

СНИЖЕНИЕ ПРОДУКЦИИ СУПЕРОКСИДНОГО АНИОН-РАДИКАЛА В НЕЙТРОФИЛАХ В РЕЗУЛЬТАТЕ ДЕЙСТВИЯ «НУЛЕВОГО» МАГНИТНОГО ПОЛЯ

© 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, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: docmag@mail.ru

Поступила в редакцию 21.04.2020 г.

После доработки 21.04.2020 г.

Принята к публикации 07.05.2020 г.

Предварительная инкубация суспензии нейтрофилов в «нулевом» магнитном поле, создаваемом системой магнитных экранов (остаточное постоянное магнитное поле не более 20 нТл), приводит к существенному снижению интенсивности их люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Добавка в среду для инкубации ингибитора NADPH-оксидазы, дифенилйодония, приводит к снижению интенсивности хемилюминесценции, как в опытных, так и в контрольных образцах (геомагнитное поле). При этом различия между группами, обусловленные действием «нулевого» поля, проявляются, как при меньших концентрациях дифенилйодония (2.5, 5, 10 мкМ), так и при больших его концентрациях (50, 100 мкМ), приблизительно в одинаковой степени. В отличие от этого добавка 2,4-динитрофенола, разобшителя окисления и фосфорилирования в митохондриях, начиная с концентрации 5 мкМ и далее вплоть до 200 мкМ, практически полностью нивелировала различия между контрольными и опытными образцами, которые проявлялись при более низких концентрациях этого ингибитора и в его отсутствие.

Ключевые слова: нейтрофилы, нулевое магнитное поле, супероксидный-анион радикал, хемилюминесценция, люцигенин, NADPH-оксидаза, митохондрии.

DOI: 10.31857/S0006302920040146

В литературе сообщается о снижении продукции активных форм кислорода (АФК) в гипомагнитных условиях в различных типах клеток [1–4]. Ранее нами было показано, что экспонирование перитонеальных нейтрофилов мышей при магнитном экранировании в гипомагнитных условиях вызывает снижение внутриклеточной продукции активных форм кислорода, регистрируемое по изменению интенсивности флуоресценции продуктов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина и дигидрорамина 123 [5–7]. Учитывая то, что этот эффект действия гипомагнитного поля проявлялся в опытах на нейтрофилах без дополнительной их стимуляции химическими активаторами респираторного взрыва и, следовательно, не был обусловлен нарушением ответа нейтрофилов на эти стимулы, нами с целью определения возможных молекулярных механизмов действия «нулевого» поля был проведен комплекс специальных исследований на неактивированных нейтрофилах [6]. Было показано, что сни-

жение интенсивности процессов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина в неактивированных нейтрофилах в гипомагнитных условиях не зависит от кальций-опосредованных регуляторных механизмов, о чем свидетельствует отсутствие действия внутриклеточного хелатора ионов кальция (ацетоксиметилового эфира 1,2-бис(2-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты) на интенсивность этого процесса [6]. Это снижение вряд ли обусловлено влиянием гипомагнитных условий на фосфорилирование компонентов НАДФН-оксидазы, так как добавка ингибитора протеинкиназы С (Ro 31-6233) практически не отразилась на интенсивности флуоресценции внутриклеточного дихлордигидрофлуоресцеина [6]. Добавка ингибитора фосфолипазы С (U73122) немного и приблизительно одинаково снизила продукцию АФК как в контроле, так и в опыте [6]. О возможном участии электронтранспортной цепи митохондрий в механизме этого эффекта «нулевого» поля свидетельствует снижение продукции АФК при добавке ротенона, значительно более выраженное в

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, МП – магнитное поле, САР – супероксидный анион-радикал.

опытных образцах, подвергшихся действию гипомагнитного поля [6].

Все вышеперечисленные результаты были получены методом флуоресцентной спектроскопии при использовании интенсивно реагирующих, но неселективных к определенным формам АФК флуоресцентных зондов (2,7-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата и дигидрородамина 123) [8–10]. В данной работе для оценки радикалпродуцирующей способности нейтрофилов после действия «нулевого» поля мы применили другой метод – метод активированной хемилюминесценции с использованием селективного зонда на супероксид-анион – люцигенина [11, 12]. Также на этой экспериментальной модели с целью определения возможных источников продукции супероксида, реагирующих на действие гипомагнитного поля, мы применили ингибиторный анализ с использованием ингибитора NADPH-оксидазы дифенилйодония [13, 14] и разобщителя окисления и фосфорилирования в митохондриях 2,4 динитрофенола [15, 16].

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 carevisiae*, 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 безкальциевого 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 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.

Экспонирование суспензии нейтрофилов в «нулевом» и слабом постоянном магнитном поле. Нейтрофилы инкубировали при $37.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ в концентрации 1 млн/мл по 0.25 мл в круглодонных кюветах из полистирола (диаметром 1.2 см и дли-

ной 5.5 см), в которых затем измеряли хемилюминесценцию. Типичное время инкубации составляло 40 мин. Заданную температуру поддерживали циркуляционным термостатом.

Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле с постоянной составляющей ~44 мкТл и уровнем магнитного фона на 50 Гц 15–50 нТл при таком же температурном режиме, как и опытные образцы, и одновременно с ними. Опытные образцы помещали в установку для формирования гипомагнитных условий.

В опытах была использована специальная исследовательская установка для формирования гипомагнитных условий, которая позволяла получить высокую степень ослабления геомагнитного поля – до 10000 раз (остаточное постоянное поле не превышало 20 нТл) и существенно ослабляла переменные техногенные помехи (до единиц нТл). Эта установка детально описана нами ранее [7, 17]. Она состоит из трех вставленных соосно один в другой цилиндрических магнитных экранов из пермаллоя (толщиной 1 мм). Определение остаточных полей внутри установки проводили прямым измерением с помощью феррозондового магнитометра Mag-03 MS 100 (Bartington, Великобритания). Для формирования экспериментального слабого однородного постоянного магнитного поля (МП) внутри этой установки был установлен специальный индуктор (соленоид), подключенный к источнику постоянного тока – для формирования слабого постоянного МП различной интенсивности (2.5, 7.0, 44 мкТл), используемого в ряде опытов. Размеры экспериментального участка внутри системы экранов (диаметр участка 20 см, длина – 40 см) позволяли поместить одновременно в зону однородного слабого магнитного поля достаточное для опытов число экспериментальных образцов (не менее шести). Опыты повторяли не менее трех раз.

До начала инкубации к части образцов добавляли по отдельности различные химические добавки: ингибитор NADPH-оксидазы хлорид дифенилйодония (Sigma, США) в различных концентрациях (2.5, 5.0, 10, 20, 50 и 100 мкМ), предварительно растворенный в диметилсульфоксиде (Sigma, США); а также разобщитель окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенол (Sigma, США) в различных концентрациях (1.0, 4.0, 5.0, 10, 20, 200 мкМ и 2 мМ), также предварительно растворенный в диметилсульфоксиде. Отдельно проверяли действие самой добавки диметилсульфоксида в конечной концентрации 1 мМ, соответствующей его присутствию в пробе с содержанием 10 мкМ дифенилйодония или 20 мкМ 2,4-динитрофенола. В ряде опытов эти ингибиторы вносили в пробы не до начала

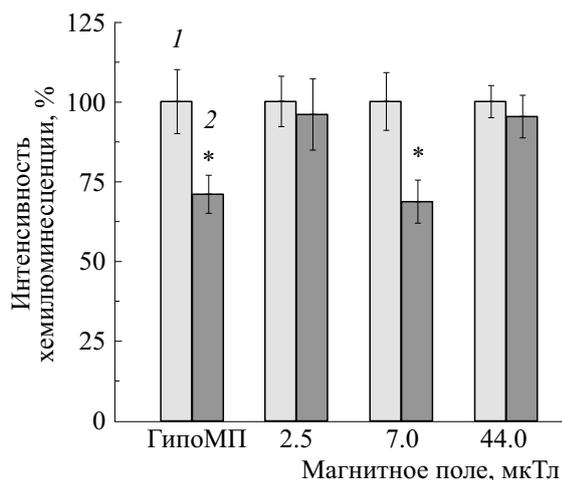


Рис. 1. Влияние постоянного МП на интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов. По оси абсцисс – величина постоянного МП в мкТл, по оси ординат – максимальная интенсивность хемилюминесценции в процентах по отношению к контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 8$). Гипомагнитное поле (ГипоМП) соответствует постоянному МП не более 0.02 мкТл; 1 – контроль, 2 – опыт. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля ($P < 0.05$).

инкубации, а сразу после нее, но до введения люцигенина и регистрации хемилюминесценции.

Регистрация хемилюминесценции. После инкубации суспензии нейтрофилов измеряли интенсивность хемилюминесценции образцов в контрольных и опытных случаях после добавки в них раствора люцигенина (Enzo Life Sciences, США) в

конечной концентрации 0.35 мМ. Для измерений использовали хемилюминометр Lum-1200 (ООО «ДИСофт», Россия). Для анализа данных хемилюминесценции применяли программу PowerGraph. Часть результатов представлена в процентах по отношению к амplitудам хемилюминесцентного ответа в контроле, принятым за 100%. Результаты измерений были статистически обработаны с применением t -критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительная инкубация суспензии нейтрофилов в «нулевом» магнитном поле приводит к существенному снижению интенсивности люцигенин-зависимой хемилюминесценции (приблизительно на 30%) (рис. 1 и 2). При увеличении постоянного поля до 2.5 мкТл этот эффект не проявляется, при 7 мкТл снова возникает и исчезает при 44 мкТл (значение соответствует величине постоянного МП в контроле) (рис. 1). Такой мультипиковый (полиэкстремальный) характер зависимости ответа на слабое постоянное МП отмечался нами и ранее в опытах на нейтрофилах при регистрации продукции АФК методом флуоресценции [7], а также на других биологических объектах [18, 19].

Добавка в среду для инкубации дифенилйодония приводит к снижению интенсивности хемилюминесценции, как в опытных, так и в контрольных образцах (рис. 2 и 3). Эффект действия дифенилйодония приблизительно линейно зависит от его дозы (растет с увеличением концентрации) как в контрольных, так и в опытных случаях (рис. 2). При этом различия между группами, обу-

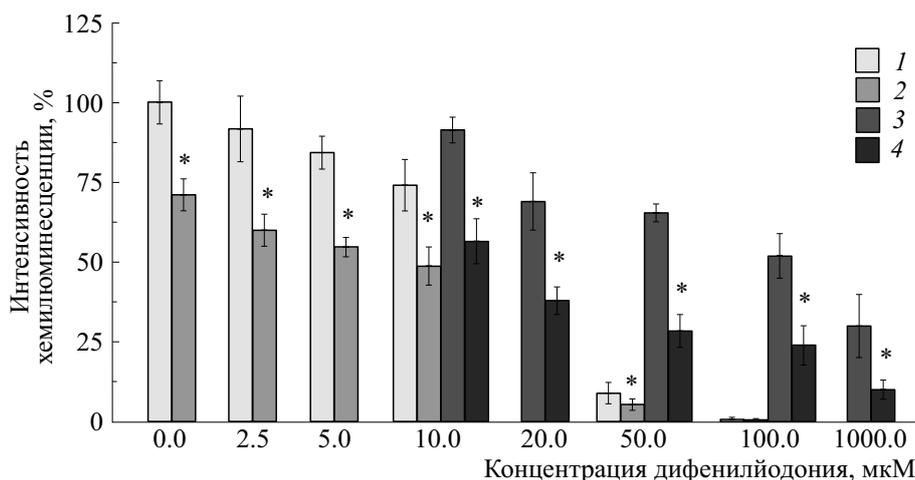


Рис. 2. Влияние дифенилйодония на интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов после действия «нулевого» МП. По оси абсцисс – концентрация дифенилйодония в мкМ, по оси ординат – максимальная интенсивность хемилюминесценции в процентах по отношению к контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 6$). 1 – Контроль, добавка дифенилйодония перед инкубацией; 2 – опыт, добавка дифенилйодония перед инкубацией; 3 – контроль, добавка дифенилйодония после инкубацией; 4 – опыт, добавка дифенилйодония после инкубацией. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля ($P < 0.05$).

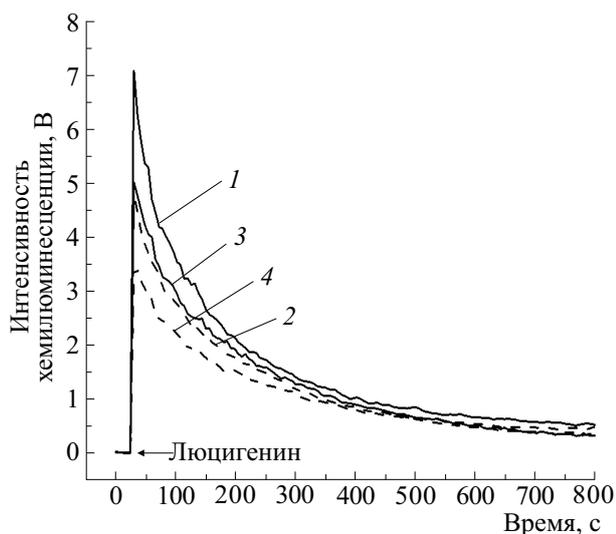


Рис. 3. Кинетика хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на люцигенин после действия «нулевого» МП в отсутствие, а также в присутствии дифенилпикрильгидразила: 1 – контроль; 2 – опыт; 3 – контроль, предварительная добавка 10 мкМ дифенилпикрильгидразила; 4 – опыт, предварительная добавка 10 мкМ дифенилпикрильгидразила.

словленные действием «нулевого» поля, проявляются как на меньших концентрациях дифенилпикрильгидразила (2,5, 5,0, 10 мкМ), так и на больших (50 и 100 мкМ), приблизительно в одинаковой степени. Отсутствие значительного действия диметилсульфоксида (различия между пробами с его добавкой в концентрации 1 мМ и соответствующими контрольными образцами не превышают 5%),

применяемого в качестве растворителя при приготовлении растворов дифенилпикрильгидразила, позволяет связать обнаруженные эффекты с действием именно этого ингибитора.

При добавке дифенилпикрильгидразила минуя стадию инкубации, непосредственно перед измерением хемилюминесценции, характер его влияния на контрольные и опытные образцы сохраняется, но степень выраженности действия в зависимости от дозы снижается (рис. 2).

Качественно иной результат получен нами в опытах с разбавителем окисления и фосфорилирования – 2,4-динитрофенолом. Так, добавка этого ингибитора, начиная с концентрации 5 мкМ и далее, вплоть до 200 мкМ, практически полностью нивелировала различия между контрольными и опытными образцами (рис. 4 и 5). При этом интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов в контроле снижалась пропорционально концентрации 2,4-динитрофенола. На основании этих данных можно сделать вывод о том, что динитрофенол в определенных концентрациях способен полностью отменить эффект действия «нулевого» МП. По-видимому, наиболее вероятной причиной этого эффекта динитрофенола может являться некоторая «идентичность» механизма его действия с эффектом «нулевого» поля. Действительно, в этом случае, конкурируя за субстраты, химический агент мог бы подавить эффект физического фактора. Альтернативной гипотезой для объяснения этого действия динитрофенола является предположение о том, что для реализации эффекта «нулевого» магнитного поля необходимо сопряжение окисления и фосфорилирования

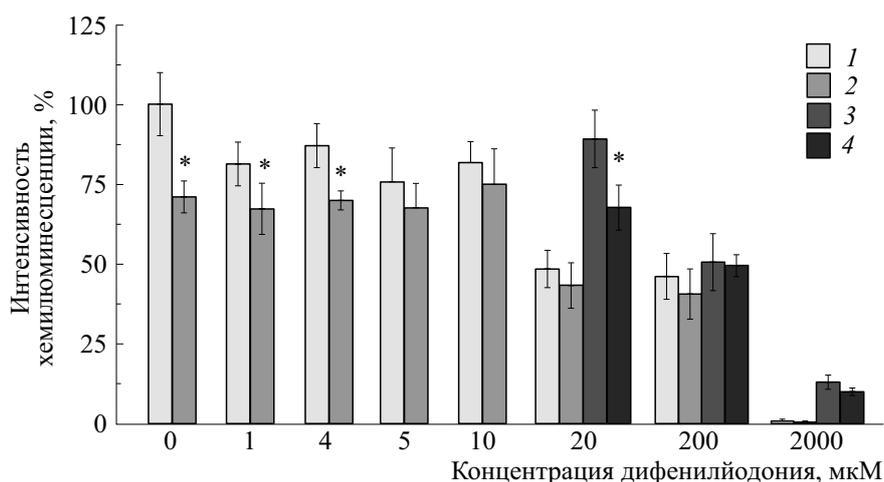


Рис. 4. Влияние динитрофенола на интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов после действия «нулевого» МП. По оси абсцисс – концентрация динитрофенола в мкМ; по оси ординат – максимальная интенсивность хемилюминесценции в процентах по отношению к контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 6$). 1 – Контроль, добавка динитрофенола перед инкубацией; 2 – опыт, добавка динитрофенола перед инкубацией; 3 – контроль, добавка динитрофенола после инкубации; 4 – опыт, добавка динитрофенола после инкубации. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля ($P < 0.05$).

в митохондриях нейтрофилов, т. е. необходим определенный уровень продукции АТФ. Однако опыты с добавкой динитрофенола не вначале, а после инкубации в «нулевом» поле, показавшие, что и в этом случае результат его действия также проявляется и качественно не меняется (рис. 4), скорее свидетельствуют в пользу первого предположения.

Известно, что механизм действия динитрофенола, который является хорошо охарактеризованным разобщителем митохондриального дыхания, связан с его способностью рассеивать протонный градиент, возникающий благодаря транспорту электронов [15, 16]. Рассеивание этого протонного градиента на внутренней митохондриальной мембране позволяет дыханию продолжаться, но при этом прекращается синтез АТФ, который обычно черпает энергию в этом протонном градиенте. Это разобщение нарушает мембранный потенциал внутренней митохондриальной мембраны [15].

Ранее было принято считать, что зрелые нейтрофилы имеют мало функциональных митохондрий, если таковые вообще имеются [20]. Это предположение было основано на том факте, что электронная микроскопия в фиксированных клетках обычно не может идентифицировать интактные митохондрии, а те, которые видны, являются небольшими, с плохо выраженными кристами и внутренней митохондриальной мембраной [20]. Кроме того, установлено, что нейтрофилы для производства энергии используют главным образом гликолиз [21], а интенсивность митохондриального дыхания очень низкая. Этот O_2 -независимый механизм производства энергии полезен тем, что позволяет нейтрофилам функционировать в очагах воспаления или в местах проникновения инфекции, где парциальное давление O_2 может быть очень низким [22]. При фагоцитозе нейтрофилы используют большие количества молекулярного O_2 не для митохондриального дыхания, а скорее для генерации супероксидного аниона и других АФК посредством дыхательного взрыва, катализируемого NADPH-оксидазой [23]. Из этих морфологических и биохимических особенностей как бы следовало, что нейтрофилы не имеют функционально активных митохондрий и не нуждаются в них.

Однако в настоящее время появляются доказательства того, что функциональные митохондрии могут играть важную роль в контроле апоптоза нейтрофилов [24]. Было показано, с использованием флуоресцентных индикаторов митохондриальной функции в живых клетках, что нейтрофилы обладают развитой митохондриальной сетью [25]. Мембранный потенциал этих митохондрий может быть нарушен химическими разобщителями транспорта электронов. Было показано, что митохондрии нейтрофилов не участвуют в быст-

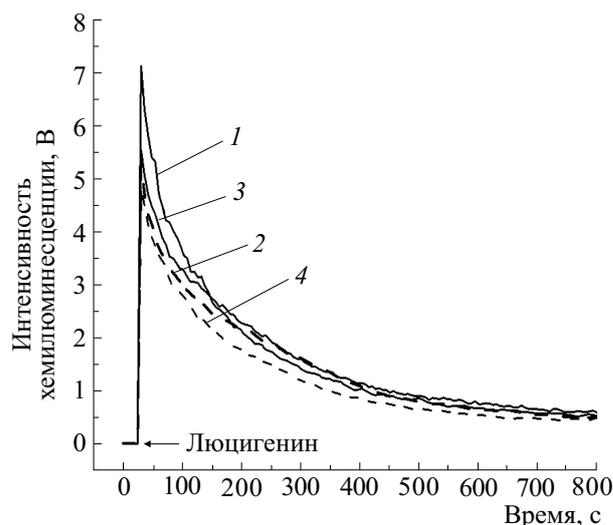


Рис. 5. Кинетика хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на люцигенин после действия «нулевого» МП в присутствии динитрофенола: 1 — контроль; 2 — опыт; 3 — контроль, предварительная добавка 10 мкМ динитрофенола; 4 — опыт, предварительная добавка 10 мкМ динитрофенола.

ром инициировании респираторного взрыва или фагоцитоза, но интенсивность этих процессов снижается у нейтрофилов, предварительно обработанных ингибиторами митохондрий [25]. Все эти данные, наряду с полученными нами экспериментальными результатами, указывают на возможность исследования митохондрий нейтрофилов в качестве потенциальных мишеней действия «нулевого» поля.

В нейтрофилах имеется несколько основных систем, в которых свободные радикалы образуются в качестве основного или побочного продукта. Прежде всего это NADPH-оксидазы, мембранные ферменты, продуцирующие супероксидный анион-радикал (САР) по реакции одноэлектронного восстановления [26]. Кроме того, важной системой продукции САР могут являться митохондрии. Известно, что на их внутренней мембране утечка САР происходит в одиннадцати местах, главным образом, в комплексах I, II, III, причем САР продуцируется как в матрикс, так и в межмембранное пространство [27].

Люцигенин считается селективным зондом на САР [11], поэтому его активно используют для изучения продукции АФК как NADPH-оксидазой, так и митохондриями [12]. Характер ингибирующего эффекта дифенилйодония (неспецифический ингибитор NADPH-оксидазы), обнаруженный нами в настоящей работе на нейтрофилах, подвергшихся действию «нулевого» поля, делает сомнительным предположение о том, что NADPH-оксидаза является основным источником САР, реагирующим на действие гипомангнитных условий.

Напротив, опыты с динитрофенолом, разобшителем окислительного фосфорилирования, показавшие практически полную отмену эффекта действия «нулевого» магнитного поля в его присутствии, делают обоснованным предположение о том, что именно митохондрии, как продуценты САР, являются основной мишенью действия этого физического фактора. Разумеется, эта гипотеза требует дальнейшего изучения.

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. Politsanski, 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. Валеева и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **64** (4), 720 (2019).
7. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, И.А. Шаев и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **65** (3), 524 (2020).
8. J. P. Crow, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* **1** (2), 145 (1997).
9. S. L. Hempel, G. R. Buettner, Y. Q. O'Malley, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **27** (1–2), 146 (1999).
10. G. Bartosz, *Clin. Chim. Acta* **368**, 53 (2006).
11. T. B. Aasen, B. Bolann, J. Glette, et al., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **47**, 673 (1987).
12. А. А. Джатдоева, Е. В. Проскурнина, А. М. Нестерова и др., *Биол. мембраны* **34** (6), 116 (2017).
13. A. R. Cross and O. T. Jones, *Biochem. J.* **237**, 111 (1986).
14. Y. Li and M. A. Trush, *Biochim. Biophys. Acta* **253**, 295 (1998).
15. S. Matsuyama, J. L. Lopis, Q. L. Deveraux, et al., *Nat. Cell. Biol.* **2**, 318 (2000).
16. M. M. El-Guindy, A. C. Neder, and C. B. Gomes, *Cell Mol Biol.* 1981, 27(5):399–402.
17. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **65** (1), 97 (2020).
18. В. В. Новиков, И. М. Шейман и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **52** (5), 912 (2007).
19. V. V. Novikov, I. M. Sheiman, and E. E. Fesenko, *Bioelectromagnetics* **29**, 387 (2008).
20. S. W. Edwards, *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil* (Cambridge University Press, N.-Y., 1994).
21. M. L. Karnovsky, *Semin. Hematol.* **5**, 156 (1968).
22. S. W. Edwards, M. B. Hallett, and A. K. Campbell, *Biochem. J.* **217**, 851 (1984).
23. A. W. Segal and A. Abo, *Trends Biochem. Sci.* **18**, 43 (1993).
24. J. G. Pryde, A. Walker, A. G. Rossi, et al., *J. Biol. Chem.* **275**, 33574 (2000).
25. G. Fossati, D. A. Moulding, D. G. Spiller, et al., *J. Immunol.* **170**, 1964 (2003).
26. A. Panday, M. K. Sahoo, D. Osorio, and S. Batra, *Cell Mol. Immunol.*, **12**, 5 (2015).
27. V. Kozjak-Pavlovic, *Cell Tissue Res.* **367** (1), 83 (2017).

Attenuation in Superoxide Anion Radical Production in Neutrophils after Exposure to Near Null Magnetic Field

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

Preincubation of neutrophil suspension when exposed to near null magnetic field created by a system of magnetic shields (the residual static magnetic field not greater than 20 nT) is associated with a significant decrease in the intensity of lucigenin-dependent chemiluminescence of neutrophils. Addition of the NADPH-oxidase inhibitor diphenyliodonium to the incubation medium caused attenuation in the chemiluminescence activity both in the exposed and control samples (geomagnetic field). Differences induced by near null magnetic field were observed almost to the same extent between exposed and control samples at both lower (2.5, 5, 10 μM), and higher (50, 100 μM) concentrations of diphenyliodonium. In contrast, the presence of 2,4-dinitrophenol, the uncoupler of oxidative phosphorylation in mitochondria, at concentrations of 5 μM up to 200 μM virtually completely blunted differences which were observed between exposed and control samples at lower concentrations of this inhibitor or in the absence of it.

Keywords: neutrophils, near null magnetic field, superoxide anion radical, chemiluminescence, lucigenin, NADPH-oxidase, mitochondria