

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

В. А. Кратасюк

\_\_\_\_\_

подпись

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

06.04.01 – Биология

06.04.01.03 – Биофизика

Фагоцитарная активность клеток крови больных полипозным риносинуситом в  
ответ на метициллин-резистентные штаммы *Staphylococcus aureus*

Научный руководитель

д.б.н., доцент О. А. Коленчукова

\_\_\_\_\_

Выпускник

Д. И. Тюменцева

\_\_\_\_\_

Рецензент

д.м.н., профессор К. Г. Добрецов

\_\_\_\_\_

Красноярск 2018

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Фагоцитарная активность клеток крови больных полипозным риносинуситом в ответ на метициллин-резистентные штаммы *Staphylococcus aureus*» содержит 44 страниц текстового документа, 44 использованных источников.

Цель работы: оценить фагоцитарную активность клеток крови больных полипозным риносинуситом при воздействии метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus*.

Проводилась оценка фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов крови у больных полипозным риносинуситом при воздействии метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus* относительно контрольной группы методами хемилюминесценции и проточной цитометрии.

В ходе исследования было обнаружено, что у больных полипозным риносинуситом активность фагоцитов крови в ответ на антибиотикорезистентные штаммы выше относительно контроля.

Ключевые слова: ФАГОЦИТОЗ, НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ГРАНУЛОЦИТЫ, МОНОЦИТЫ, ПОЛИПОЗНЫЙ РИНОСИНУСИТ, ЗОЛОТИСТЫ СТАФИЛОККОК, ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ, БАКТЕРИИ.

# СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ.....	6
1.2 ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИИ <i>Staphylococcus</i> .....	8
1.4 ФАГОЦИТОЗ.....	12
1.5 ПОЛИОЗНЫЙ РИНОСИНОСИТ.....	18
2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	21
2.1 ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	21
2.2 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	21
2.2.1 МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.....	21
2.2.1.1 ВЫДЕЛЕНИЕ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
2.2.1.2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
2.2.2 ВЫДЕЛЕНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ И МОНОЦИТОВ ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ.....	22
2.2.3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОРОД-НЕЗАВИСИМОГО ФАГОЦИТОЗА.....	23
2.2.4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОРОД-ЗАВИСИМОГО ФАГОЦИТОЗА.....	24
2.3 СТАТИСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	25
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ.....	26
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	38
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	39
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	40

## ВВЕДЕНИЕ

Полипозный риносинусит (ПРС) — хроническое воспалительное заболевание слизистой оболочки полости носа и околоносовых пазух, характеризующееся образованием и рецидивирующим ростом полипов, состоящих преимущественно из отечной ткани, инфильтрированной эозинофилами или нейтрофилами в зависимости от формы заболевания. Основным клиническим проявлением заболевания является образование и рецидивирующий рост полипов [1]. Полипы — это доброкачественные новообразования, которые располагаются на стенках полых органов, имеющих слизистую оболочку. На сегодняшний день до конца не известны точные причины появления полипов в носовой полости. Но установлены некоторые факторы: наличие грибковых инфекций, аллергические реакции в организме, хронические воспаления, которые сопровождаются гнойными выделениями из носа, муковисцидоз и даже наследственная предрасположенность. Полипозный риносинусит в большинстве случаев развивается в совокупности нескольких факторов и редко становится следствием, какой-то одного из этих причин. Одной из причин развития ПРС являются бактерии *Staphylococcus aureus*. Бактерии золотистого стафилококка являются своеобразными суперантигенами, которые способны поддерживать эозинофильный воспалительный процесс. Было обнаружено влияние энтерокина золотистого стафилококка на рост и развитие полипов, как суперантигена. Роль бактерий в этиологии заболевания подтверждает образование «нейтрофильных» новообразований или полипозного гнойного риносинусита [2].

Известно, что при стафилококковой инфекции киллинг бактерий осуществляется в основном с участием кислород-зависимой ферментной системы. При этом, как показывают результаты исследования, на этапах инициации инфекции реактивность этих бактерицидных систем зависит как от вида, так и от степени вирулентности возбудителя [3, 4].

Одной из главных систем защиты организма от чужеродных агентов является фагоцитоз, но играет важную роль при гнойно-воспалительных заболеваниях, особенно при стафилококковой инфекции, так как выполняет защитную функцию организма. Нейтрофильные гранулоциты и моноциты являются фагоцитирующими клетками, которые направлены на антибактериальную защиту, являются мощными эффекторами и запускают механизмы каскадных реакций, предотвращая развитие воспаления. Моноциты первыми мобилизуются в очаг воспаления и, от их фагоцитарной активности зависит элиминация возбудителя [4, 5, 6].

В связи с этим, актуальным является исследование фагоцитарной активности клеток крови у больных полипозным риносинуситом при воздействии бактерий устойчивых к метициллин-резистентным штаммам *Staphylococcus aureus*.

Таким образом, целью исследования является оценка фагоцитарной активности клеток крови больных полипозным риносинуситом при воздействии метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus*.

Для достижения данной цели, поставлены следующие задачи:

1. Определение первичных радикалов кислорода выделяемых нейтрофильными гранулоцитами и моноцитами крови при воздействии метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus*.
2. Определение вторичных радикалов кислорода выделяемых нейтрофильными гранулоцитами и моноцитами крови при воздействии метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus*.
3. Определение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов крови при воздействии метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus*.
4. Определение фагоцитарной активности субпопуляций моноцитов крови при воздействии метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus*.

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Хемилюминесценция

Хемилюминесценция (ХЛ) – это явление, при котором химическая реакция сопровождается выделением кванта света, т.е. свечением. На основании данного явления существуют различные методы исследования, получившие широкое распространение во множестве отраслей. Это аналитическая химия – высокочувствительный анализ обнаружения различных веществ; экологический мониторинг воздуха, вод и почв; исследование продуктов питания: овощей, фруктов и масел. Также метод применим в области биомедицины. С помощью ХЛ проводят разнообразные клинические и фармакологические исследования, в том числе анализ количества АФК и работы АОС [7]. Типичная ХЛ реакция отображена в формуле (4)



где, А и В – исходные вещества;

С, D – продукты реакции;

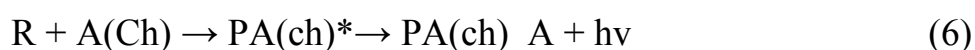
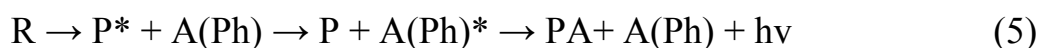
С\* – электронно-возбужденное состояние;

hV – квант света.

Электронно-возбужденное состояние достигается путем электронного перехода молекул, с образованием разрыхляющей орбитали, что приводит к повышению энергии, которая выделяется квантом света. Наибольшее значение имеют  $n \rightarrow \pi^*$ - и  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходы, притом вероятность  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходов достаточно велика, и поэтому соответствующие полосы поглощения обладают достаточной интенсивностью [7, 8].

Реакции образования АФК обладают собственной хемилюминесценцией. Например, образование синглетного кислорода ( ${}^1O_2$ ). Образованный синглетный кислород переходит в основное (триплетное состояние), реакция сопровождается выделением кванта света. Стоит заметить, что реакции

образования АФК обладают низкой интенсивностью ХЛ, т.н. сверхслабое свечение. Фиксирование такого свечения весьма затруднительно, и редко применяется в лабораторной практике. Для увеличения свечения применяют специальные вещества, называемые активаторами ХЛ-свечения. По механизму действия разделяют физические и химические активаторы. Физические активаторы не влияют на химическую реакцию, но способны увеличивать квантовый выход испускания фотона путем физического переноса энергии от возбужденного продукта к молекуле активатора. Процесс описывается формулой (5). При физическом активировании ХЛ достигается увеличение квантового выхода на 3-4 порядка. Физическими активаторами являются: родамин Ж, кумарины, хлорофилл А и другие [9, 10].



где, R – радикал;

R – продукт реакции;

A(Ph) – физический активатор;

A(Ch) – химический активатор

RA(ch) – продукт превращения молекулы активатора;

R\* A\* – электронно-возбужденное состояние;

hV – квант света.

Химические активаторы, напротив участвуют в химической реакции и являются продуктом реакции, что отображено на формуле (6). При химической активации, реакция, по сути, идет иным путем. Для лабораторного выявления свободных радикалов применяют следующие химические активаторы: люминол (3-аминофталевый гидразид), люцигенин и пенициллин G [9, 10, 11, 12]. Люминол был открыт в 1928 году Албрехтом. Это вещество помогает выявить весь пул АФК, а также суммарную активность миелопероксидазы и NADPH-оксидазы и др. ферментов, а также ионы некоторых металлов. Для

сравнения, при помощи люцигенина можно измерить только образование супероксидного анион-радикала и активность NADPH-оксидазы [7, 13].

## 1.2 Характеристика бактерии *Staphylococcus*

Стафилококки относятся к роду *Staphylococcus*, который был открыт в 1880 году Пастером и Огстоном. Название *Staphylococcus* дал Огстон (*staphyle* - гроздь, *coccus* - зернышко, ягода), а описание рода - Розенбах. Род включает в себя более 32 видов, важными для человека является около 8 видов, классификация построена изучения фенотипических свойств и генотипических признаков. Стафилококки - это грамположительные кокки, в чистой культуре характерно скопление в виде гроздьев винограда (свойственно деление в различных плоскостях), могут образовывать микрокапсулу, но не образуют спор. Растут на простых питательных средах (МПА - мясопептонный агар, МПБ - мясопептонный бульон), являются галофильными т.к. размножаются при высоких концентрациях NaCl (10 - 15%), используется при изготовлении элективной среды ЖСА - желточно-солевого агара. Стафилококки чувствительны к красителям (бриллиантовому зеленому, кристаллическому фиолетовому) [14].

Существуют разнообразные пути передачи стафилококка, например, артифициальный (через нестерильные медицинские инструменты), фекально-оральный (пищевой), аэрогенный (воздушно - пылевой, воздушно-капельный) и другие. Восприимчивость к стафилококкам высокая, так как поражаются больные с иммунодефицитом, вызванным разными причинами (травма, операция, сахарный диабет и т.д.) [15].

Также не меньшую опасность представляет эндогенная инфекция вызванная стафилококками — представителями собственной нормальной микрофлоры. Аутоштаммы увеличивают свою вирулентность и вызывают патологический процесс как в исходном биотопе, так и в других биотопах организма за счет миграции и транслокации при уменьшении иммунного статуса организма [15].



Продуцируемый некоторыми стафилококками энтеротоксин обуславливает возникновение пищевых отравлений. У стафилококков легко развивается резистентность ко многим противомикробным препаратам, что создает большие трудности при лечении больных [16].

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) является первым микроорганизмом, у которого обнаружена устойчивость к антибиотикам. Со стафилококка началась история изучения пенициллиназы — первой в ряду  $\beta$ -лактамаз и т.д.

Выработка антибиотикорезистентности у золотистого стафилококка. Поскольку развитие и широкое клиническое применение пенициллина в начале 1940 года отмечен началом «эры антибиотиков», сообщения о штаммах золотистого стафилококка и их устойчивостью к пенициллину в 1942 отмечен началом нашей критической, непрекращающейся борьбе против антибиотика сопротивлением [17].

Резистентные к пенициллину стафилококки, составляют почти 80 % клинически важных изолятов. Резистентность к пенициллину обусловлена выработкой пенициллиназы, не действует на полусинтетические пенициллины (оксациллин и метициллин), а также на карбапенемы и цефалоспорины, но разрушает амино- и уреидо-пенициллины. Синтез пенициллиназы индуцируется  $\beta$ -лактамными антибиотиками [17].

Метициллин-резистентный стафилококк (MRSA) — любой штамм бактерии золотистого стафилококка, который устойчив к большой группе антибиотиков — бета-лактамов. MRSA адаптировался к выживанию в присутствии метициллина, диклоксациллина и оксациллина. Наиболее часто именно с ним связаны внутрибольничные (нозокомиальные) инфекции. Клиническое значение метициллинрезистентности является предметом интенсивного изучения. Известно, что уровень летальности при бактериемиях, вызываемых MRSA, достоверно выше, чем при инфекциях, обусловленных чувствительными штаммами. Особое беспокойство вызывает практически повсеместное повышение частоты выделения MRSA [4,18].

В процессе эволюции стафилококки приобрели способность к угнетению фагоцитарной функции лейкоцитов крови путем блокирования опсонизирующих веществ (комплемента и иммуноглобулина G), а также путем непосредственного токсического действия на фагоциты. Нейтрофилы не способны к образованию интермедиатов кислорода, при нарушении окислительного метаболизма, вследствие этого организм становится особенно чувствителен к золотистому стафилококку [19, 20].

### **1.3 Фагоцитарные клетки периферической крови**

#### **1.3.1 Характеристика и функции нейтрофильных гранулоцитов**

Основную массу лейкоцитов составляют нейтрофильные гранулоциты. Зрелые клетки этого ряда-сегментоядерные НГ — подвижные, высокодифференцированные и высокоспециализованные клетки крови, которые тонко реагируют на функциональные и органические изменения в организме, выполняя фагоцитарную и бактерицидную функции [21].

В физиологических условиях нейтрофильные гранулоциты в кровяном русле распределяются на две приблизительно равные части- пристеночный (маргинальный) пул и центральный, находящийся в центре кровотока. При эмоциональном напряжении, после приема пищи, введения ряда гормонов (катехоламинов, глюкокортикостероидов и т.д.) лейкоциты из маргинального русла поступают в центральный [21, 22].

Продолжительность жизни нейтрофильных гранулоцитов в среднем 14 дней, из них 5-6 дней они созревают и задерживаются в синусах костного мозга, от 30 до двух дней циркулируют в периферической крови, 6-7 дней находятся в тканях, откуда они уже не возвращаются в кровяное русло [21].

Нейтрофилы обладают высокой фагоцитарной способностью и подвижностью, способны к хемотаксису. Они поглощают бактерии и другие частицы, которые перевариваются под действием гидролитических ферментов. Жизненный цикл нейтрофилов достигает до 8 сут. В 8-12 ч находятся

кровеносном русле, а затем выходят в соединительную ткань, где выполняют свои функции [23].

Биологическое значение НГ заключается в том, что они доставляют в очаг воспаления большое количество разнообразных протеолитических ферментов, играющих важную роль в процессе рассасывания некротических тканей. Исследования последних лет показали, что гранулоциты могут также выделять в кровь вещества, обладающие бактериальными и антитоксическими свойствами, а также пирогенные вещества, вызывающие лихорадку, и вещества, поддерживающие воспалительный процесс [21, 24].

### **1.3.2 Характеристика и функции моноцитов**

В 1839 г. R.Ebert и H.Florey обнаружили, что моноциты из кровяного русла мигрируют в ткани, где превращаются в макрофаги. Провоспалительные, метаболические и инфекционные стимулы существенно усиливают миграцию моноцитов из кровотока. В тканях и органах моноциты превращаются не только в макрофаги, но и в дендритные клетки. Первоначально макрофаги были отнесены к клеткам ретикулоэндотелиальной системы. Но из-за трудности различия между «истинными» синусоидальными эндотелиальными клетками и макрофагами, выстилающими синусы, возникло понятие о моноцитарно-макрофагальной системе, включающей костномозговые предшественники, моноциты и гетерогенную популяцию макрофагов [25].

Развитие моноцитов начинается в костном мозге, где в течение 2-3 дней из стволовых клеток развиваются клетки, образующие гранулоцитарно-макрофагальные колонии, монобласты, промоноциты и моноциты. В сутки из костного мозга в кровяное русло поступают 5 на 108 моноцитов. Моноциты циркулируют в кровяном русле примерно 18 ч. С помощью комплекса механизмов, в котором принимают участие цитокины и адгезивные молекулы, они проникают в различные органы и ткани [26, 27]. Под влиянием внеклеточного матрикса, поверхностных молекул окружающих клеток и их продуктов моноциты дифференцируются в различные типы резидентных

макрофагов: клетки Купфера в печени, тканевые макрофаги соединительной ткани, остеокласты костной ткани, микроглия нервной ткани, макрофагальноподобные А-клетки синовиальной оболочки. Макрофаги располагаются в слизистой оболочке желудочно-кишечного, дыхательного и урогенитального трактов, в интерстициальной ткани сердца, почек, поджелудочной железы, в серозных полостях [28].

Популяции моноцитов различаются по экспрессии CD14 и CD16, и значительно отличаются друг от друга по своим функциональным свойствам, к числу которых относятся профиль синтезируемых цитокинов и хемокинов, способность к фагоцитозу, а также синтезу и секреции активных форм кислорода и оксида азота [28]. В связи с этим функциональные особенности моноцитов могут также оцениваться и по уровню «респираторного взрыва», который характеризуется хемилюминесцентной активностью клеток при их взаимодействии с объектами фагоцитоза [29]. Циркулирующие моноциты можно разделять по фенотипическим характеристикам как минимум на две популяции, различающиеся по уровням экспрессии поверхностных молекул – компонента рецепторного комплекса для бактериального липопосахарида CD14 и высоко аффинного рецептора Fcγ CD16. Клетки, несущей на своей поверхности только CD14, принято называть «классическими моноцитами», так как в норме они составляют до 95% от общего числа циркулирующих моноцитов. Тогда как моноциты, обладающие фенотипом CD14+CD16+, определяются как «неклассические» или «провоспалительные» [30].

#### **1.4 Фагоцитоз**

Мечников И. И. получил Нобелевскую премию за открытие защитной функции макрофагов (явление фагоцитоза). Первым ответом иммунной системы организма на проникновение чужеродных антигенов является фагоцитоз [31].

Таблица 1– Стадии фагоцитоза

Стадия	Событие	Факторы клетки-мишени	Факторы фагоцита
Хемотаксис	Направленное движение фагоцита к объекту	Хемотаксины: бактериальные, C5a, C3a, хемокины, лейкотриены и др.	Рецепторы хемотаксических факторов, цитоскелет
Адгезия	Установление контакта (прилипание фагоцита к объекту)	Опсонины (антитела, C3b, фибронектин), молекулы адгезии	Молекулы адгезии (интегрины и др.), рецепторы (FcγR, C3R и др.)
Активация мембраны	Подготовка к поглощению	Интегрины, опсонины, защитные факторы микроорганизмов	Белки G, Ca <sup>2+</sup> , сигнальные факторы, киназы, цитоскелет
Погружение	Обволакивание объекта	Защитные факторы, препятствующие фагоцитозу	Цитоскелет (микрофиламенты)
Образование фагосомы	Замыкание мембраны и погружение	Не установлены	Цитоскелет (микротрубочки, микрофиламенты), мембрана
Образование фаголизосомы	Слияние фагосомы и лизосомы	Блокирующие агенты (подавляют слияние)	То же
Киллинг и переваривание	Гибель объекта и его переваривание	Факторы устойчивости	O <sub>2</sub> - и NO-зависимые факторы, катионные белки, пептиды, ферменты, закисление
Выброс продуктов деградации	Выброс содержимого фаголизосомы из клетки	Не установлены	Цитоскелет, мембрана

В процессе фагоцитоза клетки захватывают и переваривают твёрдые частицы. Так как фагоцитоз – один из видов эндоцитоза, у некоторых клеток он используется для получения полезных веществ, и для одноклеточных организмов подобен питанию. Однако, у многоклеточных организмов фагоцитоз выполняет функцию удаления отходов и патогенов [32].

Пищеварительная функция – основное эволюционное формирование фагоцитоза как иммунологического феномена. Предковые одноклеточные организмы поедают и переваривают чужеродные частицы внешней среды с целью питания. Такой тип питания сохранился у современных губок, кишечнополостных и протозоа. Прокариоты, среди которых встречается много патогенных микроорганизмов и неструктурированные вещества являлись источником питания [31]. Фагоцитарная функция макрофагов-амебоцитов сохранилась в эволюции от одноклеточных до высших многоклеточных, включая млекопитающих, несмотря на усовершенствование в филогенезе механизмов иммунной защиты. Механизм фагоцитоза включает 8 последовательных фаз (табл. 1).

Инициатором процесса служит образование на поверхности клетки комплекса антиген-антитело. Опсонизация обеспечивается присутствием небольшого количества в организме молекул антител («нормальные антитела»). Антитела, находящиеся на поверхности чужеродной клетки, присоединяют к ним белков системы комплекса и стимулируют активацию. Образующаяся система действует как промотор следующих стадий фагоцитоза, стимулирует прямо или через посредство других клеток образование веществ, усиливающих эффект опсонизации чужеродной клетки [31].

Фагоциты способны осуществлять киллинг микроорганизмов с помощью двух принципиально различных механизмов: кислород-независимого и кислород-зависимого.

Кислород-независимый механизм реализации антимикробной реактивности моноцитов, нейтрофильных гранулоцитов, следует отметить цитоплазматические гранулы, которые содержат дополнительные

антимикробные агенты, которые действуют в фаголизосомах без присутствия кислорода. В настоящее время хорошо охарактеризованы три компонента гранул: В/РІ (бактерицидный/повышающий проницаемость белок), CLCP (химотрипсиноподобный катионный белок; катепсин-G) и дефенсины [32].

В/РІ – белок азурофильных гранул, обладающий бактерицидной активностью в отношении грамотрицательных бактерий. Причиной потери жизнеспособности бактерий является повышение их проницаемости путем деградации пептидогликанов и фосфолипидов. Избирательность по отношению к грамотрицательным бактериям определяется взаимодействием с ЛПС. CLCP – также содержится в азурофильных гранулах, включает в себя три катионных белка с перекрестной иммунологической реактивностью, которые *in vitro* обладают антибактериальной и химотрипсиновой активностями. Дефенсины – это группа низкомолекулярных пептидов, богатых цистеином. Эти пептиды проявляют активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов и вирусов. Дефенсины нейтрофилов человека подвергают киллингу только метаболически активные бактерии и индуцируют потерю целостности их внешней и внутренней мембран.

Кислород-зависимый путь – это «респираторный взрыв», который относится к комплексу метаболических процессов, которые имеют место при стимуляции фагоцитоза. А именно это: увеличение потребления кислорода и усиление окисления глюкозы в пентозофосфатном цикле (ПФП), и как результат этого – продукция АФК, которые, в свою очередь, обладают бактерицидным действием и обеспечивают цитотоксический эффект. Именно на регистрации интенсивности «респираторного взрыва» основаны многие клинико-диагностические методы оценки состояния организма, в частности и хемилюминесцентный анализ, используемый в данном исследовании. За счет реакции окисления НАДФН, который образуется при окислении глюкозы, и восстановления молекулы кислорода до супероксидного аниона, мембраноассоциированная пиридиннуклеотидоксидаза катализирует респираторный взрыв [33].

«Респираторный взрыв» обычно сопутствует фагоцитозу. Однако усиление клеточного «дыхания» и повышение активности ПФП наблюдается и при взаимодействии с крупными объектами, недоступными эндоцитозу, а также при стимуляции растворимыми агентами. В этих случаях моноциты выделяют оксиданты во внеклеточную среду, где они выполняют такие же функции, как внутри фагосомы.

Свободным радикалом называют любой атом или молекулу, на внешнем энергетическом уровне которого присутствует один неспаренный электрон, что придает радикалу высокую химическую активность. Свободные радикалы кислорода принято называть активными формами кислорода (АФК) [12, 33].

При дыхании основное количество кислорода (98%) используется для получения энергии в процессах тканевого дыхания, однако небольшое количество (2-5 %) переходит в АФК. К числу АФК относят свободные радикалы кислорода: супероксид анион-радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ), перегидроксильный радикал ( $HO_2^{\bullet}$ ), гидроксильный радикал ( $HO^{\bullet}$ ), перекись водорода ( $H_2O_2$ ) синглетный кислород ( $^1O_2$ ), озон ( $O_3$ ), гипохлорит ( $HOCl$ ) и другие вещества [33, 34].

АФК образуются в ходе аэробных процессов во многих частях клетки: митохондрии, лизосомы, пероксисомы, ядро, эндоплазматический ретикулум (ЭПР), плазматическая мембрана, цитозоль [33]. Рассмотрим основные пути образования АФК. В ходе неполного одно-трехэлектронного восстановления  $O_2$  по формуле (1) могут образовываться следующие АФК: супероксид кислорода, перекись водорода, а также гидроксил-радикал. Изначально молекула  $O_2$  присоединяет один неспаренный электрон и переходит в супероксид. Два радикала кислорода по формуле (2) могут образовывать пероксидное соединение [34]. Донорами электронов для данных реакций могут выступать ионы переходной валентности (железо ( $Fe^{2+}$ ), медь ( $Cu^+$ )), которые образуются в плазме или межтканевой жидкости при взаимодействии с супероксидным радикалом, реакция при участии ионов



железа представлена в формуле (4). Далее по формуле (4) идет образование агрессивного радикала: гидроксила [12, 34].

АФК разрушают нуклеотидные пары в молекулах нуклеиновых кислот путем окисления ОН-группы, что ведет к нарушениям в структуре РНК, ДНК, а также рибосомальной дисфункции и, как следствие, наблюдаются нарушения в синтезе белка. Повреждения ДНК могут вызывать мутации, которые могут быть, в том числе, канцерогенными. Нарушения, вызванные окислительными процессами, способствуют множеству патологических состояний, в числе которых: нейродегенеративные заболевания (болезни Альцгеймера, Паркинсона, латеральный амиотрофический склероз), эмфизема, сердечнососудистые заболевания, катаракта, рак и другие патофизиологические состояния. Существуют данные о корреляции окислительного стресса в качестве источника или результата с более чем 100 заболеваниями [12].

АФК нарушают ненасыщенные связи в липидных молекулах, из которых состоит билипидный слой клеточных мембран. Следовательно, наблюдается потеря текучести мембран, нарушение рецепторов и последующий клеточный лизис. Все аминокислоты также чувствительны к окислению. В результате окисления аминокислот, может нарушиться процесс свертывания белковой глобулы, что приводит, например, к потере активности ферментов. Окислительные повреждения углеводов способны изменить любую из функций клеточных рецепторов [12, 33, 34].

Несмотря на высокую токсичность, АФК являются необходимыми для жизнеобеспечения метаболитами. АФК способствуют образованию некоторых биологически активных веществ, например, простагландинов – внутриклеточных регуляторов, которые синтезируются в ответ на различные воздействия. Так, для синтеза простагландина  $H_2$  ( $RGH_2$ ) арахидоновая кислота окисляется под действием АФК [12, 33]. Благодаря способности окислять белки и изменять белковую глобулу, осуществляется протеолиз, что необходимо для активации ряда ферментов. Например, прямое действие  $H_2O_2$  повреждает порфириновые структуры, что приводит к инактивации гем-содержащих

ферментов и окислению ДНК, липидов, -SH группы аминокислот и кето-кислот [33, 34].

Существенна роль АФК в реакциях клеточного иммунитета, под воздействием АФК происходит обезвреживание бактерий и других патогенных агентов. При обнаружении чужеродного агента иммунные клетки – нейтрофилы выбрасывают АФК в кровь, т.н. «кислородный или респираторный взрыв» для окисления этих веществ [12, 13, 34]. Существует и иное влияние АФК на иммунные реакции. Активированные чужеродным агентом макрофаги обеспечивают первейшую иммунную защиту. Эти клетки выделяют АФК, что является фактором, повышающим порог активации Т-лимфоцитов. Благодаря влиянию АФК, необходима меньшая концентрация антигенных пептидов, для инициации пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов, что увеличивает скорость иммунного ответа [12, 33].

Таким образом, огромное разнообразие микроорганизмов, атакующих клетки человека, определило многообразие бактерицидных механизмов, действующих как в аэробных, так и анаэробных условиях.

### **1.5 Полипозный риносинусит**

Полипозный риносинусит (ПРС) — хроническое воспалительное заболевание слизистой оболочки полости носа и околоносовых пазух, характеризующееся образованием и рецидивирующим ростом полипов, состоящих преимущественно из отечной ткани, инфильтрированной эозинофилами или нейтрофилами в зависимости от формы заболевания. Основным клиническим проявлением заболевания является образование и рецидивирующий рост полипов [1]. Полипозный риносинусит выявляется при многих патологических состояниях: кистозном фиброзе, синдроме Штрауса, Юнга, Картагенера, сочетается с заболеваниями органов дыхания (57%), с опухолевыми процессами (12%), рядом аллергических заболеваний (бронхиальной астмой - 29-35%, лекарственной аллергией - 8%, аллергическим грибковым синуситом и др.) [25]. Назальный полипоз выявляется у 2,1-4,3%

взрослого населения, преимущественно у мужчин (2,2:1), лиц старших возрастных групп (средний возраст заболевших – 49,4 года). Он часто осложняет течение бронхиальной астмы [36].

До настоящего времени нет единого мнения об этиологии и патогенезе полипозного процесса в полости носа и околоносовых пазухах, поэтому существует много теорий возникновения этой болезни, основные из них: анатомические факторы, остеит, инфекционно-аллергическая, аутоиммунная, нарушение метаболизма арахидоновой кислоты.

Анатомические факторы рассматриваются как один из факторов в развитии ПРС. Они включают в себя пневматизированные клетки средней носовой (concha bullosa), искривление перегородки и вариации в конфигурации крючковатого отростка. Несмотря на предлагаемые механизмы анатомической изменчивости, ведущей к ПРС, многочисленные исследования не показали никакой разницы в распространенности анатомических различий между пациентами с ПРС и здоровыми людьми [37].

Остеит является еще одним возможным этиологическим фактором ПРС. Пациенты с ПРС часто имеют области выраженного костного утолщения на компьютерной томографии. Было высказано предположение, что это неравномерное утолщения и увеличение плотности костной ткани могут быть признаком воспаления кости, что приводит к персистенции воспаления вышележащей слизистой оболочки [38]. Остеит характеризуется различной степенью активности остеокластов и активности остеобластов, что приводит к нарушению организации пластинчатости кости и приводит к образованию незрелых тканевых участков кости [39].

Инфекционно-аллергическая теория осуществляется на том, что возникновение полипозных изменений слизистой оболочки с формированием в последующем полипов носа и околоносовых пазух можно рассматривать, как продолжение развития продуктивного процесса вследствие иммунопатологических изменений при хронических инфекционно-аллергических риносинуситах. Бактерии могут участвовать в развитии

воспаления при ПРС [40]. Положительные кожные пробы к одному бактериальному антигену были выявлены у 27,3% больных ПРС, а у 54.2% пациентов-к нескольким бактериальным антигенам. Чаще у этих пациентов наблюдалась сенсбилизация стафилококком и стрептококком [41].

Сторонники аутоиммунной концепции патогенеза ПРС полагают, что одним из пусковых моментов развития аутоаллергического процесса может служить воздействие на ткань инфекционного агента, который, взаимодействуя со слизистой оболочкой полости носа, приводит ее в состояние хронического воспаления. В таком случае развитие полипов характеризуется склонностью к быстрому рецидивированию после удаления, аналогично вышеизложенному. Наряду с отеком, эозинофильной инфильтрацией, а также тканевыми признаками аутоагрессии в крови определяются аутоантитела к полипозным структурам, поскольку при этой форме всегда имеет место иммунодефицит по клеточному и гуморальному типу, что способствует развитию аутоиммунного механизма, который становится ведущим в рецидивировании полипов. В результате сама слизистая оболочка приобретает свойства антигена [41].

Нарушение метаболизма арахидоновой кислоты. Ключевая роль в современных исследованиях патогенеза АТ по-прежнему, отводится особенности метаболизма арахидоновой кислоты, стимуляции аспирином повышенной продукции лейкотриенов и изучается повышенная чувствительность к ним дыхательных путей. В норме существует два пути метаболизма арахидоновой кислоты: фермент циклооксигеназа превращает арахидонат в простагландины, тромбоксаны и простаглицлин, часть из которых обладает бронхоконстрикторными свойствами (простаглицлин F2a, тромбоксан A2). Другие продукты циклооксигеназного пути расщепления арахидоновой кислоты – простаглицлин E2, простаглицлин, – напротив, оказывают противовоспалительное и бронходилатирующее действие. Второй путь распада арахидоновой кислоты при участии фермента липоксигеназы приводит к образованию эйкозаноидов с исключительно провоспалительными и бронхоконстрикторными свойствами – лейкотриенов (ЛТ) [42, 43].

## **2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Объекты исследования**

Объектами исследования служили нейтрофильные гранулоциты, моноциты крови, выделенные у больных полипозным риносинуситом (n=43). Группу контроля составили нейтрофильные гранулоциты и моноциты крови, выделенные у здоровых людей сопоставимых по полу и возрасту. Также штаммы *Staphylococcus aureus* устойчивых (MRSA) и чувствительных (MSSA) к действию метициллина.

### **2.2 Методы исследования**

#### **2.2.1 Микробиологические методы**

##### **2.2.1.1 Выделение штаммов бактерий *Staphylococcus aureus***

Для взятия образцов патологического материала со слизистой оболочки носа, носоглотки раневого отделяемого, мокроты и бронхиального содержимого и транспортировки для дальнейших исследований, используются стерильные тумферы с коммерческой транспортной средой Эймса.

##### **2.2.1.2 Определение антибиотикорезистентности штаммов бактерий *Staphylococcus aureus***

Для выявления метициллинрезистентных штаммов *S. aureus* использовали метод скрининга на агаре. Для проведения скрининга использовали агар Мюллера-Хинтон, содержащий 4% NaCl и 6,0 мкг/мл оксациллина. Микробную взвесь готовили методом прямого суспендирования из нескольких однотипных изолированных колоний стафилококков. В стерильном физиологическом растворе и доводили до мутности 0,5 по Мак Фарланду ( $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл). Инокуляцию чашек с агаром проводили с помощью стерильного ватного тампона. Культуру наносили на ограниченную

поверхность (диаметром 10-15 мм). Штаммы *S. aureus* инкубировали при температуре 35<sup>0</sup> С в течение полных 24 часов. После инкубации чашки просматривали. Появление видимого роста на месте нанесения культуры считали проявлением устойчивости данного штамма к метициллину. Исследование проводили при обязательном контроле роста испытуемых культур на агаре Мюллера-Хинтон с 4% NaCl без метициллина (культуры наносили также, как на агар с метициллином).

### **2.2.2 Выделение нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов из периферической крови**

Забор крови для исследования проводили утром натощак с 8 до 9 часов. Выделение общей фракции моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов осуществляли по общепринятому методу в градиенте плотности фиколл-верографина с последующей очисткой от прилипающих клеток. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева. При контроле морфологического состава лейкоцитарных взвесей определялась чистота выхода нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов, которая составляла не менее 97%, жизнеспособность клеток соответствовала 98-100%. В дальнейшем 1 миллион выделенных клеток использовали для определения хемилюминесцентной активности.

Порядок выполнения работы:

1. Используют фиколл-верографин  $\rho = 1,077$  г/см<sup>3</sup> и  $\rho = 1,119$  г/см<sup>3</sup>. Вначале создают двойной градиент фиколл-верорографина: первым в пробирку вносят раствор фиколл-урографина, имеющий плотность  $\rho = 1,119$  г/см<sup>3</sup>, затем на него аккуратно наслаивают раствор фиколла с плотностью  $\rho = 1,077$  г/см<sup>3</sup>.
2. Гепаринизированную кровь наслаивают на двойной градиент фиколл-верорографина, центрифугируют 45 мин при 1500 об. После центрифугирования получают кольца моно- нуклеарных клеток (верхнее) и нейтрофилов (нижнее), а в осадке находятся эритроциты. Полученные

кольца мононуклеарных клеток и нейтрофилов отбирают в чистые центрифужные пробирки.

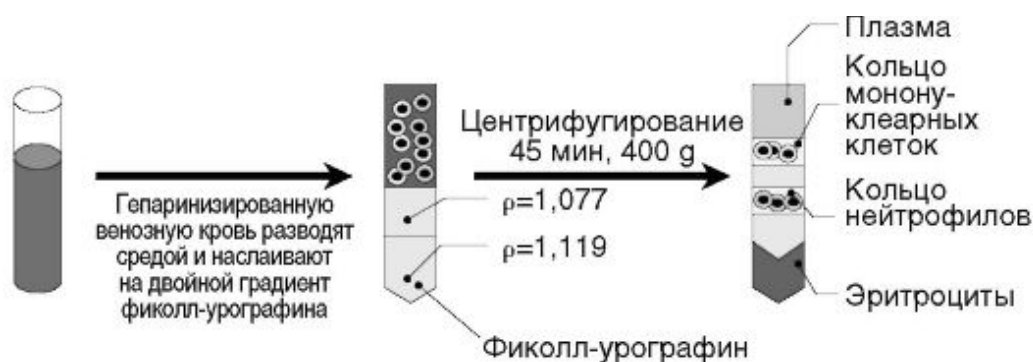


Рисунок 1 – Выделение мононуклеарных клеток и нейтрофилов с помощью градиента плотности фиколл-урографина

3. Добавляют физиологический раствор превосходящим объемом и центрифугируют 5 мин при 1500 об. Все клетки оседают на дно, смыв супернатанта.
4. Добавляют 1 мл. раствора Хэнкса в кювету с нейтрофилами. Клетки готовы к исследованию в течении 2 часов
5. Добавляют 3 мл среды RPMI в кювету с мононуклеарными клетками. Далее данную смесь переносят на пластиковую чашку Петри и инкубируют 1 час при 37 °С.
6. После инкубирования мононуклеарных клеток, среда RPMI заменяется на раствор Версена и инкубируется 20 мин при 4°С.
7. Раствор Версена с моноцитами переливают в пробирку и добавляют 9 мл. физиологического раствора. Центрифугируют 5 мин при 1500 об.
8. После центрифугирования моноциты оседают на дно пробирки, сливают супернатант. Добавляют 1 мл раствора Хэнкса. Клетки готовы к исследованию в течении 2 часов.

### 2.2.3 Определение кислород-независимого фагоцитоза

Функции фагоцитоза оценивали с помощью резистентных и чувствительных штаммов бактерий меченых FITC на проточном цитометре FC500. Конъюгацию бактерий проводили следующим образом: смывы с

твёрдых сред разводили бикарбонатным буфером pH=9,0 до концентрации 1млн/мл, затем в равном объёме добавляли FITC растворенный в ДМСО (1 мкг/мл), инкубировали в темноте в течении 1 часа, и троекратно отмывали. К 50 мкл венозной гепаринизированной крови добавляли 10 мкл суспензии меченых бактерий и инкубировали 30 минут при температуре 37°C, затем отмывали и докрашивали моноклональными АТ к CD14, CD16 и CD45. Далее в течении 15 минут проводили лизис эритроцитов раствором Versalise. Через 15 мин. определяли интенсивность свечения на проточномцитометре.

#### **2.2.4 Определение кислород-зависимого фагоцитоза**

Исследование спонтанной и индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) моноцитов периферической крови проводили по методу DeSoleetal. (1983). Пробы включали 200 мкл лейкоцитарной взвеси (1 млн/мл), 20 мкл донорской сыворотки (AB(IV) (RhI-)), 240 мкл раствора Хенкса (без фенолового красного) и 50 мкллюминола или 50 мкллюцигенина (100 мкг/мл, “Sigma”). Проба индуцированной ХЛ содержала 200 мкл раствора Хенкса и 40 мкл лопсонизированного зимозана (2 мг/мл, “Sigma”) или живой бактериальной суспензии 106КОЕ/мл. Бактериальную суспензию готовили из суточной бактериальной культуры в концентрации 106 КОЕ/мл. Затем пробы помещали в хемилюминесцентный анализатор “CL3606M” (СКТБ «Наука», Красноярск) и в течение 90 мин оценивали спонтанную и индуцированную ХЛ реакцию. Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (Tmax), максимальное значение интенсивности (Imax), площадь кривой (S<sup>2</sup>). Усиление ХЛ, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной ХЛ к площади спонтанной ХЛ и определяли как индекс активации (ИА), который определяли по формуле:

$$ИА = S_{\text{индуцированная}} / S_{\text{спонтанная}}, \quad (2.2.2.4.1)$$



где  $S_{\text{индуцированная}}$  – величина площади под кривой хемилюминесценции, индуцированной опсонизированным зимозаном или живой бактериальной суспензией;

$S_{\text{спонтанная}}$  – величина площади под кривой спонтанной хемилюминесценции.

### **2.3 Статистические методы исследования**

По результатам исследования в пакете электронных таблиц MS Excel 2010 была сформирована база данных, на основе которой с помощью пакета прикладных программ и Statistica 8,0 производился статистический анализ. Выборку описывали с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей ( $C_{25}$  и  $C_{75}$ ). Достоверность различий между показателями контрольной и опытных групп оценивали по непараметрическому критерию Mann-Whitney и Вилкоксона. Результаты статистической обработки представлены в таблицах.

### 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Определение общего пула активных форм кислорода выделяемого нейтрофильными гранулоцитами и моноцитами включало в себя оценку базовой активности и определение резервных возможностей клеток при воздействии индукторов в виде живой бактериальной суспензии *Staphylococcus aureus* (устойчивых и чувствительных) с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции.

А также отдельно исследована способность нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов к образованию супероксидного анион-радикала ( $-\text{O}_2$ ) с помощью люцигенин-зависимой хемилюминесценции.

В результате была определена активность кислород-зависимых окислительных ферментативных систем нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов, активность которых определяется количеством, выделенных активных форм кислорода. Образование активных форм кислорода зависит от функционирования сложного мультимолекулярного комплекса, объединенного общим названием НАДФН-оксидазной ферментативной системы и миелопероксидазного комплекса, который играет немаловажную роль в обезвреживании токсичных продуктов метаболизма и образовании ряда активных форм кислорода [44].

Результаты исследования продукции первичных радикалов кислорода в нейтрофильных гранулоцитах при воздействии устойчивыми и чувствительными штаммами золотистого стафилококка отражены в таблицах 2-3.

В результате исследования продукции первичных радикалов кислорода в группе больных полипозным риносинуситом, относительно контрольной группы в нейтрофильных гранулоцитах наблюдалось повышение уровня интенсивности спонтанной хемилюминесцентной реакции у больных полипозным риносинуситом, относительно контрольной группы. При этом время выхода на пик, при индукции устойчивыми штаммами золотистого стафилококка и индекс активации у больных полипозным риносинуситом,

снижены, относительно контрольной группы. Это, в свою очередь, показывает запас резервных возможностей первичных радикалов кислорода в нейтрофильных гранулоцитах крови у больных полипозным риносинуситом. При этом снижена активность клеток в ответ на антиген (табл. 2).

Таблица 2 – Показатели люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов крови при воздействии устойчивых к метициллину штаммов *Staphylococcus aureus*

Показатели	Контрольная группа		Группа больных ПРС	
	Спонтанная реакция	MRSA	Спонтанная реакция	MRSA
	N=29		N=18	
	1	2	3	4
Tmax (сек)	1576 (1233-1782)	1234 (895-1508)	1999 (1477-2580)	1239 (1115-1541) P <sub>3</sub> =0,019 P <sub>4</sub> (MSSA)=0,039
I <sub>max</sub> (о.е)	16036 (2472-21536)	18002 (7420-22758)	31399 (14954-38131) P <sub>1</sub> =0,008	17349 (9412-35518)
S <sub>max</sub> ×10 <sup>4</sup> (о.е)	4212 (703-5591)	5050 (1644-7877)	4584 (966-14960)	8498 (201-13430)
ИА (о.е)		1,2 (0,94-1,66) P <sub>1</sub> =0,026		0,91 (0,17-1,65)

В результате исследования люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов при воздействии штаммов *Staphylococcus aureus* больных полипозным риносинуситом происходит повышение уровня интенсивности спонтанной хемилюминесцентной реакции, относительно контрольной группы. Время выхода на пик нейтрофильных гранулоцитов в люцигенин-зависимой хемилюминесценции при воздействии устойчивых штаммов стафилококка уменьшается (табл. 3).

Таблица 3 – Показатели люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов крови при воздействии чувствительных к метициллину штаммов *Staphylococcus aureus*

Показатели	Контрольная группа		Группа больных PPC	
	Спонтанная реакция	MSSA	Спонтанная реакция	MSSA
	N=29		N=18	
	1	2	3	4
Tmax (сек)	1576 (1233-1782)	1507 (1096-1713)	1999 (1477-2580)	1533 (1477-1861) P <sub>4</sub> (MRSA)=0,039
I <sub>max</sub> (о.е)	16036 (2472-21536)	10803 (6339-21537)	31399 (14954-38131) P <sub>1</sub> =0,008	21441 (10520-31525)
S <sub>max</sub> ×10 <sup>4</sup> (о.е)	4212 (703-5591)	3277 (1975-6038)	4584 (966-14960)	4079 (1396-14490)
ИА (о.е)		1,1 (0,61-2,44)		0,91 (0,67-1,61)

Результаты исследования продукции первичных радикалов кислорода в моноцитах при воздействии штаммами золотистого стафилококка отражены в таблицах 4-5.

В результате исследования продукции первичных радикалов кислорода в группе больных полипозным риносинуситом, относительно контрольной группы в моноцитах крови наблюдается повышение уровня интенсивности спонтанной хемилюминесцентной реакции у больных полипозным риносинуситом, относительно контрольной группы. Внутри контрольной группы происходит повышение уровня интенсивности спонтанной хемилюминесцентной реакции, а также снижения индекса активации моноцитов крови при индукции устойчивыми штаммами *Staphylococcus aureus*, относительно чувствительных. Зато внутри группы больных полипозным риносинуситом, напротив, наблюдается повышение индекса активации

моноцитов при воздействии устойчивыми штаммами *Staphylococcus aureus*, относительно чувствительных (табл. 4, табл. 5).

Таблица 4 – Показатели люцигенин-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови при воздействии устойчивых к метициллину штаммов *Staphylococcus aureus*

Показатели	Контрольная группа		Группа больных ПРС	
	Спонтанная реакция	MRSA	Спонтанная реакция	MRSA
	N=29		N=18	
	1	2	3	4
Tmax (сек)	860 (484-2603)	1416 (664-1576)	1157 (1129-1608)	1157 (809-1476)
I <sub>max</sub> (о.е)	194 (157-2030)	188 (147-2056) P <sub>2</sub> (MSSA)=0,036	14257 (1689-14647) P <sub>1</sub> =0,035	11328 (11081-11551)
S <sub>max</sub> ×10 <sup>4</sup> (о.е)	44,9 (28,9-824)	33,9 (30,9-837)	160,3 (119,7-4545,0)	224,9 (74,7-7239,0)
ИА (о.е)		1,10 (1-1,24) P <sub>2</sub> (MSSA)=0,046		1,04 (0,98-1,64) P <sub>4</sub> (MSSA)=0,046

В результате исследования люцигенин-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови больных полипозным риносинуситом происходит понижение уровня интенсивности спонтанной хемилюминесцентной реакции при воздействии чувствительных штаммов *Staphylococcus aureus*, относительно спонтанной реакции (табл. 5).

Моноциты крови у больных полипозным риносинуситом активизируются, усиливая продукцию супер-оксидного-анион-радикала в спонтанной хемилюминесцентной реакции (табл. 4, табл. 5).

Таким образом, наблюдается активизация работы моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов уже в кровяном русле.

Таблица 5 – Показатели люцигенин-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови при воздействии устойчивых к метициллину штаммов *Staphylococcus aureus*

Показатели	Контрольная группа		Группа больных ПРС	
	Спонтанная реакция	MSSA	Спонтанная реакция	MSSA
	N=22		N=18	
	1	2	3	4
Tmax (сек)	860 (484-2603)	1609,5 (364-2519)	1157 (1129-1608)	1478 (1199-1653)
I <sub>max</sub> (о.е)	194 (157-2030)	1133,5 (158-2213) P <sub>2</sub> (MRSA)=0,036	14257 (1689-14647) P <sub>1</sub> =0,035	11316 (11177-13422) P <sub>3</sub> =0,013
S <sub>max</sub> ×10 <sup>4</sup> (о.е)	44,9 (28,9-824)	135,6 (32,7-881,3)	160,3 (119,7-4545,0)	134,9 (108,9-4527,0) P <sub>3</sub> =0,013
ИА (о.е)		1,21 (0,97-1,65) P <sub>2</sub> (MRSA)=0,046		0,99 (0,75-1,03) P <sub>4</sub> (MRSA)=0,046

Результаты исследования продукции вторичных радикалов кислорода в нейтрофильных гранулоцитах крови при воздействии устойчивыми и чувствительными штаммами золотистого стафилококка отражены в таблицах 6-7.

Исследование работы вторичных радикалов кислорода в нейтрофильных гранулоцитах крови у больных полипозным риносинуситом показало активацию процессов кислород-зависимого фагоцитоза. При этом происходит повышение интенсивности выработки вторичных радикалов, таких как перекись водорода, гидроксид-радикал, гипохлорид-радикал, в спонтанном процессе, а также времени выхода на пик при индукции антигеном в виде золотистого стафилококка (табл. 6, табл. 7).

Таблица 6 – Показатели люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов крови при воздействии устойчивых к метициллину штаммов *Staphylococcus aureus*

Показатели	Контрольная группа		Группа больных ПРС	
	Спонтанная реакция	MRSA	Спонтанная реакция	MRSA
	N=29		N=18	
	1	2	3	4
Tmax (сек)	583 (324-891)	795 (479-960)	1479 (1042-2171)	1423 (1245-1641) P <sub>2</sub> =0,001
I <sub>max</sub> (o.e)	45819 (3694-82140)	24886 (3282-84073) P <sub>2</sub> (MSSA)=0,036	22877 (18037-38102) P <sub>1</sub> =0,035	95824 (28116-99973) P <sub>2</sub> =0,019 P <sub>3</sub> =0,008
S <sub>max</sub> ×10 <sup>4</sup> (o.e)	10295 (1041-2164)	7771 (1011-20180)	13395 (606-27750)	22580 (3166-31770)
ИА (o.e)		1,29 (0,61-1,87) P <sub>1</sub> =0,007 P <sub>2</sub> (MSSA)=0,046		0,89 (0,45-4,77) P <sub>2</sub> (MSSA)=0,046

В результате исследования люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов крови внутри группы больных полипозным риносинуситом происходит понижение индекса активации при воздействии устойчивыми штаммами *Staphylococcus aureus*, относительно чувствительных. Исследование работы вторичных радикалов кислорода в нейтрофильных гранулоцитах крови внутри контрольной группы показало понижение уровня интенсивности спонтанной хемилюминесцентной реакции и индекса активации при индукции устойчивыми штаммами *Staphylococcus aureus*, относительно чувствительных (табл. 6, табл. 7).

Таблица 7 – Показатели люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов крови при воздействии чувствительных к метициллину штаммов *Staphylococcus aureus*

Показатели	Контрольная группа		Группа больных ПРС	
	Спонтанная реакция	MSSA	Спонтанная реакция	MSSA
	N=29		N=18	
	1	2	3	4
Tmax (сек)	583 (324-891)	788 (548-1028)	1479 (1042-2171)	1262 (1042-1737) P <sub>2</sub> =0,006
I <sub>max</sub> (o.e)	45819 (3694-82140)	37993 (3073-70037) P <sub>2</sub> (MRSA)=0,036	22877 (18037-38102) P <sub>1</sub> =0,035	98290 (29429-127813) P <sub>2</sub> =0,032 P <sub>3</sub> =0,007
S <sub>max</sub> ×10 <sup>4</sup> (o.e)	10295 (1041-2164)	12010 (1309-22970)	13395 (606-27750)	29100 (3744-36160) P <sub>3</sub> =0,013
ИА (o.e)		1,52 (1,00-2,15) P <sub>1</sub> =0,013 P <sub>2</sub> (MRSA)=0,046		1,42 (0,75-4,51) P <sub>2</sub> (MRSA)=0,046

Результаты исследования продукции вторичных радикалов кислорода в моноцитах крови при воздействии штаммами золотистого стафилококка отражены в таблицах 8-9.

Исследование работы вторичных радикалов кислорода в моноцитах крови внутри контрольной группы показало повышение уровня интенсивности спонтанной хемилюминесцентной реакции, площади под кривой и индекса активации при индукции устойчивыми штаммами *Staphylococcus aureus*, относительно чувствительных (табл. 8, табл. 9).

В результате исследования люминол-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови внутри группы больных полипозным риносинуситом



происходит понижение индекса активации при воздействии устойчивыми штаммами *Staphylococcus aureus*, относительно чувствительных. Также происходит понижение уровня интенсивности спонтанной хемилюминесцентной реакции моноцитов при индукции устойчивыми штаммами золотистого стафилококка, относительно спонтанной реакции в группе больных полипозным риносинуситом (табл. 8, табл. 9).

Определение активности мононуклеарных клеток показало усиление выработки вторичных радикалов у больных полипозным риносинуситом в спонтанной реакции, относительно контрольной группы (табл. 8, табл. 9).

Таблица 8 – Показатели люминол-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови при воздействии устойчивых к метициллину штаммов *Staphylococcus aureus*

Показатели	Контрольная группа		Группа больных ПРС	
	Спонтанная реакция	MRSA	Спонтанная реакция	MRSA
	N=22		N=18	
	1	2	3	4
Tmax (сек)	2600 (573-4812)	2242,50 (1082-4740)	1835 (1478-2953)	1646 (1191-1980)
I <sub>max</sub> (о.е)	631,5 (173-4190)	1506,5 (230-4666) P <sub>2</sub> (MSSA)<0,001	11722 (2282-14649) P <sub>1</sub> <0,001	2418 (1302-12692) P <sub>3</sub> =0,008
S <sub>max</sub> ×10 <sup>4</sup> (о.е)	57,5 (34,4-1680)	319,4 (48,6-1620) P <sub>2</sub> (MSSA)<0,001	566,2 (142,5-7149,0)	460,4 (114,1-7179,0)
ИА (о.е)		1,01 (0,96-1,52) P <sub>2</sub> (MSSA)=0,003		0,79 (0,4-1,01)

Таблица 9 – Показатели люминол-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови при воздействии чувствительных к метициллину штаммов *Staphylococcus aureus*

Показатели	Контрольная группа		Группа больных ПРС	
	Спонтанная реакция	MSSA	Спонтанная реакция	MSSA
	N=22		N=18	
	1	2	3	4
Tmax (сек)	2600 (573-4812)	2880 (983-4692)	1835 (1478-2953)	1680 (1154-3649)
I <sub>max</sub> (о.е)	631,5 (173-4190)	602,5 (240-4044) P <sub>2</sub> (MSSA)<0,001	11722 (2282-14649) P <sub>1</sub> <0,001	1893 (1213-3649) P <sub>3</sub> =0,007
S <sub>max</sub> ×10 <sup>4</sup> (о.е)	57,5 (34,4-1680)	91,4 (46,1-1165) P <sub>2</sub> (MRSA)<0,001	566,2 (142,5-7149,0)	305,9 (131,9-7073,0)
ИА (о.е)		0,98 (0,9-1,28) P <sub>2</sub> (MRSA)=0,003		0,95 (0,64-1,06)

Показатели кислород-независимого фагоцитоза нейтрофильных гранулоцитов отражены в таблицах 10-11.

В результате исследования кислород-независимого фагоцитоза было обнаружено: снижение фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа нейтрофильных гранулоцитов при воздействии устойчивыми штаммами относительно контроля (табл. 10, табл. 11).

Фагоцитарный индекс (ФИ) — процент клеток, вступивших в фагоцитоз, от общего их числа.

Фагоцитарное число (ФЧ) — среднее число бактерий, находящихся внутриклеточно.

Таблица 10 – Показатели кислород-независимого фагоцитоза нейтрофильных гранулоцитов у контрольной группы при индукции штаммами *Staphylococcus aureus* устойчивых и чувствительных к метициллину

Показатели	Чувствительный штамм	Устойчивый штамм	Р
N=43			
Фагоцитарное число	100 (72,6-125)	59,9 (40,90-90)	<0,001
Фагоцитарный индекс	23,09 (14,71-37,47)	51,51 (22,7-66,85)	<0,001

Таблица 11 – Показатели кислород-независимого фагоцитоза нейтрофильных гранулоцитов у больных полипозным риносинуситом при индукции штаммами *Staphylococcus aureus* устойчивых и чувствительных к метициллину

Показатели	Чувствительный штамм	Устойчивый штамм	Р
N=29			
Фагоцитарное число	23,3 (14,4-34,1)	12,1 (9,55-13,9)	=0,001
Фагоцитарный индекс	25,46 (8,77-36,05)	37,34 (16,01-47,28)	=0,036

В результате исследования кислород-независимого фагоцитоза было обнаружено: снижение фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа моноцитов при воздействии устойчивыми штаммами относительно контроля (табл. 12).

Показатели кислород-независимого фагоцитоза моноцитов отражены в таблице 12.

Таблица 12 – Показатели кислород-независимого фагоцитоза моноцитов при индукции штаммами *Staphylococcus aureus* устойчивых и чувствительных к метициллину

Показатели	Контроль		Полипозный РС	
	MRSA	MSSA	MRSA	MSSA
	1	2	3	4
ФИ общей популяции моноцитов, (%)	34,92 (13,1-44,9)	12,4 (6,9-21,4) P1<0,001	22,6 (12,8-48,5)	16,5 (9,2-28,5)
ФЧ общей популяции моноцитов	55,7 (36,4-73,7)	103 (64,1-128) P1<0,001	11,0 (8,5-14,4)	22,4 (18,1-26,4) P3=0,004
ФИ фенотипа CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>+</sup> , (%)	42,1 (27,6-60,0)	30,8 (22,2-40,0) P1=0,002	28,6 (16,6-43,8) P1=0,035	21,4 (10,0-30,0)
ФЧ фенотипа CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>+</sup>	37,6 (18,7-91,9)	57,3 (26,2-192,0) P1=0,008	9,4 (7,4-11,8) P1<0,001	19,0 (13,5-20,3) P3=0,014
ФИ фенотипа CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> , (%)	50,0 (25,0-69,4)	33,3 (15,6-50,0) P1=0,009	26,5 (12,8-42,9) P1=0,023	19,4 (13,4-45,0)
ФЧ фенотипа CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	67,1 (37,7-178,0)	261,0 (128,0-364,0) P1<0,001	9,3 (6,9-15,3) P1<0,001	20,9 (14,7-34,6) P3=0,006
ФИ фенотипа CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> , (%)	36,6 (12,5-48,7)	12 (5,9-18,2) P1<0,001	20,1 (11,7-27,8)	15,3 (6,3-29,1)
ФЧ фенотипа CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>	50,8 (31,6-58,7)	63,5 (46,0-82,5) P1<0,001	8,9 (6,9-12,3) P1<0,001	19,2 (7,7-23,1) P3=0,01

Оценка активности субпопуляционного состава моноцитов при воздействии устойчивыми штаммами относительно чувствительных показала

снижение фагоцитарного индекса провоспалительных и регуляторных моноцитов и фагоцитарного числа провоспалительных, регуляторных и классических моноцитов (табл. 12).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование первичных радикалов кислорода показало активацию выработки АФК нейтрофильными гранулоцитами в спонтанной ХЛ реакции и при индукции MRSA штаммами относительно контрольной группы. Моноциты у больных полипозным риносинуситом активизируются, усиливая продукцию супер-оксидный-анион-радикала в спонтанной ХЛ реакции. Таким образом, наблюдаем активизацию работы моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов уже в кровяном русле.

Исследование вторичных радикалов кислорода показало активацию процессов кислород-зависимого фагоцитоза нейтрофильных гранулоцитов у больных полипозным риносинуситом. При этом происходит повышение интенсивности выработки вторичных радикалов, таких как  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ,  $^1O_2$ ,  $NO$ , в спонтанном процессе усиление выработки вторичных радикалов моноцитами у больных полипозным риносинуситом в спонтанной реакции.

Исследование фагоцитоза показало снижение фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов крови у больных полипозным риносинуситом относительно контроля

Оценка активности субпопуляционного состава моноцитов при воздействии устойчивыми штаммами *Staphylococcus aureus*, относительно контрольной группы показала снижение, как фагоцитарного индекса, так и фагоцитарного числа провоспалительных и регуляторных моноцитов, а также фагоцитарного числа классических моноцитов.

Таким образом, фагоцитарное звено больных полипозным риносинуситом активизируется в ответ на метициллин-резистентные штаммы *Staphylococcus aureus*, как нейтрофильных гранулоцитов, так и моноцитов интенсивнее, чем у контрольной группы.

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АФК – активные формы кислорода

ИА – индекс активации

НГ – нейтрофильных гранулоцитов

ПРС – полипозный риносинусит

СР – свободные радикалы

ХЛ – хемилюминесценция

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Topal, O, Kulaksızoglu, S, Erbek, S.S. Oxidative stress and nasal polyposis: does it affect the severity of the disease? // *Am J Rhinol Allergy*. – 2014. – P.1-4.
2. Yii, A.C. Precision medicine in united airways disease: a "treatable traits" approach / T.R Tay, X.N Choo, M.S Koh, A.K Tee, D.Y Wang // *Allergy*. – 2018.
3. Lauvau G., Chorro L., Spaulding E. Inflammatory monocyte effector mechanisms // *Cell Immunol*. – 2014. – Vol. 291, №. 1-2. – P. 32-40.
4. Shahkarami, F., Rashki, A., Rashki, G.Z. Susceptibility and Plasmid Profiles of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Susceptible *S. aureus* // *Microbiol*. – 2014. – Vol.7, no. 7. – P.37-42.
5. Игнатова, И.А. Микробиоценоз слизистой оболочки носа при аллергической риносинусопатии / О.А. Коленчукова, С.В. Смирнова, В.Т. Манчук, Т.А. Капустина, Т.И. Ким, Н.М. Чижмотря // *ЖМЭИ*. – 2007. – № 1. – С. 62—64.
6. Flack, C.E. Differential regulation of staphylococcal virulence by the sensor kinase SaeS in response to neutrophil-derived stimuli / O.W. Zurek, D.D. Meishery, K.B. Pallister, C.L. Malone, A.R. Horswill, J.M. Voyich // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2014. – Vol.111, no 13. – P.19-25.
7. Jimenez, A.M. Chemiluminescence methods (present and future) / A.M. Jimenez, M.J. Navas // *Grasas y Aceites*. – 2002. – V.53, №1 – P. 64–75;
8. Суковатая, И. Е. Фотобиофизика: учебное пособие / В. А. Кратасюк, В. В. Межевикин, И. В. Свидерская, Е. Н. Есимбекова, Е. В. Немцева // Красноярск : ИПК СФУ. – 2008.
9. Владимиров, Ю. А. Свечение, сопровождающие биологические реакции/ Ю. А. Владимиров// *Соросовский образовательный журнал*. – 1999. – №6. – С. 25-32.
10. Владимиров, Ю. А. Активированная хемилюминесценция и биолюминесценция как инструмент в медико-биологических исследованиях. / Ю. А. Владимиров// *Соросовский образовательный журнал*. – 2001. – Т. 7, №1. – С. 16-23.



11. Плужников, Н. Н. Проксидантная система. Подходы к выбору алгоритма исследования / Л.С. Бакулина, О.С. Козлов, А.И. Ярцев // Вестник оториноларингологии. – 2010. – №5.
12. Pisoschi, A. M. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review / A. M. Pisoschi, A. Pop // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2015 – № 97. – P. 55-74.
13. Коленчукова, О.А. Особенности люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим риносинуситом / О.А. Коленчукова, А.А.Савченко, С.В.Смирнова // Медицинская иммунология. – 2010. Т 12, № 4 – 5. С. 437-440.
14. Белобородов, В.Б. Стафилококковые инфекции / В.Б. Белобородов, С.Д. Митрохин // Инфекции и антимикробная терапия. – 2003. – №1. – С.12–18.
15. Kubica, M. A potential new pathway for Staphylococcus aureus dissemination: the silent survival of S. aureus phagocytosed by human monocyte-derived macrophages / M. Kubica, K. Guzik, J. Koziel, M. Zarebski, W. Richter, et al. // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3, N 1. – P.1409.
16. Зайцев, А.А. Стафилококки и ванкомицин: тенденции и противостояние // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – №6. – С.20-23.
17. Страчунский, Л.С. Внебольничные MRSA – новая проблема антибиотикорезистентности / Ю.А. Белькова, А.В. Дехнич // Клини.микробиол. антимикроб. химиотер. – 2005. – №1. – С.32-46.
18. Yang Z, Fu Y, Liu B, Zhou E, Liu Z, Song X, Li D, Zhang N. Ferrerol regulates antimicrobial peptide expression and reduces Staphylococcus aureus internalization into bovine mammary epithelial cells // Microb Pathog. – 2013.
19. Genestet C., Scavenging of reactive oxygen species by tryptophan metabolites helps Pseudomonas aeruginosa escape neutrophil killing / G.A. Le, H. Chaker, B. Polack, B. Guery, B. Toussaint, M.J. Stasia // Free Radic Biol Med. – 2014.
20. Swe, P.M., Fischer, K. A Scabies mite serpin interferes with complement-mediated neutrophil functions and promotes staphylococcal growth // PLoS Negl Trop Dis. – 2014.

21. Ройт А. Основы иммунологии // Москва. – 1991г. – С. 10 - 18.
22. Ройт, А., Бростофф, Д., Мейл, Д. // Иммунология. – 2000. С. 48 - 54.
23. Елисеев, В.Г. Гистология: под редакцией / В.Г. Елисеев, Ю.И. Афанасьев, Н.А. Юрина. – Москва: Медицина. – 1983. – С.146.
24. Хайтов, Р.М. Иммунология // Москва. – 2000. – Том3. – С. 61 - 67.
25. Абелев, Г.И. Воспаление // Соросовский образовательный Журнал. – 1996.– №10. – С. 28 - 32.
26. Пинегин Б.В., Карсанова М.И. Макрофаги : свойства и функции // Иммунология. – 2009. – №6. – С. 241 – 247.
27. Ярилин, А.А. Иммунология. – 2010. – С.63-71.
28. Tolouei Semnani R., Human monocyte subsets at homeostasis and their perturbation in numbers and function in filarial infection / V. Moore, S. Bennuru, S. Ganesan, R. Cotton, R. Anuradha, S. Babu, T.B. Nutman // Infect. Immun. – 2014. – Vol. 82, no. 11. – P. 4438-4446.
29. Hristov M., Schmitz S., Nauwelaers F., Weber C. A flow cytometric protocol for enumeration of endothelial progenitor cells and monocyte subsets in human blood. J. Immunol. Methods. – 2012. – Vol. 381, no. 1-2. – P. 9-13.
30. Shi C., Pamer E.G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. Nat. Rev. Immunol. – 2011. – Vol. 11, no. 11. – P. 762-774.
31. Герасимов, И.Г. Свертывание крови активирует нейтрофилы к респираторному взрыву / И.Г. Герасимов, Д.Ю. Игнатов // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2005. – № 7. – С. 88-90.
32. Олиферук, Н.С. Оценка фагоцитарной и бактериальной активности нейтрофилов, макрофагов и незрелых дендритных клеток / Н.С. Олиферук //Иммунология. – 2005. – №1. – С.10.
33. Винник, Ю.С. Динамика продукции активных форм кислорода лимфоцитами крови у больных острым панкреатитом / Ю.С. Винник, С.С. Дунаевская, Е.В. Портнягин, Г.В. Макарская// Сибирское медицинское обозрение. – 2010. – №1. – С. 35-38.

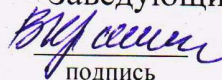
34. Halliwell B Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence / B. Halliwell // *The Lancet*. – 1994 – V. 344, №. 8924. – P. 721-724.
35. Yılmaz, I. Last station in the eosinophilic asthma with chronic rhinosinusitis and/or nasal polyposis march: Eosinophilic asthma with radiological findings associated with blood eosinophilia / S.N. Bahçecioglu, M. Türk, N. Tutar, F.S. Oymak, İ. Gülmez // *Asthma*. – 2018.
36. Лопатин, А.С. Лечение полипозного риносинусита // *Consilium medicum*. – 2002. – С. 21-25.
37. Yoon, Y.H. The role of B cell Activating Factor (BAFF) expression on pathogenesis of nasal polyp in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis / J. Jin, K.R Kwon, S.H Kim, K.S Rha, Y.M Kim // *Rhinology*. – 2014.
38. Singh, P. Bacterial biofilm on the sinus mucosa of healthy subjects and patients with chronic rhinosinusitis (with or without nasal polyposis) / R. Mehta, S. Agarwal, P. Mishra // *Laryngol Otol*. – 2015. – №9 – P.130-133.
39. Лопатин, А.С, Сидоренко, И.В, Захаржевская, Т.В. Эффективность назонекса в лечении аллергического ринита и хронического полипозного риносинусита // *Вестник оториноларингологии*. – 2000. – №9 – С.60-63.
40. Jones, N.S. CT of the paranasal sinuses: a review of the correlation with clinical, surgical and histopathological findings // *Clin. Otolaryngol*. – 2002. – №27 – P. 11–17.
41. Rimmer, J. Surgical versus medical interventions for chronic rhinosinusitis with nasal polyps / W. Fokkens, L.Y. Chong, C. Hopkins // *Cochrane Database Syst Rev*. – 2014. – №12.
42. Banglawala, S.M. Olfactory outcomes in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis after medical treatments: a systematic review and meta-analysis / S.L. Oyer, S. Lohia, A.J. Psaltis, Z.M. Soler, R.J. Schlosser // *Int Forum Allergy Rhinol*. – 2014. – №12. – P. 986-94.
43. Hulse, K.E, Stevens, W.W, Tan, B.K, Schleimer, RP. Pathogenesis of nasal polyposis // *Clin Exp Allergy*. – 2015. – №2. – P. 328.

44. Северин, Е.С. Биохимия / Т.Д. Алейникова, Д.В. Авдеева, Н.П. Волкова // Учебник для вузов. – 2003. – С.664-669.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 В. А. Кратасюк

подпись

« 13 » 06 2018 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

06.04.01 – Биология  
06.04.01.03 – Биофизика

Фагоцитарная активность клеток крови больных полипозным риносинуситом  
в ответ на метициллин-резистентные штаммы *Staphylococcus aureus*

Научный руководитель



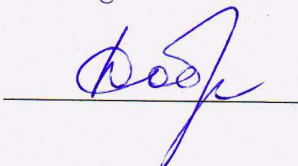
д.б.н., доцент О. А. Коленчукова

Выпускник



Д. И. Тюменцева

Рецензент



д.м.н., профессор К. Г. Добрецов

Красноярск 2018