

К ВОПРОСУ О МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ «НУЛЕВОГО» МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В НЕАКТИВИРОВАННЫХ НЕЙТРОФИЛАХ

© 2019 г. В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, Э.Р. Валеева, 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 17.03.2019 г.

После доработки 15.04.2019 г.

Принята к публикации 24.04.2019 г.

Показано, что обнаруженное нами ранее снижение интенсивности процессов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина в неактивированных нейтрофилах в гипомагнитных условиях (остаточное постоянное магнитное поле 20 нТл) 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. 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. Добавка ингибитора фосфолипазы С (U73122) незначительно и приблизительно одинаково снизила продукцию активных форм кислорода как в контроле, так и в опыте. Апоцинин в разных концентрациях вызывал рост продукции активных форм кислорода в неактивированных нейтрофилах, приблизительно в два раза менее выраженный в гипомагнитных условиях. Об участии электрон-транспортной цепи митохондрий в механизме эффекта «нулевого» поля свидетельствует снижение продукции активных форм кислорода при добавке ротенона, значительно более выраженное в опытных образцах.

Ключевые слова: гипомагнитное поле, нейтрофилы, активные формы кислорода, флуоресценция, ионы кальция, протеинкиназа С, фосфолипаза С, митохондрии.

DOI: 10.1134/S0006302919040100

В литературе имеется ряд сообщений о снижении продукции активных форм кислорода (АФК) в гипомагнитных условиях в различных типах клеток и при различной экспозиции [1–4]. Ранее нами было показано, что 1,5-часовое экспонирование перитонеальных нейтрофилов мышей при магнитном экранировании в гипомагнитных 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]. 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 гипомагнитного поля сохранялся [5]. Учитывая то, что эффект действия гипомагнитного поля проявлялся в опытах на нейтрофилах без дополнительной их стимуляции и, следовательно, был обусловлен не нарушением ответа нейтрофилов на активаторы респираторного взрыва, нами, с целью определения возможных молекулярных механизмов этого действия «нулевого» поля, проведен комплекс специальных исследований на неактивированных нейтрофилах. Напротив, в условиях воздействия комбинированных магнитных полей с определенными параметрами [6,7] отмечено стимулирующее действие этих магнитных полей на продукцию АФК в суспензии нейтрофилов [8]. В этой связи особый интерес представляет сравнение ключевых моментов молекулярных механизмов действия комбинированных магнитных полей [9–12] и «нулевого» магнитного поля.

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, H2DCF-DA – 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина диацетат, ВАРТА АМ – ацетоксиметиловый эфир 1,2-бис(2-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты.

На данном этапе для анализа эффектов гипомангнитных условий мы применили метод флуоресцентной спектроскопии с использованием хорошо изученного проникающего в клетки флуоресцентного зонда на АФК — 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата (H2DCF-DA) [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.

Основными источниками АФК в неактивированных нейтрофилах могут являться ферментный комплекс оксидазы фагоцитов, содержащей NOX2, а также единичные митохондрии [17–19]. Сборка и активность НАДФН-оксидазы напрямую зависят, прежде всего, от активностей фосфолипазы С и протеинкиназы С, и часто сопряжены с кальций-опосредованными регуляторными механизмами [20]. В этой связи в работе для анализа молекулярного механизма действия гипомангнитных условий на продукцию АФК в неактивированных нейтрофилах были использованы соответствующие химические ингибиторы.

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 ульнарной 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 1 час 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 ± 0,2°C в концентрации 1 млн/мл по 250 мкл

в полипропиленовых пробирках типа Эппендорф при световой депривации. Заданную температуру поддерживали с помощью циркуляционного термостата. Типичное время инкубации составляло полтора часа. Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле с постоянной составляющей ~42 мкТл и уровнем магнитного фона на частоте 50 Гц 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). Величина остаточного постоянного магнитного поля не превышала 20 нТл. Ее определяли прямым измерением с помощью феррозондового датчика Mag-03 MS 100 (Bartington, Великобритания). Контрольные (геомагнитное поле) и опытные (гипомагнитные условия) образцы по десять штук инкубировали одновременно. Опыты повторяли не менее трех раз.

До начала инкубации к части образцов добавляли по отдельности различные химические добавки: хелатор внутриклеточного кальция — ВАРТА АМ (ацетоксиметилловый эфир 1,2-бис(2-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты) (Sigma, США) в концентрациях 2 или 4 мкМ; ингибитор электрон-транспортной цепи митохондрий — ротенон (Sigma, США) в концентрации 1 мкМ; ингибитор НАДФН-оксидазы — апоцинин в концентрациях 20 и 500 мкМ; ингибитор фосфолипазы С — U73122 (Sigma, США) в концентрации 2 мкМ и ингибитор протеинкиназы С — бисиндолилмалеимид IV (Ro 31-6233) (Sigma, США) в концентрации 1 мкМ.

Флуоресцентное определение внутриклеточных АФК. После 1,5-часовой инкубации в гипомангнитных условиях к суспензии нейтрофилов добавляли флуоресцентный зонд на внутриклеточные АФК — 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (H2DCF-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 10 мин 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 как отношение максимальной интенсивности флуоресценции при длине волны 528 нм в опытах к контролю, принятому за 100%.

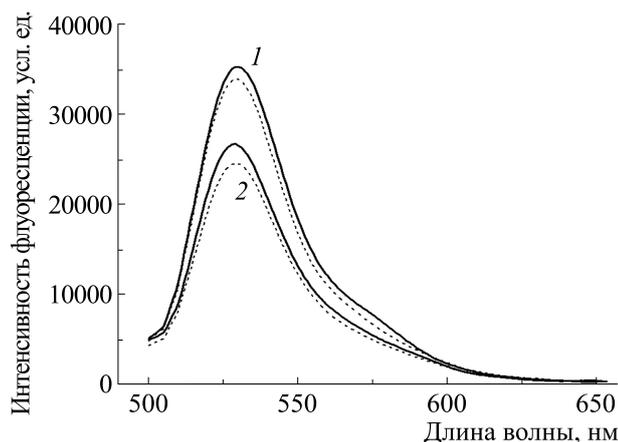


Рис. 1. Спектры флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в контроле (кривая 1) и в опыте (кривая 2) - после действия гипомангнитного поля. Пунктирными линиями обозначены стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспонирование перитонеальных нейтрофилов в гипомангнитных условиях (при ослаблении геомагнитного поля примерно в 2000 раз) вызывает значительное (на 25%) уменьшение интенсивности флуоресценции внутриклеточного дихлорфлуоресцеина (рис. 1 и 2). Следует отметить, что форма спектров и положение максимума интенсивности флуоресценции зонда в «нулевом» магнитном поле не изменялись относительно этих параметров в контроле. Также они не изме-

нялись при использовании химических добавок, примененных в дальнейших экспериментах.

Добавка в среду для инкубации нейтрофилов хелатора внутриклеточного кальция ВАРТА АМ в концентрациях 2 и 4 мкМ практически не отразилась на продукции внутриклеточных АФК в нейтрофилах, как в контроле, так и в опыте (гипомангнитные условия) (рис. 2). Это, по-видимому, свидетельствует о независимости эффекта «нулевого» магнитного поля от уровня внутриклеточного кальция и в целом от кальций-зави-

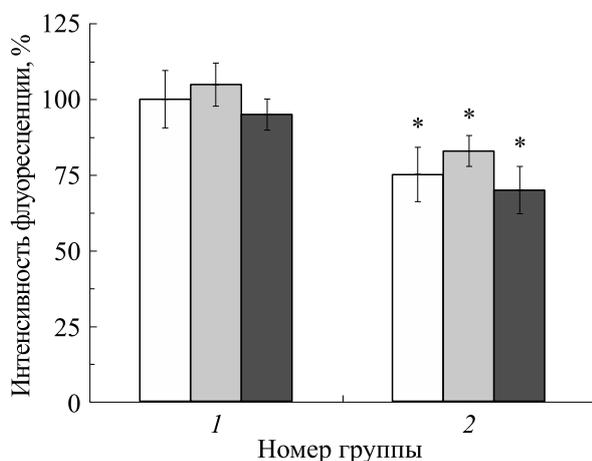


Рис. 2. Влияние гипомангнитного поля на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в отсутствие и в присутствии хелатора внутриклеточного кальция – ВАРТА АМ. По оси ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$), по оси абсцисс – номер группы (1 – контроль, 2 – опыт). Белый столбик – без добавок, серый столбик – добавка 2 мкМ ВАРТА АМ, темный столбик – добавка 4 мкМ ВАРТА АМ. Звездочкой отмечены достоверные отличия между группами ($P < 0,05$).

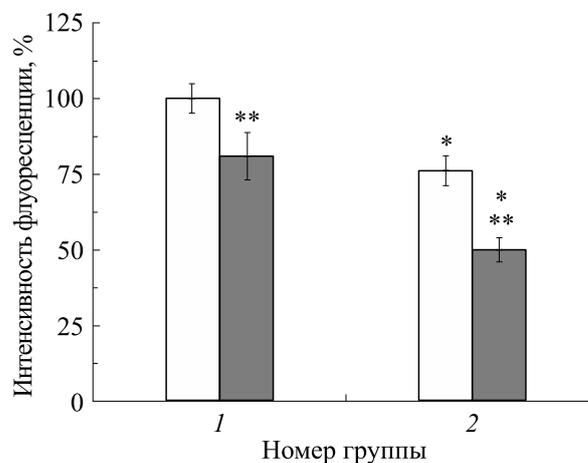


Рис. 3. Влияние гипомангнитного поля на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в отсутствие и в присутствии ротенона. По оси ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$), по оси абсцисс – номер группы (1 – контроль, 2 – опыт). Белый столбик – без добавок, серый столбик – добавка 1 мкМ ротенона. Звездочкой отмечены достоверные отличия между группами ($P < 0,05$), двумя звездочками – достоверные отличия внутри группы ($P < 0,05$).

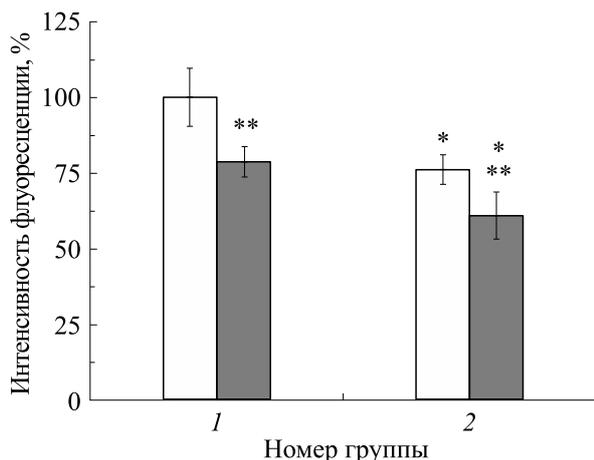


Рис. 4. Влияние гипомангнитного поля на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в отсутствие и в присутствии ингибитора фосфолипазы С – U73122. По оси ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$), по оси абсцисс – номер группы (1 – контроль, 2 – опыт). Белый столбик – без добавок, серый столбик – добавка 2 мкМ U73122. Звездочкой отмечены достоверные отличия между группами ($P < 0,05$), двумя звездочками – достоверные отличия внутри группы ($P < 0,05$).

симых механизмов. Что резко отличает этот эффект от эффекта комбинированных магнитных полей на этом же объекте (нейтрофилах), при котором, напротив, уже низкие концентрации ВАРТА АМ полностью его блокируют [9].

Добавка ротенона – ингибитора электрон-транспортной цепи митохондрий – в концентрации 1 мкМ снизила продукцию внутриклеточных АФК на 20% в контроле и значительно сильнее в

опыте (на 35%) (рис. 3). Это свидетельствует об участии митохондрий в исследуемом эффекте гипомангнитного поля и подтверждает их роль как одного из основных продуцентов АФК в неактивированных нейтрофилах [17,18]. В этой связи следует отметить, что эффект комбинированных магнитных полей был независим от введения данного ингибитора в среду культивирования нейтрофилов [12].

Добавка ингибитора фосфолипазы С U73122 снизила приблизительно одинаково (на ~20%) продукцию АФК как в контроле, так и в опыте (рис. 4), тогда как добавка ингибитора протеинкиназы С Ro 31-6233 практически не отразилась на интенсивности флуоресценции внутриклеточного дихлорфлуоресцеина (рис. 5). Эти данные коррелируют с показанной здесь ранее независимостью этого эффекта «нулевого» поля от кальций-опосредованных регуляторных механизмов и в целом не подтверждают участия процессов фосфорилирования компонентов НАДФН-оксидазы в механизмах этого эффекта.

Добавка специфического ингибитора НАДФН-оксидазы апоцинина в разных концентрациях привела к «парадоксальному» росту продукции АФК в неактивированных нейтрофилах, пропорциональному концентрации этого ингибитора, и приблизительно в два раза более выраженному в контрольных случаях (рис. 6). Этот результат можно объяснить, исходя из известного факта, что для проявления ингибирующей НАДФН-оксидазу активности апоцинина необходима его димеризация, которая происходит в присутствии пероксидаз и перекиси водорода [21,22], например, в активированных нейтрофилах. В неактивированных клетках апоцинин может стимулировать продукцию АФК за счет его

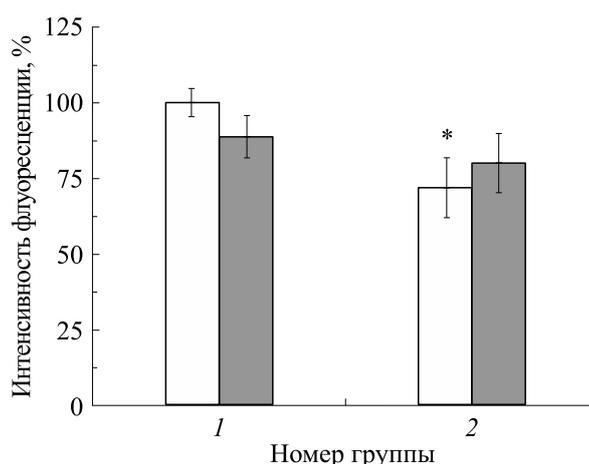


Рис. 5. Влияние гипомангнитного поля на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в отсутствие и в присутствии ингибитора протеинкиназы С – Ro 31-6233. По оси ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$), по оси абсцисс – номер группы (1 – контроль, 2 – опыт). Белый столбик – без добавок, серый столбик – добавка 1 мкМ Ro 31-6233. Звездочкой отмечены достоверные отличия между группами ($P < 0,05$).

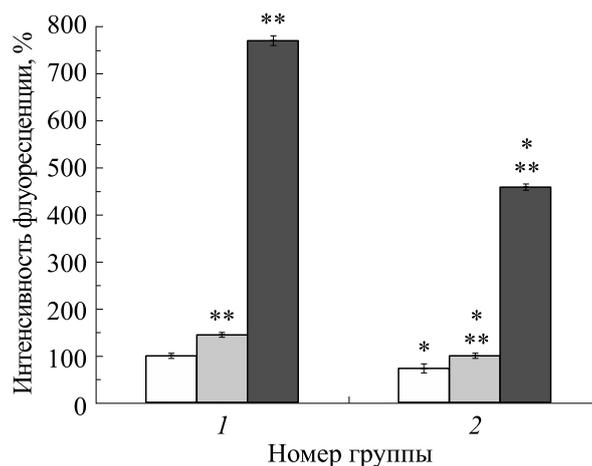


Рис. 6. Влияние гипомангнитного поля на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в отсутствие и в присутствии апоцинина. По оси ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$), по оси абсцисс – номер группы (1 – контроль, 2 – опыт). Белый столбик – без добавок, серый столбик – добавка 20 мкМ апоцинина, темный столбик – добавка 500 мкМ апоцинина. Звездочкой отмечены достоверные отличия между группами ($P < 0,05$), двумя звездочками – достоверные отличия внутри группы ($P < 0,05$).

предшествующего окисления, приводящего к образованию переходных свободных радикалов [23]. В нашем случае важно отметить, что интенсивность этого процесса в опыте (после пребывания в гипомангнитных условиях) значительно снижается.

В целом приведенные данные свидетельствуют о снижении интенсивности процессов окисления использованного флуоресцентного зонда (H2DCF) в нейтрофилах в гипомангнитных условиях, участии митохондрий и их электрон-транспортной системы в этом эффекте «нулевого» поля, возможном снижении интенсивности процессов окисления и других веществ (например, апоцинина), не зависимости эффекта «нулевого поля» от кальций-зависимых регуляторных механизмов, что позволяет предположить его метаболическую основу. Все это резко отличает эффект «нулевого» поля от эффектов комбинированных магнитных полей, с определенными параметрами [6,7], в основе которых обнаруживается влияние на регуляторные кальций-зависимые механизмы [9], контролирующие респираторный взрыв в нейтрофилах.

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. V. V Novikov., G. V. Novikov, and E. E. Fesenko, *Bioelectromagnetics* **30**, 343 (2009).
7. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **60** (3), 530 (2015).
8. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **61** (6), 1159 (2016).
9. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **62** (3), 547 (2017).
10. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, Г. В. Новиков и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **62** (5), 926 (2017).
11. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **63** (2), 277 (2018).
12. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, Н. И. Новикова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **64** (2), 290 (2019).
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. G. Fossati, D. A. Moulding, D. G. Spiller, et al., *J. Immunol.* **170**, 1964 (2003).
18. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурина, *Успехи биол. химии* **49**, 341 (2009).
19. Н. В. Воробьева, *Иммунология* **34** (4), 227 (2013).
20. А. Н. Маянский, *Цитокины и воспаление* **6** (3), 3 (2007).
21. J. Stolk, T. J. Hiltermann, J. H. Dijkman, and A. J. Verhoeven, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **11** (1), 95 (1994).
22. M. Vejrazka, R. Míček, and S. Stípek, *Biochim. Biophys. Acta* **1722** (2), 143 (2005).
23. L. R. Castor, K. A. Locatelli, and V. F. Ximenes, *Free Radic. Biol. Med.* **48** (12), 1636 (2010).

On Molecular Mechanisms of the Effect of a “Zero” Magnetic Field on the Production of Reactive Oxygen Species in Inactivated Neutrophils

V.V. Novikov, E.V. Yablokova, E.R. Valeeva, and E.E. Fesenko

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

It has been shown that the decrease in intensity of 2,7-dichlorodihydrofluorescein oxidation processes in inactivated neutrophils under hypomagnetic field exposure (the residual static magnetic field of 20 nT) is not related to the calcium-mediated mechanisms as evidenced by the absence of the effect of cell-permeant Ca^{2+} chelators such as 1,2-bis-(2-amino-phenoxy)ethane- N,N,N',N' -tetraacetic acid acetoxymethyl ester on the intensity of the process alluded. This decrease is hardly caused by effects of exposure to hypomagnetic field on phosphorylation of NADPH-oxidase components because addition of a protein kinase C inhibitor, Ro 31-6233, did not virtually decrease the fluorescence intensity of intracellular dichlorodihydrofluorescein. Addition of a phospholipase C inhibitor, U73122, led to a negligible decrease in ROS production in control (almost same extent as in the experiment). In the presence of apocynin at different concentrations ROS production in inactivated neutrophils increased and it was 2 times lower under hypomagnetic field conditions. A decrease in ROS production which was more apparent during the experiment after addition of rotenone is indicative of the fact that the mitochondrial electron-transport chain is involved in the mechanism of the effect of a “zero” magnetic field.

Keywords: hypomagnetic field, neutrophils, reactive oxygen species, fluorescence, calcium ions, protein kinase C, phospholipase C, mitochondria