

Odpowiedź immunologiczna w przebiegu zakażenia wirusem grypy^{*)}

ANDRZEJ KOWALCZYK, IWONA MARKOWSKA-DANIEL

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Kowalczyk A., Markowska-Daniel I.

Immune response during infection caused by influenza virus

Summary

The paper reviews literature on the immunological response to influenza virus (IV) infection.

The first part of the paper focuses on humoral response involving antibodies against IV and proinflammatory cytokines. The response involves mainly antibodies of IgA, IgG and IgM classes, produced against antigenic proteins of IV – hemagglutinin and neuraminidase. The antibodies are presented in blood and in BALB from 7 DPI and remain at a high level for 8-10 weeks post infection. Moreover, cytotoxic T lymphocytes are more specific to NP and M proteins. Virus titres in the lungs are tightly correlated with the level of IFN- α , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10 and IL-12 in BALF. There is no correlation between virus replication and cytokines in serum.

The biological effects of immunosuppressive activity caused by IV are discussed in the second part of this review. Some of IV strains possess NS protein in the form known as IFN-inducing particles (IFP), some others in the form of INF-suppressing particles (ISP). IL-10 activity of the host was also described as an immunosuppressive factor.

The third part of the paper summarizes the relationship between the pathogenesis of influenza and the acute phase proteins induced by cytokines.

To recapitulate, immunological response to infection caused by influenza virus is a multistage and multifactor process, including specific and unspecific humoral and cell response. The response involves mainly proinflammatory cytokines and acute phase proteins. Undoubtedly, biological properties of IV, especially its suppressive effect on the secretion of INF along with IL-10 activity, reduce cell response, influencing the defense of the organism against infection.

This model of influenza virus infection may be valuable for assessing the therapeutic potential of cytokine antagonists.

Keywords: influenza virus, immune response, pathogenesis, cytokines, acute phase proteins

Objawy kliniczne oraz zmiany patologiczne towarzyszące zakażeniu wirusem grypy (influenza virus, IV) wyglądają podobnie u człowieka i u świń. Również skład cytokin płynu oskrzelowo-pęcherzykowego (broncho-aleovar lavage fluid, BALF) jest zbliżony u zakażonych świń i eksperymentalnie zakażanych wolontariuszy (11). Biorąc to pod uwagę oraz fakt, że organizm świni jest wrażliwy na zakażenie tymi samymi podtypami wirusa grypy, co organizm człowieka, uznano świnię za organizm modelowy do badań nad patogenezą i odpowiedzią immunologiczną w przebiegu grypy.

Charakterystyczny przebieg zakażenia wirusem grypy związany jest ze specyfiką odpowiedzi immunologicznej indukowanej infekcją. Odpowiedź immuno-

logiczna na zakażenie IV jest wieloetapowym i wieloczynnikowym procesem, na który składają się specyficzna odpowiedź humoralna oraz wielopłaszczyznowa odpowiedź komórkowa. W związku z pneumotropizmem IV reakcje immunologiczne dotyczą głównie układu oddechowego.

Humoralna odpowiedź immunologiczna

Odpowiedź immunologiczna organizmu na zakażenie IV jest szybka i prowadzi najczęściej do efektywnej eliminacji wirusa z ustroju. Biorą w niej udział przeciwciała klas IgA, IgG oraz IgM (16). Są one skierowane przeciwko głównym białkom antygenowym wirusa, czyli hemaglutyninie (H) i neuraminidazie (N). Szczególnie ważną rolę w procesie neutralizacji wirusa i zabezpieczeniu organizmu przed zakażeniem odgrywają przeciwciała przeciwko H. Jest ona miejscem

^{*)} Praca finansowana ze środków na naukę w latach 2009-2012 jako projekt badawczy nr N N308 097537.

głównych determinant antygenowych, a jej zmienność jest najważniejszym czynnikiem umożliwiającym wirusowi efektywne unikanie neutralizacji przez komórki odpornościowe organizmu, co tym samym utrudnia kontrolowanie epidemii grypy drogą szczepień ochronnych. Swoiste przeciwciała pojawiają się zarówno w surowicy krwi, jak i w płynie oskrzelowym. Testem zahamowania hemaglutynacji można je wykryć w surowicy już w 7. dniu po zakażeniu. Po przechorowaniu grypy przeciwciała utrzymują się na wysokim poziomie przez mniej więcej 8-10 tygodni, po czym ich poziom zaczyna spadać.

Jak wykazano w badaniach przeprowadzonych na myszach, cytotoksyczne limfocyty T są swoiste głównie w odniesieniu do białek NP i M wirusa grypy, a w mniejszym stopniu wobec H i N (24). Cytotoksyczne limfocyty T, pomimo iż nie są zdolne do zablokowania łączenia się wirusa z receptorami, a więc tym samym nie mogą zapobiec infekcji, odgrywają istotną rolę w procesie eliminacji wirusa z tkanki płucnej.

Komórkowa odpowiedź immunologiczna sterowana cytokinami prozapalnymi

Interakcje pomiędzy wirusem a komórkami immunokompetentnymi zostały opisane głównie na podstawie wyników badań przeprowadzonych *in vivo* z udziałem myszy, jako organizmów modelowych lub w warunkach *in vitro* w hodowlach komórek. W wyniku replikacji wirusa *in vivo* dochodzi do stymulacji komórek limfatycznych pierwszej linii obrony i rozwoju reakcji zapalnej związanej z sekrecją cytokin. Pełnią one rolę pośredników w przekazywaniu sygnałów między komórkami. Wywierane przez nie działanie jest silne, nawet przy niskich stężeniach. Dotychczas wykryto 50 chemokin, które ze względu na skład aminokwasów zostały podzielone na dwie subpopulacje (15). Wczesna odpowiedź immunologiczna jest wynikiem działania cytokin prozapalnych, do których zalicza się: interferon α (INF- α), czynnik martwicy nowotworu (TNF- α) oraz interleukinę 1 (IL-1) (1). Są one zwykle wydzielane w miejscu docelowym, dlatego w przebiegu infekcji IV są produkowane głównie w płucach. Dodatkowo obserwuje się ograniczony transport cytokin przez barierę krew-pęcherzyk płucny. Z tego powodu stężenie tych białek jest wysokie w płucach, natomiast niskie lub niewykrywalne w surowicy (22). Inne cytokiny, takie jak: IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 także mają wpływ na rozwój i specyfikę objawów po zakażeniu IV, ale ich rola podczas zakażeń układu oddechowego IV jest mniej poznana.

W badaniach prowadzonych w warunkach *in vivo* z wykorzystaniem myszy udokumentowano wczesne podniesienie się poziomu INF, TNF, IL-1, IL-6 w popłuczynie z drzewa oskrzelowego lub w homogenizacie płucnym, którym towarzyszyło nasilenie objawów chorobowych oraz zmiany patologiczne w płucach (1, 10, 13). W przypadku zakażenia myszy wysoce zjadliwym wirusem grypy świń blokowanie TNF przeciw-

ciałami przyczyniało się do redukcji ostrych zmian anatomopatologicznych w płucach i do przedłużenia życia do jednej doby (29). Zablockowanie funkcji INF powodowało obniżenie produkcji IL-1, wpływając tym samym na podwyższenie temperatury ciała. Myszy zakażane szczepem H1N1, A/PuertoRico/8/34 wykazywały wzrost wydzielania IFN- γ , IL-12 w czasie od 3 do 7 dni po infekcji. Z kolei u myszy z wyłączoną ekspresją IL-18, po zakażeniu tym szczepem, organizm nie wykazywał zdolności usuwania wirusa (4). W odniesieniu do ludzi donosowe zakażenie wolontariuszy szczepem H1N1 (A/Texas/36/91) było czynnikiem wywołującym podwyższone wydzielanie IFN- γ , którego obecność w wysięku z nosa stwierdzano do 5 dni po zakażeniu (10). W badaniach świń zaobserwowano korelację między przebiegiem choroby, produkcją cytokin, śmiertelnością zwierząt a koncentracją szczepu Sw/Belgium1/83 w dawce zakaźnej (3). Wykazano wyższe stężenie cytokin lokalnie w płucach niż we krwi obwodowej. W ciągu 18-24 godzin miano wirusa w płucach osiągnęło wartość $10^{8.2}$ - $10^{9.7}$ EID₅₀/g tkanki (30). Infekcji towarzyszyło intensywne złuszczenie się nabłonka oraz masowy wysięk w drzewie oskrzelowym, z napływem komórek zapalnych. Trzy dni po zakażeniu drogi oddechowej były wypełnione wysiękiem zawierającym resztki nekrotyczne oraz makrofagi. W tym czasie stan zwierząt zaczynał się poprawiać. Po zmniejszeniu się nasilenia objawów klinicznych poziom INF obniżał się, a dodatkowo nie wykrywano TNF- α i IL-1.

Naukowcy z Uniwersytetu Philipsa w Marburgu prześledzili mechanizm indukcji cytokin przez wirusa grypy na modelu linii komórkowych szczura i myszy (2). Mechanizm ten okazał się dużo bardziej zróżnicowany niż wcześniej sądzono. Okazało się, że TNF- α jest produkowany jedynie po zakażeniu komórek, natomiast poziom INF rośnie, gdy komórki stymuluje się również wirusem inaktywowanym światłem UV. Dodatkowa aktywacja komórek czynnikiem stymulującym tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) zasadniczo podwyższa wydzielanie INF, TNF, IL-1 oraz IL-6. W przeprowadzonych badaniach zwrócono również uwagę na synergizm odpowiedzi na zakażenie mieszane wirusem grypy oraz bakteriami. Uzyskanych wyników nie można oczywiście odnieść w pełni do zakażenia organizmu, z uwagi na brak pełnej informacji o interakcji pomiędzy poszczególnymi komórkami.

Warto nadmienić, że produkcja INF- α jest dodatkowo kontrolowana za pośrednictwem trzech czynników białkowych: 2',5'-syntetazy oligoadenylowej, kinazy białkowej R oraz białka Mx (14). Ludzkie białko Mx występuje w dwóch postaciach: A oraz B. Fenotyp MxA jest bardziej skorelowany z namnażaniem się wirusa i podczas jego replikacji kumuluje się w cytoplazmie. U świń nie zidentyfikowano występowania dwóch form tego białka, jednak zauważono wyraźny

wzrost jego wydzielania podczas aktywacji INF po doświadczalnym zakażeniu zwierząt. Największy wzrost ekspresji genów Mx oraz INF zanotowano w pierwszym dniu po zakażeniu. W teście immunohistochemicznym białko Mx wykrywano tylko w komórkach nabłonkowych układu oddechowego, głównie oskrzeli, oskrzelików i pęcherzyków płucnych. Dodatkowo okazało się, że grupa komórek z pozytywnym sygnałem dla białka Mx była liczniejsza niż komórek z sygnałem dla INF w tym samym obszarze płuc. Ekspresję tego białka uwzględnia się w wielu pracach prowadzonych nad patogenezą zakażeń SIV (12, 21, 28). Udowodniono ponadto, że polimorfizm tego genu powoduje zróżnicowaną odporność świń na infekcję IV.

Komórkami wrażliwymi na zakażenia wirusem grypy typu A są monocyty i makrofagi. W krótkim czasie po infekcji synteza białek wirusa, odbywająca się *de novo*, jest wykrywana przez komórki żerne. W ciągu 24-48 godzin zainfekowane monocyty ulegają apoptozie, niemniej jednak do tego czasu zapoczątkowują one komórkową odpowiedź immunologiczną. Oprócz wyżej wymienionych cytokin prozapalnych odpowiedź immunologiczna obejmuje transkrypcję i wydzielanie IL-6 oraz MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) i MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 α) (13). Jednocześnie chemokiny wydzielane przez neutrofile, takie jak IL-8 oraz GRO- α (growth-related oncogene α), są hamowane. Szybki wzrost stężenia chemokin obserwuje się *in vitro* już po 4 godzinach od zakażenia IV. Są one wydzielane w różnych etapach procesu zapalnego. Jako pierwsze i w najwyższym stężeniu produkowane są białka MCP-1 i MIP-1 α . Zbliżony poziom tych chemokin stwierdzono podczas stymulacji komórek silnym induktorem, jakim są np. lipopolisacharydy (LPS) bakterii. Podczas stymulowania komórek *in vitro* IV nie wykryto aktywności wydzielniczej neutrofilii dla takich chemokin, jak IL-8 lub GRO- α .

Chemokiny związane z aktywacją limfocytów CD4 i CD8

Interferon γ wraz z IL-4 są czynnikami regulatorowymi związanymi z indukowaniem transformacji limfocytów T CD4+ pomocniczych oraz limfocytów T CD8+ cytotoksycznych, odpowiednio do fenotypów T helper 2 (Th2) oraz T cytotoksycznych 2 (Tc2), produkujących IL-4 oraz IL-5 (26). Stwierdzono, że IL-4 bezpośrednio indukuje limfocyty Th2 oraz Tc2 *in vivo* i *in vitro*, natomiast INF- γ wykazuje działanie inhibicyjne *in vitro* (7). Podczas zakażenia IV myszy z upośledzoną ekspresją receptorów dla INF stwierdzono nasilenie odpowiedzi ze strony komórek Th2, w porównaniu z przebiegiem infekcji u myszy bez tego defektu, u których obserwowano silną stymulację komórek Tc2 (31). Wszystkie grupy myszy po zakażeniu wykazywały podobną sekrecję makrofagów, neutrofilii oraz limfocytów, natomiast jedynie u myszy z upośledzeniem wykryto wysoki napływ eozynofili. Zwiększona liczba granulocytów kwasochłonnych

była skorelowana z podwyższonym poziomem IL-5 w BALF. Liczbę komórek Th2 oraz Tc2 przebadano cytometrycznie w BALF oraz w hodowli komórek śródpiersiowych węzłów chłonnych. Liczba komórek CD8+ u myszy z defektem receptora dla INF, jak i u myszy zdrowych mieściła się poza zakresem wykrywalności metody. Liczba komórek CD4+ produkujących IL-4 była wyższa w płynie oskrzelowym niż w komórkach węzłów chłonnych u myszy z defektem. U myszy bez defektu liczba komórek CD4+ była wyraźnie niższa, poniżej poziomu tła, zarówno w BALF, jak i w komórkach pochodzących z hodowli. W omawianych badaniach nie wykryto obecności limfocytów CD8+ ani u zwierząt kontrolnych, ani u tych z defektem. Powodem był niski poziom ekspresji IL-4, wystarczający do indukcji komórek CD4+, ale zbyt niski do stymulacji komórek CD8+. Potwierdzeniem tej hipotezy są wyniki badań Erba i wsp. (8), w których myszy transgeniczne z wyłączoną ekspresją IL-4 były zdolne do konwersji komórek Tc2 tylko pozaustrojowo, w hodowli *in vitro*, do której dodawana była egzogenna IL-4. Ponadto zaobserwowano stymulujące działanie dodatkowych czynników, innych niż IL-4 oraz INF, powodujących przekształcanie się komórek CD8+ w komórki typu Tc2 w warunkach *in vivo*. Od czasu, gdy wykazano, że infekcja IV indukuje produkcję transformującego czynnika wzrostu TGF- β , staje się jasny brak stymulacji komórek Tc2 u zwierząt z defektem receptora dla INF (23). Powodowane jest to zahamowaniem konwersji komórek CD8+ w obecności TGF- β (6). Badania wykazały jednoznacznie, że INF- γ jest odpowiedzialny za supresję komórek CD4+.

Hipotezy supersyjnego działania wirusa grypy

Patogenność wirusa grypy zależna jest od różnorodności jego form, ujawniających się m.in. budową antygenową białek powierzchniowych, jak również białek funkcjonalnych wnętrza wirionu. Podjęto próbę sprawdzenia, które cząstki wirusa indukują produkcję INF- γ (INF-inducing particles, IFP), a które działają supresyjnie w tym zakresie (INF-suppressing particles, ISP) (19). Do badań wykorzystano 8 podtypów wirusa grypy o różnej patogenności, które podzielono na kilka grup: wirusy w pełni aktywne niemodyfikowane, wirusy z zablokowanym genem NS1, wirusy inaktywowane światłem UV lub podwyższoną temperaturą. Doświadczenie przeprowadzono z wykorzystaniem pierwotnych hodowli komórkowych z zarodka kurzego. W zależności od wariantu wirusa obserwowany poziom INF był zróżnicowany. Wirusy grypy H1N1 pozbawione całkowicie białka NS1 indukowały produkcję INF na poziomie 3000 U INF, bez okresu zwłoki, zaś wirusy-mutanty z delecją końca C białka NS1 stymulowały najwyższy poziom INF, o koncentracji 12 000 U INF. Poziom INF wywołany zakażeniem mutantami znacząco malał po okresie maksymalnego wzrostu, wynoszącym 10 godzin. Wyjściowe formy obydwu mutantów nie były w stanie stymulować

syntezy INF na wykrywalnym poziomie. Po zakażeniu dziką postacią wirusa grypy H9N2 sekrecja INF była indukowana dopiero po okresie 2-4 godzin całkowitego zastoju, po czym między 15. a 25. godziną hodowli następował wysoki wzrost, rzędu 6000 U INF. Utrzymywał się on na stałym poziomie przez dwa dni. Bazując na rozkładzie Poissona wykazano, że poziom plateau wydzielania INF został osiągnięty w momencie, gdy wszystkie komórki w hodowli jednowarstwowej uległy zakażeniu. Wydajność replikacji wirusa jest więc czynnikiem determinującym produkcję INF, co oznacza, że jego poziom może być zależny od typu wirusa. Poziom plateau może być utrzymany, gdy wirus nie zawiera decydujących mutacji, głównie delecji mogących obniżyć produkcję INF. Działanie promieni UV było wykorzystane do dezaktywacji antygenów wirusa celem zaobserwowania, który z nich ma działanie stymulujące wytwarzanie INF. Wykazano obecność dwóch genów w genomie IV, które były odpowiedzialne za inhibicję aktywności pobudzająco-hamującej produkcję INF oraz osiągnięcie maksymalnej indukcji wydzielania INF. Jeden z czynników związany był z wielofunkcyjnym białkiem NS1, który może blokować indukcję sekrecji INF poprzez odrywanie dsRNA, albo poprzez indukcję kinazy proteinowej. Dodatkowo białko NS1 nie dopuszcza do procesu poliadenylacji kończącego obróbkę pre-mRNA, ponieważ zajmuje miejsce efektorowe czynnika trawienia i poliadenylacji (cleavage polyadenylation stimulating factor, CPSF). Drugim miejscem był zespół genów podjednostek polimeraz – PA, PB1, PB2. Wysunięto hipotezę o kompleksowej funkcji tych białek, ponieważ po dezaktywacji światłem UV możliwa była podwyższona wydajność produkcji INF w komórkach. Stwierdzono, że podjednostka PB1 podczas początkowej fazy transkrypcji wirusowego RNA wyłapuje mRNA gospodarza zakończone ogonem poliadenylowym na końcu 3', którego używa jako startera reakcji amplifikacji odcinków genomu wirusa. Każda dezaktywująca porcja energii UV może inaktywować funkcje podjednostek polimerazy, przez co blokuje proces wychwytu mRNA komórki i umożliwia m.in. ekspresję genu inf. Silnym argumentem potwierdzającym tę hipotezę jest wykrycie występowania cząstek macierzystego mRNA w cytoplazmie. Wykazano, że po infekcji IV czapeczka ochronna mRNA 5' łączy się z podjednostką PB2 kompleksu, rozpoczynając trawienie endonukleolityczne polimerazą wirusową. W efekcie powstają krótkie fragmenty, które podczas transkrypcji wirusowego RNA wykorzystywane są jako startery. Z tego powodu każde prekursorowe mRNA gospodarza pozbawione jest tego odcinka i tym samym jest wystawione na działanie nukleaz, co powoduje ich całkowitą degradację w komórce. Skutkiem tego może dojść do całkowitego spadku ekspresji komórkowych białek, w tym INF.

Supresyjne działanie IV wiąże się również z interleukiną 10 (IL-10), która negatywnie reguluje odpo-

wiedź wrodzoną oraz nabytą, a ponadto działa supresorowo na usuwanie patogenu z zakażonych komórek (5). Jest ona w stanie działać bezpośrednio na poziom odpowiedzi humoralnej i komórkowej poprzez uruchamianie autokrynnego hamowania limfocytów T w odpowiedzi na antygen. Zaadaptowane komórki CD4⁺ i CD8⁺ są pierwotnym źródłem IL-10 produkowanej podczas zakażeń dróg oddechowych IV. Uznaje się ją za mediatora pośredniczącego w utrzymywaniu się chronicznych zakażeń wywołanych przez IV, choć bezpośrednio IL-10 nie odgrywa żadnej znaczącej roli w przebiegu infekcji. Podczas chronicznego przebiegu choroby poziom IL-10 był zdecydowanie mniejszy niż podczas eksperymentalnego zakażenia wirusem wysoce zjadliwym, powodującym ostry przebieg, z gwałtownym ustąpieniem objawów choroby (27). Ostremu przebiegowi choroby towarzyszył wysoki poziom IL-10 w płucach. Z uwagi na decydującą rolę komórek CD8⁺ w usuwaniu wirusa, wysoka wydajność wydzielania IL-10 przez te komórki istotnie wzmacnia odpowiedź immunologiczną. Z badań wielu autorów wiadomo, że zablokowanie aktywności IL-10 podczas zakażenia jest bezpośrednią przyczyną nadprodukcji cytokin prozapalnych, takich jak: TNF, IL-6 lub MCP-1. Takie obserwacje poczyniono podczas zakażenia szczepem wysoce patogennym H5N1 lub wirusem „hiszpanki” o podtypie H1N1. Zakażenie obydwoma szczepami nie tylko bezpośrednio stymulowało wysoki poziom wydzielania cytokin prozapalnych, ale również było inhibitorem wydzielania IL-10. Towarzysząca stanowi zapalnemu podwyższona stymulacja nacieku monocytów jest kolejnym rezultatem stymulacji limfocytów T i zwiększonej sekrecji INF- γ . Zauważono dodatkowo, że zwiększenie dawki zakaźnej wirusa wywołuje w komórkach płucnych dysproporcję w produkcji IL-10 i INF- γ , polegającą na supresji limfocytów T do produkcji IL-10.

Innym mechanizmem, który wykorzystuje IV do zwiększenia efektywności namnażania się w komórkach nabłonka, jest supresja ekspresji białka PKR (protein kinase R). Antywirusowy czynnik PKR, indukowany przez INF, jest aktywowany ponadto przez podwójną nic RNA i przez kompleks reakcji stresu komórkowego. Zaktywowany czynnik PKR fosforyzuje eukariotyczny czynnik 2 α (eIF2 α), który jest odpowiedzialny za hamowanie inicjacji translacji, a co za tym idzie – syntezy białek komórkowych wraz z białkami wirionu (13). Wirus grypy wykorzystuje dwie drogi omijania tego systemu programowanej śmierci komórki. Jeden jest związany z wykorzystaniem białka wirusowego NS1 do wiązania się z dwuniciową strukturą RNA, co interferuje z aktywacją PKR (18). Druga droga przebiega w kierunku aktywacji latentnych białek związanych z chaperonami p58IPK, które z kolei uniemożliwiają formowanie struktur drugorzędowych białka PKR (17). Białko p58IPK jest jednym z czynników hamowania apoptozy komórki.

Białka ostrej fazy

Obecność białek ostrej fazy (acute phase proteins, APPs), takich jak: haptoglobina, białko wiążące LPS oraz białko C-reaktywne (C-reactive protein, CRP) została wykryta w przebiegu zakażenia dróg oddechowych już w latach 80. (20). Są one produkowane przez trzustkę, po stymulacji cytokinami. Haptoglobina jest odpowiedzialna za wychwyt wolnej hemoglobiny we krwi, białko wiążące LPS neutralizuje zakażenia bakteryjne, natomiast białko C-reaktywne ma udział w aktywacji makrofagów oraz w procesie opsonizacji. Głównymi induktorami APPs są IL-1, IL-6 oraz TNF- α (25). W następstwie eksperymentalnego zakażenia wolontariuszy IV poziom białka CRP wzrósł w 3. dniu po infekcji, a wśród ludzi zakażonych naturalnie był wyższy niż u rekonwalescentów (9). U prosiąt doświadczalnie zakażonych szczepem Swine/Belgium/1/98 H1N1 największą koncentrację APPs w BALF zanotowano po 30 godzinach w odniesieniu do białka wiążącego LPS i po 48 godzinach dla HG i CRP. Wynosiły one, odpowiednio: 2,6 $\mu\text{g/ml}$, 360 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$. W surowicy stwierdzono wyraźny wzrost wydzielania CRP (20 $\mu\text{g/ml}$) oraz HG (2 mg/ml) w 48. godzinie po zakażeniu. Poziom białka wiążącego LPS był stały, zbliżony do 10 $\mu\text{g/ml}$. Poziom białek APPs u zwierząt z grupy kontrolnej był niewykrywalny lub dziesięcio-, a nawet stukrotnie niższy, odpowiednio, dla CRP, HG i białka wiążącego LPS.

Podsumowując, przedstawiony przegląd piśmiennictwa ukazuje złożoność odpowiedzi immunologicznej w przebiegu zakażenia wirusem grypy, w który zaangażowane są głównie cytokiny prozapalne i białka ostrej fazy. Bez wątplenia na przebieg choroby mają także wpływ właściwości biologiczne wirusa, a szczególnie zdolność do supresji wydzielania IFN, która w połączeniu z aktywnością IL-10 skutkuje osłabieniem odpowiedzi komórkowej ze strony zainfekowanego organizmu. Z uwagi na potencjalną możliwość terapeutycznego wykorzystania antagonistów cytokin poznanie procesów immunologicznych zachodzących w przebiegu zakażenia IV może mieć duże znaczenie praktyczne.

Piśmiennictwo

1. Barbé F., Saelens X., Braeckmans D., Lefèvre F., Reeth K. V.: Role of IFN- α during the acute stage of a swine influenza virus infection. *Res. Vet. Sci.* 2010, 88, 172-178.
2. Bussfeld D., Kaufmann A., Meyer R. G., Gamsa D., Sprenger H.: Differential mononuclear leukocyte attracting chemokine production after stimulation with active and inactivated influenza A virus. *Cell Immunol.* 1998, 186, 1-7.
3. Conn C. A., McClellan J. L., Maassab H. F., Smitka C. W., Majde J. A., Kluger M. J.: Cytokines and the acute phase response to influenza virus in mice. *Am. J. Physiol.* 1995, 268, 78-84.
4. Denton A. E., Doherty P. C., Turner S. J.: IL-18, but not IL-12, is required for optimal cytokine production by influenza virus-specific CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 2007, 37, 368-375.
5. Ejrnaes M., von Herrath M. G., Christen U.: Cure of chronic viral infection and virus-induced type 1 diabetes by neutralizing antibodies. *Clin. Dev. Immunol.* 2006, 13, 67-77.
6. Erard F., Wild M., Garcia-Sanz J., Le Gros G.: Switch of CD8 T cells to non-cytolytic CD8-CD4- cells that make TH2 cytokines and help B cells. *Science* 1993, 260, 1802-1805.
7. Erb K., Kirman J., Delahunt B., LeGros G.: Infection of mice with *Mycobacterium bovis* BCG induces both Th1 and Th2 immune responses in the absence of interferon- γ signalling. *Eur. Cyto. Net.* 1999, 10147-10154.
8. Erb K. J., Hou S., Hyland L., Kirman J., Moll H., Le Gros G.: Constitutive expression of interleukin 4 in vivo does not lead to the development of T helper 2 type CD8+ T cells secreting interleukin 4 or interleukin 5. *Immunol. Lett.* 1999, 68, 383-390.
9. Falsey A. R., Walsh E. E., Francis C. W., Looney R. J., Kolassa J. E., Hall W. J., Abraham G. N.: Response of C-reactive protein and serum amyloid A to influenza A infection in older adults. *J. Infect. Dis.* 2001, 183, 995-999.
10. Fritz R. S., Hayden F. G., Calfee D. P., Cass L. M., Peng A. W., Alvord W. G., Strober W., Straus S. E.: Nasal cytokine and chemokine responses in experimental influenza A virus infection: results of a placebo-controlled trial of intravenous zanamivir treatment. *J. Infect. Dis.* 1999, 180, 586-593.
11. Hayden F. G., Fritz R., Lobo M. C., Alvord W., Strober W., Straus S. E.: Local and systemic cytokine responses during experimental human influenza A virus infection. Relation to symptom formation and host defense. *J. Clin. Invest.* 1998, 101, 643-649.
12. Horisberger M. A.: Virus-specific effects of recombinant porcine interferon- γ and the induction of Mx proteins in pig cells. *J. Interferon Res.* 1992, 12, 439-444.
13. Julkunen I., Sarenva T., Pirhonen J., Ronni T., Melén K., Matikainen S.: Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001, 12, 171-180.
14. Jung K., Chae C.: Expression of Mx protein and interferon- α in pigs experimentally infected with swine influenza virus. *Vet. Pathol.* 2006, 43, 161-167.
15. Kaufmann A., Salentin R., Meyer R. G., Bussfeld D., Pauligk C., Fesq H., Hofmann P., Nain M., Gamsa D., Sprenger H.: Defense against influenza A virus infection: essential role of the chemokine system. *Immunobiology.* 2001, 204, 603-613.
16. Larsen D. L., Karasin A., Zuckermann F., Olsen C. W.: Systemic and mucosal immune responses to H1N1 influenza virus infection in pigs. *Vet. Microbiol.* 2000, 74, 117-131.
17. Lee T. G., Tang N., Thompson S., Miller J., Katze M. G.: The 58,000-dalton cellular inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is a member of the tetratricopeptide repeat family of proteins. *Mol. Cell Biol.* 1994, 14, 2331-2342.
18. Lu Y., Wambach M., Katze M. G., Krug R. M.: Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology* 1995, 214, 222-228.
19. Marcus P. I., Rojek J. M., Sekellick M. J.: Interferon induction and/or production and its suppression by influenza A viruses. *J. Virol.* 2005, 79, 2880-2890.
20. Moshage H. J., Roelofs H. M., van Pelt J. F., Hazenberg B. P., van Leeuwen M. A., Limburg P. C., Aarden L. A., Yap S. H.: The effect of interleukin-1, interleukin-6 and its interrelationship on the synthesis of serum amyloid A and C-reactive protein in primary cultures of adult human hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, 155, 112-117.
21. Nakajima E., Morozumi T., Tsukamoto K., Watanabe T., Plastow G., Mitsuhashi T.: A naturally occurring variant of porcine Mx1 associated with increased susceptibility to influenza virus in vitro. *Biochem. Genet.* 2007, 45, 11-24.
22. Nelson S., Bagby G. J., Bainton B. G., Wilson L. A., Thompson J. J., Sumner W. R.: Compartmentalization of intraalveolar and systemic lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and the pulmonary inflammatory response. *J. Infect. Dis.* 1989, 159, 189-194.
23. Oh S., McCaffery J. M., Eichelberger M. C.: Dose-dependent changes in influenza virus-infected dendritic cells result in increased allogeneic T-cell proliferation at low, but not high, doses of virus. *J. Virol.* 2000, 74, 5460-5469.
24. Olsen C. W., Brown I. H., Easterday B., Van Reeth K.: Swine influenza, [w:] Straw B. E., Zimmerman J. J., D'Allaire S., Taylor D. J.: *Diseases of Swine.* Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA 2006, 469-482.
25. Petersen H. H., Nielsen J. P., Heegaard P. M.: Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.* 35, 163-187.
26. Seder R. A., Paul W. E., Davis M. M., Fazekas de St Groth B.: The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J. Exp. Med.* 1992, 176, 1091-1098.
27. Sun J., Madan R., Karp C. L., Braciale T. J.: Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat. Med.* 2009, 15, 277-284.
28. Thomas A. V., Palm M., Broers A. D., Zezaifoun H., Desmecht D. J.: Genomic structure, promoter analysis, and expression of the porcine (*Sus scrofa*) Mx1 gene. *Immunogenetics* 2006, 58, 383-389.
29. Van Reeth K.: Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Vet. Microbiol.* 2000, 74, 109-116.
30. Van Reeth K., Nauwynck H.: Proinflammatory cytokines and viral respiratory disease in pigs. *Vet. Res.* 2000, 31, 187-213.
31. Wohlleben G., Erb K. J.: The absence of IFN- γ leads to increased Th2 responses after influenza A virus infection characterized by an increase in CD4+ but not CD8+ T cells producing IL-4 or IL-5 in the lung. *Immunol. Lett.* 2004, 95, 161-166.

Adres autora: dr Andrzej Kowalczyk, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: andrzej.kowalczyk@piwet.pulawy.pl