

УДК 579.61

**ВЛИЯНИЕ БИНАЗЫ НА НЕКРОЗ И АПОПТОЗ МАКРОФАГОВ  
В МОДЕЛИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА**

*В.А. Миронов, А.В. Филиппов, Ф.В. Ширшиков,  
Г.В. Черепнёв, Н.В. Калачёва*

**Аннотация**

Предварительная инкубация перитонеальных макрофагов с биназой в концентрации 100 мкг/мл и выше приводит к снижению гибели макрофагов от некроза, индуцированного пероксидом водорода, при этом клетки вступают преимущественно на путь апоптоза. Протекторный эффект биназы может быть следствием стабилизирующего действия биназы на цитоплазматическую мембрану. О возможности стабилизации липидного бислоя свидетельствует изменение параметров фазового перехода дипальмитоилфосфатидилхолина в присутствии биназы, которые были определены в модельном эксперименте с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии. Вместе с тем нельзя исключить влияния биназы на систему передачи H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированных проапоптогенных сигналов.

**Ключевые слова:** биназа, макрофаг, оксидативный стресс, некроз, апоптоз, протекторное действие.

**Введение**

В настоящее время активно обсуждается регуляция процессов клеточной гибели [1–4]. Особое внимание уделяется изучению роли активных форм кислорода (АФК) в развитии апоптоза и некроза [5]. Это связано с тем, что высокорекреационные АФК образуются во всех клетках с аэробным метаболизмом. Как известно, основным источником АФК в животном организме являются фагоцитирующие клетки (гранулоциты, моноциты, макрофаги), которые вовлечены в реакции естественного и адаптивного иммунитета. В физиологических условиях разрушающее действие АФК сдерживается многоуровневой системой антиоксидантов. Однако в ряде случаев эти средства защиты не справляются со своей задачей, что приводит к патологическим состояниям организма. Оксидативный стресс, определяемый как нарушение баланса между оксидантами и антиоксидантами в пользу первых, является одним из основных индукторов гибели клетки [6, 7].

Объект исследования в настоящей работе – РНКаза *Bacillus intermedius* (биназа). Выбор объекта обусловлен тем, что биназа обладает целым рядом биологических эффектов, в том числе цитотоксических, в реализации которых важную роль играет цитоплазматическая мембрана. Ранее нами было показано, что биназа оказывает модулирующее действие на фагоцитоз и генерацию макрофагами АФК *in vitro* [8, 9]. Высокие концентрации биназы подавляют, а низкие – стимулируют фагоцитоз и генерацию ими АФК. Эти эффекты не зависят

от каталитической активности фермента, а определяются особенностями физико-химического взаимодействия РНКазы с цитоплазматической мембраной. С учетом того, что АФК в зависимости от концентрации вызывают апоптоз и/или некроз, изучение влияния биназы на клеточную гибель в условиях индуцированного оксидативного стресса представляет как фундаментальный, так и прикладной интерес.

Цель работы – исследовать влияние биназы на апоптоз и некроз макрофагов в модели  $H_2O_2$ -индуцированного оксидативного стресса в контексте потенциального взаимодействия биназы с клеточной мембраной.

## 1. Методика

**1.1. Фермент.** РНКазы *Bacillus intermedius* (КФ 3.1.4.23) представляет собой основной белок с молекулярной массой 12.3 кДа, изоэлектрической точкой pI 8.9. и максимальной каталитической активностью при pH 8.5. В экспериментах использовали гомогенный препарат микробной РНКазы, полученный по методу [10].

**1.2. Выделение перитонеальных макрофагов крысы.** В экспериментах использовали перитонеальные макрофаги белых беспородных крыс 5–6-недельного возраста. Работу с крысами проводили с соблюдением принципов Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным. Крыс декапитировали под эфирным наркозом. Перитонеальные макрофаги выделяли из перитонеальных смывов, вводя животным в брюшную полость холодный 0.9%-ный раствор NaCl. Клетки промывали физиологическим раствором, суспендировали в среде PRMI (Sigma, США), разводили до концентрации  $1.2 \cdot 10^6$  кл/мл и использовали в экспериментах.

**1.3. Изучение влияния биназы и различных концентраций  $H_2O_2$  на жизнеспособность и клеточную гибель.** Макрофаги, разведенные в среде PRMI до концентрации  $1.2 \cdot 10^6$  кл/мл, наносили на покровные стекла в объеме 0.1 мл и оставляли на 20 мин для адгезии клеток ( $t = 37^\circ C$ ). Затем в опытные образцы вносили раствор биназы в среде PRMI в конечной концентрации 100 и 200 мкг/мл, инкубировали 0.5 ч в  $CO_2$ -инкубаторе при  $t = 37^\circ C$ , после чего заменяли среду с ферментом на среду, содержащую  $H_2O_2$  в различных концентрациях, и инкубировали еще 1 ч. Концентрации  $H_2O_2$  составляли 10, 20 и 30 мМ. В качестве контролей использовали интактные клетки, инкубированные в питательной среде, а также клетки, в которые добавляли раствор  $H_2O_2$  в соответствующих концентрациях без предварительной инкубации с ферментом. Затем в контрольных и опытных образцах оценивали жизнеспособность клеток с помощью красителя трипанового синего по стандартной методике [11].

Для изучения влияния пероксида водорода и биназы на некроз и апоптоз использовали  $H_2O_2$  в концентрации 2 мМ. Схема эксперимента отличалась от описанной выше удлинением временем инкубации клеток с  $H_2O_2$  до 3 ч. Кроме того, после инкубации с  $H_2O_2$ , помимо теста с трипановым синим, макрофаги окрашивали по методике Романовского – Гимза [11] для исследования морфологических характеристик.

Идентификацию жизнеспособных, некротических и апоптотических клеток осуществляли методом световой микроскопии. Некротические и апоптотические клетки дифференцировали по характерным морфологическим признакам [12]. Анализировали несколько полей зрения на каждом стекле (не менее 600 клеток) и рассчитывали относительное содержание каждой клеточной популяции. Различия долей полагали достоверными при значениях  $P \leq 0.05$ .

**1.4. Оценка интенсивности реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ) в макрофагах методом  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) [13].** Реакции ПОЛ регистрировали на программируемом биохемилюминометре БХЛ-6 (Нижний Новгород, Россия) в течение 40 с с момента начала процесса ПОЛ (время, по истечении которого интенсивность индуцированной ХЛ снижалась до постоянного уровня). В измерительные кюветы вносили 400 мкл суспензии макрофагов ( $1.2 \cdot 10^6$  кл/мл) в 0.125 моль/л калий-фосфатном буфере, pH 7.4 и 200 мкл раствора фермента в концентрации 100 и 200 мкг/мл в этом же буфере, выдерживали 30 мин в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе (37 °C). Затем кювету помещали в биохемилюминометр, добавляли 400 мкл раствора  $\text{FeSO}_4$  (0.01 ммоль/л) и инициировали ПОЛ введением 20 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  [14]. В контроле использовали буфер без фермента. Регистрировали следующие показатели: светосумму ХЛ ( $S$ ), интенсивность максимальной вспышки ( $I_{\max}$ ) и тангенс угла падения кинетической кривой ( $\text{tg } \alpha$ ). Эксперименты ставили в 4 повторностях. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы MS Excel 2003. На рисунках представлены средние значения величин и их стандартные отклонения. Различия считали достоверными при  $P \leq 0.05$ .

**1.5. Взаимодействие фосфолипидных везикул с биназой** изучали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) [15]. Был исследован фазовый переход суспензии моноламеллярных везикул из дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC) в присутствии 100 и 200 мкг/мл биназы. Измерения выполняли на микрокалориметре MicroCal VP-DSC Microcalorimeter (Täby, Швеция). Термограммы ДСК были получены при нагревании и охлаждении от 5 °C до 45 °C и давлении 1034.3 мм рт. ст. Нагревание производилось со скоростью 20 °C/ч. Обработку данных (вычитание базовой линии, интегрирование пиков) производили с помощью программного обеспечения MicroCal Origin.

**1.6. Приготовление образцов для ДСК.** На первом этапе получали мультламеллярные везикулы. Для этого 2 мг DPPC растворяли в 1 мл метанола. После достижения гомогенности смесь обдувалась струей азота для выпаривания растворителя и затем для полного удаления метанола оставлялась под вакуумом  $\sim 4 \cdot 10^{-1}$  мм рт. ст. на 12 ч. После этого сухой образец гидратировался дистиллированной водой до концентрации 5 мМ. Затем для лучшего растворения и получения однородной водной дисперсии образец нагревали до 60 °C со встряхиванием. Второй этап включал получение моноламеллярных везикул с помощью многократного замораживания и оттаивания образца [16]. Для этого образец с многослойными везикулами 3–4 раза последовательно помещался

сначала в жидкий азот, а затем в теплую воду ( $\sim -50$  C). В результате получались большие моноламеллярные везикулы.

В полученную суспензию моноламеллярных липидных везикул добавляли биназу в конечной концентрации 100 и 200 мкг/мл препарата в 0.01 М растворе НЕРЕС-буфера (рН 7.4). Инкубацию проводили при температуре 22 °С.

## 2. Результаты и их обсуждение

Известна экспериментальная модель индукции оксидативного стресса пероксидом водорода в макрофагах, в рамках которой различают как некротические, так и апоптотические клетки [7]. Таким образом, с помощью этой тест-системы можно оценить как потенциальную чувствительность макрофагов к повреждающим факторам, так и возможность защиты клеток от апоптоза или некроза (например, с помощью биологически активных веществ или лекарственных средств).

Нами установлено, что в условиях окислительного стресса, индуцированного высокими концентрациями  $H_2O_2$ , количество жизнеспособных перитонеальных макрофагов резко снижалось (рис. 1).

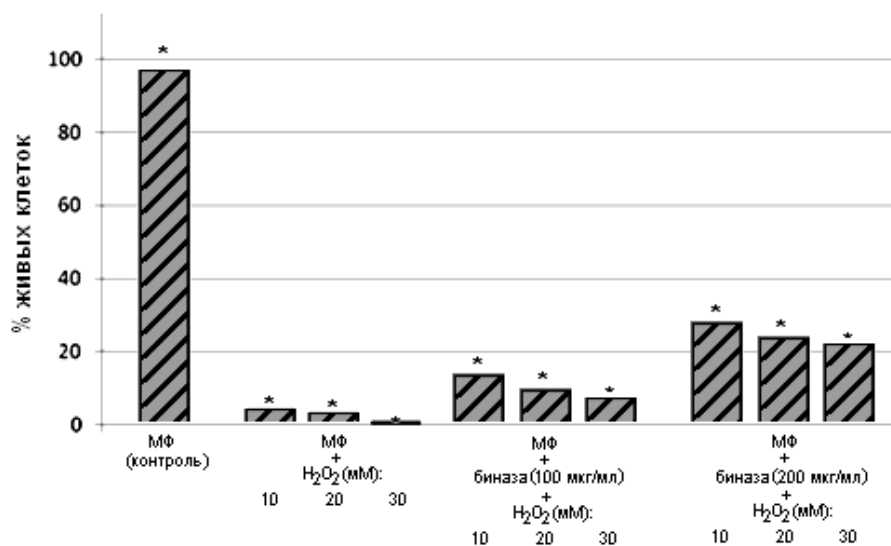


Рис. 1. Влияние различных концентраций  $H_2O_2$  (10, 20, 30 мМ) и биназы (100 и 200 мкг/мл) на жизнеспособность макрофагов (окраска трипановым синим)

В этих условиях практически все клетки погибали по механизму некроза с характерными морфологическими признаками: увеличение размера, повышение тургорного давления в клетках (набухание), потеря правильной формы, проницаемая цитоплазматическая мембрана.

Цитотоксичность возрастала при повышении концентрации пероксида водорода от 10 до 30 мМ, что согласуется с известными эффектами высоких концентраций  $H_2O_2$  [7]. Однако если макрофаги перед индукцией окислительного стресса инкубировались с биназой в течение 30 мин, то доля жизнеспособных клеток увеличивалась (рис. 1). Следует отметить, что инкубация макрофагов с РНКазой в течение 30 мин не влияла на жизнеспособность макрофагов.

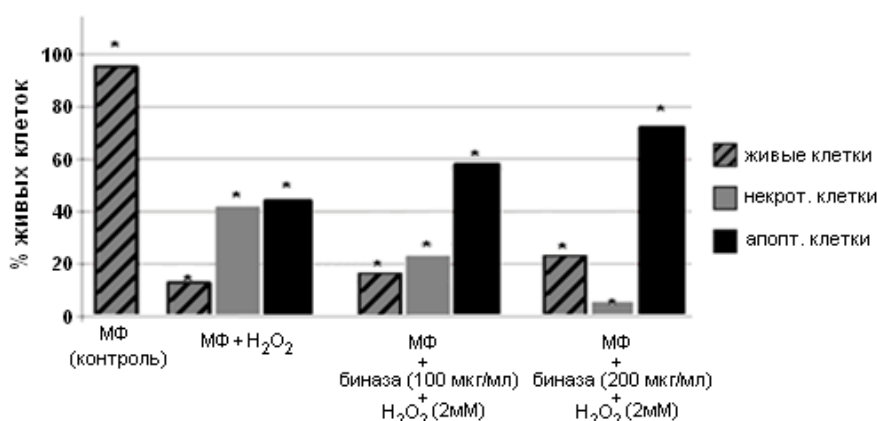


Рис. 2. Влияние биназы (100 и 200 мкг/мл) на гибель макрофагов в условиях окислительного стресса, индуцированного 2 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Время инкубации макрофагов с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 3 ч. Жизнеспособные клетки определялись с помощью витального красителя трипанового синего, апоптотические клетки подсчитывались после окрашивания по Романовскому – Гимза. В расчёт брали клетки с характерной для апоптоза изменённой структурой ядер и сравнивали с контролем

В следующих экспериментах мы уменьшили концентрацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до 2 мМ, но при этом увеличили экспозицию с пероксидом водорода с 1 до 3 ч (рис. 2).

При микроскопии было выявлено три типа клеток: жизнеспособные, некротические и апоптотические. Последние имели характерные морфологические признаки программированной гибели: уменьшение размеров, кариорексис и конденсация хроматина по периферии ядра. Предварительная инкубация клеток с РНКазой увеличивала в популяции долю жизнеспособных и апоптотических клеток (рис. 2), что свидетельствует о цитопротекторной активности биназы.

**2.1. Оценка интенсивности реакций ПОЛ в макрофагах методом Fe<sup>2+</sup>-индуцированной ХЛ.** Клеточная мембрана – одна из самых чувствительных мишеней при действии на клетку многих факторов, в том числе и повреждающих. Среди последних существенную роль играют АФК. К их числу относят и пероксид водорода H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, который в силу своей способности в присутствии Fe<sup>2+</sup> генерировать АФК, претендует на ведущую роль в реализации повреждающего действия на клетки.

Процесс гибели клетки на одном из этапов обязательно включает в себя перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот – универсальный фактор повреждения липидов мембран [17]. В связи с этим мы провели оценку интенсивности реакций ПОЛ в макрофагах при экспериментальном окислительном стрессе методом Fe<sup>2+</sup>-индуцированной ХЛ. Результаты экспериментов представлены на рис. 3.

В условиях стресса, индуцированного пероксидом водорода, значительно возрастают светосумма сигнала (*S*) и интенсивность максимальной вспышки (*I*<sub>max</sub>) и резко уменьшается tg α (показатель антиоксидантного состояния системы),

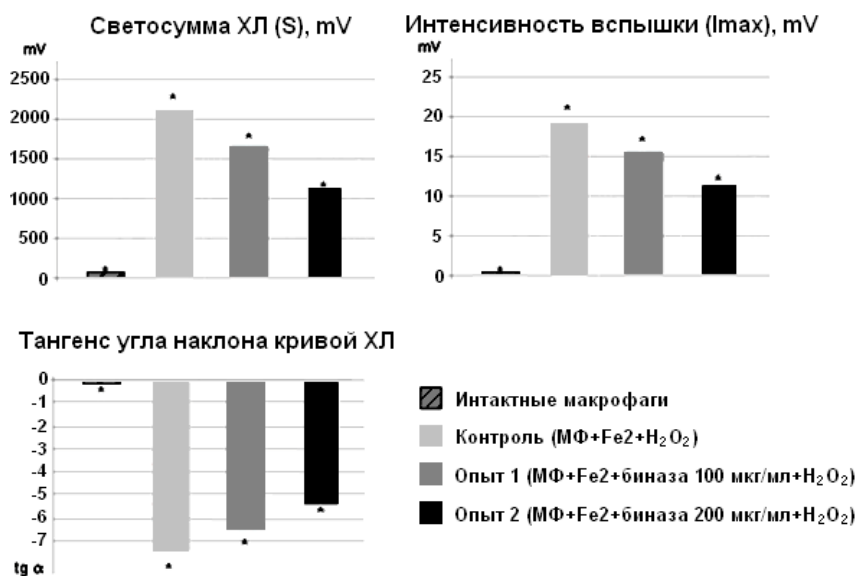


Рис. 3. Параметры ХЛ intactных макрофагов и макрофагов, инкубированных с биназой, в условиях окислительного стресса, индуцированного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 мМ)

что свидетельствует об интенсивном протекании процессов перекисного окисления липидов цитоплазматической мембраны и её повреждении. У макрофагов, предварительно проинкубированных с биназой, наблюдается заметное снижение средних значений светосуммы и максимальной интенсивности ХЛ по сравнению с контролем. Уменьшение этих показателей свидетельствует о значительном снижении интенсивности свободнорадикальных процессов в клетках, обработанных рибонуклеазой и затем подвергнутых окислительному стрессу. При этом величина, характеризующая антиоксидантную активность системы: тангенс угла наклона кинетической кривой ХЛ – увеличивалась. Полученные результаты отражают повышение антиоксидантного потенциала исследуемой системы и свидетельствуют о том, что после инкубации макрофагов с биназой, по-видимому, изменяются свойства их мембраны, в результате чего макрофаги становятся менее чувствительными к повреждающему действию пероксида водорода.

## 2.2. Изучение взаимодействия фосфолипидных везикул с биназой.

О возможном изменении свойств мембраны после взаимодействия с биназой свидетельствуют результаты модельного эксперимента, проведенного с везикулами DPPC с помощью метода ДСК. Нами были исследованы параметры фазового перехода везикул DPPC в присутствии 100 и 200 мкг/мл биназы. Полученные термограммы показали различия в процессе протекания фазового перехода липидных везикул в присутствии биназы и без неё (рис. 4). Результаты обработки термограмм представлены в табл. 1.

При взаимодействии везикул с РНКазой происходит увеличение температуры фазового перехода и молярной энтальпии и наблюдается незначительное увеличение ширины фазового перехода (табл. 1).

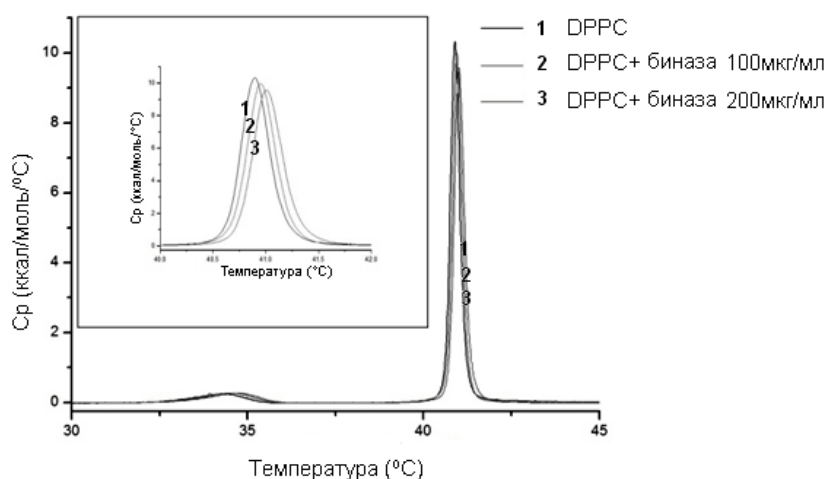


Рис. 4. Термограммы ДСК везикул DPPC в присутствии 100 и 200 мкг/мл биназы

Табл. 1

Параметры основного фазового перехода DPPC в исследованных образцах.  $T_{\text{фп}}$  – положение центра пика основного фазового перехода,  $\Delta T_{\text{фп}}$  – ширина пика основного фазового перехода на полувысоте,  $\Delta H$  – молярная энтальпия перехода

№	Состав	$T_{\text{фп}}$ , °C	$\Delta T_{\text{фп}}$ , °C	$\Delta H$ , кал/моль
1	DPPC	40.89	0.30	$3630 \pm 18$
2	DPPC + 100 мкг/мл биназы	40.95	0.31	$3690 \pm 35$
3	DPPC + 200 мкг/мл биназы	41.00	0.32	$3760 \pm 30$

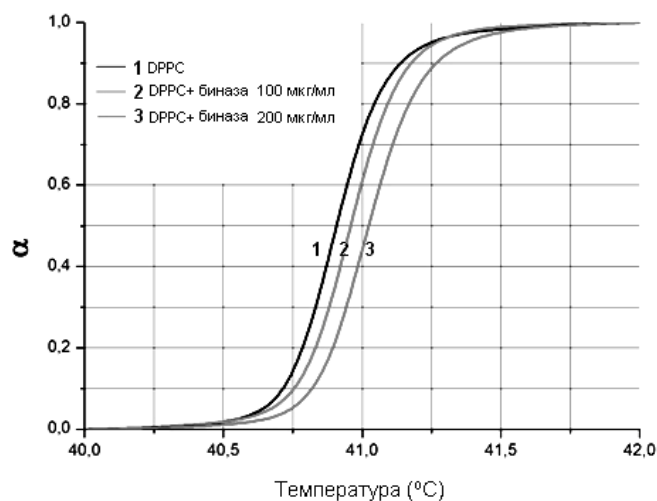


Рис. 5. Кривые плавления везикул DPPC

На рис. 5 представлены кривые плавления везикул DPPC, анализ которых показывает, что в присутствии биназы доля жидкой фазы ( $\alpha$ ) при фазовом переходе липида уменьшается.

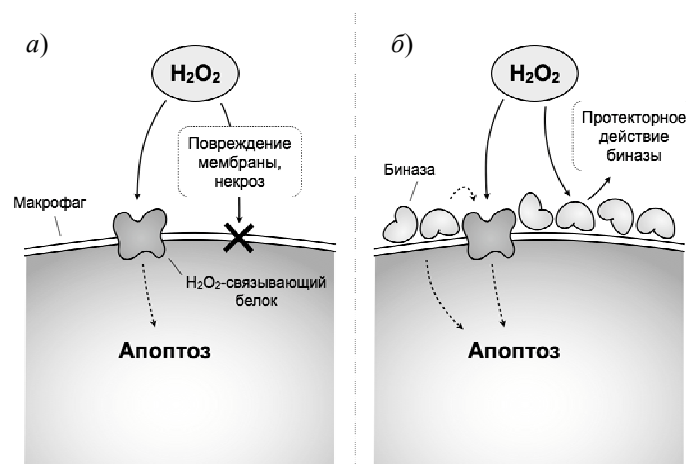


Рис. 6. Гипотетическая модель протекторного действия биназы на макрофаг в условиях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированного оксидативного стресса: а) некроз- и апоптоз-индуцирующие эффекты пероксида водорода; б) возможные механизмы действия биназы на макрофаг: стабилизирующее действие на цитоплазматическую мембрану и влияние биназы на систему передачи H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированных проапоптогенных сигналов

Уменьшение доли жидкой фазы при фазовом переходе липида в присутствии биназы вполне согласуется с повышением температуры фазового перехода гель – жидкий кристалл у этих образцов по сравнению с контролем. В свою очередь, повышение температуры фазового перехода липида после взаимодействия с биназой свидетельствует о стабилизации липидного бислоя.

На основании полученных результатов мы предлагаем гипотетическую модель протекторного действия биназы в условиях оксидативного стресса. В макрофагах идентифицированы апоптоз-индуцирующие сигнальные пути, запускаемые пероксидом водорода [18]. Вместе с тем пероксид водорода способен оказывать цитотоксический эффект, проявляющийся в непосредственном повреждении мембраны и некротической гибели клетки (рис. 6, а). Адсорбция РНКазы на клеточную мембрану, вызывая структурные перестройки мембраны, стабилизирующие её бислоем, приводит к снижению разрушающего действия на мембрану пероксида водорода. В результате процент некротической гибели клеток значительно снижается. Подобный механизм стабилизации мембран бактериальных клеток после их взаимодействия с биназой, по-видимому, лежит и в основе антимуtagenной активности этого фермента, описанной в работе [19]. Кроме того, нельзя исключить вмешательства биназы в систему передачи пероксид-индуцированных проапоптогенных сигналов, которые способствуют апоптозу (рис. 6, б).

В многочисленных работах доказана роль Toll like-рецепторов (TLR) в реализации программированной клеточной гибели и активации естественного иммунитета [20–22]. Результаты ряда исследований свидетельствуют о потенциальном участии TLR в системе H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированных NF-κB-зависимых сигнальных путей, ведущих к аутофагии, некрозу и апоптозу [23]. В работе [24] экспериментально доказано, что (в кардиомиоцитах) пероксид водорода инициирует активацию NF-κB и AP-1 посредством TLR-2-зависимого механизма.



С другой стороны, известно, что бактерии рода *Bacillus* взаимодействуют с макрофагами через TLR-2 и TLR-4 [25], а биназа концентрационно зависимо модулирует окислительный метаболизм макрофагов [9]. В связи с этим нельзя исключить, что биназа способна активировать TLR макрофага и запускать через них апоптоз. Предлагаемый механизм мог бы объяснить обнаруженный проапоптогенный ко-стимулирующий эффект комбинации биназа + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Однако предположение о TLR-зависимых механизмах действия биназы нуждается в экспериментальном подтверждении. Полученные в настоящей работе результаты дают основание для более глубокого исследования влияния биназы на клеточную гибель.

### 3. Выводы

Предварительная инкубация перитонеальных макрофагов с биназой в концентрации 100 мкг/мл и выше приводит к снижению гибели макрофагов от некроза, индуцированного оксидативным стрессом, при этом клетки вступают преимущественно на путь апоптоза.

Взаимодействие биназы с большими моноламеллярными везикулами дипальмитоилфосфатидилхолина сопровождается увеличением температуры фазового перехода липида гель – жидкий кристалл и уменьшением доли жидкой фазы при фазовом переходе. Изменение этих параметров свидетельствует о стабилизирующем эффекте биназы на липидный бислой.

### Summary

*V.A. Mironov, A.V. Filippov, F.V. Shirshikov, G.V. Cherepnev, N.V. Kalacheva.* The Effect of Binase on the Necrosis and Apoptosis of Macrophages in an Oxidative Stress Model.

Preliminary incubation of peritoneal macrophages with binase in a concentration of 100 mkg/ml (and more) results in the reduction of the macrophages' death by necrosis induced by hydrogen peroxide. In this case the cells mostly enter apoptosis. The protection effect of binase may be a consequence of a stabilizing effect of binase on cytoplasmic membrane. The possibility of the lipid bilayer stabilization is indicated by the change in DPPC phase transition parameters in the presence of binase, which have been determined in a model experiment by differential scanning calorimetry. However, the influence of binase on the transmission of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced pro-apoptotic signals should not be ruled out.

**Key words:** binase, macrophage, oxidative stress, necrosis, apoptosis, protection effect.

### Литература

1. *Pereira W.O., Amarante-Mendes G.P.* Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal // *Scand. J. Immunol.* – 2011. – V. 73, No 5. – P. 401–407.
2. *Манских В.Н.* Пути гибели клетки и их биологическое значение // *Цитология.* – 2007. – Т. 49, № 11. – С. 909–915.
3. *Москалёва Е.Ю., Северин С.Е.* Возможные механизмы адаптации клетки к повреждениям, индуцирующим программированную гибель. Связь с патологией // *Патол. физиол. и эксперим. терапия.* – 2006. – № 2. – С. 2–16.
4. *Edinger A.L., Thompson C.B.* Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2004. – V. 16, No 6. – P. 663–669.

5. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса // *Вопр. мед. химии.* – 2001. – Т. 47, № 6. – С. 561–581.
6. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых И.А., Труфякин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 554 с.
7. Часовских Н.Ю., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Апоптоз и окислительный стресс. – Томск: Печ. мануфактура, 2009. – 148 с.
8. Калачева Н.В., Куриненко Б.М. Влияние рибонуклеаз и их модифицированных производных на функциональную активность перитонеальных макрофагов крысы // *Биомед. химия.* – 2005. – Т. 51, № 3. – С. 303–309.
9. Калачева Н.В., Наруллина А.В., Куриненко Б.М. Особенности электростатического взаимодействия панкреатической и микробной рибонуклеаз с макрофагами *in vitro* // *Цитология.* – 2007. – Т. 49, № 4. – С. 296–300.
10. Голубенко И.А., Балабан Н.П., Лецинская И.Б., Волкова Т.И., Клейнер Г.И., Чепурнова Н.К., Афанасенко Г.А., Дудкин С.М. Рибонуклеаза *Vacillus intermedius* 7P. Очистка хроматографией на фосфоцеллюлозе и некоторые характеристики гомогенного фермента // *Биохимия.* – 1979. – Т. 44, № 4. – С. 640–648.
11. Клиническая лабораторная аналитика: в 3 т. / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Лабинформ-РАМЛД, 1999. – Т. 2: Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. – 375 с.
12. Gawlitta D., Oomens C.W.J., Vaaijens F.P.T., Bouten C.V.C. Evaluation of a continuous quantification method of apoptosis and necrosis in tissue cultures // *Cytotechnology.* – 2004. – V. 46, No 2–3. – P. 139–150.
13. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // *Усп. биол. химии.* – 2009. – Т. 49. – С. 341–388.
14. Справочник по лабораторным методам исследований / Под ред. Л.А. Даниловой. – СПб.: Питер, 2003. – 736 с.
15. McMullen, T.P., McElhaney R.N. New aspects of the interaction of cholesterol with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as revealed by high-sensitivity differential scanning calorimetry // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – V. 1234, No 1. – P. 90–98.
16. Traïkia M., Warschawski D.E., Recouvreux M., Cartaud J., Devaux P.F. Formation of unilamellar vesicles by repetitive freeze-thaw cycles: characterization by electron microscopy and <sup>31</sup>P-nuclear magnetic resonance // *Eur. Biophys. J.* – 2000. – V. 29, No 3. – P. 184–195.
17. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
18. Ryan K.A., Smith M.F. Jr., Sanders M.K., Ernst P.B. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression // *Infect. Immun.* – 2004. – V. 72, No 4. – P. 2123–2130.
19. Иванченко О.Б., Ильинская О.Н., Карамова Н.С. Антимутагенная активность ферментного препарата «Биназа» в микробных тест-системах // *Микробиология.* – 1995. – Т. 54, № 2. – С. 234–238.
20. Aliprantis A.O., Yang R.B., Weiss D.S., Godowski P., Zychlinsky A. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2 // *EMBO J.* – 2000. – V. 19, No 13. – P. 3325–3336.
21. Lasker M.V., Nair S.K. Intracellular TLR signaling: a structural perspective on human disease // *J. Immunol.* – 2006. – V. 177, No 1. – P. 11–16.

22. *Werling D., Hope J.C., Howard C.J., Jungi T.W.* Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists // *Immunology*. – 2004. – V. 111, No 1. – P. 41–52.
23. *Bortoluci K.R., Medzhitov R.* Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR // *Cell Mol. Life Sci.* – 2010. – V. 67, No 10. – P. 1643–1651.
24. *Frantz S., Kelly R.A., Bourcier T.* Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor  $\kappa$ B by oxidative stress in cardiac myocytes // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276, No 7. – P. 5197–5203.
25. *Huang J.M., La Ragione R.M., Nunez A., Cutting S.M.* Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2008. – V. 53, No 2. – P. 195–203.

Поступила в редакцию  
13.02.12

---

**Миронов Владислав Алексеевич** – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [kazan.vlad@gmail.com](mailto:kazan.vlad@gmail.com)

**Филиппов Андрей Васильевич** – доктор физико-математических наук, профессор кафедры физики молекулярных систем Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [andrey.filippov@ksu.ru](mailto:andrey.filippov@ksu.ru)

**Ширшиков Фёдор Владимирович** – студент кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [shrshkv@ya.ru](mailto:shrshkv@ya.ru)

**Черепнёв Георгий Валентинович** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий иммунологической лабораторией Республиканской клинической больницы № 2 МЗ РТ, г. Казань.

E-mail: [rkb2\\_rt@mail.ru](mailto:rkb2_rt@mail.ru)

**Калачёва Наталия Васильевна** – кандидат химических наук, старший научный сотрудник кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [nvkalacheva@yandex.ru](mailto:nvkalacheva@yandex.ru)