

ВЛИЯНИЕ «НУЛЕВОГО» МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В НЕЙТРОФИЛАХ

© 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 15.03.18 г.

Показано, что 1,5-часовое экспонирование перитонеальных нейтрофилов мышей при магнитном экранировании в гипомангнитных условиях (остаточное постоянное магнитное поле 20 нТл) вызывает снижение внутриклеточной продукции активных форм кислорода, регистрируемое по изменению интенсивности флуоресценции продуктов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина и дигидрородамина 123. При дополнительном введении малых концентраций активаторов респираторного взрыва – формилированного пептида N-formyl-Met-Leu-Phe или форболового эфира форбол-12-меристат-13-ацетата – этот эффект гипомангнитного поля сохраняется.

Ключевые слова: гипомангнитное 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 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 с очень слабой переменной составляющей (менее 1 мкТл) [5–11]. В этой связи представляет особый интерес влияние на изучаемые нами процессы гипомангнитных условий.

В недавнем обзоре [12] были представлены данные из более ста оригинальных экспериментальных исследований по биологическим эффектам гипомангнитного поля и сравнительный анализ некоторых теорий для их объяснения. По мнению авторов этой работы, возможность наблюдения эффектов гипомангнитного поля вполне вероятна, поскольку эти условия влияют на динамику всех прецессирующих магнитных моментов (остановка прецессии) в связи с отсутствием расщепления квантовых энергетических уровней магнитных моментов в «нулевом»

магнитном поле на зеемановские подуровни. По-видимому, работы в этом направлении могут способствовать, наряду с исследованиями эффектов комбинированных полей, выявлению первичных мишеней и биофизических механизмов трансдукции магнитного сигнала в суспензии нейтрофилов.

На данном этапе для анализа эффектов гипомангнитных условий мы применили метод флуоресцентной спектроскопии с использованием хорошо изученных проникающих в клетки флуоресцентных зондов на АФК – 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата (H2DCF-DA) и дигидрородамина 123 [13–16]. 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 CD-1

Сокращение: АФК – активные формы кислорода, H2DCF-DA – 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина диацетат, fMLF – пептид N-формил-Met-Leu-Phe, ФМА – форбол-12-меристат-13-ацетат.

массой 24–26 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 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 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.

Экспонирование суспензии нейтрофилов в гипомангнитном поле. Нейтрофилы инкубировали при $37,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ в концентрации 1 млн/мл по 250 мкл в полипропиленовых пробирках типа Эппендорф при световой депривации. Заданную температуру поддерживали циркуляционным термостатом. Типичное время инкубации составляло 1,5 ч. Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле с постоянной составляющей ~ 42 мкТл и уровнем магнитного фона на частоте 50 Гц в 15–50 нТл.

Установка для формирования гипомангнитных условий состояла из трех вставленных соосно один в другой цилиндрических экранов магнитного поля из пермаллоя (толщиной 1 мм), закрытых крышками. Величины остаточных постоянных магнитных полей не превышали 20 нТл. Их определяли прямым измерением с помощью феррозондового датчика Mag-03MS100 (Bartington, Великобритания). Контрольные (геомагнитное поле) и опытные (гипомагнитные условия) образцы инкубировали по 10 штук одновременно. Опыты повторяли не менее трех раз.

Флуоресцентная детекция внутриклеточных АФК. После полуторачасовой инкубации в гипомангнитных условиях к суспензии нейтрофилов добавляли флуоресцентные зонды на внутриклеточные АФК – H₂DCF-DA или дигидрорадамин 123 до конечной концентрации 0,01 мг/мл. В ряд контрольных и опытных образцов также добавляли один из активаторов

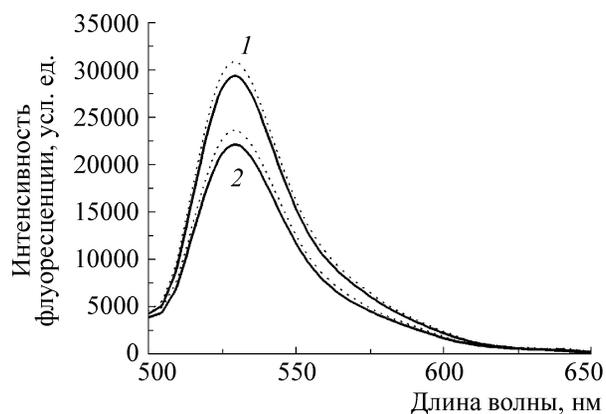


Рис. 1. Спектры флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в контроле (1) и в опыте (2) – после действия гипомангнитного поля. Пунктирными линиями обозначены стандартные отклонения.

генерации АФК – хемотаксический формилованный пептид N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF) (Sigma, США) в концентрации 0,5 мкМ или форбол-12-меристат-13-ацетат (ФМА) (Sigma, США) – в концентрации 0,05 мкМ. Пробы продолжали инкубировать при 37°C в темноте, чтобы минимизировать фотооксидацию красителей. В случае с H₂DCF-DA время инкубации составило 30 мин, при использовании дигидрорадамина 123 – 10 мин. Затем клетки отмывали, центрифугируя 10 мин при 600 g 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 в процентах, как отношение максимальной интенсивности флуоресценции в опытах к базовому контролю без активаторов, принятому за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспонирование перитонеальных нейтрофилов в гипомангнитных условиях (при ослаблении геомагнитного поля \sim в 2000 раз) вызывает значительное (на 25%) уменьшение интенсивности флуоресценции внутриклеточного дихлорфлуоресцеина (рис. 1, 2). При использовании дополнительной стимуляции клеток с помощью fMLF степень различий между контролем (геомагнитное поле) и опытом (гипомагнитное поле) сохраняется ($\sim 23\%$). Сама стиму-

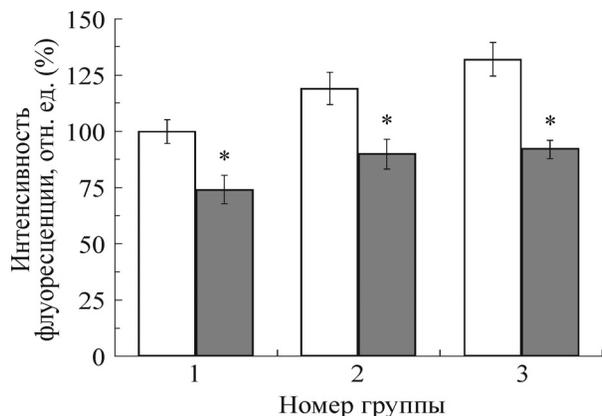


Рис. 2. Влияние гипомангнитного поля на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в отсутствие и в присутствии активаторов респираторного взрыва. Ось ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю без активаторов (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$). Ось абсцисс – номер группы: 1 – контроль и опыт без активаторов, 2 – контроль и опыт с добавками 0,5 мкМ fMLP, 3 – контроль и опыт с добавками 0,05 мкМ ФМА. Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$).

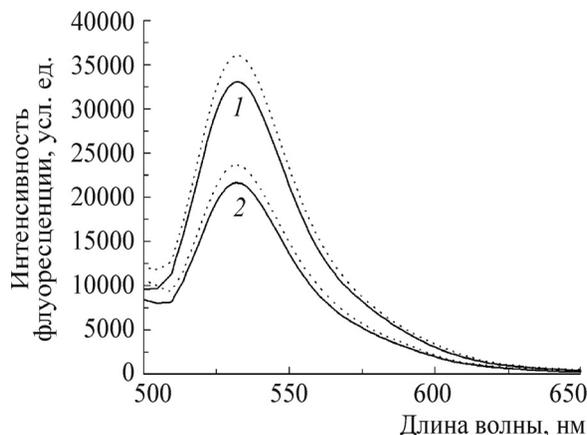


Рис. 3. Спектры флуоресценции родамина 123 в суспензии нейтрофилов в контроле (1) и в опыте (2) – после действия гипомангнитного поля. Пунктирными линиями обозначены стандартные отклонения.

ляция нейтрофилов относительно низкой дозой fMLF (0,5 мкМ) приводит к увеличению интенсивности флуоресценции этого зонда на АФК на 18% в контроле и на 16% – в опыте (рис. 2). Стимуляция нейтрофилов активатором ФМА (0,05 мкМ) вызывает увеличение интенсивности флуоресценции внутриклеточного дихлорфлуоресцеина в контрольных группах в среднем на 30%, а проведенная после пребывания в гипомангнитных условиях – на 22% по

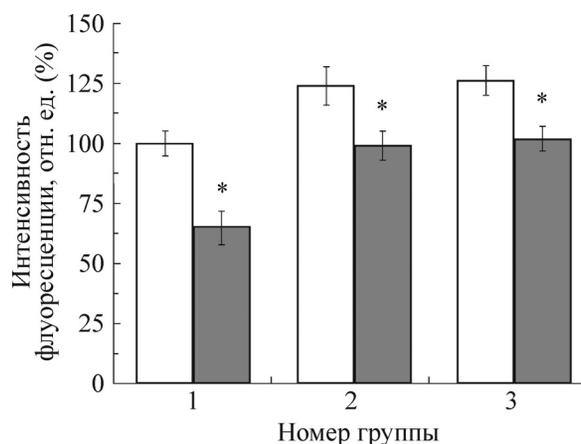


Рис. 4. Влияние гипомангнитного поля на интенсивность флуоресценции родамина 123 в суспензии нейтрофилов в отсутствие и в присутствии активаторов респираторного взрыва. Ось ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю без активаторов (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$). Ось абсцисс – номер группы: 1 – контроль и опыт без активаторов, 2 – контроль и опыт с добавками 0,5 мкМ fMLP, 3 – контроль и опыт с добавками 0,05 мкМ ФМА. Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$).

сравнению с соответствующим контролем (рис. 2). Важно отметить, что показатели интенсивности флуоресценции дихлорфлуоресцеина в опыте после стимуляции fMLF или ФМА приближаются к показателям контрольной группы без стимуляции.

Интенсивность флуоресценции родамина 123 в опыте (гипомангнитные условия без дополнительной стимуляции) существенно ниже (на 35%), чем в контроле (рис. 3, 4). Эффект дополнительной стимуляции с помощью fMLF составляет 23% в контроле и 35% в опыте. В этом случае (стимуляция fMLF) различия между контролем и опытом составляют 20%. Аналогичным образом проявляется эффект дополнительной стимуляции нейтрофилов с помощью ФМА (рис. 3, 4).

Таким образом, воздействие гипомангнитных условий вызывает снижение базовой продукции внутриклеточных АФК в нейтрофилах, что отмечается во всех опытах с обоими флуоресцирующими зондами. В опытах с дополнительной стимуляцией нейтрофилов химическими активаторами респираторного взрыва fMLF или ФМА этот эффект действия гипомангнитного поля также проявляется, но обусловлен в большей степени исходной разницей в продукции АФК, чем нарушением ответа нейтрофилов на эти активаторы.

Известными сайтами образования внутриклеточных АФК в нейтрофилах являются фагосомы, однако АФК могут синтезироваться и вне фагосом, в цитохром *b*-содержащих гранулах [17]. Помимо НАДФН-оксидазы в фагоцитах есть и другие АФК-образующие системы (например, НАДФН-оксидазы, включающие другие члены NOX-семейства [18], NO-синтазы [19], а также единичные митохондрии [20]). Но именно ферментный комплекс оксидазы фагоцитов, содержащей NOX2, дает значительно более высокий уровень АФК, чем другие клеточные оксидазы [17]. 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). При активации клеток в результате действия того или иного стимула образование АФК имеет место как внутри, так и вне клетки [21,22].

Ключевым моментом в регуляции активности НАДФН-оксидазы нейтрофилов является степень фосфорилирования ее субъединиц, определяющая возможность сборки этого ферментативного комплекса в мембране из нескольких специфических цитоплазматических и мембранных белков [23–25]. Фосфорилирование субъединиц НАДФН-оксидазы находится под контролем прежде всего протеинкиназы С, активность которой сильно зависит от уровня внутриклеточного Ca^{2+} [23–25], а также сопряжена с активностью фосфолипазы С, обеспечивающей уровень инозитолтрифосфата (стимулирует выход ионов кальция из эндоплазматического ретикулума) и диацилглицерола (напрямую активирует протеинкиназу С). На основании полученных нами данных можно предположить, что в гипомангнитных условиях тормозятся именно процессы фосфорилирования компонентов НАДФН-оксидазы, что и приводит к снижению внутриклеточной продукции АФК. Напротив, при действии комбинированных магнитных полей с определенными нами параметрами [26–28] отмечается преактивация (прайминг) нейтрофилов, блокируемая низкими концентрациями внутриклеточного хелатора Ca^{2+} [7,10], что также свидетельствует об участии процессов фосфорилирования НАДФН-оксидазы в механизме биологического действия слабого магнитного поля. Без сомнения, эти вопросы заслуживают специальных детальных исследований.

В литературе имеется несколько сообщений о снижении продукции АФК в гипомангнитных условиях на других типах клеток и при более

длительных экспозициях [29–31]. Преимуществом разработанной нами экспериментальной модели является высокая степень изученности молекулярных механизмов генерации АФК в нейтрофилах, их относительная простота и короткое время для регистрации эффекта. Принципиальным вопросом в подобных исследованиях является определение зависимости степени выраженности эффекта от величины гипомангнитного поля, так как это может дать дополнительную информацию о молекулярных мишенях [12]. Ранее в опытах на другой экспериментальной модели – делении и регенерации планарий – мы зарегистрировали дискретный характер ответа этой биосистемы на пребывание в очень слабом постоянном магнитном поле (в диапазоне 0–1,5 мкТл было обнаружено два максимума ответа, четко разделенных при ~500 нТл) [32,33]. Представляется важным проведение подобных измерений и на суспензии нейтрофилов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. В. Новиков, В. О. Пономарев, Г. В. Новиков и др., *Биофизика* **55** (4), 631 (2010).
2. В. Н. Бинги, *Принципы электромагнитной биофизики* (Изд-во Физматлит, Москва, 2011).
3. М. О. Mattsson and M. Simkó, *Frontiers in Public Health* **2**, 132 (2014).
4. F. S. Barnes and V. Greenebaum, *Bioelectromagnetics* **36**, 45 (2015).
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. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **61** (3), 510 (2016).
8. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **61** (6), 1159 (2016).
9. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, Г. В. Новиков и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **62** (5), 926 (2017).
10. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **62** (3), 547 (2017).
11. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **63** (2), 277 (2018).
12. V. N. Binhi and F. S. Prato, *PLoS ONE* **12** (6), e0179340 (2017).
13. J. P. Crow, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* **1** (2), 145 (1997).
14. S. L. Hempel, G. R. Buettner, Y. Q. O'Malley, et al., *Free Radic Biol Med.* **27** (1–2), 146 (1999).
15. G. Bartosz, *Clin. Chim. Acta* **368**, 53 (2006).
16. M. Freitas, J. L. Lima, and E. Fernandes, *Anal. Chim. Acta* **649**, 8 (2009).
17. Н. В. Воробьева, *Иммунология* **34** (4), 227 (2013).

18. D. I. Brown and K. K. Griending, *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 1239 (2009).
19. R. Korhonen, A. Lahti, H. Kankaanranta, et al., *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* **4**, 471 (2005).
20. G. Fossati, D. A. Moulding, D. G. Spiller, et al., *J. Immunol.* **170**, 1964 (2003).
21. Д. И. Рошупкин, Н. С. Белакина и М. А. Мурина, *Биофизика* **51**, 99 (2006).
22. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурина, *Успехи биол. химии* **49**, 341 (2009).
23. А. Н. Маянский, *Цитокины и воспаление* **6** (3), 3 (2007).
24. P. V. Vignais, *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1428 (2002).
25. J. El-Benna, P. M. Dang, and M. A. Gougerot-Pocidalo, *Semin. Immunopathol.* **30**, 279 (2008).
26. В. В. Новиков и М. Н. Жадин, *Биофизика* **39** (1), 45 (1994).
27. В. В. Новиков и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **46** (2), 235 (2001).
28. V. V. Novikov, G. V. Novikov, and E. E. Fesenko, *Bioelectromagnetics* **30**, 343 (2009).
29. H. Zhang, Z. Zhang, W. Mo, et al., *Protein Cell* **8** (7), 527 (2017).
30. C. F. Martino and P. R. Castello, *PLoS ONE* **6** (8), e22753 (2011).
31. P. Poltanski, E. Rajkowska, M. Brodecki, et al., *Bioelectromagnetics* **34**, 333 (2013).
32. В. В. Новиков, И. М. Шейман и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **52** (5), 912 (2007).
33. V. V. Novikov, I. M. Sheiman, and E. E. Fesenko, *Bioelectromagnetics* **29**, 387 (2008).

The Effect of «Zero» Magnetic Field 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 a 1.5 hour exposure of mice peritoneal neutrophils to a magnetic field in hypomagnetic conditions (residual static magnetic field of 20 nT) causes a decrease in intracellular reactive oxygen species levels, recorded by the change in the fluorescence intensity of the oxidation products of 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123. The effect of the hypomagnetic field is observed after respiratory burst activators: the formylated peptide N-formyl-Met-Leu-Phe or phorbol ester of phorbol 12-myristate-13-acetate applied at low concentrations are additionally added.

Keywords: hypomagnetic field, neutrophils, reactive oxygen species, fluorescence, respiratory burst