

Received: 2013.06.25
Accepted: 2014.12.04
Published: 2015.02.15

Układ odpornościowy a wirus grypy

Immune system and influenza virus

Anna Wierzbicka-Woś¹, Beata Tokarz-Deptuła², Wiesław Deptuła¹

¹Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

²Katedra Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

Streszczenie

Wirusy grypy są przyczyną infekcji dróg oddechowych, odpowiadają za 3-5 mln infekcji klinicznych i 250-500 tys. przypadków śmiertelnych rocznie. Infekcje spowodowane wirusem grypy wywołują odpowiedź immunologiczną gospodarza na poziomie odporności nieswoistej i swoistej (określanej obecnie jako naturalna i nabyta), których skutkiem jest wstrzymanie replikacji wirusa. Ponadto elementy pamięci immunologicznej są tak skonstruowane, że mogą chronić organizm przed następną infekcją grypy. Jednak do tej pory nie odkryto skutecznego sposobu na całkowitą eliminację wirusa grypy, a jedyną skuteczną metodą walki z tym patogenem wydają się szczepienia, które przez zaktywowanie układu odpornościowego w znacznym stopniu ograniczają jego rozprzestrzenianie się.

W pracy omówiono reakcję układu odpornościowego na różnych poziomach w odpowiedzi na wirus grypy po wnikięciu do organizmu oraz mechanizmy unikania przez wirus grypy reakcji tego układu, co wiąże się z dużą zmiennością tego wirusa na poziomie molekularnym. Ponadto przedstawiono metody stymulacji układu odpornościowego organizmu za pomocą szczepionek różnych generacji oraz ich skuteczność w walce z wirusem.

Słowa kluczowe: wirus grypy • układ odpornościowy

Summary

Influenza viruses are a significant cause of respiratory infections, causing 3-5 million clinical infections and 250-500 thousand deaths per year. Infections caused by the influenza virus induce a host immune response at the non-specific and specific level (defined as natural and acquired), which leads to limitation of virus replication. Moreover the elements of immunological memory are induced so that they can protect against subsequent infection by the influenza virus. However, there is still no effective way for the total elimination of this virus, and the only effective method to combat this pathogen appears to be vaccination, which through immune system activation greatly limits its spread.

The present paper presents the immune reaction at different levels in response to the influenza virus after entering the body and the mechanisms of the influenza virus for avoiding reactions of the immune system, which correspond to its high variability at the molecular level. Moreover, in this paper we describe various methods of stimulating the organism's immune systems with different generations of vaccines and their effectiveness in the fight against this pathogen.

Key words: influenza virus • immune system



Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1140337>

Word count: 3868

Tables: –

Figures: –

References: 30

Adres autora: prof. dr hab. Wiesław Deptuła, Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin; e-mail: kurp13@univ.szczecin.pl

WSTĘP

Zakażenia dróg oddechowych wywołane wirusem grypy są dużym problemem zdrowotnym na całym świecie, powodując 3-5 mln infekcji klinicznych oraz 250-500 tys. zgonów rocznie [29]. Jak wiele zakażeń, także infekcje tym wirusem w organizmie wzbudzają odpowiedź immunologiczną, powodując ograniczenie, a nawet wstrzymanie jego replikacji oraz powstanie pamięci immunologicznej, chroniącej przed następną jego infekcją. Ten optymistyczny obraz, z powodu dużej zmienności wirusa grypy, powoduje jednak ograniczenie wykorzystania tych zjawisk, a co jest ważne przy immunizacji makroorganizmu człowieka swoistymi szczepionkami [4,16,18].

Wirus grypy, należący do rodziny *Orthomyxoviridae*, zakaża i uszkadza komórki nabłonkowe układu oddechowego (nosa, krtani, tchawicy i oskrzeli) u ssaków, w tym ludzi, [4,20]. Zawiera materiał genetyczny w postaci ujemnie spolaryzowanego jednoniciowego liniowego RNA; wyróżnia się trzy typy wirusa, tj. typ A, B i C, których podział opiera się na różnicach antygenowych między głównymi białkami wirionu, czyli białkiem M i nukleoproteiną – NP [4,22]. Wirus typu A wykazuje dużą zmienność antygenową i na podstawie różnic w antygenach powierzchniowych wyodrębnia się 11 podtypów warunkowanych neuramidazą – NA (N1-N11) oraz 18 podtypów warunkowanych hemaglutyniną – HA (H1-H18) [4,20,22,27,29]. Wirus grypy typu A i B zawiera 8 segmentów wirusowego RNA, które zawierają geny kodujące białka PA, PB1 i PB2 – należące do kompleksu polimerazy RNA, białko nukleokapsydu NP, glikoproteiny NA i HA, a także białko osłonki błonowej M1 i jej elementy integralne, tj. M2 w przypadku wirusa grypy typu A, a w przypadku wirusa grypy typu B białko BM2, NB, transportowe NEP i niestrukturalne białka NS1 i NS2. Wirus grypy typu C ma tylko 7 segmentów wirusowego RNA, które również zawierają geny większości powyższych białek, przy czym klasyczna hemaglutynina jest zastąpiona białkiem HEF (hemaglutynina mającą dodatkowo funkcję esterazy) oraz brak jest genu kodującego NA [19,21]. Każdy segment RNA wirusa grypy jest otoczony białkiem NP, tworząc kompleks rybonukleoproteinowy (RNP). Wszystkie kompleksy RNP są otoczone dodatkowo osłonką białkową utworzoną przez białka M (M1), pokrytą osłonką lipidową pochodzącą z błony cytoplazmatycznej komórki gospodarza, w której są zakotwiczone dwie powierzchniowe glikoproteiny – hemaglutynina (HA) i neuraminidaza (NA) oraz

w przypadku wirusa grypy typu A białko tworzące kanały jonowe – białko M (M2), albo białko NB w przypadku wirusa grypy typu B [4,8,22]. Ze względu na to, że wirus grypy typu A odpowiada za większość infekcji sezonowych oraz epidemicznych i pandemicznych, większość prac z zakresu odpowiedzi immunologicznej wykonano z wirusem grypy typu A, choć przyjmuje się, że wirusy grypy typu A i B mają wiele wspólnych cech biologicznych [4,16].

Wirus grypy typu A jest zakaźny dla ludzi i zwierząt (konie, świnię, norki, foki, wieloryby oraz ptaki) [4,22], u których w zależności od nasilenia infekcji, może przybierać postać epidemii, a nawet pandemii [4]. W przypadku wirusa grypy typu B wykazano, że jest chorobotwórczy wyłącznie dla człowieka i przebieg zakażenia jest dużo łagodniejszy niż przy infekcji wirusem grypy typu A, choć czasem może wystąpić „pełen” obraz kliniczny oraz komplikacje charakterystyczne dla infekcji wirusem grypy typu A. Natomiast wirus grypy typu C zakaża oprócz ludzi również świnię, jednak mimo dość powszechnego występowania zakażeń tym typem wirusa, infekcja na jego tle przebiega bezobjawowo [4].

UKŁAD ODPORNOŚCIOWY A WIRUS GRYPY

Zrozumienie i przybliżenie reaktywności układu odpornościowego (UO), głównie zaindukowanego przez potencjalnie groźne podtypy wirusa grypy typu A, może się przyczynić do poznania swobodnego obrazu relacji między wirusami grypy A UO ssaków. Zakłada się też, że poznanie tych zjawisk doprowadzi także do opracowania m.in. dobrych szczepionek i w konsekwencji likwidacji ewentualnych epidemii i pandemii wywołanych przez te zarazki [4,16,18]. Badania dotyczące infekcji spowodowanych wirusem grypy typu A wykazały, że UO reaguje na poziomie odpowiedzi nieswoistej, stanowiącej pierwszą linię obrony organizmu oraz swoistej, opartej o substancje wytwarzane przez limfocyty T oraz przeciwciała syntetyzowane przez limfocyty B skierowane na konkretny podtyp wirusa grypy. W pierwszym etapie zakażenia wirusem grypy główną rolę odgrywa odporność nieswoista, której wiele elementów tworzy odporność wrodzoną – naturalną. Działanie elementów odporności naturalnej, np. przez bariery anatomiczno-fizjologiczne, może zapobiec infekcji tym wirusem komórek nabłonka układu oddechowego. W razie przełamania bariery dochodzi do wzbudzenia odporności komórkowej nieswoistej – odporności wrodzonej, co dość istotnie ogranicza replikację wirusa. [14,16,18,25]. Przyjmuje się, że po

wniknięciu do dróg oddechowych wirus grypy przyłącza się do powierzchni komórek nabłonka przez glikoproteinę HA występującą na cząstkach wirusa, która łączy się z występującymi na powierzchni komórek odpowiednimi glikoproteinami, zawierającymi odpowiednie reszty kwasu sialowego. Nabłonek dróg oddechowych jest więc ważnym elementem w odpowiedzi na infekcje wirusowe. Ważnymi elementami w przeciwwirusowej odpowiedzi wrodzonej są interferony, w tym typu I (IFN- α/β) oraz niedawno odkryte interferony typu III (IFN- $\lambda 1$, - $\lambda 2$, - $\lambda 3$), gdyż to one inicjują hamowanie rozprzestrzeniania się wirusa i aktywację odpowiedzi swoistej (nabytej) [12,18]. Ważnymi elementami tego etapu odporności naturalnej w układzie oddechowym przy tego typu infekcji są receptory rozpoznające wzorce - PRR (pattern recognition receptor), występujące m.in. na makrofagach pęcherzyków płucnych, komórkach dendrytycznych (DC) oraz komórkach NK (natural kiler) w tym i iNKT (invariant NK-like-T-cells), które rozpoznają wzorce molekularne związane z patogenem - PAMP (pathogen associated molecular patterns) i w tym przypadku jest to RNA wirusa grypy [14,16,18,25]. Dzięki receptorom PRR, do których zalicza się m.in. znaczniki TLR (Toll like receptors), RIG-I (retinoic acid inducible gene - I) oraz NLRP3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 protein), zakażenie wirusem grypy jest szybko wykrywane przez makrofagi [24]. W wyniku stymulacji tych komórek przez receptory dochodzi do indukcji wytwarzania cytokin prozapalnych, w tym interferonu typu I i III, co się objawia silnym działaniem przeciwwirusowym, a następnie prowadzi do hamowania syntezy białek w komórkach gospodarza i ograniczenia replikacji wirusa grypy [12,14,16,18,25]. Jednocześnie obserwuje się gromadzenie makrofagów i neutrofilów w zainfekowanych wirusem grypy płucach. Dowodzi to ich dużego udziału w obronności makroorganizmu zainfekowanego tym wirusem, a także ich roli w powstawaniu zmian powstałych w wyniku infekcji [13]. Wykazano, że element odporności wrodzonej jakim są makrofagi pęcherzyków płucnych powoduje, że zaktwowane wirusem grypy makrofagi fagocytują apoptotyczne i inne komórki zakażone, tym samym ograniczają jego rozprzestrzenianie się. Ponadto makrofagi wytwarzają m.in. tlenek azotu (NO_2) oraz czynnik martwicy nowotworów (TNF- α), które bezpośrednio działają bójczo na wirus grypy. Wykazano, że obecność NO_2 wiąże się także ze zmianami immunopatologicznymi, charakteryzującymi się kumulacją zapalnych leukocytów w płucach, podwyższeniem ekspresji i utrzymywaniem się prozapalnych cytokin, m.in. TNF, IL-1 i IL-6 oraz podwyższeniem ilości cytokin wydzielanych przez komórki T z receptorem CD8+ [15,17,18]. Zarejestrowano tworzenie się tzw. zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych NET (neutrophil extracellular traps) występujących wśród neutrofilów w rejonach uszkodzonej tkanki pęcherzyków płucnych, co wskazuje na ich udział w uszkodzaniu tkanki w czasie infekcji, przy czym tworzenie się NET jest indukowane m.in. enzymami biorącymi udział w reakcjach redox [13]. Wśród innych białych ciałek krwi, biorących udział w odporności ssaków po zainfekowaniu wirusem grypy, oprócz m.in. makrofagów, neutrofilów, są komórki dendrytyczne, w tym profesjonalne komórki prezentujące antygen (APC), które wzmacniają

aktywność elementów UO. Dzieje się tak w związku ze zwiększoną prezentacją przez komórki APC antygenów wirusa grypy komórkom T z receptorem CD4+ i CD8+ i dochodzi do stymulacji odporności naturalnej i nabytej. Komórki APC biorące udział w obronności makroorganizmu, w czasie infekcji wirusem grypy, zwiększają aktywność wielu innych komórek UO przez wydzielanie wielu cytokin pro- i przeciwzapalnych [16,30]. Opisano wpływ tzw. komórek tipDC (komórek DC wytwarzających TNF- α /iNOS), które również pełnią funkcję komórek APC i kumulują się w znacznych ilościach podczas letalnych infekcji wirusem grypy. Początkowo sądzono, że eliminacja komórek tipDC jest istotna do obniżenia zmian patologicznych występujących podczas zakażenia, jednak wyniki badań wskazują na istotny udział stymulujący tych komórek na proliferację i zatrzymywanie cytotoksycznych limfocytów T CD8+ w zainfekowanych płucach [1,17,18]. W konwencjonalnych komórkach dendrytycznych (cDC) zarejestrowano, że monitorują one światło dróg oddechowych za pośrednictwem dendrytów, rozprzestrzenionych między komórkami nabłonka dróg oddechowych, co przyczynia się do wykrywania apoptotycznych komórek zainfekowanych wirusem grypy, a przez wydzielanie cytokin przez komórki UO, stan ten wpływa na opsonizację wirusa grypy. Trzeba jednak dodać, że same cDC mogą być także zakażone wirusem grypy i stają się jego przenośnikami [16]. W przypadku zaistnienia takiego stanu wykazano, że komórki cDC z wirusem grypy, migrując m.in. za pośrednictwem układu limfatycznego do węzłów limfatycznych, prezentują tam niosące ze sobą antygeny tego wirusa limfocytom T, powodując ich aktywację [11]. Ponadto komórki cDC, degradując białka wirusa po wnিকnięciu do nich, doprowadzają do powstania immunopeptydów (epitopów), które są prezentowane za pośrednictwem cząsteczek MHC głównie limfocytom T. Wykazano, że w tych komórkach (cDC) białko wirusa jest uwalniane do cytosolu przez proteosomy, a następnie transportowane do ich retikulum endoplazmatycznego, gdzie łączą się z cząsteczkami MHC. Następnie taki kompleks, przez aparat Golgiego, jest transportowany na powierzchnię błony komórkowej komórek APC, gdzie prezentowany jest komórkom T. Komórki w wyniku przekazanego antygeny i połączenia go w cytoplazmie z antygenami MHC klasy I, wynoszą go na powierzchnię, co prowadzi do swoistej aktywacji limfocytów T cytotoksycznych (Tc) z receptorem CD8 i wzmożonej cytotoksyczności tych komórek [9,16,18]. Ważnymi w infekcji grypy są komórki NK - efektorowe elementy wrodzonej odporności, oddziałujące efektywnie także w reakcji cytotoksyczności, ale bez restrikcji znaczników MHC. W razie rozpoznania przez swoiste przeciwciała zakażonych wirusem grypy komórek, dochodzi do aktywacji procesu cytotoksyczności komórek polimorfonuklearnych (PMN) zależnej od przeciwciał. Przyjmuje się, że komórki NK mają zdolność rozpoznawania komórek zakażonych wirusem grypy z receptorami cytotoksyczności NKp44 i NKp46 (NCR) i zakłada się, że subpopulacja komórek NK - iNKT (invariant NKT) w okresie wczesnego stadium ostrej infekcji wirusem grypy dodatkowo stymuluje odporność uzależnioną od komórek T o receptorach CD8+, co wpływa i kształtuje przebieg i obraz choroby wywołanej przez wirus [17,23]. Warto dodać, że ich ważna rola w sen-



sie teoretycznym wiąże się z nowo opisanymi komórkami NK prezentującymi antygen i niekonwencjonalnymi komórkami cytotoksycznymi DC, tj. cytotoksycznymi komórkami dendrytycznymi wytwarzającymi IFN- γ oraz cytotoksycznymi komórkami dendrytycznymi, które różnią się m.in. tym, że te ostatnie wydzielają IL-6 i IL-10 [3].

Drugą linię obrony makroorganizmu ssaków, w tym człowieka, przed zakażeniem wirusem grypy stanowią elementy odporności nabytej, która zależy od limfocytów B, tj. ich produktami w postaci swoistych przeciwciał (immunoglobuliny - Ig) wobec wirusa oraz odpowiedzią związaną z niektórymi subpopulacjami komórek T [16,18]. W odpowiedzi związanej z limfocytami B i ich produktami szczególnie ważne są swoiste Ig dla glikoprotein powierzchniowych wirusa, tj. HA i NA, ponieważ związanie się Ig z HA wirusa grypy powoduje zahamowanie przyłączania się i w konsekwencji zahamowanie wejścia wirusów do komórek ssaków. Jednocześnie trzeba dodać, że w zależności od rejonu HA wirusa grypy, wobec którego skierowane jest swoiste przeciwciało, efektywność działania Ig może być ograniczona do jednego wirusa, jeżeli Ig łączy się z głową HA lub różnymi podtypami wirusa i jest ono swoiste dla rejonu macierzystego HA. Wykazano, że przeciwciała skierowane przeciwko NA wirusa grypy, ograniczają jego rozprzestrzenianie się, dzięki hamowaniu aktywności enzymatycznej NA, co uniemożliwia uwalnianie się cząstek wirusa grypy z komórek. Dowiedziono, że przeciwciała skierowane wobec nukleoproteiny (NP) wirusa grypy są ważne, bo w połączeniu z dopełniaczem mogą powodować lizę zainfekowanych komórek wirusem grypy [8,16]. Pozytywne działanie przeciwciał łączy się z tym, że Ig przyłączając się do wirusa grypy ułatwiają proces fagocytozy jego cząsteczek przez komórki PMN czy monocyty-makrofagi (komórki MN) – elementy odpowiedzi naturalnej, co także przyczynia się do wzmocnienia odpowiedzi odpornościowej przeciwko temu wirusowi. Ważnym elementem w czasie infekcji wirusem grypy jest białko M2 tego wirusa, które działa bezpośrednio na komórki makroorganizmu, tworząc podczas wczesnej, a nawet późnej fazy replikacji wirusa, kanały jonowe w aparacie Golgiego komórek makroorganizmu. Białko to jest wysoce konserwatywne u wirusów grypy różnych podtypów, jednak występuje w niewielkich stężeniach w komórkach po ich zakażeniu. Przyjmuje się, że głównymi immunoglobulinami biorącymi udział w czasie zakażenia ssaków, w tym ludzi wirusem grypy, są IgA, IgM i IgG oraz SIgA (wytwarzana miejscowo i transportowana ze śluzem dróg oddechowych). Ig tworzące lokalną ochronę przed infekcją dróg oddechowych powodują hamowanie replikacji wirusa grypy, choć również są w stanie zneutralizować wirus będący wewnątrz komórek makroorganizmu [8,11,16]. Wykazano, że SIgA są wytwarzane stosunkowo szybko po zakażeniu, a obecność ich jest wskaźnikiem wczesnego zakażenia wirusem grypy. W przypadku surowicznych IgG ich ważność i rola jest związana z ich stopniowym przedostawianiem się do dróg oddechowych i neutralizowaniem wirusa grypy po przyłączeniu się jego cząstek, co jak wykazano warunkuje najdłuższą trwającą barierę ochronną makroorganizmu na zakażenie tym czynnikiem. Przeciwciała IgM z dopełniaczem głównie inicjują neutralizację wirusa grypy, a ich po-

jawienie się jest cechą infekcji pierwotnej tym wirusem [16]. Rola ochronna limfocytów B przeciw wirusowi grypy łączy się także z jego „dostaniem się” do nich przez receptory BCR. Wirus ten wewnątrz limfocytów B jest „przerabiany” i następnie po połączeniu się z antygenami MHC II klasy, prezentowany limfocytom T pomocniczym Th2. Komórki te przez wydzielanie swoistych interleukin dają sygnał i aktywują limfocyty B. Powoduje to wzrost liczby komórek B i wzmacnia ich aktywność podczas syntezy Ig, powodując zwiększoną neutralizację wirusa grypy. Udział odporności nabytej przy zakażeniu wirusem grypy wiąże się również z odpornością związaną z wieloma subpopulacjami limfocytów T (oprócz T CD8+), m.in. limfocytami pomocniczymi Th CD4+, w obrębie których są limfocyty Th1 i wspomniane limfocyty Th2 oraz limfocytami Treg i Th17 [16]. Wykazano, że limfocyty o receptorach T CD4+ wykazujące aktywność w stosunku do zainfekowanych komórek wirusem grypy, a ponadto wydzielając wiele cytokin aktywnie oddziałują na komórki UO. W przypadku komórek Th1 wykazano, że wytwarzając m.in. IL-2, IFN- γ i TNF- β , aktywują komórki PMN i MN m.in. do cytotoksyczności, cytolizy, fagocytozy, zjawiska NET i trogocytozy [9], natomiast wydzielane przez limfocyty Th2 IL-4, 5, 6, 10 i 13, wzmagają odporność związaną z komórkami B w zakresie ich liczby oraz syntezy Ig. Udział komórek Treg i Th17 w odporności przeciw infekcji wirusem grypy łączy się z ich regulującym działaniem na wiele komórek UO, ponieważ kontrolują odpowiedź komórek T CD4+ oraz T CD8+ i po infekcji oraz po podaniu szczepionki przeciwko grypie. Ponadto limfocyty Treg wpływają hamująco na odpowiedź komórek Th, chociaż nie wpływają na limfocyty B. W stanach zapalnych, które rejestruje się przeważnie w czasie infekcji wirusem grypy ssaków, w tym człowieka, stwierdza się, że komórki Th17 wzmacniają aktywność komórek Th przez wytwarzanie IL-6, która hamuje funkcje komórek Treg. Natomiast wspomniana wcześniej funkcja komórek T z receptorem CD8, w czasie infekcji wirusem grypy, jest związana z ich aktywnością cytotoksyczną i/lub cytoliczną. Komórki te rozpoznają i eliminują komórki zakażone tym wirusem w reakcji cytotoksyczności, zapobiegając wytwarzaniu wirusów potomnych. Reakcja komórek jest skierowana głównie w odpowiedzi na prezentowane przez komórki UO białka M i NP [8]. Limfocyty T CD8 indukują również apoptozę komórek zainfekowanych, a wytwarzając cytokiny poprawiają prezentację antygeny wirusa grypy, np. w wyniku stymulacji ekspresji cząsteczek MHC. Ponadto komórki T CD8 są nieodzowne przy następnych zakażeniach wirusem grypy, choć trzeba dodać, że ich reaktywność podczas wtórnej infekcji zależy także od kostymulacji, jaką otrzymały głównie w czasie początkowej fazy różnicowania limfocytów T dziewiczych w komórki T efektorowe [1,8,16,18,30]. Jednocześnie wykazano znaczny wpływ komensalicznych bakterii układu oddechowego na odpowiedź immunologiczną organizmu, podczas infekcji dróg oddechowych, np. wirusem grypy. Przypuszcza się, że produkty niektórych grup mikroorganizmów komensalicznych, mogą oddziaływać na różne receptory PRR stymulując leukocyty miejscowo lub systemowo. Czynniki uwalniane z leukocytów mogą wspierać stałe wytwarzanie pro-IL-1 β i pro-IL-18, przez promowanie białka z grupy NLR sygnału 1 do aktywacji cytokin zależnych od inflamasomu [14].

OSŁABIAJĄCE DZIAŁANIE WIRUSA GRYPY NA UO

Wykazano, że białka wirusa grypy mają zdolność wiązania się do różnych komponentów stanowiących wrodzone elementy układu odpornościowego, hamując odpowiedź, czego następstwem jest to, że wirus grypy jest słabo bądź w ogóle „niewidoczny” dla UO. Stwierdzono, że białko wirusa grypy NS1 wiąże RNA wirusa z domeną wiążącą RNA, maskując je przed rozpoznaniem przez receptory TLR oraz RIG-I, co prowadzi do zahamowania wytwarzania m.in. interferonu typu I [16]. Białko to może również wiązać trzyczęściowy motyw zawierający białko 25 (TRIM 25) i hamować aktywację receptorów RIG-I lub w wyniku utworzenia kompleksu z kinazą proteinową zależną od RNA (PKR – RNA-dependent protein kinase), hamować jej funkcje, a tym samym umożliwiać syntezę protein wirusa grypy [12,16]. Wykazano, że odpowiedź przeciwko infekcji wirusem grypy w komórkach nabłonka dróg oddechowych jest bardziej uzależniona od konstytutywnego uwalniania IFN- β i reakcji zachodzących w wyniku uwalniania tej cytokiny, niż na skutek obecności reszt kwasu sjałowego czy szlaku związanego z RIG-I. Dowiedziano, że stałe uwalnianie IFN- β zapewniało skuteczną odpowiedź immunologiczną i ograniczenie replikacji wirusa grypy w zainfekowanych komórkach nabłonkowych oskrzeli. Jednocześnie w komórkach nabłonka oskrzelowego zaobserwowano wczesną indukcję receptorów RIG-I i większy odsetek zainfekowanych komórek ulegających apoptozie, co korelowało ze zmniejszoną replikacją wirusa [12]. W prawidłowych warunkach aktywność PKR jest regulowana przez komórkowy inhibitor P58^{IPK}, który tworzy kompleks z białkiem szoku termicznego 40 (hsp40). Natomiast w przypadku proteiny NP wirusa grypy stwierdzono, że oddziałując z białkiem hsp40 wywołuje jego dysocjację, w wyniku czego uwolniony zostaje inhibitor P58^{IPK}, co powoduje inaktywację PKR, a tym samym „wyłączona” jest przeciwwirusowa ochrona komórki, umożliwiając syntezę białek wirusa grypy i jego replikację [16]. Również proteina M2 wirusa grypy hamuje P58^{IPK} przez przyłączenie się do inhibitora hsp40, dochodzi do zatrzymania syntezy białek i indukcji apoptozy komórki zakażonej, ułatwiając uwalnianie nowo powstałych cząstek wirusowych [16]. Jednocześnie wykazano, że wirus grypy wpływa na autofagię, czyli proces prowadzący do lizosomalnej degradacji cytoplazmatycznych białek i organelli w komórce [10]. Zarejestrowano, że proteina M2 wirusa grypy, ma zdolność wiązania się z białkiem Beclin-1 w komórce nim zainfekowanej, hamując w ten sposób proces autofagii na poziomie fuzji autofagosomu z lizosomem. Sugeruje się, że także apoptoza umożliwia omijanie przez wirusa grypy reaktywności przeciwwirusowej UO, ale jednocześnie zjawisko to stwarza możliwość namnażania się i uwalniania wirusa w komórkach gospodarza [10]. Innym mechanizmem „obronnym” wirusa grypy przed UO gospodarza jest białko PB1-F2 z resztą seryny w pozycji 66, które hamuje wytwarzanie interferonu typu I przez wiązanie się i inaktywację mitochondrialnej przeciwwirusowej proteiny sygnałnej MAVS (mitochondria antiviral signaling protein). Wykazano też, że polimorfizm proteiny PB1-F2 wirusa grypy warunkuje jego patogenność, bo ma ono również wpływ na indukcję apoptozy komórek prezentujących antygen i wykazuje synergiczne działanie na funkcje wirusowych

polimeraz PA i PB2 [5,10]. Ponadto białko PB2 jest zdolne do wiązania stymulatora 1 promotorowego interferonu (IPS-1 – interferon promotor stimulator 1), który w prawidłowych warunkach przyczynia się do stymulacji wytwarzania interferonu β (IFN- β). Jeszcze innym sposobem ucieczki wirusa grypy przed UO jest jego duża zmienność i obecność wariantów białka HA, które jest głównym celem odpowiedzi związanej z Ig, co sprawia, że obrona organizmu nie jest w pełni skuteczna [16]. Zmienność wirusa grypy przede wszystkim jest warunkowana segmentową budową genomu wirusa i tym samym jego zdolnością do reasocjacji oraz bardzo częstej mutacji punktowej, przy jednoczesnym braku mechanizmów naprawczych podczas replikacji wirusów. Przyczynia się to w znacznym stopniu do nagromadzenia zmian, zwłaszcza w obrębie genów kodujących powierzchniowe antygeny wirusa grypy, tj. HA i NA, [2,16]. Mechanizmami zmienności genetycznej wirusa grypy jest przesunięcie antygenowe i skok antygenowy. Przesunięcie antygenowe polega na spontanicznych mutacjach w obrębie genomu wirusa grypy podczas jego replikacji, których wynikiem mogą być zmiany pojedynczych aminokwasów w sekwencji białek antygenowych oraz zmiany we wzorze glikozylacji białek tego wirusa [2,5,8,16]. Skok antygenowy polega na wymianie jednego lub kilku fragmentów RNA wirusa między szczepami wirusa grypy typu A, co najczęściej się odbywa gdy organizm gospodarza jest zakażony jednocześnie dwoma różnymi szczepami wirusa. Istnieje wtedy możliwość wymiany między np. ludzkim i zwierzęcym wirusem grypy, genów kodujących powierzchniowe glikoproteiny (NA, HA) czy polimerazy (PB1, PB2, PA) [5]. Konsekwencją takiej wymiany materiału RNA między szczepami wirusa grypy jest pojawienie się odrębnego szczepu o znacznych zmianach antygenowych, przeciw którym organizm gospodarza nie wytworzył jeszcze i nie umie w krótkim czasie „zebrać” nowych sił warunkujących odporność [2,8,16].

PRAKTYCZNE ASPEKTY REAKCJI UO WOBEC WIRUSA GRYPY

Oceniając skutki po wniknięciu wirusa grypy do organizmu ssaka, w tym człowieka, trzeba stwierdzić, że najskuteczniejszym sposobem zapobiegania grypie jest stymulacja UO przez podanie różnych szczepionek przeciwko grypie. Dotąd opisano szczepionki żywe, inaktywowane, z rozszczepionym wirionem, podjednostkowe oraz wirosomalne [2,4,8,16]. Mogą być podawane najczęściej domięśniowo, ale także śródskórną i donosowo [2,8]. Szczepionki żywe stosuje się głównie w postaci aerozolu i są podawane donosowo, ponieważ zawierają atenuowane wirusy grypy, które zostały pozbawione zjadliwości dla człowieka, a są immunogenne. Szczepionki tego typu indukują procesy odpornościowe na poziomie komórek B, tj. wytwarzających immunoglobuliny i czynniki wzrostu oraz aktywacji komórek PMN, MN i T, tak jak podczas procesów występujących w czasie naturalnego zakażenia ssaków tym wirusem [4,25,29]. Natomiast szczepionki inaktywowane zawierają mieszaninę zabitych szczepów wirusa grypy, są podawane domięśniowo i ze względu na swoiste działanie i mniejsze bezpieczeństwo, nie są już dostępne w Europie [2,4,8,16,29]. Innym typem szczepionek są szczepionki z rozszczepionym wirionem, przygotowywane z inaktywowanych cząstek wirusa grypy.



Zawierają fragmenty wirusa chemicznie rozbitego, oczyszczanego z białek pochodzenia niewirusowego. Natomiast szczepionki podjednostkowe zawierają oczyszczone elementy wirusa, głównie proteiny powierzchniowe HA i NA, które cechują się w pełni właściwościami antygenowymi, tj. antygenowością i immunogennością. Ostatnim typem szczepionek są szczepionki wirosomalne, tj. zawierające cząstki podobne do wirusa grypy, czyli odtworzoną osłonką wirusową bez jego materiału genetycznego, która zachowuje aktywność wiązania cząstek i fuzję z błoną komórkową komórek człowieka. W takich szczepionkach wirosom pełni rolę adiuwantu oraz układu dostarczania oczyszczonych antygenów HA i NA wirusa grypy [2,4,8,16,29]. W fazie testowej wobec wirusa grypy u ssaków, w tym człowieka, są również szczepionki typu ISCOMS (immune stimulating complex), wykorzystujące kompleksy stymulujące odpowiedź immunologiczną. Szczepionki te głównie zwiększają i indukują aktywność limfocytów T CD8. Kompleksy ISCOM powstają na zasadzie łączenia immunogenów wirusa grypy z innymi składnikami, tj. cholesterolem, fosfatydylocholiną i saponiną, tworząc struktury komórkopodobne, zawierające wewnątrzbiałkowy składnik szczepionki, które wzbudzają znacznie silniej odpowiedź komórkową i humoralną, warunkującą odporność naturalną i nabytą. W porównaniu z klasycznymi szczepionkami np. inaktywowaną, są wciąż przedmiotem badań [16]. Większość szczepionek przeciw grypie sezonowej, dopuszczonych do obrotu w krajach Unii Europejskiej jest wytwarzanych z wykorzystaniem wirusów grypy namnażanych w zależnych jajach kurzych, jednak wiąże się to z możliwością zanieczyszczenia biologicznego, tj. bakteryjnego i grzybowego, ale także wirusowego. Ponadto istnieje niebezpieczeństwo wystąpienia alergii na białko jaja kurzego u osób wrażliwych na ten alergen. Dlatego też od lat trwają badania mające na celu zastąpienie klasycznych metod produkcji szczepionek przeciwgrypowych innymi, często bezpieczniejszymi metodami. Jedną z nich jest wykorzystanie ssaczycy linii komórkowych, tj. linii MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) komórek nerki psa oraz linii Vero nerki afrykańskiej małpy zielonej. Przewodzenie namnażania wirusa w tego typu liniach umożliwia zwiększenie dostępności szczepionki, jednak wiąże się również z koniecznością dodawania do hodowli surowicy, co może powodować reakcje nadwrażliwości, zmienność między seriami surowicy i również niebezpieczeństwo za-

nieczyszczenia np. mikoplazmami czy endogennymi wirusami zwierzęcymi [2]. Dlatego też dąży się do wyeliminowania konieczności dodawania surowic do linii komórkowej, czego wynikiem jest linia MDCK 33016 zaadaptowana do namnażania wirusa z wykorzystaniem podłoża chemicznie zmodyfikowanego [2]. W ostatnich latach pojawiła się jednak nowa metoda uzyskiwania antygenów wirusa grypy, bez konieczności jego namnażania, dzięki wykorzystaniu rekombinantowych białek HA wytwarzanych z zastosowaniem linii komórek owadzych i systemu ekspresji bakulowirusa (BEVS) [2,6,7,28]. W połowie stycznia 2013 r. używano triwalentną szczepionkę przeciwko wirusowi grypy wspomnianą metodą, która została dopuszczona i może być stosowana prewencyjnie przeciwko grypie sezonowej u ludzi między 18 a 49 rokiem życia [26]. Jednocześnie coraz większą uwagę poświęca się strategiom produkcji szczepionek podjednostkowych lub DNA, co pozawala unikać problemów, jakie wynikają z produkcji szczepionek na bazie jaj kurzych. Obecnie najbardziej obiecujące wydają się szczepionki zawierające cząstki wirusopodobne, oparte na metodach rekombinacji, tzw. szczepionki VLP (virus-like particles). Zawierają nieinfekcyjne i niereplikujące cząstki, które prezentują niezmienione i aktywne biochemicznie antygeny stymulujące odpowiedź humoralną i komórkową. Obecnie są produkowane w liniach komórkowych ssaczycy, owadzych lub roślinnych, jednak nadal są na etapie prób klinicznych [26].

ZAKOŃCZENIE

Biorąc pod uwagę przedstawione fakty dotyczące reakcji UO na wirusa grypy, należy stwierdzić, że mimo iż mechanizmy infekcji wirusem grypy oraz obrony organizmu przed zakażeniem nim poznano, to nadal istnieją poważne luki w wyjaśnieniu roli różnych elementów układu odpornościowego, których poznanie może się przyczynić do opracowania bardziej swoistych metod oddziaływania na wirus grypy. Stąd dalsze badania z tego zakresu powinny zmierzać w kierunku poznania dalszych mechanizmów immunologicznych wobec wirusa grypy, co pozwoliłoby na opracowanie skuteczniejszych sposobów [metod] interwencji, w tym nowych szczepionek, a to wzmocniłoby możliwości zwalczania infekcji grypy w przyszłości - choroby obecnie nadal groźnej dla ssaków, w tym człowieka.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Aldridge J.R.Jr, Moseley C.E., Boltz D.A., Negovetich N.J., Reynolds C., Franks J., Brown S.A., Doherty P.C., Webster R.G., Thomas P.G.: TNF/iNOS-producing dendritic cells are necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 5306-5311
- [2] Augustowicz E.: Wybrane elementy procesu wytwarzania szczepionek przeciw grypie. *Przegl. Epidemiol.*, 2010; 64: 373-380
- [3] Bielawska-Pohl A., Pajtasz-Piasecka E., Duś D.: Związki komórek NK z komórkami dendrytycznymi. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2013; 67: 192-200
- [4] Brydak L.B.: Grypa. Pandemia grypy mit czy realne zagrożenie? Oficyna Wyd. Rytm, Warszawa 2008
- [5] Coleman J.R.: The PB1-F2 protein of influenza A virus: increasing pathogenicity by disrupting alveolar macrophages. *Virology*, 2007; 4: 9
- [6] Cox M.M., Hashimoto Y.: A fast track influenza virus vaccine produced in insect cells. *J. Invertebr. Pathol.*, 2011; 107: S31-S41
- [7] Cox M.M., Hollister J.R.: FluBlok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. *Biologicals*, 2009; 37: 182-189
- [8] Cox R.J., Brokstad K.A., Ogra P.: Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand. J. Immunol.*, 2004; 59: 1-15
- [9] Deptuła W., Tokarz-Deptuła B., Stosik M.: Immunologia dla biologów. Wyd. Uniwersytet Szczeciński, 2008

- [10] Dumit V.I., Dengiel J.: Autophagosomal protein dynamics and influenza virus infection. *Front. Immunol.*, 2012; 3: 43
- [11] GeurtsvanKessel C.H., Lambrecht B.N.: Division of labor between dendritic cells subsets of the lung. *Mucosal Immunol.*, 2008; 1: 442-450
- [12] Hsu A.C., Parson K., Barr I., Lowther S., Middleton D., Hansbro P.M., Wark P.A.: Critical role of constitutive type I interferon response in bronchial epithelial cell to influenza infection. *PLoS One*, 2012; 7: e32947
- [13] Hulo C., Castro E., Masson P., Bougueleret L., Bairoch A., Xenarios I., Le Mercier P.: ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Res.*, 2011; 39: D576-D582
- [14] Ichinohe T., Pang I.K., Kumamoto Y., Reaper D.R., Ho J.H., Murray T.S., Iwasaki A.: Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 5354-5359
- [15] Jayasekera J.P., Vinuesa C.G., Karupiah G., King N.J.: Enhanced antiviral antibody secretion and attenuated immunopathology during influenza virus infection in nitric oxide synthase-2-deficient mice. *J. Gen. Virol.*, 2006; 87: 3361-3371
- [16] Kreijtz J.H., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F.: Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res.*, 2011; 162: 19-30
- [17] La Gruta N.L., Turner J.: T cell mediated immunity to influenza: mechanisms of viral control. *Trends Immunol.*, 2014; 35: 396-402
- [18] McGill J., Heusel J.W., Legge K.L.: Innate immune control and regulation of influenza virus infections. *J. Leuk. Biol.*, 2009; 86: 803-812
- [19] Mishra N.: Emerging influenza A/H1N1: challenges and development. *The Health*, 2011; 1: 16- 22
- [20] Mrukowicz J., Gładysz A., Sawiec P.: Wybrane choroby wirusowe. Grypa. W: Choroby wewnętrzne, red. A. Szczekliki, 2011
- [21] Narasaraju T., Yang E.I., Samy R.P., Ng H.H., Poh W.P., Liew A.A., Phoon M.C., von Rooijen N., Chow V.T.: Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am. J. Pathol.*, 2011; 179: 199-210
- [22] Niedźwiedzka-Rystwej P., Deptuła W.: Pryszczycza i ptasia grypa – groźne zoonozy. *Laboratorium*, 2009; 3: 50-53
- [23] Paget C., Ivanov S., Fontaine J., Blanc F., Pichavant M., Renneson J., Bialecki E., Pothlichet J., Vendeville C., Barba-Spaeth G., Huerra M.R., Faveeuw C., Si-Tahar M., Trottein F.: Potential role of invariant NKT cells in the control of pulmonary inflammation and CD8+ T cell response during acute influenza A virus H3N2 pneumonia. *J. Immunol.*, 2011; 186: 5590- 5602
- [24] Pang I.K., Iwasaki A.: Inflammasomes as mediators of immunity against influenza virus. *Trends Immunol.*, 2011; 32: 34-41
- [25] Pulendran B., Ahmed R.: Immunological mechanisms of vaccination. *Nature Immunol.*, 2011; 12: 509-517
- [26] Thompson C.M., Petiot E., Lennaert A., Henry O., Kamen A.A.: Analytical technologies for influenza virus-like particle candidate vaccines: challenges and emerging approaches. *Virol. J.*, 2013; 10: 141
- [27] Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuenco S., Gomez J., Chen L.M., Johnson A., Tao Y., Dreyfus C., Yu W. i wsp.: New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.*, 2013; 9: e1003657
- [28] Treanor J.J., El Sahly H., King J., Graham I., Izikson R., Kohberger R., Patriarca P., Cox M.: Protective efficacy of a trivalent recombinant hemagglutinin protein vaccine (FluBlok) against influenza in healthy adults: A randomized, placebo-controlled trial. *Vaccine*, 2011; 29: 7733-7739
- [29] WHO: Influenza fact sheet no. 211. <http://www.who.int/media-centre/factsheets/2003/fs211/en/> (12.12.2014)
- [30] Zammit D.J., Turner D.L., Klonowski K.D., Lefrançois L., Cauley L.S.: Residual antigen presentation after influenza virus infection affects CD8 T cell activation and migration. *Immunity*, 2006; 24: 439-449

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.

