ЦИТОЛОГИЯ / CELL AND TISSUE BIOLOGY, 2026, том 68, № 2, с. 117—129

УДК 578.23
DOI: 10.7868/S3034606126020021

ЭНДОЦИТОЗНЫЕ ПУТИ В ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ ВИРУСА ГРИППА А

А. Н. Горшков[1, *], М. О. Щепина[2], Д. Е. Бобков[1, 3], Е. А. Варюшина[1]

[1] Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, 197376, Российская Федерация

[2] Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334, Российская Федерация

[3] Научный центр генетики и наук о жизни Научно-технологического университета «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, 354340, Российская Федерация

** E-mail: angorsh@yahoo.com*

Аннотация. **Обоснование и цель работы.** Известна важная роль клатрин-зависимого эндоцитоза в интернализации вируса гриппа А (ВГА), при этом были высказаны идеи о возможном участии других эндоцитозных путей. В этой связи целью нашего исследования являлся анализ вклада различных путей эндоцитоза в инфицирование клеток MDCK ВГА. **Материал и методика.** Интернализацию ВГА клетками MDCK исследовали через 20 мин после их инфицирования вирусом штамма A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1). Трансмиссионную электронную микроскопию (ТЭМ) проводили с использованием метода негативного контрастирования и на ультратонких срезах инфицированных клеток. Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) исследовали организацию актинового цитоскелета инфицированных клеток и клатрин-зависимый эндоцитоз вируса в них. **Результаты.** По данным ТЭМ, интернализация ВГА в клетки MDCK осуществляется как через окаймленные ямки, так и посредством макропиноцитоза. По данным КЛСМ, часть интернализуемых клетками вирионов ассоциирована с кластерами клатрина, меченного флуоресцентным белком mKate2 (окаймленными ямками). Попиксельное сравнение интенсивности флуоресценции в двух каналах (зеленого — меченый моноклональным антителом гемагглютинин, и красного — mKate2-клатрин) обнаружило умеренную положительную корреляцию между двумя сигналами (r-Spearman's = 0.48), то есть часть интернализуемых вирусов не колокализована с окаймленными ямками и проникает через альтернативные эндоцитозные пути. КЛСМ-анализ организации актинового цитоскелета клеток MDCK в условиях вирусной инфекции обнаружил, что на апикальной клеточной поверхности F-актин представлен небольшими агрегатами, соответствующими мембранным раффлам. Частичная ассоциация вирионов с этими агрегатами свидетельствует об их интернализации с участием раффлов (макропиноцитоз). **Заключение.** Вирус A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) интернализуется через клатрин-зависимый эндоцитоз и макропиноцитоз. Вовлеченность макропиноцитоза является дополнительным фактором инфективности различных штаммов вируса гриппа А.

Ключевые слова: вирус гриппа А, клатрин-зависимый эндоцитоз, макропиноцитоз, мембранные раффлы, трансмиссионная электронная микроскопия, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Принятые сокращения: ВГА — вирус гриппа А; ГА — гемагглютинин; КЛСМ — конфокальная лазерная сканирующая микроскопия; НА — нейраминидаза; РГА — реакция гемагглютинации; РКЭ — развивающиеся куриные эмбрионы; ТИД — тканевая инфекционная доза; ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия; MOI — множественность инфекции (multiplicity of infection); ROI — region of interest.

Благодарность. Авторы благодарят Е. Д. Автономова (Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России) за помощь в подготовке рисунков.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-24-00306; https://rscf.ru/project/24-24-00306/).

Соблюдение этических стандартов. В экспериментах животные и люди не участвовали.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Ссылка для цитирования: Горшков А. Н., Щепина М. О., Бобков Д. Е., Варюшина Е. А. Эндоцитозные пути в интернализации вируса гриппа А. *Цитология / Cell and Tissue Biology*. 2026. Т. 68. № 2. С. 117—129. https://doi.org/10.7868/S3034606126020021

Поступила в редакцию 30.11.2025
После доработки 09.12.2025
Принята к публикации 10.12.2025

© Горшков А. Н., Щепина М. О., Бобков Д. Е., Варюшина Е. А., 2026

ЦИТОЛОГИЯ / CELL AND TISSUE BIOLOGY, 2026, том 68, № 2, с. 117—129

DOI: 10.7868/S3034606126020021

Endocytic Pathways in the Internalization of the Influenza A Virus

A. N. Gorshkov[a, *], M. O. Shchepina[b], D. E. Bobkov[a, c], E. A. Varyushina[a]

[a] *Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of Russia 197376, St. Petersburg, Russian Federation*

[b] *Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences 119334, Moscow, Russian Federation*

[c] *Research Center for Genetics and Life Sciences of the Sirius University of Science and Technology 354340, Sirius Federal Territory, Krasnodar region, Russian Federation*

** E-mail: angorsh@yahoo.com*

Abstract. **Objective:** The important role of clathrin-mediated endocytosis in the internalization of the influenza A virus (IAV) is known, and ideas have been suggested about the possible involvement of other endocytic pathways. In this regard, the aim of our study was to analyze the contribution of various endocytosis pathways to the infection of MDCK cells with the influenza A virus. **Material and methods:** Internalization of the influenza A virus by MDCK cells was studied in 20 min after their infection with the A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) strain virus. Transmission electron microscopy (TEM) was performed using the negative contrast method and on ultrathin sections of infected cells. Organization of the actin cytoskeleton of infected cells and clathrin-dependent endocytosis of the virus in them were studied by confocal laser scanning microscopy (CLSM). **Results:** According to TEM, the internalization of the IAV into MDCK cells is carried out both through clathrin-coated pits and through macropinocytosis. According to CLSM, part of the virions internalized by cells are associated with mKate2-clathrin clusters (clathrin-coated pits). A pixel-by-pixel comparison of the fluorescence intensity in two channels (green — monoclonal antibody-labeled hemagglutinin, and red — mKate2-clathrin) revealed a moderate positive correlation between the two signals (r-Spearman's = 0.48), that is, part of the internalized viruses are not colocalized with clathrin-coated pits and penetrate through alternative endocytic pathways. CLSM-analysis of the actin cytoskeleton organization of MDCK cells after of viral infection showed that F-actin on the apical cell surface is represented by aggregates corresponding to membrane ruffles. The partial association of virions with these aggregates suggests their internalization through a process involving raffles (macropinocytosis). **Conclusions:** A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) virus is internalized via both clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis. The involvement of macropinocytosis is an additional factor of the infectivity of various strains of the influenza A virus.

Keywords: influenza A virus, clathrin-dependent endocytosis, macropinocytosis, membrane raffles, transmission electron microscopy, confocal laser scanning microscopy

Acknowledgments. The authors thank E. D. Avtonomov (Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation) for assistance in preparing the figures.

Funding. This work was supported by the Russian Scientific Foundation (project ID: no. 24-24-00306; https://rscf.ru/project/24-24-00306/).

Ethics approval and consent to participate. This work does not contain any studies involving human and animal subjects.

Conflict of interests. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

For citation: Gorshkov A. N., Shchepina M. O., Bobkov D. E., Varyushina E. A. Endocytic pathways in the internalization of the influenza a virus. *Tsitologiya / Cell and Tissue Biology*. 2026. V. 68. No. 2. P. 117—129. https://doi.org/10.7868/S3034606126020021

Received November 30, 2025
December 9, 2025
Accepted December 10, 2025

© Gorshkov A. N., Shchepina M. O., Bobkov D. E., Varyushina E. A., 2026

Вирус гриппа А (ВГА) является широко распространенным возбудителем, различные подтипы ВГА поражают людей, диких и домашних птиц и млекопитающих. У людей подтипы ВГА H1N1 и H3N2 вызывают как единичные случаи заболевания, так и массовые сезонные эпидемии. Циркулирующие в популяциях человека вирусы гриппа А ежегодно приводят к серьезным медицинским и социально-экономическим последствиям (Taubenberger, Morens, 2010). По имеющимся оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), во всем мире эти эпидемии вызывают от трех до пяти миллионов случаев тяжелых заболеваний и от 290 000 до 650 000 смертей в год (WHO, 2025). Кроме того, постоянно существует опасность зоонозной передачи других подтипов вируса гриппа А, прежде всего высокопатогенного птичьего гриппа H5N1 с очень высокой наблюдаемой летальностью инфицированных пациентов (51.5%) (Webby, Uyeki, 2024). В настоящее время быстрое глобальное распространение вируса H5N1 клада 2.3.4.4b среди многих видов птиц и млекопитающих, в том числе среди домашних животных, ежедневно контактирующих с человеком, вызывает наибольшую озабоченность ВОЗ из-за высокого риска его пандемии (Perez-Acle et al., 2024; Peacock, et al., 2025).

Вирус гриппа А относится к семейству Orthomyxoviridae и характеризуется сегментированным одноцепочечным РНК-геномом негативной направленности (Krammer et al., 2018). Восемь сегментов генома ВГА кодируют 10—18 белков в зависимости от штамма вируса. Среди этих вирусных белков поверхностные гликопротеины гемагглютинин (ГА) (кодируется сегментом 4) и нейраминидаза (НА) (кодируется сегментом 6) играют ключевую роль в адсорбции вируса (Shtyrya et al., 2009; Cohen et al., 2013; Sakai et al., 2017), а также представляют собой основные мишени для нейтрализующих антител (Wu, Wilson, 2020; Chen et al., 2022; Momont, 2023).

Существует два медицинских подхода, специфически направленных на снижение угрозы ВГА: вакцинопрофилактика и химиотерапия гриппа. К сожалению, высокая изменчивость поверхностных вирусных белков ГА и НА существенно снижает эффективность как вакцинопрофилактики, так и этиотропной терапии данного вируса. ВГА обладает исключительной эволюционной пластичностью, связанной с явлениями антигенного дрейфа и, что особенно опасно, антигенного сдвига, которые позволяют вирусу ускользать от защитного действия иммунной системы, а также инфицировать новые виды хозяев (Shi et al., 2014; Lazniewski et al., 2018; Thompson, Paulson, 2021; Guo et al., 2024). Существующие в настоящее время на рынке этиотропные препараты против ВГА (осельтамивир, занамивир, перамивир, ланинамивир) относятся к группе ингибиторов вирусной НА; в ряде недавних публикаций отмечено появление штаммов ВГА, устойчивых к ним (Lackenby et al., 2008; Thorlund et al., 2011; Abed and Boivin, 2017; Wang et al., 2024; Xu et al., 2024).

На всех этапах цикла репликации ВГА тесно взаимодействует с различными эффекторными и сигнальными системами клетки-хозяина, используя и реорганизуя многочисленные клеточные функции для беспрепятственного прохождения жизненного цикла (König et al., 2010; Watanabe et al., 2010). Для интернализации вируса через барьер плазматической мембраны клетки требуется сложная, скоординированная в пространстве и времени, комбинация вирусных и клеточных белковых механизмов (Sempere, Stertz, 2021; Sulpiana, Atik, 2024). Адсорбция вируса, которая определяется взаимодействием вирусного ГА с остатками N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты в составе сиалогликанов на поверхности клеток-мишеней, является отправной точкой его репликативного цикла (Karakus et al., 2020; Kamiki et al., 2022; Maes et al., 2024). Инициация эндоцитоза адсорбированного вириона требует ряда внутриклеточных сигнальных событий, главным образом каскадов фосфорилирования, для передачи сигнала от рецепторных белков к эффекторным системам эндоцитоза (Kaksonen, Roux, 2018).

Интернализация ВГА была давно и прочно связана с клатрин-опосредованным эндоцитозом по результатам электронной и флуоресцентной микроскопии (Patterson et al., 1979; Matlin et al., 1981; Zhang, Whittaker, 2014). Однако в последние годы появились идеи об участии альтернативных эндоцитозных путей в интернализации ВГА с вовлечённостью множественных путей сигналинга (рецепторных тирозинкиназ, ряда малых ГТФаз, ИТФ-сигнального пути). В частности, были опубликованы данные о том, что клетки, экспрессирующие доминантно-негативную форму белка Eps15 (важнейший компонент адапторного комплекса в составе окаймлённых ямок) и, соответственно, не способные к клатрин-зависимому эндоцитозу, тем не менее успешно инфицируются вирусом гриппа и сопоставимы в этом отношении с интактными клетками (Sieczkarski, Whittaker, 2002). Аналогичным образом клетки, экспрессирующие доминантно-негативную форму динамина 1, также не способные к клатрин-зависимому эндоцитозу, эффективно инфицируются ВГА с филаментозной морфологией вирионов (Sieczkarski, Whittaker, 2005). По данным прижизненной визуализации, при инфицировании клеток ВГА всегда существует субпопуляция интернализуемых вирионов, не колокализованная с EYFP-клатрином (Rust et al., 2004). Эти результаты вносят дополнительную сложность в картину эндоцитоза данного вируса.

Исследования эндоцитоза ВГА требуют синтеза методов классической вирусологии, клеточной, молекулярной и структурной биологии. Среди них особое значение имеют прямые микроскопические наблюдения адсорбции, эндоцитоза и их отдельных компонентов. По существу, трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) остается единственным методом детальной визуализации вирусных частиц и клеточных белков с наноразмерным разрешением, хотя и не позволяет исследовать живые объекты (Roingeard et al., 2019). Изучение динамики прикрепления вируса и его интернализации неизбежно требует использования многоцветной конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с флуоресцентной

маркировкой вирусов и оверэкспрессией флуоресцентных fusion-белков, участвующих в эндоцитозных и сигнальных процессах (Lakadamyali, 2004; Xie et al., 2023).

Ранние стадии ВГА-инфекции являются привлекательной мишенью для новых стратегий химиотерапевтического вмешательства (Yang, Liu, 2022; Zhu et al., 2023), при этом ключевые клеточные факторы интересны для разработки противовирусных препаратов нового поколения в качестве альтернативы быстро мутирующим вирусным белкам-мишеням (Edinger et al., 2014; Maes et al., 2024).

В этой связи исследование роли путей эндоцитоза в жизненном цикле ВГА обладает высокой актуальностью как в рамках фундаментальной вирусологии, так и для разработки новых подходов к терапии гриппа. Целью нашего исследования являлся анализ вклада различных путей эндоцитоза в инфицирование клеток MDCK вирусом гриппа А.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки и вирусы. Работа выполнена на клетках пермиссивной к ВГА линии эпителиального происхождения MDCK (Madin-Darby canine kidney) London line (FR-58; International reagent resource, США). Клетки культивировали в питательной среде α-МЕМ («Биолот», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Россия) и 1% антибиотика-антимикотика (Gibco, США). После достижения 80% конфлюэнтности клетки обрабатывали раствором трипсин/ЭДТА (Invitrogen, США) в течение 10 мин их рассевали в соотношении 1:5.

В работе использовали штамм ВГА A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) из коллекции ФГБУ НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева (Санкт-Петербург, Россия). Культивирование вируса проводили в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) (АО «Птицефабрика Синявинская»). При культивировании в РКЭ, в аллантоисную полость 10-суточных эмбрионов вносили по 200 мкл вирусного инокулята и культивировали при 34 °С в течение 48 ч, после чего собирали вируссодержащую аллантоисную жидкость.

Гемагглютинирующую активность и инфекционные титры вируса определяли согласно стандартным методикам, рекомендованными ВОЗ (WHO, 2011). Гемагглютинирующую активность вируса оценивали в реакции гемагглютинации (РГА) с использованием 0.5%-ной суспензии куриных эритроцитов. Инфекционные титры вируса определяли титрованием в клеточной культуре MDCK методом предельных 10-кратных разведений. Учет результатов титрования проводили с помощью метода РГА. Титры вирусов в культуре MDCK рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в 50%-ных инфекционных дозах (lgТИД50/мл) (Lei et al., 2021). Измерение инфекционного титра было выполнено в двух независимых повторах. Инфекционная активность штамма A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), использованного в исследованиях, составила 8.75 lgТИД 50/мл.

Для исследований эндоцитоза методами ТЭМ и КЛСМ клетки инфицировали вирусной суспензией в высокой дозе заражения (MOI = 50) и культивировали 20 мин при 37 °С в CO_2-инкубаторе. Контрольные клетки культивировали в тех же условиях без заражения вирусом.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). *Метод негативного контрастирования.* Вирусную суспензию наносили на медные сетки для электронной микроскопии 300 mesh (Sigma-Aldrich, США), покрытые коллодиевой пленкой-подложкой. После адсорбции частиц из суспензии к поддерживающей плёнке в течение 1—2 мин сеточки дважды промывали дистиллированной водой. Далее выполняли негативное контрастирование образца в течение 1—2 мин в 2%-ном растворе натриевой соли фосфорно-вольфрамовой кислоты (Sigma-Aldrich, США), pH 7.2, после чего сетки высушивали и исследовали в просвечивающем электронном микроскопе JEM 1011 (JEOL, Япония). Диапазон инструментальных увеличений составлял 50 000—300 000×. Электронные микрофотографии были получены с использованием высокоразрешающей цифровой камеры Morada (Olympus, Япония).

Метод ультратонких срезов. Монослои контрольных и инфицированных вирусом клеток MDCK в чашках Петри префиксировали в течение 30 мин 2.5%-ным раствором глютарового альдегида (Sigma-Aldrich, США) на PBS и отмывали им же 2 раза. Далее префиксированные клеточные монослои аккуратно снимали с поверхности чашек Петри, клетки переносили в микропробирки Эппендорф и осаждали центрифугированием. Затем клетки постфиксировали в течение 1 ч 1%-ным раствором тетроксида осмия (SPI, США) на PBS, дважды отмывали PBS и дегидратировали в серии растворов этанола возрастающей концентрации (30—96%). Затем образцы пропитывали ацетоном и заключали в эпоксидную смолу Эпон. Полимеризация эпоксидной смолы проходила в течение 24 ч в термостате при температуре 56 °С. На ультрамикротоме Leica UC7 получали ультратонкие срезы исследуемых образцов клеток толщиной 50—70 нм. Срезы собирали на медные сетки для электронной микроскопии и контрастировали в спиртовом растворе уранилацетата и водном растворе цитрата свинца. Для электронно-микроскопического исследования использовали микроскоп JEOL JEM 1011(JEOL, Япония). Цифровые электронные микрофотографии получены с использованием камеры Morada (Olympus, Япония).

Трансфекция клеток плазмидой mKate2-клатрин. Для решения задачи визуализации окаймленных ямок в клетках MDCK использовали коммерческую плазмиду, кодирующую легкую цепь клатрина, слитую с флуоресцентным белком mKate2, под эукариотическим цитомегаловирусным промотором («Евроген», Россия). Для трансфицирования использовали суточную культуру клеток MDCK, выращенных на круглых покровных стеклах диаметром 12 мм, размещенных в лунках 24-луночного планшета.

Трансфекция была выполнена с помощью трансфекционного реагента TurboFect (Thermo Fisher Scientific, США). Для трансфекции 1 мкг плазмидной ДНК разводили в 100 мкл бессывороточной среды и смешивали с 2 мкл реагента TurboFect. После 15-минутной инкубации по 100 мкл раствора вносили в лунки планшета, содержащие покровные стекла с клетками. Дальнейшее культивирование трансфицированных клеток происходило в течение 24—48 ч при 37 °C в CO_2-инкубаторе.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСК). Трансфицированные плазмидой mKate2-клатрин клетки MDCK были инфицированы ВГА в дозе 50 MOI. Через 20 мин после внесения вируса клетки фиксировали 2%-ным параформальдегидом (Sigma-Aldrich, США) на PBS в течение 10 мин и отмывали 2 раза PBS. Далее клетки пермеабилизовали в 0.1%-ном растворе Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США) на PBS в течение 5 мин и инкубировали в 1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США) 10 мин. Для специфической иммунодетекции интернализуемых вирионов препараты инфицированных клеток инкубировали в течение 1 ч с первичными моноклональными антителами 10A12 (разведение 1:100) из коллекции моноклональных антител НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия). Далее после трехкратной отмывки в PBS следовала инкубация в течение 1 ч со вторичными козьими антителами против иммуноглобулинов мыши, коньюгированными с FITC (Sigma-Aldrich, США), и 30-минутная окраска ядер реактивом DAPI (Thermo Fisher, США). После отмывки в PBS препараты заключали в препятствующий фотообесцвечиванию агент Fluoroshield (Sigma-Aldrich, США).

Для исследования организации F-актина инфицированные вирусом клетки MDCK фиксировали, отмывали и пермеабилизировали, как описано ранее, инкубировали в течение 1 ч с первичными моноклональными антителами 10A12, отмывали в PBS3 раза, инкубировали с коньюгированными с FITC вторичными козьими антителами к иммуноглобулинам мыши и родамин-фаллоидином в течение 1 ч, отмывали, окрашивали DAPI и заключали в Fluoroshield (Sigma-Aldrich, США).

Для получения изображений в конфокальном микроскопе TCS SP8 (Leica, Германия) флуоресцентные сигналы получали возбуждением на следующих спектральных лазерных линиях: 405 нм (DAPI), 488 нм (FITC), 561 нм (mKate2, родамин-фаллоидин). С целью исключения перекрестной флуоресценции меток между каналами, использовали режим последовательного сканирования.

Оценка колокализации mKate2-клатрина и интернализуемого вируса. Для оценки колокализации mKate2-клатрина и интернализуемого вируса был использован программный продукт ImageJ (NIH, США). Были проанализированы клетки на пяти стеклах. На полученных в конфокальном микроскопе микрофотографиях инфицированных клеток MDCK, экспрессирующих mKate2-клатрин, было выбрано 20 клеток, одновременно инфицированных вирусом (непрямое иммуномечение вирусного ГА, сигнал FITC) и экспрессирующих mKate2-клатрин (сигнал mKate2). Затем в выбранных таким образом областях интереса (ROI) с помощью программы ImageJ попиксельно сравнивали интенсивности флуоресценции в двух данных каналах. На основе полученного набора значений интенсивности флуоресценции в двух каналах определяли коэффициент корреляции Спирмена в качестве численной оценки уровня колокализации двух меток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ультраструктура вирусных частиц. На рис. 1 приведены электронные микрофотографии вирионов гриппа использованного в нашей работе штамма A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1). Характерный размер вириона — 120—180 нм. В суспензии прослеживается полиморфизм вирусной популяции, содержащей как округлые вирусные частицы (рис. 1*а*), так и вирионы близкой к овальной или с-образной формы (рис. 1*б—г*).

Известно, что в эпидемически актуальных свежевыделенных клинических изолятах вируса гриппа часто встречаются вирионы филаментозной морфологии

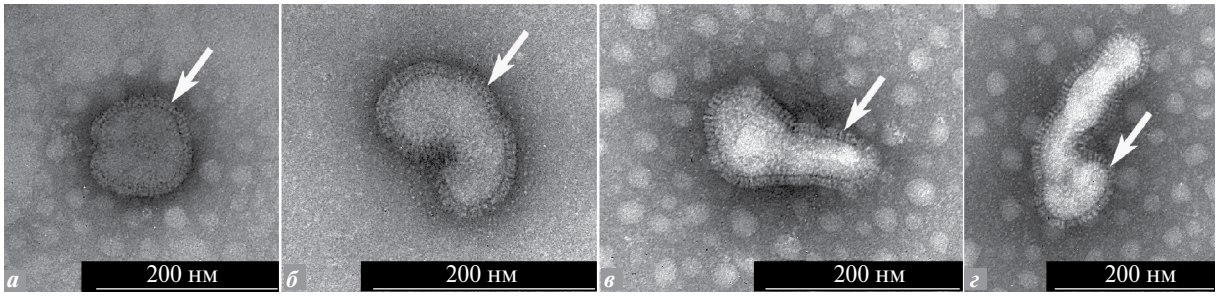


Рис. 1. Ультраструктура вирионов гриппа штамма A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1). Прослеживается полиморфизм вирусной популяции. *а* — Вирион округлой формы. *б, в, г* — Вирионы близкой к овальной или с-образной формы. Стрелки — опушение из поверхностных гликопротеинов, гемагглютинина и нейраминидазы. Целостность и упорядоченность опушения не нарушены

длиной до 1—2 мкм; филаментозная морфология вирусных частиц в целом коррелирует с их высокой инфективностью и эпидемической опасностью (Neumann et al., 2009; Badham et al., 2016; Dadonaite et al., 2016; Li et al., 2021). Штамм A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) является модельным лабораторным штаммом с длительной историей серийного пассирования на развивающихся куриных эмбрионах. Вирионы филаментозной формы в нашем исследовании не выявлены.

Вирионы окружены липидной мембраной, с которой ассоциированы поверхностные вирусные гликопротеины — гемагглютинин (ГА) и нейраминидаза (НА), формирующие упорядоченное опушение высотой около 13 нм на поверхности вирусных частиц. Целостность опушения и высокий уровень сохранности характерной клиновидной формы шипов гемагглютинина (отсутствие признаков денатурации белка) подтверждают пригодность использованной вирусной суспензии для всех последующих экспериментов, связанных с адсорбцией и эндоцитозом вирусных частиц клетками-мишенями.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) интернализации ВГА клетками MDCK. Нами проведено исследование клеток, оверэкспрессирующих легкую цепь клатрина, слитую с флуоресцентным белком mKate2, инфицированных ВГА A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) в течение 20 мин в дозе заражения MOI = 50. На препаратах наблюдали явную локализацию оверэкспрессированного белка mKate2-клатрина в составе окаймленных ямок (рис. 2), что свидетельствует об адекватности созданной нами клеточной модели для исследований клатрин-зависимого эндоцитоза. Мы не детектировали эндогенный клатрин, но, согласно опубликованным результатам со схожим методическим подходом, оверэкспрессированный клатрин включается в 97 % окаймленных ямок, то есть флуоресцируют практически все окаймленные ямки в клетке (Rust et al., 2004).

На микрофотографиях (рис. 2) видно, что далеко не все клетки в монослое были трансфицированы и экспрессировали mKate2-клатрин. Поэтому в исследование были включены только клетки, оверэкспрессирующие данный белок и одновременно инфицированные вирусом

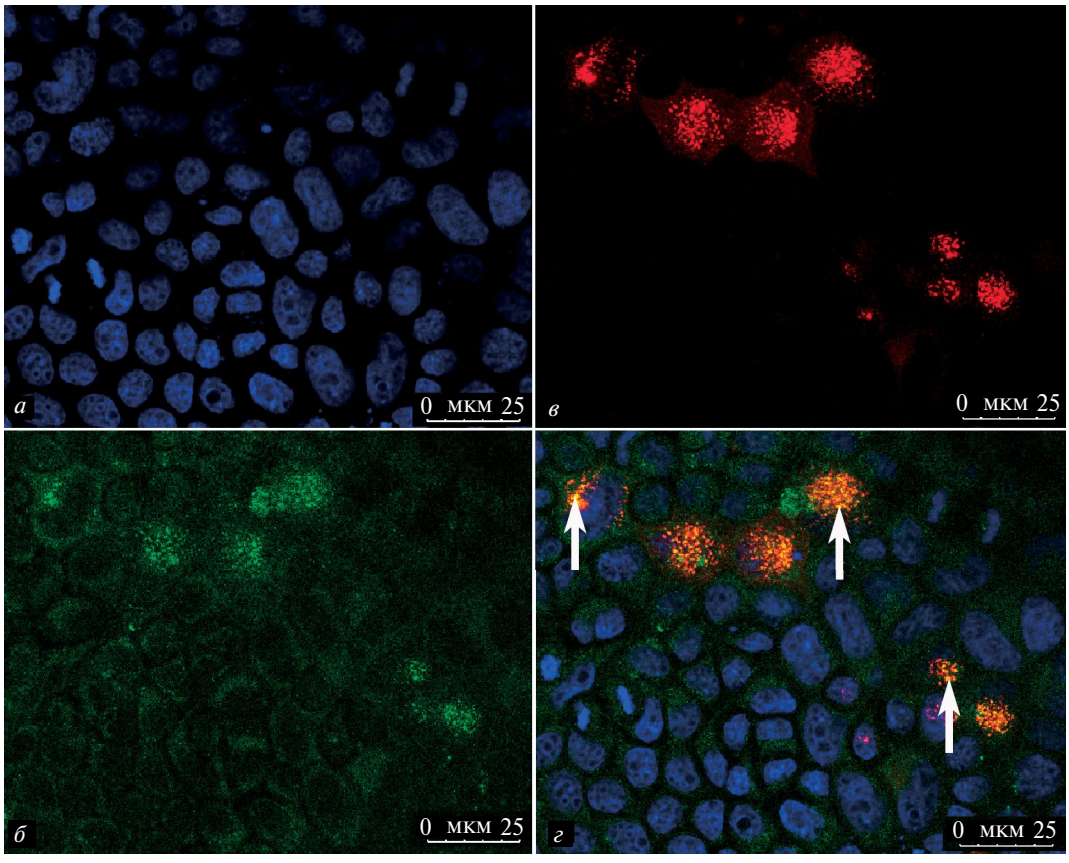


Рис. 2. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия клеток MDCK, оверэкспрессирующих mKate2-клатрин, инфицированных вирусом A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) в дозе заражения 50 MOI в течение 20 мин. *а* — Окраска ядер DAPI. *б*, *в* — Флуоресценция соответственно гемагглютинина (непрямое иммуномечение) и mKate2-клатрина. *г* — Наложение каналов. Стрелки — колокализация интернализуемых вирусных частиц с mKate2-клатрином

(непрямое иммуномечение гемагглютинина моноклональным антителом 10A12). По полученным нами данным конфокальной микроскопии, в таких клетках обнаруживается значительная, но неполная колокализация интернализуемого вируса и mKate2-клатрина в окаймленных ямках (рис. 2*г*).

Используя программу ImageJ, мы выполнили статистический анализ колокализации mKate2 — клатрина и меченого интернализуемого вируса в клетках MDCK. С этой целью на микрофотографиях препаратов в качестве ROI были выбраны только клетки с названными выше признаками ($n = 20$) и проведено попиксельное сравнение интенсивности флуоресценции в двух каналах (меченый ВГА, зеленый канал, и mKate2-клатрин, красный канал). Коэффициент корреляции Спирмена (*r*-Spearman's) между интенсивностью свечения пикселей в красном и зеленом каналах при этом оказался равным 0.48 (умеренная положительная корреляция). Таким образом, из полученных нами данных конфокальной микроскопии следует вывод, что в инфицированных клетках MDCK часть вирионов интернализуется через клатриновые окаймленные ямки, в то время как другая часть использует альтернативные эндоцитозные пути.

Известно, что макропиноцитоз является распространённым эндоцитозным механизмом, не связанным с «классическим» клатрин-зависимым эндоцитозом. Подобно фагоцитозу, макропиноцитоз обеспечивается процессами быстрой полимеризации/деполимеризации субмембранного актина с формированием мембранных протрузий (ламеллоподий или мембранных раффлов). Однако макропиноцитоз не управляется напрямую рецепцией эндоцитируемых веществ и представляет собой, по-видимому, неспецифическое поглощение достаточно значительных по меркам клетки количеств внеклеточной жидкости; размер макропиносом превышает 200 нм (Bloomfield, Kay, 2016). Актиновый цитоскелет является основным драйвером макропиноцитоза, данный процесс контролируется рядом регуляторов субмембранного актина, в частности малой ГТФазой Ras и связанной с ней системой фосфатидилинозитол 3,4,5 трифосфат (PIP3)-сигналинга (Porat-Shliom et al., 2008; Hoeller et al., 2013) и малой ГТФазой Rac.

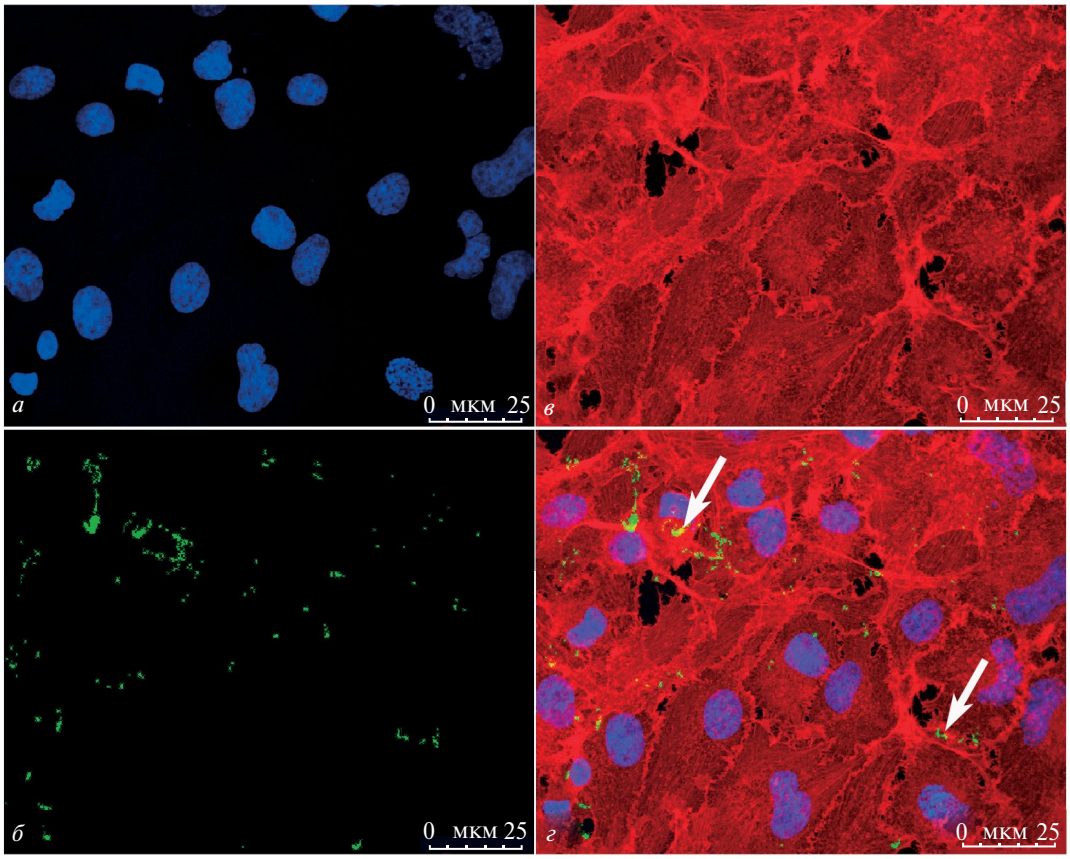


Рис. 3. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия клеток MDCK, инфицированных вирусом A/Puerto-Rico/8/1934 (H1N1) в дозе заражения 50 MOI в течение 20 мин и окрашенных родамин-фаллоидином. *а* — Окраска ядер DAPI, *б* — гемагглютинин (непрямое иммуномечение), *в* — родамин-фаллоидин, *г* — наложение каналов. Стрелки — колокализация интернализуемых вирусных частиц с агрегатами апикального F-актина

В связи со сказанным мы провели исследование организации актинового цитоскелета клеток MDCK в условиях вирусной инфекции, с окраской F-актина родамин-фаллоидином. Согласно полученным результатам (рис. 3), на ранней стадии вирусной инфекции (20 мин) F-актин локализован по клеточным границам, в виде стресс-фибрилл в базальной области клетки, а также агрегатов F-актина на апикальной клеточной поверхности, соответствующих мембранным раффлам (рис. 3*в*). Частичная ассоциация интернализуемых вирионов с агрегатами апикального F-актина свидетельствует в пользу макропиноцитоза части вирионов с использованием раффлов мембраны (рис. 3*г*). Этот результат подтверждается приведенными ниже данными электронной микроскопии.

Ультраструктура клеток MDCK на ранней стадии вирусного заражения. Конфлюэнтный монослой клеток MDCK является поляризованным эпителием, с характерными зонами межклеточных плотных контактов между соседними клетками (рис. 4). Зоны плотных контактов разделяют клеточную мембрану на апикальный и базолатеральный домены. Апикальная поверхность клеток MDCK характеризуется присутствием значительного количества окаймлённых ямок (рис. 4*в*) и окаймлённых везикул (рис. 4*г*), свидетельствующих об активном клатрин-зависимом эндоцитозе через апикальный домен клеточной мембраны.

Инфицирование монослоя MDCK вирусом гриппа А происходит через апикальный домен мембраны клеток. Линия MDCK имеет высокую пермиссивность к ВГА ряда подтипов за счет присутствия на апикальной поверхности клеток рецепторов для связывания гемагглютинина — сиаловых кислот типов α-2,3 и α-2,6. Сиаловые кислоты составляют концевые группы сиалогликанов; сиалогликаны в качестве компонента гликокаликса связаны с липидами и белками апикальной мембраны (Karakus et al., 2020).

В условиях вирусной инфекции на ультратонких срезах клеток MDCK обнаруживаются эндоцитируемые вирионы (рис. 5), при этом прослеживаются последовательные этапы интернализации, от адсорбции вирионов к клеточной поверхности (рис. 5*а*) до локализации вирионов в ранней эндосоме (рис. 5*г*). По полученным нами результатам ТЭМ, интернализация ВГА осуществляется как посредством клатрин-зависимого эндоцитоза через окаймленные ямки (рис. 5*б*), так и посредством макропиноцитоза с участием раффлов клеточной мембраны (рис. 5*в*). Эти данные полностью согласуются с изложенными выше результатами КЛСМ.

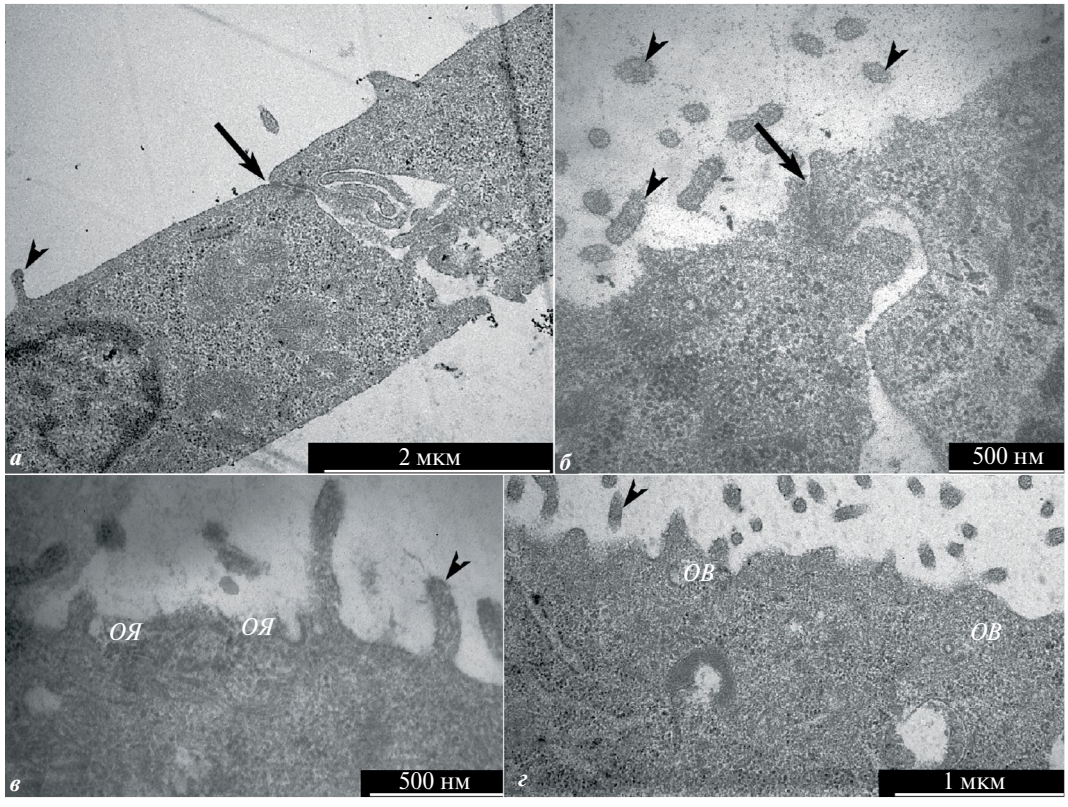


Рис. 4. Электронная микроскопия контрольных клеток MDCK. *а*, *б* — зоны межклеточных плотных контактов (стрелки); *в* — окаймленные ямки (*ОЯ*) на апикальной поверхности клеток; *г* — окаймлённые везикулы (*ОВ*) в апикальной зоне цитоплазмы; головки стрелок — микроворсинки апикальной поверхности

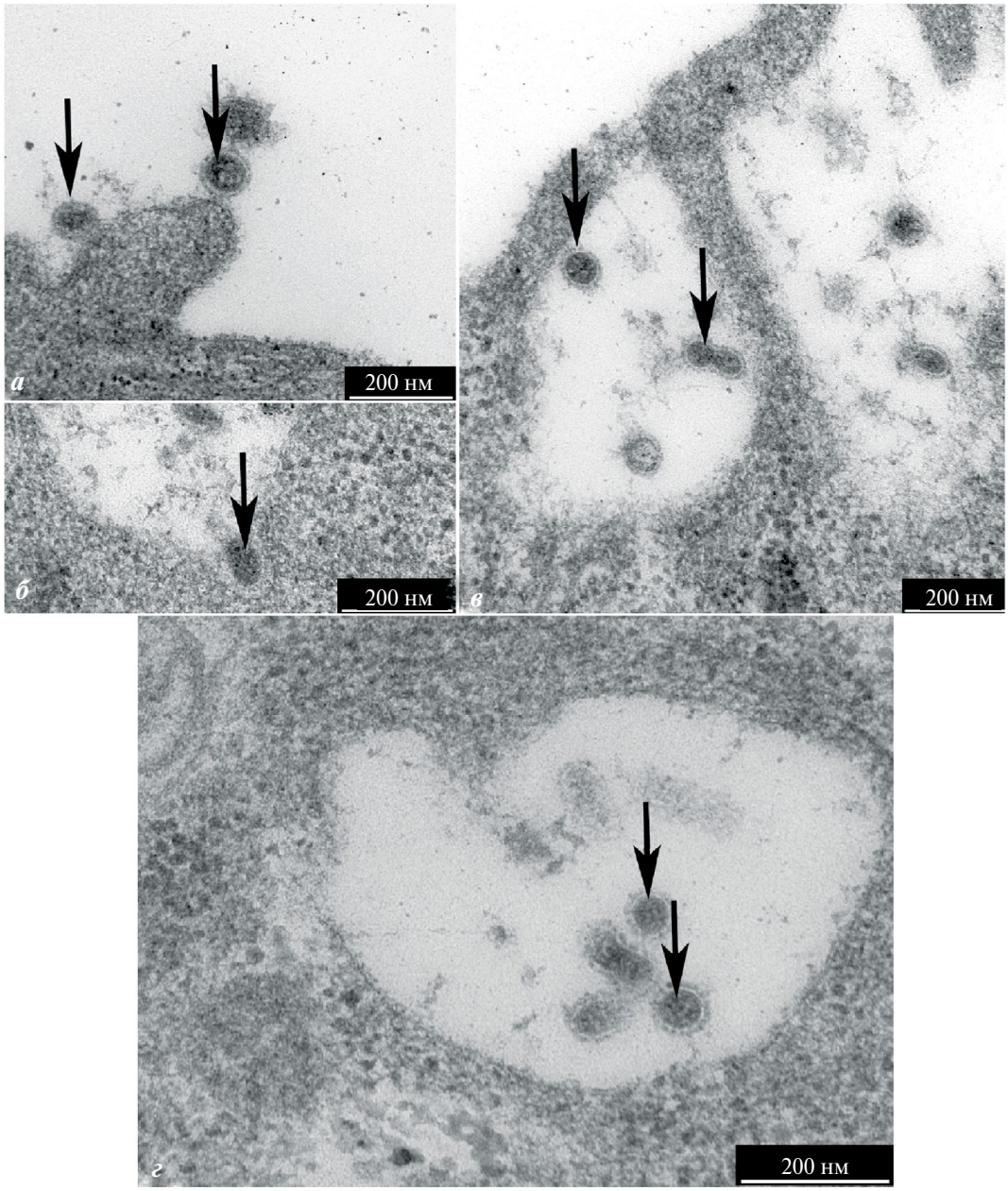


Рис. 5. Электронная микроскопия клеток MDCK, инфицированных вирусом A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) в дозе заражения 50 MOI в течение 20 мин. *а* — Адсорбция вирусных частиц (стрелки) к клеточной поверхности; *б* — интернализация вириона (стрелка) с помощью клатрин-зависимого эндоцитоза; *в* — интернализация вирионов (стрелки) с помощью макропинцитоза; *г* — ранняя эндосома, содержащая интернализованные вирионы

Таким образом, согласно полученным нами данным, вирус гриппа А способен интернализоваться через клатрин-зависимый эндоцитоз и макропиноцитоз. Вовлеченность макропиноцитоза как второго механизма интернализации ВГА свидетельствует о высокой степени сложности во взаимодействиях вируса с клеткой-хозяином, эволюционно достигнутой данным вирусным патогеном.

В недавних исследованиях были предложены новые подходы к терапии гриппа на основе блокирования функции клеточных протеинкиназ, участвующих в передаче сигнала в области эндоцитируемого вириона, в частности с использованием ингибиторов сигнального пути PI3K/Akt (Hirata et al., 2014; Deinhardt-Emmer et al., 2021). Множественность используемых ВГА эндоцитозных путей требует расширения поиска таких ингибиторов

и дополнительного включения в него регуляторов динамики субмембранного актина при макропиноцитозе, таких как протеинкиназа FAK (Bergmann, Elbahesh, 2019).

Нужно отметить, что в целом клеточные эндоцитозные пути не исчерпываются клатрин-зависимым эндоцитозом и макропиноцитозом. В дополнение к ним хорошо известен эндоцитоз через кавеолы (Pelkmans, Helenius, 2002). Кроме того, был открыт ряд новых эндоцитозных механизмов, включая эндоцитоз, опосредованный RhoA, cdc-42, ARF6, CtBP/BARS и флотиллином (см. обзор: Sandvig et al., 2018). В литературе нет прямых данных о связи этих путей с интернализацией вирусов. В отношении кавеол такие данные существуют для вируса SV40 (Stang et al., 1997). Применительно к ВГА, имеется несколько публикаций, в которых отмечено снижение уровня инфицирования клеток при воздействии таких агентов, как филипин (блокатор холестерина) или метил-β-циклодекстрин, который удаляет холестерин из клеточных мембран (De Conto et al., 2011; Verma et al., 2018). Холестерин является характерным компонентом кавеол. Однако обогащенные холестерином зоны мембраны являются не только областями формирования кавеол, но и представляют собой сайты многочисленных сигнальных белковых взаимодействий, вовлеченных в жизненный цикл вируса. Кроме того, хорошо известно, что в поляризованных эпителиальных слоях (монослой MDCK и респираторные эпителии *in vivo*) кавеолы в норме локализованы на базолатеральной поверхности клеток, и при инфицировании с апикальной стороны практически отсутствует возможность физического контакта вируса гриппа с ними (Verkade et al., 2000).

Таким образом, интернализация ВГА A/Puerto-Rico/8/1934 (H1N1) в клетки MDCK осуществляется как посредством клатрин-зависимого эндоцитоза, так и посредством макропиноцитоза, что представляет особый интерес при оценке инфективности вирусных штаммов. Полученные результаты расширяют знания о механизмах интернализации вируса гриппа А при инфекции, а также важны для поиска новых терапевтических подходов, направленных на компоненты данных эндоцитозных путей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abed Y., Boivin G.* 2017. A review of clinical Influenza A and B infections with reduced susceptibility to both oseltamivir and zanamivir. Open Forum Infect. Dis. V. 4. ofx105. https://doi.org/10.1093/ofid/ofx105
2. *Badham M. D., Rossman J. S.* 2016. Filamentous influenza viruses. Curr. Clin. Microbiol. Rep. V. 3. P. 155. https://doi.org/10.1007/s40588-016-0041-7
3. *Bloomfield G., Kay R. R.* 2016. Uses and abuses of macropinocytosis. J. Cell Sci. V. 129. P. 2697. https://doi.org/10.1242/jcs.176149
4. *Chen Y., Wang F., Yin L., Jiang H., Lu X., Bi Y., Zhang W., Shi Y., Burioni R., Tong Z., Song H., Qi J., Gao G. F.* 2022. Structural basis for a human broadly neutralizing influenza A hemagglutinin stem-specific antibody including H17/18 subtypes. Nat. Commun. 2022. V. 13. P. 7603. https://doi.org/10.1038/s41467-022-35236-y
5. *Cohen M., Zhang X. Q., Senaati H. P., Chen H. W., Varki N. M., Schooley R. T., Gagneux P.* 2013. Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase. Virol. J. V. 10. P. 321. https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-321
6. *Dadonaite B., Vijayakrishnan S., Fodor E., Bhella D., Hutchinson E. C.* 2016. Filamentous influenza viruses. J. Gen. Virol. V. 97. P. 1755. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000535
7. *De Conto F., Covan S., Arcangeletti M. C., Orlandini G., Gatti R., Dettori G., Chezzi C.* 2011. Differential infectious entry of human influenza A/NWS/33 virus (H1N1) in mammalian kidney cells. Virus Res. V. 155. P. 221. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.10.008
8. *Edinger T. O., Pohl M. O., Stertz S.* 2014. Entry of influenza A virus: Host factors and antiviral targets. J. Gen. Virol. V. 95. Pt 2. P. 263. https://doi.org/10.1099/vir.0.059477-0
9. *Guo X., Zhou Y., Yan H., An Q., Liang C., Liu L., Qian J.* 2024. Molecular Markers and Mechanisms of Influenza A Virus Cross-Species Transmission and New Host Adaptation. Viruses. V. 16. P. 883. https://doi.org/10.3390/v16060883
10. *Hoeller O., Bolourani P., Clark J., Stephens L. R., Hawkins P. T., Weiner O. D., Weeks G., Kay R. R.* 2013. Two distinct functions for PI3-kinases in macropinocytosis. J. Cell Sci. V. 126. P. 4296. https://doi.org/10.1242/jcs.134015
11. *Kaksonen M., Roux A.* 2018. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. V. 5. P. 313. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132

12. *Kamiki H., Murakami S., Nishikaze T., Hiono T., Igarashi M., Furuse Y., Matsugo H., Ishida H., Katayama M., Sekine W., Muraki Y., Takahashi M., Takenaka-Uema A., Horimoto T.* 2022. Influenza A Virus Agnostic Receptor Tropism Revealed Using a Novel Biological System with Terminal Sialic Acid Knockout Cells. J. Virol. 96, e00416-22. https://doi.org/10.1128/jvi.00416-22

13. *Karakus U., Pohl M. O., Stertz S.* 2020. Breaking the Convention: Sialoglycan Variants, Coreceptors, and Alternative Receptors for Influenza A Virus Entry. J. Virol. V. 94. e01357-19. https://doi.org/10.1128/JVI.01357-19

14. *König R., Stertz S., Zhou Y., Inoue A., Hoffmann H. H., Bhattacharyya S., Alamares J. G., Tscherne D. M., Ortigoza M. B., LiangY., Gao Q., Andrews S. E., Bandyopadhyay S., De Jesus P., Tu B. P., Pache L., Shih C., Orth A., Bonamy G., Miraglia L., Ideker T., García-Sastre A,. Young J. A., Palese P., Shaw M. L., Chanda S. K.* 2010. Human host factors required for influenza virus replication. Nature. V. 463. P. 813. https://doi.org/10.1038/nature08699

15. *Krammer F., Smith G. J.D., Fouchier R. A.M., Peiris M., Kedzierska K., Doherty, P.C., Palese P., Shaw M. L., Treanor J., Webster R. G., García-Sastre A.* 2018. Influenza. Nat. Rev. Dis. Primers. V. 4. P. 3. https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y

16. *Lackenby A., Thompson C. I., Democratis J.* 2008. The potential impact of neuraminidase inhibitor resistant influenza. Curr. Opin. Infect. Dis. V. 21. P. 626—638. https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283199797

17. *Lakadamyali M., Rust M. J., Zhuang X.* 2004. Endocytosis of influenza viruses. Microbes Infect. V. 10. P. 929. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.05.002

18. *Lazniewski M., Dawson W. K., Szczepinska T., Plewczynski D.* 2018. The structural variability of the influenza A hemagglutinin receptor-binding site. Brief Funct. Genom. V. 17. P. 415. https://doi.org/10.1093/bfgp/elx042

19. *Lei C., Yang J., Hu J., Sun X.* On the Calculation of TCID50 for Quantitation of Virus Infectivity. Virol Sin. 2021;36(1):141—144. https://doi.org/10.1007/s12250-020-00230-5

20. *Li T., Li Z., Deans E. E., Mittler E., Liu M., Chandran K., Ivanovic T.* 2021. The shape of pleomorphic virions determines resistance to cell-entry pressure. Nat. Microbiol. V. 6. P. 617. https://doi.org/10.1038/s41564-021-00877-0

21. *Maes A., Botzki A., Mathys J., Impens F., Saelens X.* Systematic review and meta-analysis of genome-wide pooled CRISPR screens to identify host factors involved in influenza A virus infection. J. Virol. 2024, 98, e0185723. https://doi.org/10.1128/jvi.01857-23

22. *Matlin K. S., Reggio H., Helenius A., Simons K.* 1981. Infectious entry pathway of influenza-virus in a canine kidney-cell line. J. Cell Biol. V. 91. P. 601. https://doi.org/10.1083/jcb.91.3.601

23. *Momont C., Dang H. V., Zatta F., Hauser K., Wang C., di Iulio J., Minola A., Czudnochowski N., De Marco A., Branch K., et al.* 2023. A pan-influenza antibody inhibiting neuraminidase via receptor mimicry. Nature. V. 618. P. 590. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06136-y

24. *Neumann G., Noda T., Kawaoka Y.* 2009. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. Nature. V. 459. P. 931. https://doi.org/10.1038/nature08157

25. *Patterson S., Oxford J. S., Dourmashkin R. R.* 1979. Studies on the mechanism of influenza-virus entry into cells. J. Gen. Virol. V. 43. P. 223. https://doi.org/10.1099/0022-1317-43-1-223

26. *Peacock T. P., Moncla L., Dudas G., VanInsberghe D., Sukhova K., Lloyd-Smith J.O., Worobey M., Lowen A. C., Nelson M. I.* 2025. The global H5N1 influenza panzootic in mammals. Nature. V. 637. P. 304. https://doi.org/10.1038/s41586-024-08054-z

27. *Pelkmans L, Helenius A.* 2002. Endocytosis via caveolae. Traffic. V. 3. P. 311. https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30501.x

28. *Perez-Acle T., Ravello C., Rosemblatt M.* 2024. Are we cultivating the perfect storm for a human avian influenza pandemic? Biol. Res. V. 57. P. 96. https://doi.org/10.1186/s40659-024-00570-6

29. *Porat-Shliom N., Kloog Y., Donaldson J. G.* 2008. A unique platform for H-Ras signaling involving clathrin-independent endocytosis. Mol. Biol. Cell. V. 19. P. 765.
https://doi.org/10.1091/mbc.e07-08-0841

30. *Roingeard P., Raynal P. I., Eymieux S., Blanchard E.* 2019. Virus detection by transmission electron microscopy: Still useful for diagnosis and a plus for biosafety. Rev. Med. Virol. V. 1. e2019.
https://doi.org/10.1002/rmv.2019

31. *Rust M. J., Lakadamyali M., Zhang F., Zhuang X.* 2004. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. Nat. Struct. Mol. Biol. V. 11. P. 567.
https://doi.org/10.1038/nsmb769

32. *Sakai T., Nishimura S. I., Naito T., Saito M.* 2017. Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase act as novel motile machinery. Sci Rep. V. 7. P. 45043.
https://doi.org/10.1038/srep45043

33. *Sandvig K., Kavaliauskiene S., Skotland T.* 2018. Clathrin-independent endocytosis: an increasing degree of complexity. Histochem. Cell Biol. V. 150. P. 107.
https://doi.org/10.1007/s00418-018-1678-5

34. *Sempere Borau M., Stertz S.* 2021. Entry of influenza A virus into host cells-recent progress and remaining challenges. Curr. Opin.Virol. V. 48. P. 23.
https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.03.001

35. *Shi Y., Wu Y., Zhang W., Qi J., Gao G. F.* 2014. Enabling the 'host jump', structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses. Nat. Rev. Microbiol. V. 12. P. 822.
https://doi.org/10.1038/nrmicro3362

36. *Shtyrya Y. A., Mochalova L. V., Bovin N. V.* 2009. Influenza virus neuraminidase: Structure and function. Acta Naturae. V. 1. P. 26.
https://doi.org/10.32607/20758251-2009-1-2-26-32

37. *Sieczkarski S. B., Whittaker G. R.* 2002. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. J. Virol. V. 76. V. 10455.
https://doi.org/10.1128/jvi.76.20.10455-10464.2002

38. *Sieczkarski S. B., Whittaker G. R.* 2005. Characterization of the host cell entry of filamentous influenza virus. Arch Virol. V. 9. P. 1783—1796.
https://doi.org/10.1007/s00705-005-0558-1

39. *Stang E., Kartenbeck J., Parton RG.* 1997. Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae. Mol. Biol. Cell. V. 8. P. 47—57.
https://doi.org/10.1091/mbc.8.1.47

40. *Sulpiana Amalia R., Atik N.* 2024. The Roles of Endocytosis and Autophagy at the Cellular Level During Influenza Virus Infection: A Mini-Review. Infect. Drug Resist. V. 17. P. 3199.
https://doi.org/10.2147/IDR.S471204

41. *Taubenberger J. K., Morens D. M.* 2010. Influenza: The once and future pandemic. Public Health Rep. 125 (Suppl. 3). P. 16.

42. *Thompson A. J., Paulson J. C.* 2021. Adaptation of influenza viruses to human airway receptors. J. Biol. Chem. V. 296, P. 100017.
https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.013309

43. *Thorlund K., Awad, T., Boivin G., Thabane L.,* 2011. Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors. BMC Infect. Dis. V. 11. P. 134.
https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-134

44. *Verkade P., Harder T., Lafont F., Simons K.* 2000. Induction of caveolae in the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells. J. Cell. Biol. V. 148. P. 727.
https://doi.org/10.1083/jcb.148.4.727

45. *Verma D. K., Gupta D., Lal S. K.* 2018. Host lipid rafts play a major role in binding and endocytosis of influenza a virus. Viruses. V. 10. P. 650.
https://doi.org/10.3390/v10110650

46. *Wang J., Shen B., Yue L., Xu H., Chen L., Qian D., Dong W., Hu Y.* 2024. The Global Trend of Drug Resistant Sites in Influenza A Virus Neuraminidase Protein from 2011 to 2020. Microorganisms. V. 12. P. 2056.
https://doi.org/10.3390/microorganisms12102056

47. *Watanabe T., Watanabe S., Kawaoka Y.* 2010. Cellular networks involved in the influenza virus life cycle. Cell Host Microbe. V. 7. P. 427.
https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.008

48. *Webby R. J., Uyeki T. M.* 2024. An Update on Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus, Clade 2.3.4.4b. J. Infect. Dis. V. 230. P. 3533.
https://doi.org/10.1093/infdis/jiae379

49. World Health Organization. 2011. WHO Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Geneva, Switzerland, 139 p.

50. World Health Organization. Influenza Fact Sheet. Available online:
https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)

51. *Wu N. C., Wilson I. A.* 2020. Influenza Hemagglutinin Structures and Antibody Recognition. Cold Spring Harb. Perspect. Med. V. 10. a038778.
https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038778

52. *Xie E., Ahmad S., Smyth R. P., Sieben C.* 2023. Advanced fluorescence microscopy in respiratory virus cell biology. Adv. Virus Res. V. 116. P. 123.
https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2023.05.002

53. *Xu J., Luo Q., Huang Y., Li J., Ye W., Yan R., Zhou X., He Z., Liu G., Zhu Q.* 2024. Influenza neuraminidase mutations and resistance to neuraminidase inhibitors. Emerg. Microbes Infect. V. 13. P. 2429627.
https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2429627

54. *Yang J., Liu S.* 2022. Influenza virus entry inhibitors. Adv. Exp. Med. Biol. V. 1366. P. 123.
https://doi.org/10.1007/978-981-16-8702-0_8

55. *Zhang Y., Whittaker G. R.* 2014. Influenza entry pathways in polarized MDCK cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. V. 450. P. 234—239.
https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.095

56. *Zhu M., Anirudhan V., Du R., Rong L., Cui Q.* 2023. Influenza virus cell entry and targeted antiviral development. J. Med. Virol. V. 11. e29181.
https://doi.org/10.1002/jmv.2918110