

## ДЕЙСТВИЕ СЛАБЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 2016 г. В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, Е.Е. Фесенко

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: docmag@mail.ru

Поступила в редакцию 09.10.15 г.

Показано, что воздействие комбинацией постоянным (42 мкТл) и коллинеарным ему слабым (диапазон амплитуд 108–3440 нТл) переменным низкочастотным (1; 4,4; 16,5 Гц, при соотношении амплитуд 6; 1; 1,6 соответственно частотам) магнитными полями на гепаринизированную и разбавленную фосфатным буфером венозную кровь человека при физиологических температурах вызывает усиление ее хемилюминесценции после добавки люминола или люцигенина. Акцептор свободных радикалов эдаравон (МС1–186) и ингибитор НАДФН-оксидазы апоцинин снижают интенсивность хемилюминесценции крови и нивелируют этот эффект действия магнитных полей.

*Ключевые слова:* магнитное поле, кровь, хемилюминесценция.

Ранее нами проведено исследование, направленное на экспериментальный анализ возможности генерации свободных радикалов кровью млекопитающих при действии комбинации магнитных полей (МП) с крайне слабой переменной низкочастотной компонентой [1]. Для определения радикалов и других активных форм кислорода (АФК) в крови млекопитающих в работе был использован метод хемилюминесценции (ХЛ), основанный на регистрации ХЛ в присутствии химических активаторов [2]. Было показано, что воздействие комбинацией постоянным МП (42 мкТл) и коллинеарным ему очень слабым переменным низкочастотным магнитным полем (1 Гц, 600 нТл; 4,4 Гц, 100 нТл; 16,5 Гц, 160 нТл) на гепаринизированную и разбавленную фосфатным буфером венозную кровь человека при физиологических температурах вызывает резкое усиление ее хемилюминесценции после добавки люминола. В этой связи представляется важным определить диапазон интенсивностей переменной компоненты комбинации МП, в котором проявляется этот эффект. Представляется значимой оценка влияния добавок к образцам крови химических ловушек свободных радикалов и блокаторов ферментов (например, НАДФН-оксидазы) – продуцентов АФК в экспериментах при действии слабого магнитного поля на хемилюминесценции крови, что спо-

собствовало бы более полному выяснению вовлеченности свободнорадикальных процессов в механизм реализации этого эффекта слабых МП. Этому бы способствовало и использование в экспериментах наряду с люминолом других активаторов хемилюминесценции.

Представленные в настоящей статье данные касаются исследования биологического действия слабых и крайне слабых постоянных и переменных магнитных полей с параметрами, соответствующими диапазону естественных (геомагнитных) и искусственных (техногенных) магнитных полей – нано- и микротесловые интенсивности и низкие частоты (единицы, десятки и сотни герц) и представляются актуальными в связи с недостаточной изученностью эффектов и механизмов действия этих МП [3–7].

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследований использовали свежие образцы венозной крови из кубитальной вены от практически здоровых доноров с гепарином в качестве антикоагулянта. Кровь разводили в фосфатном буфере, содержащем 147 мМ NaCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 мМ KCl, pH 7,4. В основном для опытов готовили образцы следующего состава и объема: 200 мкл фосфатного буфера, 25 мкл гепаринизированной (20 М.Е. на 1 мл) крови, предварительно разведенной в соотношении 1 : 3. Ряд опытов был проведен с использованием для разведения крови вместо фосфатного буфера раствора Хенкса с pH 7,4. Образцы разведенной крови инкубировали при

Сокращения: МП – магнитное поле, АФК – активные формы кислорода, ХЛ – хемилюминесценция.

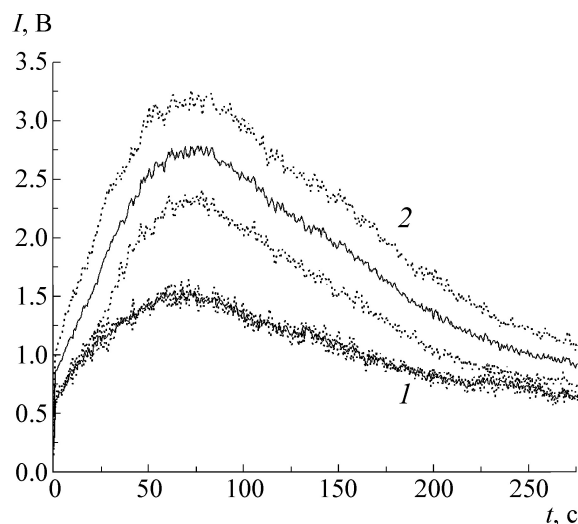
37°C в плоскодонных цилиндрических кварцевых пробирках, закрытых парафильмом, в которых затем проводили регистрацию хемилюминесценции. Типичное время инкубации составляло 1 ч.

Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле с постоянной составляющей ~ 42 мкТл и уровнем магнитного фона на частоте 50 Гц в 15–50 нТл, соответствующими этим показателям в экспериментальных группах, за исключением заданной искусственно переменной компоненты поля.

Установка для воздействия слабыми МП состояла из двух пар коаксиально расположенных колец Гельмгольца диаметром 140 см, ориентированных вдоль вектора геомагнитного поля. На одну пару колец подавали постоянный ток для формирования заданной величины постоянной составляющей МП  $42 \pm 0,1$  мкТл. На вторую пару колец подавали электрический ток от генератора синусоидальных сигналов для формирования переменной компоненты поля. Базовая амплитуда переменной компоненты составляла  $860 \pm 10$  нТл. В опытах был использован трехчастотный сигнал 1; 4,4 и 16,5 Гц, показавший активность в предыдущих опытах [1,8], с амплитудами отдельных частот 600, 100 и 160 нТл соответственно. В отдельной серии опыты были проведены при различных амплитудах переменной компоненты в диапазоне 108–3440 нТл при соотношении амплитуд 6; 1; 1,6 соответственно частотам 1; 4,4 и 16,5 Гц. Величины действующих МП определяли прямым измерением с помощью феррозондового датчика Mag-03 MS 100 (Bartington, Великобритания).

После часовой инкубации измеряли интенсивность хемилюминесценции образцов крови в контрольных и опытных случаях после добавки в них 10 мкл раствора люминола или люцигенина (Enzo Life Sciences, США) с концентрацией  $10^{-2}$  М (рабочие концентрации  $4,25 \cdot 10^{-4}$  М). В работе использован хемилюминометр Lum-5773 (ООО «ДИСофт», Россия), измеряющий интенсивность света, возникающего в биологических образцах. Значения интенсивности свечения соответствовали световому потоку, т.е. количеству фотонов в единицу времени. При этом  $1 \text{ мВ} \approx 1 \text{ фотон/с}$ . Для анализа данных хемилюминесценции использована программа PowerGraph.

Отдельные серии опытов проведены при добавках к образцам крови ловушки свободных радикалов MCI-186 (Santa Cruz Biotechnology, США) или блокатора НАДФН-оксидазы – апоцинина (Santa Cruz Biotechnology, США).



**Рис. 1.** Влияние слабых МП (постоянное МП 42 мкТл, переменное МП 16,5 Гц, 160 нТл; 4,4 Гц, 100 нТл; 1 Гц, 600 нТл) на хемилюминесценцию венозной крови человека при добавлении люминола. Контрольные (1) и опытные (2) образцы инкубировали 60 мин при 37°C. Пунктирными линиями обозначены стандартные отклонения. Ось абсцисс – время в секундах с момента введения люминола; ось ординат – интенсивность хемилюминесценции в вольтах, где 1000 фотон/с = 1 В.

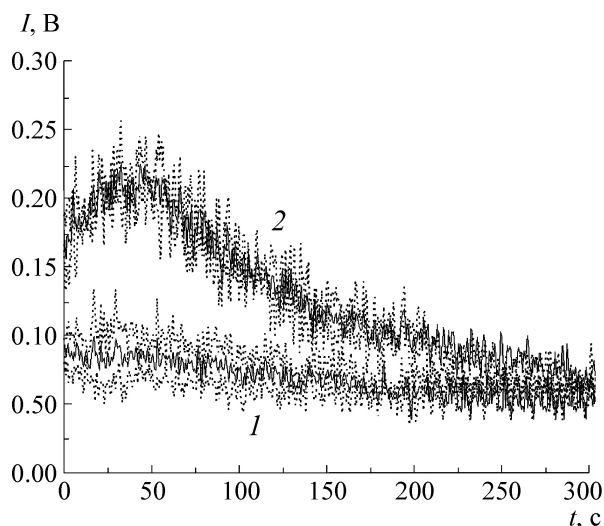
Результаты статистически обработаны с применением *t*-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из рис. 1, часовая обработка разбавленной фосфатным буфером венозной крови человека вызывает резкую активацию ХЛ образца после добавки в него люминола. Подобный эффект отсутствует в контрольных случаях. Представленные результаты, полученные в опытах *in vitro*, однозначно свидетельствуют о реакции крови млекопитающих на воздействие слабыми МП с переменной низкочастотной компонентой менее 1 мкТл.

Добавка в качестве активатора ХЛ люцигенина также привела к усилению ХЛ после воздействия слабыми МП (рис. 2). В силу высокой чувствительности люцигенина как хемилюминесцентного зонда на супероксидный радикал [2] можно предположить усиление продукции супероксида при действии МП.

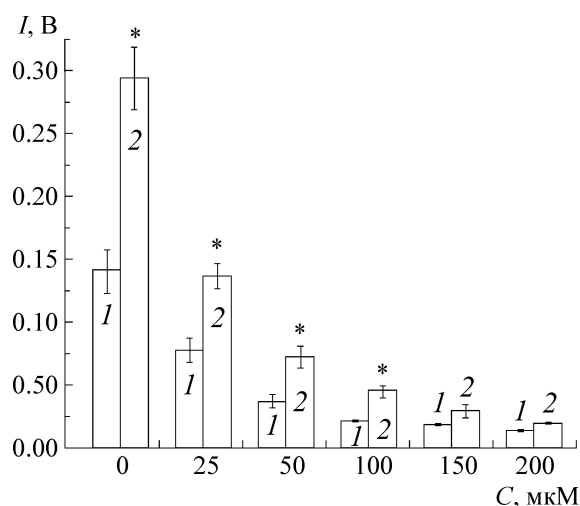
Для рассмотрения вопроса о роли АФК в усилении хемилюминесценции крови при действии слабыми МП мы уменьшили уровень АФК с использованием нескольких методов. Один метод снижения АФК был основан на использовании терапевтического антиоксиданта и поглотителя свободных радикалов MCI-186 (эда-



**Рис. 2.** Влияние слабых МП (постоянное МП 42 мкТл, переменное МП 16,5 Гц, 160 нТл; 4,4 Гц, 100 нТл; 1 Гц, 600 нТл) на хемилюминесценцию венозной крови человека при добавлении люцигенина. Контрольные (1) и опытные (2) образцы инкубировали 60 мин при 37°C. Пунктирными линиями обозначены стандартные отклонения. Ось абсцисс – время в секундах с момента введения люцигенина; ось ординат – интенсивность хемилюминесценции в вольтах, где 1000 фотон/с = 1 В.

равона) [9,10]. Эдаравон оказывает существенное влияние на интенсивность хемилюминесценции образцов венозной крови (рис. 3). При инкубации образцов крови в присутствии МСИ-186 в контрольных и опытных случаях интенсивность хемилюминесценции заметно снижается. Степень выраженности этого эффекта МСИ-186 зависит от его концентрации. Так, например, 25 мкМ эдаравона при добавке к опытным образцам компенсирует разницу между контролем (без МСИ-186) и опытом, обусловленную действием слабого МП. Более высокие значения интенсивности ХЛ в опытных образцах по сравнению с контролем при одинаковых концентрациях эдаравона отмечены вплоть до 100 мкМ МСИ-186. При добавках 150 или 200 мкМ эдаравона в контрольных и опытных случаях интенсивности хемилюминесценции образцов крови значительно снижены (более чем на 80%) и не отличаются между собой (рис. 3).

Мы использовали также другой метод снижения АФК – с помощью апоцинина, который нарушает сборку ферментативного комплекса НАДФН-оксидазы [11], фермента продуцента супероксид-анион-радикала [12]. Как и в случае с МСИ-186, при инкубации образцов крови в присутствии апоцинина интенсивность хемилюминесценции крови заметно снижается (рис. 4).

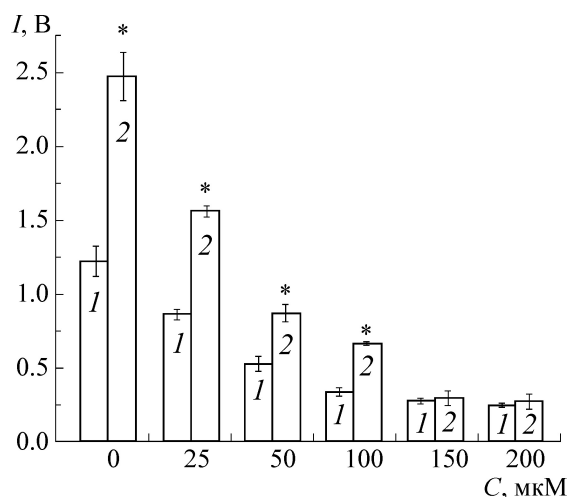


**Рис. 3.** Влияние слабых МП (постоянное МП 42 мкТл, переменное МП 16,5 Гц, 160 нТл; 4,4 Гц, 100 нТл; 1 Гц, 600 нТл) на хемилюминесценцию крови человека в присутствии эдаравона при добавлении люминола; контрольные (1) и опытные (2) образцы инкубировали 60 мин при 37°C. Ось абсцисс – концентрация МСИ-186; ось ординат – интенсивность хемилюминесценции (максимальные значения) в вольтах, где 1000 фотон/с = 1 В. Здесь и на последующих рисунках звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ( $p < 0,05$ ).

В венозной крови при концентрации апоцинина 25 мкМ в опытных образцах (действие слабых комбинированных МП) интенсивность ХЛ практически не отличается от уровня базового контроля (в отсутствие апоцинина). При добавках 150 и 200 мкМ апоцинина интенсивности ХЛ и в контроле и в опыте резко снижены и не различаются между собой.

Эти результаты, полученные с использованием акцептора свободных радикалов (эдаравона) и ингибитора НАДФН-оксидазы (апоцинина), явно указывают на вовлеченность свободнорадикальных процессов в механизм реализации действия слабых КМП на кровь млекопитающих. Усиление люцигенин-активированной ХЛ при действии МП, используемой для обнаружения супероксидного радикала [2], а также ингибирование эффектов апоцинином являются доказательствами участия этого радикала в исследуемых процессах.

Опыты с различными интенсивностями переменной компоненты МП в диапазоне 108–3440 нТл показали наличие реакции на воздействие комбинированным МП во всем изученном диапазоне (рис. 5). При этом в более сильном переменном магнитном поле при амплитудах 1720 и 3440 нТл степень выраженности эффекта выше. При амплитудах 430 и 860 нТл эффект



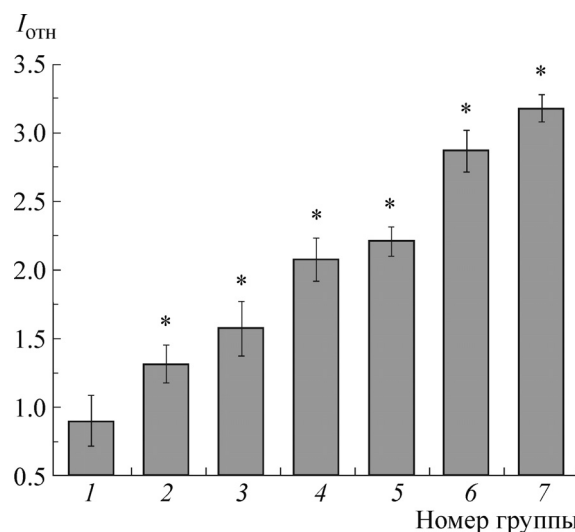
**Рис. 4.** Влияние слабых МП (постоянное МП 42 мкТл, переменное МП 16,5 Гц, 160 нТл; 4,4 Гц, 100 нТл; 1 Гц, 600 нТл) на хемилюминесценцию крови человека в присутствии апоцинина при добавлении люминола; контрольные (1) и опытные (2) образцы инкубировали 60 мин при 37°C. Ось абсцисс – концентрация апоцинина; ось ординат – интенсивность хемилюминесценции (максимальные значения) в вольтах, где 1000 фотон/с = 1 В.

действия поля по величине несколько ниже. При минимальной из использованных амплитуд – 108 нТл – эффект действия комбинированных МП на хемилюминесценцию крови существенно ослабевает.

Обращает на себя внимание линейная зависимость величины этого эффекта от амплитуды переменной компоненты поля. Этот тип зависимости отличается от обнаруженных ранее нами [8,13] и другими авторами [14] на различных биологических объектах (планарии, мыши с трансплантированными опухолями) нелинейных, часто полиэкстремальных (мультипиковых) зависимостей, свидетельствующих о наличии так называемых «амплитудных окон» биологической активности слабых МП [15]. Этот факт может явиться следствием некоторой особенности механизма изучаемого нами эффекта действия слабых МП на хемилюминесценцию крови, или же быть обусловленным более сложной нелинейной зависимостью других эффектов МП от скорости производства и концентрации свободных радикалов.

В целом приведенные данные свидетельствуют о роли свободных радикалов, генерируемых кровью млекопитающих, в механизмах биологического действия слабых магнитных полей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных



**Рис. 5.** Влияние слабых МП (постоянное МП 42 мкТл; переменное МП – сумма трех частот 1, 4,4 и 16,5 Гц при соотношении амплитуд 6, 1 и 1,6) на хемилюминесценцию крови человека при добавлении люминола в зависимости от амплитуды переменной компоненты МП. Ось абсцисс – номер группы; ось ординат – относительная интенсивность хемилюминесценции (максимальные значения интенсивности ХЛ в опыте/максимальные значения интенсивности ХЛ в контроле). 1 – Контроль (источник переменного МП отключен), 2 – амплитуда переменного поля 108 нТл, 3 – 215 нТл, 4 – 430 нТл, 5 – 860 нТл, 6 – 1720 нТл, 7 – 3440 нТл.

исследований (грант № 14-44-03676 р\_центр\_а) и Правительства Московской области.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **60** (3), 530 (2015).
2. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурина, *Успехи биол. наук* **49**, 341 (2009).
3. В. Н. Бинги, *Принципы электромагнитной биофизики* (Изд-во Физматлит, М., 2011).
4. В. В. Новиков, В. О. Пономарев, Г. В. Новиков и др., *Биофизика* **55** (4), 631 (2010).
5. В. О. Пономарев и В. В. Новиков, *Биофизика* **54** (2), 235 (2009).
6. В. В. Леднев, в сб. *Моделирование геофизических процессов* (Объединенный институт физики Земли им. О. Ю. Шмидта, М., 2003), сс. 130–136.
7. А. Л. Бучаченко, *Успехи химии* **83** (1), 1 (2014).
8. V. V. Novikov, G. V. Novikov, and E. E. Fesenko, *Bioelectromagnetics* **30**, 343 (2009).
9. E. Otomo, *Cerebrovasc Dis.* **15**, 222 (2003).
10. N. R. Love, Y. Chen, S. Ishibashi, et al., *Nat. Cell Biol.* **15**, 222 (2013).
11. J. Stefanska and R. Pawliczak, *Mediators Inflamm.* 2008:106507 (2008).

12. J. D. Lambeth, *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 181 (2004).
13. V. V. Novikov, I. M. Sheiman, and E. E. Fesenko, *Bioelectromagnetics* **29**, 387 (2008).
14. N. A. Belova, O. N. Ermakova, A. M. Ermakov, et al., *Environmentalist* **27**, 411 (2007).
15. A. R. Liboff, S. D. Smith, and B. R. McLeod, in *Mechanistic Approaches to Interactions of Electric and Electromagnetic Fields with Living Systems*, Ed. by M. Blank and E. Findl (Plenum Press, New York, London, 1987), pp. 109–132.

## Action of Weak Magnetic Fields on Chemiluminescence in Human Blood

V.V. Novikov, E.V. Yablokova, and E.E. Fesenko

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

It was demonstrated that the exposure of heparinized human venous blood diluted in phosphate buffer to a static magnetic field (42 mT) in combination with a collinear weak (amplitude range of 108–3440 nT) variable low-frequency (1 Hz; 4.4 Hz; 16.5 Hz at amplitude ratio values 6; 1; 1.6, respectively) magnetic fields at physiological temperatures, causes an intensification of chemiluminescence after addition of luminol or lucigenin. The free radical scavenger edaravone (MCI-186) and the NADPH oxidase inhibitor apocynin reduce the intensity of blood chemiluminescence, neutralizing the effect of magnetic fields.

*Key words: magnetic field, blood, chemiluminescence*