

## ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ НА ПРАЙМИНГ НЕЙТРОФИЛОВ В СЛАБЫХ КОМБИНИРОВАННЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЯХ

© 2019 г. В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, Н.И. Новикова\*, Е.Е. Фесенко

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра  
«Пуцинский научный центр биологических исследований РАН»,  
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

\*Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
142290, Пушкино Московской области, просп. Науки, 6

E-mail: doctag@mail.ru

Поступила в редакцию 18.01.19 г.

После доработки 18.01.19 г.

Принята к публикации 29.01.19 г.

Показано, что различные химические агенты (этилендиаминтетрауксусная кислота, сульфат цинка, этиловый спирт, ротенон) по разному влияют на преактивацию (прайминг) нейтрофилов, развивающуюся при действии слабых комбинированных коллинеарных постоянного и переменного магнитных полей (комбинированные магнитные поля: постоянное поле 42 мкТл; переменное поле 0,86 мкТл, сумма частот 1,0; 4,4 и 16,5 Гц). Низкие концентрации этилендиаминтетрауксусной кислоты (0,05%) меньше снижают интенсивность люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов в ответ на активатор респираторного взрыва – пептид N-формил-Met-Leu-Phe – при действии комбинированных магнитных полей, чем в контроле. Напротив, этиловый спирт (0,45%) и сульфат цинка (0,1 мМ) в большей степени влияют на этот процесс именно при действии комбинированных магнитных полей. Ротенон (1 мкМ) оказывает слабое влияние на хемилюминесценцию нейтрофилов как при действии комбинированных магнитных полей, так и в контроле.

*Ключевые слова:* слабое магнитное поле, нейтрофилы, респираторный взрыв, свободные радикалы, активные формы кислорода, этилендиаминтетрауксусная кислота, ротенон, сульфат цинка, этиловый спирт, хемилюминесценция.

DOI: 10.1134/S000630291902008X

Ряд авторов рассматривает возможность влияния магнитных полей на продукцию активных форм кислорода как перспективный подход к анализу механизмов их биологического действия [1,2]. Ранее в экспериментах на цельной крови и нейтрофилах методами активированной хемилюминесценции и флуоресцентной спектроскопии нами было показано усиление генерации свободных радикалов и других активных форм кислорода в результате действия комбинированных постоянного и низкочастотного переменного магнитных полей (КМП) с очень слабой переменной составляющей (менее 1 мкТл) [3–7]. В частности, в этих работах был зарегистрирован праймирующий эффект (преактивация респираторного взрыва

в нейтрофилах) 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 увеличения интенсивности перекисного окисления липидов с процессом функциональной преактивации нейтрофилов в результате действия КМП, так как ингибитор перекисного окисления липидов ионол (10 мкМ) не снижал в этом случае индекс прайминга. Также не снижала индекс прайминга предва-

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

рительная 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 не развивался [7]. Также эффективно снижали хемилюминесценцию ингибитор НАДФН-оксидазы апоцинин и скевенжер гипохлорита эдаравон [4]. Было показано, что низкие концентрации хелатора внутриклеточного кальция ВАРТА АМ блокируют этот эффект слабых КМП [8]. При этом уровень внеклеточного кальция практически не влияет на степень выраженности праймирования респираторного взрыва. Отсюда следует, что одним из ключевых моментов механизма действия слабых КМП на нейтрофилы может являться усиленный выход ионов кальция в цитозоль из внутриклеточных депо. Вторым из экспериментально установленных ключевых моментов механизма преактивации нейтрофилов в слабом КМП является выраженная зависимость величины этого эффекта от концентрации атмосферных газов [9]. Показано, что предварительная мягкая частичная дегазация суспензии нейтрофилов при давлении атмосферных газов 640 мм рт. ст. приводит к существенному (четырёхкратному) снижению степени влияния КМП, но практически не отражается на способности клеток генерировать респираторный взрыв в ответ на активатор (пептид N-формил-Met-Leu-Phe) в контроле [9].

В этой связи для всестороннего анализа механизмов действия слабых КМП на нейтрофилы представляется важным дальнейшее изучение этого эффекта КМП в присутствии химических добавок, блокирующих различные звенья регуляции респираторного взрыва и метаболизма нейтрофилов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

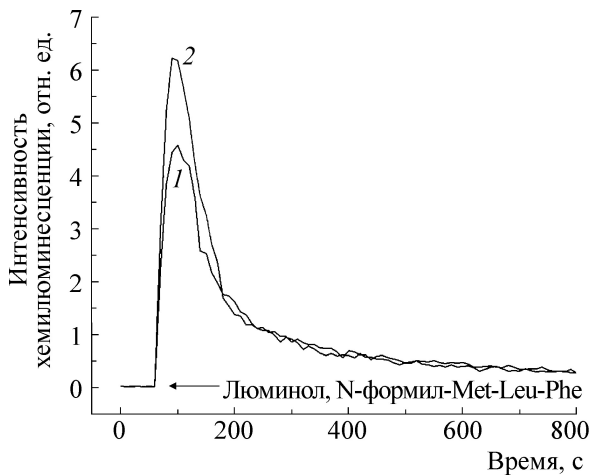
**Получение суспензии нейтрофилов.** Работа выполнена на перитонеальных нейтрофилах мышей. Для получения перитонеальных нейтрофилов использовали лабораторных мышесамцов линии CD-1 массой 22–25 г, полученных из питомника лабораторных животных «Пушино» (ФИБХ РАН, г. Пушино Московской области). В перитонеальную 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 ультранарной дислокации, их брюшную полость промывали 3 мл 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 мМ NaCl, 6 мМ KCl, 1 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 5,5 мМ глюкозы, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 10 мМ HEPES, pH 7,4; Sigma, США) до концентрации 1 млн кл./мл.

**Экспонирование суспензии нейтрофилов в магнитном поле.** Нейтрофилы инкубировали при 37,0 ± 0,2°C в концентрации 1 млн кл./мл по 0,25 мл в кюветах для последующего измерения хемилюминесценции. Типичное время инкубации составляло 1 ч. Заданную температуру поддерживали циркуляционным термостатом.

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 в опытах 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 так, что направления формируемых ими магнитных полей были расположены вдоль вектора геомагнитного поля. На одну пару колец подавали постоянный ток для формирования заданной величины постоянной составляющей магнитного поля 42 ± 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 экспериментах [10,11], с амплитудами отдельных частот 600; 100 и 160 нТл соответственно. Величины действующих магнитных полей определяли прямым измерением с помощью феррозондового датчика Mag-03 MS100 (Bartington, Великобритания).

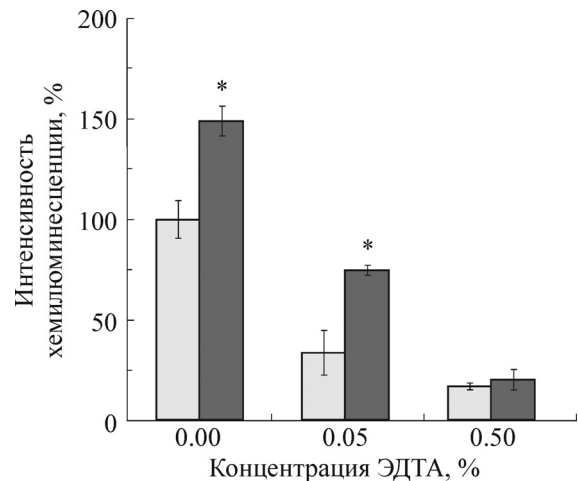


**Рис. 1.** Влияние КМП на кинетику и интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов из брюшной полости мыши при стимуляции клеток 1 мкМ N-формил-Met-Leu-Phe в присутствии люминола: 1 – контроль, 2 – опыт.

До начала инкубации к части образцов добавляли по отдельности различные химические добавки: дигидрат динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты ( $\text{Na}_2$ -ЭДТА) (Sigma, США) в концентрациях 0,05 и 0,5% – неселективный хелатора металлов; ротенон (Sigma, США) в концентрации 1 мкМ – ингибитор цепи митохондрий; блокатор протонных каналов (канал VSOP/HV1)  $\text{ZnSO}_4$  в концентрации 100 мкМ [12,13] или перехватчик гидроксильных радикалов этиловый спирт в концентрации 0,45%.

**Регистрация хемилюминесценции.** После часовой инкубации суспензии нейтрофилов 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 хемилюминометр Lum-5773 (ООО «ДИСофт», Россия). Для анализа данных хемилюминесценции применяли программу 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.

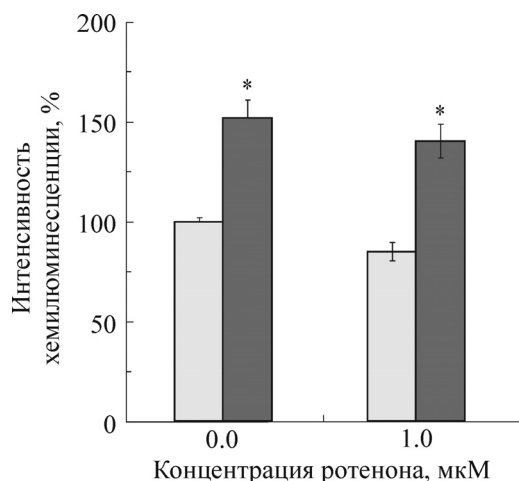
Результаты статистически обработаны с применением *t*-критерия Стьюдента.



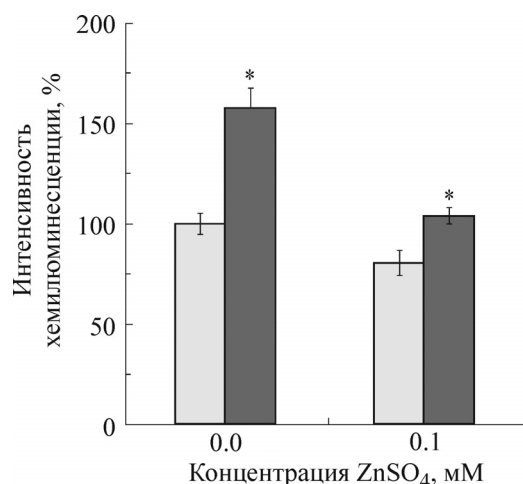
**Рис. 2.** Влияние ЭДТА на интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов: контроль – серый столбик, опыт – действие КМП (темный столбик). По оси абсцисс – концентрация ЭДТА, по оси ординат – интенсивность хемилюминесценции (максимальные значения) в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения). Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ( $P < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительная инкубация суспензии нейтрофилов в комбинированном магнитном поле вызывает существенную преактивацию респираторного взрыва (индекс прайминга нейтрофилов составил  $\sim 1,5$ ) (рис. 1 и 2). Добавка в среду для инкубации хелатора металлов ЭДТА привела к значительному снижению интенсивности хемилюминесценции, как в опытных, так и в контрольных образцах (рис. 2). Высокие концентрации ЭДТА (0,5%) снижают интенсивность хемилюминесценции в контроле приблизительно в пять раз и нивелируют различия между контрольными и опытными образцами (рис. 2). При использовании низких концентраций ЭДТА (0,05%) интенсивность хемилюминесценции образцов также снижается, но в большей степени в контрольных случаях (на 66%). В опыте (предварительное действие КМП) интенсивность хемилюминесценции снизилась лишь на 50%. Это различие обусловило рост индекса прайминга нейтрофилов при действии КМП в присутствии 0,05% ЭДТА с 1,47 до 2,18 (на 48%). Этот результат соответствует ранее сделанным нами наблюдениям о слабой зависимости праймирующего эффекта КМП от концентрации внеклеточного кальция при добавке различных его количеств в среду для культивирования нейтрофилов и ведущей роли внутриклеточного кальция в этих процессах [8].



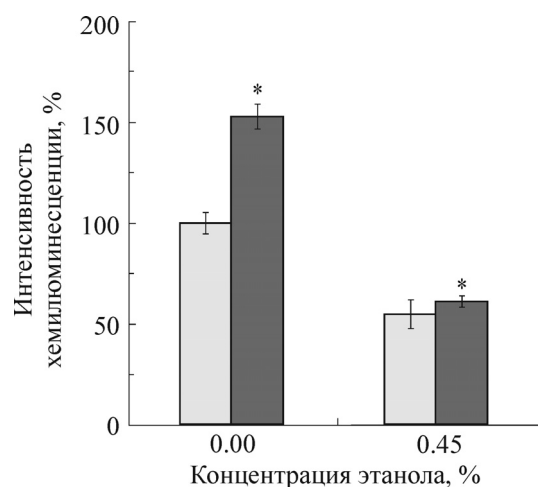
**Рис. 3.** Влияние ротенона на интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов: контроль – серый столбик, опыт – действие КМП (темный столбик). По оси абсцисс – концентрация ротенона, по оси ординат – интенсивность хемилюминесценции (максимальные значения) в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения). Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ( $P < 0,05$ ).



**Рис. 4.** Влияние сульфата цинка на интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов: контроль – серый столбик, опыт – действие КМП (темный столбик). По оси абсцисс – концентрация ZnSO<sub>4</sub>, по оси 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 ( $P < 0,05$ ).

Добавка ротенона в среду для инкубации нейтрофилов мало отразилась на интенсивности респираторного взрыва как в контроле, так и опыте (рис. 3). Различия между группами, обусловленные действием КМП, в этом случае полностью сохраняются (рис. 3). Этот факт не позволяет сделать вывод о каком-либо участии цепи митохондрий в данном эффекте использованного режима КМП.

Добавка сульфата цинка – блокатора протонных каналов VSOP/HV1 – снизила интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов в контроле на 22%, а в опыте – на 34% (рис. 4). Большая степень ослабления респираторного взрыва в опыте после действия КМП в условиях ингибирования протонных каналов, по-видимому, обусловлена их ролью в поддержании производства супероксида и поступления кальция в клетки, за счет предотвращения деполяризации мембраны и клеточного подкисления, вызванных электрогенностью НАДФН-оксидазы, осуществляющей перенос электронов через мембрану [12,13]. Очевидно, что при возросшей нагрузке в результате процесса преактивации (опытная группа) блокировка этих каналов может проявиться в большей степени, чем в менее активном состоянии (контрольная группа), что и наблюдается в эксперименте. По-видимому, в этой связи индекс прайминга нейтрофилов при действии КМП в присутствии 100 мМ сульфата цинка снизился на 16%.



**Рис. 5.** Влияние этилового спирта на интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов: контроль – серый столбик, опыт – действие КМП (темный столбик). По оси абсцисс – концентрация C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, по оси 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 ( $P < 0,05$ ).

Добавка этилового спирта (0,45%) в среду для инкубации нейтрофилов снизила интенсивность их хемилюминесценции на 45% в контроле и на 60% в опыте (рис. 5). Этиловый

спирт в использованной концентрации является хорошо изученным перехватчиком гидроксильных радикалов [14]. Ранее с этой целью мы применяли диметилсульфоксид [8], и не выявили его влияния вплоть до концентрации 1 мМ, хотя известно, что диметилсульфоксид в относительно низких концентрациях (0,02–2,5 мМ) способен эффективно перехватывать гидроксильные радикалы [15,16]. В опытах с этиловым спиртом нами получены новые данные. Показано, что индекс прайминга нейтрофилов при действии КМП в присутствии 0,45% спирта снижается на 27%. Пока не ясно, обусловлен ли этот эффект этилового спирта именно перехватом гидроксильных радикалов и их ролью в механизме действия слабых КМП или, что не менее вероятно, другими его физико-химическими свойствами. Однако очевидно, что этиловый спирт в исследованной концентрации существенно снижает эффективность действия КМП.

В связи с высокой степенью изученности процессов и механизмов краткосрочного прайминга нейтрофилов [17–20] на данный момент существует высокая вероятность выделения основных, а возможно, и иницирующих звеньев праймирующего эффекта слабых КМП. Очевидно, что усиление продукции свободных радикалов нейтрофилами в результате действия КМП связано прежде всего с давно изучаемыми биофизиками резонансно-подобными реакциями [21–37] и вряд ли обусловлено механизмом радикальных пар в его классическом варианте [2,38] или магнитохимическим механизмом [39], о чем свидетельствуют как малая величина вызывающей эффект переменной компоненты КМП, так и зависимость эффекта от ее частот.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. O. Mattsson and M. Simkó, *Frontiers Publ. Health* **2**, 132 (2014).
2. F. S. Barnes and B. Greenebaum, *Bioelectromagnetics* **36**, 45 (2015).
3. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и 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 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. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **63** (2), 277 (2018).
10. V. V. Novikov, G. V. Novikov, and E. E. Fesenko, *Bioelectromagnetics* **30**, 343 (2009).
11. В. В. Новиков, В. О. Пономарев, Г. В. Новиков и др., *Биофизика* **55** (4), 631 (2010).
12. A. El. Chemaly, Y. Okochi, M. Sasaki, et al., *J. Exp. Med.* **207** (1), 129 (2010).
13. N. Demaurex, *WIREs Membr. Transp. Signal.* **1**, 3 (2012).
14. В. Н. Мальцева, Н. В. Авхачева, Б. Ф. Санталов и В. Г. Сафронова, *Цитология* **48** (12), 1000 (2006).
15. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурина, *Успехи биол. химии* **49**, 341 (2009).
16. Д. И. Рошупкин, Н. С. Белакина и М. А. Мурина, *Биофизика*, **51**, 99 (2006).
17. Г. И. Клебанов и Ю. А. Владимиров, *Успехи соврем. биологии* **119** (5), 462 (1999).
18. А. Н. Маянский, *Цитокины и воспаление* **6** (3), 3 (2007).
19. J. El-Benna, P. M. Dang, and M. A. Gougerot-Pocidal, *Semin Immunopathol.* **30**, 279 (2008).
20. J. El-Benna, M. Hurtado-Nedelec, V. Marzaioli, et al., *Immunol. Rev.* **273** (1), 180 (2016).
21. C. F. Blackman, S. G. Benane, D. E. House, and W. T. Joines, *Bioelectromagnetics* **6** (1), 1 (1985).
22. A. R. Liboff, *J. Biol. Phys.* **13**, 99 (1985).
23. V. V. Lednev, *Bioelectromagnetics* **12** (2), 71 (1991).
24. В. В. Новиков и М. Н. Жадин, *Биофизика* **39** (1), 45 (1994).
25. В. В. Новиков, *Биофизика* **39** (5), 825 (1994).
26. В. В. Новиков, *Биофизика* **41** (5), 973 (1996).
27. M. N. Zhadin, V. V. Novikov, F. S. Barnes, and N. F. Pergola, *Bioelectromagnetics* **19**, 41 (1998).
28. В. В. Новиков и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **46** (2), 235 (2001).
29. Н. А. Белова и В. А. Панчелюга, *Биофизика* **55** (4), 750 (2010).
30. E. D'Emilia, L. Giuliani, M. Ledda, et al., *Electromagn. Biol. Med.* **36** (1), 55 (2017).
31. A. Pazur, *Electromagn. Biol. Med.* **37** (2), 100 (2018).
32. N. V. Bobkova, V. V. Novikov, N. I. Medvinskaya, et al., *Electromagn. Biol. Med.* **37** (3), 127 (2018).
33. E. G. Novoselova, V. V. Novikov, S. M. Lunin, et al., *Electromagn. Biol. Med.* **38** (1), 74 (2019). DOI: 10.1080/15368378.2018.1545667.
34. G. Khokhlova, T. Abashina, N. Belova, et al., *Bioelectromagnetics* **39** (6), 485 (2018).
35. V. N. Binhi, *Bioelectromagnetics* **21**, 34 (2000).
36. V. N. Binhi and F. S. Prato, *Bioelectromagnetics* **38**, 41 (2017).
37. V. N. Binhi and F.S. Prato, *Sci. Reports* **8**, 13495 (2018).

38. P. J. Hore and H. Mouritsen, *Annu. Rev. Biophys.* 45, 299 (2016). 39. В. Н. Бинги, *Принципы электромагнитной биофизики* (Физматлит, Москва, 2011).

## Effects of Different Chemical Agents on Priming of Neutrophils Exposed to Weak Combined Magnetic Fields

V.V. Novikov\*, E.V. Yablokova\*, N.I. Novikova\*\*, and E.E. Fesenko\*

*\*Institute of Cell Biophysics – Division of Federal Research Center “Pushchino Scientific Center of Biological Investigations” of the Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

*\*\*Branch of Shemiakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki 6, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

It has been shown that various chemical agents (ethylenediaminetetraacetic acid, zinc sulphate, ethyl alcohol, rotenone) have different effects on preactivation (priming) of neutrophils exposed to weak combined collinear static and alternating magnetic fields (combined magnetic fields: static field 42  $\mu\text{T}$ , alternating field 0.86  $\mu\text{T}$ , the sum of frequencies 1.0; 4.4 and 16.5 Hz). Ethylenediaminetetraacetic acid at low concentrations (0.05%) induced a decrease in the intensity of luminol-dependent chemiluminescence of neutrophils in response to stimulation with an activator of the respiratory burst, peptide N-formyl-Met-Leu-Phe under the action of combined magnetic fields to a lesser extent than in control conditions. In contrast, ethyl alcohol (0.45%) and zinc sulphate (0.1 mM) had a greater effect on this process under the action of combined magnetic fields. Rotenone (1  $\mu\text{M}$ ) had a weak effect on neutrophil chemiluminescence both under the action of combined magnetic fields and in control conditions.

*Keywords: weak magnetic field, neutrophils, respiratory burst, free radicals, reactive oxygen species, ethylenediaminetetraacetic acid, rotenone, zinc sulphate, ethyl alcohol, chemiluminescence*