

© Осипчук Д. В.

УДК 616-022.7- 053.2:616.155.3

Осипчук Д. В.

## АКТИВАЦІЯ ГРАНУЛОЦИТІВ, ОПОСЕРЕДКОВАНА ТОЛЛ-ПОДІБНИМИ РЕЦЕПТОРАМИ ПРИ ІНВАЗИВНИХ БАКТЕРІАЛЬНИХ ІНФЕКЦІЯХ ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України» (м. Київ)

dariia\_osypchuk@ukr.net

Робота є фрагментом наукових розробок лабораторії імунології Інституту педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України за темою «Розробка методів профілактики та лікування ускладнень вагітності, пологів та післяпологового періоду у жінок з великим інтервалом між пологами», № державної реєстрації 01.08U001052.

**Вступ.** Гранулоцити – важливий компонент вродженої імунної системи. Циркуючі клітини швидко мігрують до місць запалення, забезпечуючи першу лінію захисту від патогенів. Вони володіють широким спектром мікробіцидних функцій – від продукування прозапальних цитокінів та протимікробних пептидів до реалізації нейтрофільних позаклітинних пасток (НПП) та фагоцитозу [7]. Гранулоцити безпосередньо розпізнають мембраноасоційовані або секретовані патогенами молекули, такі як пептидогликан (ПГН), ліпопротеїни, ліпотьохоеві кислоти, ліпополісахарид (ЛПС), CpG- вмісна ДНК, флагелін та інші [3].

Ці молекули, відомі як патоген-асоційовані молекулярні патерни (ПАМП), взаємодіють з низкою рецепторів, які мають назву паттерн-розпізнавальні рецептори, та розташовані як на поверхні цитоплазматичної мембрани, так і на внутрішньоклітинних мембранах. Одна з найбільш досліджених родин цих рецепторів, є родина Толл-подібних рецепторів (ТЛР), яка нараховує 11 функціональних рецепторів у людини [12]. ТЛР розпізнають широкий спектр ПАМП вірусного, бактеріального та грибового походження. Зв'язування цих рецепторів з ПАМП активує сигнальні шляхи клітини, що призводить до синтезу широкого спектру цитокінів, посилення фагоцитозу, презентації антигену та інших ефекторних функцій клітини [1]. Дослідження демонструють, що всі ТЛР, окрім ТЛР3, експресуються на гранулоцитах [3,12]. Показано, що активація ТЛР на нейтрофілах сприяє посиленню адгезії, дегрануляції та фагоцитозу, призводить до підвищення експресії інтегринів (CD11b), секреції цитокінів, хемокінів тим самим забезпечуючи протимікробну активність цих клітин [3,13,8].

Хоча противірусний імунітет, переважно, розглядається в рамках адаптивного імунітету, відкриття ТЛР, які розпізнають вірусні антигени, та виявлення їх експресії на клітинах вродженого імунітету, продемонструвало важливу роль ранньої відповіді вродженого імунітету в захисті від вірусних інфекцій. Продемонстровано, що нейтрофіли експресують ТЛР7, ТЛР8 та інші рецептори, які розпізнають антигени вірусного походження [3,14]. Активація цих

рецепторів призводить до синтезу прозапальних цитокінів, хемокінів та формування нейтрофільних позаклітинних пасток (НПЗ), обмежуючи тим самим поширення вірусної інфекції [5,17]. Таким чином, активація гранулоцитів опосередкована ТЛР, призводить до реалізації захисних функцій та елімінації широкого спектру патогенів. Разом з тим, важливим залишається дослідження впливу стимуляції ТЛР на активацію гранулоцитів, вже за умов гострої інфекції.

**Мета дослідження.** Основною метою роботи було дослідити, вплив активації ТЛР на рівень експресії молекули адгезії та рецептора до С3 компонента комплементу – CD11b та молекули адгезії CD62L на гранулоцитах при інвазивних бактеріальних інфекціях.

**Об'єкт і методи дослідження.** Визначення відповіді гранулоцитів на стимуляцію ТЛР проводилося у 40 дітей. Серед них: діти з інвазивними бактеріальними інфекціями, віком від 4 м. до 16 р. (група 1, n = 28); та здорові діти віком від 3 до 13 років, першої групи здоров'я, в яких не визначалось гострих, рекурентних або хронічних захворювань, та які протягом попередніх 3 місяців не хворіли на інфекційні захворювання, а також не отримували лікування антибактеріальними та імуномодуючими препаратами з будь-якої причини (контрольна група, n = 12). На обстеження дітей та використання результатів дослідження було отримано проінформовану згоду батьків.

Гепаринізовану кров (100мкл) інкубували з лігандами ТЛР протягом 1 год (37°C) в CO2 інкубаторі. Використовували наступні ліганди: ТЛР2 – пептидогликан *Staphylococcus aureus* («Sigma Aldrich», США) – 11мкг/мл, ТЛР4 – ліпополісахарид *Escherichia coli* («Sigma Aldrich», США) – 100нг/мл, ТЛР7/8 – синтетичний аналог одноланцюгової РНК – резиквімод R848 («Sigma Aldrich», США) – 3,3мкг/мл. В якості негативного контролю гепаринізовану кров інкубували з середовищем RPMI-1640 («Sigma Aldrich», США). Після інкубації до зразків додавали по 500 мкл лізуючого розчину («BD Science», США) та перемішували, залишали при кімнатній температурі на 10 хв. Потім додавали до кожного зразку 500 мкл дистильованої води, перемішували та залишали на 10 хв. при кімнатній температурі. Після, відкривали на центрифугі (5хв., 1500g), зливали надосад. До кожного зразка додавали по 3 мкл моноклональних антитіл мічених фікоеритрином до CD11b та моноклональних антитіл мічених флуо-

ресцеїн тіоціонатом до CD62L, перемішували та інкубували на 20 хв. на льодяній бані. Після інкубації, до кожного зразка додавали по 500 мкл розчину Cell Wash («BD Science», США), перемішували та відкручували на центрифугі (5хв., 1500g). Після відкрутки, зливали надосад, перемішували на Vortex та аналізували на приладі FacsScan Vecton Dickinson.

Гранулоцити виокремлювали за параметрами прямого та бічного розсіювання. До аналізу брались 10 000 подій. Інтенсивність експресії CD11b на гранулоцитах оцінювали за параметром Mean Fluorescence Intensity (MFI). Показником для оцінки експресії CD62L на гранулоцитах, використовували відсотковий вміст CD62L<sup>+</sup> гранулоцитів в загальній популяції. Результати досліджень піддавали варіативно-статистичній обробці за Стьюдентом з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel.

**Результати досліджень та їх обговорення**

В активованому стані гранулоцити характеризуються високими рівнями експресії інтегрину CD11b та низькими рівнями експресії CD62L, що забезпечує ефективний механізм міграції в місце запалення. Спонтанний рівень експресії цих маркерів на гранулоцитах, використовують, як маркери септичного стану та загального системного запалення [11,15]. Спонтанний рівень експресії інтегрину CD11b в групі з інвазивними бактеріальними інфекціями був достовірно вищим – 440,7 ± 177,8 MFI порівняно з контрольною групою (242,1 ± 94,9 MFI, P < 0,01) (табл. 1). Спонтанний рівень експресії CD62L був достовірно нижчим за показник в контрольній групі (45,7 ± 29,6 MFI та 78,3 ± 12,2%, P < 0,05, відповідно). Проте, в групі дітей з інвазивними бактеріальними

ми інфекціями показники значно варіювали, демонструючи значну різницю в рівнях експресії CD62L на гранулоцитах.

Для коректного аналізу подальших експериментальних даних, цю групу було розділено на дві групи в залежності від рівня спонтанної експресії CD62L. До групи 1a входили зразки із відсотком CD62L<sup>+</sup> гранулоцитів вищим, або що дорівнював 35% (найменший показник експресії CD62L в контрольній групі). До групи 1b увійшли зразки із відсотковим вмістом CD62L<sup>+</sup> гранулоцитів нижчим за 35%. Таким чином, в групі 1a (n = 14) спонтанний рівень експресії дорівнював 73,9 ± 15,9%, в групі 1b (n = 14) – 17,4 ± 7,8% (табл. 2). Рівень експресії CD62L в групі 1b був достовірно нижчим за показники в групі 1a та контрольній групі, P < 0,05.

Пептидоглікан – це компонент клітинної стінки бактерій, який розпізнається TLR2 [6]. В попередніх роботах було показано, що інкубація з пептидогліканом активує гранулоцити та індукує швидкий приріст експресії активаційних маркерів на їх поверхні, зокрема й CD11b [9]. В ході експерименту, найнижчий рівень індукованої експресії було виявлено на гранулоцитах після інкубації з пептидогліканом в контрольній групі – 586,1 ± 180,0. В групах 1a рівень експресії досягав 755,6 ± 214,5 та 746,07 ± 155 в групі 1b, ці показники були достовірно вищі за показник в контрольній групі, P < 0,05 (табл. 1). Рівень експресії молекули адгезії CD62L після активації пептидогліканом досягав найнижчого значення в контрольній групі – 4,5 ± 1,9%, що статистично відрізнялось від рівня залишкової експресії в групі 1a – 10,1 ± 8,2% P < 0,05 (табл. 2).

Таблиця 1.

**Рівень спонтанної та індукованої експресії молекули адгезії CD11b на гранулоцитах(MFI)**

Група	Спонтанний рівень експресії	Рівень експресії після інкубації пептидогліканом (активація TLR2)	Рівень експресії після інкубації з R848 (активація TLR7/8)	Рівень експресії після інкубації з ліпополісахаридом (активація TLR4)
1a (n = 14)	362,0 <sup>*/**</sup>	755,6 <sup>*</sup>	645,8	722,2 <sup>*</sup>
1b (n = 14)	519,3 <sup>*</sup>	746,07 <sup>*</sup>	593,9	676,3 <sup>*</sup>
Контрольна група (n = 12)	242,1	586,1	557,7	492,5

Примітки: \* P < 0,05 порівняно з контрольною групою; \*\* P < 0,05 порівняно з групою 1b.

Таблиця 2.

**Рівень спонтанної та індукованої експресії інтегрину CD62L на гранулоцитах (%)**

Група	Спонтанний рівень експресії	Рівень експресії після інкубації пептидогліканом (активація TLR2)	Рівень експресії після інкубації з R848 (активація TLR7/8)	Рівень експресії після інкубації з ліпополісахаридом (активація TLR4)
1a (n = 14)	73,9 ± 15,9 <sup>**</sup>	10,1 ± 8,2 <sup>*</sup>	31,5 ± 16,8 <sup>*/**</sup>	7,6 ± 5,3
1b (n = 14)	17,9 ± 7,7	5,3 ± 2,1	8,2 ± 5,2	3,1 ± 1,5
Контрольна група (n = 12)	78,30 ± 12,2	4,5 ± 1,9	12,9 ± 9,3	4,2 ± 1,8

Примітки: \*P<0,05 порівняно з контрольною групою; \*\* P<0,05 порівняно з групою 1b.

Рівень експресії CD62L в групі 1б становив  $5,3 \pm 2,1\%$  та статистично не відрізнявся від значень в інших групах. Як було описано раніше, обидві підгрупи дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями, демонстрували високий рівень спонтанної експресії CD11b, що відображує запальний стан та сенсibiliзацію патогеном. Останнє, може призводити праймінгу гранулоцитів та бути передумовою вищого рівня індукованої експресії при інкубації з пептидогліканом, порівняно з контролем [16]. TLR7 та TLR8 внутрішньоклітинні рецептори, які зв'язуються з одноланцюговим РНК та ініціюють ряд прозапальних реакцій. Синтетичним агоністом, який використовують для дослідження функціонального стану TLR7 та TLR8 є резиквімод (R848). Продемонстровано, що активація TLR7 та TLR8 призводить до синтезу цитокінів IL-6, IL-8 та інших прозапальних медіаторів, утворення ПНП, що демонструє важливість цих рецепторів у противірусній активності гранулоцитів [4].

Рівні індукованої експресії CD11b після інкубації з R848 в групах, статистично не відрізнялись між собою (табл. 1). Найвищий рівень експресії CD62L після активації TLR7/8 був в групі 1а –  $31,5 \pm 16,8\%$ , що статистично відрізнявся від рівнів експресії в групі 1б та контрольній групі ( $8,2 \pm 5,2$  та  $12,9 \pm 9,3\%$ ,  $P < 0,05$ , відповідно) (табл. 2).

ЛПС – основний компонент клітинної стінки грамнегативних бактерій, що розпізнається одним з найбільш досліджених рецепторів родини TLR – TLR4 [10]. В експериментальних роботах було показано, що за умов «вимкнення» гену цього рецептора у мишей, відбувається зниження продукції прозапальних цитокінів, проліферації В-лімфоцитів та знижується загальний рівень виживання у відповідь на інфікування грамнегативними бактеріями [1]. Так як і при інкубації з пептидогліканом, в підгрупах 1а та 1б рівні експресії CD11b, після інкубації з ЛПС, були достовірно вищими за показник в контрольній групі (табл. 1). Найвищий рівень експресії CD62L після інкубації з ЛПС спостерігався в підгрупі 1а –  $7,6 \pm 5,3\%$ . В підгрупі 1б цей показник досягав зна-

чення –  $3,1 \pm 1,5\%$ , в контрольній групі –  $4,2 \pm 1,8\%$  (табл. 2).

### Висновки

Таким чином, активації TLR на поверхні гранулоцитів призводить до значного зростання експресії інтегрину CD11b та зниження експресії молекули адгезії CD62L. Високий спонтанний рівень експресії CD11b та знижений рівень експресії CD62L на гранулоцитах у дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями, свідчить про активний запальний стан та підтверджує можливість використання цих маркерів, як показників запалення. Обидві підгрупи дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями демонстрували достовірно вищий рівень індукованої експресії CD11b у відповідь на стимуляцію TLR2 та TLR4. Такий приріст свідчить про попередню сенсibiliзацію бактеріальними антигенами та «праймінг» гранулоцитів, що є важливою передумовою повноцінної активації гранулоцитів [8]. Активація TLR7/8, які розпізнають вірусну олРНК, призводила до зростання експресії інтегрину, проте рівні індукованої експресії не відрізнялись між дослідними групами. Цікаво відмітити, що в підгрупі 1а, з високим спонтанним рівнем експресії CD62L, рівень спонтанної експресії CD11b був нижчим, в порівнянні з підгрупою 1б, що ще раз підтверджує важливість цих маркерів, як показників запалення. Також, в підгрупі 1а, рівень залишкової експресії CD62L на гранулоцитах після активації лігандами TLR2 та TLR7/8, був достовірно вищим за показники в контрольній групі. Така залишкова експресія молекули адгезії на гранулоцитах, після активації, може сприяти посиленій міграції клітин до місць запалення, завдяки щільнішому контакту з ендотелієм [2]. За рахунок низької спонтанної експресії CD62L в підгрупі 1б, показники експресії CD62L, після активації є непоказовими.

**Перспективи подальших досліджень.** Активація клітин вродженого імунітету, опосередкована Toll-подібними рецепторами – важливий компонент першої лінії захисту організму. Подальші дослідження повинні бути направлені на оцінку взаємозв'язку активації Toll-подібних рецепторів та функціональної активності інших клітин вродженого імунітету.

### Література

- Carpenter S. How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses? / S. Carpenter, L. A. O'Neill // *Cell. Microbiol.* – 2007. – Vol. 9, № 8. – P. 1891-1901.
- Hafezi-Moghadam A. L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment / A. Hafezi-Moghadam, K. L. Thomas, A. J. Proctor // *J. Exp. Med.* – 2001. – Vol. 2, № 193. – P. 863-872.
- Hayashi F. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function / F. Hayashi, T. K. Means, A. D. Luster // *Blood.* – 2003. – Vol. 102. – P. 2660-2669.
- Hattermann K. The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B4, prostaglandin E2 and platelet-activating factor biosynthesis / K. Hattermann, S. Picard, M. Borgeat [et al.] // *FASEB J.* – 2007. – Vol. 21, № 7. – P. 1575-1585.
- Jenne C. N. Neutrophils Recruited to Sites of Infection Protect from Virus Challenge by Releasing Neutrophil Extracellular Traps / C.N. Jenne, C. H. Wong, F. J. Zemp [et al.] // *Cell. Host. Microbe.* – 2013. – Vol. 13, № 2. – P. 169-180.
- Kielian T. Toll-like receptor 2 (TLR2) is pivotal for recognition of *S. aureus* peptidoglycan but not intact bacteria by microglia / T. Kielian, N. Esen, E. D. Bearden // *Glia.* – 2005. – Vol. 49, № 4. – P. 567-576.
- Kumar V. Neutrophils: Cinderella of innate immune system / V. Kumar, A. Sharma // *Int. Immunopharmacol.* – 2010. – Vol. 10, № 11. – P. 1325-1334.
- Kobayashi S. D. Neutrophils in the innate immune response / S. D. Kobayashi, J. M. Voyich, C. Burlak [et al.] // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* – 2005. – Vol. 53. – P. 505-517.
- Mattsson E. Peptidoglycan induces mobilization of the surface marker for activation marker CD66b in human neutrophils but not in eosinophils / E. Mattsson, T. Persson, P. Andersson [et al.] // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2003. – Vol. 10, № 3. – P. 485-488.

10. Medzhitov R. The Toll receptor family and microbial recognition / R. Medzhitov, C. Jr Janeway // Trends Microbiol. – 2000. – Vol. 8. – P. 452-456.
11. Nupponen I. Neutrophil CD11b expression and circulating interleukin-8 as diagnostic markers for early-onset neonatal sepsis / I. Nupponen, S. Andersson, A. L. Jdrvenрдд // Pediatrics. – 2001. – Vol. 108. – P. 12.
12. O'Neill L. A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress / L. A. O'Neill // Immunol. Rev. – 2008. – Vol. 226. – P. 10-18.
13. Parker L. C. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil / L. C. Parker, M. K. B. Whyte, S. K. Dower [et al.] // J. Leukoc. Biol. – 2005. – Vol. 77. – P. 886-892.
14. Tang F. S. Differential neutrophil activation in viral infections: Enhanced TLR-7/8-mediated CXCL8 release in asthma / F. S. Tang, Van Ly D, K. Spann // Respirology. – 2016. – Vol. 21, № 1. – P. 172-179.
15. Turunen R. Increased CD11b-Density on Circulating Phagocytes as an Early Sign of Late-Onset Sepsis in Extremely Low-Birth-Weight Infants / R. Turunen, S. Andersson, I. Nupponen // Pediatr. Res. – 2005. – Vol. 5, № 2. – P. 270-275.
16. Wright H. L. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases / H. L. Wright, R. J. Moots, R. C. Bucknall [et al.] // Rheumatology. – 2010. – Vol. 49. – P. 1618-1631.
17. Wang G. N. Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus / J. P. Wang, G. N. Bowen, C. Padden [et al.] // Blood. – 2008. – Vol. 1. – P. 2028-2034.

УДК 616-022.7- 053.2:616.155.3

### АКТИВАЦІЯ ГРАНУЛОЦИТІВ, ОПОСЕРЕДКОВАНА ТОЛЛ-ПОДІБНИМИ РЕЦЕПТОРАМИ ПРИ ІНВАЗИВНИХ БАКТЕРІАЛЬНИХ ІНФЕКЦІЯХ

Осипчук Д. В.

**Резюме.** В цій роботі досліджували активацію гранулоцитів, опосередковану Толл-подібними рецепторами у дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями. Стимуляція ТЛР2, ТЛР4, ТЛР7 та ТЛР8 призводила до значного зростання експресії інтегрину CD11b та шедінгу молекули адгезії CD62L на гранулоцитах. Спонтанний рівень експресії CD11b та рівні індукованої експресії після інкубації з лігандами ТЛР2 та ТЛР4 були достовірно вищими в групі дітей з інвазивними бактеріальними інфекціями, порівняно з контрольною групою. Дослідна група також характеризувалась значною варіативністю в значеннях спонтанної експресії CD62L, що в поєднанні з високим рівнем спонтанної експресії CD11b свідчило про активний запальний стан. Вищий рівень індукованої експресії у відповідь на стимуляцію бактеріальними лігандами ТЛР2 та ТЛР4, але не ТЛР7 та ТЛР8, свідчить про попередню сенсibiliзацію бактеріальними антигенами та «праймінг» гранулоцитів, що є важливою передумовою повноцінної активації гранулоцитів.

**Ключові слова:** Толл-подібні рецептори, бактеріальні інфекції, гранулоцити.

УДК 616-022.7- 053.2:616.155.3

### АКТИВАЦИЯ ГРАНУЛОЦИТОВ, ОПОСРЕДОВАННАЯ ТОЛЛ-ПОДОБНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ ПРИ ИНВАЗИВНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Осипчук Д. В.

**Резюме.** В этой работе исследовали активацию гранулоцитов, опосредованную Толл-подобными рецепторами у детей с инвазивными бактериальными инфекциями. Стимуляция ТЛР2, ТЛР4, ТЛР7 и ТЛР8 приводила к значительному росту экспрессии интегрин CD11b и шедингу молекулы адгезии CD62L на гранулоцитах. Спонтанный уровень экспрессии CD11b и уровни индуцированной экспрессии – после инкубации с лигандами ТЛР2 и ТЛР4, были достоверно выше в группе детей с инвазивными бактериальными инфекциями по сравнению с контрольной группой. Группа детей с бактериальными инфекциями, также характеризовалась значительной вариативностью в значениях спонтанной экспрессии CD62L, что в сочетании с высоким уровнем спонтанной экспрессии CD11b свидетельствовало об активном воспалительном состоянии. Высокий уровень индуцированной экспрессии в ответ на стимуляцию бактериальными лигандами ТЛР2 и ТЛР4, но не ТЛР7 и ТЛР8, свидетельствует о предварительной сенсibiliзации бактериальными антигенами и «прайминг» гранулоцитов, что является важным условием полноценного иммунного ответа.

**Ключевые слова:** Толл-подобные рецепторы, бактериальные инфекции, гранулоциты.

UDC 616-022.7- 053.2:616.155.3

### ACTIVATION OF GRANULOCYTES MEDIATED BY TOLL-LIKE RECEPTORS IN INVASIVE BACTERIAL INFECTIONS

Osypchuk D. V.

**Abstract.** In this study, we examined the activation of granulocytes mediated by Toll-like receptors (TLR), in the group of children with invasive bacterial infections. Stimulation of TLR2, TLR4, TLR7 and TLR8 led to a significant increase in the expression of integrin CD11b and shedding of adhesion molecules CD62L on granulocytes. Level of spontaneous expression of CD11b integrin in the group of children with invasive bacterial infections was significantly higher –  $440,7 \pm 177,8$  MFI compared with the control group ( $242,1 \pm 94,9$  MFI,  $P < 0,01$ ). Level of spontaneous expression of CD62L was significantly lower compared to control group ( $45,7 \pm 29,6$  MFI and  $78,3 \pm 12,2\%$ ,  $P < 0,05$ , respectively). Study group also characterized by a large variability in the values of the spontaneous expression of CD62L, which, combined with high levels of spontaneous expression of CD11b indicative of an active inflammatory state and confirms the possibility of using these markers as indicators of inflammation.

For correct analysis of experimental data, the study group was divided into two subgroups depending on the spontaneous expression of CD62L. The first subgroup (1a) included samples with higher or equal to 35% CD62L<sup>+</sup> granulocyte (the lowest rate of CD62L expression in the control group). The 1b subgroup included samples with percentage of CD62L<sup>+</sup> granulocytes below 35%.

Both subgroups of children with invasive bacterial infections showed significantly higher levels of CD11b expression induced in response to stimulation of TLR2 and TLR4. In the 1a subgroup the expression level reached  $755,6 \pm 214,5$  and  $746,07 \pm 155$  in the 1b subgroup, that was significantly higher compared to control group ( $P < 0,05$ ). The level of expression of adhesion molecules CD62L upon activation of TLR2 reached the lowest rate in the control group –  $4,5 \pm 1,9\%$ , which is statistically different from the residual level of expression in the 1a subgroup –  $10,1 \pm 8,2\%$  ( $P < 0,05$ ). The level of expression of CD62L in group 1b was  $5,3 \pm 2,1\%$  and there was no statistical significance compared with other groups. As after incubation with peptidoglycan, levels of CD11b expression after incubation with lipopolysaccharide, in the subgroups 1a and 1b, were significantly higher compared to control group. The highest level of CD62L expression after incubation with lipopolysaccharide was observed in the subgroup 1a –  $7,6 \pm 5,3\%$ , there was no statistical significance compared with other groups. Increased expression of CD11b mediated by activation of TLR2 and TLR4 indicates previous sensitization of bacterial antigens and priming of granulocytes, which is an important prerequisite for full activation of granulocytes.

Activation of TLR7/8 that recognize viral ssRNA, led to an increase in integrin expression, but induced expression levels did not differ between the experimental groups. In the first subgroup, the level of residual CD62L expression on granulocytes after activating ligands TLR2 and TLR7/8, was significantly higher than in the control group. Such residual expression of adhesion molecules on granulocytes, once activated, can contribute to enhanced cell migration to sites of inflammation due to tighter contact with the endothelium. Due to the low spontaneous expression of CD62L in subgroup 1b, performance CD62L expression, is activated after inconsistent.

Higher levels of induced expression in response to stimulation by bacterial ligands of TLR2 and TLR4, but not TLR8 and TLR7, indicates previous sensitization of bacterial antigens and priming of granulocytes, which is essential for the full activation of immune response.

**Keywords:** Toll-like receptors, bacterial infections, granulocytes.

*Рецензент – проф. Лобань Г. А.*  
Стаття надійшла 01.02.2016 року