальных источников заболеваемости и смертности в мире. Ввиду ограниченного эффекта от применения имеющихся в настоящее время вакцин и противовирусных препаратов особо важной задачей для отечественного здра-

**Таблица. Последовательности миРНК, использованные в работе****Table. Sequences of siRNAs used in the study**

миРНК / siRNA	Последовательность / Sequence
FLT4.1	5'-UCACAUAGAAGUAGAUGAGdTdC-3' 5'-CUCAUCUACUUCUAUGUGAdCdC-3'
FLT4.2	5'-UGUGAAUUAGGAUCUUGAGdCdT-3' 5'-CUCAAGAUCUAAUUCACAdTdC-3'
Nup98.1	5'-UUUGUACUGAUGUUAGUGCdTdA-3' 5'-GCACUAAACUACAGUACAAAdGdC-3'
Nup98.2	5'-AUCCAAUUUAGAUUUUGUCdAdA-3' 5'-GACAAAUUUUAGAUUUUGGAdGdA-3'
Nup205.1	5'-AUCUACAAAUCUUCAGCdTgG-3' 5'-GCUUGAAGAUUUUGUAGAUCdAdA
siL2 (неспецифическая миРНК / nonspecific siRNA)	5'-UUUCCGUCUACGUCUUCCdTdT-3' 5'-GGAAAGACGAUGACGGAAAdTdT-3'

воохранения становится разработка принципиально новых методов терапии и профилактики респираторных вирусных инфекций. Одним из потенциально перспективных методов терапии гриппозной инфекции является применение миРНК, направленных к клеточным генам, косвенно принимающим участие в вирусной репродукции. Исходя из этого, **целью** работы является оценка профилактического потенциала миРНК, направленных к клеточным генам *FLT4*, *Nup98* и *Nup205 in vivo*, в отношении гриппозной инфекции.

## Материалы и методы

### миРНК

Подбор миРНК осуществлялся к кодирующим областям мРНК, а конкретно к экзонсодержащим областям, и обуславливался тем, что после сплайсинга экзоны соединяются между собой, образуя зрелую мРНК (промежуточный продукт экспрессии гена). Уже зрелая мРНК подвергается воздействию со стороны миРНК, в результате чего на стадии трансляции не происходит синтеза конечного продукта экспрессии гена – белка.

Дизайн миРНК осуществляли с помощью ресурса siDirect 2.0<sup>1</sup>. Олигорибонуклеотиды («Синтол», Россия) разводили водой до концентрации 100 пмоль/мкл. Далее комплементарные олигонуклеотиды («Синтол», Россия) смешивали, инкубировали в термостате при 60 °С в течение 1 мин, затем охлаждали до комнатной температуры. Готовые РНК-дуплексы хранили при температуре –70 °С. Все работы с готовыми дуплексами проводились с использованием холодового штатива. Последовательности используемых миРНК представлены в **таблице**. Каждый олигорибонуклеотид имеет два дезоксирибонуклеотида на 3'-конце. Это необходимо для минимизации отрицательного влияния

ферментов-экзонуклеаз. В качестве неспецифического контроля использовалась миРНК siL2, специфичная к гену светляковой люциферазы и не влияющая на жизненный цикл клеток A549.

### Вирус

В работе использован вирус гриппа A/California/7/09 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>), полученный из коллекции вирусов НИИ ВС им. И.И. Мечникова. Культивирование и определение титра вируса проводилось на культуре клеток MDCK.

### Культуры клеток

В работе использовались клетки почек кокер-спаниеля MDCK (Институт Пастера, Франция) и клетки мышечных фибробластов L929 (НИИ ВС им. И.И. Мечникова, Россия). Клетки MDCK выращивали в среде MEM («ПанЭко», Россия), содержащей 5% эмбриональной сыворотки коров (ЭСК) Gibco (Fisher Scientific, Новая Зеландия), 40 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия) и 300 мкг/мл L-глутамин («ПанЭко», Россия) при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Клетки L929 выращивали в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 5% ЭСК, 40 мкг/мл гентамицина и 300 мкг/мл L-глутамин при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.

### Мыши

Мышей линии BALB/C – самок с массой тела 17–20 г – получали из питомника «Столбовая» (Московская обл., Россия). Животные содержались в виварии на стандартном рационе со свободным доступом к брикетированному корму и воде. Содержание соответствовало правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник. Маркировка мышей производилась с помощью красителей.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES, July 23, 2010). Исследование одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (протокол № 04-21 от 18.02.2021).

### Введение комплексов миРНК мышам с последующим заражением вирусом гриппа A/California/7/09 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>

Мышей заражали в возрасте от 7 до 9 недель. Рекомендуемое количество вещества миРНК составило 1,5 нмоль/мкл [23]. миРНК вводились мышам интраназально под наркозом по 30 мкл на особь. Введение миРНК осуществлялось без использования носителя. Через 4 ч после интраназального введения миРНК проводилось заражение мышей вирусом гриппа A/California/7/09 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> в дозе LD<sub>50</sub>. Объём введённой вируссодержащей жидкости составил 30 мкл для каждой особи кроме тех, которые были включены в отрицательный контроль.

### Получение лёгких мышей

На 3-й день после введения комплексов миРНК и инфицирования вирусом гриппа мышей умерщвляли и в стерильных условиях извлекали лёгкие. После

<sup>1</sup>siDirect version 2.0. Highly effective, target specific siRNA online design site. Available from: <https://sidirect2.mai.jp>.

промывки в растворе Хенкса проводилась гомогенизация лёгких. Далее гомогенат осветляли от клеточного детрита центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин. Полученный супернатант использовали для определения вирусного титра и изменения количества вРНК.

#### Выявление вРНК

вРНК выделяли из лёгочного гомогената мышей набором ExtractRNA (Evrogen, Россия). Для постановки реакции обратной транскрипции (ОТ) применяли набор реагентов ОТ-1 («Синтол», Россия). Изменение концентрации вРНК контролировали с помощью количественной ОТ-ПЦР-РВ (полимеразной цепной реакции с ОТ в реальном времени) с набором праймеров и зондов к М-гену вируса гриппа А. Для ПЦР-РВ использовали набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green и референсного красителя ROX («Синтол», Россия). Рабочая концентрация праймеров и зондов составила 10 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). Праймеры и зонды («Синтол», Россия) представлены в нашем раннем исследовании [1].

#### Расчёт экспрессии целевого гена с использованием критерия $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Оценка изменения экспрессии целевого гена проводилась с использованием критерия  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Проводился расчёт разницы трёх повторов пороговых циклов ПЦР ( $\Delta Ct$ ) между исследуемыми генами отрицательного контроля и геном домашнего хозяйства *GAPDH*:  $\Delta Ct = Ct$  (интересующий ген) –  $Ct$  (*GAPDH*).

Аналогичный расчёт  $\Delta Ct$  проводился для клеток, обработанных миРНК. Полученные данные усреднялись.

После определения  $\Delta Ct$  для всех групп исследования полученные с трёх повторов данные  $\Delta Ct$  усреднялись, а затем рассчитывалось значение  $\Delta\Delta Ct$  относительно среднего значения  $\Delta Ct$  для клеток, обработанных миРНК:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{обработанный образец}) - \Delta Ct (\text{отрицательный контроль}).$$

Для определения критерия  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  необходимо 2 возвести в полученное значение  $\Delta\Delta Ct$  для каждого исследуемого гена [24]. Далее данные  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  будут представлены в процентах. Расчёт изменения экспрессии проводился относительно изменения экспрессии целевых генов (*FLT4*, *Nup98* и *Nup205*) в неинфицированной культуре клеток, трансфицированной миРНК L2, неспецифичной по отношению к указанным мышным.

#### Титрование вируса по конечной точке цитопатического действия

Вирусный титр определялся по крайней точке визуального проявления цитопатического эффекта в культуре клеток MDCK. Клетки MDCK сеяли в 96-луноч-

ные планшеты с посевной концентрацией  $1 \times 10^4/\text{см}^2$ . Через двое суток питательная среда удалялась из лунок, вносили 10-кратные последовательные разведения вирусного материала в поддерживающей среде без трипсина и инкубировали на протяжении четырех суток в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при 37 °С. На четвертые сутки проводили визуальный учёт результатов титрования под микроскопом на наличие специфического цитопатического эффекта для вируса гриппа (изменение, деформация, открепление мёртвых клеток со дна лунки). Вирусный титр рассчитывался по М.А. Ramakrishnan [25] и выражался как логарифм тканевых цитопатогенных доз ( $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ ).

#### Статистическая обработка данных

Статистическую значимость полученных результатов определяли с помощью критерия Манна–Уитни. Разница считалась достоверной при  $p \leq 0,01$  и  $p \leq 0,05$ .

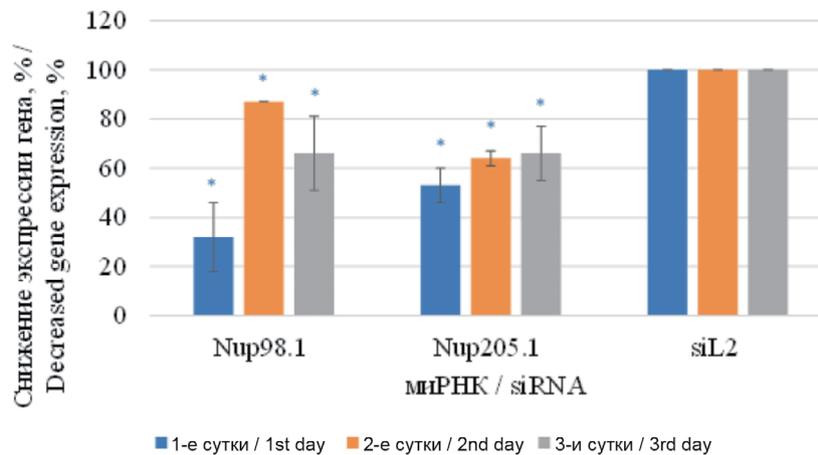
### Результаты

#### Оценка ингибирующего эффекта миРНК на экспрессию целевых генов

Промежуточным продуктом экспрессии гена является мРНК, а конечным – белок [26]. Для оценки подавляющего влияния миРНК на экспрессию генов *FLT4*, *Nup98* и *Nup205* была взята культура L929 и проведена трансфекция миРНК в эту культуру. Продукты экспрессии отобранных генов активно взаимодействуют с вирусом гриппа на разных этапах его репродукции [27–29]. Далее выполнялась проверка способности полученных синтетических миРНК ингибировать экспрессию целевых генов. При трансфекции миРНК *Nup98.1* и *Nup205.1* экспрессия целевых генов в среднем снижалась на 61% на первые сутки и на 44% на вторые сутки относительно неспецифического контроля L2. Снижение экспрессии на 34% на третьи сутки отмечалось при использовании миРНК *Nup98.1* и *Nup205.1* относительно неспецифического контроля L2. В качестве неспецифического контроля было принято изменение экспрессии генов *Nup98* и *Nup205* в неинфицированной культуре клеток, обработанных миРНК L2, направленной к гену светляковой люциферазы. За 100% транскрипции клеточных генов *Nup98* и *Nup205* было принято изменение экспрессии данных генов в неинфицированной культуре клеток, обработанных миРНК L2. Применение миРНК *FLT4.1*, *FLT4.2* и *Nup98.2* не приводило к какому-либо изменению экспрессии относительно неспецифической миРНК L2. Оценка подавления экспрессии генов проводилась с использованием метода  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [30]. На рис. 1 показана эффективность нокдауна мРНК в клетках L929.

#### Влияние одиночных комплексов миРНК на изменение массы тела после заражения

Одним из критериев эффективности применения противовирусных препаратов является снижение потери массы тела в результате инфекции. После заражения мышей вирусом гриппа А/California/7/09 ( $\text{H}_1\text{N}_1$ ) не наблюдалось выраженных различий в по-

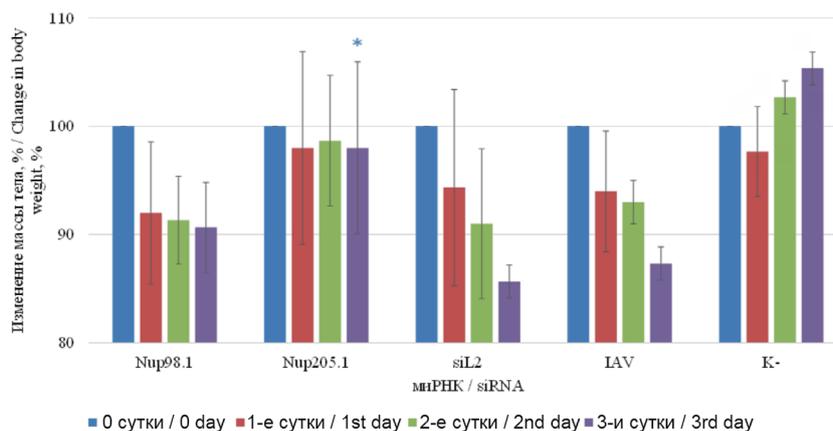


**Рис. 1.** Влияние миРНК на экспрессию генов *Nup98* и *Nup205*.

По оси абсцисс указаны названия миРНК, направленных к одноимённым генам. По оси ординат показано изменение экспрессии генов *Nup98* и *Nup205* после обработки клеток комплексами миРНК относительно неспецифической миРНК L2 (в %). \* $p \leq 0,05$ .

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

The X-axis shows the names of siRNAs targeting the genes of the same name. The Y-axis shows the changes in the expression of the *FLT4*, *Nup98* and *Nup205* genes after treatment of cells with siRNA complexes relative to nonspecific siRNA L2, expressed (in %). \* $p \leq 0.05$ .



**Рис. 2.** Влияние комплексов миРНК на изменение массы мышей в течение трёх суток после заражения вирусом гриппа A/California/7/09 ( $H_1N_1$ ) в динамике.

На оси абсцисс представлены миРНК и их одноимённые целевые клеточные гены. На оси ординат представлено изменение массы тела в (в %). \* $p \leq 0,05$ .

**Fig. 2.** The effect of siRNA complexes on dynamic changes of mice body weight during three days after infection with the influenza A/California/7/09 ( $H_1N_1$ ) virus.

The X-axis shows siRNAs and respective target cellular genes of the same name. The Y-axis shows the changes in body weight, expressed (in %). \* $p \leq 0.05$ .

тере массы тела между контрольными группами мышей и мышами, обработанными молекулами миРНК. После интраназального введения мышам миРНК Nup205.1 не отмечалось выраженной потери массы, а на третьи сутки после интраназального введения миРНК показатель массы мышей в этих группах был достоверно различим по сравнению с группами неспецифического и вирусного контроля. Полученные данные представлены на **рис. 2**.

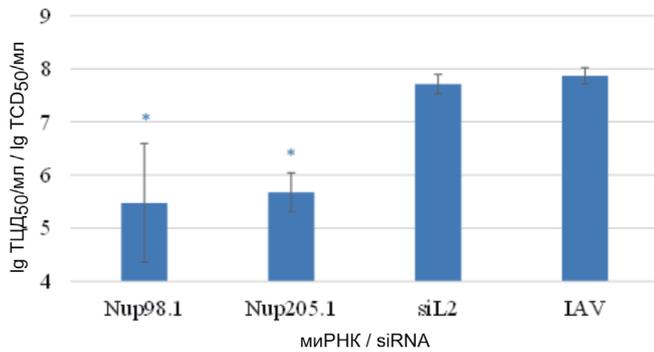
*Влияние комплексов миРНК на репродукцию вируса гриппа A/California/7/09 ( $H_1N_1$ ) in vivo*

Далее проводилась оценка противовирусного эффекта комплексов миРНК в отношении вируса гриппа A/California/7/09 ( $H_1N_1$ ). Мышей забивали на третьи сутки после интраназального введения миРНК и зара-

жения, после чего извлекали лёгкие, выделяли из них вирус и проводили его титрование. Было установлено, что при  $LD_{50}$  использование всех миРНК приводило к снижению вирусной репродукции. Применение миРНК Nup98.1 приводило к снижению вирусной репродукции на третьи сутки на 2,3 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл по отношению к неспецифическому и вирусному контролю. На 2,1 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл достоверно снижался вирусный титр по отношению к контрольным группам соответственно при использовании миРНК Nup205.1. Полученные данные представлены на **рис. 3**.

*Влияние комплексов миРНК на динамику вРНК вируса гриппа A/California/7/09 ( $H_1N_1$ ) in vivo*

Далее было проведено определение изменения вРНК при обработке клеток миРНК. При оценке вли-



**Рис. 3.** Влияние подавления генов *Nup98* и *Nup205* посредством миРНК на репродукцию вируса гриппа A/California/7/09 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) на третьи сутки с момента трансфекции при LD<sub>50</sub>.

По оси абсцисс – названия миРНК. По оси ординат представлен показатель вирусного титра. \**p* ≤ 0,05.

**Fig. 3.** Effect of siRNA suppression of the *Nup98* and *Nup205* genes on the reproduction of influenza A/California/7/09 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) virus on the third day after infection with LD<sub>50</sub>.

The X-axis shows the name of the siRNA. The Y-axis shows the viral titers. \**p* ≤ 0.05.

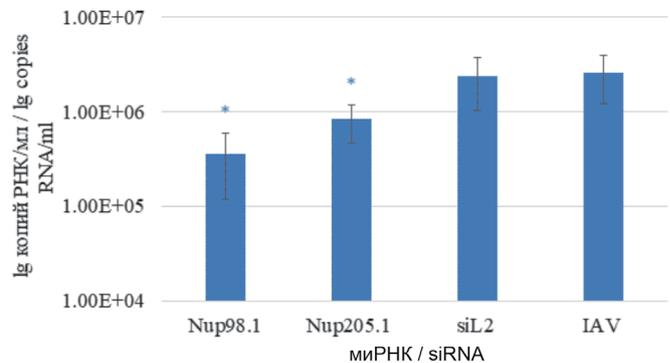
яния миРНК на изменение количества вРНК при использовании штамма A/California/7/09 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) было установлено, что обработка клеток миРНК Nup98.1 и Nup205.1 приводила к достоверно эффективному снижению вРНК на третьи сутки после заражения клеток по сравнению с неспецифическим и вирусным контролем в 6,6 и 2,9 раза соответственно. Полученные данные представлены на рис. 4.

#### Влияние пула миРНК на репродукцию вируса гриппа A/California/7/09 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) in vivo

Исходя из полученных результатов, нами были отобраны две миРНК, наиболее эффективно показавшие себя в качестве одиночных противовирусных молекул, – Nup98.1 и Nup205.1 (Nup98/Nup205). Из этих двух миРНК был создан пул, одновременно направленный к одноимённым генам. Далее мы интраназально ввели данный комплекс мышам, после чего заразили их вирусом гриппа A/California/7/09 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>). Мышей забивали на третьи сутки, после чего из лёгких выделяли вирус для последующего титрования, а также определяли количество вРНК. При оценке вирусной репродукции было получено, что у мышей, которым интраназально вводился комплекс Nup98.1/Nup205.1 (Nup98/Nup205), вирусный титр был достоверно ниже (на 1,4 lg TCID<sub>50</sub>/мл) по сравнению с неспецифическим контролем. Полученные данные представлены на рис. 5.

#### Влияние пула миРНК Nup98.1/Nup205.1 на изменение вРНК на третьи сутки с момента трансфекции при LD<sub>50</sub>

Наряду с этим было получено, что при снижении вирусного титра также наблюдалась и достоверная разница (в 2 раза) между клетками, обработанными поликомплексом миРНК, и клетками с неспецифическим контролем siL2. Полученные данные представлены на рис. 6.

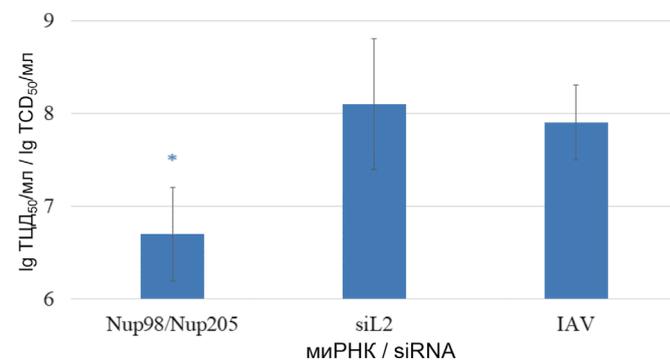


**Рис. 4.** Влияние подавления генов *Nup98* и *Nup205* посредством миРНК на изменение вРНК на третьи сутки с момента трансфекции при LD<sub>50</sub>.

По оси абсцисс – названия миРНК. По оси ординат представлено количество вРНК. \**p* ≤ 0,05.

**Fig. 4.** Effect of siRNA suppression of *Nup98* and *Nup205* genes on concentration of viral RNA on the third day after infection with LD<sub>50</sub>.

The X-axis shows the names of the siRNAs. The Y-axis shows the concentration of viral RNA. \**p* ≤ 0.05.



**Рис. 5.** Влияние пула миРНК Nup98.1/Nup205.1 на репродукцию вируса гриппа A/California/7/09 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) на третьи сутки с момента трансфекции при LD<sub>50</sub>.

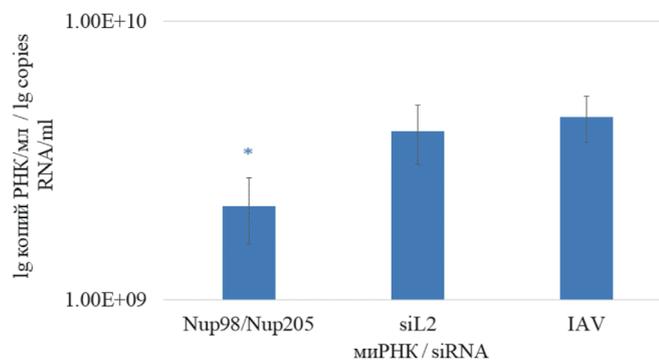
По оси абсцисс – названия миРНК. По оси ординат представлен показатель вирусного титра. \**p* ≤ 0,05.

**Fig. 5.** Effect of the Nup98.1/Nup205.1 siRNA pool on the reproduction of influenza A/California/7/09 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) virus on the third day after infection with LD<sub>50</sub>.

The X-axis shows the names of the siRNAs. The Y-axis shows the viral titers. \**p* ≤ 0.05.

## Обсуждение

Данное исследование является частью цикла работ по оценке противовирусной активности миРНК, направленных к клеточным генам, продукты экспрессии которых принимают непосредственное участие в процессе вирусной репродукции. Была проведена серия экспериментов по оценке эффективности подавления экспрессии как одного гена, так и одновременно нескольких клеточных генов с использованием комплексов миРНК, направленных к генам *Nup98* и *Nup205*. В ходе экспериментов были получены данные о том, что как одиночное, так и групповое применение миРНК приводит к достоверному снижению вирусной репродукции. Наиболее эффективный противовирусный эффект наблюдался при использовании миРНК



**Рис. 6.** Влияние подавления генов *Nup98* и *Nup205* посредством миРНК на изменение вРНК на третьи сутки с момента трансфекции при LD<sub>50</sub>.

По оси абсцисс – названия миРНК. По оси ординат представлено количество вРНК. \* $p < 0,05$ .

**Fig. 6.** Effect of siRNA suppression of *Nup98* and *Nup205* genes on concentration of viral RNA on the third day after challenge with LD<sub>50</sub>.

The X-axis shows the names of siRNAs. The Y-axis shows the concentration of viral RNA. \* $p < 0.05$ .

*Nup98* (подобраны к области 8-го экзона одноимённого гена (позиция экзона – 28 811...28 974)) и *Nup205* (подобраны к области 17-го экзона одноимённого гена (позиция экзона – 30 466...30 565)), направленных к кодирующим областям мРНК. Подбор миРНК к областям экзона обусловлен тем, что после сплайсинга экзоны соединяются между собой, образуя зрелую мРНК (промежуточный продукт экспрессии гена). Далее миРНК подвергает мРНК деградации, в результате чего на стадии трансляции не происходит синтеза белка. Для оценки эффективности комплексов миРНК использовалось два методических подхода: титрование вируса по цитопатическому действию и ОТ-ПЦР-РВ, которые согласовывались между собой. Полученные данные коррелировали друг с другом: при снижении вирусного титра наблюдалось и снижение вРНК.

Параллельно с этим была проведена оценка изменения массы тела заражённых мышей после интраназального введения им миРНК. Было получено, что достоверное нарастание мышинной массы отмечается на третьи сутки после заражения при использовании миРНК *Nup205.1*. При введении мышам поликомплекса миРНК *Nup98.1/Nup205.1* не было достоверной разницы изменения массы тела по сравнению контрольными группами, однако отмечалось достоверное снижение вирусного титра на 1,4 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Несмотря на столь небольшое снижение вирусного титра, имеется ряд исследований, в которых показано, что такое снижение вирусной активности повышает выживаемость при заражении животных летальными дозами вируса гриппа [31, 32]. Выраженный противовирусный эффект мог быть также индуцирован и активацией неспецифических факторов врождённого иммунитета, таких как интерфероны или другие провоспалительные эффекторы. Одной из причин активации данного звена иммунитета может быть то, что

при попадании в организм, помимо противовирусного эффекта, миРНК оказывает ещё и иммуномодулирующий эффект, связываясь с Toll-подобными рецепторами 3-го типа, в результате чего происходит активация ряда провоспалительных цитокинов [33, 34].

Важность полученных результатов опосредуется ещё и тем, что мышам миРНК вводились всего один раз за 4 ч до заражения и отсутствовал носитель для осуществления трансфекции. Дополнительно для заражения использовались те дозы вируса, которые, вероятно, выше тех, с которыми человек может встретиться в повседневной жизни.

## Заключение

На сегодняшний день особо актуальным является вопрос разработки и создания средств экстренной и эффективной профилактики и терапии респираторных вирусных инфекций. В настоящем исследовании получены данные о том, что применение миРНК, одиночно или комплексно направленных к клеточным генам на модели *in vivo*, способно достоверно приводить к снижению вирусной репродукции, а также к повышению выживаемости лабораторных животных. Дополнительно в данном исследовании получены результаты, показывающие, что блокировка вирусной репродукции на стадии ядерного импорта и экспорта приводит к наиболее эффективному снижению вирусной репродукции. Полученные результаты, показывающие высокую противовирусную эффективность миРНК на модели *in vivo*, а также данные наших прошлых исследований [1–3] позволяют рекомендовать миРНК в качестве основного действующего компонента перспективного прототипа препарата для клинических испытаний. При этом важно понимать, что при дальнейшей оптимизации молекул миРНК, условия трансфекции и подавлении активности клеточных генов, а также использовании в более высоких концентрациях миРНК могут оказаться ещё более мощным ингибитором развития не только гриппозной, но и любой другой респираторной вирусной инфекции. В глобальном масштабе результаты проведённого исследования способствуют разработке принципов быстрого конструирования и наработке специфических и эффективных противовирусных миРНК. Это позволит экстренно реагировать на развитие эпидемий и пандемий, индуцируемых вирусами, относящимися к разным таксономическим группам, а также эффективно противостоять им.

## ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. World Health Day 2023. Health For All. Available at: <https://www.euro.who.int/ru/media-centre/events/events/2021/10/flu-awareness-campaign-2021>
2. Britannica. 1968 flu pandemic. Global outbreak. Available at: <https://www.britannica.com/event/1968-flu-pandemic>
3. Trilla A., Trilla G., Daer C. The 1918 “Spanish flu” in Spain. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 47(5): 668–73. <https://doi.org/10.1086/590567>
4. Onishchenko G.G., Sizikova T.E., Lebedev V.N., Borisevich S.V. Analysis of promising approaches to COVID-19 vaccine development. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2020; 20(4): 216–27. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-216-227>

5. Glover R.E., Urquhart R., Lukawska J., Blumenthal K.G. Vaccinating against covid-19 in people who report allergies. *BMJ*. 2021; 372: n120. <https://doi.org/10.1136/bmj.n120>.
6. Smith M. Vaccine safety: medical contraindications, myths, and risk communication. *Pediatr. Rev.* 2015; 36(6): 227–38. <https://doi.org/10.1542/pir.36-6-227>
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. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.03.003>
9. 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. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.10.009>
10. 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. <https://doi.org/http://doi.org/10.2174/0929867324666170920165926>
11. McManus M.T., Sharp P.A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* 2002; 3(10): 737–47. <https://doi.org/10.1038/nrg908>
12. Fire A.Z. Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death Differ.* 2007; 14(12): 1998–2012. <https://doi.org/10.1038/sj.sdd.4402253>
13. 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. <https://doi.org/10.1111/apt.13432>
14. 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. <https://doi.org/101080/13543784.2017.1333105>
15. 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. <https://doi.org/10.1002/rmv.1976>
16. 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>
17. 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. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0671-7>
18. Adams D. Patisiran, an investigational RNAi therapeutic for patients with hereditary transthyretin-mediated (hATTR) amyloidosis: Results from the phase 3 APOLLO study. *Revue Neurologique.* 2018; 174(S1): S37. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.01.085>
19. Zhao L. Therapeutic strategies for acute intermittent porphyria. *Intractable Rare Dis. Res.* 2020; 9(4): 205–16. <https://doi.org/10.5582/irdr.2020.03089>
20. Pashkov E., Korchevaya E., Faizuloev E., Rtishchev A., Cherepovich B., Bystritskaya E., et al. Knockdown of FLT4, Nup98, and Nup205 cellular genes effectively suppresses the reproduction of influenza virus strain A/WSN/1933 (H1N1) in vitro. *Infect. Disord. Drug Targets.* 2022; 22(5): 100–8. <https://doi.org/10.2174/1871526522666220325121403>
21. Пашков Е.А., Корчевая Е.Р., Файзулов Е.Б., Пашков Е.П., Зайцева Т.А., Ртищев А.А. и др. Создание модели изучения противовирусного действия малых интерферирующих РНК in vitro. *Санитарный врач.* 2022; (1): 65–74. <https://doi.org/10.33920/med-08-2201-07> EDN: <https://elibrary.ru/paaeqt>
22. Pashkov E.A., Korotyshcheva M.O., Pak A.V., Faizuloev E.B., Sidorov A.V., Poddubikov A.V., et al. Investigation of the anti-influenza activity of siRNA complexes against the cellular genes FLT4, Nup98, and Nup205 in vitro. *Fine Chem. Technol.* 2022; 17(2): 140–51. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-2-140-151>
23. Tompkins S.M., Lo C.Y., Tumpey T.M., Epstein S.L. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(23): 8682–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402630101>
24. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
25. Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016; 5(2): 85–6. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
26. Czuppon P., Pfaffelhuber P. Limits of noise for autoregulated gene expression. *J. Math. Biol.* 2018; 77(4): 1153–91. <https://doi.org/10.1007/s00285-018-1248-4>
27. Eierhoff T., Hrinicus 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>
28. Shaw M.L., Stertz S. Role of host genes in influenza virus replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2018; 419: 151–89. [https://doi.org/10.1007/82\\_2017\\_30](https://doi.org/10.1007/82_2017_30)
29. Watanabe T., Watanabe S., Kawaoka Y. Cellular networks involved in the influenza virus life cycle. *Cell Host Microbe.* 2010; 7(6): 427–39. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.008>
30. TTP. How To Perform The Delta-Delta Ct Method. Available at: <https://toptipbio.com/delta-delta-ct-pcr/>
31. Epstein S.L., Tumpey T.M., Mispilon J.A., Lo C.Y., Cooper L.A., Subbarao K., et al. DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(8): 796–801. <http://doi.org/10.3201/eid0805.010476>
32. Liang S., Mozdzanowska K., Palladino G., Gerhard W. Heterosubtypic immunity to influenza type A virus in mice. Effector mechanisms and their longevity. *J. Immunol.* 1994; 152(4): 1653–61.
33. Pak A.V., Pashkov E.A., Abramova N.D., Poddubikov A.V., Nagieva F.G., Bogdanova E.A., et al. Effect of antiviral siRNAs on the production of cytokines in vitro. *Fine Chem. Technol.* 2022; 17(5): 384–93. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-5-384-393>
34. Пашков Е.А., Пак А.В., Абрамова Н.Д., Яковлева И.В., Варганова Н.О., Богданова Е.А. и др. Изучение экспрессии гена IL-1β под действием комплексов мРНК, обладающих противогриппозным действием. *Российский иммунологический журнал.* 2022; 25(4): 485–90. <https://doi.org/10.46235/1028-7221-1202-SEO> EDN: <https://www.elibrary.ru/bbqdh>

## REFERENCES

1. WHO. World Health Day 2023. Health For All. Available at: <https://www.euro.who.int/ru/media-centre/events/events/2021/10/flu-awareness-campaign-2021>
2. Britannica. 1968 flu pandemic. Global outbreak. Available at: <https://www.britannica.com/event/1968-flu-pandemic>
3. Trilla A., Trilla G., Daer C. The 1918 “Spanish flu” in Spain. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 47(5): 668–73. <https://doi.org/10.1086/590567>
4. Onishchenko G.G., Sizikova T.E., Lebedev V.N., Borisevich S.V. Analysis of promising approaches to COVID-19 vaccine development. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2020; 20(4): 216–27. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-216-227>
5. Glover R.E., Urquhart R., Lukawska J., Blumenthal K.G. Vaccinating against covid-19 in people who report allergies. *BMJ*. 2021; 372: n120. <https://doi.org/10.1136/bmj.n120>.
6. Smith M. Vaccine safety: medical contraindications, myths, and risk communication. *Pediatr. Rev.* 2015; 36(6): 227–38. <https://doi.org/10.1542/pir.36-6-227>
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. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.03.003>
9. 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. <https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.10.009>

10. 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. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170920165926>
11. McManus M.T., Sharp P.A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* 2002; 3(10): 737–47. <https://doi.org/10.1038/nrg908>
12. Fire A.Z. Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death Differ.* 2007; 14(12): 1998–2012. <https://doi.org/http://doi.org/10.1038/sj.sdd.4402253>
13. van der Ree M.H., van der Meer A.J., van Nuenen A.C., de Bruijne J., Ottosen 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. <https://doi.org/http://doi.org/10.1111/apt.13432>
14. 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. <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1333105>
15. 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. <https://doi.org/10.1002/rmv.1976>
16. 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>
17. 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. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0671-7>
18. Adams D. Patisiran, an investigational RNAi therapeutic for patients with hereditary transthyretin-mediated (hATTR) amyloidosis: Results from the phase 3 APOLLO study. *Revue Neurologique.* 2018; 174(S1): S37. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.01.085>
19. Zhao L. Therapeutic strategies for acute intermittent porphyria. *Intractable Rare Dis. Res.* 2020; 9(4): 205–16. <https://doi.org/10.5582/irdr.2020.03089>
20. Pashkov E., Korchevaya E., Faizuloev E., Rtishchev A., Cherepovich B., Bystritskaya E., et al. Knockdown of FLT4, Nup98, and Nup205 cellular genes effectively suppresses the reproduction of influenza virus strain A/WSN/1933 (H1N1) in vitro. *Infect. Disord. Drug Targets.* 2022; 22(5): 100–8. <https://doi.org/10.2174/1871526522666220325121403>
21. Pashkov E.A., Korchevaya E.R., Faizuloev E.B., Pashkov E.P., Zaiceva T.A., Rtishchev A.A., et al. Creation of a model for studying the antiviral effect of small interfering RNAs in vitro. *Sanitary Doctor.* 2022; (1): 65–74. <https://doi.org/10.33920/med-08-2201-07> EDN: <https://elibrary.ru/paaeqt> (in Russian)
22. Pashkov E.A., Korotysheva M.O., Pak A.V., Faizuloev E.B., Sidorov A.V., Poddubikov A.V., et al. Investigation of the anti-influenza activity of siRNA complexes against the cellular genes FLT4, Nup98, and Nup205 in vitro. *Fine Chem. Technol.* 2022; 17(2): 140–51. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-2-140-151>
23. Tompkins S.M., Lo C.Y., Tumpey T.M., Epstein S.L. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(23): 8682–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402630101>
24. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
25. Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016; 5(2): 85–6. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
26. Czuppon P., Pfaffelhuber P. Limits of noise for autoregulated gene expression. *J. Math. Biol.* 2018; 77(4): 1153–91. <https://doi.org/10.1007/s00285-018-1248-4>
27. Eierhoff T., Hrincius 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>
28. Shaw M.L., Stertz S. Role of host genes in influenza virus replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2018; 419: 151–89. [https://doi.org/10.1007/82\\_2017\\_30](https://doi.org/10.1007/82_2017_30)
29. Watanabe T., Watanabe S., Kawaoka Y. Cellular networks involved in the influenza virus life cycle. *Cell Host Microbe.* 2010; 7(6): 427–39. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.008>
30. TTP. How To Perform The Delta-Delta Ct Method. Available at: <https://toptipbio.com/delta-delta-ct-pcr/>
31. Epstein S.L., Tumpey T.M., Misplon J.A., Lo C.Y., Cooper L.A., Subbarao K., et al. DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(8): 796–801. <https://doi.org/10.3201/eid0805.010476>
32. Liang S., Mozdzanowska K., Palladino G., Gerhard W. Heterosubtypic immunity to influenza type A virus in mice. Effector mechanisms and their longevity. *J. Immunol.* 1994; 152(4): 1653–61.
33. Pak A.V., Pashkov E.A., Abramova N.D., Poddubikov A.V., Nagieva F.G., Bogdanova E.A., et al. Effect of antiviral siRNAs on the production of cytokines in vitro. *Fine Chem. Technol.* 2022; 17(5): 384–93. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-5-384-393>
34. Pashkov E.A., Pak A.V., Abramova N.D., Yakovleva I.V., Vartanova N.O., Bogdanova E.A., et al. Studying expression of IL-1 $\beta$  gene under the action of siRNA complexes with anti-influenza effect. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal.* 2022; 25(4): 485–90. <http://doi.org/10.46235/1028-7221-1202-SEO> EDN: <https://www.elibrary.ru/bbqdh> (in Russian)