

ВЛИЯНИЕ СЛАБЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В НЕЙТРОФИЛАХ

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

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

E-mail: docmag@mail.ru

Поступила в редакцию 29.06.16 г.

Показано, что часовое экспонирование перитонеальных нейтрофилов мышей при физиологических температурах в слабых комбинированных постоянном (42 мкТл) и коллинеарном ему низкочастотном переменном (сумма частот 1,0, 4,4 и 16,5 Гц, амплитуда 0,86 мкТл) магнитных полях вызывает усиление внутриклеточной продукции активных форм кислорода, регистрируемое по изменению интенсивности флуоресценции продуктов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина и дигидрорадамина 123. Дополнительное введение малых концентраций активаторов респираторного взрыва – формилированного пептида N-formyl-Met-Leu-Phe или форболового эфира форбол-12-меристат-13-ацетата – значительно усиливает степень выраженности этого эффекта слабых магнитных полей.

Ключевые слова: магнитное поле, нейтрофилы, активные формы кислорода, флуоресценция, респираторный взрыв.

Возможность влияния на продукцию активных форм кислорода (АФК) рассматривается как один из перспективных подходов к анализу механизмов биологического действия слабых магнитных полей [1–4]. Ранее нами исследовано влияние комбинированных магнитных полей (КМП) с крайне слабой переменной низкочастотной компонентой на генерацию свободных радикалов кровью млекопитающих [5,6]. Для определения радикалов и других АФК в крови человека и лабораторных животных был использован метод хемилюминесценции, основанный на регистрации хемилюминесценции в присутствии химических активаторов [7]. В результате экспериментов было обнаружено, что воздействие слабых постоянных и переменных магнитных полей с параметрами, соответствующими диапазону естественных (геомагнитных) и искусственных (техногенных) магнитных полей – нано- и микротесловые интенсивности (диапазон амплитуд 0,11–3,44 мкТл) и низкие частоты (1,0, 4,4, 16,5 Гц) – на гепаринизированную и разбавленную фосфатным буфером венозную кровь при физиологических температурах вызывает значительное усиление ее хемилюминесценции после добавки люминола

или люцигенина [5,6]. Акцептор свободных радикалов эдаравон (МС1-186) и ингибитор НАДФН-оксидазы апоцинин снижают интенсивность хемилюминесценции крови и нивелируют этот эффект действия магнитных полей, что явно указывает на вовлеченность свободнорадикальных процессов в механизм действия слабых КМП [6]. Далее было показано, что предварительное часовое экспонирование суспензии нейтрофилов мышей и человека при физиологических температурах в слабых комбинированных постоянном (42 мкТл) и коллинеарном ему низкочастотном переменном (сумма частот 1; 4,4 и 16,5 Гц, амплитуда 0,86 мкТл) магнитных полях вызывает праймирование респираторного взрыва, что проявляется в значительном усилении хемилюминесценции в ответ на введение малых концентраций активаторов респираторного взрыва: формилированного пептида N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) или форбол-12-меристат-13-ацетата (ФМА) в присутствии люминола [8].

По причине недостаточной изученности обнаруженных нами эффектов слабых КМП, в частности неопределенности мест образования АФК (внутри и/или вне клетки), нами принято данное исследование. Доказать продукцию АФК внутри клетки методами хемилюминесценции нелегко [7], поэтому на данном этапе мы применили метод флуоресцентной спектроскопии с использованием хорошо изученных проникающих в клетки флуоресцентных

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, КМП – комбинированные магнитные поля, fMLP – формилированный пептид N-formyl-Met-Leu-Phe, ФМА – форбол-12-меристат-13-ацетат, H2DCF-DA – 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина диацетат.

зондов на АФК – 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата (H2DCF-DA) и дигидрородамина 123 [9–12]. H2DCF-DA проникает в клетку, где под действием внутриклеточных эстераз переходит в форму H2DCF. H2DCF – слабо флуоресцирующий агент, который в реакциях с окислителями превращается в сильно флуоресцирующий продукт дихлорфлуоресцеин. Дигидрородамин 123, так же как и H2DCF-DA, является липофильным соединением, которое легко проникает в клетку. При окислении дигидрородамин 123 превращается во флуоресцирующий родамин 123. При окислении одна из аминогрупп красителя приобретает заряд, что препятствует его выходу из клетки в окисленной форме.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение суспензии нейтрофилов. Работа выполнена на перитонеальных нейтрофилах мышей. Для получения нейтрофилов использовали лабораторных мышей-самцов линии Balb массой 22–25 г. В перитонеальную полость мыши инъецировали 150 мкл суспензии зимозана с концентрацией 5 мг/мл (Zymozan A из *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma, США). После этого через 12 ч животных умерщвляли методом ультрафиолетовой дислокации и промывали их брюшную полость тремя миллилитрами охлажденного раствора Хенкса без кальция. Экссудат собирали пипеткой и центрифугировали в течение 10 мин при 600 g. Супернатант декантировали, а осадок разводили в 2 мл бескальциевого раствора Хенкса и оставляли на 1 ч при 4°C. Количество выделенных клеток подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определяли, используя витальный краситель трипановый синий. Содержание живых клеток при этом составляло не менее 98%. Для опытов образцы получали, разводя суспензию нейтрофилов стандартной средой Хенкса (138 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaHCO₃, 5,5 mM глюкозы, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,4; Sigma, США) до концентрации 1 млн кл/мл.

Экспонирование суспензии нейтрофилов в магнитном поле. Нейтрофилы инкубировали при 37°C в концентрации 1 млн/мл по 250 мкл в полипропиленовых пробирках типа Эппендорф. Типичное время инкубации составляло 1 ч. Заданную температуру поддерживали с помощью циркуляционного термостата.

Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле с постоянной составляющей ~ 42 мкТл и уровнем магнитного фона на 50 Гц 15–50 нТл, что соответствует

показателям в экспериментальных группах, за исключением заданной искусственно переменной компоненты поля.

Установка для воздействия слабыми магнитными полями 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 магнитного поля $42,0 \pm 0,1$ мкТл. На вторую пару колец подавали электрический ток от генератора синусоидальных сигналов для формирования переменной компоненты поля. Базовая амплитуда переменной компоненты составляла 860 ± 10 нТл. В опытах был использован трехчастотный сигнал 1,0, 4,4 и 16,5 Гц, показавший активность в предыдущих опытах [5,6,8,13], с амплитудами отдельных частот 600, 100 и 160 нТл соответственно. Величины действующих магнитных полей определяли прямым измерением с помощью феррозондового датчика Mag-03 MS 100 (Bartington, Великобритания).

Флуоресцентная детекция внутриклеточных АФК. После часовой инкубации в КМП источник переменного магнитного поля отключали и к суспензии нейтрофилов добавляли флуоресцентные зонды на внутриклеточные АФК – H2DCF-DA или дигидрородамин 123 – до конечной концентрации 0,01 мг/мл. В ряд контрольных и опытных образцов также добавляли один из активаторов генерации АФК: хемотаксический формилованный пептид N-формил-Met-Leu-Phe (Sigma, США) в концентрации 0,1 мкМ или форбол-12-меристат-13-ацетат (Sigma, США) в концентрации 0,01 мкМ, используемой в предыдущих опытах [8]. Пробы продолжали инкубировать при 37°C в темноте, чтобы минимизировать фотооксидацию красителей. В случае с H2DCF-DA время инкубации составило 30 мин, а при использовании дигидрородамина 123 – 10 мин. Затем клетки отмывали, центрифугируя при 600 g в течение 10 мин при комнатной температуре в растворе Хенкса. Далее к осадку добавляли 1 мл среды, ресуспендировали и регистрировали спектры флуоресценции образцов на приборе Thermo Scientific Lumina Fluorescence Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, США) при возбуждении на длине волны 488 нм.

Результаты статистически обработаны с применением *t*-критерия Стьюдента. Часть результатов представлена как отношение максимальной интенсивности хемилюминесценции в опытах к базовому контролю без активаторов, принятому за 100%.

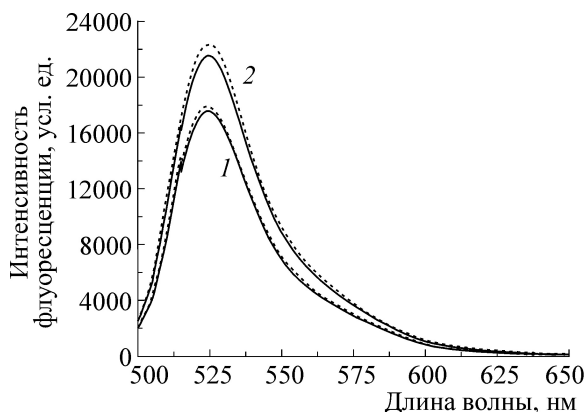


Рис. 1. Спектры флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в контроле (1) и в опыте (2) – после действия слабых комбинированных магнитных полей. Пунктирными линиями обозначены стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспонирование перитонеальных нейтрофилов в слабых КМП вызывает значительное (на 22%) увеличение интенсивности флуоресценции внутриклеточного дихлорфлуоресцеина (рис. 1, 2). При использовании дополнительной стимуляции клеток после воздействия КМП с помощью fMLP степень различий между контролем и опытом увеличивается до 43%. Важно отметить, что сама стимуляция нейтрофилов низкой дозой (0,1 мкМ) fMLP не приводит к увеличению интенсивности флуоресценции этого зонда на АФК (рис. 2). Стимуляция нейтрофилов активатором ФМА (0,01 мкМ) вызывает увеличение интенсивности флуоресценции внутриклеточного дихлорфлуоресцеина в контрольных группах в среднем на 35%, а проведенная после обработки полем – приводит к двукратному усилению интенсивности флуоресценции в опыте по сравнению с соответствующим контролем (рис. 2).

Интенсивность флуоресценции родамина 123 в опыте (воздействие КМП без дополнительной стимуляции) существенно выше (на 47%), чем в контроле (рис. 3, 4). В этом случае не выражен эффект дополнительной стимуляции с помощью fMLP (различия между контролем и опытом составляют ~ 53%). Заметна реакция флуоресценции родамина 123 на саму стимуляцию fMLP (увеличение на 13%). Использование активатора ФМА приводит к двукратному усилению флуоресценции в контрольных группах. После предварительной обработки суспензии клеток КМП и введения ФМА различия между контролем и опытом достигают 100% (рис. 4). Следует отметить, что максимальные значения интен-

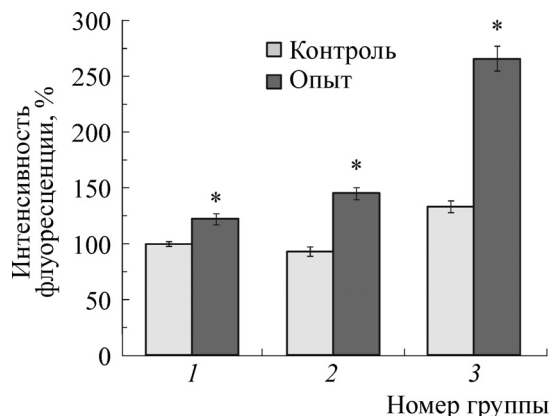


Рис. 2. Влияние слабых комбинированных магнитных полей (постоянное МП 42 мкТл; переменное МП 0,86 мкТл – сумма трех частот 1,0, 4,4 и 16,5 Гц при соотношении амплитуд 6, 1 и 1,6) на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в отсутствие и в присутствии активаторов респираторного взрыва. Ось ординат – максимальная интенсивность хемилуминесценции в процентах по отношению к базовому контролю без активаторов (средние значения и стандартные отклонения, $n = 5$); ось абсцисс – номер группы; 1 – контроль и опыт без активаторов, 2 – контроль и опыт с добавками 0,1 мкМ fMLP, 3 – контроль и опыт с добавками 0,01 мкМ ФМА. Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$).

сивности флуоресценции родамина 123 в этой серии опытов отмечены при использовании дополнительной стимуляции ФМА. При воздействии КМП наблюдается рост флуоресценции дихлорфлуоресцеина и родамина 123 приблизительно в два раза по сравнению с контрольными образцами, также простимулированными ФМА (рис. 2, 4). Сами низкие концентрации ФМА вызывают существенное увеличение продукции внутриклеточных АФК, что особенно заметно в случае с родамином 123.

Таким образом, воздействие слабыми КМП вызывает усиление продукции внутриклеточных АФК в нейтрофилах, что отмечается во всех опытах с обоими флуоресцирующими зондами. В опытах с дополнительной последующей стимуляцией нейтрофилов химическими активаторами респираторного взрыва fMLP и ФМА этот эффект действия КМП в ряде случаев потенцируется. Низкие концентрации действующего через специфические рецепторы fMLP потенцируют предварительную обработку КМП, усиливая выраженность эффекта приблизительно в два раза, что проявляется в опытах с H2DCF-DA. При использовании более мощного активатора респираторного взрыва – ФМА, имитирующего диацилглицерол и напрямую (без рецепторных посредников) активирующего

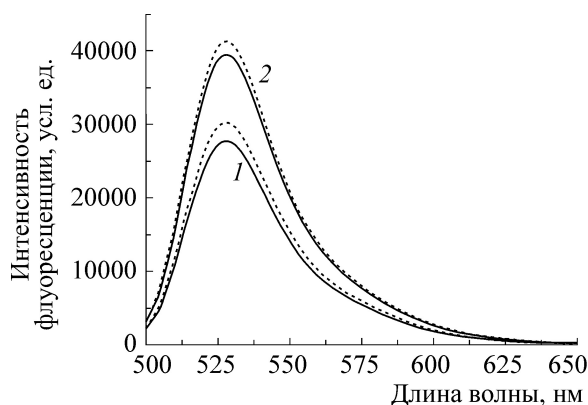


Рис. 3. Спектры флуоресценции родамина 123 в суспензии нейтрофилов в контроле (1) и в опыте (2) – после действия слабых комбинированных магнитных полей. Пунктирными линиями обозначены стандартные отклонения.

протеинкиназу С, отмечается усиление эффектов действия КМП при использовании и H2DCF-DA и дигидрородамина 123. Во всех случаях с использованием дигидрородамина 123 отмечаются более высокие интенсивности флуоресценции.

Общепринятыми сайтами образования внутриклеточных АФК в нейтрофилах являются фагосомы, однако АФК могут синтезироваться и вне фагосом, в цитохром *b*-содержащих гранулах [14]. Помимо НАДФН-оксидазы в фагоцитах есть и другие АФК-образующие системы (например, НАДФН-оксидазы, включающие другие члены NOX-семейства [15], NO-синтазы [16], а также митохондрии [17]). Но именно ферментный комплекс оксидазы фагоцитов, содержащей NOX 2, образует значительно более высокий уровень АФК, чем другие клеточные оксидазы [14]. Сборка оксидазы на цитоплазматической мембране ведет к выходу АФК во внеклеточное окружение (внеклеточные АФК), а сборка оксидазы на внутриклеточных мембранах приводит к синтезу АФК, остающихся внутри мембранных органелл (внутриклеточные АФК). Считается, что при активации клеток в результате действия того или иного стимула образование АФК имеет место как внутри, так и вне клетки [7].

Ранее мы показали, что слабое КМП праймирует респираторный взрыв в нейтрофилах [8], но не активирует, по крайней мере существенно, саму их люминол-зависимую хемилюминесценцию. Из этого следует, что выработка гипохлорита, основного окислителя люминола [7,18], в нейтрофилах при действии КМП не усиливается. Полученные нами в этом исследовании

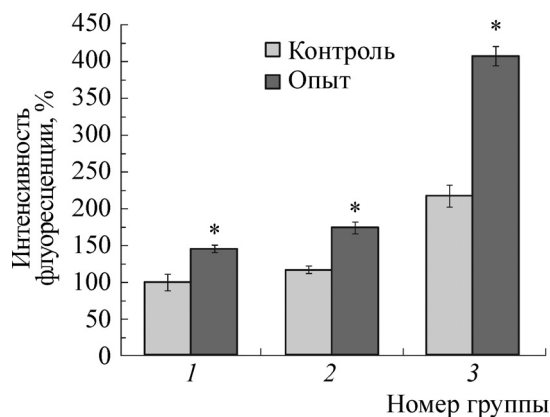


Рис. 4. Влияние слабых комбинированных магнитных полей (постоянное МП 42 мкТл; переменное МП 0,86 мкТл – сумма трех частот 1,0, 4,4 и 16,5 Гц при соотношении амплитуд 6, 1 и 1,6) на интенсивность флуоресценции родамина 123 в суспензии нейтрофилов в отсутствии и в присутствии активаторов респираторного взрыва. Ось ординат – максимальная интенсивность хемилюминесценции в процентах по отношению к базовому контролю без активаторов (средние значения и стандартные отклонения, $n = 5$); ось абсцисс – номер группы; 1 – контроль и опыт без активаторов, 2 – контроль и опыт с добавками 0,1 мкМ fMLP, 3 – контроль и опыт с добавками 0,01 мкМ ФМА. Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$).

данные показывают некоторое усиление продукции активных метаболитов кислорода в нейтрофилах при действии КМП без дополнительной активации стимуляторами респираторного взрыва fMLP и ФМА и резкое усиление степени выраженности эффекта КМП при использовании этих активаторов. Это существенно дополняет экспериментальные результаты, полученные в предыдущих исследованиях [8,19–21]. В силу невысокой специфичности к разным видам АФК обоих использованных нами флуоресцентных зондов [9–12], нельзя определенно указать вид АФК, продуцируемый у праймированных КМП нейтрофилов. Это может быть перекись водорода, пероксинитрит, гидроксильный радикал и другие окислители. Резкая активация окисления флуоресцентных зондов на АФК, так же как и резкая активация люминол-зависимой хемилюминесценции при дополнительной стимуляции fMLP и ФМА обработанных КМП нейтрофилов [8], могут свидетельствовать о накоплении в нейтрофилах предшественников гипохлорита, прежде всего перекиси водорода, и/или о подготовке компонентов систем сигнальной трансдукции в клетке, стимулирующих выработку продуктов одноэлектронного восстановления кислорода.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-44-03676р_центр_а) и Министерства инвестиций и инноваций Московской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. В. Новиков, В. О. Пономарев, Г. В. Новиков и др., Биофизика **55** (4), 631 (2010).
2. В. О. Пономарев и В. В. Новиков, Биофизика **54** (2), 235 (2009).
3. В. О. Пономарев, В. В. Новиков, А. В. Карнаухов и О. А. Пономарев, Биофизика **53** (2), 197 (2008).
4. В. Н. Бинги, *Принципы электромагнитной биофизики* (Изд-во Физматлит, Москва, 2011).
5. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика **60** (3), 530 (2015).
6. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика, **61** (1), 126 (2016).
7. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурина, Успехи биол. наук **49**, 341 (2009).
8. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика, **61** (3), 510 (2016).
9. J. P. Crow, Nitric Oxide: Biology and Chemistry **1** (2), 145 (1997).
10. S. L. Hempel, G. R. Buettner, Y. Q. O'Malley, et al., Free Radic. Biol. Med. **27** (1–2), 146 (1999).
11. G. Bartosz, Clin. Chim. Acta **368**, 53 (2006).
12. M. Freitas, J. L. Lima, and E. Fernandes, Anal. Chim. Acta **649**, 8 (2009).
13. V. V. Novikov, G. V. Novikov, and E. E. Fesenko, Bioelectromagnetics **30**, 343 (2009).
14. Н. В. Воробьева, Иммунология **34** (4), 227 (2013).
15. D. I. Brown and K. K. Griending, Free Radic. Biol. Med. **47**, 1239 (2009).
16. R. Korhonen, A. Lahti, H. Kankaanranta, et al., Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy **4**, 471 (2005).
17. G. Fossati, D. A. Moulding, and D. G. Spiller et al., J. Immunol. **170**, 1964 (2003).
18. O. Myhre, J. M. Andersen, H. Aarnes, and F. Fonnum, Biochem. Pharmacol. **65**, 1575 (2003).
19. S. Roy, Y. Noda, V. Eckert, et al., FEBS Lett. **376**, 164 (1995).
20. B. Poniedzialek, P. Rzymiski, H. Nawrocka-Bogusz, et al., Electromag. Biol. Med. **32**, 333 (2013).
21. Н. А. Белова, М. М. Поцелуева, Л. К. Сребницкая и др., Биофизика **55** (4), 657 (2010).

Effect of Weak Magnetic Fields on Production of Reactive Oxygen Species in Neutrophils

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 shown that an hour-long exposure of peritoneal neutrophils of mice to a combination of a weak constant magnetic field (42 μT) and low-frequency alternating magnetic fields collinear to the weak constant magnetic field (the sum of the frequencies 1.0, 4.4, and 16.5 Hz, amplitude 0.86 μT) at physiological temperatures causes an increase in intracellular production of reactive oxygen species, recorded by the change in fluorescence intensity of the oxidation products of 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123. The addition of low concentrations of respiratory burst activators (formylated peptide N-formyl-Met-Leu-Phe or phorbol ester phorbol 12-meristate-13-acetate) significantly enhances the degree of the effect of weak magnetic fields.

Key words: magnetic field, neutrophils, reactive oxygen species, fluorescence, respiratory burst