

УДК 577.3

## ВЛИЯНИЕ СЛАБОГО ПОСТОЯННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ В ДИАПАЗОНЕ ВЕЛИЧИН ОТ «НУЛЕВОГО» ПОЛЯ (0,01 мкТл) ДО 100 мкТл НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В НЕАКТИВИРОВАННЫХ НЕЙТРОФИЛАХ

© 2020 г. В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, И.А. Шаев, Е.Е. Фесенко

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: docmag@mail.ru

Поступила в редакцию 16.12.2019 г.

После доработки 16.12.2019 г.

Принята к публикации 24.12.2019 г.

Показано, что 40-минутное экспонирование перитонеальных нейтрофилов в гипомангнитных условиях (при величине остаточного поля 0.01 мкТл) вызывает значительное (на 25%) уменьшение интенсивности флуоресценции внутриклеточного дихлорфлуоресцеина. При увеличении постоянного магнитного поля до 1 мкТл величина этого эффекта ослабленного магнитного поля сохраняется. При дальнейшем увеличении поля до 2.5 мкТл эффект действия поля исчезает и снова проявляется при 5 мкТл в редуцированном виде, достигая максимума при 7 мкТл. При последовательном увеличении индукции постоянного магнитного поля (9, 15, 19.5 мкТл) отмечается столь же выраженный и устойчивый ингибирующий эффект, степень выраженности которого значительно снижается только при 30 мкТл. Далее, при величине постоянного магнитного поля 45 мкТл значения интенсивности флуоресценции продуктов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина уже не отличаются от контрольных. При дальнейшем увеличении поля до 74 мкТл и 100 мкТл также не отмечено влияние на эти процессы.

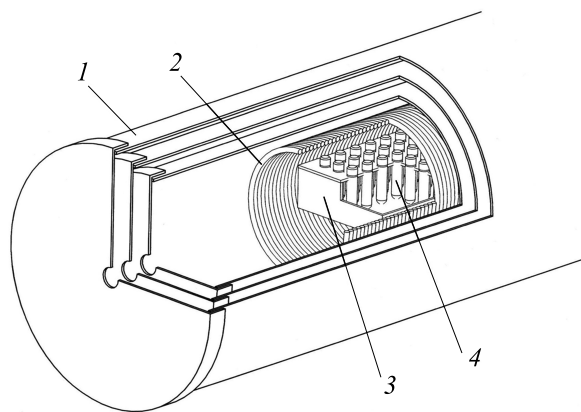
*Ключевые слова:* гипомангнитное поле, геомагнитное поле, нейтрофилы, активные формы кислорода, флуоресценция.

DOI: 10.31857/S0006302920020114

В литературе имеется ряд сообщений о снижении продукции активных форм кислорода (АФК) в гипомангнитных условиях в различных типах клеток и при различной экспозиции [1–4]. Ранее нами было показано, что полуторачасовое экспонирование перитонеальных нейтрофилов мышей при магнитном экранировании в гипомангнитных условиях (остаточное постоянное магнитное поле менее 20 нТл) вызывает снижение базовой внутриклеточной продукции активных форм кислорода, регистрируемое по изменению интенсивности флуоресценции продуктов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина и дигидрородамина 123 [5, 6]. Учитывая то, что эффект действия гипомангнитного поля проявлялся в опытах на нейтрофилах без дополнительной их стимуляции химическими активаторами респираторного взрыва (формилированным пептидом N-formyl-Met-Leu-Phe или форболовым эфиром форбол-12-ме-

рилат-13-ацетата) и, следовательно, не обусловлен нарушением ответа нейтрофилов на эти стимулы, нами с целью определения возможных молекулярных механизмов этого действия «нулевого» поля был проведен комплекс специальных исследований на неактивированных нейтрофилах [6]. Было показано, что снижение интенсивности процессов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина в неактивированных нейтрофилах в гипомангнитных условиях не зависит от кальций-опосредованных регуляторных механизмов, о чем свидетельствует отсутствие действия внутриклеточного хелатора ионов кальция (ацетоксиметилового эфира 1,2-бис(2-аминофеноксид)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты) на интенсивность этого процесса [6]. Это снижение вряд ли обусловлено влиянием гипомангнитных условий на фосфорилирование компонентов НАДФН-оксидазы, так как добавка ингибитора протеинкиназы С (Ro 31-6233) практически не отразилась на интенсивности флуоресценции внутриклеточного дихлордигидрофлуоресцеина

*Сокращения:* АФК – активные формы кислорода, МП – магнитное поле, ГМП – геомагнитное поле.



**Рис. 1.** Блок магнитной обработки: 1 — магнитные экраны; 2 — соленоид; 3 — термостабилизированная кювета; 4 — экспериментальные образцы.

[6]. Добавка ингибитора фосфолипазы С (U73122) немного и приблизительно одинаково снизила продукцию АФК как в контроле, так и в опыте [6]. О возможном участии электрон-транспортной цепи митохондрий в механизме этого эффекта «нулевого» поля свидетельствует снижение продукции АФК при добавке ротенона, значительно более выраженное в опытных образцах, подвергшихся действию гипомангнитного поля [6].

В связи с этими результатами возникает вопрос о том, каким образом данный эффект гипомангнитного поля зависит от величины остаточного магнитного поля и, более широко, от величины постоянной компоненты магнитного поля (МП) в диапазоне ослабленного геомагнитного поля (ГМП), параметров ГМП (34–68 мкТл и далее до 100 мкТл). Ответить на этот вопрос предполагается в данном исследовании.

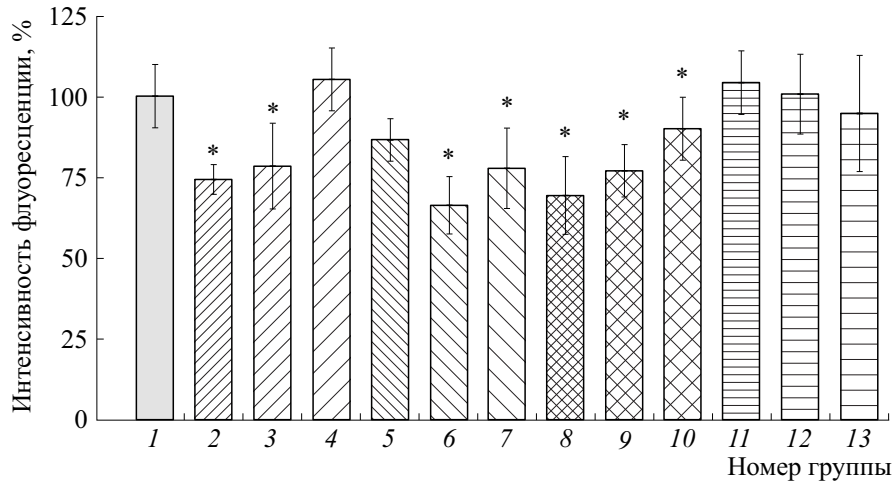
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение суспензии нейтрофилов.** Работа выполнена на перитонеальных нейтрофилах мышей. Для получения нейтрофилов использовали лабораторных мышей самцов линии CD-1 массой 24–26 г, полученных из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Пушино, Московская область). 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 цервикальной дислокации, их брюшную полость промывали четырьмя миллилитрами охлажденного раствора Хенкса без кальция. Экссудат собирали пипеткой и центрифугировали в течение 5 мин при 600 g. Супернатант декантировали, а осадок разводили в 4 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 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5,5 mM глюкозы, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH 7.4; Sigma, США) до концентрации 1 млн кл/мл.

**Экспонирование суспензии нейтрофилов в постоянном магнитном поле заданной величины.** Нейтрофилы инкубировали при  $37.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$  в концентрации 1 млн/мл по 250 мкл в полипропиленовых пробирках типа Эппендорф. Заданная температура поддерживалась циркуляционным термостатом. Типичное время инкубации составляло 40 мин. Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле с постоянной составляющей ~45 мкТл и уровнем магнитного фона на 50 Гц 15–50 нТл.

В опытах была использована специальная, необходимая для корректного выполнения работ с ослабленным геомагнитным полем и со слабыми МП, исследовательская аппаратура — установка для формирования гипомангнитных условий, которая позволяла получить высокую степень ослабления ГМП — до 10000 раз (остаточное постоянное поле не превышало 10 нТл) и существенно ослабляла переменные техногенные помехи (до единиц нТл). Эта установка состояла из трех вставленных соосно один в другой цилиндрических магнитных экранов из пермаллоя (толщиной 1 мм), закрытых крышками с отверстиями для подводки измерительной и термостабилизирующей аппаратуры (рис. 1). Определение остаточных полей в установке проводили пря-



**Рис. 2.** Влияние постоянного магнитного поля на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов. По оси ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к контролю (средние значения и стандартные отклонения,  $n = 8$ ); по оси абсцисс – номер группы: 1 – контроль, 2 – постоянное МП 0.01 мкТл, 3 – 1.0 мкТл, 4 – 2.5 мкТл, 5 – 5.0 мкТл, 6 – 7.0 мкТл, 7 – 9.0 мкТл, 8 – 15.0 мкТл, 9 – 19.5 мкТл, 10 – 30 мкТл, 11 – 45 мкТл, 12 – 74 мкТл, 13 – 100 мкТл. Звездочкой отмечены достоверные отличия между группами ( $P < 0.05$ ).

мым измерением с помощью феррозондового магнитометра Mag-03 MS 100 (Bartington, Великобритания). Для формирования экспериментального слабого однородного постоянного МП различной интенсивности (1.0, 2.5, 5.0, 7.0, 9.0, 15.0, 19.5, 30, 45, 74, 100 мкТл) внутри этой системы был установлен специальный индуктор (соленоид), подключенный к источнику постоянного тока. Размеры экспериментального участка внутри экранов (диаметр 20 см, длина 40 см) позволили поместить одновременно в зону однородного слабого магнитного поля достаточное для опытов число экспериментальных образцов (не менее 8). Опыты повторяли не менее трех раз.

**Флуоресцентная детекция внутриклеточных АФК.** После 40-минутной инкубации к суспензии нейтрофилов добавляли флуоресцентный зонд на внутриклеточные АФК – 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат ( $H_2DCF-DA$ ) (Sigma, США) до конечной концентрации 0.01 мг/мл. Пробы продолжали инкубировать в течение 30 мин при 37°C в темноте, чтобы минимизировать фотооксидацию красителя. Затем клетки отмывали, центрифугируя при 600 g в течение 5 мин при комнатной температуре в растворе Хенкса. Далее к осадку добавляли 1 мл среды, ресуспендировали и регистрировали спектры флуоресценции образцов на приборе Lumina Fluorescence Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, США), при возбуждении на длине волны 488 нм.

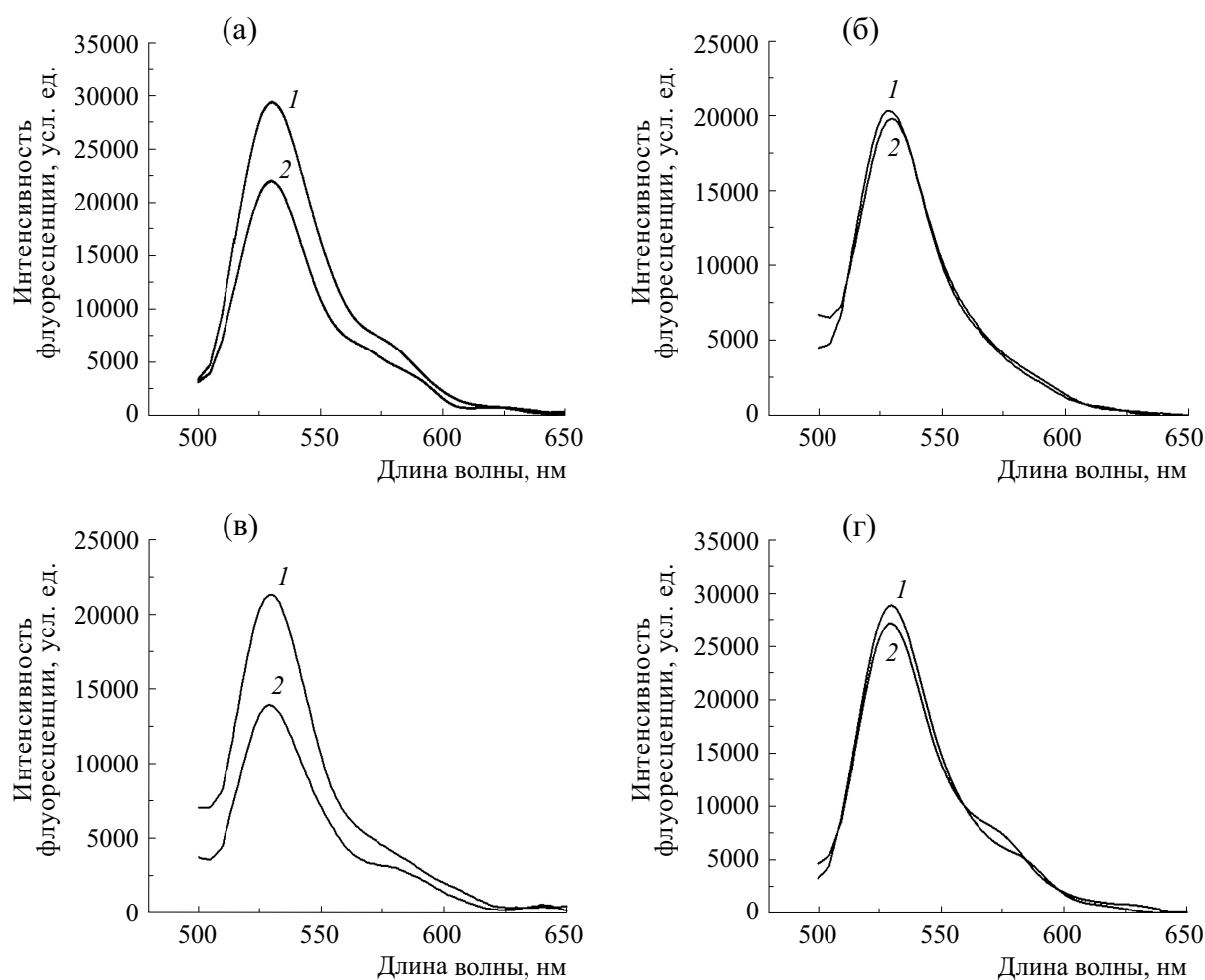
Следует отметить, что нами был применен метод флуоресцентной спектроскопии с использованием хорошо изученного проникающего в

клетки флуоресцентного зонда на АФК – 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата [7–10].  $H_2DCF-DA$  проникает в клетку, где под действием внутриклеточных эстераз переходит в форму  $H_2DCF$ .  $H_2DCF$  – слабо флуоресцирующий агент, который в реакциях с окислителями превращается в сильно флуоресцирующий продукт – дихлорфлуоресцеин.

Результаты статистически обработаны с применением  $t$ -критерия Стьюдента. Часть результатов представлена в процентах, как отношение максимальной интенсивности флуоресценции при длине волны 528 нм в опытах к значению в контроле, принятому за 100%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспонирование перитонеальных нейтрофилов в гипомангнитных условиях (при величине остаточного поля 0.01 мкТл) вызывает значительное (на 25%) уменьшение интенсивности флуоресценции внутриклеточного дихлорфлуоресцеина (рис. 2, 3). При увеличении постоянного МП до 1 мкТл величина этого эффекта ослабленного МП сохраняется (рис. 2). При дальнейшем увеличении поля до 2.5 мкТл эффект действия поля исчезает и снова проявляется при 5 мкТл в редуцированном виде, достигая максимума при 7 мкТл (рис. 2). Любопытно, что при последовательном увеличении индукции МП на следующих трех значениях величины постоянного МП (9.0, 15.0, 19.5 мкТл) отмечается столь же выраженный и устойчивый ингибирующий эффект, степень вы-



**Рис. 3.** Спектры флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в контроле (1) и в опыте (2) после действия некоторых величин постоянного магнитного поля: (а) – 0.01 мкТл, (б) – 2.5 мкТл, (в) – 7.0 мкТл, (г) – 100 мкТл.

раженности которого значительно снижается только при 30 мкТл. В этой связи важно отметить, что величина постоянного поля 30 мкТл приблизительно соответствует нижнему уровню диапазона ГМП (34–68 мкТл). Далее, при величине постоянного МП 45 мкТл, соответствующей локальному значению ГМП в зоне, где были расположены контрольные образцы в наших опытах, значения интенсивности флуоресценции продуктов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина не отличаются от контрольных образцов (рис. 2). При дальнейшем увеличении поля до величин 74 мкТл и 100 мкТл, уже выходящих за верхний уровень диапазона ГМП, не отмечено действия поля на эти процессы. В этом случае показатели флуоресценции продукта окисления  $H_2DCF-DA$  – дихлорфлуоресцеина – уже не отличаются от контрольных (рис. 2).

При анализе результатов важно отметить, что форма спектров и положение максимума интенсивности использованного флуоресценции зонда в «нулевом» магнитном поле, в ослабленном и в усиленном постоянном МП (по отношению к ГМП) не изменялись относительно этих параметров в контроле (рис. 3).

Нам представляется информативной обнаруженная зависимость интенсивности флуоресценции продуктов окисления  $H_2DCF-DA$  в нейтрофилах от величины постоянного магнитного поля в изученном диапазоне его индукции (0.01–100 мкТл), которая свидетельствует о высокой чувствительности этих процессов к изменению магнитных условий. Выявленная анизотропия ответа биологической системы на такое воздействие может дать конкретную информацию для анализа физических механизмов неспецифиче-

ской магниторецепции. В настоящий момент набирает популярность модель неспецифической (не связанной с определенными рецепторами) магниторецепции [11], основанная на анализе прецессии магнитных моментов и молекулярных вращениях в слабом МП, в которой для реалистичных оценок полученные нами данные могли бы быть полезны. Также нельзя исключить из рассмотрения ион-резонансные механизмы действия слабого поля [12]. В этом случае можно предположить, что при различных величинах постоянного магнитного поля система генерации внутренних электрических процессов в клетке или в межклеточной среде будет попадать или нет в резонансные условия [13, 14], что могло бы отразиться на интенсивности процессов внутриклеточного окисления.

С практической точки зрения крайне важным представляется результат отсутствия биологического действия слабого постоянного МП при величине 2.5 мкТл, в то время как при меньших (1 мкТл) и при больших (7 мкТл) значениях поля суспензия нейтрофилов реагирует на воздействие. Это тем более интересно, что ранее на другой экспериментальной модели — делении планарий *Dugesia tigrina* — был получен аналогичный результат (отсутствие действия) при близкой величине постоянного МП — 3 мкТл [15, 16]. Крайне любопытно то, что процессы окисления  $H_2DCF$  в нейтрофилах оказались чувствительны к действию слабого постоянного магнитного поля в широком диапазоне его величин, от 0.01 мкТл вплоть до практически нижней границы ГМП — 30 мкТл (исключая одно значение — 2.5 мкТл). Эти данные, наряду с ранее полученными о том, что слабые комбинированные магнитные поля — постоянное магнитное поле (60 мкТл) и коллинеарное ему переменное низкочастотное магнитное поле на частоте 49.5 Гц (близкой к промышленной частоте 50 Гц) при амплитудах в диапазоне 60–180 нТл — вызывают, при превентивном 40-минутном воздействии, значительное снижение интенсивности респираторного взрыва в суспензии нейтрофилов в ответ на активатор — пептид N-формил-Met-Leu-Phe [17], а также последними данными о сильном влиянии имитаций геомагнитных бурь на биологические объекты [18, 19], указывают на высокую чувствительность биологических процессов к вариациям слабых магнитных полей. Следует отметить, что возможность выявления этих реакций появилась только в последнее время благодаря использованию специальной экранирующей и цифровой техники.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. Zhang, Z. Zhang, W. Mo, et al., *Prot. Cell* **8** (7), 527 (2017).
2. C. F. Martino and P. R. Castello, *PLoS One* **6** (8), e22753 (2011).
3. P. Politanski, E. Rajkowska, M. Brodecki, et al., *Bioelectromagnetics* **34**, 333 (2013).
4. V. N. Binhi and F. S. Prato, *PLoS One* **12** (6), e0179340 (2017).
5. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **63** (3), 484 (2018).
6. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, Э. Р. Валева и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **64** (4), 720 (2019).
7. J. P. Crow, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* **1** (2), 145 (1997).
8. S. L. Hempel, G. R. Buettner, Y. Q. O'Malley, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **27** (1–2), 146 (1999).
9. G. Bartosz, *Clin. Chim. Acta* **368**, 53 (2006).
10. M. Freitas, J. L. Lima, and E. Fernandes, *Anal. Chim. Acta* **649**, 8 (2009).
11. V. N. Binhi and F. S. Prato, *Sci. Rep.* **8**, 13495 (2018).
12. A. R. Liboff, *Electromagn. Biol. Med.* **38** (2), 143 (2019).
13. В. В. Новиков и М. Н. Жадин, *Биофизика* **39** (1), 45 (1994).
14. M. N. Zhadin, V. V. Novikov, F. S. Barnes, and N. F. Pergola, *Bioelectromagnetics* **19**, 41 (1998).
15. В. В. Новиков, И. М. Шейман и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **52** (5), 912 (2007).
16. V. V. Novikov, I. M. Sheiman, and E. E. Fesenko, *Bioelectromagnetics* **29**, 387 (2008).
17. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **65** (1), 97 (2020).
18. И. Л. Голованова, А. А. Филиппов, Ю. В. Чеботарева и др., *Вопросы ихтиологии* **55** (4), 476 (2019).
19. А. В. Романовский, Д. С. Песня, Е. И. Извеков и др., *Биофизика* **59** (6), 1151 (2014).

## The Effect of Weak Static Magnetic Field Ranging from 0.01 $\mu\text{T}$ (a “Zero” Magnetic Field Level) to 100 $\mu\text{T}$ on the Production of Reactive Oxygen Species in Nonactivated Neutrophils

V.V. Novikov, E.V. Yablokova, I.A. Shaev, and E.E. Fesenko

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

It was shown that after 40-min exposition of peritoneal neutrophils to a hypomagnetic field (at 0.01  $\mu\text{T}$ , residual magnetic field) the fluorescence intensity of intracellular dichlorofluorescein significantly decreased (by 25%). The effect of weak magnetic field persists while increasing static magnetic field up to 1  $\mu\text{T}$ . This effect disappears when the level of exposure increases further up to 2.5  $\mu\text{T}$  and appears again in the range of 5  $\mu\text{T}$  in a reduced form achieving a maximum effect at field amplitude of 7  $\mu\text{T}$ . The equally pronounced and inhibitory effect, the magnitude of which significantly decreases only at the amplitude of 30  $\mu\text{T}$ , is observed when the intensity of static magnetic field increases gradually (9.0, 15.0, 19.5  $\mu\text{T}$ ). Then, when static magnetic field is 45  $\mu\text{T}$  in magnitude, the values of the fluorescence intensity of the products of oxidation of 2,7-dichlorodihydrofluorescein do not really differ from a control. No effects of magnetic field in the range of 74  $\mu\text{T}$  and 100  $\mu\text{T}$  on the oxidation processes were observed either.

*Keywords: hypomagnetic field, geomagnetic field, neutrophils, reactive oxygen species, fluorescence*