

## Знижена відповідь натуральних кілерних лімфоцитів на стимуляцію Toll-подібного рецептора 3 у дітей, які часто хворіють

Д.В. Осипчук<sup>1</sup>, В.П. Чернишов<sup>1</sup>, Л.І. Чернишова<sup>2</sup>, Н.П. Кисіль<sup>3</sup>, Б.В. Донської<sup>1</sup>, І.М. Матвієнко<sup>4</sup>, В.П. Родіонов<sup>4</sup>, Ю.А. Маковська<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України», Київ;

<sup>2</sup> Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л.Шупика, Київ;

<sup>3</sup> Національна дитяча спеціалізована лікарня «ОХМАТДИТ», Київ;

<sup>4</sup> ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України», Київ;

e-mail: dariia\_osypchuk@ukr.net

Досліджували активацію натуральних кілерних (НК) лімфоцитів, опосередковану Toll-подібним рецептором 3 (ТЛР3), у дітей, що часто хворіють, та у дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями. Показником активації був CD69 на НК-лімфоцитах після інкубації з лігандом ТЛР3. У дітей, що часто хворіють, спостерігався вірогідно нижчий цей показник -  $36,3 \pm 4,4\%$  порівняно зі здоровими дітьми ( $56,5 \pm 4,9\%$ ) та групою дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями ( $55,9 \pm 4,4\%$ ). Також зниженим був активаційний потенціал НК-клітин -  $24,9 \pm 4,5\%$ , котрий вираховували як різницю між відсотковим вмістом CD69<sup>+</sup> НК-лімфоцитів після інкубації та спонтанним значенням (без додавання активатора). Аналіз кореляційних взаємозв'язків показав, що активація НК-лімфоцитів, опосередкована ТЛР3, не залежить від віку. Таким чином, здатність до активації НК-лімфоцитів, опосередкованої ТЛР3, не залежить від віку і є зниженою у дітей, що часто хворіють. Це може сприяти підвищеній чутливості до вірусних інфекцій та їх бактеріальних ускладнень.

Ключові слова: натуральні кілерні лімфоцити; Toll-подібні рецептори.

### ВСТУП

Toll-подібні рецептори (ТЛР) - компоненти вродженого імунітету, які розпізнають широкий спектр висококонсервативних структурних або секретованих компонентів патогенів, так званих патогенасоційованих молекулярних патернів (ПАМП), що є необхідними для їх життєдіяльності [1]. ТЛР розпізнають вірусні, бактеріальні та грибові ПАМП у структурі мікроорганізмів та ініціюють вроджений та набутий імунітет. Активація ТЛР індукує транскрипцію антимікробних генів, цитокінів і хемокинів [2].

ТЛР експресуються на всіх імунних клітинах організму, зокрема і на НК-лімфоцитах [3–6]. Останні беруть участь в імунному захисті, безпосередньо, елімінують вірусинфі-

ковані та злоякіснотрансформовані клітини та активують інші ланки імунної системи завдяки секреції цитокінів – інтерлейкіну – 12 (ІЛ-12) та інтерферону- $\gamma$  (ІФН- $\gamma$ ) [7]. На НК-лімфоцитах людини експресуються майже всі ТЛР [7–9], зокрема ТЛР3, який відноситься до окремої групи внутрішньоклітинних ТЛР - ключових компонентів протівірусної імунної відповіді. Він розпізнає та зв'язується з дволанцюговою РНК (длРНК), що є обов'язковим проміжним продуктом реплікації РНК-вмісних вірусів. Стимуляція ТЛР3, активує НК-лімфоцити, що призводить до секреції цитокінів, підвищення клітинного лізису вірусинфікованих і пухлинних клітин. Продемонстровано, що стимуляція НК - лімфоцитом синтетичним аналогом длРНК - poly I:C, який є лігандом ТЛР3, індукує

© Д.В. Осипчук, В.П. Чернишов, Л.І. Чернишова, Н.П. Кисіль, Б.В. Донської, І.М. Матвієнко, В.П. Родіонов, Ю.А. Маковська

секрецію ІФН- $\gamma$ , та прозапальних цитокінів - ІЛ-6 та ІЛ-8, котрі є важливими регуляторами імунної відповіді. Також у відповідь на стимуляцію ТЛР3 НК-клітини підвищують експресію маркера активації CD69 [8,9]. Тобто розпізнавання вірусів через ТЛР3 допомагає НК-клітинам відігравати фундаментальну роль у першій лінії захисту організму проти вірусних інфекцій. Відкриття ТЛР та виявлення їх на НК-лімфоцитах дало змогу припустити, що ці клітини здатні не лише елімінувати вірусінфіковані та пухлинні клітини, а також відповідати безпосередньо на інвазію бактеріальних та інших патогенів, розпізнаючи ПАМП. Взаємодія цих клітин з лігандами ТЛР у місцях інфекції з подальшим синтезом прозапальних медіаторів та активацією набутої ланки імунітету робить їх важливим компонентом у боротьбі як з вірусними, так і бактеріальними патогенами [10-13].

Мета нашої роботи дослідити здатність до активації НК-лімфоцитів у відповідь на стимуляцію ТЛР3 у дітей з частими респіраторними та інвазивними бактеріальними інфекціями.

## МЕТОДИКА

Визначення відповіді НК-лімфоцитів на стимуляцію ТЛР3 проводили у 71 дитини. Серед них: діти з інвазивними бактеріальними інфекціями, віком від 4 міс до 16 років ( $n=28$ ); діти, які страждали від частих респіраторних інфекцій або часто хворіли, віком від 1 до 13 років ( $n=25$ ) та здорові віком від 3 до 13 років (перша група здоров'я) в яких не спостерігалось гострих, рекурентних або хронічних захворювань та які протягом попередніх 3 міс не мали інфекційних захворювань, а також не отримували лікування антибактеріальними та імуномодулювальними препаратами з будь-якої причини (контрольна група,  $n=18$ ). На обстеження дітей та використання результатів експерименту було отримано згоду батьків.

Для дослідження проводили забір венозної крові в об'ємі від 500 мкл до 2 мл. Цільну периферичну кров (по 100мкл) інкубували 20 год у CO<sub>2</sub>-інкубаторі ("Revo", Швейцарія) у середовищі RPMI-1640 при 37°C з додаванням та без додавання синтетичного аналога длРНК - poly I:C - 50мкг/мл («Sigma-Aldrich», США). Клітини мітили FITC-, PE- та PE-Cy5-кон'югованими моноклональними антитілами до поверхневих маркерів - CD69, CD56 та CD3 («BD Bioscience», США). Відсотковий вміст НК-лімфоцитів та експресію CD69 на цих клітинах після інкубації вимірювали на проточному цитометрі FACScan за допомогою програмного забезпечення CellQuest software («BD Bioscience», США). Рівень спонтанної експресії CD69 вимірювали на зразках, що культивувались у відсутності poly I:C. Результати представлено у вигляді відсоткового вмісту CD69<sup>+</sup> НК-лімфоцитів. Статистичну обробку проводили за допомогою програми GraphPad Prism 6.0, для дослідження вірогідності використовували метод статистичного аналізу one-way Anova. Коефіцієнти кореляції визначали за методом Пірсона.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відсотковий вміст НК-лімфоцитів значно варіював у межах груп, проте не було вірогідної статистичної різниці між ними. У дітей, що часто хворіли, він становив -  $11,4 \pm 1,1\%$ , у дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями -  $8,8 \pm 1,7\%$ , у здорових  $8,2 \pm 1,1\%$ .

Експресія маркера активації CD69 на НК-лімфоцитах відрізнялася між групами. Найвищий рівень спонтанної експресії спостерігався у дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями -  $20,6 \pm 3,3\%$  НК-лімфоцитів мали фенотип CD69<sup>+</sup> (рисунок). Цей показник був вищий порівняно з групою дітей, що часто хворіли -  $11,4 \pm 1,8\%$  ( $P < 0,05$ ). У контролі вміст активованих НК-лімфоцитів сягав  $15,3 \pm 2,9\%$  та статистично не відрізнявся від значень у інших групах

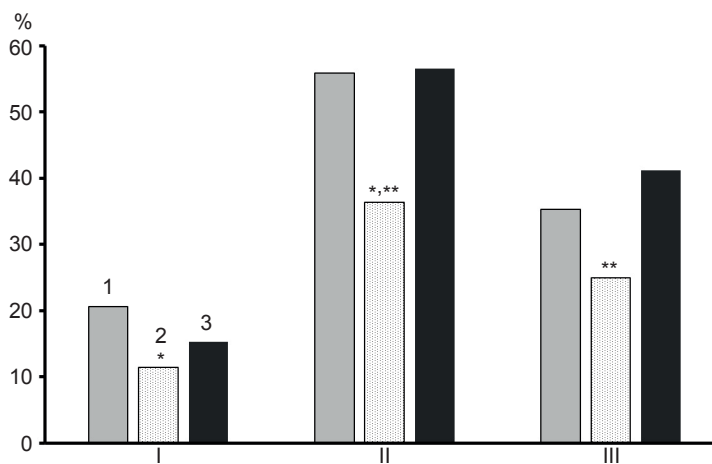
(рисунок). НК-лімфоцити є невід'ємним і важливим компонентом імунної системи, тому загальний стан активації імунної системи та гострого запалення, внаслідок бактеріальної інвазії, міг відобразитися на них підвищеним вмістом активаційного маркера у групі дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями. Також на поверхні цих клітин містяться рецептори і до бактеріальних антигенів, що дає їм можливість безпосередньо розпізнавати бактерії та брати активну участь у перебігу інфекції.

Інкубація з poly I:C призводила до значного зростання експресії маркера активації на НК-лімфоцитах. У дітей, що часто хворіли, цей показник сягав нижчого значення -  $36,3 \pm 4,4\%$ , ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем -  $56,5 \pm 4,9\%$  та значеннями у дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями -  $55,9 \pm 4,9\%$  (див. рисунок).

Для детальнішої оцінки здатності НК-лімфоцитів активуватися при інкубації з poly I:C ми вираховували приріст маркера CD69 на цих клітинах як різницю між відсотковим вмістом CD69<sup>+</sup> НК-лімфоцитів після та до інкубації з poly I:C. У контрольній групі -  $41,2 \pm 4,5\%$  НК-лімфоцитів набули фенотипу CD69<sup>+</sup> після активації poly I:C (див. рисунок). Значно нижче значення приросту було в

групі дітей, що часто хворіли -  $24,9 \pm 4,5\%$  ( $P < 0,05$  порівняно із контролем). Рівень приросту в групі дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями становив  $35,4 \pm 12,9\%$  та статистично не відрізнявся від значень у інших групах (див. рисунок). Таким чином, у групі дітей, що часто хворіють, спостерігався найнижчий приріст активаційного маркера CD69, лише  $24,9 \pm 4,5\%$  НК-лімфоцитів почали експресувати цей маркер після інкубації з poly I:C.

Зважаючи на значну різницю у віці дітей, ми дослідили чи є взаємозв'язок віку та рівня спонтанної експресії CD69 на НК-лімфоцитах після інкубації з poly I:C, приростом активаційного маркера та кількістю цих клітин у кожній групі (таблиця). Між віком дітей та досліджуваними показниками не виявлено кореляційних взаємозв'язків у жодній з груп дітей. Зміни в імунній відповіді, опосередкованій активацією ТЛР, відбуваються до першого року та в похилому віці. В період від 1-го року життя до похилого віку (65 років) відсутні суттєві відмінності в реакціях вродженого імунітету (на прикладі синтезу цитокінів), зумовлених активацією ТЛР [14]. Наші результати також підтверджують описані дані - активація НК-лімфоцитів, опосередкована



Зміни експресії активаційного маркера CD69 на НК-лімфоцитах до інкубації з poly I:C(I), після інкубації(II) та їх різницею(III): 1 – діти з інвазивними бактеріальними інфекціями, 2 – діти, що часто хворіють, 3 – контрольна група. \* $P < 0,05$  – порівняно з групою дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями; \*\* $P < 0,05$  – порівняно з контрольною групою дітей

активацією ТЛР3, не залежить від віку. Це дає можливість порівнювати різні вікові групи при дослідженнях функціональної активності ТЛР.

Згідно з нашими результатами, діти, що часто хворіють, мають низький спонтанний рівень експресії маркера активації CD69 та знижену здатність до активації після інкубації з агоністом ТЛР3 – poly I:C. Як відомо, активація ТЛР3 на НК-клітинах призводить до підвищення клітинного лізису вірусінфікованих та пухлинних клітин, секреції прозапальних цитокінів, які є регуляторами імунної відповіді (ІФН- $\gamma$ ), та хемоатрактантами (ІЛ-6 та ІЛ-8) [8–10]. У рамках захисних реакцій вродженого імунітету слизових оболонок від інфекцій, відбувається активна міграція нейтрофілів, НК-лімфоцитів, макрофагів та індукується синтез прозапальних цитокінів і хемокінів. Вдале завершення інфекції великою мірою

залежить саме від вчасного надходження лейкоцитів і продукції хемокінів у місці інфікування [13,15,16]. Наступна відповідь набутого імунітету вже є першочерговою в усуненні вірусів і репарації пошкоджених у результаті інфекції тканин. Можна припустити, що знижена активаційна здатність НК-лімфоцитів і як можливий наслідок знижена секреція прозапальних цитокінів, у дітей, які часто хворіють, є однією з причин їх чутливості до вірусних інфекцій, що також створює сприятливі умови для бактеріальних ускладнень. Heltzer і співавт. [17] продемонстрували знижену секрецію прозапальних цитокінів імунними клітинами у відповідь на стимуляцію ТЛР у дітей, хворих на грип, порівняно зі здоровими. Така знижена запальна відповідь у гострий період захворювання, може зменшувати пошкодження індуковані вірусом, тим не менше, ці зміни можуть зберігатись і після

#### Взаємозв'язок віку дітей та показників активації НК-лімфоцитів і їх відсотковим вмістом

Показник	Коефіцієнт кореляції Пірсона	Вірогідність
Діти з інвазивними бактеріальними інфекціями (n=28)		
Спонтанний рівень експресії CD69 на НК-лімфоцитах	0,19	>0,05
Рівень експресії CD69 на НК-лімфоцитах після інкубації з poly I:C	0,22	>0,05
Відсотковий вміст НК- лімфоцитів	0,11	>0,05
Різниця між рівнем експресії CD69 на НК-лімфоцитах після інкубації з poly I:C та спонтанним рівнем	0,08	>0,05
Діти, які часто хворіють (n=25)		
Спонтанний рівень експресії CD69 на НК-лімфоцитах	-0,32	>0,05
Рівень експресії CD69 на НК-лімфоцитах після інкубації з poly I:C	-0,15	>0,05
Відсотковий вміст НК- лімфоцитів	-0,14	>0,05
Різниця між рівнем експресії CD69 на НК-лімфоцитах після інкубації з poly I:C та спонтанним рівнем	-0,31	>0,05
Контрольна група (n=18)		
Спонтанний рівень експресії CD69 на НК-лімфоцитах	0,22	>0,05
Рівень експресії CD69 на НК-лімфоцитах після інкубації з poly I:C	0,14	>0,05
Відсотковий вміст НК- лімфоцитів	-0,05	>0,05
Різниця між рівнем експресії CD69 на НК-лімфоцитах після інкубації з poly I:C та спонтанним рівнем	0,01	>0,05

завершення вірусної інфекції, створюючи умови для повторних вірусних захворювань та розвитку бактеріальних ускладнень.

## ВИСНОВКИ

1. Продемонстровано знижену здатність до активації НК-лімфоцитів, опосередкованої ТЛР3, у групі дітей, котрі часто хворіють, що може призводити до підвищеної чутливості до вірусних інфекцій та наступних бактеріальних ускладнень.

2. Діти з інвазивними бактеріальними інфекціями мають високий рівень як спонтанної експресії маркера активації на НК-лімфоцитах, так і високий рівень активаційного потенціалу останніх, що може свідчити про активну участь НК-лімфоцитів у перебігу бактеріальної інфекції.

3. Показано відсутність кореляційних взаємозв'язків віку дітей та показників активації НК-лімфоцитів і їх відсоткового вмісту.

**Д.В. Осипчук, В.П. Чернышев, Л.И. Чернышева, Н.П. Кисель, Б.В. Донской, И.Н. Матвиенко, В.П. Родионов, Ю.А. Маковская**

### **СНИЖЕННЫЙ ОТВЕТ НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ НА СТИМУЛЯЦИЮ TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 3 У ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ**

В этой работе мы исследовали активацию НК-лимфоцитов, опосредованную стимуляцией Toll-подобного рецептора 3 (ТЛР3), у часто болеющих детей и детей с инвазивными бактериальными инфекциями. Показателем активации использовали уровень экспрессии маркера активации CD69 на НК-лимфоцитах после инкубации с лигандом ТЛР3. В часто болеющих детей наблюдался достоверно сниженный уровень экспрессии маркера активации -  $36,3 \pm 4,4\%$  по сравнению с контролем ( $56,5 \pm 4,9\%$ ) и детьми с инвазивными бактериальными инфекциями ( $55,9 \pm 4,4\%$ ). Также сниженным был показатель активационного потенциала НК-лимфоцитов -  $24,9 \pm 4,5\%$ , который вычисляли как разницу между процентным содержанием CD69<sup>+</sup> НК-лимфоцитов после инкубации и спонтанным значением (без добавления активатора). Анализ корреляционных взаимосвязей показал, что активация НК-лимфоцитов, опосредованное ТЛР3, не зависит от возраста. Таким образом, способность к активации НК-лимфоцитов, опосредованной ТЛР3, не зависит от возраста и является

пониженной у часто болеющих детей. Снижена активация НК-лимфоцитов может способствовать повышенной чувствительности к вирусным инфекциям и их бактериальным осложнениям.

Ключевые слова: натуральные киллерные лимфоциты; Toll-подобные рецепторы.

**D.V. Osypchuk<sup>1</sup>, V.P. Chernyshov<sup>1</sup>, L.I. Chernysheva<sup>2</sup>, N.P. Kissel<sup>3</sup>, B.V. Dons`koi<sup>1</sup>, I.M. Matvienko<sup>4</sup>, V.P. Rodionov<sup>4</sup>, Yu.A. Makovs`ka<sup>4</sup>**

### **REDUCED RESPONSE OF NATURAL KILLER LYMPHOCYTES TO TOLL-LIKE RECEPTOR 3 STIMULATION IN CHILDREN WITH RECURRENT INFECTIONS**

In this study, we examined the activation of natural killer (NK)-lymphocytes mediated by Toll-like receptor 3 (TLR3), in the group of children with recurrent infections and the group of children with invasive bacterial infections. We examined level of CD69 (marker of activation) expression on NK - lymphocytes after incubation with TLR3 ligand. There was a significant decrease in the level of an activation marker -  $36,3 \pm 4,4\%$  in the group of children with recurrent infections, compared with a control group of healthy children ( $56,5 \pm 4,9\%$ ) and the group of children with invasive bacterial infections ( $55,9 \pm 4,4\%$ ). Also, decreased was an activation potential of NK-lymphocytes -  $24,9 \pm 4,5\%$  which was calculated as the difference between the percentage of CD69<sup>+</sup> NK - lymphocytes after incubation and spontaneous value (without the addition of activator). There were no correlations between markers of TLR3 mediated activation of NK-cells and the age. Thus, the ability to activate NK - lymphocyte mediated by TLR3, independent of age and reduced in the group of children with recurrent infections. Reduced activation of NK-lymphocytes may contribute to increased susceptibility to viral infections and bacterial complications.

Key words: NK-cells; TLR; Toll-like receptors.

<sup>1</sup>Laboratory of Immunology, Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

<sup>2</sup>Department of Children Infectious Diseases and Children's Immunology, Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Kiev, Ukraine

<sup>3</sup>Department of septic surgery, National Children's Specialized Hospital «OHMATDYT», Kiev, Ukraine

<sup>4</sup>Department of health child's problems and premorbid states, Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine.

## REFERENCES

1. O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev.* 2008;

- 226:10–8.
2. Bereznaia NM, Sepiashvili RI. Physiology of Toll-like receptors--regulators of natural and acquired immunity. *Fiziol Zh.* 2011;57(5):26-9.
  3. Fitzner N, Clauberg S, Essmann F, Liebmann J, Kolb-Bachofen V. Human skin endothelial cells can express all 10 TLR genes and respond to respective ligands. *Clin. Vaccine Immunol.* 2008;15(1):138-46.
  4. Ingerslev HC, Ossum CG, Lindenstrem T, Nielsen ME. Fibroblasts express immune relevant genes and are important sentinel cells during tissue damage in rainbow trout. *PLoS One.* 2010;5(2):e9304.
  5. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence *Nat Rev Immunol.* 2007;7(3):179-90.
  6. Sun J C, Lanier L L. NK cell development, homeostasis and function:Parallels with CD8 T cells. *Nat Rev Immunol.* 2011;11: 645–57
  7. Lauzon NM, Mian F, MacKenzie R, Ashkar AA. The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cell Immunol.* 2006;241:102–12.
  8. Wulff S, Pries R, Wollenberg B. Cytokine release of human NK cells solely triggered with Poly I:C *Cell Immunol.* 2010;263(2):135-7
  9. Moore TC, Kumm PM, Brown DM, Petro TM. Interferon response factor 3 is crucial to poly-I:C induced NK cell activity and control of B16 melanoma growth. *Cancer Lett.* 2014;346(1):122-8.
  10. Tyler C. Moore, Phyllis M. Kumm, Deborah M. Brown, Thomas M. Petro. Souza-Fonseca-Guimaraes F, Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Natural Killer (NK) Cells in Antibacterial Innate Immunity: Angels or Devils? *Mol Med.* 2012;30:270-85
  11. Adib-Conquy M1, Scott-Algara D2, Cavaillon JM1, Souza-Fonseca-Guimaraes F TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals *Immunol Cell Biol.* 2014 Mar;92(3):256-62.
  12. Dong Z, Wei H, Sun R, Hu Z, Gao B, Tian Z. Involvement of natural killer cells in PolyI:C-induced liver injury. *J Hepatol.* 2004;41(6):966-73.
  13. Sarris M, Masson JB, Maurin D, Van der Aa LM, Boudinot P, Lortat-Jacob H, Herbomel P, Unni AM, Bondar T. Inflammatory chemokines direct and restrict leukocyte migration within live tissues as glycan-bound gradients. *Curr Biol.* 2012;22(24):2375-82.
  14. Kollmann TR, Levy O, Montgomery RR, Goriely S. Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly. *Immunity.* 2012;37(5):771-83.
  15. Medzhitov R. Intrinsic sensor of oncogenic transformation induces a signal for innate immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:1686–91.
  16. Zeng R, Li C, Li N, Wei L, Cui Y. The role of cytokines and chemokines in severe respiratory syncytial virus infection and subsequent asthma. *Cytokine.* 2011;53(1):1-7.
  17. Heltzer ML, Coffin SE, Maurer K, Bagashev A, Zhang Z, Orange JS, Sullivan KE. Immune dysregulation in severe influenza. *J Leukoc Biol.* 2009;85(6):1036-43.

*Матеріал надійшов  
до редакції 22.12.2015*