

РОЛЬ ГИДРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ И ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ПРАЙМИРОВАНИИ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА В НЕЙТРОФИЛАХ И УСИЛЕНИИ ЛЮМИНОЛ-ЗАВИСИМОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ КРОВИ ПРИ ДЕЙСТВИИ КОМБИНИРОВАННЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ С ОЧЕНЬ СЛАБОЙ ПЕРЕМЕННОЙ НИЗКОЧАСТОТНОЙ КОМПОНЕНТОЙ

© 2017 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 16.01.17 г.

Показано, что низкие концентрации (1,0; 2,5 мкМ) ацетоксиметилового эфира 1,2-бис(2-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты, хелатора внутриклеточного кальция, блокируют праймирующий эффект слабых комбинированных постоянного (42 мкТл) и коллинеарного ему низкочастотного переменного (1,0; 4,4 и 16,5 Гц; 0,86 мкТл) магнитных полей, который проявляется как более выраженное усиление хемилюминесценции суспензии нейтрофилов мыши (после их обработки комбинированными магнитными полями) в ответ на введение бактериального пептида N-формил-Met-Leu-Phe в присутствии люминола. Сходные результаты получены при действии хелатора внутриклеточного кальция на люминол-зависимую хемилюминесценцию цельной крови. Степень выраженности праймирующего эффекта слабых комбинированных магнитных полей на респираторный взрыв в нейтрофилах не зависит от присутствия внеклеточного Ca^{2+} и от добавок перехватчика гидроксильных радикалов – диметилсульфоксида в концентрациях 0,025–1,0 мМ.

Ключевые слова: магнитное поле, нейтрофилы, свободные радикалы, активные формы кислорода, хемилюминесценция, ионы кальция.

Ранее нами в экспериментах на цельной крови млекопитающих [1–3] и отдельных клеточных субпопуляциях (нейтрофилах) [4,5] методами активированной хемилюминесценции и флуоресцентной спектроскопии показано усиление генерации свободных радикалов и других активных форм кислорода в результате действия слабых комбинированных постоянного и низкочастотного переменного магнитных полей (КМП) с очень слабой переменной составляющей (менее 1 мкТл). Рядом авторов на суспензии нейтрофилов были получены близкие данные при более высоких значениях амплитуд переменной компоненты КМП (десятки мкТл) [6–9]. В этой связи возникает необходимость экспериментального анализа биофизических механизмов этого эффекта на клеточном уровне. Одним из ключевым моментом здесь может оказаться влияние слабых КМП на концентра-

цию цитозольного Ca^{2+} . Многие ферменты, участвующие в регуляции респираторного взрыва и активирующие НАДФН-оксидазу (протеинкиназа C, МАРК, тирозинкиназы и пр.), зависят от цитозольного кальция и тормозятся в его отсутствие [10,11]. Ряд теоретических работ посвящен изучению возможности влияния слабых КМП на концентрацию внутриклеточного кальция [12–16]. К экспериментальному анализу могут быть также привлечены собственно радикальные механизмы действия КМП [17–20]. К примеру, избыточная продукция гидроксильных радикалов, инициируя перекисное окисление липидов в мембранах, могла бы способствовать входу ионов Ca^{2+} в клетку из внеклеточной среды, как это имеет место при более высокоинтенсивном лазерном облучении [21,22].

С учетом вышеизложенного, нами проведено исследование действия слабых КМП на суспензию нейтрофилов и цельную разбавленную кровь в среде, содержащей Ca^{2+} , и в номинально бескальциевой среде, а также при добавках перехватчика гидроксильных радикалов и хелатора внутриклеточного кальция.

Сокращения: КМП – комбинированные магнитные поля, ДМСО – диметилсульфоксид, ВАРТА АМ – ацетоксиметиловый эфир 1,2-бис(2-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение суспензии нейтрофилов. Работа выполнена на перитонеальных нейтрофилах мышей. Для получения перитонеальных 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 (зимозан А из *Saccharomyces carevisiae*, Sigma, США). После этого через 12 ч животных умерщвляли методом ульнарной дислокации и промывали их брюшную полость 3 мл охлажденного раствора Хенкса без кальция. Экссудат собирали пипеткой и центрифугировали в течение 5 мин при 600 g. Супернатант декантировали, а осадок разводили в 1 мл бескальциевого раствора Хенкса и оставляли на 40 мин 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 мМ NaCl, 6 мМ KCl, 1 мМ MgSO₄, 1 мМ Na₂HPO₄, 5 мМ NaHCO₃, 5,5 мМ глюкозы, 1 мМ CaCl₂, 10 мМ HEPES, pH 7,4; Sigma, США) до концентрации 1 млн кл./мл. Часть опытов проводили в номинально бескальциевой среде Хенкса, т.е. среде такого же состава за исключением 1 мМ CaCl₂.

Подготовка образцов цельной крови. Для исследований использовали свежие образцы крови интактных мышей, полученные после декапитации, с гепарином в качестве антикоагулянта. Кровь разводили стандартной средой Хенкса с pH 7,4. В основном для опытов готовили образцы следующего состава и объема: 200 мкл среды Хенкса, 25 мкл гепаринизированной (20 М.Е. на 1 мл) крови (предварительно разведенной в соотношении 1 : 3).

Экспонирование суспензии нейтрофилов и цельной крови в магнитном поле. Нейтрофилы инкубировали при $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$ в концентрации 1 млн/мл по 0,25 мл в полипропиленовых пробирках. Типичное время инкубации составляло 1 ч. Заданную температуру поддерживали с помощью циркуляционного термостата. Аналогичным образом инкубировали образцы разведенной в 30 раз крови. До начала инкубации к части образцов добавляли перехватчик гидроксильных радикалов диметилсульфоксид (ДМСО) (Sigma, США) в концентрациях 0,025–50 мМ или хелатор внутриклеточного кальция ВАРТА АМ (ацетоксиметилловый эфир 1,2-бис(2-аминофеноксид)этан-N,N,N',N'-тетраук-

сусной кислоты) (Sigma, США) в концентрациях 1,0, 2,5 и 10 мкМ. При приготовлении раствора ВАРТА АМ в качестве растворителя использовали ДМСО. Его присутствие в образцах в этих случаях не превышало 1 мМ (0,1; 0,25 и 1 мМ соответственно концентрациям ВАРТА АМ).

Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле с постоянной составляющей ~42 мкТл и уровнем магнитного фона на 50 Гц 15–50 нТл, соответствующим этим 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 $42 \pm 0,1$ 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 [1–5,23], 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).

Регистрация хемилюминесценции. После часовой инкубации измеряли интенсивность хемилюминесценции образцов крови в контрольных и опытных пробах после добавления в них раствора люминола (Enzo Life Sciences, США) в концентрации 0,35 мМ. В пробы с суспензией нейтрофилов помимо люминола добавляли активатор генерации активных форм кислорода: хемотаксический формилованный пептид N-формил-Met-Leu-Phe (Sigma, США) в концентрации 1 мкМ. В работе использован хемилюминометр Lum-5773 (ООО ДИСофт, Россия). Для анализа данных хемилюминесценции использована программа PowerGraph. Часть результатов представлена в процентах по отношению к амплитудам хемилюминесцентного ответа в контроле, принятым за 100%.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Диметилсульфоксид был использован нами в качестве растворителя для приготовления раствора хелатора внутриклеточного кальция ВАРТА АМ. В связи с известной способностью ДМСО в относительно низких концентрациях (0,02–2,5 мМ) эффективно перехватывать гидроксильные радикалы [24,25] представляет самостоятельный интерес исследование его действия на процесс праймирования респираторного взрыва в нейтрофилах и усиление люминол-зависимой хемилюминесценции цельной крови при действии КМП с очень слабой переменной компонентой. Исходно (без предварительной добавки ДМСО) праймирующий эффект слабых КМП проявляется в этой серии опытов как более чем двукратное усиление хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов (после ее обработки магнитным полем) на введение формилированного пептида (1 мкМ) в присутствии люминола. Предварительная добавка ДМСО в различных концентрациях к опытным и контрольным образцам нейтрофилов до начала их инкубации при 37°C в КМП и в контроле не влияет на интенсивность измеряемой в конце инкубации люминол-зависимой хемилюминесценции вплоть до концентрации ДМСО 1 мМ (рис. 1). При более высоких концентрациях (5 мМ) происходит заметное (приблизительно в два раза) снижение интенсивности хемилюминесценции в опытных образцах. В контроле такое же снижение интенсивности хемилюминесценции отмечается при концентрации ДМСО 12,5 мМ. При этой концентрации ДМСО различия между контрольными и опытными образцами полностью нивелируются. Эти результаты не подтверждают особую роль гидроксильных радикалов в механизме данного эффекта КМП. При относительно высоких концентрациях ДМСО значительное ослабление хемилюминесценции может быть обусловлено прямой реакцией ДМСО с гипохлоритом [25]. Поэтому наблюдаемые различия между контролем и опытом, по-видимому, связаны с различными уровнями гипохлорита и перекиси водорода в исследуемых образцах.

Учитывая вышеприведенные данные, в опытах с селективным хелатором внутриклеточного кальция ВАРТА АМ были использованы такие количества ДМСО, чтобы его концентрации в образцах не превышали 1 мМ. Уже низкие концентрации ВАРТА АМ (1 мкМ) полностью нивелировали стимулирующий (праймирующий) эффект воздействия КМП с очень слабой переменной компонентой на респираторный взрыв в нейтрофилах (при добавке внутриклеточного хелатора кальция в образцы до начала инкубации в поле) (рис. 2). В опытных образцах (действие КМП) интенсивность хемилюминесценции снижалась более чем в два раза. При такой же концентрации хелатора в контроле отмечено лишь незначительное (~20%) снижение люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов, активированных формилированным пептидом. При увеличении концентрации ВАРТА АМ до 10 мкМ отмечается значительное снижение хемилюминесценции, как в опытных, так и в контрольных образцах (~75%).

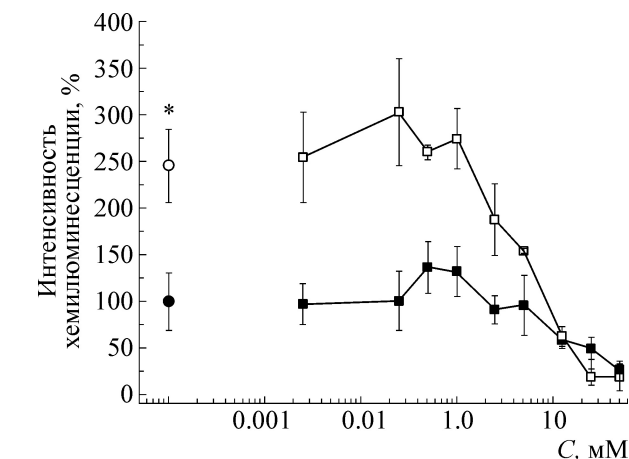


Рис. 1. Влияние ДМСО на интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов при стимуляции клеток пептидом N-формил-Met-Leu-Phe в присутствии люминола; контрольные (темные квадраты) и опытные (светлые квадраты, действие КМП) образцы инкубировали с ДМСО до измерения хемилюминесценции 60 мин при 37°C. Ось абсцисс – концентрация ДМСО; ось ординат – интенсивность хемилюминесценции (максимальные значения) в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения). Отдельно обозначены звездочкой уровни хемилюминесценции в группах без предварительной добавки ДМСО.

Аналогичное действие хелатор внутриклеточного кальция оказывает на люминол-зависимую хемилюминесценцию цельной разведенной крови (рис. 3). В этом случае нивелирование различий между контрольными и опытными образцами наблюдается при концентрации ВАРТА АМ 2,5 мкМ.

Важно отметить, что уровень внеклеточного кальция практически не влияет на степень выраженности праймирования респираторного взрыва в нейтрофилах при действии слабых КМП. Об этом свидетельствует приблизительно одинаковый хемилюминесцентный ответ нейтрофилов на стимуляцию формилированным пептидом в присутствии люминола в среде Хенкса, содержащей ионы кальция (1 мМ) и в

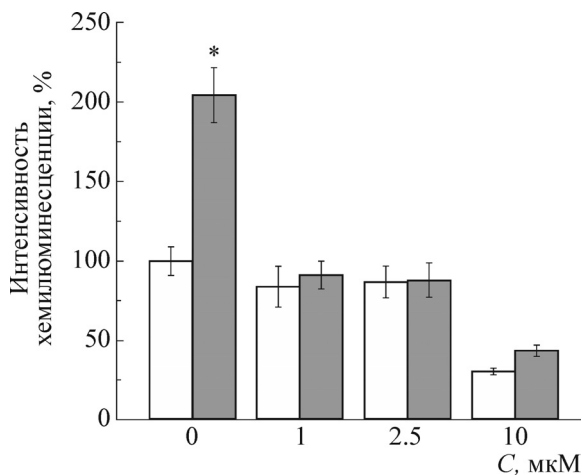


Рис. 2. Влияние ВАРТА АМ на интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов при стимуляции клеток пептидом N-формил-Met-Leu-Phe в присутствии люминола; контрольные (светлые столбцы) и опытные (темные столбцы, действие КМП) образцы инкубировали с ВАРТА АМ до измерения хемилюминесценции 60 мин при 37°C. Ось абсцисс – концентрации ВАРТА АМ, ось ординат – интенсивность хемилюминесценции (максимальные значения) в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения). Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$).

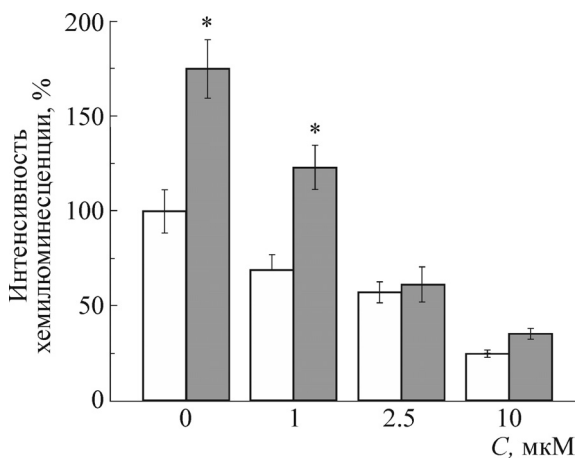


Рис. 3. Влияние ВАРТА АМ на интенсивность хемилюминесценции цельной крови при добавке люминола; контрольные (светлые столбцы) и опытные (темные столбцы, действие КМП) образцы инкубировали с ВАРТА АМ до измерения хемилюминесценции 60 мин при 37°C. Ось абсцисс – концентрации ВАРТА АМ; ось ординат – интенсивность хемилюминесценции (максимальные значения) в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения). Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$).

номинально бескальциевой среде (без добавок Ca^{2+}) (рис. 4).

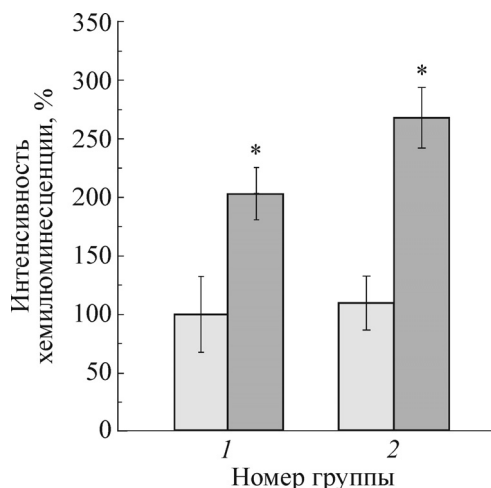


Рис. 4. Влияние внеклеточного кальция на интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов при стимуляции клеток пептидом N-формил-Met-Leu-Phe в присутствии люминола; контрольные (светлые столбцы) и опытные (темные столбцы, действие КМП) образцы инкубировали в среде Хенкса до измерения хемилюминесценции 60 мин при 37°C. По оси абсцисс: группа 1 – контроль и опыт в полной среде Хенкса с 1 мМ CaCl_2 , группа 2 – контроль и опыт в номинально бескальциевой среде Хенкса; ось ординат – интенсивность хемилюминесценции (максимальные значения) в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения). Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$).

Приведенные данные свидетельствуют о ключевой роли внутриклеточного свободного кальция в механизме действия слабых КМП на генерацию свободных радикалов и других активных форм кислорода в нейтрофилах и цельной крови. Отсутствие выраженных эффектов ДМСО в концентрациях, в которых он является эффективным перехватчиком гидроксильных радикалов, и эффектов экзогенного кальция не подтверждает предположение об инициации процессов липидной пероксидации в клеточных мембранах при действии слабых КМП и усилении в связи с этим транспорта ионов кальция из внешней среды в клетку. По-видимому, в рассматриваемом нами случае как ключевой момент механизма действия слабых КМП более вероятен усиленный выход ионов кальция в цитозоль из внутриклеточных депо.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **60** (3), 530 (2015).
2. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **61** (1), 126 (2016).
3. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, № 1, 23 (2016).
4. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **61** (3), 510 (2016).
5. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **61** (6), 1159 (2016).
6. S. Roy, Y. Noda, V. Eckert, et al., *FEBS Lett.* **376**, 164 (1995).
7. Н. А. Белова, М. М. Поцелуева, Л. К. Сребницкая и др., *Биофизика* **55** (4), 657 (2010).
8. B. Poniedzialek, P. Rzymiski, H. Nawrocka-Bogusz, et al., *Electromag. Biol. Med.* **32**, 333 (2013).
9. M. O. Mattsson and M. Simkó, *Frontiers in Public Health* **2**, 132 (2014).
10. J. R. Forehand, M. J. Pabst, W. A. Phillips, et al., *J. Clin. Invest.* **83**, 74 (1989).
11. А. Н. Маянский, *Цитокины и воспаление* **6** (3), 3 (2007).
12. A. R. Liboff, *J. Biol. Phys.* **13**, 99 (1985).
13. V. V. Lednev, *Bioelectromagnetics* **12**, 71 (1991).
14. M. N. Zhadin and E. E. Fesenko, *Biomed. Sci.* **1** (3), 245 (1990).
15. V. N. Binhi, *Electromagnetobiol.* **16** (3), 203 (1997).
16. В. Н. Бинги, *Принципы электромагнитной биофизики* (Физматлит, Москва, 2011).
17. В. О. Пономарев и В. В. Новиков, *Биофизика* **54** (2), 235 (2009).
18. В. О. Пономарев, В. В. Новиков, А. В. Карнаухов и О. А. Пономарев, *Биофизика* **53** (2), 197 (2008).
19. О. А. Пономарев, С. И. Кубарев, И. С. Кубарева и др., *Хим. физика* **23** (8), 9 (2004).
20. I. A. Solov'ov and K. Schulten, *Biophys. J.* **96**, 4804 (2009).
21. Ю. А. Владимиров, в кн. *Эфферентная медицина* (ИБМХ РАМН, М., 1994), сс. 51–67.
22. Г. И. Клебанов, И. В. Страшкевич, Т. В. Чичук и др., *Биол. мембраны* **15** (3), 273 (1998).
23. V. V. Novikov, G. V. Novikov, and E. E. Fesenko, *Bioelectromagnetics* **30**, 343 (2009).
24. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурина, *Успехи биол. химии* **49**, 341 (2009).
25. Д. И. Рощупкин, Н. С. Белакина и М. А. Мурина, *Биофизика* **51**, 99 (2006).

The Role of Hydroxyl Radicals and Calcium Ions in the Priming of Respiratory Burst in Neutrophils and Strengthening of the Luminol-Dependent Blood Chemiluminescence under the Influence of Combined Magnetic Fields with a Very Weak Low-Frequency Alternating Component

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 at low concentrations (1.0; 2.5 μM) an intracellular calcium chelator ВАРТА АМ blocked the priming effect of weak combined static magnetic field (42 μT) and low frequency collinear alternating magnetic field (1.0, 4.4, and 16.5 Hz; 0.86 μT), which was manifested as a marked enhancement of chemiluminescence of the suspension of mouse neutrophil (after combined magnetic field exposure) in response to injection of the bacterial peptide N-formyl-Met-Leu-Phe in the presence of luminol. Similar results were obtained under the effect of ВАРТА АМ on luminol-dependent chemiluminescence of whole blood. The degree of the priming effect of weak combined magnetic fields on the respiratory burst in neutrophils does not depend on the presence of extracellular Ca^{2+} and is unaffected by the scavenger of hydroxyl radicals – dimethylsulfoxide at concentrations of 0.025–1.0 mM.

Key words: magnetic field, neutrophils, free radicals, reactive oxygen species, chemiluminescence, calcium ions