

УДК 615.371:57.083.2

ОСОБЛИВОСТІ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ ПРИ ГРИПОЗНІЙ ІНФЕКЦІЇ ТА ПЕРСПЕКТИВИ СТВОРЕННЯ ВАКЦИННИХ ПРЕПАРАТІВ

Давидова Т. В.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН»

Введення

Розвиток сучасної медицини дозволяє проаналізувати основні механізми розгортання противірусного захисту при грипозній інфекції. Імунна відповідь великою мірою залежить від особливостей будови віріону, а також сприйняття його організмом. Тому пошук найефективніших стратегій захисту базується на застосуванні цих механізмів, які детально будуть викладені у тексті статті.

Вірус грипу належить до сімейства Orthomyxoviridae і є причиною однієї з основних інфекцій дихальних шляхів у людини. Щорічно віруси грипу викликають, за оцінками фахівців, 3-5 млн захворювань з тяжким перебігом та 250 000-500 000 смертельних випадків [1]. Віріони грипу плеоморфні, частіше сферичні, діаметром 80-120 нм. Зовні вони вкриті суперкапсидною біліпідною оболонкою, в яку занурені глікопротеїни гемаглютинин (HA) та нейрамінідаза (NA), що утворюють поверхневі «шипи», довжиною 10-14 нм і діаметром 4 нм. Відомо три типи даного респіраторного захворювання (А, В і С), які мають суттєві антигенні відмінності двох своїх внутрішніх білків: нуклеопротеїду (NP) та матричного білка (M) [2,3]. Вони відрізняються також за патогенністю, організацією генома та суперкапсиду [4]. Вірус грипу А вражає людину та різних теплокровних тварин (птахів та ссавців), тоді як типи В і С є переважно патогенами людини. Найбільш часто захворювання людини викликають віруси грипу А і В. Геном вірусу грипу А складається з восьми сегментів одноланцюгової «мінусової» РНК (од РНК-) та кодує 12 білків: два поверхневих глікопротеїна (HA та NA), два матричних білка (M1 і M2), нуклеопротеїд (NP), три білка полімеразного комплексу (PA, PB1, PB2) і чотири неструктурних протеїни (NS1, NS2, PA-X і PB1-F2) [1,4].

Віруси грипу А підрозділяються на серотипи з урахуванням їх поверхневих глікопротеїнів - на даний час відомо 17 підтипів HA і десять підтипів NA [5]. HA зв'язуються з рецепторами на поверхні епітеліальних клітин респіраторного тракту, які представлені сіаловими кислотами (N-ацетилнейрамінова кислота

(Neu5Ac)). Молекули HA 1, 2 та 3 підтипу переважно зв'язуються з рецепторами, які мають глікани Neu5Ac2R6, в той час як віруси пташиного грипу (HA 5 та 7 типу) з'єднуються з рецепторами Neu5Ac2R3. Респіраторний епітелій людини має обидва варіанти рецепторів Neu5Ac- α 2, 6 (верхні відділи дихальних шляхів) та Neu5Ac- α 2, 3 (нижні відділи дихальних шляхів) і, таким чином, віруси пташиного типу можуть вражати людину переважно при попаданні глибоко в легені. Однією з властивостей пандемічних вірусів є - відсутність жорсткої специфічності HA [3,4].

Останні роки щорічні епідемії викликають сезонні штами вірусу А (H1N1 і H3N2) та вірус В [2]. Це може бути пов'язано з їх здатністю бути невпізнаними для вірус специфічних антитіл у зв'язку з антигенним дрейфом (рис 1). Сезонні вакцини проти грипу, для того щоб залишатися ефективними, повинні оновлюватися майже щорічно, відповідно до нових епідемічних штамів. [5].

Мутації поступово накопичуються здебільше у округлій головній частині HA, яка є дуже мінливою, що дозволяє вірусу грипу уникати впізнання нейтралізуючими антитілами і викликати сезонні спалахи та епідемії. Цей феномен зветься антигенним дрейфом. Поява нового підтипу в людській популяції називається антигенним зсувом і може викликати спалах пандемії, в тому разі, коли вірус буде ефективно передаватися від людини до людини, тому що антитіла, спрямовані проти нового підтипу, відсутні. Минулі пандемії були викликані штамми грипу, у яких відбувся обмін генних сегментів між двома або більше серотипами, наприклад, пташиним та людським. Однак, недавні дослідження на творах припускають, що вірус пташиного грипу, H5N1, може безпосередньо передаватися від тварин до людини, бо потрібна зовсім невелика кількість адаптивних мутацій [6].

Вроджений імунітет

Основними мішенями для вірусу грипу є епітеліальні клітини, які вистилають дихальні шляхи та ініціюють імунну відповідь при виявленні вірусу. Перша лінія оборони формується вродженим імунітетом, яка діє швидко, але не має специфічності та механізму пам'яті. Він складається з фізичних бар'єрів та клітинних імунних реакцій [3]. Ініціація антивірусного сигнального каскаду відбувається при впізнанні патоген-асоційованих молекулярних паттернів (PAMP) вірусу грипу паттернами впізнання рецепторів (PRR), у результаті чого продукуються інтерферони (IFN), цитокіни та хемокіни [3].

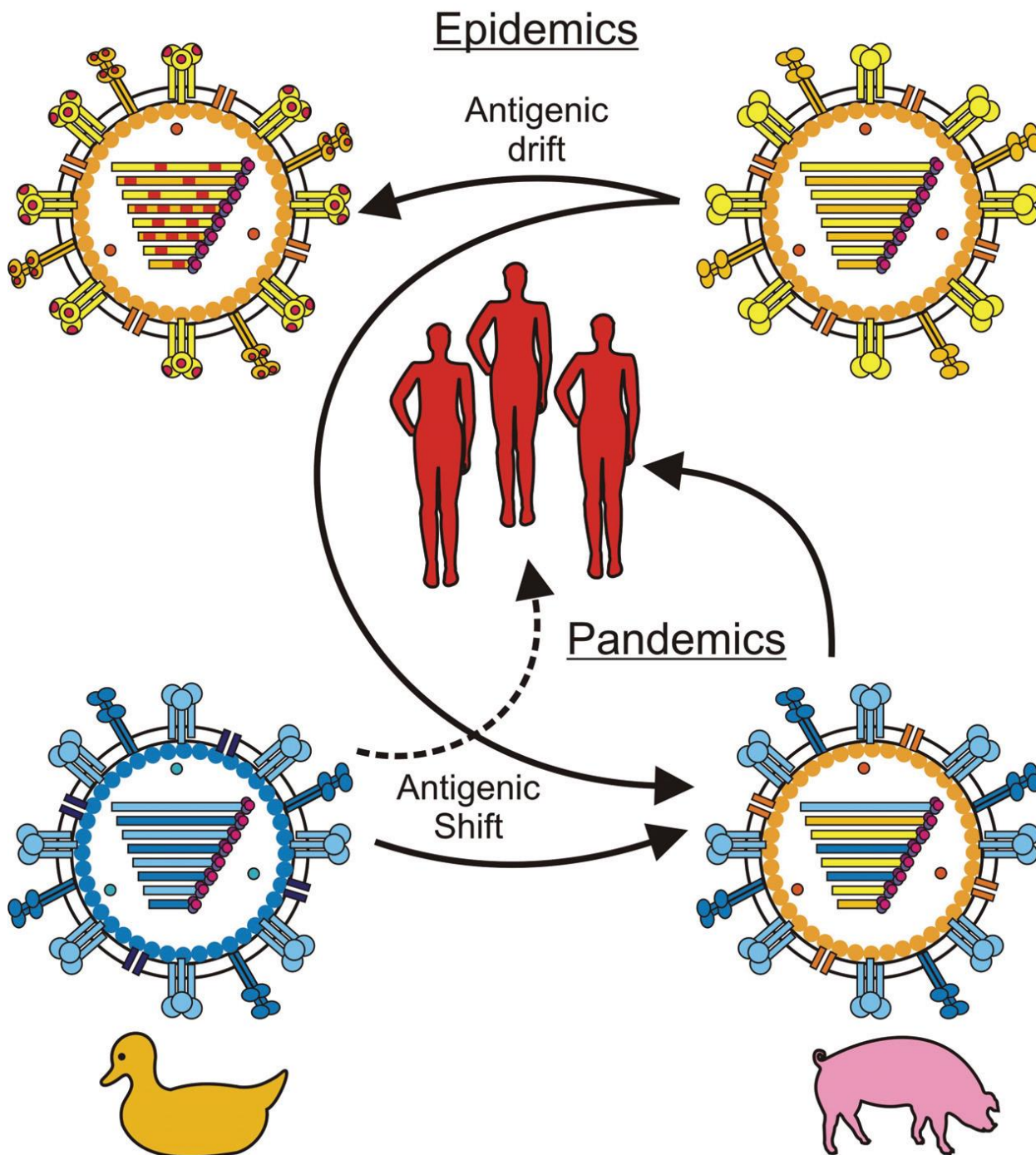


Рис. 1. Антигенний дрейф і зсув (шифт), що дозволяє вірусам грипу уникнути імунної відповіді (за [6]).

Три головних категорії PRR, що задіяні у цьому процесі, це TLR рецептори (Toll like), RIG-I (retinoic acid inducible gene-1) та NOD подібні рецептори (nucleotide oligomerization domain-like) із типу NLRP3 (pyrin domain containing 3) [6]. TLR перші розпізнають грипозну інфекцію. TLR2 та TLR4, які розташовані на поверхні клітин, розпізнають поверхневі глікопротеїди -HA та NA [7]. Внутріклітинні рецептори TLR7 впізнають олРНК вірусу грипу після її поглинання та руйнування у ацидильованих ендосомах [6], а TLR3 — дволанцюгову РНК (длРНК). На пізніших стадіях

інфекційного процесу, новостворені некапсульовані 5'- трифосфати, що несуть вірусні РНК, розпізнаються RIG-I рецепторами у цитоплазмі [8].

NLRP3 є частиною інфламасоми і активуються длРНК, які потім активують каспазу I, в результаті протеолітичного дозрівання IL-1 β і IL-18 [8,9]. Сигнальний каскад усіх активованих TLR, за винятком TLR3, починається з активації MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88), який згодом може активувати фактор некрозу пухлини (TNF), асоційований з рецептором фактора 6 (TRAF6), або безпосередньо, або за допомогою IL-1R-асоційованої кінази-1 (IRAK 1), що в кінцевому

підсумку призводить до активації мітоген-активованої кінази (MAPKs) і ядерного фактора каппа легкого ланцюга енхансера активованих В-клітин (NF- κ B). Сигнальний каскад реакцій TLR3 починається з активації TRIF (TIR-домена, що містить перехідник, що індукуює інтерферон- β) та в кінцевому підсумку активує NF- κ B і інтерферон регуляторний фактор 3 (IRF3). TLR4 може також сигналізувати через TRIF залежний шлях для формування комплексу TRAM-TRIF.

Активация RIG-I рецептора йде шляхом зв'язування вірусного 5'-трифосфату РНК або вірусної длРНК з доменом репресора (RD) RIG-I, що є результатом конформаційних змін під впливом активації каспаз і набору доменів (CARD). Ці домени убуквітинуються IFN-індукованою E3 убіквітинлігазою, тристороннім мотивом 25 (TRIM25) [6]. RIG-I може бути асоційованим з мітохондріальним противірусним сигнальним адаптером (MAVS; також відомим як IPS-1, VISA або Cardif), та починає сигнальний каскад, який призводить до активації IRF3 і NF- κ B [8,9]. Сигнальні каскади з TLR, і RIG-I рецепторами були детально описані на рис 2.

Всі ці шляхи зрештою мають призвести до транскрипції прозапальних цитокінів, хемокінів та IFN, які активують противірусну відповідь, шляхом залучення нейтрофілів, активацію макрофагів та дозрівання дендритних клітин (ДК).

Були визначені три типи IFN [10]. Тип I інтерферонів включає IFN- α і IFN- β , які відіграють важливу роль в обмеженні вірусної реплікації [11]. IFN-I, котрі виділяються інфікованими клітинами діють на рецептори IFN- α/β (IFN- α/β R) тих же клітин або сусідніх осередків, активованих противірусним сигнальним каскадом, що включає фосфорилування тирозин-кінази 2 (Tyk2) та Янус-кінази 1 (JAK1), яка потім фосфорилує перетворювач сигналу і активатори транскрипції STAT 1 та STAT 2. Фосфорильований STAT1 і 2 поєднанні з IRF9 є основою для формування ISGF3 (IFN-стимульованих генів фактора-3 транскрипований комплекс), який відповідає за транскрипції більш ніж 300 генів, що кодують, наприклад, антивірусні білки (Таблиця 1), які в клітинах обмежують реплікацію вірусу [9] (рис 3). IFN- β діє через позитивний зворотній зв'язок на свої рецептори, які активують IFN стимулюючи генний фактор 3 (ISGF3) з експресією IRF-7. Він фосфорилується у присутності вірусної інфекції та індукуює експресію, як IFN- α так і IFN- β [5,8]. Побічні продукти вірусної реплікації 5'-трифосфат олРНК та длРНК, які можуть зв'язуватися з рецептором RIG-1, що призводить до конформаційних змін, в результаті впливу на CARDS, які є убіквітиновані за TRIM25. Пізніше

RIG-1, пов'язаний з MAVS починає сигнальний каскад, що веде до активації факторів транскрипції IRF3, NF- κ B і ATF-2 / JunC, внаслідок чого спостерігається транскрипція IFN- β мРНК. Червоним кольором позначено об'єкти, на яких вірус грипу А заважає цьому шляху, як описано в тексті (рис. 2)

IFN- β продукований інфікованими клітинами зв'язується IFN рецепторами, що викликають фосфорилування Tyk2 і JAK1. За цим слідує зв'язування та фосфорилування STAT1 і STAT2, які згодом утворюють комплекс з IRF9. Цей ISGF-3 комплекс діє як фактор транскрипції для більше ніж 300 генів, деякі з яких виявляють противірусну дію (див. текст). Експресований білок PKR активується при виявленні вірусної длРНК, що призводить до інгібування синтезу білків, в тому числі вірусних. PKR пригнічується цитоплазматичним білком P58IPK, проте діяльність P58IPK інгібується шляхом зв'язування цитоплазматичного hsp40. Білок IRF7 фосфорилується у присутності вірусу грипу, це призводить до активації зворотного зв'язку, та в результаті чого посилюється транскрипція IFN- α і IFN- β . Червоним кольором позначено механізм втручання вірусу грипу в цей шлях, ці перешкоди пояснено більш докладно в тексті (рис. 2).

IFN- γ є основним видом II типу IFN. Він сприяє створенню ефективних адаптивних цитотоксичних Т-клітин (CTL) у відповідь на інфікування вірусом грипу. Він регулює гомеостаз вірус-специфічних CTL в лімфатичних вузлах та подальше переміщення CTL в місця інфекції. Крім того, IFN- γ відіграє важливу роль у відповідях CTL-пам'яті. Інтерферони III типу IFN- λ , також контролюють грипозну інфекцію в легенях [14].

Епітелій слизової оболонки верхніх дихальних шляхів - один з основних захисних бар'єрів. Під впливом цитокінів і продуктів мікробного походження епітеліальні клітини експресують молекули адгезії, цитокіни та інші молекули, важливі для реалізації імунних процесів. Слизова оболонка респіраторного тракту має місцевий імунітет - MALT (Mucosal Associated Lymphoid Tissues).

Лімфоцити, активовані в лімфоїдній тканині слизових оболонок, мігрують через регіональні лімфатичні вузли і повертаються через грудну протоку і кровоносне русло назад в слизові оболонки. У формуванні місцевого імунітету беруть участь мононуклеарні фагоцити, система комплементу, інтерферони (IFN), лізоцим, концентрація якого в мигдаликах в 300 разів вище, ніж у сироватці крові та ін.

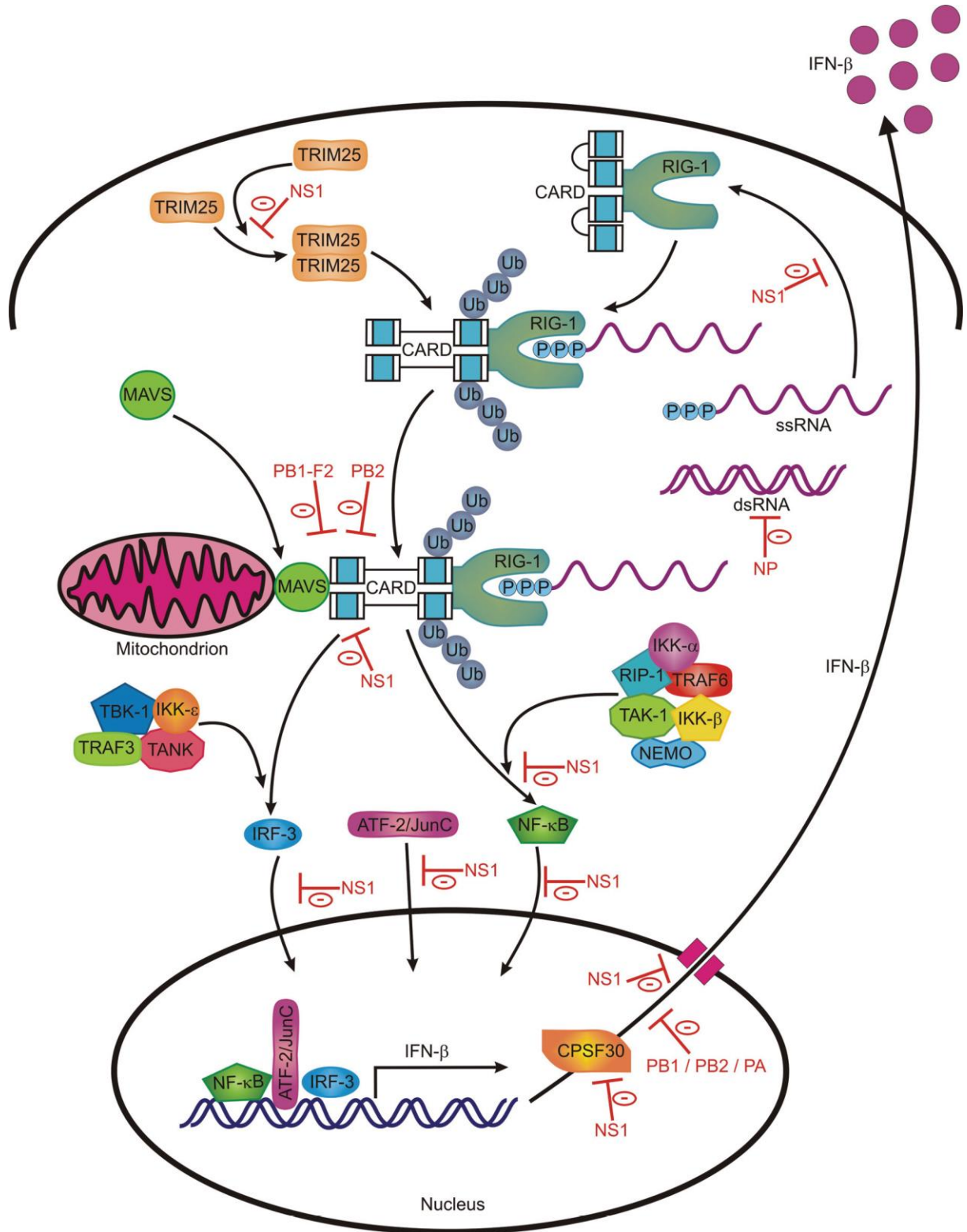


Рис. 2. RIG-I сигнального шляху та інгібування вірусів грипу А (за [6]).

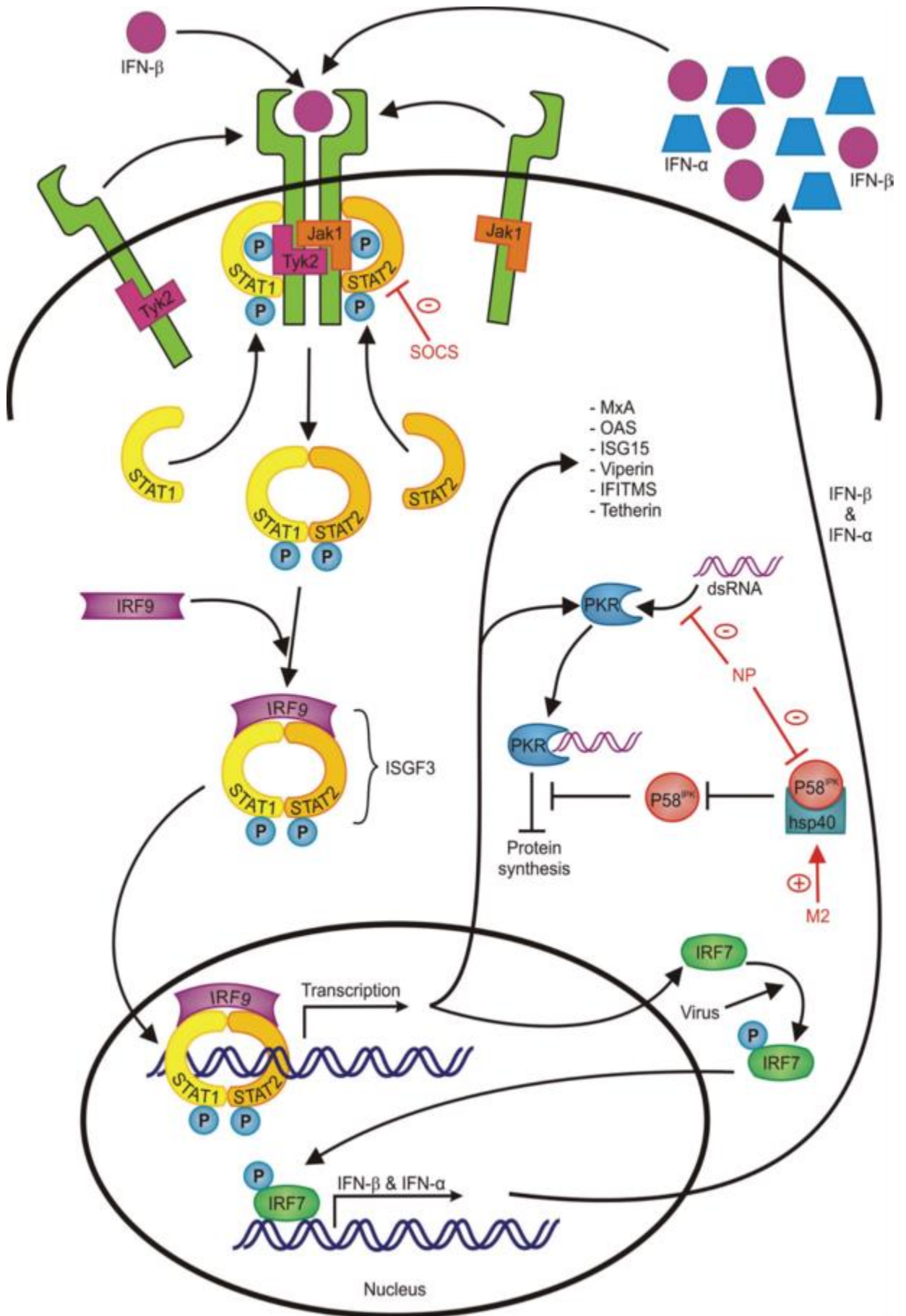


Рис. 3. IFN типу I сигнальний шлях та інгібування вірусів грипу А (за [6]).

Таблиця 1. IFN-індуковані противірусні білки та їх функції.

Білки	Функції	Джерела інформації
MxA (Мухovirus ген резистентності)	Пригнічує вірусну реплікацію, стикаючись з структурою вірусних рибонуклепротеїнів.	[11]
PKR (протеїнкінази R)	Обмежують реплікацію вірусу	[12]
OAS (2'-5'олигоаденілат синтетаза)	Припиняє вірусну реплікацію за допомогою активуючого RNaseL, що призводить до деградації вірусної і клітинної РНК і, в кінцевому рахунку, апоптозу інфікованих вірусом клітин	[13]
ISG15 (IFN-стимулюючий ген 15)	Регулює кількість IFN-стимульованих білків	[13]
Viperin (Виперин)	Пригнічує вірусний вихід	[13]
Tetherin (Тетерін)	Інгібує утворення частинок вірусу грипу	[13,14]
IFITM (Interferon-induced transmembrane protein 3)	Обмежує проникнення вірусу	[11]

Лімфоєпітеліальний комплекс в загальній системі імунотропних органів бере активну участь у формуванні місцевого та системного імунітету, продукуючи антитіла, утворюючи клітини імунної пам'яті (малі лімфоцити з великими ядрами, які є носіями закодованої інформації), виконує інформативну, захисну, нейрорефлекторну і кровотворну функції [12,14].

Роль макрофагів у імунній відповіді

Для підтримки гомеостазу, альвеолярні макрофаги знаходяться у стані відносного спокою та продукують тільки невелику кількість цитокінів й знижують індукцію вродженого і адаптивного імунітету [15, 16]. CCL2 (Chemokine (C-C motif) ligand 2), продуковані інфікованими епітеліальними клітинами протягом початкової фази інфекції, привертають альвеолярні макрофаги і моноцити за допомогою їх рецептора CCR2. Активовані макрофаги підвищують свою відповідь, завдяки виділенню прозапальних цитокінів, в тому числі IL-6 і TNF- α . Альвеолярні макрофаги відіграють важливу роль у стриманні поширення інфекції. Вони також беруть участь у регуляції адаптивної імунної відповіді. Оскільки зниження функції альвеолярних макрофагів до грипозної інфекції, призводить до зниження титрів антитіл і зменшення кількості вірус-специфічних CTL після зараження. У разі інфікування вірусом грипу за рахунок

гіперактивності синтетази-2 оксиду азоту (NOS 2) альвеолярними макрофагами та затяжної продукції ними TNF- α створюються умови для більш тяжкого перебігу захворювання [17-21].

Набутий імунітет

Друга лінія оборони проти грипу – це набутий імунітет. Цей специфічний захист працює відносно повільно при першому контакті зі збудником грипу. Однак, після другої зустрічі з цим патогеном, в результаті формування імунологічної пам'яті, імунна відповідь відбувається швидше та сильніше. Набута імунна відповідь складається з гуморальної (вірус-специфічних антитіл) та клітинної (вірус-специфічних CD4 + та CD8 + клітин) ланки. Коротко окреслимо вірус-специфічні компоненти придбаного імунного захисту та його внеску в очищення організму від грипозної інфекції.

Гуморальний імунітет

Грип індукує вироблення вірус-специфічних антитіл В-клітинами [Ошибка! Закладка не определена.]. Зокрема, антитіла, спрямовані до HA та NA корелюють із захисним імунітетом. Специфічність антитіл пов'язана з підтипами NA та HA (головним чином, із високою мінливістю округлої головної частини HA).

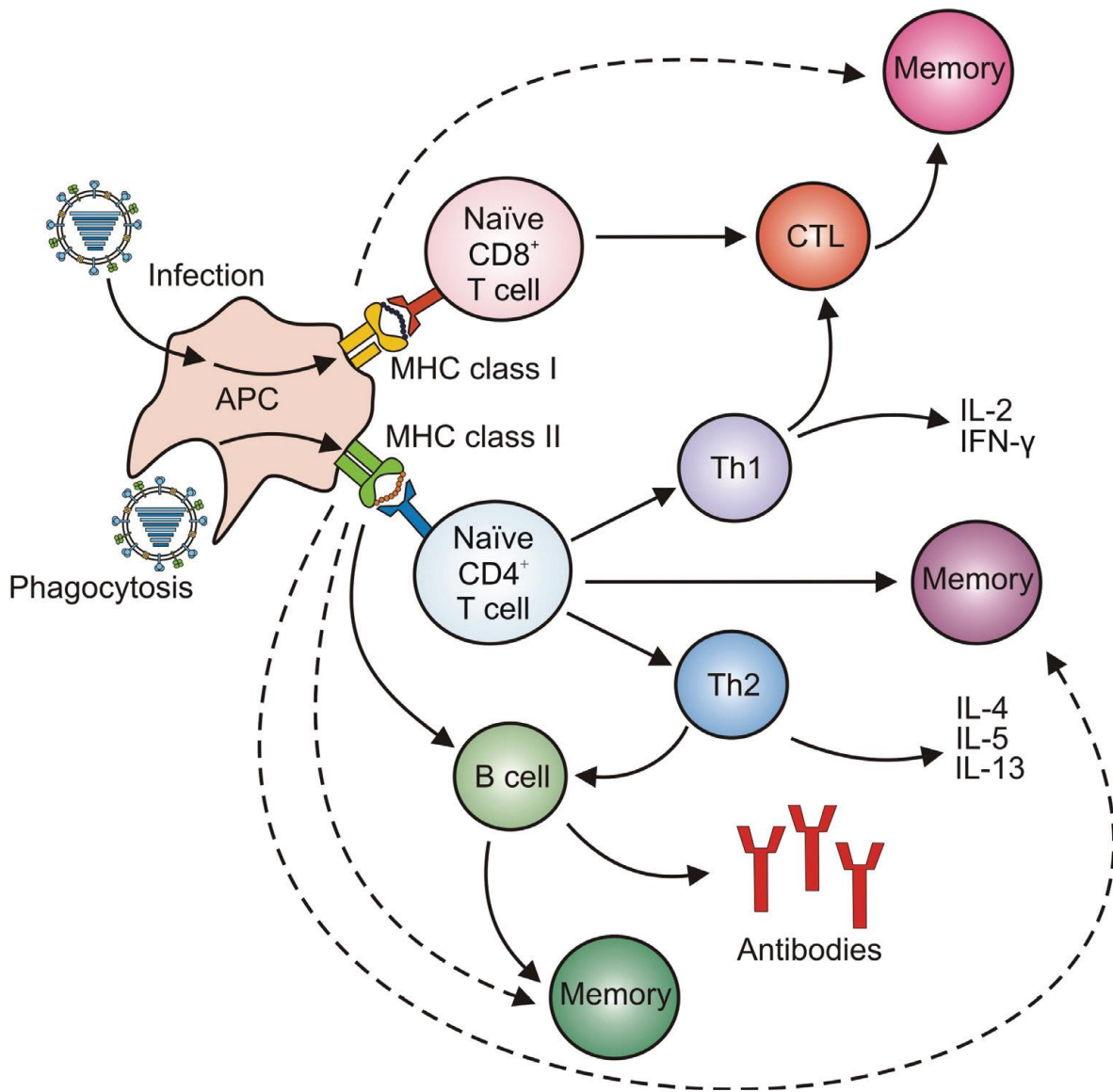


Рисунок 4. Індукція гуморального та клітинного імунітету. Імунну відповідь після первинної вірусної інфекції позначено суцільними стрілками (за [18]).

Більш швидка активація вірус-специфічних клітин-пам'яті при вторинній зустрічі з грипом позначено пунктиром.

Антитіла до іншого основного поверхневого глікопротеїну NA, втручаються в останній фазі циклу вірусної реплікації. NA це фермент, що виводить сіалову кислоту з інфікованих клітин зі сформованими віріонами, тим самим полегшуючи ефективне вивільнення та поширення новостворених вірусних частинок [1]. На відміну від HA-специфічних антитіл, NA-специфічні антитіла не нейтралізують вірус. Тим не менш, за рахунок інгібування ферментативної активності NA, ці антитіла обмежують поширення вірусу і, таким чином, знижують тяжкість і тривалість захворювання [19]. Крім того, NA-специфічні антитіла можуть також сприяти знищенню інфікованих вірусом клітин шляхом полегшення ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)

[20]. Окрім HA і NA у суперкапсиді вірусу міститься невеликий глікопротеїн M2. Це тетрамерний трансмембранний білок, що має активний іонний канал та відіграє важливу роль в «розпакуванні» вірусу в ендосомах [1]. Захисний ефект M2-специфічних антитіл вперше був продемонстрований на мишах після пасивної передачі M2-специфічних моноклональних антитіл [20]. M2-специфічні антитіла також полегшують ADCC [21, 22]. Білок M2 дуже схожий у різних підтипів вірусу, отже M2-специфічні антитіла, ймовірно, можуть викликати гетеросубтиповий імунітет [19].

Після перенесеної інфекції, також виробляються антитіла проти інших вірусних білків, у тому числі NP [20]. NP також схожий у різних підтипів вірусу грипу А, тому їх антитіла можуть потенційно сприяти гетеросубтиповому імунітету. Хоча NP-специфічні антитіла не є нейтралізуючими,

було показано на мишах, що вони сприяють захисному імунітету [Ошибка! Закладка не определена.,18, 19]. Тим не менш, спосіб їх дії ще погано вивчено, але він може включати в себе ADCC інфікованих клітин та опсонізацію NP, у результаті чого покращується Т-клітинна відповідь [21].

Після первинної інфекції, активується синтез сироваткових антитіл ізотипів IgM, IgA і IgG, а після вторинної, IgM не спостерігається. IgM антитіла можуть нейтралізувати вірус, а також активують систему комплементу. У людей вірус-специфічний сироватковий IgA є показником недавнього зараження вірусом грипу. Вірус-специфічні IgG відповідають за довгостроковий захист, за умови, що антитіла відповідають штамам, що викликали інфекцію. На додаток до сироваткових антитіл, грипозна інфекція також викликає місцеві реакції, виділяється секреторний IgA, який захищає епітеліальні клітини дихальних шляхів [23,24].

Новонароджені можуть бути захищені від інфекції завдяки материнським антитілам, коли вони збігаються з підтипом вхідного вірусу [21].

Клітинний імунітет

Грип викликає клітинну імунну відповідь, у тому числі проліферацію вірус-специфічних CD4 + та CD8 + Т-клітин. Вони відіграють важливу роль у регуляції імунної відповіді та елімінації вірусу, відповідно.

CD4 + Т-клітини активуються після визнання вірусних епітопів, пов'язаних з молекулами МНС II класу та взаємодіють з ко-стимуляторними молекулами на APC .

Залежно від цитокінового стану, активація первинних CD4 + може призвести до диференціювання їх в CD4 + Т-хелпери 1-клітини (Th1) або Th2, які можна виділити на основі їх профілів експресії цитокінів [24]. Th2 клітини продукують IL-4, IL-5 і IL-13, а також сприяють активації та диференціації В-клітин, що призводить до продукції антитіл [25]. Відповідь антитіл, підсилена індукцією антитіл-комутаторів та соматичними гіпермутаціями, впливає на варіабельну дільницю, де йде дозрівання афінних грип-специфічних антитіл [26].

Th1 клітини виробляють IFN- γ і IL-2 і, в основному, беруть участь у посиленні відповідей CTL [25], також є суттєвими для індукції клітин пам'яті CD8 +. Клітини пам'яті CD4 +, індуковані після першої зустрічі з грипом, сприяють прискоренню подальшого контролю над інфекцією [27].

Легеневі CD4 +, зокрема, відіграють важливу роль у захисті при вторинній інфекції грипу. Окрім допоміжної функції, вони також мають цитолітичну активність. Було показано, що ці

клітини відіграють важливу роль в захисті проти грипу у людей [23].

Первинні CD8 + клітини активуються після визнання вірусних епітопів, пов'язаних з молекулами МНС I класу на APC в дренажних лімфатичних вузлах, а потім диференціюються в CTL. Вони мігрують до місця інфекції, де розпізнають та усувають інфіковані клітини, і тим самим запобігають репродукції та розповсюдженню нових вірусних часток [28]. Вірус-специфічні CTL людського грипу, здебільшого спрямовані проти епітопів досить типових внутрішніх вірусних білків, таких як M1, NP, PA і PB2. Таким чином, CTL мають високий ступінь перехресної реактивності з вірусами грипу різних підтипів. Активація Т-клітинних рецепторів (TCR) за допомогою специфічного комплексу епітопів-МНС I класу призводить до лізису, внаслідок випуску перфोरину та гранзіму, що викликають апоптоз інфікованої клітини. Крім того, прозапальні цитокіни, такі як TNF- α , також інгібують реплікацію вірусу та підвищують літичну активність CTL. Активується експресія FasL, що стимулює апоптоз інфікованих клітин. Після зараження, утворюється депо довгоіснуючих специфічних антигенів центральної пам'яті та ефекторних CD8+ клітин пам'яті, які формують основу для більш швидкої та більш сильної відповіді на повторну інфекцію.

Більшість сучасних знань про захисну роль CD8 + клітин при грипі була отримана з дослідів на мишах, де було показано, що саме CD8 + клітини створюють гомо- і гетеросубтиповий імунітет [29]. CTL -захист від грипу у людей є рідкісним явищем. Недавнє дослідження вказує на наявність гетеросубтипової пам'яті CD4 + і та CD8+ клітин проти пандемічного вірусу H1N1 2009 року у незаражених осіб [24,25]. Було показано, що рівень літичної активності PBMC має зворотній зв'язок з рівнем вірусного розповсюдження і знижується після експериментального зараження тварин, у яких відсутні антитіла до цього живого-атенуйованого штаму [27]. Інші непрямі докази захисної ролі CD8, що створюють гетеросубтиповий захист у людей були отримані після епідеміологічних досліджень. Люди, які мали симптоми грипу H1N1 до пандемії 1957 були частково захищені від інфекції вірусом пандемічного H2N2 штаму [28]. Аналогічна тенденція була виявлена в окремих випадках з вірусом H5N1 [30].

На додаток до активації вірус-специфічних CD4+ і CD8+ клітин, активуються два інших типу клітин, а саме P3 (FOXP3)-- регуляторні Т-клітини (Tregs) та Т-хелпери 17 (Th17). Tregs відіграють важливу роль у встановленні балансу імунної реакції під час інфекції. Вони контролюють CD4 Т-хелпери і відповідь CTL, що запобігає імунопатології інфікованих тканин. Th17-клітини продукують IL-6, який інгібує Tregs ефекти і, отже,

сприяє Т-хелперній відповіді. Крім того, Th17, під час грипозної інфекції, грають роль у протидії вторинним бактеріальним інфекціям, наприклад, *S. aureus*, який також викликає пневмонії. Інфекція грипу може сприяти вторинній бактеріальній пневмонії, пригнічуючи клітини Th17 в І типі IFN-залежним способом [24].

Способи ухилення вірусів грипу від противірусного імунитету

Імунний тиск на вірус грипу змушує його вдаватися до різних способів уникнення руйнуючої дії імунітету. Зв'язування вірусних білків з різними компонентами природженої імунної системи призводить до їх інгібування (рис. 2 і 3) [27], у той час як комбінація імунного тиску і висока мутабельність вірусу грипу призводить до генерації нових штамів, які здатні уникнути існуючого придбаного гуморального та клітинного імунітету (Рисунки 1 і 5).

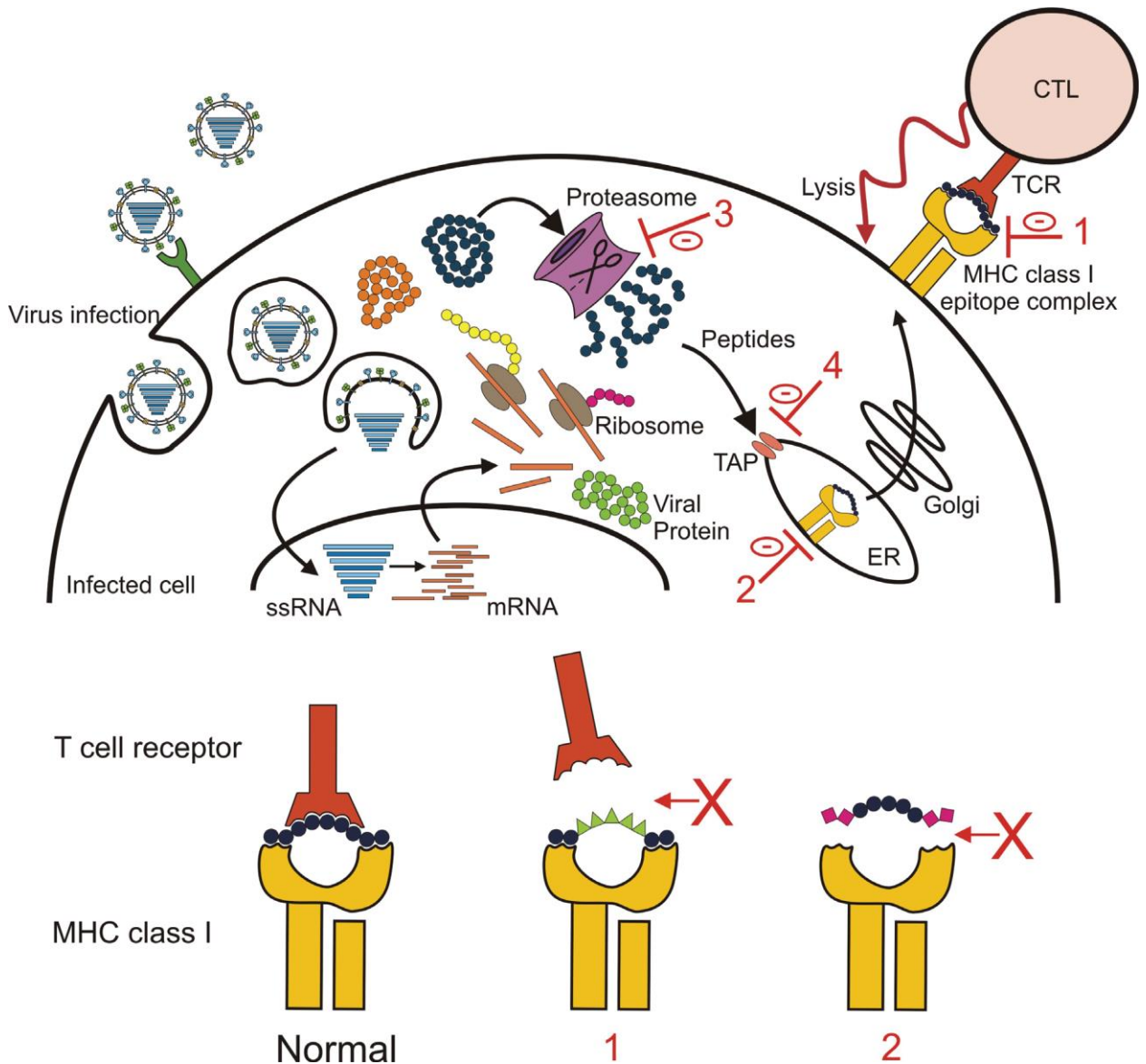


Рисунок 5. МНС класу I, презентація вірусу грипу А та його ухилення від імунної системи (за [31]).

На рисунку 5 показано вірус-інфіковані клітини та презентацію вірусних епітопів молекулами МНС класу I. Вірус може уникнути ідентифікацію конкретними CTL різними шляхами: (1) мутацією в TCR-контактних залишках CTL-епітопів, щоб запобігти визнання епітопу МНС класу I комплексу специфічними CTL, або (2) мутацією анкерних

залишків епітопу CTL, яка запобігає зв'язування епітопу МНС молекул класу I. Окрім цього, можливі мутації за межами епітопу CTL, що може вплинути на антигенну обробку протеасоми або транспорту через РТК відповідно (3 і 4).

Мутація R384G в NP 383-391 епітопі також залежить від вірусної активності та йде тільки в присутності функціонально-компенсаційних ко-

мутацій. На даний час невідомо, чи віруси грипу можуть накопичувати мутації, блокуючі CTL епітопи для того, щоб запобігти ефективній обробці та представленню цих епітопів. Цікаво, що амінокислотна зміна в НА вірусу грипу А / H3N2 також була пов'язаний з ухиленням від впізнання CD4 +Т-клітини, але не з втечею від впізнання антитілами [24].

Ухилення від вродженого імунітету

Зокрема, білок NS1 сприяє антагоністичній відповіді природженого імунітету. В клітинних інфікованих модифікованими вірусами, де не функціонує ген NS1, присутня сильніша інтерференова відповідь, ніж в клітинах, інфікованих типовим вірусом. NS1 інгібує передачу сигналів рецептора RIG-I різними способами. NS1 блокує визнання 5'-фосфорилази вірусної одРНК RIG-I рецепторами [27]. Подальша передача за сигнальним шляхом RIG-I, NS1 запобігає олігомеризації TRIM25, через взаємодію зі спіральним ланцюгом домену, і гальмує TRIM25-опосередковану RIG-I CARD, убівітування якої необхідно для передачі сигналу [24]. Нарешті, NS1 також запобігає активації та ядерній транслокації МАФ-3, NF-κB і ATF-2 / C-Jun. Цим NS1 обмежує RIG-I поштовх активації транскрипції ІФН-β promoter [30]. NS1 також змінює експресію генів клітини-хазяїна шляхом зв'язування з CPSF30 (розщеплення і поліаденілювання фактору специфіки); він запобігає поліаденілювання 3'-го кінця pre-mRNA. Крім того, NS1 обмежує експресію генів в цілому, перешкоджаючи самому механізму експорту мРНК.

NS1 не тільки гальмує природжену імунну систему. Як PB2 грипу (особливо варіанти, що містять аспарагінову кислоту в положенні 9) і PB1-F2 (тільки варіанти, що містять серин в положенні 66) обмежує продукцію ІФН-β завдяки асоціації з MAVS [19,26].

Вірусні білки PB2, PB1 і PA утворюють грипозний полімеразний комплекс, основною функцією якого є синтез мРНК. Крім того, вони також беруть участь у зриванні верхівок приймаючих мРНК, а, отже, зменшують експресію генів клітини-хазяїна в тому числі та ІФН-β [28].

Нещодавно виявлено, що PA-X вірусний білок здатний пригнічувати експресію клітинних генів, особливо тих, які беруть участь в регуляції ініціації клітинної імунної відповіді [29]. Як описано вище, вірус грипу призводить до утворення протівірусної PKR (Таблиця 1). Для того, щоб PKR обмежила вірусну реплікацію, спочатку необхідно активувати вірусну длРНК. PKR-активація знаходиться під жорстким регулюванням клітинного білку p58 IPK, який інгібує активність PKR, але є неактивним, коли він утворює комплекс з білком теплового удару 40 (hsp40) [23].

Зв'язування NP з комплексом p58 IPK-hsp40 реалізує p58 IPK, і тим самим NP пригнічує ефекти PKR [23]. На відміну від цього, білок M2, який також зв'язується з комплексом p58 IPK-hsp40, уповільнює вивільнення p58 IPK і тим самим обмежує синтез білка, який в кінцевому підсумку призводить до апоптозу клітини-хазяїна, можливо, підвищуючи вхід вірусної частинки [27, 28, 29].

Завдяки капсидуванню грипозної РНК, білок NP може зменшити утворення длРНК, які в іншому випадку можуть призвести до активації сигналів RIG-I. Оскільки більшість PRR знаходяться всередині цитоплазми, стратегія ядерної реплікації вірусу також запобігає впізнанню вірусної РНК в цитоплазмі.

На додаток йде обмеження виробництва І типу IFN, вірус грипу порушує тип сигналізації цих рецепторів. Грипозна інфекція індукує експресію SOCS (пригнічувач сигналів цитокінів) білків, що інгібують рецептори сигналізації IFN α/β на рівні активації JAK/STAT [28]. Крім того, втручання вірусів грипу у шлях природженої сигналізації, також в змозі протидіяти клітинній імунній системі. Наприклад, вони погіршують здатність моноцитів диференціюватися в зрілі дендритні клітини (DC) [21]. Окрім того, було показано, що NS1 може інгібувати дозрівання DC, і тим самим побічно обмежити індукцію вірус-специфічної CD8 + Т-клітинної відповіді. Ще один шлях ухилення – це перешкоджання NK- відповіді. Поступові мутації глікозилювання частин НА призводить до зниження NK визнання НА на інфікованих вірусом клітинах. Пригнічення ζ ланцюга NKp46 рецепторів вільним НА призводить до сповільненої сигналізації і тим самим до зниження цитотоксичності NK клітин. Крім того, вірус може безпосередньо інфікувати і вбивати NK клітини [24].

Ухилення від гуморальної імунної відповіді

Різні механізми сприяють ухиленню вірусів грипу від гуморального імунітету. Через відсутність активності перевірки, при транскрипції вірусної РНК за допомогою вірусної РНК-полімерази існує схильність до помилок, що призводить до неправильного включення нуклеотидів. В результаті утворюються квазі-види вірусів з випадковими мутаціями у геномі. Під вибіркоким тиском антитіл присутніх у людській популяції, що були індуковані після грипозної інфекції та/або вакцинації, можливий варіант позитивного вибору із квазі-видів, які накопили амінокислотні заміни в антигенному складі НА, що розпізнаються вірусонейтралізуючими антитілами. Це явище відоме як дрейф та дозволяє вірусу ухилитися від впізнання антитілами, а також щорічно викликати епідемії грипу (рис. 1) [9].

Представлення нового вірусу грипу, відмінного за підтипами антигенів, в людській

популяції має назву антигенна мінливість, саме вона відповідає за спалахи пандемій, тоді як нейтралізуючі антитіла проти нового штаму вірусу відсутні в популяції в цілому (рис 1) [10]. Їх представлення може відбутися після зоонозної передачі. В більшості випадків, пандемії були викликані вірусами, у яких відбувся обмін сегментів генів між людським і пташиним та/або свинячим типом. Для обміну клітини повинні бути заражені двома типами вірусів одночасно. Так, епітеліальні клітини дихальних шляхів свиней мають рецептори для обох видів, пташиного та людського, вірусів грипу А, і можуть слугувати місцем для виникнення мутації. Пандемія 1957 / H2N2 була викликана після ре-обміну між людським і пташиним грипом, як це було і з пандемічним вірусом 1968/ H3N2. Вірус, який викликав пандемію 2009/ H1N1 з'явився після декількох обмінів між пташиним, свинячим і людським вірусом грипу А [7].

Цікавим є факт, що функціонально важливі та консервативні послідовності поверхневих білків, таких як пептид злиття, є недоступними для розпізнавання антитілами, так як вони поховані всередині білка. Аналогічні стратегії ухилення від впізнання антитілами використовують і інші віруси, такі як вірус імунодефіциту людини (ВІЛ) [21].

Ухилення від клітинної імунної відповіді

Віруси використовують різні шляхи, щоб уникнути визнання вірус-специфічними Т-клітинами. Віруси з великим геномом ДНК (наприклад, віруси герпесу) можуть кодувати білки, які заважають різним етапам обробки та презентації антигену [Ошибка! Закладка не определена.]. Більшість РНК-вірусів, включаючи віруси грипу, мають відносно невеликі геноми і обмежені можливості кодування. Тим не менш, вони можуть уникнути визнання Т-клітинами за допомогою високої частоти мутацій і селективного тиску вірус-специфічних Т-клітин.

Амінокислотні заміни всередині СТЛ-епітопів можуть вплинути на представлення епітопу по-різному. Ці заміни при закріпленні можуть призвести до повної втрати епітопу, так як він більше не може зв'язуватися з відповідними молекулами І класу МНС (рис 5). Мутації в TCR контактних залишках можуть вплинути на впізнання специфічними Т-клітинами, так як епітоп більше не відповідає специфіці TCR (рис 5). Обидва типи амінокислотних заміни спостерігаються в процесі еволюції сезонних А вірусів (H3N2). Прикладом мутації в залишках злиття є заміна R384G в HLA-B * 2705 обмеженого NP 383-391 епітопом. Ця заміна значно впливає на вірус-специфічну відповідь СТЛ людини *in vitro*. Примітно, що ця мутація досягла закріплення швидко, незважаючи на те, що упізнається тільки меншістю юдей. Приклад це амінокислотна варіація у TCR, яка включає те, що

спостерігалось в HLA-B * 3501, окремому епітопі NP418-426. Цікаво, що функціональні обмеження можуть стримати зміни в СТЛ. Наприклад, епітопи M158-66 матриці білка високо консервативні, незважаючи на його імунодомінантну природу та обмеження HLA A * 0201, яке має високу поширеність в популяції людей. Віруси грипу не витримують мутації в цьому епітопі без втрати стійкості.

Вакцини

На теперішній час проти сезонного грипу застосовуються переважно інактивовані вакцинні препарати. Їх використання спрямовано на індукцію штам-специфічних антитіл, які відповідають епідемічним штамам [24]. Хоча ці вакцини вважаються безпечними і ефективними, вони мають деякі недоліки [25]. Антигенний дрейф дозволяє сезонним вірусам уникнути нейтралізуючої активності антитіл, що продуковані завдяки попередній інфекції або вакцинації. Таким чином, вакцина не може створити довичний захист і повинна оновлюватися майже щорічно [26]. Крім того, виробництво вакцини займає кілька місяців та рекомендації про вакцинні штами майбутнього сезону грипу мають бути зроблені за місяці заздалегідь. У більшості сезонів, передбачені вакцинні штами відповідають епідемічним. Однак іноді, можуть і не відповідати циркулюючому штаму, що веде до нераціонального захисту [27,28, 29]. У разі несподіваного спалаху пандемії, час, необхідний для виробництва і розповсюдження вакцини проти пандемічного грипу також є основним недоліком [32]. Сезонні вакцини проти грипу не забезпечують захист проти пандемічних штамів нових підтипів, оскільки антитіла, продуковані в наслідок вакцинації перехресно не реагують та крос-реактивна CD8 + Т-клітинна відповідь індукується не ефективно.

Окрім цього, використовуються живі аттенуйовані вакцини проти сезонного грипу [27]. Їх перевагою є те, що вони викликають не тільки клітинну імунну відповідь [28], а також імунітет на слизових оболонках. Зовсім недавно була розроблена жива ослаблена грипозна вакцина, де в геномі штаму вірусу закладено порушення діяльності білку NS1 шляхом вилучення або усічення гена NS1. Отже, вірус не може ухилитися від імунної реакції. Бажано, щоб сезонні вакцини, індукували широкий захисний імунітет проти можливих варіантів дрейфу та потенційно пандемічних штамів вірусу. Сучасні інактивовані вакцини, можливо, навіть заважають індукції клітинно-опосередкованого імунітету, що з'являється у випадку природних інфекцій, особливо у маленьких дітей, які ще імунологічно наївні стосовно грипу. Таким чином, інактивовані вакцини

можуть перешкоджати розвитку гетеросубтипového імунітету [33,34].

Є бажаною розробка вакцин, які індукують широкий спектр антитіл і, переважно, тривалу відповідь гетеросубтиповими СТЛ. Так, вірусні білки, такі як NP і М1 високо консервативні, вони є ймовірними мішенями для індукції крос-реактивних Т-клітин [27]. Індукційна ефективність відповідей СТЛ залежить від ефективного ендогенного процесінгу антигену та презентації МНС класу I. Це вимагає ефективної доставки вірусних білків в цитозоль. Кілька вакцин-кандидатів цитозольної доставки в даний час досліджуються, в тому числі ДНК-вакцини, рекомбінантні вірусні вектори, Iscoms та віросоми, деякі з них вже пройшли клінічні дослідження [28]. Являють особливий інтерес антитіла, спрямовані проти консервативних стовбурових регіонів молекули HA. На відміну від підтипу специфічних антитіл індукованих проти округлої головної частини HA, ці HA-стовбурові специфічні антитіла здатні на широкий спектр нейтралізуючої активності, щодо великої кількості підтипів вірусу грипу. Використовуючи, цю стовбурову ділянку в якості імуногену, можуть бути викликані усі захисні реакції антитіл [27].

Крім того, ектодомен білку M2 високо консервативний та антитіла, індуковані проти цієї області, здатні створити захист від інфекції [28,35]. Але при цьому не спостерігається повної нейтралізації віріонів специфічними до білку M2 антитілами, бо M2 є незначним антигеном на вірусних частинках. Тим не менш, оскільки вона також експресується на поверхні інфікованих клітин, ADCC можливо є відповідальним за захисний ефект цих антитіл [30].

Висновки

1. Таким чином, вакцини, які індукують як гуморальну, так і клітинно-опосередковану імунні відповіді, спрямовані на консервативні ділянки вірусу, на додаток до штам-специфічних антитіл, повинні активувати захисний імунітет до великої кількості різноманітних вірусів грипу, в тому числі варіантів дрейфу та нових підтипів.
2. Знання складності взаємодії між імунною системою та неконсервативним патогеном таким, як вірус грипу, значно зросла у останній час. Це може допомогти зменшити як захворюваність, так і смертність, завдяки створенню ефективних сезонних вакцин, але все ще існують прогалини в розумінні, які забезпечують можливості для вдосконалення та розробки більш широко-захисаючих вакцин.
3. Індукція СТЛ-реакцій із незмінними епітопами, може бути шляхом для створення цілковито протективних вакцин. Сучасні дослідження також фокусуються на відповідях крос-нейтралізуючих

антитіл, спрямованих на більш консервативні регіони поверхневих білків.

4. У сукупності ці нові шляхи створення зможуть протистояти мінливій сутності вірусу грипу, і згодом зможуть захистити навіть від появи нових пандемічних штамів.

FEATURES OF THE IMMUNE RESPONSE DURING INFECTION AND PROSPECTS FOR THE VACCINES CREATION

Davidova T.V.

The influenza virus belongs to the family Orthomyxoviridae and is a major cause of respiratory infections in humans. Each year, influenza viruses cause, according to experts, 3-5 million severe course of the disease and 250 000-500 000 deaths. Influenza A viruses are divided into serotypes based on their surface glycoproteins - known currently 17 subtypes of HA and NA subtypes ten. Upon infection with an influenza virus, both innate and adaptive immune responses are inducing. In recent years the annual seasonal epidemics were causing strains of the virus A (H1N1 and H3N2) and virus B. This may be due to their ability to be unrecognizable virus specific antibodies due to antigenic drift (Figure 1). Seasonal flu vaccine, to be effective, must be updated almost annually, according to new epidemic strains. In this work will discuss various strategies used by influenza viruses to evade innate immune responses and recognition by components of the humoral and cellular immune response, which consequently may result in reduced clearing of the virus and virus-infected cells. The primary targets for influenza viruses are the epithelial cells that line the respiratory tract and which initiate an antiviral immune response upon detection of the virus. The first line of defense is formed by the innate immune system, which is quick but lacks specificity and memory. Innate immunity is formed by physical barriers and innate cellular immune responses. Here, we outline several of the innate defense mechanisms directed against influenza infections. During homeostasis, alveolar macrophages exhibit a relatively quiescent state, producing only low levels of cytokines, and suppress the induction of innate and adaptive immunity. Activated macrophages enhance their pro-inflammatory cytokine response, including IL-6 and TNF- α . Alveolar macrophages have a direct role in limiting viral spread by phagocytosis of apoptotic infected cells and by phagocyte-mediated opsonophagocytosis of influenza virus particles. They are also involved in regulating the adaptive immune response. The second line of defense against influenza is the adaptive immune response. This highly specific response is relatively slow upon first encounter with a pathogen. The adaptive immune response consists of humoral (virus-specific antibodies) and cellular (virus-specific CD4+ and CD8+ T cells)

immunity. Influenza virus infection induces the production of influenza virus-specific antibodies by B cells. Antibodies directed to the viral HA and NA correlate with protective immunity. Immune pressure on influenza viruses forces them to adopt strategies to evade immunity. Various mechanisms contribute to immune evasion of influenza viruses from the humoral immune response. Due to the lack of proofreading activity, the transcription of viral RNA by the viral RNA polymerase is error prone and results in misincorporation of nucleotides. Under the selective pressure of antibodies that are present in the human population, induced after influenza virus infections and/or vaccination, variants are positively selected from the quasi species that have accumulated amino acid substitutions in the antigenic sites of HA that are recognized by virus-neutralizing antibodies. This phenomenon is known as antigenic drift. Introduction of influenza viruses of a novel antigenically distinct subtype into the human population is known as antigenic shift and may cause a pandemic outbreak, since neutralizing antibodies against the new virus strain are absent in the population at large. Introduction of antigenically distinct viruses can occur after zoonotic transmission. However, in most cases, pandemics were caused by viruses that had exchanged gene segments between human and avian or swine influenza viruses. Currently used seasonal influenza vaccines are predominantly inactivated vaccine preparations. Development of vaccines that induce broad range of antibodies and preferably long heterosubtypic CTL response is desirable. Yes viral proteins such as the NP and M1 highly conservative, they are likely targets for the induction of cross-reactive T cells. This requires effective delivery of viral proteins in the cytosol. Several vaccine candidates cytosolic delivery is currently being investigated, including DNA vaccines, recombinant viral vectors, Iscoms and virosomal. They have already passed clinical trials. In addition, the induction of cross-reactive antibodies has attracted attention in recent years, antibodies directed against conserved regions of molecules on the stem are of particular interest. Unlike subtype specific antibodies induced against the main round of the AB, these stem HA-specific antibodies capable of neutralizing a broad activity against a large number of subtypes of influenza virus. In addition, ectodomen M2 highly conserved protein and antibodies induced against this region are able to create protection against infection. Thus, vaccines that induce both humoral and cell-mediated immune responses aimed at conserved areas of virus, in addition to the strain-specific antibodies can afford. Protective immunity to many different flu viruses, including new variants and subtypes drift. Knowing the complexity of the interaction between the immune system and variable pathogen such as influenza virus, has increased significantly in recent years. This can help reduce both morbidity and mortality, through the

creation of effective seasonal vaccine, but there are still gaps in understanding, providing opportunities for improvement and developing a more widely-protecting vaccines. Induction STL-reactions with the same epitope can be a way to create fully protecting vaccines. Current research also focuses on the responses of cross antibodies directed to a more conservative regions of the surface proteins. Together, these will create new ways to confront the changing nature of influenza virus, and subsequently be able to protect even the emergence of new pandemic strains.

Keywords: influenza; evasion; innate immunity; adaptive immunity

References

- 1 Palese P. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication/[Text]/P. Palese, M.L. Shaw// In Fields Virology, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business: Philadelphia, PA, USA, 2007; Volume 2, pp. 1647–1689. WHO. Influenza (seasonal) fact sheet No211.
- 2 Jagger B.W. An overlapping protein-coding region in influenza a virus segment 3 modulates the host response/[Text]/B.W. Jagger, H.M. Wise, J.C. Kash, K.A. Walters, N.M. Wills, et al.//Science 2012, 337, 199–204.
- 3 Fouchier, R.A. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls/[Text]/ R.A. Fouchier, V. Munster, A.Wallensten, T.M. Bestebroer, et al.// Virology. 2005, 79, 2814–2822. Viruses 2012, 4 1455
- 4 Tong S. A distinct lineage of influenza A virus from bats/[Text]/S. Tong, Y. Li, P. Rivaller, C. Conrardy, D.A. Castillo et al.// Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012, 109, 4269–4274
- 5 Smith D.J. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus/[Text]/ D.J. Smith, A.S. Lapedes, J.C. de Jong et al.// Science 2004, 305, 371–376
- 6 Herfst S. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets/[Text]/ S. Herfst, E.J.A. Schrauwen, M. Linster, S. Chutinimitkul et al.// Science 2012, 336, 1534–1541
- 7 Wang T.T. Seroevidence for H5N1 influenza infections in humans: Meta-analysis/[Text]/ T.T. Wang, M.K. Parides, P. Palese/ Science 2012, 335, 1463
- 8 Pindel A. The role of protein kinase R in the interferon response/[Text]/A. Pindel, A. Sadler// J. Interferon Cytokine Res. 2011, 31, 59–70
- 9 Imai M. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets/[Text]/ M. Imai, T. Watanabe, M. Hatta, S.C. Das, M. Ozawa et al.//Nature 2012, 486, 420–428

- 10 Haller O. Dynammin-like MxA GTPase: Structural insights into oligomerization and implications for antiviral activity/[Text]/ O. Haller, S. Gao, A. von der Malsburg, O. Daumke, G. Kochs //J. Biol. Chem. 2010, 285, 28419–28424
- 11 Bodewes R. Targets for the induction of protective immunity against influenza A viruses/[Text]/R. Bodewes, A.D. Osterhaus, G.F. Rimmelzwaan// Viruses 2010, 2, 166–188.
- 12 Koutsonanos D.G. Serological memory and long-term protection to novel H1N1 influenza virus after skin vaccination/[Text]/D.G. Koutsonanos, M. del Pilar Martin, V.G. Zarnitsyn, J. Jacob, M.R. Prausnitz et al.// Infect. Dis. 2011, 204, 582–591
- 13 Lamere M.W. Regulation of antinucleoprotein IgG by systemic vaccination and its effect on influenza virus clearance/[Text]/M.W. Lamere, A. Moquin, F.E. Lee, R.S. Misra, P.J. Blair et al. // J. Virol. 2011, 85, 5027–5035
- 14 Onodera T. Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection/[Text]/ T. Onodera, Y. Takahashi, Y. Yokoi, M. Ato, Y. Kodama et al.//Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012, 109, 2485–2490.
- 15 Zuccotti G. Transplacental antibody transfer following maternal immunization with a pandemic 2009 influenza A(H1N1) MF59-adjuvanted vaccine/[Text]/G. Zuccotti, L. Pogliani, E. Pariani, A. Amendola, A. Zanetti// JAMA 2010, 304, 2360–2361.
- 16 Bodewes R. Prevalence of antibodies against seasonal influenza A and B viruses in children in Netherlands/[Text]/R. Bodewes, G. de Mutsert, F.R. van der Klis, M. Ventresca, S. Wilks et al.// Clin. Vaccine Immunol. 2011, 18, 469–476.
- 17 Sridhar S. Predominance of heterosubtypic IFN-gamma-only-secreting effector memory T cells in pandemic H1N1 naive adults/[Text]/ S. Sridhar, S. Begom, A. Bermingham, T. Ziegler, K.L. Roberts et al.// Eur. J. Immunol. 2012, doi:10.1002/eji.201242504
- 18 Wang, T.T.; Tan, G.S.; Hai, R.; Pica, N.; Petersen, E.; Moran, T.M.; Palese, P. Broadly protective monoclonal antibodies against H3 influenza viruses following sequential immunization with different hemagglutinins. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*
- 19 Varga Z.T. The influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon at the level of the MAVS adaptor protei/[Text]/Z.T. Varga, I. Ramos, R. Hai, M. Schmolke, A. Garcia-Sastre et al.//PLoS Pathog. 2011, 7, e1002067
- 20 Conenello G.M. A single N66S mutation in the PB1-F2 protein of influenza A virus increases virulence by inhibiting the early interferon response in vivo/[Text]/G.M. Conenello, J.R. Tisoncik, E. Rosenzweig, Z.T. Varga et al.// J. Virol. 2011, 85, 652–662
- 21 Dudek S.E. The influenza virus PB1-F2 protein has interferon antagonistic activity/[Text]/S.E. Dudek, L. Wixler, C. Nordhoff, A. Nordmann et al.//Biol. Chem. 2011, 392, 1135–1144.
- 22 Graef K.M. The PB2 subunit of the influenza virus RNA polymerase affects virulence by interacting with the mitochondrial antiviral signaling protein and inhibiting expression of beta interferon/[Text]/K.M. Graef, F.T. Vreede, Y.F. Lau, A.W. McCall et al.//J. Virol. 2010, 84, 8433–8445
- 23 Sharma K. Influenza A virus nucleoproteinexploits Hsp40 to inhibit PKR activation/[Text]/K. Sharma, S. Tripathi, P. Ranjan, P. Kumar, R. Garten et al.// PLoS One 2011, 6, e20215
- 24 Guan Z. Interaction of Hsp40 with influenza virus M2 protein: Implications for PKR signaling pathway/[Text]/Z. Guan, D. Liu, S. Mi, J. Zhang et al.// Protein Cell 2010, 1, 944–955.
- 25 Sorrell E.M. Predicting 'airborne' influenza viruses: (Trans-) mission impossible?/[Text]/E.M. Sorrell, E.J. Schrauwen, M. Linster, M. DeGraaf, S. Herfst et al.// Curr. Opin. Virol. 2011, 1, 635–642. Viruses 2012, 4 1472
- 26 Bodewes R. The use of influenza A viruses expressing reporter genes to assess the frequency of double infections in vitro/[Text]/R. Bodewes, N.J. Nieuwkoop, R.J. Verburgh, R.A. Fouchier et al.// J. Gen. Virol. 2012, 93, 1645–1648.
- 27 Pada S. Overview/reflections on the 2009 H1N1 pandemic/[Text]/S. Pada, P.A. Tambyah// Microb. Infect. 2011, 13, 470–478
- 28 Pica N. NS1-truncated live attenuated virus vaccine provides robust protection to aged mice from viral challenge/[Text]/N. Pica, R.A. Langlois, F. Krammer, I. Margine, P. Palese// J. Virol. 2012, doi:10.1128/JVI.01131-12.
- 29 Rudenko L. Live attenuated pandemic influenza vaccine: Clinical studies on A/17/California/2009/38 (H1N1) and licensing of the Russian-developed technology to WHO for pandemic influenza preparedness in developing countries/[Text]/L. Rudenko, H. van den Bosch, I. Kiseleva, A. Mironov et al.//Vaccine 2011, 29, A40–A44.
- 30 Bodewes R. Annual vaccination against influenza virus hampers development of virus-specific CD8(+) T cell immunity in children/[Text]/ R. Bodewes, P.L. Fraaij, M.M. Geelhoed-Mieras, C.A. van Baalen et al.//J. Virol. 2011, 85, 11995–12000
- 31 Berkhoff, E.G.; Geelhoed-Mieras, M.M.; Jonges, M.; Smith, D.J.; Fouchier, R.A.; Osterhaus, A.D.; Rimmelzwaan, G.F. An amino acid substitution in the influenza A virus hemagglutinin associated with escape from recognition by human virus-specific CD4+ T-cells. *Virus Res.* **2007**, *126*, 282–287
- 32 Bodewes R. Vaccination against seasonal influenza A/H3N2 virus reducesthe induction of heterosubtypic immunity against influenza A/H5N1 virus infection in ferrets/[Text]/ R. Bodewes, J.H. Kreijtz, M.M.

-
- Geelhoed-Mieras, G. van Amerongen et al.//*J. Virol.* 2011, 85, 2695–2702. *Viruses* 2012, 4 1476
- 33 Bodewes R. Vaccination with whole inactivated virus vaccine affects the induction of heterosubtypic immunity against influenza virus A/H5N1 and immunodominance of virus-specific CD8+ T-cell responses in mice/[Text]/ R. Bodewes, J.H. Kreijtz, M.L. Hillaire, M.M. Geelhoed-Mieras et al.//*J. Gen. Virol.* 2010, 91, 1743–1753
- 34 Berthoud T.K. Potent CD8+ T-cell immunogenicity in humans of a novel heterosubtypic influenza A vaccine, MVA-NP+M1/[Text]/T.K. Berthoud, M. Hamill, P.J. Lillie, L. Hwenda et al.// *Clin. Infect. Dis.* 2011, 52, 1–7
- 35 Song J.M. Influenza virus-like particles containing M2 induce broadly cross protective immunity/[Text]/J.M. Song, B.Z. Wang, K.M. Park, N. Van Rooijen et al.//*PLoS One* 2011, 6, e14538