

ПРАЙМИРОВАНИЕ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА У НЕЙТРОФИЛОВ *in vitro* ПРИ ДЕЙСТВИИ СЛАБЫХ КОМБИНИРОВАННЫХ ПОСТОЯННОГО И НИЗКОЧАСТОТНОГО ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ

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

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

E-mail: dostag@mail.ru

Поступила в редакцию 14.03.15 г.

Показано, что предварительное часовое экспонирование перитонеальных нейтрофилов мышей 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 значительное усиление хемилюминесценции клеток в ответ на введение малых концентраций активаторов респираторного взрыва: формилированного пептида N-формил-Met-Leu-Phe или форболового эфира форбол-12-меристат-13-ацетата в присутствии люминола. Нейтрофилы человека, выделенные из периферической крови, реагируют на предварительную обработку комбинированными магнитными полями и последующую активацию N-формил-Met-Leu-Phe сходным с нейтрофилами мышей образом.

Ключевые слова: магнитное поле, нейтрофилы, активные формы кислорода, хемилюминесценция.

Ранее нами исследовано влияние комбинированных магнитных полей (КМП) с крайне слабой переменной низкочастотной компонентой на генерацию свободных радикалов кровью млекопитающих [1,2]. Для определения радикалов и других активных форм кислорода (АФК) в крови человека и лабораторных животных был использован метод хемилюминесценции, основанный на регистрации хемилюминесценции в присутствии химических активаторов [3]. 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; 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 [2]. Акцептор свободных радикалов эдаравон (МС1 –186) и ингибитор НАДФН-оксидазы апоцинин снижают интенсивность хемилюминесценции крови и нивели-

руют этот эффект действия магнитных полей, что явно указывает на вовлеченность свободнорадикальных процессов в механизм действия слабых КМП [2]. Усиление люцигенин-активированной хемилюминесценции при действии КМП, а также блокирование эффектов апоцинином являются аргументами в пользу участия супероксидных радикалов в исследуемых процессах.

Известно, что основными продуцентами АФК в крови являются фагоцитирующие клетки, в частности нейтрофилы [4]. Генерация АФК в активированных нейтрофилах в основном инициируется в результате работы мультиферментного комплекса НАДФН-оксидазы, локализованного в плазматической мембране и производящего супероксид анион-радикал [5]. В этой связи представляется вполне естественным продолжить на этих клетках наши исследования [1,2], направленные на изучение механизмов генерации АФК при действии слабых КМП.

Полиморфно-ядерные нейтрофильные гранулоциты (нейтрофилы) – наиболее многочисленные лейкоциты крови человека. Массированный выброс АФК при активации нейтрофилов – «респираторный взрыв» – является суммой процессов, зависящих от комплекса мембранных и цитозольных протеинов, которые собираются вместе, чтобы отреагировать на действие многих факторов [5–8]. Без такого

Сокращения: КМП – комбинированные магнитные поля, АФК – активные формы кислорода, fMLP – N-формил-Met-Leu-Phe, ФМА – форбол-12-меристат-13-ацетат.

рода активации оксидазные компоненты НАДФН-оксидазы остаются разобщенными и не могут ответить на стимуляцию. Считается, что в покоящихся нейтрофилах НАДФН-оксидаза, определяющая продукцию АФК, находится в неактивном состоянии. Для активации НАДФН-оксидазы необходимо фосфорилирование ее субъединиц и последующая сборка комплекса в мембране из нескольких специфических цитоплазматических и мембранных белков. Нейтрофил способен регулировать свою реактивность, в частности деактивировать или праймировать способность к респираторному взрыву [7,8]. При праймировании предварительная обработка клетки агентом приводит к последующему усилению ответа на активацию. Этот процесс наблюдается при контакте нейтрофилов с цитокинами, бактериальными липополисахаридами и пр., при местном и системном воспалении – ожоговой болезни, остром респираторном дистресс-синдроме, сепсисе и др. [7]. Повышая эффекторный потенциал клеток, праймирование создает фон для проявления активности фагоцитарных стимуляторов. Возможность праймирования респираторного взрыва с помощью слабых КМП вплоть до настоящего времени оставалась неизученной. В литературе имеется несколько сообщений о влиянии относительно слабых низкочастотных магнитных полей на кинетику образования АФК в суспензии нейтрофилов с воздействием магнитного поля после введения активаторов респираторного взрыва [9–11]. Следует отметить, что интенсивности переменной компоненты магнитного поля, исследуемые в этих работах, были значительно выше (140 мкТл [9]; 74,7 мкТл [10]; 10, 40 и 80 мкТл [11]), чем в наших экспериментах (диапазон 0,1–3,44 мкТл) [2]. Эти авторы обнаружили модуляцию образования АФК в активированных нейтрофилах методами люминол-зависимой люминесценции [10] и усиление респираторного взрыва с использованием флуоресцентных меток на АФК – дихлорфлуоресцеина диацетата [9] и дигидрорадамина [11].

Целью настоящей работы явилось исследование возможности праймирования респираторного взрыва нейтрофилов с помощью предварительной обработки этих клеток КМП с крайне слабой переменной низкочастотной компонентой и последующей активации продукции АФК формируемым пептидом N-формил-Met-Leu-Phe (fMLP) или форболовым эфиром форбол-12-меристат-13-ацетатом (ФМА).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение суспензии нейтрофилов. Работу выполняли на перитонеальных нейтрофилах мышей и нейтрофилах человека, выделенных из периферической крови. 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 (*Zymozan A* из *Saccharomyces cerevisiae* производства компании Sigma, США). После этого через 12 ч животных умерщвляли методом ульнарной дислокации и их брюшную полость промывали тремя миллилитрами 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.

Для получения нейтрофилов из периферической крови человека использовали свежие образцы венозной крови из кубитальной вены от здоровых доноров с гепарином в качестве антикоагулянта (20 МЕ на 1 мл). Нейтрофилы выделяли методом дифференциального центрифугирования на двухслойном градиенте фикола (Sigma, США) – урографина (Bayer, Германия) (1,119 г/мл и 1,077 г/мл) по стандартной методике [12]. Чистота фракции составляла 96–98%; жизнеспособность клеток, оцениваемая по окрашиванию трипановым синим, составляла не менее 95%. Как и в предыдущем случае, клетки до эксперимента содержали в номинально бескальциевой среде и использовали в экспериментах в стандартной среде Хенкса через 40 мин после выделения.

Экспонирование суспензии нейтрофилов в магнитном поле. Нейтрофилы инкубировали при 37°C в концентрации 1 млн/мл по 0,25 мл 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

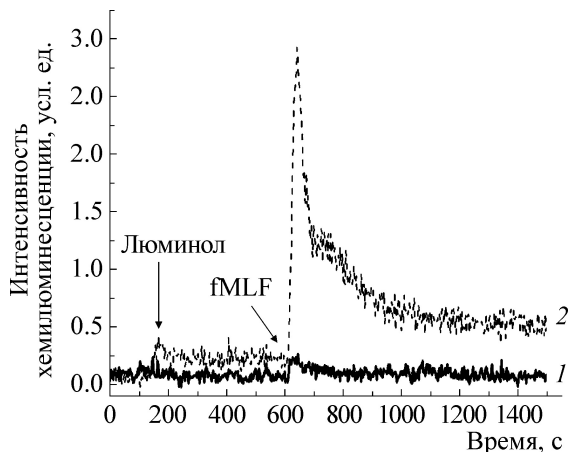


Рис. 1. Влияние предварительной обработки слабым КМП (постоянное магнитное поле 42 мкТл, переменное магнитное поле 16,5 Гц, 160 нТл; 4,4 Гц, 100 нТл; 1 Гц, 600 нТл) на кинетику и интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов из брюшной полости мыши при стимуляции клеток 10 нМ fMLP в присутствии люминола. Контрольные (1) и опытные (2) образцы инкубировали при 37°C.

составляющей ~ 42 мкТл и уровнем магнитного фона на 50 Гц 15–50 нТл, соответствующим этим показателям в экспериментальных группах, за исключение 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 составляющей составляла 860 ± 10 нТл. В опытах был использован трехчастотный сигнал 1; 4,4 и 16,5 Гц, показавший активность в предыдущих опытах [1,2,13], 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).

Регистрация хемилюминесценции. Интенсивность продукции АФК клетками оценивали по люминол-зависимой хемилюминесценции с помощью хемилюминометра ХЕМИЛЮМ-12, разработанного в Институте биофизики клетки РАН [14]. Регистрацию проводили при 37°C параллельно от 12 проб с частотой опроса 1/2,5 с. Одновременно в прибор помещали кон-

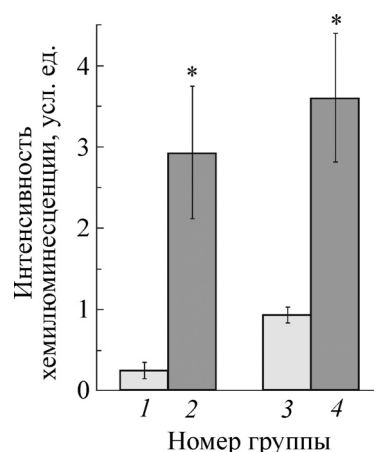


Рис. 2. Влияние предварительной обработки слабым КМП (постоянное магнитное поле 42 мкТл, переменное магнитное поле 16,5 Гц, 160 нТл; 4,4 Гц, 100 нТл; 1 Гц, 600 нТл) на интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов при стимуляции клеток fMLP (1,2 – 0,01 мкМ; 3,4 – 0,1 мкМ) в присутствии люминола. Контрольные (1,3) и опытные (2,4) образцы инкубировали при 37°C. По оси ординат – максимумы интенсивности хемилюминесценции (средние значения и стандартные отклонения, $n = 4$). Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($p < 0,05$).

трольные и опытные образцы. К образцам добавляли люминол (Enzo Life Sciences, США) в концентрации 0,35 мМ и один из активаторов генерации АФК – хемотаксический формилированный пептид fMLP (Sigma, США) или ФМА (Sigma, США) в различных концентрациях.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительное часовое экспонирование перитонеальных нейтрофилов мышей в слабых КМП вызывает значительное (на порядок) усиление хемилюминесценции клеток в ответ на введение субпороговых (10 нМ) концентраций активатора fMLP (рис. 1, 2). При увеличении концентрации этого активатора в десять раз степень выраженности праймирующего эффекта КМП снижается приблизительно в два раза (рис. 2, 3). Как следует из рис. 1–3, это снижение не является следствием уменьшения ответа нейтрофилов, обработанных КМП, в ответ на большую дозу активатора (ответы нейтрофилов опытных групп на концентрации fMLP в 10 и 100 нМ сопоставимы по величине), а определяется естественным усилением ответа контрольных нейтрофилов на увеличенную концентрацию активатора (fMLP). Нейтрофилы че-

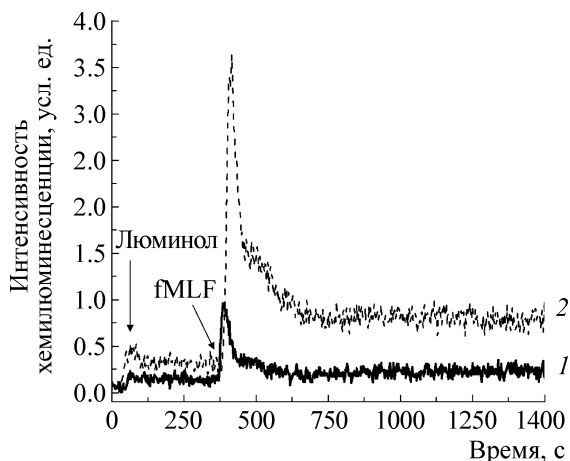


Рис. 3. Влияние предварительной обработки слабым КМП (постоянное магнитное поле 42 мкТл, переменное магнитное поле 16,5 Гц, 160 нТл; 4,4 Гц, 100 нТл; 1 Гц, 600 нТл) на кинетику и интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов из брюшной полости мыши при стимуляции клеток 100 нМ fMLP в присутствии люминола. Контрольные (1) и опытные (2) образцы инкубировали при 37°C.

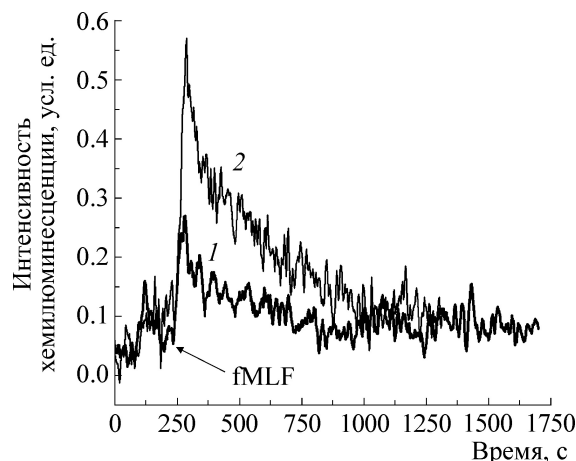


Рис. 4. Влияние предварительной обработки слабым КМП (постоянное магнитное поле 42 мкТл, переменное магнитное поле 16,5 Гц, 160 нТл; 4,4 Гц, 100 нТл; 1 Гц, 600 нТл) на кинетику и интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов из венозной крови человека при стимуляции клеток 10 нМ fMLP в присутствии люминола. Контрольные (1) и опытные (2) образцы инкубировали при 37°C.

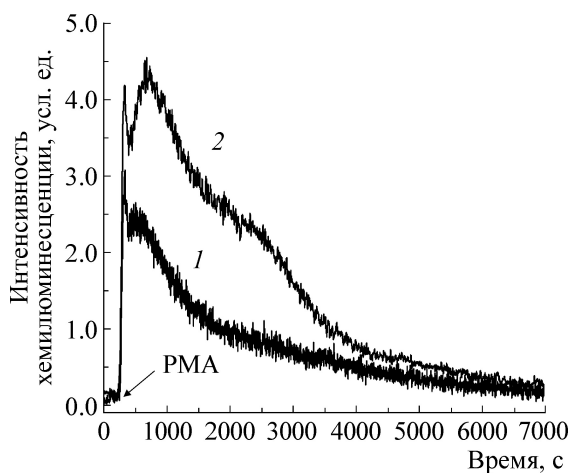


Рис. 5. Влияние предварительной обработки слабым КМП (постоянное магнитное поле 42 мкТл, переменное магнитное поле 16,5 Гц, 160 нТл; 4,4 Гц, 100 нТл; 1 Гц, 600 нТл) на кинетику и интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов из брюшной полости мыши при стимуляции клеток 10 нМ ФМА в присутствии люминола. Контрольные (1) и опытные (2) образцы инкубировали при 37°C.

ловека, выделенные из периферической крови, реагируют на предварительную обработку КМП и последующую активацию fMLP сходным с нейтрофилами мышей образом (рис. 4).

Экспонированные в КМП нейтрофилы также более сильно, по сравнению с контрольной группой, реагируют на другой активатор респираторного взрыва ФМА (10 нМ) (рис. 5, 6). В этом случае отмечается двукратное усиление

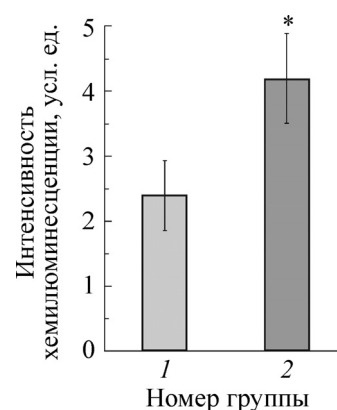


Рис. 6. Влияние предварительной обработки слабым КМП (постоянное магнитное поле 42 мкТл, переменное магнитное поле 16,5 Гц, 160 нТл; 4,4 Гц, 100 нТл; 1 Гц, 600 нТл) на интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов при стимуляции клеток 10 нМ ФМА в присутствии люминола. Контрольные (1) и опытные (2) образцы инкубировали при 37°C. По оси ординат – максимумы интенсивности хемилюминесценции (средние значения и стандартные отклонения, $n = 4$). Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($p < 0,05$).

люминол-зависимой хемилюминесценции клеток.

Таким образом, при использовании обоих активаторов респираторного взрыва: хемотаксического пептида fMLP, осуществляющего передачу сигнала через рецепторы fMLP, и фоболового эфира (ФМА), имитирующего диа-

цилглицерол и напрямую (без рецепторных посредников) активирующего мембранную протеинкиназу С [15], зарегистрирован выраженный праймирующий (стимулирующий) эффект предобработки нейтрофилов КМП с крайне слабой (амплитуда 0,86 мкТл) переменной низкочастотной компонентой. Трудно судить о влиянии процедуры выделения нейтрофилов на функциональный статус клеток, в частности, на их активационные параметры. Поэтому мы использовали обе основные методики выделения нейтрофилов из цельной крови человека и из брюшной полости мышей. В этой связи интерес представляют наши предварительные исследования, выполненные на цельной крови [1,2], в которых отсутствовали манипуляции, связанные с изоляцией нейтрофилов.

В данный момент механизм праймирования нейтрофилов слабым КМП остается неизученным. Известно, что при действии различных праймирующих агентов, могут реализоваться разные механизмы: изменения в уровне экспрессии адгезивных молекул на поверхности клетки; освобождение содержимого гранул; полимеризация актина; фосфорилирование компонентов НАДФН-оксидазы; синтез белка *de novo*; модуляция концентрации цитозольного кальция; активация фосфолипаз; образование биоактивных липидов [7,16,17]. Можно предположить, что в нашем случае (воздействие КМП) праймирование не связано с активацией рецепторов, а решается на пострецепторном пространстве, захватывая факторы, важные для инициации и развития респираторного взрыва. В пользу этого свидетельствует одинаковый ответ праймированных КМП нейтрофилов на отличающиеся в десять раз пороговые концентрации активатора fMLP, а также усиленный ответ на прямой активатор протеинкиназы С (ФМА).

Активно изучается роль фосфорилирования оксидазных компонентов и киназных ферментов, ответственных за праймирование нейтрофилов [8,16]. Поскольку главным участником фосфорилирования является компонент НАДФН оксидазы – p47phox, большинство наблюдений посвящено этому белку [8,16]. Можно предположить, что праймирующий эффект в нашем случае определяется частичным фосфорилированием p47phox, подготавливающим его к полной активации. О такой возможности свидетельствует отмена иммуномодуляционных эффектов малоинтенсивного излучения на частоте 41,95 ГГц с помощью ингибиторов протеинкиназ у праймированных малыми дозами fMLP нейтрофилов [18].

Важным может оказаться отношение кальция к праймированию нейтрофила слабым

КМП. Косвенно об этом свидетельствуют результаты работ, в которых модуляция респираторного взрыва в активированных нейтрофилах зарегистрирована на циклотронной частоте Ca^{2+} [10,11]. Многие ферменты, которые участвуют в регуляции респираторного взрыва (например, протеинкиназа С, MAPK, тирозинкиназы и пр.), зависят от цитозольного Ca^{2+} и тормозятся при его отсутствии [19].

В связи с тем, что в ряде теоретических работ [20–23] рассматривают магнитные моменты протонов в качестве первичных мишеней для переменных низкочастотных магнитных полей нанотеслового диапазона интенсивности, используемых в нашей работе, следует обратить внимание на роль протонных токов (канал VSOP/HV1) в поддержании производства супероксида и поступления кальция в нейтрофилы, за счет предотвращения деполяризации мембраны и клеточного подкисления, вызванных электрогенностью оксидазы, осуществляющей перенос электронов через мембрану [24,25].

В анализе первичных механизмов действия слабых КМП на прайминг нейтрофилов следует учесть гематопорфириновую гипотезу действия низкоинтенсивного лазерного облучения, сформулированную Ю.А. Владимировым [26,27]. Согласно этой гипотезе, поглощение энергии эндогенным фотосенсибилизатором усиливает липидную перекисидацию в мембране, увеличивая в связи с этим ее проницаемость для ионов кальция, и, как следствие активует внутриклеточные процессы, вызывая, в частности, прайминг фагоцитов. Аналогичный процесс, по-видимому, может быть рассмотрен и в нашем случае.

Экспериментальное изучение внутриклеточных сигнальных систем, вовлеченных в праймирование респираторного взрыва в нейтрофилах при действии слабых КМП, может помочь выяснить механизмы, которыми регулируются специфические функции нейтрофилов, и развить терапевтические стратегии применения слабых КМП.

Авторы работы благодарят В.Г. Сафронову, Б.Ф. Санталова и И.В. Тихонову за консультативную и методическую помощь при проведении исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-44-03676р_центр_a) 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. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскура, *Успехи биол. наук* **49**, 341 (2009).
4. J. Lindena, H. Burkhardt, and A. Dwenger, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **25** (11), 765 (1987).
5. J. D. Lambeth, *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 181 (2004).
6. P. V. Vignais, *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1428 (2002).
7. А. Н. Маянский, *Цитокины и воспаление* **6** (3), 3 (2007).
8. J. El-Benna, P. M. Dang, and M. A. Gougerot-Pocidal, *Semin Immunopathol.* **30**, 279 (2008).
9. S. Roy, Y. Noda, V. Eckert, et al., *FEBS Lett.* **376**, 164 (1995).
10. Н. А. Белова, М. М. Поцелуева, Л. К. Сребницкая и др., *Биофизика* **55** (4), 657 (2010).
11. B. Poniedzialek, P. Rzymiski, H. Nawrocka-Bogusz, et al., *Electromag. Biol. Med.* **32**, 333 (2013).
12. Д. К. Новиков и В. И. Новикова, в сб.: *Клеточные методы иммунодиагностики* (Минск, Беларусь, 1979), сс. 20–31.
13. V. V. Novikov, G. V. Novikov, and E. E. Fesenko, *Bioelectromagnetics* **30**, 343 (2009).
14. В. Г. Сафронова, А. Г. Габдулхакова, А. В. Миллер и др., *Биохимия* **66**, 840 (2001).
15. F. Rossi, P. Bellavite, G. Berton, et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* **141**, 283 (1982).
16. F. R. Sheppard, M. R. Kelher, E. E. Moore, et al., *J. Leukocyte Biol.* **78**, 1025 (2005).
17. А. В. Миллер, Автореферат дис. ... канд. биол. наук (Пушино, 2004).
18. V. G. Safronova, A. G. Gabdoulkhakova, and B. F. Santalov, *Bioelectromagnetics* **23**, 599 (2002).
19. J. R. Forehand, M. J. Pabst, W. A. Phillips, et al., *J. Clin. Invest.* **83**, 74 (1989).
20. В. В. Леднев, в сб. *Моделирование геофизических процессов* (Объединенный институт физики Земли им. О. Ю. Шмидта, 2003), сс. 130–136.
21. В. Н. Бинги, *Принципы электромагнитной биофизики* (Изд-во Физматлит, Москва, 2011).
22. В. О. Пономарев и В. В. Новиков, *Биофизика* **54** (2), 235 (2009).
23. В. О. Пономарев, В. В. Новиков, А. В. Карнаухов и О. А. Пономарев, *Биофизика* **53** (2), 197 (2008).
24. A. El Chermaly, Y. Okochi, M. Sasaki, et al., *J. Exp. Med.* **207** (1), 129 (2010).
25. N. Demaurex, *WIREs Membr. Transp. Signal.* **1**, 3 (2012).
26. Ю. А. Владимиров, в сб. *Эфферентная медицина* (ИБМХ РАМН, М., 1994), сс. 51–67.
27. Г. И. Клебанов, И. В. Страшкевич, Т. В. Чичук и др., *Биол. мембраны* **15** (3), 273 (1998).

Priming of Respiratory Burst in Neutrophils *in vitro* under Weak Combined Static and Low Frequency Alternating Magnetic Fields

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 a one-hour pre-exposure of mice peritoneal neutrophils at physiological temperatures in combined weak static magnetic field (42 μT) and low-frequency collinear alternating magnetic field (sum of the frequencies 1, 4.4 and 16.5 Hz, amplitude 0.86 μT) causes a significant enhancement of chemiluminescence of cells in response to low concentrations of activators of the respiratory burst: formylated peptide N-formyl-Met-Leu-Phe or phorbol ester of phorbol 12-myristate-13-acetate in the presence of luminol. Human neutrophils, which were isolated from peripheral blood, respond to the pretreatment with combined magnetic fields and subsequent activation of N-formyl-Met-Leu-Phe in a similar manner to mice neutrophils.

Key words: magnetic field, neutrophils, reactive oxygen species, chemiluminescence