

**БИОХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

**BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY**

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

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-5-384-393>



УДК 615.275.2

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

**Действие противовирусных миРНК  
на выработку цитокинов *in vitro***

**А.В. Пак<sup>1</sup>, Е.А. Пашков<sup>1,2,✉</sup>, Н.Д. Абрамова<sup>2</sup>, А.В. Поддубиков<sup>2</sup>, Ф.Г. Нагиева<sup>2</sup>,  
Е.А. Богданова<sup>1</sup>, Е.П. Пашков<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

✉ Автор для переписки, e-mail: [pashkov.j@yandex.ru](mailto:pashkov.j@yandex.ru)

**Аннотация**

**Цели.** Оценить динамику уровня экспрессии генов IL-1 $\beta$  и IL-28 $\beta$  (IFN- $\lambda$ 3) в результате комплексного нокдауна некоторых клеточных генов, чьи продукты экспрессии играют важную роль в репродукции вируса гриппа.

**Методы.** Вирусодержащую жидкость и клеточный лизат отбирали в течение 3-х дней с момента трансфекции и заражения и оценивали интенсивность вирусной репродукции методами титрования по цитопатическому действию. Концентрацию вирусной рибонуклеиновой кислоты (вРНК) и изменение экспрессии IL-1 $\beta$  и IL-28 $\beta$  (IFN- $\lambda$ 3) 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.** Использование каждого комплекса малых интерферирующих РНК (миРНК) приводило к снижению вирусной репродукции на 1-е сутки при множественности заражения 0.001. Применение комплексов А (FLT4.2 + Nip98.1) и D (FLT4.2 + Nip98.1 + Nip205) приводило к снижению вирусного титра на 2.8 lgТЦД<sub>50</sub>/мл и на 2.1 lgТЦД<sub>50</sub>/мл относительно применения неспецифической миРНК L2 и вирусного контроля ( $p \leq 0.05$ ).

В результате трансфекции комплексов В (Nip98.1 + Nip205) и С (FLT4.2 + Nip205) вирусный титр также снижался на  $1.5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$  и  $1.8 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$  соответственно относительно неспецифической миРНК L2 и вирусного контроля ( $p \leq 0.05$ ). При проведении ОТ-ПЦР-РВ также было отмечено достоверное уменьшение концентрации вРНК. При использовании комплексов В, С и D концентрация вРНК снижалась на 1-е сутки в 14.5, 4.1 и 15.0 раз соответственно. На 2-е сутки в клетках с комплексами В и D наблюдалось уменьшение концентрации вРНК в 17.1 и 18.3 раз ( $p \leq 0.05$ ). Наряду со снижением вирусного титра и вРНК наблюдалось повышение экспрессии генов IL-1 $\beta$  и IL-28 $\beta$  на 1-е сутки при использовании всех комплексов миРНК относительно неспецифического и вирусного контроля ( $p \leq 0.05$ ). На 2-е сутки также наблюдалось повышение экспрессии в клетках с комплексами А и D, а на третьи – в клетках с комплексом D ( $p \leq 0.05$ ).

**Выводы.** Исследование показало, что применение комплексов миРНК приводит к выраженному противовирусному эффекту при одновременном подавлении активности клеточных генов (FLT4, Nip98 и Nip205). Параллельно с этим было выявлено, что при трансфекции комплексов, блокирующих образование продуктов экспрессии, необходимых для вирусной репродукции, повышается уровень экспрессии генов IL-1 $\beta$  и IL-28 $\beta$ . Данные результаты свидетельствуют о том, что используемые миРНК обладают не только противовирусной, но также и иммуномодулирующей активностью, что способствует более эффективному иммунному ответу организма.

**Ключевые слова:** РНК-интерференция, IL-1 $\beta$ , вирус гриппа А, IFN- $\lambda$ 3, экспрессия генов, миРНК, провоспалительные цитокины, IL-28 $\beta$ , вирусная РНК

**Для цитирования:** Пак А.В., Пашков Е.А., Абрамова Н.Д., Поддубиков А.В., Нагиева Ф.Г., Богданова Е.А., Пашков Е.П., Свитич О.А., Зверев В.В. Действие противовирусных миРНК на выработку цитокинов *in vitro*. *Тонкие химические технологии*. 2022;17(5):384–393. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-5-384-393>

## RESEARCH ARTICLE

# Effect of antiviral siRNAs on the production of cytokines *in vitro*

Anastasia V. Pak<sup>1</sup>, Evgeny A. Pashkov<sup>1,2,✉</sup>, Natalia D. Abramova<sup>2</sup>, Alexander V. Poddubikov<sup>2</sup>, Firaya G. Nagieva<sup>2</sup>, Ekaterina A. Bogdanova<sup>1</sup>, Evgeny P. Pashkov<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

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

### Abstract

**Objectives.** To evaluate the dynamics of the expression level of IL-1 $\beta$  and IL-28 $\beta$  (IFN- $\lambda$ 3) genes as a result of complex knockdown of some cellular genes, whose expression products play an important role in the reproduction of the influenza virus.

**Methods.** Following the collection of virus-containing liquid and cell lysate within three days from the moment of transfection and infection, the intensity of viral reproduction was assessed using the cytopathic effect titration method. The concentration of viral ribonucleic acid (vRNA) and change in the expression of IL-1 $\beta$  and IL-28 $\beta$  (IFN- $\lambda$ 3) were determined by real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (real-time RT-qPCR). The nonparametric Mann-Whitney test was used to statistically calculate significant differences between groups.

**Results.** The use of each small interfering ribonucleic acid (siRNA) complex led to a decrease in viral reproduction on the first day at the multiplicity of infection (MOI) of 0.001. The use of complex A (FLT4.2 + Nup98.1) and D (FLT4.2 + Nup98.1 + Nup205) led to a decrease in viral titer by 2.8 lgTCID<sub>50</sub>/mL and by 2.1 lgTCID<sub>50</sub>/mL relative to the use of nonspecific L2 siRNA and viral control ( $p \leq 0.05$ ). Transfection of complexes B (Nup98.1 + Nup205) and C (FLT4.2 + Nup205) also reduced the viral titer by 1.5 lgTCID<sub>50</sub>/mL and 1.8 lgTCID<sub>50</sub>/mL relative to nonspecific L2 siRNA and viral control ( $p \leq 0.05$ ). When conducting real-time RT-qPCR, a significant decrease in the concentration of viral RNA was also noted. When using complexes B, C, and D, the concentration of vRNA decreased on the first day by 14.5, 4.1, and 15 times, respectively. On the second day, a decrease in vRNA was observed in cells with B and D complexes by 17.1 and 18.3 times ( $p \leq 0.05$ ). Along with a decrease in the viral titer and vRNA, an increase in the expression of the IL-1 $\beta$  and IL-28 $\beta$  genes was observed on the first day when using all siRNA complexes relative to nonspecific and viral controls ( $p \leq 0.05$ ). On the second day, an increase was also observed in cells with A and D complexes, while on the third day, there was an increase in the expression of these genes in cells with complex D ( $p \leq 0.05$ ).

**Conclusions.** The use of siRNA complexes is shown to have a pronounced antiviral effect while simultaneously suppressing the activity of cellular genes (FLT4, Nup98 and Nup205). In parallel, the transfection of complexes that block the formation of expression products necessary for viral reproduction is demonstrated to lead to an increase in the level of expression of the IL-1 $\beta$  and IL-28 $\beta$  genes. These results indicate not only that the use of siRNA has antiviral activity, but also immunomodulatory activity, which can contribute to a more effective immune response of the body.

**Keywords:** RNA interference, IL-1 $\beta$ , influenza A virus, IFN- $\lambda$ 3, gene expression, siRNA, pro-inflammatory cytokines, IL-28 $\beta$ , viral RNA

**For citation:** Pak A.V., Pashkov E.A., Abramova N.D., Poddubikov A.V., Nagieva F.G., Bogdanova E.A., Pashkov E.P., Svitich O.A., Zverev V.V. Effect of antiviral siRNAs on the production of cytokines *in vitro*. *Tonk. Khim. Tekhnol.* = *Fine Chem. Technol.* 2022;17(5):384–393 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-5-384-393>

## ВВЕДЕНИЕ

Данная статья продолжает исследования по созданию универсальной платформы для быстрой разработки экономически эффективных и безопасных средств терапии вирусных инфекций, начатые в 2021 г. группой ученых Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (Россия) [1, 2].

Респираторные вирусные инфекции на сегодняшний день представляют из себя одну из наиболее глобальных мировых проблем, несущих тяжелые социальные и экономические последствия. Например, пандемия COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, с 2019 г. унесла

жизни более 6.3 млн человек во всем мире<sup>1</sup>, а гриппозная инфекция – почти 650000 жизней<sup>2</sup> только в 2021 г. Вирусные инфекции поражают не только респираторную, но и центральную нервную, мочеполовую, сердечно-сосудистую и иммунную системы, а также вызывают развитие бактериальных и грибковых осложнений [3–6].

Вирусы гриппа имеют белки, обладающие иммуномодулирующими свойствами и способные вызывать вторичные иммунодефициты. Среди

<sup>1</sup> <https://coronavirus-graph.ru/mir>, дата обращения 20.06.2022. / Accessed June 20, 2022.

<sup>2</sup> <https://www.euro.who.int/ru/media-centre/events/events/2021/10/flu-awareness-campaign-2021>, дата обращения 20.06.2022. / Accessed June 20, 2022.

них наиболее изученным является белок NS-1 (nonstructural protein-1). Одной из его основных функций является нарушение функционирования интерферон-опосредованных механизмов защиты организма, из-за чего снижается выработка провоспалительных цитокинов – интерлейкинов, что приводит к недостаточности иммунного ответа [7].

На сегодняшний день существует ряд этиотропных, патогенетических, симптоматических и иммуномодулирующих препаратов, применяющихся для терапии гриппа. Однако достижение полного терапевтического эффекта от применения этих препаратов невозможно из-за появления новых резистентных форм вируса гриппа, развития аллергических реакций на лекарственные препараты, необходимости индивидуального подбора препаратов [8–11]. Остается также открытым вопрос применения иммуномодулирующих препаратов, поскольку эффект от их применения носит ограниченный характер, а в некоторых случаях способен повлечь за собой тяжелые последствия для самого пациента [12–14]. Использование противовирусных препаратов также имеет определенные ограничения [15]. Для преодоления этих проблем необходимы дизайн и разработка принципиально новых противовирусных препаратов. Одна из перспективных технологий создания специфических противовирусных препаратов основана на механизме РНК-интерференции [16–18].

Ранее нами был показан выраженный противовирусный эффект от применения малых интерферирующих РНК (миРНК), направленных к одному, двум и более клеточным генам одновременно, чьи продукты экспрессии принимают важное участие в вирусной репродукции, однако не была выполнена оценка изменения экспрессии некоторых провоспалительных цитокинов, играющих важную роль в формировании противовирусного иммунитета [1, 2, 19]. *IL-1 $\beta$*  принимает участие в усилении экспрессии генов MCP-1 и MCP-3 и функциональном созревании тканевых макрофагов и дендритных клеток [20, 21]. Это приводит к усилению воспалительной реакции и активации эффективной системы презентации антигена. *IFN- $\lambda$ 3* образуются раньше, чем интерфероны другого типа, и проявляют мощную защитную функцию на ранней стадии инфекции. Применение миРНК по отношению к клеточным генам, участвующим в процессе репродукции вируса гриппа, способно снижать вирусную активность *in vitro* и способствовать более эффективному иммунному ответу [18].

Исходя из вышесказанного, целью настоящего исследования является оценка динамики уровня экспрессии генов *IL-1 $\beta$*  и *IL-28 $\beta$*  (*IFN- $\lambda$ 3*) в результате

комплексного нокадауна некоторых клеточных генов, чьи продукты экспрессии играют важную роль в репродукции вируса гриппа.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подбор миРНК, олигонуклеотидов, последовательности используемых миРНК, информация об используемом вирусе гриппа A/WSN/33 (**H1N1**), культурах клеток, методика оценки цитотоксичности комплексов миРНК, методика трансфекции клеток миРНК с последующим заражением, комплексы миРНК, использованные в работе, методика титрования вируса по конечной точке цитопатического действия представлены в наших более ранних исследованиях [1, 2, 19]. Экспрессия генов *IL-1 $\beta$*  и *IFN- $\lambda$ 3* исследовалась методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ).

### Выявление вирусной РНК

Тотальную РНК выделяли из клеточного лизата набором ExtractRNA (*Евроген*, Россия). Для постановки реакции обратной транскрипции применяли набор реагентов «ОТ-1» (*Синтол*, Россия). Изменение концентрации вирусной РНК (вРНК) контролировали с помощью количественной ОТ-ПЦР-РВ с набором праймеров и зондов к М-гену вируса гриппа А [22]. Для оценки экспрессии *IL-1 $\beta$*  и *IFN- $\lambda$ 3* использовали ОТ-ПЦР-РВ, а также  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  критерий оценки экспрессии.

Для ПЦР-РВ использовали набор реагентов в присутствии красителя EVA Green и референсного красителя ROX (*Синтол*) и 2.5-кратную реакционную смесь для проведения ПЦР-РВ (*Синтол*). Рабочая концентрация праймеров и зондов составила 10 пмоль/мкл и 5 пмоль/мкл соответственно. Реакция ПЦР-РВ проводилась в амплификаторе ДТ-96 (*ДНК-технология*, Россия). Температурно-временной режим составил 95 °С — 5 мин (1 цикл), 62 °С — 40 с, 95 °С — 15 с (40 циклов). Праймеры и зонды синтезированы компанией *Синтол* и представлены в [2].

### Статистическая обработка данных

Статистическую значимость полученных результатов определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни. Разница считалась достоверной при уровне статистической значимости  $0.01 \leq p \leq 0.05$ . Показатели достоверности рассчитывались с использованием ПО «Minitab»<sup>3</sup>.

<sup>3</sup> <https://www.minitab.com/en-us/>, дата обращения 08.06.2022. / Accessed June 08, 2022.

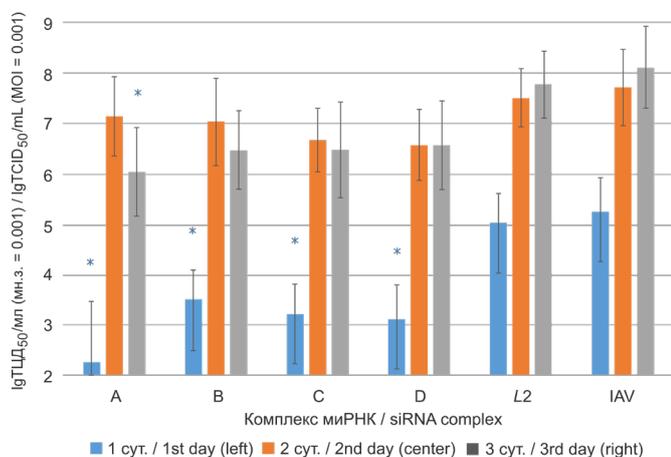
## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Оценка цитотоксичности

Ранее подобные последовательности миРНК были использованы в исследовании по оценке противовирусного эффекта в отношении вируса гриппа. Подробные результаты оценки цитотоксичности представлены в работе [2].

### Влияние комплексов миРНК на титр вируса

Для оценки эффективности противовирусного действия миРНК и снижения вирусной активности, на культуре клеток Madin-Darby Canine Kidney выполнялось титрование вирусосодержащей жидкости, отбирившейся на 24, 48 и 72 ч с момента трансфекции комплексов миРНК в культуру клеток A549. В отличие от нашего предыдущего исследования [1], в настоящей работе множественность заражения (МОИ) составила 0.001. Было установлено, что при данном МОИ использование всех комплексов миРНК, направленных к клеточным генам, приводит к достоверному снижению вирусной репродукции на первые сутки после заражения. Полученные данные показаны на рис. 1



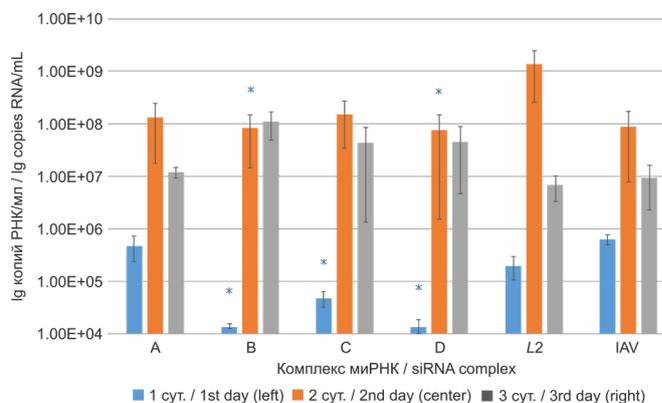
**Рис. 1.** Влияние комплексов миРНК (A: *FLT4* + *Nup98*; B: *Nup98* + *Nup205*; C: *FLT4.2* + *Nup205*; D: *FLT4* + *Nup98* + *Nup205*), направленных к генам *FLT4*, *Nup98* и *Nup205* на репродукцию вируса гриппа ( $p \leq 0.05$ ). IAV – influenza A virus. На оси ординат указано изменение титра вируса в  $\text{lgTCD}_{50}/\text{мл}$ . На оси абсцисс указаны комплексы миРНК.

**Fig. 1.** Influence of siRNAs complexes (A: *FLT4* + *Nup98*; B: *Nup98* + *Nup205*; C: *FLT4* + *Nup205*; D: *FLT4* + *Nup98* + *Nup205*) directed to the *FLT4*, *Nup98*, and *Nup205* genes on the reproduction of the influenza virus ( $p \leq 0.05$ ). IAV—influenza A virus. The ordinate indicates the change in virus titer in  $\text{lgTCD}_{50}/\text{mL}$ . The abscissa shows siRNA complexes.

и свидетельствуют о способности миРНК снижать вирусную активность *in vitro*. При трансфекции комплекса А, направленного к генам *FLT4* + *Nup98*, отмечалось достоверное снижение вирусного титра по сравнению с неспецифическим контролем на 2.8  $\text{lgTCD}_{50}/\text{мл}$  ( $p \leq 0.05$ ), а при трансфекции комплекса В (гены *Nup98* + *Nup205*) – на 1.5  $\text{lgTCD}_{50}/\text{мл}$  ( $p \leq 0.05$ ). Применение комплексов С (гены *FLT4* + *Nup205*) и D (гены *FLT4* + *Nup98* + *Nup205*) приводило к достоверному снижению вирусного титра по сравнению с неспецифическим контролем на 1.8 и на 2.1  $\text{lgTCD}_{50}/\text{мл}$  соответственно ( $p \leq 0.05$ ).

### Влияние миРНК на концентрацию вРНК

На рис. 2 показано изменение концентрации вРНК *in vitro* в результате трансфекции миРНК. Оценка изменения концентрации вРНК проводилась с помощью ОТ-ПЦР-РВ. Отмечалось, что при  $\text{MOI} = 0.001$  применение комплексов В, С и D приводило к достоверному снижению вРНК на первые сутки по сравнению с неспецифическим контролем в 14.5, 4.1 и 15 раз соответственно ( $p \leq 0.05$ ). На вторые сутки снижение вРНК отмечалось при использовании комплексов В и D в 17.1 и 18.3 раза ( $p \leq 0.05$ ).

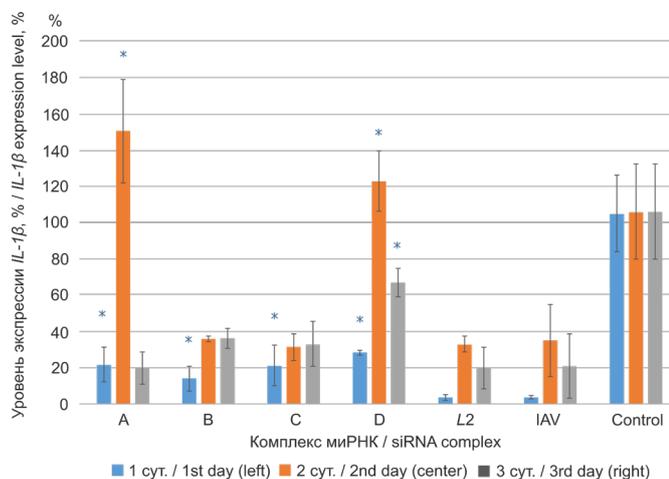


**Рис. 2.** Влияние комплексов миРНК (A: *FLT4* + *Nup98*; B: *Nup98* + *Nup205*; C: *FLT4* + *Nup205*; D: *FLT4* + *Nup98* + *Nup205*) на концентрацию вРНК. (На графике данные приведены в  $\text{lg}_{10}$ , в тексте снижение указано в количестве раз) ( $p \leq 0.05$ ). IAV – influenza A virus. На оси ординат указано изменение количества вРНК в  $\text{lg}_{10}$ . На оси абсцисс указаны комплексы миРНК.

**Fig. 2.** Effect of siRNA complexes (A: *FLT4* + *Nup98*; B: *Nup98* + *Nup205*; C: *FLT4* + *Nup205*; D: *FLT4* + *Nup98* + *Nup205*) on the concentration of viral RNA. (On the graph, the data are given in  $\text{lg}_{10}$ , in the text the decrease is indicated in the number of times) ( $p \leq 0.05$ ). IAV—influenza A virus. The ordinate indicates the change for vRNA in  $\text{lg}_{10}$ . The abscissa shows siRNA complexes.

### Динамика экспрессии *IL-1β* и *IFN-λ3*

Оценка экспрессии *IL-1β* и *IFN-λ3* выполнялась с помощью ОТ-ПЦР-РВ и критерия оценки экспрессии  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . На рис. 3 показаны результаты оценки экспрессии *IL-1β*. Было выявлено, что при MOI = 0.001 достоверное повышение экспрессии *IL-1β* на 18% относительно неспецифического контроля отмечалось на 1 сутки при использовании комплекса А. При трансфекции комплексов В, С и D также отмечалось достоверное повышение экспрессии *IL-1β* на 10, 17 и 25% соответственно ( $p \leq 0.05$ ). На вторые сутки уровень экспрессии *IL-1β* повысился в клетках, трансфицированных комплексами А и D на 118 и 90% ( $p \leq 0.05$ ) по сравнению с неспецифическим контролем, а также превысил уровень экспрессии в незараженных клетках на 45 и 17% соответственно. На третьи сутки повышение экспрессии *IL-1β* на 47% отмечалось в клетках, трансфицированных комплексом D ( $p \leq 0.05$ ). На рис. 4 представлены данные об изменении экспрессии *IFN-λ3* в течение трех суток с момента трансфекции и заражения. Достоверное повышение экспрессии относительно неспецифического контроля отмечалось лишь на вторые сутки при использовании комплексов А и С на 10 и 24% соответственно ( $p \leq 0.05$ ).



**Рис. 3.** Влияние комплексов миРНК

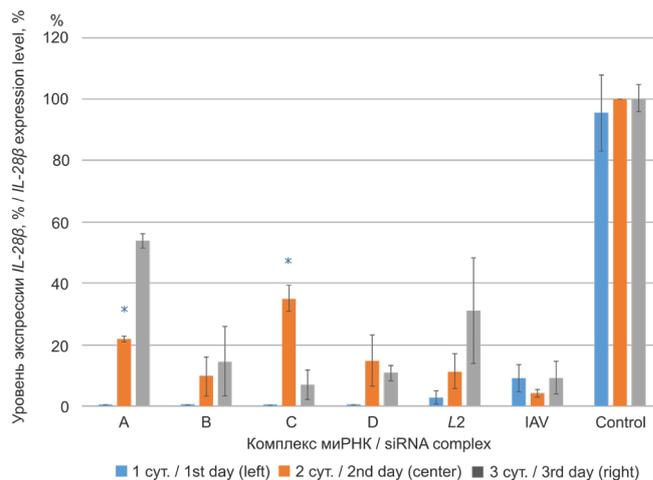
(A: *FLT4* + *Nup98*; B: *Nup98* + *Nup205*; C: *FLT4* + *Nup205*; D: *FLT4* + *Nup98* + *Nup205*) на изменение экспрессии *IL-1β* ( $p \leq 0.05$ ). IAV – influenza A virus. На оси ординат указано изменение уровня экспрессии *IL-1β*.

На оси абсцисс указаны комплексы миРНК.

**Fig. 3.** Effect of siRNA complexes

(A: *FLT4* + *Nup98*; B: *Nup98* + *Nup205*; C: *FLT4* + *Nup205*; D: *FLT4* + *Nup98* + *Nup205*) on changes in *IL-1β* expression ( $p \leq 0.05$ ). IAV—influenza A virus.

The ordinate shows the change in the expression level of *IL-1β*. The abscissa shows siRNA complexes.



**Рис. 4.** Влияние комплексов миРНК

(A: *FLT4* + *Nup98*; B: *Nup98* + *Nup205*; C: *FLT4* + *Nup205*; D: *FLT4* + *Nup98* + *Nup205*) на изменение экспрессии *IFN-λ3* ( $p \leq 0.05$ ). IAV – influenza A virus.

На оси ординат указано изменение уровня экспрессии *IFN-λ3*. На оси абсцисс указаны комплексы миРНК.

**Fig. 4.** Effect of siRNA complexes

(A: *FLT4* + *Nup98*; B: *Nup98* + *Nup205*; C: *FLT4* + *Nup205*; D: *FLT4* + *Nup98* + *Nup205*) on changes in *IFN-λ3* expression ( $p \leq 0.05$ ). IAV—influenza A virus.

The ordinate shows the change in the expression level of *IFN-λ3*. The abscissa shows siRNA complexes.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящая работа является исследованием по оценке влияния миРНК на индукцию выработки *IL-1β* и *IFN-λ3* и сопутствующего снижения вирусной активности. В исследовании была проведена серия экспериментов по оценке изменения экспрессии уровня *IL-1β* и *IFN-λ3* при подавлении экспрессии клеточных генов *FLT4*, *Nup98* и *Nup205*, важных для репродукции вируса гриппа с помощью миРНК. Для оценки эффективности экспрессии уровня цитокинов и снижения вирусной активности применялось два методических подхода, согласующихся между собой: титрование вируса по цитопатическому действию и ОТ-ПЦР-РВ. Было показано, что применение миРНК приводит к выраженному противовирусному эффекту, а также получены данные, свидетельствующие о взаимосвязи между снижением вирусного титра, изменением количества вРНК и повышению уровня *IL-1β* и *IFN-λ3*. Параллельно с этим, ранее были получены результаты о низкой цитотоксичности комплексов миРНК, не приводящей к существенным нарушениям жизнедеятельности клеток после нокдауна одного или нескольких генов [2].

Было установлено, что при титровании вируса по цитопатическому действию каждый комплекс миРНК приводил к снижению вирусной активности на первые сутки после заражения. На рис. 1 представлены данные о том, что при MOI = 0.001 вирусный титр в клетках, обработанных комплексами А и D, снижался на 2.8 lgТЦД<sub>50</sub>/мл и на 2.1 lgТЦД<sub>50</sub>/мл соответственно по отношению к неспецифической миРНК L2 ( $p \leq 0.05$ ). При трансфекции комплексов В и С, снижение вирусного титра составило 1.5 lgТЦД<sub>50</sub>/мл и 1.8 lgТЦД<sub>50</sub>/мл соответственно по сравнению с неспецифическим контролем L2 ( $p \leq 0.05$ ).

По результатам ОТ-ПЦР-РВ отмечалось снижение количества вРНК в обработанных комплексами клетках по сравнению с неспецифическим и вирусным контролями. Использование комплексов В, С и D привело к достоверному снижению вРНК на первые сутки по сравнению с миРНК siL2 в 14.5, 4.1 и 15 раз соответственно ( $p \leq 0.05$ ). Снижение концентрации вРНК на вторые сутки отмечалось при использовании комплексов В и D в 17.1 и 18.3 раза соответственно ( $p \leq 0.05$ ). Вызывает интерес, что при использовании комплекса А не отмечалось снижения концентрации вРНК, однако наблюдалось выраженное снижение вирусного титра. Подобный результат связан, по всей видимости, с тем, что используемая комбинация комплекса А, направленного к генам *FLT4* и *Nup98*, приводила к частичному синтезу вРНК, однако сборка и выход вириона из клетки были ограничены, в то время как остальные комплексы, по всей видимости, полностью блокировали синтез вРНК, сборку и выход вириона. Схожие результаты отмечаются в работе J. Piasecka с соавторами, где также проводится оценка противовирусного эффекта миРНК [23].

Оценка экспрессии *IL-1β* и *IFN-λ3* выполнялась с помощью ОТ-ПЦР-РВ и критерия оценки экспрессии 2<sup>-ΔΔCt</sup>. На рис. 3 и 4 приведены данные о динамике экспрессии *IL-1β* и *IFN-λ3* в течение трех суток с момента трансфекции и заражения. Наиболее эффективное повышение экспрессии *IL-1β* отмечается при использовании комплексов А и D. На первые и вторые сутки после трансфекции рост экспрессии составил 18/118% для комплекса А и 25/90% для комплекса D соответственно по отношению к неспецифическому контролю L2 ( $p \leq 0.05$ ), а также превысил уровень экспрессии в незараженных клетках на 45% и 17% на вторые сутки. На третьи сутки также отмечалась повышенная экспрессия при использовании комплекса D на 47%. При использовании комплексов В и С, нарастание экспрессии отмечалось лишь на первые сутки на 10% и 17% соответственно ( $p \leq 0.05$ ). При оценке увеличения уровня

экспрессии *IFN-λ3* рост отмечался лишь на вторые сутки при использовании комплексов А и С на 10% и 24% соответственно по отношению к неспецифическому контролю ( $p \leq 0.05$ ). Такой результат неоднородного роста экспрессии *IL-1β* и *IFN-λ3* связан, по всей видимости, с тем, что разные нуклеотидные последовательности миРНК могут по-разному индуцировать выработку провоспалительных цитокинов и интерферонов через Toll-подобные рецепторы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время особо актуальным является вопрос экстренного создания лекарственных средств для профилактики и терапии высококонтагиозных респираторных инфекций. Необходимо, чтобы данные лекарственные вещества были безопасны, нетоксичны для пациента и имели низкий спектр противопоказаний. Параллельно с этим, важным их свойством должна быть способность оказывать терапевтический и профилактический эффект несмотря на лекарственную устойчивость патогена. В настоящем исследовании приведены данные о том, что одновременный нокдаун нескольких клеточных генов, играющих важную роль в вирусной репродукции, посредством комплексов миРНК достоверно снижал вирусную активность гриппа *in vitro*. Наряду с этим отмечалось выраженное снижение вРНК и повышение уровня экспрессии *IL-1β* и *IFN-λ3*, несмотря на способность вируса гриппа оказывать иммуносупрессивное действие. Полученные результаты свидетельствуют о том, что используемые в работе миРНК обладают не только противовирусной активностью, но также и иммуномодулирующей активностью, что способствует более эффективному иммунному ответу организма. Дополнительно данные результаты позволят разработать принципы быстрого проектирования и создания специфических противовирусных средств, предназначенных для защиты от старых и новых патогенных вирусов, обеспечения противоэпидемической безопасности различных групп населения и эффективного ответа на возникновение пандемий и случаев биотерроризма.

## Благодарности

Исследование выполнено с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова Министерства здравоохранения Российской Федерации при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.

### Acknowledgments

The study was carried out using the scientific equipment of the Center for Collective Use of the I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, and supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Agreement No. 075-15-2021-676 dated July 28, 2021.

### Вклад авторов

**А.В. Пак, Е.А. Пашков, Н.Д. Абрамова** – выполнение экспериментов;

**Е.А. Пашков, Е.А. Богданова** – написание текста статьи, анализ полученных результатов;

**А.В. Поддубиков, Ф.Г. Нагиева** – научное редактирование;

**Е.П. Пашков, О.А. Свитич, В.В. Зверев** – идея исследования, резюме, общее руководство.

### Authors' contributions

**A.V. Pak, E.A. Pashkov, N.D. Abramova** – conducting the experiments;

**E.A. Pashkov, E.A. Bogdanova** – writing the text of the article and the analysis of the obtained results;

**A.V. Poddubikov, F.G. Nagieva** – scientific editing;

**E.P. Pashkov, O.A. Svitich, V.V. Zverev** – idea of the study, summary, and general management.

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

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. 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>

[Pashkov E.A., Korotysheva M.O., Pak A.V., Faizuloev E.B., Sidorov A.V., Poddubikov A.V., Bystritskaya E.P., Dronina Y.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 (in Russ.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-2-140-151>]

2. Пашков Е.А., Файзулов 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>]

3. Sellers S.A., Hagan R.S., Hayden F.G., Fischer W.A. II. The hidden burden of influenza: A review of the extra-pulmonary complications of influenza infection. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2017;11(5):372–393. <https://doi.org/10.1111/irv.12470>

4. 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>

5. Radžišauskienė 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>

6. 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>

7. Plotnikova M.A., Klotchenko S.A., Vasin A.V. Development of a multiplex quantitative PCR assay for the analysis of human cytokine gene expression in influenza A virus-infected cells. *J. Immunol. Methods.* 2016;430:51–55. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.01.005>

8. Wang J., Wu Y., Ma C., Fiorin G., Wang J., Pinto L.H., et al. Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013;110(4):1315–1320. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216526110>

9. Lampejo T. Influenza and antiviral resistance: an overview. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020;39(7):1201–1208. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03840-9>

10. Leneva I.A., Russell R.J., Boriskin Y.S., Hay A.J. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: Implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antiviral Res.* 2009;81(2):132–140. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.10.009>

11. Goldhill D.H., Te Velthuis A.J.W., Fletcher R.A., Langat P., Zambon M., Lackenby A., Barclay W.S. The mechanism of resistance to favipiravir in influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018;115(45):11613–11618. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811345115>
12. Yang H., Winkler W., Wu X. Interferon Inducer IFI35 regulates RIG-I-mediated innate antiviral response through mutual antagonism with Influenza protein NS1. *J. Virol.* 2021;95(11):e00283–21. <https://doi.org/10.1128/jvi.00283-21>
13. Sa Ribero M., Jouvenet N., Dreux M., Nisole S. Interplay between SARS-CoV-2 and the type I interferon response. *PLoS Pathog.* 2020;16(7):e1008737. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008737>
14. Hauser P., Khosla J., Aurora H., Laurin J., Kling M.A., Hill J., Gulati M., Thornton A.J., Schultz R.L., Valentine A.D., Meyers C.A., Howell C.D. A prospective study of the incidence and open-label treatment of interferon-induced major depressive disorder in patients with hepatitis C. *Mol. Psychiatry*. 2002;7(9):942–947. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001119>
15. 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):5115–5127. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170920165926>
16. Fire A.Z. Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death Differ.* 2007;14(12):1998–2012. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402253>
17. Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mell C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
18. 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>
19. Пашков Е.А., Корчевая Е.Р., Файзулов 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-08-2201-07>]
20. Park H.S., Liu G., Thulasi Raman S.N., Landreth S.L., Liu Q., Zhou Y. NS1 Protein of 2009 Pandemic Influenza A Virus Inhibits Porcine NLRP3 Inflammasome-Mediated Interleukin-1 Beta Production by Suppressing ASC Ubiquitination. *J. Virol.* 2018;92(8):e00022–18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00022-18>
21. Julkunen I., Melén K., Nyqvist M., Pirhonen J., Sareneva T., Matikainen S. Inflammatory responses in influenza A virus infection. *Vaccine*. 2000;19(Suppl. 1):S32–S37. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00275-9](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00275-9)
22. 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>
23. 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:

**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: dcnnpk@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0003-4295-7858>

**Пашков Евгений Алексеевич**, аспирант, кафедра 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); 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. SPIN-код РИНЦ 4933-1128, <https://orcid.org/0000-0002-5682-4581>

**Абрамова Наталья Дмитриевна**, 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: and960911@gmail.com. SPIN-код РИНЦ 1763-8942, <https://orcid.org/0000-0002-7307-0515>

**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. SPIN-код РИНЦ 9658-1553, <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>

**Нагиева Фирая Галиевна**, д.м.н., доцент, заведующий лабораторией гибридных клеточных культур, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (105064, Россия, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5А). E-mail: fgn42@yandex.ru. SPIN-код РИНЦ 5897-3591, <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>

**Богданова Екатерина Александровна**, к.м.н., доцент 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: bogdekaterin@yandex.ru. SPIN-код РИНЦ 7250-5808, <https://orcid.org/0000-0002-5620-1843>

**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>

**Свитич Оксана Анатольевна**, чл.-корр. Российской академии наук, 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 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: svitichoa@yandex.ru. SPIN-код РИНЦ 8802-5569, <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

**Зверев Виталий Васильевич**, академик РАН, д.б.н., профессор, 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 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: vitalyzverev@outlook.com. SPIN-код РИНЦ 2122-1808, <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

#### **About the authors:**

**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 A. Pashkov**, Postgraduate Student, 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); 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. RSCI SPIN-code 4933-1128, <https://orcid.org/0000-0002-5682-4581>

**Natalia D. Abramova**, 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: and960911@gmail.com. RSCI SPIN-code 1763-8942, <https://orcid.org/0000-0002-7307-0515>

**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. RSCI SPIN-code 9658-1553, <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>

**Firaya G. Nagieva**, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Federal State Budgetary Scientific Institution "I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera" (5A, Malyi Kazennyi pereulok, Moscow, 105064, Russia). E-mail: fgn42@yandex.ru. RSCI SPIN-code 5897-3591, <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>

**Ekaterina A. Bogdanova**, Cand. Sci. (Med.), Associate 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: bogdekaterin@yandex.ru. RSCI SPIN-code 7250-5808, <https://orcid.org/0000-0002-5620-1843>

**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>

**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, 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: svitichoa@yandex.ru. RSCI SPIN-code 8802-5569, <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 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: vitalyzverev@outlook.com. RSCI SPIN-code 2122-1808, <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

*Поступила: 19.07.2022; получена после доработки: 30.08.2022; принята к опубликованию: 20.09.2022.  
The article was submitted: July 19, 2022; approved after reviewing: August 30, 2022; accepted for publication: September 20, 2022.*