

КИНЕТИКА ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НЕЙТРОФИЛАМИ ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ В ГИПОМАГНИТНОМ ПОЛЕ

© 2021 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 15.02.2021 г.

После доработки 26.02.2021 г.

Принята к публикации 27.02.2021 г.

Показано, что 30-минутная инкубация суспензии нейтрофилов в «нулевом» магнитном поле, создаваемом системой магнитных экранов из пермаллоя (остаточное постоянное магнитное поле не превышает 20 нТл), приводит к существенному снижению (на 48%) интенсивности ее люцигенин-зависимой хемилюминесценции, определенной сразу после окончания воздействия гипомангнитных условий. Через 20 мин после пребывания в гипомангнитных условиях (при последующей 20-минутной инкубации нейтрофилов в геомагнитном поле) степень проявления различий между контрольными и опытными образцами полностью сохраняется. При увеличении длительности последующей после пребывания в «нулевом» магнитном поле инкубации экспериментальных образцов в геомагнитном поле (постоянное поле 44 мкТл) до 40 и 60 мин различия между ними и соответствующими контрольными группами образцов уменьшаются до 32 и 22%.

Ключевые слова: гипомангнитное поле, геомагнитное поле, нейтрофилы, активные формы кислорода, люцигенин, хемилюминесценция.

DOI: 10.31857/S0006302921030121

Свободные радикалы и другие активные формы кислорода (АФК) могут представлять собой потенциальные молекулы для модуляции биологических функций в ответ на действие «нулевого» магнитного поля [1]. В литературе сообщается о снижении продукции АФК в гипомангнитных условиях в различных типах клеток [2–5]. Ранее нами было показано, что экспонирование перитонеальных нейтрофилов мышей при магнитном экранировании в гипомангнитных условиях вызывает снижение внутриклеточной продукции АФК, регистрируемое по изменению интенсивности флуоресценции продуктов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина и дигидрородамина 123 [6–8]. Этот эффект гипомангнитного поля проявлялся в опытах на нейтрофилах без дополнительной их стимуляции химическими активаторами респираторного взрыва и, следовательно, не обусловлен нарушением ответа нейтрофилов на эти стимулы [6, 7]. Для оценки радикалпродуцирующей способности нейтрофилов после действия «нулевого» поля мы применили и другой метод — метод активированной хемилюминес-

ценции с использованием люцигенина, селективного зонда на супероксид-анион [9, 10], с помощью которого было показано существенное снижение интенсивности их люцигенин-зависимой хемилюминесценции в этих условиях [11].

При анализе эффектов гипомангнитных условий на продукцию АФК биологическими объектами одним из важных и практически неизученных вопросов остается экспериментальная оценка продолжительности последствий этих условий, т. е. определение временного периода, в котором проявляются остаточные эффекты «нулевого» магнитного поля (МП) после прекращения его прямого действия. Для изучения временной динамики продукции АФК в данной работе мы применили уже хорошо зарекомендовавший себя в предыдущих исследованиях по этой теме метод люцигенин-зависимой хемилюминесценции [11], позволяющий в течение относительно короткого времени (несколько минут) оценить изменение скорости продукции АФК [9–11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение суспензии нейтрофилов. Работа выполнена на перитонеальных нейтрофилах мы-

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

шей. 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 не менее чем на 1 ч при 4°C (но не более чем на 3 ч, так как более длительное хранение в этом случае снижало хемилюминесцентный ответ нейтрофилов на последующую добавку люцигенина). Эта процедура позволяла снизить спонтанную хемилюминесценцию нейтрофилов и перевести эти клетки в «одинаковое» состояние, характеризующееся их равномерным хемилюминесцентным ответом, что обеспечивало возможность работы с ними в течение экспериментального дня. 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 средой Хенкса (окончательный состав среды: 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 геомагнитном поле. Нейтрофилы инкубировали при $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ в концентрации 1 млн кл/мл по 0.25 мл в круглодонных кюветах из полистирола (диаметр — 1.2 см, длина — 5.5 см), в которых затем измеряли хемилюминесценцию. Заданную температуру поддерживали с помощью циркуляционного водного термостата.

Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле (ГМП) с постоянной составляющей ~ 44 мкТл и уровнем магнитного фона на 50 Гц в 15–50 нТл при таком же температурном режиме, как и опытные образцы, и одновременно с ними (также одновременно проводили последующую регистрацию хемилюминесценции контрольных и экспериментальных образцов в опытах с одинаковой продолжительностью их инкубации). Опытные образцы помещали в установку для формирования гипомагнитных условий на 30 мин, затем в образцах регистрировали люцигенин-зависимую хемилюминесценцию

(сразу после окончания инкубации в «нулевом» МП — опыты с временем последствия «0» мин). Другие опытные группы образцов сразу после окончания действия «нулевого» поля переносили в условия инкубации в геомагнитном поле на 20, 40 и 60 мин с последующей регистрацией хемилюминесценции после окончания инкубации. Каждой экспериментальной группе образцов соответствовала своя контрольная группа, инкубируемая одновременно с опытной, но только в условиях ГМП.

В опытах была использована специальная исследовательская аппаратура — установка для формирования гипомагнитных условий, которая позволяла получить высокую степень ослабления ГМП — 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 [8, 12]. Установка состояла 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). Размеры экспериментального участка внутри системы экранов (диаметр — 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.

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. В работе был использован 12-канальный хемилюминометр Lum-1200 (ООО «ДИСофт», Россия). Для анализа данных хемилюминесценции применяли программу «PowerGraph». Часть результатов представлена в процентах по отношению к амплитудам хемилюминесцентного ответа в контроле, принятым за 100%.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

30-минутная инкубация суспензии нейтрофилов в «нулевом» магнитном поле приводит к существенному снижению интенсивности ее люцигенин-зависимой хемилюминесценции, определенной сразу после окончания воздействия гипомагнитных условий (приблизительно на 48%) (рис. 1–3). Через 20 мин после пребывания в гипомагнитных условиях (при последующей

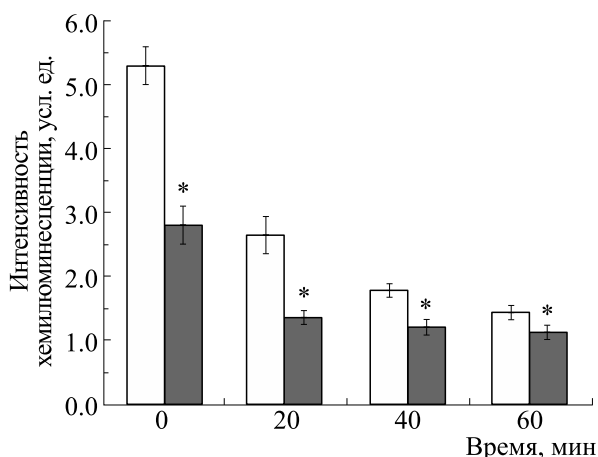


Рис. 1. Влияние «нулевого» магнитного поля на интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов в зависимости от продолжительности последующей инкубации в геомагнитном поле. По оси ординат — максимальная интенсивность хемилюминесценции в условных единицах (средние значения и стандартные отклонения, $n = 6$), по оси абсцисс — время инкубации в геомагнитном поле после пребывания в «нулевом» МП. Светлые столбики — контроль, темные столбики — опыт. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля ($P < 0.05$).

20-минутной инкубации в ГМП) степень проявления различий между контрольными и опытными образцами полностью сохраняется (различия составляют 49%) (рис. 1–3). При увеличении длительности последующей после пребывания в «нулевом» МП инкубации экспериментальных образцов в ГМП до 40 и 60 мин различия между

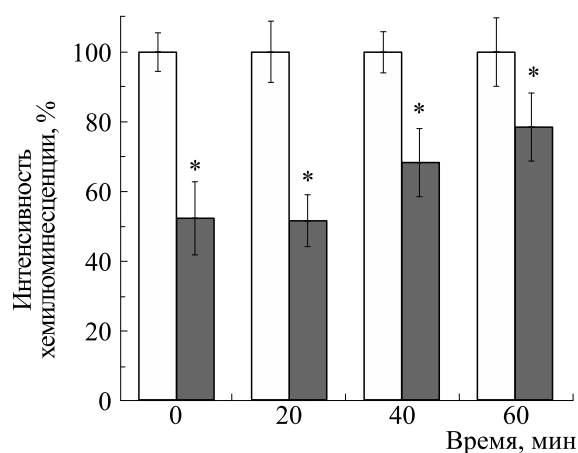


Рис. 2. Временная динамика последствий «нулевого» магнитного поля в отн. ед., нормализованных относительно контрольных значений (средние значения и стандартные отклонения, $n = 6$). По оси абсцисс — время инкубации в геомагнитном поле после пребывания в «нулевом» МП. Светлые столбики — контроль, темные столбики — опыт. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля ($P < 0.05$).

ними и соответствующими контрольными группами образцов уменьшаются соответственно до 32 и 22% (рис. 1–3). Следует отметить, что увеличение времени инкубации и в контроле, и в опыте само по себе сопровождается снижением интенсивности люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов, что может быть связано с активацией антиоксидантных систем в этих клетках [13, 14] или расходом эндогенных восстановительных эквивалентов (НАДН, НАДФН) [10]. Последующие эксперименты помогут установить, имеют ли отношение эти естественные процессы к механизмам действия «нулевого» поля. Против этого, однако, свидетельствует динамика эффекта «нулевого» поля с максимумами ответа именно на ранние сроки наблюдений.

Полученные нами данные о наличии по крайней мере 20-минутного временного периода последствий гипомангнитных условий на скорость продукции АФК нейтрофилами, в котором степень выраженности эффекта действия «нулевого» поля (снижение продукции АФК) полностью сохраняется, имеет помимо фундаментального значения выраженный прикладной (методический) аспект. Действительно, в ряде случаев крайне затруднительно проводить прямое изучение действия «нулевого» поля с помощью стандартной исследовательской аппаратуры, так как сама эта аппаратура является источником магнитных помех. Да и извлечение образцов при исследовании из гипомангнитных условий в условия окружающего ГМП приводит к существенному изменению их магнитного окружения. Наличие обнаруженного нами относительно продолжительного периода последствий у этого физического фактора в принципе позволяет планировать и проводить эксперименты с разобщением (в течение определенного времени) пребывания объектов исследования в гипомангнитных условиях и регистрации эффекта их действия с помощью измерительной аппаратурой, что может способствовать прогрессу в этой области исследований.

В заключение следует отметить особую важность и перспективность изучения эффектов «нулевого» магнитного поля в целом для биоэлектромагнитных исследований. Наряду с прикладными аспектами уже обнаруженного неблагоприятного действия гипомангнитных условий на процессы эмбрионального развития [15–17], морфогенез [18–20] и поведенческие реакции [21, 22] изучение этих эффектов может способствовать определению первичных «работающих» мишеней действия слабого магнитного поля в биологических объектах [1, 5, 23, 24].

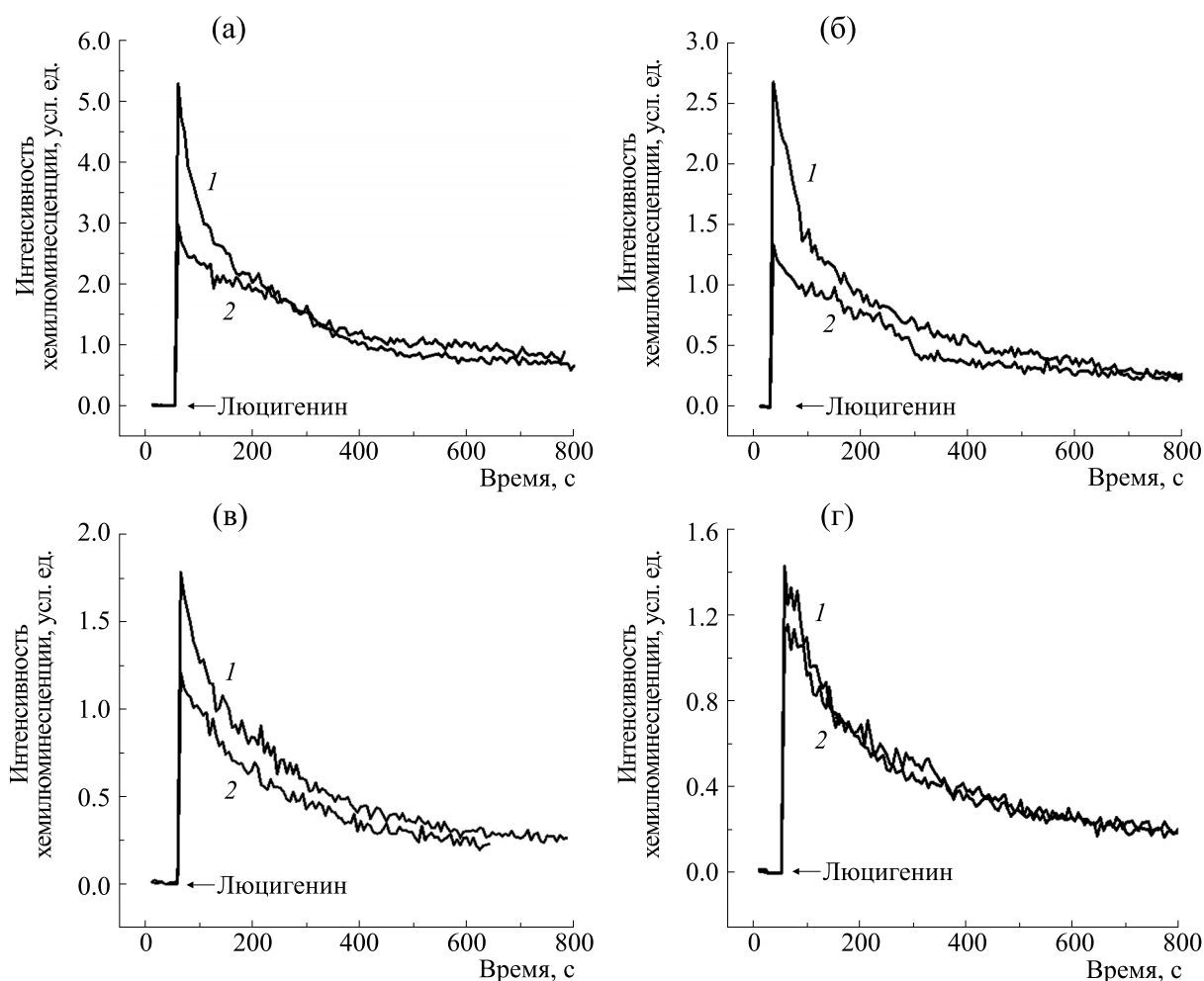


Рис. 3. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на люцигенин после действия «нулевого» МП при различных временах последующей инкубации в геомагнитном поле: (а) — 0 мин (без инкубации в ГМП), (б) — 20 мин, (в) — 40 мин, (г) — 60 мин; 1 — контроль, 2 — опыт.

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. B. Zhang and L. Tian, *Bioelectromagnetics* **41** (8), 573 (2020).
2. H. Zhang, Z. Zhang, W. Mo, et al., *Prot. Cell* **8** (7), 527 (2017).
3. C. F. Martino and P. R. Castello, *PLoS One* **6** (8), e22753 (2011).
4. P. Poltanski, E. Rajkowska, M. Brodecki, et al., *Bioelectromagnetics* **34**, 333 (2013).
5. V. N. Binhi and F. S. Prato, *PLoS One* **12** (6), e0179340 (2017).
6. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **63** (3), 484 (2018).
7. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, Э. Р. Валеева и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **64** (4), 720 (2019).
8. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, И. А. Шаев и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **65** (2), 524 (2020).
9. T. B. Aasen, B. Bolann, J. Glette, et al., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **47**, 673 (1987).
10. А. А. Джатдоева, Е. В. Проскурнина, А. М. Нестерова и др., *Биологич. мембраны* **34** (6), 116 (2017).
11. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, И. А. Шаев и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **65** (4), 735 (2020).
12. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **65** (1), 97 (2020).

13. F. Barnes and S. Kandala, *Bioelectromagnetics* **39**, 249 (2018).
14. F. Barnes and B. Greenebaum, *Bioelectromagnetics* **41**, 392 (2020).
15. M. Osipenko, L. Mezhevnikina, I. Krasts, et al., *Biophysics* **53**, 317 (2008).
16. K. Trukhanov, T. Gur'eva, O. Dadasheva, et al., *Radiats. Biol. Radioecol.* **54**, 179 (2014).
17. В. В. Крылов, Е. А. Осипова, Н. А. Панкова и др., *Биофизика* **62** (4), 825 (2017).
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. A. V. Van Huizen, J. M. Morton, L. J. Kinsey, et al., *Sci. Adv.* **5**, eaau7201 (2019).
21. B. Zhang, H. Lu, W. Xi, et al., *Neurosci. Lett.* **371**, 190 (2004).
22. V. N. Binhi and R. M. Sarimov, *Electromagn. Biol. Med.* **28**, 310 (2009).
23. F. Barnes and B. Greenebaum, *Bioelectromagnetics* **36**, 45 (2015).
24. V. O. Ponomarev and V. V. Novikov, *Biophysics* **54**, 163 (2009).

Kinetics of the Production of Reactive Oxygen Species by Neutrophils after Incubation in a Hypomagnetic 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

It was shown that 30-min incubation of neutrophils in the presence of a near null magnetic field produced with the use of permalloy for magnetic shielding (the residual static magnetic field not greater than 20 nT) leads to a significant decrease (by 48%) in the intensity of lucigenin-dependent chemiluminescence measured directly after removal of the hypomagnetic field. In 20 min after being in hypomagnetic conditions (followed by 20 min of incubation of neutrophils in the geomagnetic field), the degree of severity of differences between the control and experimental samples is completely preserved. When time periods of incubation of experimental samples in the geomagnetic field (static magnetic field 44 μ T) were extended (40 min and 60 min) after exposure to a near null magnetic field, the differences between experimental and appropriate control groups of samples were smaller, up to 32 and 22%.

Keywords: hypomagnetic field, geomagnetic field, neutrophils, reactive oxygen species, lucigenin, chemiluminescence