

РОЛЬ КИСЛОРОДА В ПРАЙМИНГЕ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ СЛАБОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ

© 2018 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 02.02.17 г.

Показано, что предварительная мягкая частичная дегазация суспензии нейтрофилов при давлении атмосферных газов 640 мм рт. ст., сопровождающаяся снижением содержания кислорода до 412 нг-атом О/мл, приводит к существенному (четырёхкратному) снижению индекса прайминга нейтрофилов при действии слабого комбинированного магнитного поля (постоянное магнитное поле – 42 мкТл и коллинеарное ему низкочастотное магнитное поле – 1; 4,4; 16,5 Гц; 860 нТл), но не отражается на способности клеток генерировать респираторный взрыв в ответ на активатор (пептид N-формил-Met-Leu-Phe) в контроле. Частичная замена воздушной смеси на карбоген, ксенон или гексафторид серы снижает интенсивность люминол-зависимой хемилюминесценции образцов.

Ключевые слова: слабое магнитное поле, кислород, нейтрофилы, свободные радикалы, активные формы кислорода, дегазация, карбоген, ксенон, гексафторид серы, хемилюминесценция.

Ряд авторов рассматривает окислительный стресс в качестве иницирующего этапа в развитии биологических эффектов, индуцированных внешними магнитными полями [1,2]. Ранее в экспериментах на цельной крови млекопитающих и отдельных клеточных субпопуляциях (нейтрофилах) методами активированной хемилюминесценции и флуоресцентной спектроскопии нами было показано усиление генерации свободных радикалов и других активных форм кислорода и хлора в результате действия комбинированных постоянного и низкочастотного переменного магнитных полей (КМП) с очень слабой переменной составляющей (менее 1 мкТл) [3–6]. В этих работах был, в частности, зарегистрирован 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 проявлялся как более выраженное усиление хемилюминесценции суспензии нейтрофилов, после их предварительной обработки КМП, в ответ на введение бактериального пептида N-формил-Met-Leu-Phe или форболового эфира форбол-12-меристат-13-ацетата в присутствии люминола [5]. Было показано лишь небольшое усиление перекисного окисления липидов в нейтрофилах после часового действия КМП [7]. Не выявлено взаимосвязи этого уве-

личения интенсивности перекисного окисления липидов с процессом функциональной преактивации (прайминга) нейтрофилов в результате действия КМП, так как ингибитор перекисного окисления липидов – ионол (10 мкМ) – не снижал в этом случае индекс прайминга нейтрофилов. Также не снижала индекс прайминга предварительная добавка перехватчика синглетного кислорода – гистидина (0,1 и 1 мМ) [7] или перехватчика гидроксильных радикалов – диметилсульфоксида в концентрациях до 1 мМ [8]. Значительное ингибирующее действие на интенсивность хемилюминесценции суспензии нейтрофилов оказывал ингибитор миелопероксидазы азид натрия (0,1 мМ), при этом прайминг в его присутствии после действия КМП не развивался [7]. Также эффективно снижали хемилюминесценцию ингибитор НАДФН-оксидазы – апоцинин и скевенжер гипохлорита – эдавазон [4]. Было показано, что низкие концентрации хелатора внутриклеточного кальция ВАРТА АМ блокируют этот эффект слабых КМП [8]. При этом уровень внеклеточного кальция практически не влиял на степень выраженности праймирования респираторного взрыва. Отсюда следует, что одним из ключевых моментов механизма действия слабых КМП на прайминг нейтрофилов может являться усиленный выход ионов кальция в цитозоль из внутриклеточных депо.

Для всестороннего анализа механизмов действия слабых КМП на прайминг нейтрофилов

Сокращение: КМП – комбинированные (постоянное и низкочастотное переменное) магнитные поля.

представляется важным изучить этот эффект КМП в различных физических условиях, в частности при различном давлении атмосферных газов, под контролем, прежде всего, содержания кислорода. Это, в частности, позволит оценить возможный вклад в праймирование нейтрофилов при действии КМП процессов диффузии кислорода к трансмембранным сайтам связывания НАДФН-оксидазы, обусловленный влиянием поля на конвекцию примембранных слоев воды, как это, вероятно, наблюдается при действии на суспензию нейтрофилов электрической компоненты низкоинтенсивного лазерного излучения [9–12].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение суспензии нейтрофилов. Работа выполнена на перитонеальных нейтрофилах мышей. Для получения перитонеальных нейтрофилов использовали лабораторных мышей самцов линии CD-1 массой 22–25 г, полученных из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Пушино Московской области). В перитонеальную полость мыши инъецировали 150 мкл суспензии опсонизированного зимозана с концентрацией 5 мг/мл (Zymozan A из *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma, США). После этого через 12 ч животных умерщвляли методом ульнарной дислокации, их брюшную полость промывали 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 60 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 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.

Частичная дегазация суспензии нейтрофилов. Часть образцов по 0,25 мл в пробирках типа Эппендорф выдерживали в течение 30 мин под давлением 640 мм рт. ст. при 37°C в приборе Degassing station (TA Instruments, США). После этого пробирки закрывали крышками и тщательно заклеивали парафильмом (Serva, Германия).

Замещение воздуха в образцах другими газами. В части образцов замещали воздушную смесь на карбоген, гексафторид серы или ксе-

нон. Для этого из камеры, заполненной газом, шприцем (2 мл), содержащим исследуемый образец (0,25 мл), производили забор необходимого количества газа.

Определение концентрации кислорода в образцах. После процедуры частичной дегазации, а также в контрольных случаях (исходные образцы) измеряли содержание кислорода полярографическим методом с помощью закрытого кислородного электрода Кларка в термостатируемой ячейке объемом 1 мл (до измерения объединяли содержимое четырех пробирок) при постоянном перемешивании и температуре 26°C. Сигналы регистрировали с помощью прибора Record4 (ИБК РАН, Пушино Московской области) и соответствующего программного обеспечения. При калибровке считали, что при температуре 26°C раствор содержит 500 нг-атом O/мл.

Экспонирование суспензии нейтрофилов в магнитном поле. Нейтрофилы инкубировали при $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ в концентрации 1 млн/мл по 0,25 мл в тех же полипропиленовых пробирках, в которых проводили дегазацию. Также одновременно инкубировали пробы без дегазации. 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 в 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 (расстояние между кольцами одной пары 70 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 программируемого генератора синусоидальных сигналов (цифрово-аналоговый преобразователь платы L-791 фирмы L-Card, Россия) 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 [13,14], с амплитудами отдельных частот 600; 100 и 160 нТл соответственно. Величины действующих магнитных полей определяли пря-

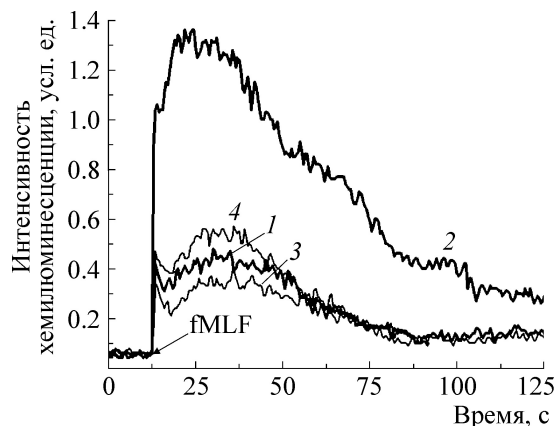


Рис. 1. Влияние предварительных частичной дегазации и обработки слабым КМП на кинетику и интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов из брюшной полости мыши при стимуляции клеток 1 мкМ пептида N-формил-Met-Leu-Phe (fMLP) в присутствии люминола. Контрольные (1 – недегазированный образец; 3 – дегазированный образец) и опытные – КМП (2 – недегазированный образец; 4 – дегазированный образец) образцы инкубировали при 37°C.

мым измерением с помощью феррозондового датчика Mag-03 MS 100 (Bartington, Великобритания).

Регистрация хемилюминесценции. После часовой инкубации содержимое пробирок для инкубации переносили в специальные пробирки из оптического стекла и измеряли интенсивность хемилюминесценции образцов в контрольных и опытных случаях после добавки в них раствора люминола (Enzo Life Sciences, США) в концентрации 0,35 мМ и активатора генерации активных форм кислорода – хемотаксического формилированного пептида N-формил-Met-Leu-Phe (Sigma, США) в концентрации 1 мкМ. В работе использовали хемилюминесцентметр Lum-5773 (ООО ДИСОфт, Россия). Для анализа данных хемилюминесценции использована компьютерная программа PowerGraph. Часть результатов представлена в процентах по отношению к амплитудам хемилюминесцентного ответа в контроле, принятым за 100%. Для наглядности использован индекс прайминга, равный отношению максимальной интенсивности хемилюминесценции в опыте к соответствующему значению в контроле.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частичная дегазация образцов привела к снижению содержания в них кислорода с $500 \pm$

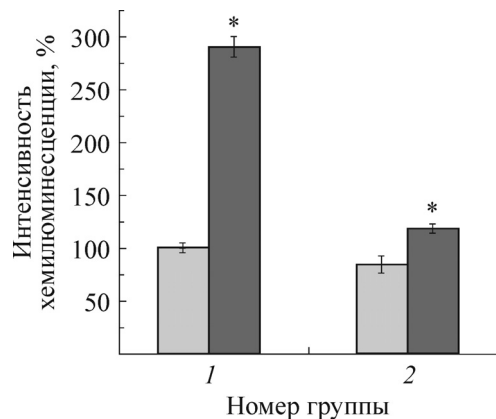


Рис. 2. Влияние предварительных частичной дегазации и обработки слабым КМП на интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов при стимуляции клеток 1 мкМ пептида N-формил-Met-Leu-Phe в присутствии люминола. Образцы инкубировали при 37°C. По оси абсцисс – номер группы: 1 – без дегазации, 2 – частичная дегазация. Светлые столбики – контроль, темные столбики – опыт (КМП). По оси ординат – максимумы интенсивности хемилюминесценции (средние значения и стандартные отклонения, $n = 5$). Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$).

10 до 412 ± 14 нг-атом О/мл. Сама по себе эта процедура слабо влияла на способность нейтрофилов генерировать респираторный взрыв в ответ на введение его активатора пептида N-формил-Met-Leu-Phe (рис. 1). Предварительная инкубация недегазированной суспензии нейтрофилов в комбинированном магнитном поле вызывала существенную преактивацию респираторного взрыва (индекс прайминга нейтрофилов составил ~ 3) (рис. 1, 2). В отличие от этого частично дегазированная суспензия нейтрофилов демонстрировала достоверно и значительно (приблизительно в четыре раза) более слабый ответ на действие слабого КМП (индекс прайминга не превышал 1,5) (рис. 1, 2).

Значительное повышение концентрации кислорода в образцах за счет замены 50% воздушной смеси на карбоген привело к резкому уменьшению интенсивности хемилюминесценции проб (рис. 3), при этом различия между контрольными и опытными (действие КМП) образцами сохранились. Наслоение гексафторида серы на поверхность раствора суспензии нейтрофилов привело к пропорциональному уменьшению интенсивности хемилюминесценции в контроле и в опыте (рис. 3). Замена воздушной смеси на ксенон проявилась в уменьшении интенсивности хемилюминесценции и нивелировании различий между контролем и опытом (рис. 3).

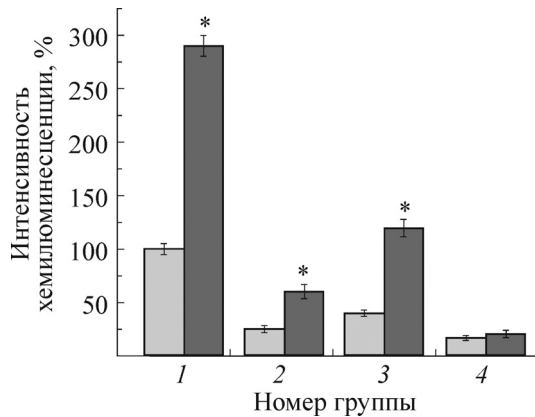


Рис. 3. Влияние замещения воздуха различными газами и слабого КМП на интенсивность хемилуминесценции нейтрофилов при стимуляции клеток 1 мкМ пептида N-формил-Met-Leu-Phe в присутствии люминола. Образцы инкубировали при 37°C. По оси абсцисс – номер группы: 1 – воздух, 2 – карбоген, 3 – гексафторид серы, 4 – ксенон. Светлые столбики – контроль, темные столбики – опыт (КМП). По оси ординат – максимумы интенсивности хемилуминесценции (средние значения и стандартные отклонения, $n = 5$). Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$).

При интерпретации полученных результатов нужно учесть особенности кислородного метаболизма объекта исследований – нейтрофилов, выделенных из брюшной полости. Известно, что нестимулированные полиморфно-ядерные лейкоциты (нейтрофилы) потребляют относительно небольшое количество кислорода (~1 нмоль O_2 в мин на 10^7 клеток), но уже через несколько секунд после действия активатора респираторного взрыва потребление кислорода увеличивается в 50–100 раз [15–17]. Это объясняется тем, что потребление кислорода в нейтрофилах обусловлено в основном не дыханием митохондрий, а активацией НАДФН-оксидазы [18,19]. Зрелые гранулоциты содержат лишь несколько митохондрий на клетку и потребляемый ими кислород необходим, прежде всего, для осуществления эффекторных функций (респираторный взрыв) [18,19]. Остальные функции нейтрофилы могут проявлять и в отсутствие кислорода, за счет энергии анаэробного гликолиза [18,19]. В этой связи полученные нами данные о зависимости величины праймирующего эффекта слабых КМП от концентрации кислорода особенно интересны. Резкое снижение эффективности воздействия слабого КМП в условиях мягкой частичной дегазации, кото-

рая не отразилась на функциональном состоянии клеток и их способности генерировать респираторный по данным контрольных опытов, позволяет предположить, что уровень кислорода связан именно с процессами рецепции слабого КМП суспензией нейтрофилов. Без сомнения, этот вопрос заслуживает специальных детальных исследований.

Авторы работы благодарят Н.В. Пенькова, Н.Э. Швирста и З.Г. Амерханова за консультативную и методическую помощь при проведении исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. O. Mattsson and M. Simkó, *Frontiers in Public Health* **2**, 132 (2014).
2. F. S. Barnes and B. Greenebaum, *Bioelectromagnetics* **36**, 45 (2015).
3. В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, Е.Е. Фесенко, *Биофизика* **60** (3), 530 (2015).
4. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика*, **61** (1), 126 (2016).
5. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **61** (3), 510 (2016).
6. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **61** (6), 1159 (2016).
7. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, Г. В. Новиков и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **62** (5), 926 (2017).
8. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **62** (3), 547 (2017).
9. Ю. А. Владимиров, Г. И. Клебанов, Г. Г. Борисенко и А. Н. Осипов, *Биофизика* **49** (2), 339 (2004).
10. Ю. А. Владимиров, А. Н. Осипов и Г. И. Клебанов, *Биохимия* **69** (1), 103 (2004).
11. Г. И. Клебанов и Ю. А. Владимиров, *Успехи соврем. биологии* **119** (5), 462 (1999).
12. С. Д. Захаров, С. А. Скопионов и В. М. Чудновский, в сб. *Лазеры и медицина* (М., 1989), сс. 81–82.
13. V. V. Novikov, G. V. Novikov, and E. E. Fesenko, *Bioelectromagnetics* **30**, 343 (2009).
14. В. В. Новиков, В. О. Пономарев, Г. В. Новиков и др., *Биофизика* **55** (4), 631 (2010).
15. M. Reiss and D. Roos, *J. Clin. Invest.* **61**, 480 (1978).
16. M. J. Green, H. A. Hill, and D. G. Tew, *FEBS Lett.* **216** (1), 31 (1987).
17. B. A. Wagner, S. Venkataraman, and G. R. Buettner, *Free Radic Biol Med.* **51** (3), 700 (2011).
18. J. Seymour, G. I. Klebanoff, and R. A. Clark, in *The Neutrophil: Function and Clinical Disorders* (North-Holland Publ. Company, Amsterdam–N.Y.–Oxford, 1978), pp. 5–28.
19. Г. И. Клебанов, *Мембраны. Сер. Критические технологии*, № 6, 26 (2000).

The Role of Oxygen in the Priming of Neutrophils under the Action of Weak Magnetic Field

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 the preliminary soft partial degassing of the neutrophil suspension at atmospheric gases pressure 640 mm Hg, accompanied by a decrease in the oxygen content to 412 ng-atom O/ml, leads to a significant (4-fold) decrease in the neutrophil priming index under the action of weak combined magnetic fields (the constant magnetic field is 42 μ T and collinear alternating magnetic field with frequency is 1, 4.4, 16.5 Hz, 860 nT), but does not affect the ability of cells to generate a respiratory burst in response to the activator (peptide N-formyl-Met-Leu-Phe) in the control. Partial replacement of the air mixture with carbogen, xenon or sulfur hexafluoride reduces the intensity of luminol-dependent chemiluminescence of the samples.

Keywords: weak magnetic field, oxygen, neutrophils, free radicals, reactive oxygen species, degassing, carbogen, xenon, sulfur hexafluoride, chemiluminescence