

**БИОХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

**BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY**

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

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-2-140-151>



УДК 615.275.2

**НАУЧНАЯ СТАТЬЯ**

**Исследование противогриппозной активности комплексов миРНК против клеточных генов *FLT4*, *Nip98* и *Nip205* на модели *in vitro***

**Е.А. Пашков<sup>1,2,✉</sup>, М.О. Коротышева<sup>1</sup>, А.В. Пак<sup>1</sup>, Е.Б. Файзулов<sup>2</sup>, А.В. Сидоров<sup>2</sup>, А.В. Поддубиков<sup>2</sup>, Е.П. Быстрицкая<sup>2</sup>, Ю.Е. Дронина<sup>1,3</sup>, В.К. Солнцева<sup>1</sup>, Т.А. Зайцева<sup>1</sup>, Е.П. Пашков<sup>1</sup>, А.С. Быков<sup>1</sup>, О.А. Свитич<sup>1,2</sup>, В.В. Зверев<sup>1,2</sup>**

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

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

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

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

**Аннотация**

**Цели.** Оценка изменения вирусной активности гриппа A/WSN/33 после комплексного нокадауна комбинаций клеточных генов *FLT4*, *Nip98* и *Nip205* в культуре легочных клеток человека A549.

**Методы.** Работа выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (Россия). Авторами выполнялась трансфекция комбинаций комплексов миРНК, вызывающих одновременное нарушение экспрессии клеточных генов *FLT4*, *Nip98* и *Nip205*. В течение трех дней с момента трансфекции и заражения проводился отбор надосадочной жидкости и клеточного лизата для последующего определения интенсивности вирусной репродукции по методу титрования по цитопатическому действию. Динамику изменения концентрации вирусной рибонуклеиновой кислоты (вРНК) определяли методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). Для вычисления статистически значимых различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

**Результаты.** При использовании всех комбинаций комплексов малых интерферирующих РНК (миРНК) жизнеспособность клеток не снижалась ниже порогового уровня в 70%. В клетках, обработанных комплексом *FLT4.2 + Nup98.1 + Nup205* при множественности заражения (*Multiplicity of infection, MOI*) 0.1 достоверное снижение вирусной репродукции на 1.5 lg отмечалось на первые сутки по отношению к неспецифическому и вирусному контролю. Использование комплексов миРНК при *MOI* 0.01 приводило к более выраженному противовирусному эффекту. Вирусный титр в клетках, обработанных комплексами миРНК *FLT4.2 + Nup98.1* и *Nup98.1 + Nup205* снижался на первые сутки на 1.5 lg. В клетках, обработанных комплексами *FLT4.2 + Nup205* и *FLT4.2 + Nup98.1 + Nup205* снижался на 1.8 и 2 lg на первые сутки и на 1.8 и 2.5 lg на вторые сутки соответственно по отношению к неспецифическому и вирусному контролю. При проведении ОТ-ПЦР-РВ отмечено достоверное снижение концентрации вирусной РНК. При *MOI* 0.1 снижение вирусной в 295, 55 и 63 раза отмечалось при использовании комплексов миРНК *FLT4.2 + Nup98.1*, *Nup98.1 + Nup205* и *FLT4.2 + Nup98.1 + Nup205* соответственно. На вторые сутки снижение вирусной РНК также отмечалось в клетках, обработанных комплексом *FLT4.2 + Nup98.1*. Снижение вРНК на третьи сутки в 415 раз отмечалось в клетках, обработанных комплексом *FLT4.2 + Nup205*. При *MOI* 0.01 концентрация вРНК снизилась в 9.5 раз при использовании комплекса *Nup98.1 + Nup205* относительно неспецифического и вирусного контроля.

**Выводы.** В ходе исследования был показан выраженный противовирусный эффект комбинаций миРНК при одновременном подавлении активности клеточных генов (*FLT4*, *Nup98* и *Nup205*), чьи продукты экспрессии играют важное участие в процессе вирусной репродукции, а также получены оригинальные конструкции комплексов миРНК. Полученные результаты имеют важное значение для создания препаратов для экстренной профилактики и терапии, чье действие основано на механизме РНК-интерференции.

**Ключевые слова:** РНК-интерференция, вирус гриппа А, экспрессия генов, матричная РНК, малые интерферирующие РНК, вирусная РНК

**Для цитирования:** Пашков Е.А., Коротышева М.О., Пак А.В., Файзулов Е.Б., Сидоров А.В., Поддубиков А.В., Быстрицкая Е.П., Дронина Ю.Е., Солнцева В.К., Зайцева Т.А., Пашков Е.П., Быков А.С., Свитич О.А., Зверев В.В. Исследование противогриппозной активности комплексов миРНК против клеточных генов *FLT4*, *Nup98* и *Nup205* на модели *in vitro*. *Тонкие химические технологии*. 2022;17(2):140–151. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-2-140-151>

## RESEARCH ARTICLE

# Investigation of the anti-influenza activity of siRNA complexes against the cellular genes *FLT4*, *Nup98*, and *Nup205* *in vitro*

**Evgeny A. Pashkov<sup>1,2,✉</sup>**, **Maria O. Korotysheva<sup>1</sup>**, **Anastasia V. Pak<sup>1</sup>**,  
**Evgeny B. Faizuloev<sup>2</sup>**, **Alexander V. Sidorov<sup>2</sup>**, **Alexander V. Poddubikov<sup>2</sup>**,  
**Elizaveta P. Bystritskaya<sup>2</sup>**, **Yuliya E. Dronina<sup>1,3</sup>**, **Viktoriiia K. Solntseva<sup>1</sup>**,  
**Tatiana A. Zaiceva<sup>1</sup>**, **Evgeny P. Pashkov<sup>1</sup>**, **Anatoly S. Bykov<sup>1</sup>**, **Oxana A. Svitich<sup>1,2</sup>**,  
**Vitaliy V. Zverev<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia

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

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

✉ Corresponding author, e-mail: [pashckov.j@yandex.ru](mailto:pashckov.j@yandex.ru)

**Abstract**

**Objectives.** Evaluation of changes in the viral activity of influenza A/WSN/33 after complex knockdown of combinations of cellular genes *FLT4*, *Nup98* and *Nup205* in human lung cell culture A549.

**Methods.** The work was carried out using the equipment of the Center for Collective Use of the I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Russia. The authors performed transfection of combinations of small interfering ribonucleic acid (siRNA) complexes that cause simultaneous disruption of the expression of cellular genes *FLT4*, *Nup98*, and *Nup205*. Within three days from the moment of transfection and infection, the supernatant fluid and cell lysate were taken for subsequent viral reproduction intensity determination using the titration method for cytopathic action. The dynamics of changes in the concentration of viral ribonucleic acid (vRNA) was determined by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR). The nonparametric Mann–Whitney test was used to calculate statistically significant differences between groups.

**Results.** Using all of the combinations of siRNA complexes, cell viability did not decrease below the threshold level of 70%. In cells treated with complex *FLT4.2* + *Nup98.1* + *Nup205* at the multiplicity of infection (MOI) equal to 0.1, a significant decrease in viral reproduction by 1.5 lg was noted on the first day in relation to nonspecific and viral controls. The use of siRNA complexes at MOI 0.01 resulted in a more pronounced antiviral effect. The viral titer in cells treated with siRNA complexes *FLT4.2* + *Nup98.1* and *Nup98.1* + *Nup205* decreased by 1.5 lg on the first day. In cells treated with complexes *FLT4.2* + *Nup205* and *FLT4.2* + *Nup98.1* + *Nup205*, it decreased by 1.8 and 2.0 lg on the first day and by 1.8 and 2.5 lg on the second day, respectively, in relation to nonspecific and viral controls. When conducting real-time RT-PCR, a significant decrease in the concentration of vRNA was noted. At MOI 0.1, a 295, 55, and 63-fold decrease in the viral load was observed with the use of siRNA complexes *FLT4.2* + *Nup98.1*, *Nup98.1* + *Nup205*, and *FLT4.2* + *Nup98.1* + *Nup205*, respectively. On the second day, a decrease in vRNA was also observed in cells treated with complex A. A 415-fold decrease in vRNA on the third day was noted in cells treated with complex *FLT4.2* + *Nup205*. At MOI 0.01, the concentration of vRNA decreased 9.5 times when using complex B relative to nonspecific and viral control.

**Conclusions.** The study showed a pronounced antiviral effect of siRNA combinations while simultaneously suppressing the activity of cellular genes (*FLT4*, *Nup98*, and *Nup205*), whose expression products are playing important role in the viral reproduction process, and obtained original designs of siRNA complexes. The results obtained are of great importance for the creation of emergence prophylactic and therapeutic drugs, whose action is based on the mechanism of RNA interference.

**Keywords:** RNA interference, influenza A virus, gene expression, mRNA, small interfering RNA, viral RNA

**For citation:** Pashkov E.A., Korotysheva M.O., Pak A.V., Faizuloev E.B., Sidorov A.V., Poddubikov A.V., Bystritskaya E.P., Dronina Yu.E., Solntseva V.K., Zaiceva T.A., Pashkov E.P., Bykov A.S., Svitich O.A., Zverev V.V. Investigation of the anti-influenza activity of siRNA complexes against the cellular genes *FLT4*, *Nup98*, and *Nup205* in vitro. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2022;17(2):140–151 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-2-140-151>

**ВВЕДЕНИЕ**

Вирус гриппа является причиной одной из самых распространенных антропонозных инфекций, поражающих верхние дыхательные пути. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2021 г. отмечалось до 1.2 млрд новых случаев гриппозной инфекции, до 5 млн случаев тяжелого течения заболевания и до 65 000 смертей

в мире<sup>1</sup>. Повышенную опасность для мирового здравоохранения несет вирус гриппа А, имеющий высокую клиническую значимость и значительный пандемический потенциал [1]. Дополнительно, осложнения гриппа способны повлиять на такие системы органов, как центральная нервная, мочеполовая и сердечно-сосудистая. Не является так же

<sup>1</sup> <https://www.euro.who.int/ru/media-centre/events/events/2021/10/flu-awareness-campaign-2021>

исключением риск развития бактериальных и грибковых постгриппозных осложнений [2–5].

Сохранение угрозы развития новых эпидемий и пандемий демонстрирует, что достигнутый прогресс в развитии инфраструктуры здравоохранения даже в наиболее развитых странах мира не гарантирует защиты населения от вновь возникающих случаев инфекций [6]. Известно, что при вспышках бактериальных инфекций ответ на подобные вызовы ищут в разработке новых вариантов антибактериальных препаратов. В случае же вирусных инфекций, на сегодняшний день практически отсутствуют подходы для экстренной разработки и создания лекарственных препаратов. Отдельные примеры успешного решения этой задачи (ингибитор протеазы вируса иммунодефицита человека Лопинавир (*Lopinavir*) для лечения вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)-инфекции; ингибиторы неструктурного белка 5В (NS5В) – Софосбувир (*Sofosbuvir*), Дасабувир (*Dasabuvir*) для лечения инфекции, вызванной вирусом гепатита С) показывают, что разработка экстренных таргетных противовирусных препаратов занимает долгое время, а высокая стоимость разработок делает их недоступными для повсеместного применения [7–9].

Параллельно с этим, применение многих противовирусных препаратов, направленных на терапию и профилактику данной инфекции не приносит необходимого результата ввиду того, что ежегодно выявляются новые вирусные штаммы, резистентные к этим препаратам [10]. Современные вакцины так же не гарантируют полной защиты от болезни, поскольку не всегда вызывают достаточный иммунный ответ, на фоне чего приобретенный иммунитет сохраняет длительность всего на 6 месяцев [11]. Следует учитывать, что противогриппозные вакцины ежегодно должны перерабатываться, поскольку каждый год появляются новые штаммы вируса гриппа, что снижает эффективность уже ранее созданных вакцин. Помимо этого, вакцинопрофилактика является затруднительной для людей, страдающих аллергией на яичный белок, а также для лиц с иммунодефицитом [12–15]. Резюмируя все вышесказанное, создание универсальной платформы для быстрой разработки экономически эффективных и безопасных средств терапии вирусных инфекций имеет очевидную актуальность для обеспечения безопасности людей, поскольку это позволит создать подходы к контролю циркуляции вирусов гриппа, патогенных для человека.

РНК-интерференция (РНКи) – последовательность регуляторных реакций в эукариотических клетках, вызванных чужеродной двуцепочечной молекулой рибонуклеиновой кислоты (РНК). Механизм РНК-интерференции состоит в разделении экзогенной двуцепочечной РНК на небольшие

последовательности эндонуклеазой *Dicer*, которые являются малыми интерферирующими РНК (миРНК). После этого, миРНК связывается с РНК-индуцируемым комплексом выключения гена (RNA-induced silencing complex или *RISC*), включающим в себя три белка: Аргонавт-2 (*Ago2*), клеточный белковый активатор протеинкиназы R (protein activator of the interferon-induced protein kinase, *PACT*) и связывающий реакцию трансактивации РНК белок (transactivation response element RNA-binding protein, *TRBP*). Образовавшийся комплекс подвергает целевую матричную РНК-мишень (мРНК) деградации [16, 17].

На сегодняшний день намечается тенденция к созданию лекарственных препаратов, основанных на механизме РНК-интерференции. Допуск к клиническому применению уже получили препараты Патисиран (*Patisiran*) и Гивосиран (*Givosiran*), применяемые в терапии генетически-обусловленных заболеваний – амилоидной полинейропатии и острой печеночной порфирии [18, 19]. Также известен ряд находящихся на разных стадиях клинических испытаний противовирусных препаратов для терапии гепатита С, респираторно-синцитиальный вирус (РСВ)-инфекции и ВИЧ-инфекции [20, 22].

Следует иметь ввиду, что одним из основных факторов, снижающим противовирусную активность РНК-интерференции, является способность к «ускользанию» от миРНК, специфичных к вирусным генам [23]. Ввиду этого, наиболее важной особенностью применяемого подхода на основе индукторов РНК-интерференции, позволяющего избежать возникновения устойчивости вируса к терапии, является одновременность терапевтического воздействия и множественность мишеней разрушающего воздействия синтетическими олигонуклеотидами на транскрипты клетки-хозяина, жизненно важные для репродукции вируса.

Поскольку ранее был показан противовирусный эффект от одиночного нокдауна клеточных генов с помощью миРНК [24, 25], целью настоящего исследования является экспериментальное обоснование и оценка эффективности одновременного нокдауна двух и более клеточных генов (*FLT4*, *Nip98* и *Nip205*) с целью снижения репродукции вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1) в культуре клеток А549.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### миРНК

Подбор миРНК осуществляли с помощью ресурса siDirect 2.0<sup>2</sup>. Олигорибонуклеотиды (*Синтол*, Россия) разводили водой до концентрации 100 пмоль/мкл. Далее комплементарные

<sup>2</sup> siDirect (mai.jp)

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 –80 °С. Все работы с готовыми дуплексами проводились с использованием холододового штатива. Последовательности используемых миРНК представлены в табл. 1. 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/WSN/33 (H1N1) (*St. Jude's Children's Research Hospital*, США). Культивирование и определение титра вируса проводилось на культуре клеток Madin-Darby Canine Kidney (MDCK).

### Культуры клеток

В работе использовались клетки почек кор-кер-спаниеля MDCK (*Institut Pasteur*, Франция) и клетки аденокарциномы человеческого легкого A549 (*ATCC*, США). 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-глутамина (*ПанЭко*, Россия) при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Клетки A549 выращивали в среде DMEM (*ПанЭко*, Россия), содержащей 5% ЭСК, 40 мкг/мл гентамицина и 300 мкг/мл L-глутамина при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.

### МТТ-тест

Выживаемость клеток A549, обработанных комплексами миРНК, оценивали с помощью метилтиазолилтетразолий бромид (МТТ) теста. На первые, вторые и третьи сутки после трансфекции в лунки с клетками 96-луночного планшета добавляли по 20 мкл раствора МТТ с концентрацией 5 мг/мл

(*ПанЭко*, Россия) и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 2 ч. Далее культуральную жидкость отбирали и добавляли в лунки по 100 мкл изопропанола (*Sigma-Aldrich*, США) в каждую лунку. С помощью планшетного спектрофотометра (*Varioscan*, *Thermo Fisher Scientific*, США) определяли оптическую плотность каждой лунки при 530 нм с учетом фоновых значений при 620 нм.

### Трансфекция клеток миРНК с последующим заражением

Для трансфекции комплексов миРНК, клетки A549 высевали на 24-луночные планшеты в посевной концентрации 1:3. После образования 80% клеточного монослоя, клетки промывались раствором фосфатно-солевого буфера и бессывороточной средой Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*). Далее смесь Lipofectamin 2000 (*Thermo Fisher Scientific*) и Opti-MEM добавляли к раствору миРНК в среде Opti-MEM и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Суммарная концентрация каждого из четырех комплексов миРНК, необходимая для нокдауна генов, составила 20 пмоль/мкл на лунку. Составы комплексов миРНК и их последовательности указаны в табл. 2 и 3 соответственно. После инкубации комплексы добавляли к клеткам. миРНК siL2 была использована в качестве неспецифического контроля. Затем клетки инкубировали при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Спустя 4 ч культуральную среду удаляли из всех лунок, кроме отрицательного контроля и добавляли по 0.5 мл вируссодержащей жидкости с множественностью заражения (МОИ) 0.1, 0.01, состоящей из среды DMEM, 0.001% тозил-фенилаланилхлорметилкетона (Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone, ТРСК) (*Sigma-Aldrich*, Германия), 40 мкг/мл гентамицина. После этого клетки вновь помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор. В течение трех последующих суток отбирались образцы супернатанта для последующего титрования и клеточный

**Таблица 1.** Последовательности миРНК, использованные в работе  
**Table 1.** siRNA sequences used in the work

миРНК / siRNA	Последовательность / Sequence
<i>FLT4.2</i>	UGAAGUUCUGUUGAAAAAGdAdC CUUUUCAACAGAACUUCAdCdA
<i>Nup98.1</i>	AGUCUUUGUUUCAGAAAGCdGdC GCUUUCUGAAACAAAGACUdCdA
<i>Nup205</i>	UCAAAAUCUUAUCAAGAAGdGdT CUUCUUGAUAAAGAUUUUGAdAdG
<i>siL2</i> (неспецифическая миРНК) <i>siL2</i> (nonspecific siRNA)	UUUCCGUCAUCGUCUUUCCdTdT GGAAAGACGAUGACGGAAAdTdT

**Таблица 2.** Комплексы миРНК, использованные в работе  
**Table 2.** Complex siRNA used in the work

Комплекс миРНК Complex siRNA	Состав комплекса миРНК Composition of complex siRNA
Комплекс А / Complex A	<i>FLT4.2 + Nup98.1</i>
Комплекс Б / Complex B	<i>Nup98.1 + Nup205</i>
Комплекс В / Complex C	<i>FLT4.2 + Nup205</i>
Комплекс Г / Complex D	<i>FLT4.2 + Nup98.1 + Nup205</i>

**Таблица 3.** Праймеры для выявления в ОТ-ПЦР-РВ М-гена ВГА  
**Table 3.** Primers for real-time RT-PCR of the influenza A virus (IAV) M-gene

Праймер Primer	Последовательность Sequence
IAV M F:	GGAATGGCTAAAGACAAGACCAAT
IAV M R:	GGGCATTTTGGACAAAGCGTCTAC
IAV M Pr: FAM	AGTCCTCGCTCACTGGGCACGGTG-BHQ1

лизат для оценки динамики концентрации вирусной РНК методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ).

#### Выявление вРНК

Вирусную РНК выделяли из клеточного лизата набором Рибо-сорб (*Helicon*, Россия). Для постановки реакции обратной транскрипции применяли набор реагентов ОТ-1 (*Синтол*, Россия). Изменение концентрации вирусной РНК контролировали с помощью количественной ОТ-ПЦР-РВ с набором праймеров и зондов к М-гену вируса гриппа А (ВГА) [26]. Для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (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 пмоль/мкл и 5 пмоль/мкл соответственно. Реакция ПЦР-РВ проводилась в амплификаторе ДТ-96 (*ДНК-технология*, Россия). Температурно-временной режим составил 95 °С — 5 мин (1 цикл); 62 °С — 40 с, 95 °С — 15 с (40 циклов). Праймеры и зонды (*Синтол*, Россия) представлены в табл. 3.

#### Титрование вируса по конечной точке цитопатогенного действия

Вирусный титр определялся по крайней точке визуального проявления цитопатического эффекта в культуре клеток MDCK. Клетки MDCK сеяли в 96-луночные планшеты с посевной концентрацией  $1 \cdot 10^4$ /см<sup>2</sup>. Через двое суток питательная среда удалялась из лунок, вносились 10-кратные последова-

тельные разведения вирусного материала в поддерживающей среде без трипсина и инкубировали на протяжении четырех суток в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С. На четвертые сутки проводили визуальный учет результатов титрования под микроскопом на наличие специфического цитопатического эффекта для вируса гриппа (изменение, деформация, открепление мертвых клеток со дна лунки). Вирусный титр рассчитывался по [27] и выражался как логарифм тканевых цитопатогенных доз (lg ТЦД<sub>50/мл</sub>).

#### 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

#### Влияние комплексов миРНК на выживаемость трансфицированных клеток

Выживаемость клеток A549, трансфицированных миРНК, оценивали в течение трех суток. По аналогии с работой [28], пороговое значение выживаемости было установлено на уровне 70%. Через 24 ч жизнеспособность клеток, обработанных комплексами С и D снизилась на 15–17%. На вторые сутки выживаемость клеток, обработанных этими же комплексами, практически не изменилась, однако токсичность комплексов А и В для клеток составила 24% и 21%, соответственно. На третьи сутки показатели выживаемости клеток практически не изменились. За 100% была принята выживаемость

нетрансфицированных клеток. Значения выживаемости нормализованы по отношению к средней оптической плотности нетрансфицированных клеток в каждый соответствующий временной интервал после трансфекции. Полученные данные представлены в табл. 4.

**Влияние комплексов миРНК на титр вируса**

С целью оценки динамики вирусной активности, на клетках MDCK проводилось титрование вирусосодержащей жидкости, отбирившейся в течение трех суток с момента внесения комплексов миРНК в культуры клеток A549. Данные, приведенные на рис. 1, указывают на способность комплексов миРНК снижать репродукцию вируса гриппа *in vitro*. На рис. 1а показано снижение вирусного титра при MOI = 0.1. Было установлено, что при таком значении MOI применение комплекса миРНК, направленного к генам *FLT4*, *Nip98* и *Nip205*, приводило к достоверному снижению вирусной репродукции на 1.5 lg ТЦД<sub>50/мл</sub> в первые сутки по сравнению с миРНК *siL2*. В нетрансфицированной культуре клеток титры вируса со временем увеличивались, достигая пиковых значений на 48 и 72 ч. То же самое было отмечено и в клетках, трансфицированных неспецифической миРНК *siL2*. На рис. 1б приведены данные о том, что при MOI = 0.01, вирусный титр в клетках, обработанных комплексами А и В, достоверно снижался на первые сутки на 1.5 lg ТЦД<sub>50/мл</sub> по отношению к контролю ( $p < 0.05$ ). Применение комплексов С и D приводило к достоверному снижению вирусного титра на 1.8 и 2 lg ТЦД<sub>50/мл</sub> на первые и на 1.8 и 2.5 lg

ТЦД<sub>50/мл</sub> на вторые сутки ( $p < 0.05$ ) соответственно по сравнению с контролями.

**Влияние миРНК на концентрацию вирусной РНК**

На рис. 2 отображено влияние миРНК на концентрацию вирусной РНК *in vitro*. Для оценки изменения концентрации вирусной РНК выполнялось ОТ-ПЦР-РВ. На рис. 2а показано, что при MOI = 0.1 применение комплексов А, В и С приводило к достоверному снижению ВРНК на первые сутки по сравнению с миРНК *siL2* в 295, 55 и 63 раза, соответственно ( $p < 0.05$ ). На вторые сутки снижение ВРНК в 205 раз отмечалось в клетках, трансфицированных комплексом А ( $p < 0.05$ ). При использовании комплекса С отмечалось снижение ВРНК в 415 раз на третьи сутки ( $p < 0.05$ ). На рис. 2б приведены данные о том, что концентрация ВРНК в клетках с MOI = 0.01, достоверно снижалась на первые сутки в 9.5 раз при использовании комплекса Б ( $p < 0.05$ ) по сравнению с неспецифическим контролем.

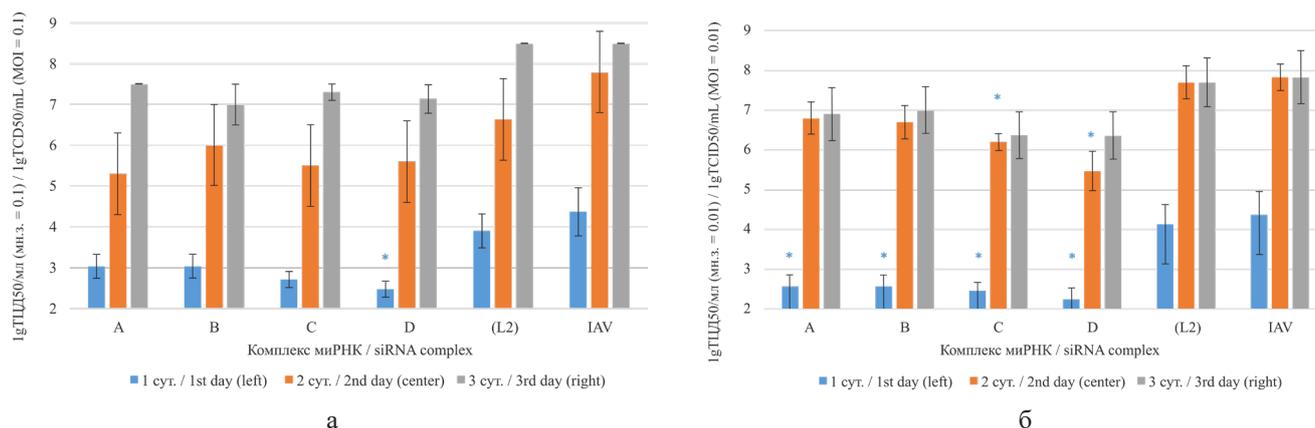
**ОБСУЖДЕНИЕ**

Настоящая работа является продолжением исследований по оценке противовирусной активности одиночных нокдаунов вышеуказанных клеточных генов посредством миРНК, выполненных авторами ранее [21, 22]. Была проведена серия экспериментов по оценке эффективности одновременного нокдауна нескольких клеточных генов

**Таблица 4.** Выживаемость клеток после трансфекции миРНК, %

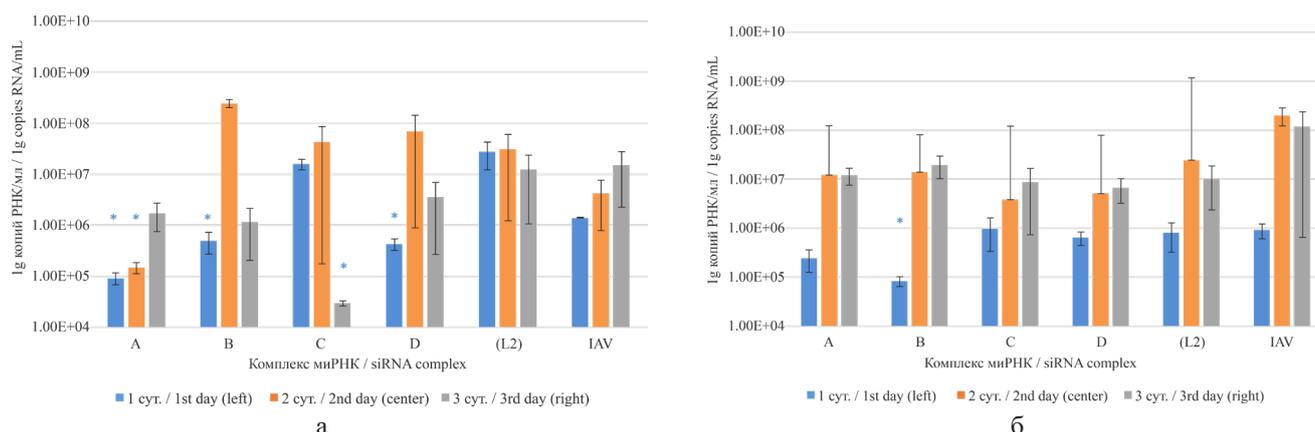
**Table 4.** Cell survival after siRNA transfection in %

Комплекс МиРНК siRNA complex	1-е сутки 1 <sup>st</sup> day	2-е сутки 2 <sup>nd</sup> day	3-и сутки 3 <sup>rd</sup> day
Комплекс А Complex A	98	76	75
Комплекс В Complex B	97	79	73
Комплекс С Complex C	85	84	86
Комплекс D Complex D	83	78	81
<i>siL2</i> (неспецифич.) <i>siL2</i> (nonspecific)	98	84	95
K-(нетрансфиц.) K-(nontransfect.)	100	100	100



**Рис. 1.** (а) Множественность заражения (мн.з.) = 0.1; (б) мн.з. = 0.01. Влияние комплексов миРНК (А – *FLT4.2* + *Nup98.1*; В – *Nup98.1* + *Nup205*; С – *FLT4.2* + *Nup205*; D – *FLT4.1* + *Nup98.1* + *Nup205*), направленных к генам *FLT4*, *Nup98* и *Nup205* на репродукцию вируса гриппа (на рисунке данные приведены в  $\log_{10}$ ).

**Fig. 1.** (a) Multiplicity of infection (MOI) = 0.1; (b) MOI = 0.01. Influence of siRNAs complexes (A – *FLT4.2* + *Nup98.1*; B – *Nup98.1* + *Nup205*; C – *FLT4.2* + *Nup205*; D – *FLT4.1* + *Nup98.1* + *Nup205*) directed to the *FLT4*, *Nup98*, and *Nup205* genes on the reproduction of the influenza virus (on the graph, the data are given in  $\log_{10}$ ).



**Рис. 2.** (а) Множественность заражения (мн.з.) = 0.1; (б) мн.з. = 0.01. Влияние комплексов миРНК (А, В, С и D) на концентрацию вирусной РНК (на графике данные приведены в  $\log_{10}$ ).

**Fig. 2.** (a) Multiplicity of infection (MOI) = 0.1; (b) MOI = 0.01. The effect of siRNA complexes (A, B, C, and D) on the concentration of vRNA (on the graph, the data are given in  $\log_{10}$ ).

с использованием комплексов миРНК, направленных к генам *FLT4*, *Nup98* и *Nup205*. Был показан выраженный противовирусный эффект миРНК, направленных одновременно к нескольким мРНК этих генов и получены данные, свидетельствующие о корреляции между снижением экспрессии клеточных генов и снижением вирусной репродукции. Для оценки эффективности комплексов миРНК использовалось два методических подхода: титрование вируса по цитопатогенному действию и ОТ-ПЦР-РВ, которые согласовывались между собой. Помимо эффективного снижения экспрессии генов, важным критерием использования миРНК или их комплексов является их низкое влияние на

жизнедеятельность клеток в результате нокдауна одного или нескольких целевых генов.

Было установлено, что композиции миРНК, направленные одновременно к генам *FLT4*, *Nup98* и *Nup205* не снижали жизнеспособность клеток ниже порогового уровня в 70% по аналогии с [28]. При титровании вируса по цитопатогенному действию отмечалось следующее снижение вирусной активности. При множественности заражения 0.1 достоверное снижение вирусной репродукции на  $1.5 \text{ Ig TCID}_{50}/\text{mL}$  отмечалось только при использовании комплекса D в первые сутки относительно неспецифической миРНК *siL2*. Лучший результат отмечался при множественности заражения 0.01.

На рис. 2 приведены данные о том, что при  $MOI = 0.01$ , вирусный титр в клетках, обработанных комплексами А и В, достоверно снижался на первые сутки на  $1.5 \lg TCD_{50/мл}$  по отношению к контролю ( $p < 0.05$ ). Применение комплексов С и D приводило к достоверному снижению вирусного титра на  $1.8$  и  $2 \lg TCD_{50/мл}$  на первые и на  $1.8$  и  $2.5 \lg TCD_{50/мл}$  на вторые сутки ( $p < 0.05$ ) соответственно по сравнению с контролями. По результатам ОТ-ПЦР-РВ отмечалось снижение количества вирусной РНК в обработанных комплексами клетках по сравнению с контролями. При  $MOI = 0.1$  использование комплексов А, В и D привело к достоверному снижению вРНК на первые сутки по сравнению с миРНК *siL2* в 295, 55 и 63 раза, соответственно ( $p < 0.05$ ). На вторые сутки подобный эффект отмечался в клетках, обработанных комплексом А. При использовании комплекса В отмечалось снижение вРНК в 415 раз на третьи сутки. На рис. 4 приведены данные о том, что концентрация вРНК в клетках с  $MOI = 0.01$  достоверно снижалась на первые сутки в 9.5 раз при использовании комплекса Б ( $p < 0.05$ ) по сравнению с неспецифическим контролем. Следует отметить, что накопление вирусной РНК связано, по всей видимости, с тем, что осуществляется частичный синтез вирусной РНК, но при этом отсутствует сборка вириона. На этом фоне происходит накопление вирусной РНК *in vitro*. Похожие результаты были показаны в статье [29].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день остро стоит вопрос создания безопасных и эффективных лекарственных средств для терапии и профилактики гриппа и его осложнений. В настоящем исследовании получены данные о том, что одновременный нокдаун нескольких клеточных генов, выполняющих важные роли в процессе эндоцитоза вируса и ядерного импорта/экспорта вРНК с помощью комплексов миРНК достоверно эффективно снижал репродукцию вируса гриппа *in vitro*. Эффективное подавление вирусной репродукции отмечалось при использовании комплекса миРНК, направленного сразу ко всем трем генам. Это свидетельствует о том, что нарушение вирусной репродукции одновременно на разных стадиях приводит к наиболее результативному эффекту и, как следствие, сниже-

нию вирусной активности. Полученные результаты позволяют рекомендовать миРНК, направленные к клеточным генам, для исследования в качестве потенциальных лекарственных препаратов для экстренной профилактики и терапии гриппа на животной модели инфекции. Параллельно с этим, полученные результаты способствуют разработке принципов быстрого конструирования и наработки специфических и эффективных противовирусных миРНК, которые могут быть использованы для разработки средств защиты от вирусов, относящихся к разным таксономическим группам. Данная технология должна стать в высокой степени универсальной и в перспективе может войти в систему быстрого реагирования на появление новых патогенных вирусов, возникновение пандемий и биологического терроризма.

## Благодарности

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

## Acknowledgments

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

## Вклад авторов

**Е.А. Пашков, М.О. Коротышева, А.В. Пак, Т.А. Зайцева** – выполнение экспериментов;  
**Е.А. Пашков, Е.П. Быстрицкая, Ю.Е. Дронина, В.К. Солнцева** – написание текста статьи, анализ полученных результатов;  
**Е.Б. Файзулов, А.В. Поддубиков, А.В. Сидоров** – научное редактирование;  
**Е.П. Пашков, А.С. Быков, О.А. Свитич, В.В. Зверев** – идея исследования, резюме, общее руководство.

## Authors' contributions

**E.A. Pashkov, M.O. Korotysheva, A.V. Pak, and Zaiceva T.A.** – conducting the experiments;  
**E.A. Pashkov, E.P. Bystritskaya, Yu.E. Dronina, and V.K. Solntseva** – writing the text of the article and the analysis of the obtained results;  
**E.B. Fayzuloev, A.V. Poddubikov, and A.V. Sidorov** – scientific editing;  
**E.P. Pashkov, A.S. Bykov, O.A. Svitich, and V.V. Zverev** – idea of the study, summary, and general management.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
 The authors declare no conflicts of interest.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Peteranderl C., Herold S., Schmoldt C. Human Influenza Virus Infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2016;37(4):487–500. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584801>
2. Sellers S.A., Hagan R.S., Hayden F.G., Fischer W.A. 2nd. The hidden burden of influenza: A review of the extrapulmonary complications of influenza infection. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2017;11(5):372–393. <https://doi.org/10.1111/irv.12470>
3. Koehler P., Bassetti M., Kochanek M., Shimabukuro-Vornhagen A., Cornely O.A. Intensive care management of influenza-associated pulmonary aspergillosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019;25(12):1501–1509. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.04.031>
4. Radzišauskienė D., Vitkauskaitė M., Žvinytė K., Mameniškienė R. Neurological complications of pandemic A(H1N1)2009pdm, postpandemic A(H1N1)v, and seasonal influenza A. *Brain Behav.* 2021;11(1):e01916. <https://doi.org/10.1002/brb3.1916>
5. Kalil A.C., Thomas P.G. Influenza virus-related critical illness: pathophysiology and epidemiology. *Crit. Care.* 2019;23(1):258. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2539-x>
6. Webby R.J., Webster R.G. Emergence of influenza A viruses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2001;356(1416):1817–1828. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0997>
7. Kirby B.J., Symonds W.T., Kearney B.P., Mathias A.A. Pharmacokinetic, Pharmacodynamic, and Drug-Interaction Profile of the Hepatitis C Virus NS5B Polymerase Inhibitor Sofosbuvir. *Clin. Pharmacokinet.* 2015;54(7):677–690. <https://doi.org/10.1007/s40262-015-0261-7>
8. Gentile I., Buonomo A.R., Borgia G. Dasabuvir: A Non-Nucleoside Inhibitor of NS5B for the Treatment of Hepatitis C Virus Infection. *Rev. Recent Clin. Trials.* 2014;9(2):115–123. <https://doi.org/10.2174/1574887109666140529222602>
9. Magro P., Zanella I., Pescarolo M., Castelli F., Quiros-Roldan E. Lopinavir/ritonavir: Repurposing an old drug for HIV infection in COVID-19 treatment. *Biomed. J.* 2021;44(1):43–53. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.11.005>
10. Han J., Perez J., Schafer A., Cheng H., Peet N., Rong L., Manicassamy B. Influenza Virus: Small Molecule Therapeutics and Mechanisms of Antiviral Resistance. *Curr. Med. Chem.* 2018;25(38):5115–5127. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170920165926>
11. Castle S.C. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin. Infect. Dis.* 2000;31(2):578–585. <https://doi.org/10.1086/313947>
12. Looi Q.H., Foo J.B., Lim M.T., Le C.F., Show P.L. How far have we reached in development of effective influenza vaccine? *Int. Rev. Immunol.* 2018;37(5):266–276. <https://doi.org/10.1080/08830185.2018.1500570>
13. Pleguezuelos O., James E., Fernandez A., Lopes V., Rosas L.A., Cervantes-Medina A., Cleath J., Edwards K., Neitzey D., Gu W., Hunsberger S., Taubenberger J.K., Stoloff G., Memoli M.J. Efficacy of FLU-v, a broad-spectrum influenza vaccine, in a randomized phase IIb human influenza challenge study. *npj Vaccines.* 2020;5(1):22. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0174-9>
14. Wang F., Chen G., Zhao Y. Biomimetic nanoparticles as universal influenza vaccine. *Smart Mater. Med.* 2020;1:21–23. <https://doi.org/10.1016/j.smaim.2020.03.001>
15. Smith M. Vaccine safety: medical contraindications, myths, and risk communication. *Pediatr. Rev.* 2015;36(6):227–238. <https://doi.org/10.1542/pir.36.6.227>
16. McManus M.T., Sharp P.A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* 2002;3(10):737–747. <https://doi.org/10.1038/nrg908>
17. Пашков Е.А., Файзулоев 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. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-182-190>  
[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. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology.* 2020;65(4):182–190 (in Russ.). <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-182-190>]
18. Adams D., Suhr O.B. 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.neurol.2018.01.085>
19. Zhao L., Wang X., Zhang X., Liu X., Zhang Y., Zhang S. Therapeutic strategies for acute intermittent porphyria. *Intractable & Rare Diseases Research.* 2020;9(4):205–216. <https://doi.org/10.5582/irdr.2020.03089>
20. Van der Ree M.H., et al. Miravirsens dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics.* 2015;43(1):102–113. <https://doi.org/10.1111/apt.13432>
21. DeVincenzo J., et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS).* 2010;107(19):8800–8805. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912186107>
22. Qureshi A., Tantray V.G., Kirmani A.R., Ahangar A.G. A review on current status of antiviral siRNA. *Rev. Med. Virol.* 2018;28(4):1976. <https://doi.org/10.1002/rmv.1976>
23. Lesch M., Luckner M., Meyer M., Weege F., Gravenstein I., Raftery M., Sieben C., Martin-Sancho L., Imai-Matsushima A., Welke R.W., Frise R., Barclay W., Schönrich G., Herrmann A., Meyer T.F., Karlas A. RNAi-based small molecule repositioning reveals clinically approved urea-based kinase inhibitors as broadly active antivirals. *PLoS Pathog.* 2019;15(3):e1007601. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007601>
24. Пашков Е.А., Файзулоев Е.Б., Корчевая Е.Р., Ртищев А.А., Черепович Б.С., Сидоров А.В., Поддубиков А.В., Быстрицкая Е.П., Дронина Ю.Е., Быков А.С., Свитич О.А., Зверев В.В. Нокдаун клеточных генов *FLT4*, *Nup98* и *Nup205* как супрессор вирусной активности гриппа А/WSN/33 (H1N1) в культуре клеток А549. *Тонкие химические технологии.* 2021;16(6):476–489. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-16-6-476-489>  
[Pashkov E.A., Faizuloev E.B., Korchevaya E.R., Rtishchev A.A., Cherepovich B.S., Sidorov A.V., Poddubikov A.V., Bystritskaya E.P., Dronina Yu.E., Bykov A.S., Svitich O.A., Zverev V.V. Knockdown of *FLT4*, *Nup98*, and *Nup205* cellular genes as a suppressor for the viral activity of Influenza A/WSN/33 (H1N1) in A549 cell culture. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2021;16(6):476–489 (in Russ.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-16-6-476-489>]
25. Пашков Е.А., Корчевая Е.Р., Файзулоев Е.Б., Пашков Е.П., Зайцева Т.А., Ртищев А.А., Поддубиков А.В., Свитич О.А., Зверев В.В. Создание модели изучения противовирусного действия малых интерферирующих РНК *in vitro*. *Санитарный врач.* 2022;1. <https://doi.org/10.33920/med-08-2201-07>

[Pashkov E.A., Korchevaya E.R., Faizuloev E.B., Pashkov E.P., Zvereva T.A. Rtishchev A.A., Poddubikov A.V., Svitich O.A., Zverev V.V. Creation of model for studying the antiviral effect of small interfering RNAs *in vitro*. *Sanitarnyi vrach*. 2022;1 (in Russ.). <https://doi.org/10.33920/med-08-2201-07j>]

26. Lee H.K., Loh T.P., Lee C.K., Tang J.W., Chiu L., Koay E.S. A universal influenza A and B duplex real-time RT-PCR assay. *J. Med. Virol.* 2012;84(10):1646–1651. <https://doi.org/10.1002/jmv.23375>

27. Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016;5(2):85–86. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>

28. 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>

29. 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;19:627–642. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.12.018>

### Об авторах:

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

**Коротышева Мария Олеговна**, студент, Международная школа «Медицина Будущего», Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, с. 2). E-mail: trans.mutation@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-7216-1266>

**Пак Анастасия Витальевна**, студент, Институт клинической медицины им. Н.В. Склифосовского, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, с. 2). E-mail: dcennpk@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0003-4295-7858>

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

**Сидоров Александр Викторович**, к.б.н., заведующий лабораторией ДНК-содержащих вирусов, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (105064, Россия, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5А). E-mail: sashasidorov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3561-8295>

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

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

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

**Солнцева Виктория Константиновна**, к.м.н., старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. академика А.А. Воробьева, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, с. 2). E-mail: speak\_to\_vika@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-3783-9232>

**Зайцева Татьяна Александровна**, к.м.н., старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. академика А.А. Воробьева, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, с. 2). E-mail: zat25@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9205-322X>

**Пашков Евгений Петрович**, д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. академика А.А. Воробьева, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, с. 2). E-mail: 9153183256@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-4963-5053>

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

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

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

**About the authors:**

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

**Maria O. Korotysheva**, Student, International School "Medicine of the Future," I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) (8, Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: trans.mutation@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-7216-1266>

**Anastasia V. Pak**, Student, Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) (8, Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: dcnpk@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0003-4295-7858>

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

**Alexander V. Sidorov**, Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of DNA viruses, Federal State Budgetary Scientific Institution "I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera" (5A, Malyi Kazennyi pereulok, Moscow, 105064, Russia). E-mail: sashasidorov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3561-8295>

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

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

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

**Viktoriya K. Solntseva**, Cand. Sci. (Med.), Senior Lecturer, A.A. Vorobiev Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) (8, Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: speak\_to\_vika@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-3783-9232>

**Tatyana A. Zaiceva**, Cand. Sci. (Med.), Senior Lecturer, A.A. Vorobiev Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) (8, Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: zat25@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9205-322X>

**Evgeny P. Pashkov**, Dr. Sci. (Med.), Professor, A.A. Vorobiev Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) (8, Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: 9153183256@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-4963-5053>

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

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

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

*Поступила: 15.03.2022; получена после доработки: 30.03.2022; принята к опубликованию: 20.04.2022.  
The article was submitted: March 15, 2022; approved after reviewing: March 30, 2022; accepted for publication: April 20, 2022.*