

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НЕЙТРОФИЛАМИ

© 2021 г. В.В. Новиков*, Е.В. Яблокова*, А.П. Кадырков**, Е.Е. Фесенко*

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

**Акционерное общество «Елатомский приборный завод»,
391351, Рязанская обл., Касимовский район, раб. пос. Елатьма, ул. Янина, 25

E-mail: docmag@mail.ru

Поступила в редакцию 11.05.2021 г.

После доработки 07.06.2021 г.

Принята к публикации 08.06.2021 г.

Показано, что импульсные магнитные поля (первый режим: длительность импульсов 2 мс, частота повторения 6.25 Гц, форма импульсов — колоколообразная; второй режим: длительность импульсов 1 мс, частота повторения 100 Гц, форма импульсов — колоколообразная) влияют на интенсивность люминолзависимой хемилюминесценции нейтрофилов в широком диапазоне величин импульсных магнитных полей (0.0004–10 мТл). Для проявления обнаруженных этим методом эффектов импульсных магнитных полей требуется добавка в суспензию нейтрофилов активатора продукции активных форм кислорода — форбол-12-меристат-13-ацетата. Однако этот механизм действия импульсных магнитных полей на продукцию активных форм кислорода в нейтрофилах не является единственным, так как люцигенин-зависимая хемилюминесценция в системе без активаторов также реагирует на их действие.

Ключевые слова: импульсные магнитные поля, активные формы кислорода, нейтрофилы, хемилюминесценция.

DOI: 10.31857/S0006302921040128

В биомедицинских исследованиях установлен факт положительного влияния импульсной магнитной стимуляции при целом ряде патологий [1, 2], особенно при трудно заживающих переломах, на процессы репарации костной ткани [3–5]. Эта область применения магнитного поля (МП) получила поддержку в медицине в связи с ее эффективностью. В этих случаях используются в основном относительно сильные МП с индукцией порядка единиц и десятков мТл. В связи с этим речь может идти об электрохимическом механизме их действия, реализующемся за счет электромагнитной индукции коротких и мощных импульсов МП [6], и о механизме радикальных пар, основанном на реакциях с участием спин-коррелированных пар радикалов [7]. Являются ли эти, относительно хорошо изученные, механизмы единственными для устройств импульсной магнитной стимуляции, могли бы ответить специальные эксперименты по сравнению эффектов биологи-

ческого действия вблизи индуктора МП (в зоне с миллитесловой индукцией МП) и на различных расстояниях от него, вплоть до зоны с нанотесловой интенсивностью импульсного магнитного поля (ИМП), которые проведены в настоящей работе.

Для проведения такого рода исследования необходимо наличие чувствительного к действию МП биологического объекта, реагирующего на него за короткое время, что позволило бы проводить одновременные сравнительные эксперименты при различных интенсивностях ИМП. В качестве такого объекта нами выбрана суспензия нейтрофилов, а именно процессы продукции свободных радикалов и других активных форм кислорода (АФК) в этой биологической системе. Ранее мы уже сообщали о том, что этот объект чувствителен как к действию комбинированных МП (КМП) с очень слабой переменной компонентой (нанотесловые и микротесловые индукции МП) [8–11], так и к действию гипомангнетного поля [12–15], поэтому представляется вполне обоснованным использовать его и для изучения эффектов ИМП.

Сокращения: МП — магнитные поля, ИМП — импульсные магнитные поля, АФК — активные формы кислорода, fMLF — N-формил-Met-Leu-Phe, ФМА — форбол-12-меристат-13-ацетат.

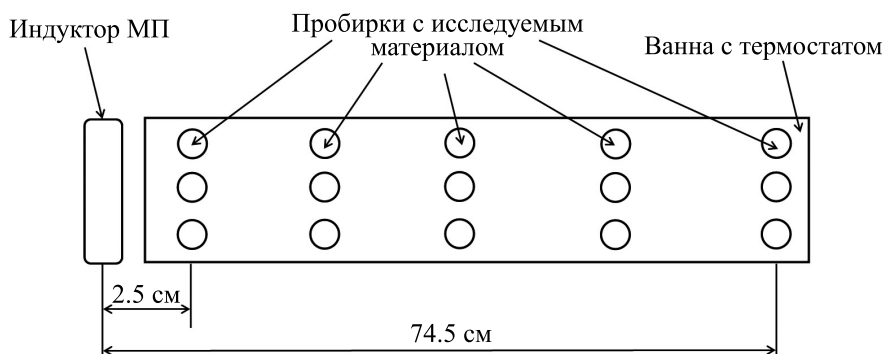


Рис. 1. Схема экспериментальной установки для воздействия ИМП на суспензию нейтрофилов.

В данной работе мы применили метод клеточной хемилюминесценции для оценки активирующего/подавляющего действия ряда режимов ИМП на продукцию АФК нейтрофилами. В качестве источника ИМП был использован прибор «Алмаг+» (АО «Елатомский приборный завод», Рязанская область).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Установка для воздействия ИМП. Для генерации ИМП использовали стандартный терапевтический прибор «Алмаг+» с одним из индукторов, который представлял собой катушку медного провода (толщиной 0.16 мм, 750 витков). Индуктор крепили к краю ванны, в которой циркулировала подогреваемая жидкость (вода), как это показано на рис. 1. Амплитуда тока в проводе при первом режиме генерации ИМП составляла 1.1 А, во втором режиме генерации (обозначен на приборе цифрой «3») — 0.4 А. Параметры ИМП при режиме 1: амплитудное значение магнитной индукции на рабочей поверхности 20 мТл, длительность импульсов 2 мс, частота повторения импульсов 6.25 Гц, форма импульсов — колоколообразная. Параметры ИМП при режиме 2: амплитудное значение магнитной индукции на рабочей поверхности 6 мТл, длительность импульсов 1 мс, частота повторения импульсов 100 Гц, форма импульсов — колоколообразная.

Исследуемые образцы одновременно находились на разных расстояниях от индуктора: образцы 1 — 2.5 см, образцы 2 — 20.5 см, образцы 3 — 39.5 см, образцы 4 — 57.5 см, образцы 5 — 74.5 см. Измерение амплитуды ИМП производили миллитесламетром ТП-2У с диапазоном измерения 0.1–1999 мТл. При величинах, меньших 0.1 мТл, измеряли ИМП с помощью феррозондового магнитометра Mag-03 MS 100 (Bartington, Великобритания). Экспериментальные образцы находились на оси катушки. Значения индукции ИМП на различных расстояниях от индуктора представлены в табл. 1.

Контрольные образцы инкубировали одновременно с опытными при такой же температуре. Они находились на расстоянии не менее 2 м от источника ИМП не по оси катушки (приблизительно под углом 90° к этой оси). В этом случае измерения не фиксировали ИМП от прибора, т.е. остаточные ИМП были незначительными (менее 10 нТл). Постоянная составляющая геомагнитного поля в зоне экспериментов, величиной приблизительно 36 мкТл, находилась под углом 68° к горизонтальной плоскости. Магнитный фон на промышленной частоте (50 Гц) не превышал 0.2 мкТл.

Люминолзависимая хемилюминесценция нейтрофилов. Активность двух режимов воздействия ИМП оценена при помощи метода хемилюминесценции на модели преактивации нейтрофилов. Выбор объекта и метода определялся

Таблица 1. Величина индукции ИМП на различных расстояниях от индуктора

№ образца	Расстояние от индуктора, см	Индукция ИМП, мТл	
		Режим 1	Режим 2
1	2.5	10.0	3.8
2	20.5	0.011	0.004
3	39.5	0.0011	0.0004
4	57.5	0.0007	0.00026
5	74.5	0.0005	0.000225

высокой чувствительностью, относительной простотой и коротким временем измерения функциональной активности фагоцитов. Принцип метода состоит в том, что в процессе стимуляции фагоциты продуцируют большое количество различных прооксидантов (супероксидный радикал, перекись водорода, гипохлорит), способных в процессе взаимодействия с люминолом генерировать мощную люминолзависимую хемилюминесценцию, интенсивность которой пропорциональна функциональной активности клеток [16].

Изученные режимы ИМП проверяли на их способность осуществлять преактивацию (прайминг) нейтрофилов. Для проверки этого действия ИМП суспензия нейтрофилов предварительно инкубировалась на протяжении 40 мин при действии ИМП, генерируемого прибором «Алмаг+».

Получение суспензии нейтрофилов. Работа выполнена на перитонеальных нейтрофилах мышей. Для выделения перитонеальных нейтрофилов использованы лабораторные мыши-самцы линии CD-1 массой 24–26 г, полученные из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Пушино, Московская область). Для выполнения измерений в рамках одного экспериментального дня использовали суспензию нейтрофилов, полученную из одной мыши. Выделение клеток проводили в день проведения измерений. Для получения клеток 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 3 мл охлажденного раствора Хенкса без кальция. Экссудат собирали пипеткой и центрифугировали в течение 5 мин при 600 g. Супернатант декантировали, а осадок разводили в 1 мл бескальциевого раствора Хенкса и оставляли не менее чем на 40 мин при 4°C (но не более чем на 4 ч, так как более длительное хранение клеток снижало хемилюминесцентный ответ нейтрофилов на последующую добавку люминола и активаторов продукции АФК). 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%.

Инкубация суспензии нейтрофилов в ИМП. Для выполнения опытов образцы получали путем раз-

ведения суспензии нейтрофилов модифицированной 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. Образцы по 0.25 мл находились в круглодонных кюветах из полистирола ($d = 1.2$ см, $l = 5.5$ см), в которых в дальнейшем проводили измерение хемилюминесценции. Нейтрофилы инкубировали при $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ в течение 40 мин. Заданную температуру поддерживали циркуляционным водным термостатом УН 4 (MLW, Германия).

Регистрация хемилюминесценции суспензии нейтрофилов при различных вариантах ее активации. После инкубации нейтрофилов измеряли интенсивность хемилюминесценции полученных образцов при добавлении в них раствора люминола (Enzo Life Sciences, США) в конечной концентрации 0.35 mM. Для этого в пробу объемом 0.25 мл добавляли 0.1 мл водного раствора люминола в концентрации 9.45 mM при pH 7.6, создаваемым добавкой NaOH, и содержащего диметилсульфоксид в концентрации 140 mM. В суспензию нейтрофилов помимо люминола был добавлен активатор генерации активных форм кислорода — хемотаксический формилированный пептид N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF) (Sigma, США) в конечной концентрации 1 мкМ. Для этого в пробу объемом 0.26 мл добавляли 0.1 мл раствора fMLF в среде Хенкса в концентрации 27 мкМ, содержащего диметилсульфоксид в концентрации 33.3 mM. Для регистрации хемилюминесценции был использован 12-канальный хемилюминометр Lum-1200 (ООО ДИСофт, Россия). Для анализа результатов использовали программу «PowerGraph».

В части опытов была использована схема двойной последовательной стимуляции нейтрофилов [17]. Для этого до начала инкубации в ИМП в суспензию клеток был добавлен другой активатор генерации АФК — форболовый эфир форбол-12-меристат-13-ацетат (ФМА) (Sigma, США) в низких концентрациях (1 или 10 нМ), а после окончания инкубации хемилюминесцентный ответ регистрировали, как и ранее, на введение люминола и пептида fMLF. Таким образом, в этом случае на первом этапе опытов нейтрофилы стимулировали с помощью ФМА, агента с внутриклеточным механизмом действия (имитирующим диацилглицерол и напрямую активирующим мембранную протеинкиназу C [18]), а на втором этапе (при регистрации хемилюминесценции) проводили основную стимуляцию fMLF, агентом с внеклеточным механизмом действия (осуществляющим передачу сигнала через рецепторы fMLP [18, 19]). Такая двойная стимуляция приводит к максимально полному ответу нейтрофилов на эти стимулы и, следовательно, к

Таблица 2. Люминолзависимая хемилюминесценция нейтрофилов с активатором fMLF после 40 мин действия ИМП в режиме 1 на различных расстояниях от индуктора ИМП (при различной величине ИМП)

№ образца	Интенсивность хемилюминесценции		
	V	%	p
Контроль	3.26 ± 0.66	100 ± 20.2	
1	3.35 ± 0.84	102.8 ± 25.2	0.827337
2	3.39 ± 1.11	104.0 ± 32.8	0.815605
3	3.53 ± 0.82	108.3 ± 23.2	0.541369
4	2.81 ± 0.24	86.2 ± 8.4	0.090344

Примечание. Величина ИМП и расстояние от индуктора соответствуют приведенным в табл. 1; $n = 6$.

Таблица 3. Люминолзависимая хемилюминесценция с активатором fMLF после 40 мин действия ИМП в разных режимах (1 и 2) при различной величине ИМП

№ образца	Режим ИМП	Интенсивность хемилюминесценции		
		V	%	p
Контроль	1	1.77 ± 0.21	100 ± 11.9	
1	1	2.20 ± 0.57	124.3 ± 26.1	0.152522
2	1	2.12 ± 0.53	119.8 ± 16.5	0.088948
Контроль	2	1.13 ± 0.15	100 ± 13.3	
1	2	1.51 ± 0.30	133.6 ± 19.9	0.030006
2	2	1.01 ± 0.10	89.4 ± 10.3	0.196490

Примечание. Величина ИМП и расстояние от индуктора соответствуют приведенным в табл. 1; $n = 6$.

улучшению чувствительности использованного метода [17].

Кроме этого, для детализации механизма действия ИМП проводили отдельную стимуляцию продукции АФК с помощью ФМА (без использования fMLF) в двух вариантах. В первом из них ФМА добавляли в пробу до начала инкубации клеток в ИМП, а затем через 20 мин при регистрации хемилюминесценции использовали добавку люминола. Второй вариант этих опытов – предварительная инкубация в ИМП без активаторов, а затем при регистрации хемилюминесценции добавка люминола и ФМА.

Люцигенин-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов для определения спонтанной продукции активных форм кислорода. 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. Следует отметить, что в этом случае дополнительная стимуляция активаторами продукции АФК (ФМА или fMLF) не проводилась, т.е. в этих опытах определяли фоновую продукцию супероксидного анион-радикала в нейтрофилах [15, 20, 21].

Представление результатов и их статистическая обработка. Значения интенсивности люминесценции соответствовали световому потоку, т.е. количеству фотонов в единицу времени: 1 В соответствует ≈ 1000 фотонов/с. 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

Предварительная обработка нейтрофилов в течение 40 мин при ИМП режима 1 не привела к значимому изменению показателей люминол-зависимой хемилюминесценции в ответ на введение активатора fMLF (табл. 2). Этот результат отмечается на всех исследованных расстояниях (первых четырех) от индуктора ИМП, т.е. в широком диапазоне значений индукции МП (0.0007–10 мТл). В отличие от этого, при использовании ИМП другого режима (режим 2) отмечается некоторое усиление хемилюминесцентного ответа (133.6%, $p = 0.030$) при максимально близком расстоянии от индуктора ИМП (табл. 3).

Таблица 4. Люминолзависимая хемилюминесценция нейтрофилов с двойной последовательной стимуляцией при различной величине ИМП МП

№ образца	Режим ИМП	Интенсивность хемилюминесценции		
		V	%	p
Контроль*	1	12.19 ± 1.23	100 ± 10.1	
1*	1	15.33 ± 2.75	125.8 ± 17.9	0.044713
2*	1	16.62 ± 1.64	136.3 ± 9.9	0.000912
Контроль**	2	5.65 ± 0.92	100 ± 16.2	
1**	2	10.08 ± 2.43	178.4 ± 24.2	0.004191
2**	2	10.23 ± 2.68	181.1 ± 26.2	0.005645

Примечание. Стимуляция — 40 мин прединкубации в ИМП с ФМА, активация пептидом fMLF после инкубации в ИМП в присутствии люминола при регистрации хемилюминесценции. Величина ИМП и расстояние от индуктора соответствуют приведенным в табл. 1; * — концентрация ФМА 10^{-8} М, ** — концентрация ФМА 10^{-9} М; $n = 6$.

При использовании более чувствительного способа двойной последовательной стимуляции (сначала, до инкубации в поле, низкими дозами ФМА, а затем, после 40 мин инкубации, при тестировании хемилюминесценции — активатором fMLF) отмечена более выраженная активация продукции АФК (табл. 4), по сравнению с изолированным использованием fMLF. Данный результат более выражен при обработке клеток параметрами поля второго режима. Следует отметить, что на расстояниях 2.5 и 20.5 см от индуктора при обоих исследованных режимах генерации импульсов (режимы 1 и 2) степень выраженности данного эффекта приблизительно одинакова.

Еще одно отличие в результатах обработки ИМП на различных режимах работы генератора ИМП проявляется при тестировании фоновой продукции супероксида методом люцигенин-зависимой хемилюминесценции без использования дополнительных активаторов продукции АФК. В этом случае режим 1 приводит к снижению продукции супероксида по сравнению с кон-

трольными образцами, а режим 2, напротив, стимулирует эту продукцию. Последнее особенно заметно на большем расстоянии от индуктора (20.5 см), т.е. при меньшей величине поля (табл. 5).

Учитывая то, что в первых опытах наиболее значительные результаты действия ИМП были отмечены при использовании метода двойной последовательной стимуляции нейтрофилов [17], мы изучили этот вариант опытов более подробно. Как видно из табл. 6 и рис. 2а, в повторных опытах при использовании режима 1 работы генератора ИМП отмечается выраженная стимуляция хемилюминесцентного ответа (до 73%) при максимальной индукции ИМП (на минимальном расстоянии от излучателя в 2.5 см). С увеличением расстояния от индуктора выраженность этого эффекта в этой серии опытов снижается (на расстоянии 20.5 см отмечена лишь стимуляция в 25%) и затухает (на расстоянии 39.5 см — 107%). Некоторое увеличение стимулирующей активности проявляется на максимальном расстоянии от индуктора — 74.5 см (на 14%), но только в виде

Таблица 5. Люцигенинзависимая хемилюминесценция без активаторов после 40 мин действия ИМП разных режимов (1 и 2) при различной величине ИМП

№ образца	Режим ИМП	Интенсивность хемилюминесценции		
		V	%	p
Контроль	1	3.11 ± 0.32	100 ± 10.4	
1	1	2.11 ± 0.41	67.9 ± 19.6	0.001758
2	1	2.38 ± 0.23	76.5 ± 9.9	0.002165
Контроль	2	1.71 ± 0.18	100 ± 10.4	
1	2	1.84 ± 0.45	107.6 ± 24.3	0.561070
2	2	2.47 ± 0.40	144.4 ± 16.3	0.003857

Примечание. Величина ИМП и расстояние от индуктора соответствуют приведенным в табл. 1; $n = 6$.

Таблица 6. Люминолзависимая хемилюминесценция нейтрофилов с двойной последовательной стимуляцией при различной величине ИМП

№ образца	Режим ИМП	Интенсивность хемилюминесценции		
		<i>V</i>	%	<i>p</i>
Контроль	1	2.38 ± 0.16	100 ± 6.7	
Образец 1	1	4.13 ± 0.95	173.5 ± 23.1	0.001063
Образец 2	1	2.97 ± 0.51	124.8 ± 17.3	0.024185
Образец 3	1	2.54 ± 0.20	106.7 ± 7.9	0.141013
Образец 4	1	2.42 ± 0.39	101.7 ± 16.0	0.824456
Образец 5	1	2.71 ± 0.52	113.9 ± 19.1	0.181259
Контроль	2	3.81 ± 0.37	100 ± 9.6	
Образец 1	2	5.07 ± 1.45	133.1 ± 28.5	0.058094
Образец 2	2	4.71 ± 0.37	123.6 ± 7.9	0.000549
Образец 3	2	4.50 ± 0.50	118.1 ± 11.1	0.011858
Образец 4	2	4.73 ± 1.09	124.1 ± 23.1	0.098439
Образец 5	2	4.90 ± 1.23	128.6 ± 25.2	0.081074

Примечание. Повторная серия опытов. Стимуляция – 40 мин прединкубации в ИМП с ФМА, активация пептидом fMLF после инкубации в ИМП в присутствии люминола при регистрации хемилюминесценции. Величина ИМП и расстояние от индуктора соответствуют приведенным в табл. 1; $n = 6$.

тенденции (табл. 6). Здесь следует отметить, что ранее (в первой серии этих опытов) стимуляция продукции АФК была менее выраженной – до 36% (табл. 4).

При использовании второго режима работы генератора ИМП умеренная (на 18–33%) стимуляция отмечается на всех исследованных расстояниях от индуктора (при этом на расстояниях 20.5 и 39.5 см данные статистически значимы, а на других расстояниях эффект проявляется в виде тенденции) (табл. 6, рис. 2б). В первой серии этих опытов (табл. 4) в этом случае была отмечена бо-

лее выраженная стимуляция (до 78%), но в ней были использованы более низкие концентрации ФМА (1 нМ), по сравнению с повторной серией опытов, в которой концентрация ФМА составляла 10 нМ.

Учитывая эти данные, мы проверили, как изменяются параметры хемилюминесценции нейтрофилов только при введении форболового эфира и люминола (без использования формилированного пептида). В табл. 7 представлены результаты опытов, когда ФМА вводили, как и ранее, до начала инкубации в ИМП, а люминол и

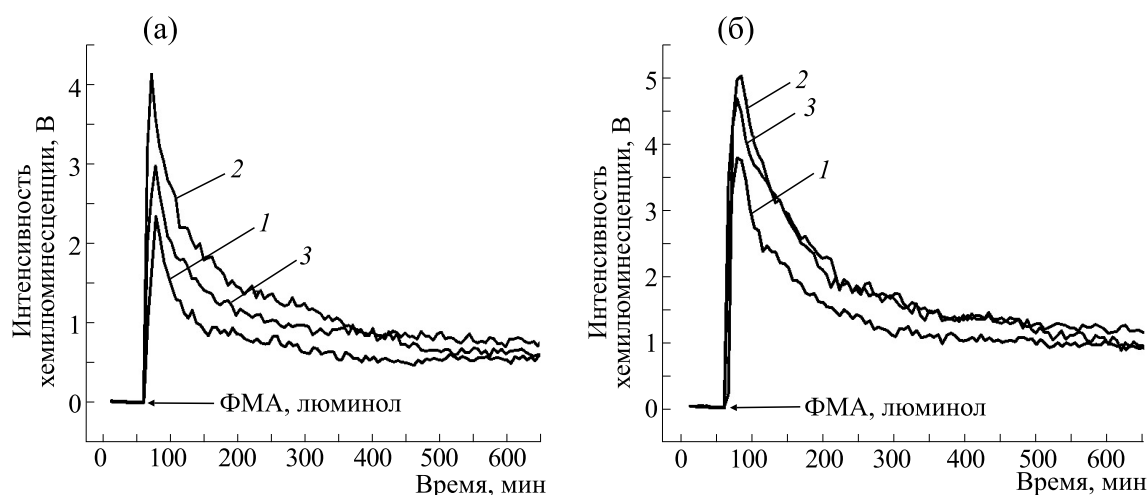


Рис. 2. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на люминол и fMLF после 40 мин действия ИМП в присутствии 10 нМ ФМА. (а) – 1 – Контроль; 2 – режим 1 (длительность импульсов 2 мс, частота повторения импульсов 6.25 Гц), образец 1 (ИМП 10 мТл); 3 – режим 1, образец 2 (ИМП 0.011 мТл). (б) – 1 – Контроль; 2 – режим 2 (длительность импульсов 1 мс, частота повторения импульсов 100 Гц), образец 1 (ИМП 3.8 мТл); 3 – режим 2, образец 2 (ИМП 0.004 мТл).

Таблица 7. Люминолзависимая хемилюминесценция нейтрофилов с предварительной добавкой 10 нМ ФМА и 20 мин инкубации в ИМП, с последующей добавкой люминола при регистрации хемилюминесценции

№ образца	Режим ИМП	Интенсивность хемилюминесценции		
		V	%	p
Контроль		6.40 ± 0.54	100 ± 8.5	
1	1	7.04 ± 0.49	110.0 ± 7.0	0.203292
2	1	6.69 ± 0.85	104.5 ± 12.8	0.534872
5	1	6.86 ± 0.45	107.2 ± 6.6	0.174993
1	2	7.52 ± 0.26	117.5 ± 3.5	0.002397
2	2	7.01 ± 0.81	109.5 ± 11.5	0.192189
3	2	8.07 ± 0.48	126.1 ± 5.9	0.000537

Примечание. Величина ИМП и расстояние от индуктора соответствуют приведенным в табл. 1; $n = 6$.

последующий хемилюминесцентный ответ регистрировали через 20 мин (сразу после окончания инкубации в ИМП). Здесь следует отметить, что стимуляция продукции АФК в результате действия активатора ФМА это длительный процесс, развивающийся в течение десятков минут, что значительно превышает продолжительность этого процесса при стимуляции fMLF (минуты) [16].

Из данных, приведенных в табл. 7, следует, что в этом варианте опытов ответ на ФМА усиливается в основном при использовании второго режима ИМП, при этом он проявляется нелинейно на различных расстояниях от индуктора поля: на максимально близком расстоянии (2.5 см) — 117.5% ($p = 0.002$); на следующем расстоянии (20.5 см) он практически отсутствует — 109.5% ($p = 0.192$), а на расстоянии 39.5 см значительно выражен — 126.1% ($p = 0.001$).

В опытах с ФМА и люминолом, выполненных в другой последовательности — добавка ФМА после 40 мин инкубации в ИМП — отмечены слабо выраженные (~10%), но достоверные эффекты стимуляции при использовании обоих режимов генерации импульсов и на различных расстояниях от индуктора поля (табл. 8, рис. 3).

В повторных опытах без стимуляции активаторами продукции АФК при регистрации фоновой продукции супероксидного радикала методом люцигенин-зависимой хемилюминесценции отмечается, как и ранее, снижение продукции супероксида при использовании первого режима работы генератора ИМП и тенденция к повышению его продукции при втором режиме ИМП (табл. 9). При этом эффекты имеют сложную зависимость от расстояния до индуктора ИМП. Например, ингибирующий эффект режима 1 проявляется при малых расстояниях (2.5 см), достигает максимума при его увеличении (20.5 см), затем

Таблица 8. Люминол-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов после 40 мин инкубации в ИМП без активаторов, с последующей добавкой 10 нМ ФМА и люминола при регистрации хемилюминесценции

№ образца	Режим ИМП	Интенсивность хемилюминесценции		
		V	%	p
Контроль		3.40 ± 0.11	100 ± 3.3	
1	1	3.73 ± 0.22	109.7 ± 5.8	0.016179
2	1	3.81 ± 0.31	112.1 ± 8.2	0.022186
5	1	3.70 ± 0.58	108.8 ± 15.8	0.286460
1	2	3.95 ± 0.24	116.2 ± 6.1	0.001382
2	2	3.47 ± 0.28	102.1 ± 8.0	0.603319
3	2	3.78 ± 0.25	111.2 ± 6.6	0.011834

Примечание. Величина ИМП и расстояние от индуктора соответствуют приведенным в табл. 1; $n = 6$.

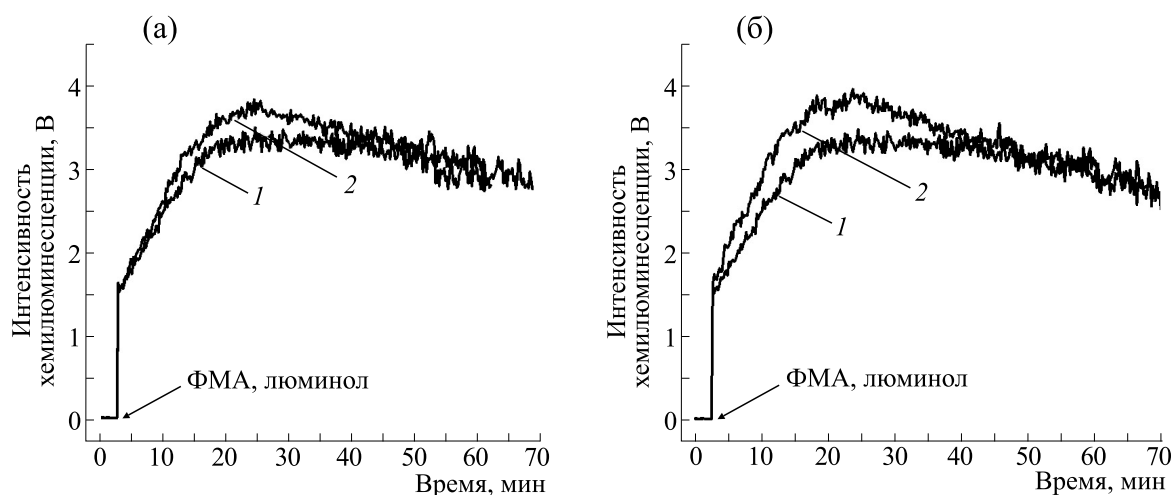


Рис. 3. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на люминол и ФМА после 40 мин действия ИМП. (а) — 1 — Контроль; 2 — режим 1 (длительность импульсов 2 мс, частота повторения импульсов 6.25 Гц), образец 1 (ИМП 10 мТл). (б) — 1 — Контроль; 2 — режим 2 (длительность импульсов 1 мс, частота повторения импульсов 100 Гц), образец 1 (ИМП 3.8 мТл).

пропадает (39.5 см и 57.5 см) и снова проявляется при увеличении этого расстояния (74.5 см).

В целом проведенное исследование свидетельствует о том, что полученные результаты подтверждают наличие биологической активности у изученных режимов ИМП и демонстрируют возможность с их помощью стимулировать нейтрофилы — одно из неспецифических звеньев системы естественной резистентности. Тем

не менее проведенные ранее исследования [8–11, 22] показывают направления для повышения клинической эффективности изделий с использованием ИМП. В работах [8–11] отмечена более эффективная реакция по продукции АФК при воздействии слабых комбинированных МП, настроенных определенным образом на характеристические частоты ряда ионов. Действительно, в случаях с комбинированными МП вы-

Таблица 9. Люцигенин-зависимая хемилюминесценция без активаторов после 40 мин действия ИМП различных режимов (1 и 2) при различной величине ИМП ($n = 6$).

№ образца	Режим ИМП	Интенсивность хемилюминесценции		
		V	%	p
Контроль	1	1.72 ± 0.06	100 ± 3.5	
1	1	1.30 ± 0.14	75.6 ± 10.6	0.016664
2	1	1.13 ± 0.14	65.7 ± 12.8	0.000010
3	1	1.72 ± 0.13	100.0 ± 7.4	1.000000
4	1	1.76 ± 0.21	102.3 ± 11.7	0.683182
5	1	1.27 ± 0.14	73.8 ± 11.4	0.000088
Контроль	2	1.86 ± 0.18	100 ± 9.5	
1	2	2.17 ± 0.31	116.7 ± 14.4	0.073205
2	2	1.98 ± 0.28	106.5 ± 14.4	0.433604
3	2	2.15 ± 0.31	115.6 ± 14.3	0.090918
4	2	1.83 ± 0.23	98.4 ± 12.6	0.810386
5	2	2.15 ± 0.27	115.6 ± 12.8	0.060907

Примечание. Повторная серия опытов. Величина ИМП и расстояние от индуктора соответствуют приведенным в табл. 1; $n = 6$.

раженные и разнонаправленные эффекты регистрируются уже при отдельной стимуляции нейтрофилов пептидом fMLF или форболовым эфиром ФМА, а для выявления эффектов ИМП потребовалось использование более чувствительного метода двойной последовательной стимуляции этими активаторами. Это обстоятельство позволяет предположить, что возможно существенное повышение эффективности работы терапевтических устройств ИМП за счет оптимизации их параметров.

Изученные клеточные механизмы активации нейтрофилов при действии ИМП свидетельствуют о том, что в этих эффектах важную роль играет модуляция активности протеинкиназы C, так как для проявления этих эффектов на уровне суспензии нейтрофилов потребовалось использование ФМА, вещества имитирующего диацилглицерол и напрямую активирующего мембранную протеинкиназу C [18], и усиливающего в связи с этим процессы фосфорилирования компонентов НАДФН оксидазы нейтрофилов. Однако НАДФН оксидаза нейтрофилов, по-видимому, является не единственным источником АФК, реагирующим на действие ИМП, так как люцигенин-зависимая хемилюминесценция без активаторов показывает разнонаправленное действие первого и второго исследованных режимов генерации ИМП на спонтанную продукцию АФК в этих клетках. Таким образом, проведенная нами работа позволила детализировать некоторые молекулярные и клеточные механизмы действия ИМП.

Касательно первичных механизмов биологического действия ИМП следует отметить, что электрохимический механизм их действия, реализующийся за счет электромагнитной индукции коротких и мощных импульсов МП [6], по-видимому, не может в изолированном виде объяснить некоторые выявленные в нашей работе эффекты, так как они наблюдаются и при значительном удалении от индуктора ИМП, т.е. в зоне слабого магнитного поля (менее 1 мкТл).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке АО «Елатомский приборный завод».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

А.П. Кадырков — зам. Директора по научной работе АО «Елатомский приборный завод». Остальные авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и ис-

пользования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. S. Markov, *Environmentalist* **27**, 465 (2007).
2. M. S. Markov, In *Electromagnetic fields in biology and medicine*, Ed. by M. Markov (CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 2015), pp. 15–28.
3. C. Galli, G. Pedrazzi, M. Mattioli-Belmonte, and S. Guizzardi, *Int. J. Biomaterials* **2018**, Art ID 8935750 (2018). DOI: 10.1155/2018/8935750
4. J. Yuan, F. Xin, W. Jiang, *Cell Physiol. Biochem.* **46**, 1581 (2018).
5. E. I. Waldorff, N. Zhang, and J. T. Ryaby, *J. Orthopaed. Translation* **9**, 60 (2017).
6. В. Н. Бинги, *Принципы электромагнитной биофизики* (Физматлит, М., 2011).
7. F. Barnes and B. Greenebaum, *Bioelectromagnetics* **36**, 45 (2015).
8. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **61** (3), 510 (2016).
9. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **65** (1), 97 (2020).
10. V. V. Novikov, E. V. Yablokova, and E. E. Fesenko, *Electromag. Biol. Med.* **39**, 364 (2020).
11. V. V. Novikov, E. V. Yablokova, and E. E. Fesenko, *Appl. Sci.* **10** (9), 3326 (2020).
12. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **63** (3), 484 (2018).
13. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, Э. Р. Валеева и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **64** (4), 720 (2019).
14. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, И.А. Шаев и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **65** (3), 524 (2020).
15. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, И.А. Шаев и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **65** (4), 735 (2020).
16. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурнина, *Успехи биол. химии* **49**, 341 (2009).
17. Е. В. Проскурнина, М. М. Созарукова, А. М. Полимова и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **161** (2), 288 (2016).
18. F. Rossi, P. Bellavite, G. Berton, et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* **141**, 283 (1982).
19. В. Г. Сафронова, А. Г. Габдулхакова, А. В. Миллер и др., *Биохимия* **66**, 840 (2001).
20. T. B. Aasen, B. Bolann, J. Glette, et al., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **47**, 673 (1987).
21. А. А. Джатдоева, Е. В. Проскурнина, А. М. Нестерова и др., *Биол. мембраны* **34** (6), 116 (2017).
22. A. R. Liboff, *Electromag. Biol. Med.* **39**, 45 (2020).

Effects of Pulsed Magnetic Fields on the Production of Reactive Oxygen Species by Neutrophils

V.V. Novikov*, E.V. Yablokova*, A.P. Kadyrkov**, and E.E. Fesenko*

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

***Joint Stock Company "Elatomsky Instrument Plant",
ul. Yanina 25, Elatma, Kasimovsky district of Ryazan region, 391351 Russia*

The present paper describes the effects of pulsed magnetic fields (mode 1: pulse duration 2 ms, 6.25 Hz repetition rate with bell-shaped pulses; mode 2: pulse duration 1 ms, 100 Hz repetition rate with bell-shaped pulses) on the intensity of luminol-dependent chemiluminescence of neutrophils in a wide range of pulsed magnetic field amplitudes (0.0004–10 mT). In order to observe pulsed magnetic fields effects with the use of this method, it is necessary to add phorbol 12-myristate 13-acetate, an activator of the production of reactive oxygen species, to the neutrophil suspension. However, this is not the only one mechanism by which pulsed magnetic fields may have an effect on reactive oxygen species production in neutrophils, since lucigenin-dependent chemiluminescence in the activator-free system is also sensitive to pulsed magnetic field exposure.

Keywords: pulsed magnetic fields, reactive oxygen species, neutrophils, chemiluminescence