

К ВОПРОСУ О МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ МАГНИТНЫХ УСЛОВИЙ (НУЛЕВЫЕ И КОМБИНИРОВАННЫЕ МАГНИТНЫЕ ПОЛЯ) НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В НЕЙТРОФИЛАХ

Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е.

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФГБУН «ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, РФ; e-mail: docmag@mail.ru

Поступила в редакцию: 20.07.2019

Аннотация. Показано, что снижение интенсивности процессов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина в нейтрофилах в гипоманнитных 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. Это снижение вряд ли обусловлено влиянием гипоманнитных условий на фосфорилирование компонентов НАДФН-оксидазы, так как добавка ингибитора протеинкиназы C (Ro 31-6233) практически не отразилась на интенсивности флуоресценции внутриклеточного дихлордигидрофлуоресцеина. Добавка ингибитора фосфолипазы C (U73122) немного и приблизительно одинаково снизила продукцию АФК как в контроле, так и в опыте. Апоцинин в разных концентрациях вызывал рост продукции АФК в неактивированных нейтрофилах, приблизительно в два раза менее выраженный в гипоманнитных условиях. Об участии электрон-транспортной цепи митохондрий в механизме эффекта «нулевого» поля свидетельствует снижение продукции АФК при добавке ротенона, значительно более выраженное в опытных образцах. Все это резко отличает эффект «нулевого» поля от эффектов комбинированных магнитных полей, в основе которых обнаруживается влияние на регуляторные кальций-зависимые механизмы, контролирующие респираторный взрыв в нейтрофилах.

Ключевые слова: гипоманнитные условия, комбинированные магнитные поля, флуоресценция, хемиллюминесценция, активные формы кислорода, нейтрофилы.

Ряд авторов рассматривает возможность влияния магнитных полей на продукцию активных форм кислорода (АФК) как перспективный подход к анализу механизмов их биологического действия [1, 2]. Ранее в экспериментах на цельной крови и нейтрофилах методами активированной хемиллюминесценции и флуоресцентной спектроскопии нами было показано усиление генерации свободных радикалов и других АФК в результате действия комбинированных постоянного и низкочастотного переменного магнитных полей (КМП) с очень слабой переменной составляющей (менее 1 мкТл) [3-7]. В этих работах был в частности зарегистрирован праймирующий эффект (предактирование респираторного взрыва в нейтрофилах) слабых комбинированных постоянного (42 мкТл) и коллинеарного ему низкочастотного переменного (1; 4,4 и 16,5 Гц; 0,86 мкТл) магнитных полей, который проявлялся как более выраженное усиление хемиллюминесценции суспензии нейтрофилов, после их предварительной обработки КМП, в ответ на введение бактериального пептида N-формил-Met-Leu-Phe или форболового эфира форбол-12-меристат-13-ацетата в присутствии люминола [5]. Было показано лишь небольшое усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ) в нейтрофилах после часового действия КМП [7]. Не выявлено взаимосвязи этого увеличения интенсивности ПОЛ с процессом функциональной предактирования нейтрофилов в результате действия КМП, так как ингибитор ПОЛ – ионол (10 мкМ) не снижал в этом случае индекс прайминга. Также не снижала индекс прайминга предварительная добавка перехватчика синглетного кислорода – гистидина (0,1 и 1 мМ) [7] или перехватчика гидроксильных радикалов – диметилсульфоксида в концентрациях до 1 мМ [8]. Значительное ингибирующее действие на интенсивность хемиллюминесценции суспензии нейтрофилов оказывал ингибитор миелопероксидазы – азид натрия (0,1 мМ), при этом прайминг в его присутствии не развивался [7]. Также эффективно снижали хемиллюминесценцию ингибитор НАДФН-оксидазы – апоцинин и скевенжер гипохлорита – эдаравон [4]. Было показано, что низкие концентрации хелатора внутриклеточного кальция ВАРТА АМ блокируют этот эффект слабых КМП [8]. При этом уровень внеклеточного кальция практически не влияет на степень выраженности праймирования респираторного взрыва. Из этого следует, что одним из ключевых моментов механизма действия слабых КМП на нейтрофилы может являться усиленный выход ионов кальция в цитозоль из внутриклеточных депо. Вторым из экспериментально установленных ключевых моментов механизма предактирования нейтрофилов в слабом КМП является выраженная зависимость величины этого эффекта от концентрации атмосферных газов [9]. Показано, что предварительная мягкая частичная дегазация суспензии нейтрофилов при давлении атмосферных газов 640 мм.рт.ст. приводит к существенному (4х кратному) снижению степени влияния КМП, но практически не отражается на способности клеток генерировать респираторный взрыв в ответ на активатор (пептид N-формил-Met-Leu-Phe) в контроле [9].

Напротив, исключение магнитного поля («нулевое» поле) приводит в ряде случаев к снижению продукции АФК в гипоманнитных условиях в различных типах клеток и при различной экспозиции [10-13]. Нами было

показано, что 1,5 часовое экспонирование перитонеальных нейтрофилов мышей при магнитном экранировании в гипомангнитных условиях (остаточное постоянное магнитное поле менее 20 нТл) вызывает снижение базовой внутриклеточной продукции активных форм кислорода, регистрируемое по изменению интенсивности флуоресценции продуктов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина и дигидрородамина 123 [14]. При дополнительном введении малых концентраций активаторов респираторного взрыва: формируемого пептида N-formyl-Met-Leu-Phe или форболового эфира форбол-12-меристат-13-ацетата этот эффект гипомангнитного поля сохранялся [14]. Учитывая то, что эффект действия гипомангнитного 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 [15]. В этой связи особый интерес представляет дальнейшее исследование и сравнение молекулярных механизмов действия различных магнитных условий (прежде всего, КМП и «нулевого» МП) на продукцию АФК в нейтрофилах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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 часов животных умерщвляли методом ульнарной дислокации, и их брюшную полость промывали тремя миллилитрами 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.

Установка для воздействия слабыми КМП состояла из двух пар коаксиально расположенных колец Гельмгольца диаметром 140 см (расстояние между кольцами одной пары 70 см), ориентированных вдоль вектора геомагнитного поля. На одну пару колец подавали постоянный ток для формирования заданной величины постоянной составляющей МП $42 \pm 0,1$ мкТл. На вторую пару колец подавали электрический ток от программируемого генератора синусоидальных сигналов (ЦАП платы L-791 фирмы L-Card, Россия) для формирования переменной компоненты поля. Базовая амплитуда переменной компоненты составляла 860 ± 10 нТл. В опытах был использован трехчастотный сигнал 1; 4,4 и 16,5 Гц, показавший активность в предыдущих экспериментах [16], с амплитудами отдельных частот 600; 100 и 160 нТл соответственно. Величины действующих МП определяли прямым измерением с помощью феррозондового датчика Mag – 03 MS 100 (Bartington, UK). Нейтрофилы инкубировали при $37,0 \pm 0,2$ °C в концентрации 1 млн кл/мл по 250 мкл в полипропиленовых пробирках типа Эппендорф. Типичное время инкубации составляло 1 час. При экспонировании суспензии нейтрофилов в гипомангнитном поле для формирования гипомангнитных условий использовалась установка, которая состояла из трех, вставленных соосно один в другой, цилиндрических экранов МП из пермаллоя (толщиной 1 мм). Величины остаточных постоянных МП не превышали 20 нТл. Контрольные (геомагнитное поле) и опытные образцы по 10 штук инкубировали при $37,0 \pm 0,2$ °C одновременно. Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле с постоянной составляющей ~ 42 мкТл и уровнем магнитного фона на 50 Гц 15-50 нТл. 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 C – U73122 (Sigma, США) в концентрации 2 мкМ и ингибитор протеинкиназы C – бисиндолилмалеимид IV (Ro 31-6233) (Sigma, США) в концентрации 1 мкМ. После 1,5 часовой инкубации к суспензии нейтрофилов добавляли флуоресцентный зонд на внутриклеточные АФК H₂DCF-DA до конечной концентрации 0,01 мг/мл. Пробы продолжали инкубировать при 37°C 30 минут в темноте, чтобы минимизировать фотоокисдацию красителей. 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, USA), при возбуждении на 488 нм.

После часовой инкубации в КМП суспензии нейтрофилов измеряли интенсивность хемиллюминесценции образцов в контрольных и опытных случаях после добавки в них раствора люминола (Enzo Life Sciences, США) в концентрации 0,35 мМ и активатора генерации АФК – хемотаксического формируемого пептида N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF) (Sigma, США) в концентрации 1 мкМ. В этих опытах до начала инкубации к части образцов добавляли по отдельности различные химические добавки: дигидрат двуназатриевой соли этилендиамин-

тетрауксусной кислоты (Na_2 -ЭДТА) (Sigma, США) в концентрациях 0,05 и 0,5 % – неселективный хелатора металлов; ротенон (Sigma, США) в концентрации 1 мкМ; блокатор протонных каналов (канал VSOP/HV1) ZnSO_4 100 мкМ [12, 13]. В работе был использован хемилюминометр Lum-5773 (ООО ДИСофт, Россия). Для анализа данных хемилюминесценции применялась программа PowerGraph. Часть результатов представлена в процентах по отношению к амплитудам хемилюминесцентного ответа в контроле, принятым за 100%. Для наглядности использован индекс прайминга (ИП) равный отношению максимальной интенсивности хемилюминесценции в опыте к соответствующему значению в контроле. Результаты статистически обработаны с применением t -критерия Стьюдента. Часть результатов по флуоресцентной детекции представлена в процентах, как отношение максимальной интенсивности флуоресценции в опытах к базовому контролю без активаторов, принятому за 100 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспонирование перитонеальных нейтрофилов в гипомагнитных условиях (при ослаблении геомагнитного поля \sim в 2000 раз) вызывает значительное (на 25%) уменьшение интенсивности флуоресценции внутриклеточного DCF (рис. 1, 2). Добавка в среду для инкубации нейтрофилов хелатора внутриклеточного

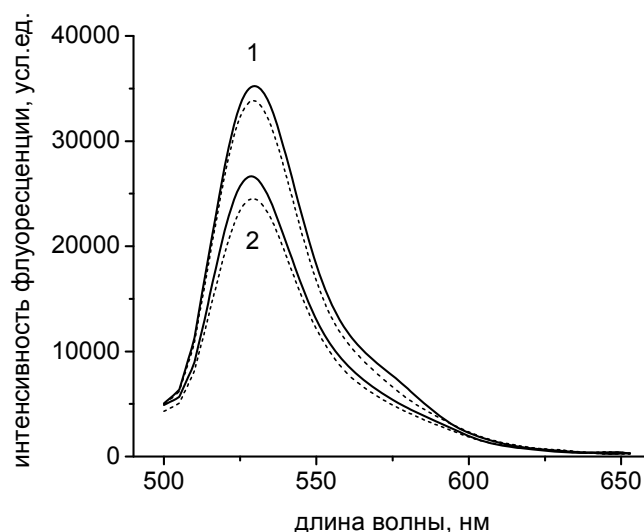


Рисунок 1. Спектры флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в контроле (1) и в опыте (2) – после действия гипомагнитного поля. Пунктирными линиями обозначены стандартные отклонения

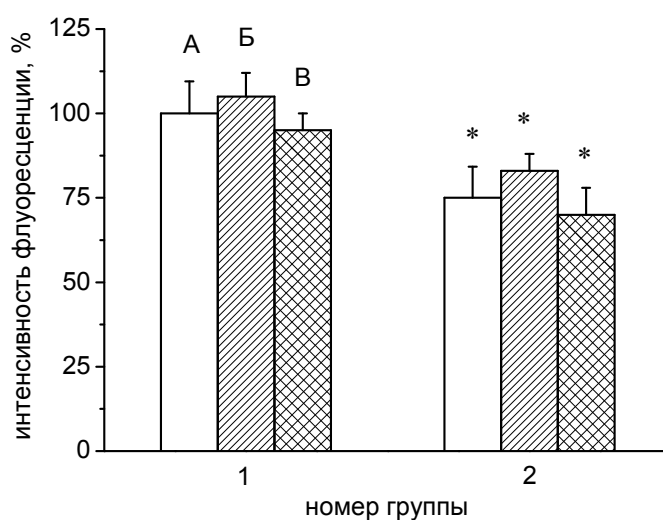


Рисунок 2. Влияние гипомагнитного поля на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в отсутствии и в присутствии хелатора внутриклеточного кальция – ВАРТА АМ. Ось ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$). Ось абсцисс – номер группы. 1 – контроль. 2 – опыт. а – без добавок, б – добавка 2 мкМ ВАРТА АМ, в - добавка 4 мкМ ВАРТА АМ. Звездочкой отмечены достоверные отличия между группами ($P < 0,05$)

кальция ВАРТА АМ в концентрациях 2 мкМ и 4 мкМ практически не отразилась на продукции внутриклеточных АФК в нейтрофилах, как в контроле, так и в опыте (гипомагнитные условия) (рис. 2). Это, по-видимому, свидетельствует о независимости эффекта «нулевого» МП от уровня внутриклеточного кальция и в целом от кальций-опосредованных механизмов. Что резко отличает этот эффект от эффекта КМП на этом же объекте (нейтрофилах), при котором, напротив, уже низкие концентрации ВАРТА АМ полностью его блокируют [8].

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 гипомагнитного поля и подтверждает их роль как одного из основных продуцентов АФК в неактивированных нейтрофилах [17]. В этой связи следует отметить, что эффект КМП был независим от введения этого ингибитора в среду культивирования нейтрофилов [18]. Добавка ингибитора фосфолипазы С U73122 снизила приблизительно одинаково (~20%) продукцию АФК как в контроле, так и в опыте (рис. 4). А добавка ингибитора протеинкиназы С Ro 31-6233 практически не отразилась на интенсивности флуоресценции внутриклеточного DCF. Эти не подтверждают участия процессов фосфорилирования компонентов НАДФН-оксидазы в механизмах этого эффекта.

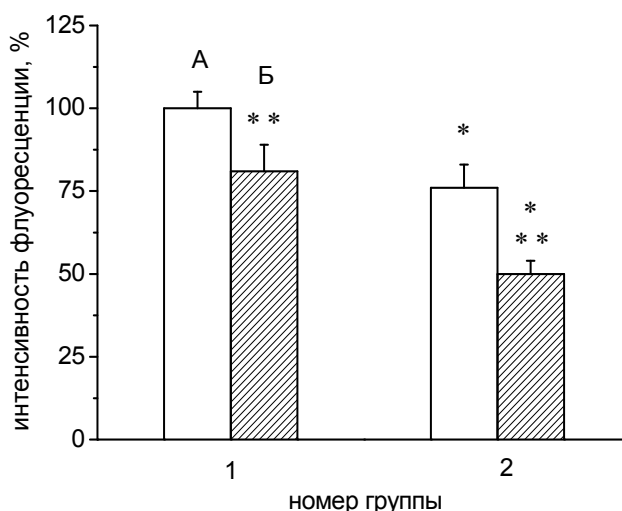


Рисунок 3. Влияние гипомагнитного поля на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в отсутствии и в присутствии ротенона. Ось ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$). Ось абсцисс – номер группы. 1 – контроль. 2 – опыт. а – без добавок, б – добавка 1 мкМ ротенона. Звездочкой отмечены достоверные отличия между группами ($P < 0,05$). Двумя звездочками отмечены достоверные отличия внутри группы ($P < 0,05$)

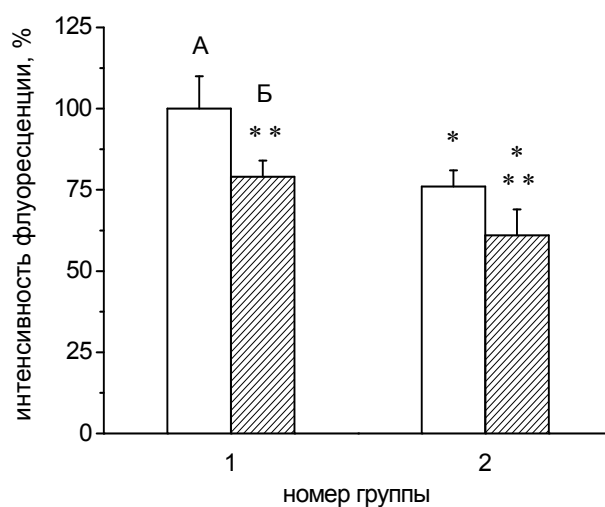


Рисунок 4. Влияние гипомагнитного поля на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в отсутствии и в присутствии ингибитора фосфолипазы С – U73122. Ось ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$). Ось абсцисс – номер группы. 1 – контроль. 2 – опыт. а – без добавок, б – добавка 2 мкМ U73122. Звездочкой отмечены достоверные отличия между группами ($P < 0,05$). Двумя звездочками отмечены достоверные отличия внутри группы ($P < 0,05$)

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. 5). 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 [19, 20], например, в активированных нейтрофилах. В неактивированных клетках апоцинин может стимулировать продукцию АФК за счет его предшествующего окисления, приводящего к образованию переходных свободных радикалов [21]. В нашем случае важно отметить, что интенсивность этого процесса в опыте (после пребывания в гипомагнитных условиях) значительно снижается.

В целом приведенные данные свидетельствуют о снижении интенсивности процессов окисления использованного флуоресцентного зонда (H₂DCF) в нейтрофилах в гипомагнитных 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

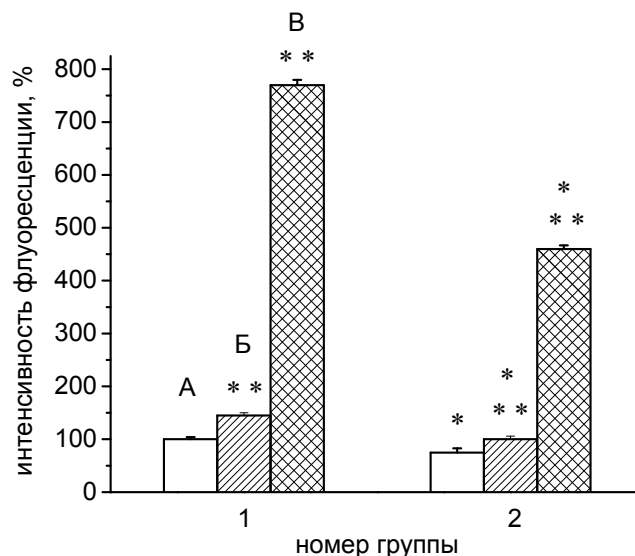


Рисунок 5. Влияние гипомагнитного поля на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в отсутствие и в присутствии апоцинина. Ось ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$). Ось абсцисс – номер группы. 1 – контроль. 2 – опыт. а – без добавок, б – добавка 20 мкМ апоцинина, в – добавка 500 мкМ апоцинина. Звездочкой отмечены достоверные отличия между группами ($P < 0,05$). Двумя звездочками отмечены достоверные отличия внутри группы ($P < 0,05$)

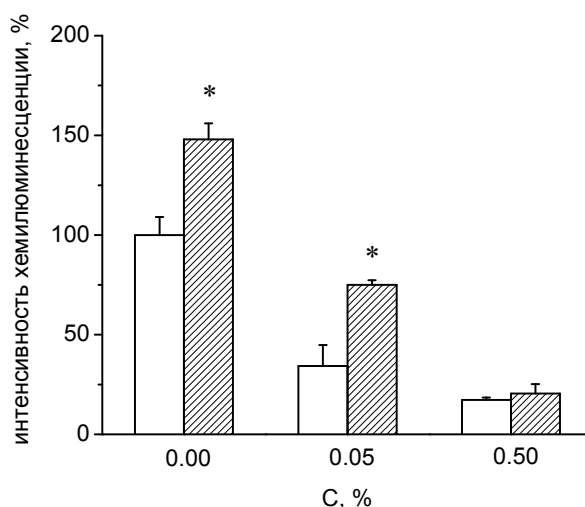


Рисунок 6. Влияние ЭДТА на интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов при действии КМП. Контроль (без штриховки). Опыт – действие КМП (штриховка). Ось абсцисс – концентрации ЭДТА. Ось ординат – интенсивность хемилюминесценции (максимальные значения) в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения). Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$)

«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 [3, 16], в основе которых обнаруживается влияние на регуляторные кальций-зависимые механизмы [8], контролирующие респираторный взрыв в нейтрофилах. Так, в случае с КМП добавка в среду для инкубации хелатора металлов ЭДТА привела к значительному снижению интенсивности хемилюминесценции, как в опытных, так и в контрольных образцах (рис. 6).

Высокие концентрации ЭДТА (0,5%) снижают интенсивность хемилюминесценции в контроле приблизительно в пять раз, и нивелируют различия между контрольными и опытными образцами (рис. 2). При использовании низких концентраций ЭДТА (0,05%) интенсивность хемилюминесценции образцов также снижается, но в большей степени в контрольных случаях (на 66%). В опыте (предварительное действие КМП) интенсивность хемилюминесценции снизилась лишь на 50%. Это различие обусловило рост индекса прайминга нейтрофилов при действии КМП в присутствии 0,05% ЭДТА с 1,47 до 2,18 (на 48%). Этот результат соответствует ранее сделанным нами наблюдениям о слабой зависимости праймирующего эффекта КМП от концентрации внеклеточного кальция, при добавке различных его количеств в среду для культивирования нейтрофилов, и ведущей роли внутриклеточного кальция в этих процессах [8].

В случае с КМП (в отличие от эффектов нулевого поля) добавка ротенона в среду для инкубации нейтрофилов мало отразилась на интенсивности респираторного взрыва, как в контроле, так и опыте (рис. 7).

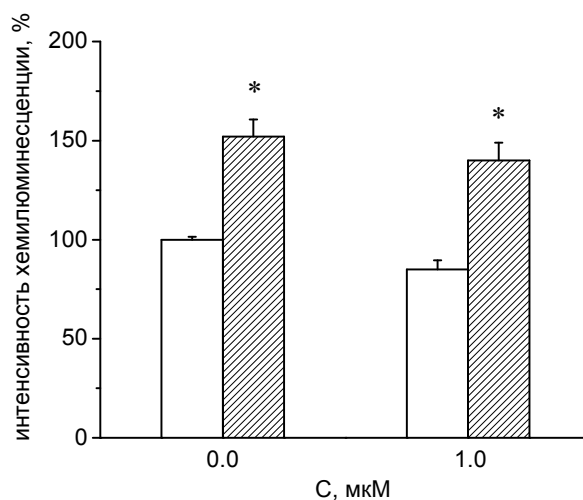


Рисунок 7. Влияние ротенона на интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов при действии КМП. Контроль (без штриховки). Опыт – действие КМП (штриховка). Ось абсцисс – концентрации ротенона. Ось ординат – интенсивность хемилюминесценции (максимальные значения) в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения). Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$)

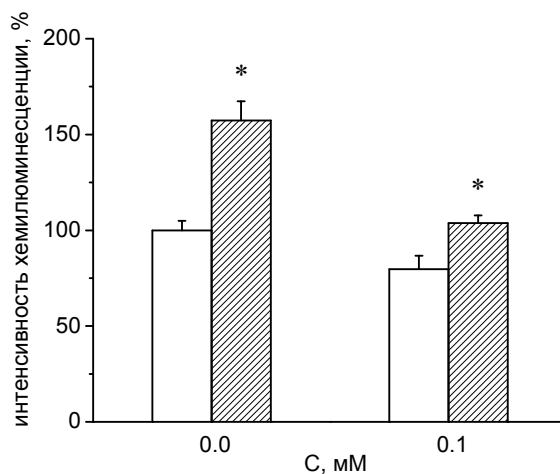


Рисунок 8. Влияние сульфата цинка на интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов при действии КМП. Контроль (без штриховки). Опыт – действие КМП (штриховка). Ось абсцисс – концентрации $ZnSO_4$. Ось ординат – интенсивность хемилюминесценции (максимальные значения) в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения). Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$)

Различия между группами, обусловленные действием КМП, в этом случае полностью сохраняются. Этот факт не позволяет сделать вывод о каком-либо участии электрон-транспортной цепи митохондрий в данном эффекте использованного режима КМП. Добавка сульфата цинка – блокатора протонных каналов VSOP/HV1 снизила интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов в контроле на 22%, а в опыте на 34% (рис. 8).

Большая степень ослабления респираторного взрыва в опыте после действия КМП в условиях ингибирования протонных каналов, по-видимому, обусловлена их ролью в поддержании производства супероксида и поступления кальция в клетки, за счет предотвращения деполяризации мембраны и клеточного подкисления, вызванных электрогенностью НАДФН-оксидазы, осуществляющей перенос электронов через мембрану [12, 13]. Очевидно, что при возросшей нагрузке в результате процесса преактивации (опытная группа) блокировка этих каналов может проявиться в большей степени, чем в менее активном состоянии (контрольная группа), что и наблюдается в эксперименте. По-видимому, в этой связи индекс прайминга нейтрофилов при действии КМП в присутствии 100 мкМ сульфата цинка снизился на 16 %.

Список литературы / References:

1. Mattsson M.O., Simkó M. Grouping of experimental conditions as an approach to evaluate effects of extremely low-frequency magnetic fields on oxidative response in *in vitro* studies. *Frontiers in Public Health*, 2014, vol. 2 (132), pp. 1-11.
2. Barnes F.S., Greenebaum B. The effects of weak magnetic field on radical pairs. *Bioelectromagnetics*, 2015, vol. 36, pp. 45-54.
3. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Действие комбинированных магнитных полей с очень слабой переменной низкочастотной компонентой на люминолзависимую хемилюминесценцию крови млекопитающих. *Биофизика*, 2015, т. 60, № 3, с. 530-533. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The action of combined magnetic fields with a very weak low-frequency alternating component on luminol-dependent chemiluminescence in mammalian blood. *Biophysics (Moscow)*, 2015, vol. 60, no. 3, pp. 429-432]
4. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Действие слабых магнитных полей на хемилюминесценцию крови человека. *Биофизика*, 2016, т. 61, № 1, с. 126-130. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The effect of weak magnetic fields on the chemiluminescence of human blood. *Biophysics (Moscow)*, 2016, vol. 61, no. 1, pp. 105-108.]
5. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Праймирование респираторного взрыва у нейтрофилов *in vitro* при действии слабых комбинированных постоянного и низкочастотного переменного магнитных полей. *Биофизика*, 2016, т. 61, № 3, с. 510-515. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. Priming of the respiratory burst in neutrophils exposed to a combination of weak constant and alternating low-frequency magnetic fields *in vitro*. *Biophysics (Moscow)*, 2016, vol. 61, no. 3, pp. 429-434.]
6. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Влияние слабых магнитных полей на продукцию активных форм кислорода в нейтрофилах. *Биофизика*, 2016, т. 61, № 6, с. 1159-1163. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The effect of weak magnetic fields on the production of reactive oxygen species in neutrophils. *Biophysics (Moscow)*, 2016, vol. 61, no. 6, pp. 959-962.]
7. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Новиков Г.В., Фесенко Е.Е. Роль липидной пероксидации и миелопероксидазы в праймировании респираторного взрыва в нейтрофилах при действии комбинированных постоянного и переменного магнитных полей. *Биофизика*, 2017, т. 62, № 5, с. 926-931. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Novikov G.V., Fesenko E.E. The role of lipid peroxidation and myeloperoxidase in priming a respiratory burst in neutrophils under the action of combined constant and alternating magnetic fields. *Biophysics (Moscow)*, 2017, vol. 62, no. 5, pp. 759-763.]
8. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Роль гидроксильных радикалов и ионов кальция в праймировании респираторного взрыва в нейтрофилах и усилении люминол-зависимой хемилюминесценции крови при действии комбинированных магнитных полей с очень слабой переменной низкочастотной компонентой. *Биофизика*, 2017, т. 62, № 3, с. 547-551. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The role of hydroxyl radicals and calcium ions in the priming of a respiratory burst in neutrophils and the increase in luminol-dependent blood chemiluminescence on exposure to combined magnetic fields with a very weak low-frequency alternating component. *Biophysics (Moscow)*, 2017, vol. 62, no. 3, pp. 440-443.]
9. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Роль кислорода в прайминге нейтрофилов при действии слабого магнитного поля. *Биофизика*, 2018, т. 63, № 2, с. 277-281. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The role of oxygen in the priming of neutrophils on exposure to a weak magnetic field. *Biophysics (Moscow)*, 2018, vol. 63, no. 2, pp. 56-59.]
10. Zhang H., Zhang Z., Mo W. et al. Shielding of the geomagnetic field reduces hydrogen peroxide production in human neuroblastoma cell and inhibits the activity of CuZn superoxide dismutase. *Protein Cell*, 2017, vol. 8, no. 7, pp. 527-537.
11. Martino C.F., Castello P.R. Modulation of hydrogen peroxide production in cellular systems by low level magnetic fields. *PLoS ONE*, 2011, vol. 6, no. 8, e22753.
12. Poltanski P., Rajkowska E., Brodecki M. et al. Combined effect of X-ray radiation and static magnetic fields on reactive oxygen species in rat lymphocytes *in vitro*. *Bioelectromagnetics*, 2013, vol. 34, pp. 333-336.
13. Binhi V.N., Prato F.S. Biological effects of the hypomagnetic field: Analytical review of experiments and theories. *PLoS ONE*, 2017, vol. 12, no. 6, e0179340.

14. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Влияние «нулевого» магнитного поля на продукцию активных форм кислорода в нейтрофилах. *Биофизика*, 2018, т. 63, № 3, с. 484-488. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The effect of a “zero” magnetic field on the production of reactive oxygen species in neutrophils. *Biophysics (Moscow)*, 2018, vol. 63, no. 3, pp. 365-368.]
15. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Валеева Э.Р., Фесенко Е.Е. К вопросу о молекулярных механизмах действия «нулевого» магнитного поля на продукцию активных форм кислорода в неактивированных нейтрофилах. *Биофизика*, 2019, т. 64, № 4, с. 720-725. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Galeeva E.R., Fesenko E.E. On molecular mechanisms of the effect of a “zero” magnetic field on the production of reactive oxygen species in inactivated neutrophils. *Biofizika*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 720-725. (In Russ.)]
16. Новиков В.В., Пономарев В.О., Новиков Г.В., Кувичкин В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Эффекты и молекулярные механизмы биологического действия слабых и сверхслабых магнитных полей. *Биофизика*, 2010, т. 55, № 4, с. 631-639. [Novikov V.V., Ponomarev V.O., Novikov G.V., Kuvichin V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. Effects and molecular mechanisms of the biological action of weak and extremely weak magnetic fields. *Biophysics (Moscow)*, 2010, vol. 55, no. 4, pp. 565-572.]
17. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. *Успехи биологической химии*, 2009, т. 49, с. 341-388. [Vladimirov Yu.A., Proskurina E.V. Free radicals and cellular chemiluminescence. *Usp. Biol. Himii*, 2009, vol. 49, pp. 341-388. (In Russ.)]
18. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Новикова Н.И., Фесенко Е.Е. Влияние различных химических агентов на прайминг нейтрофилов в слабых комбинированных магнитных полях. *Биофизика*, 2019, т. 64, № 2, с. 290-295. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Novikova N.I., Fesenko E.E. The effects of various chemical agents on priming of neutrophils exposed to weak combined magnetic fields. *Biophysics (Moscow)*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 209-213.]
19. Stolk J., Hiltermann T.J., Dijkman J.H., Verhoeven A.J. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1994, vol. 11, no. 1, pp. 95-102.
20. Vejrazka M., Míček R., Stípek S. Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, vol. 1722, no. 2, pp. 143-147.
21. Castor L.R., Locatelli K.A., Ximenes V.F. Pro-oxidant activity of apocynin radical. *Free Radic. Biol. Med.*, 2010, vol. 48, no. 12, pp. 1636-1643.

ON MOLECULAR MECHANISMS OF THE EFFECT OF MAGNETIC CONDITIONS (ZERO AND COMBINED MAGNETIC FIELDS) ON THE PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN NEUTROPHILS

Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E.

Institute of Cell Biophysics RAS

Institutskaya str., 3, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: docmag@mail.ru

Abstract. It has been shown that the decrease in intensity of 2,7-dichlorodihydrofluorescein oxidation processes in neutrophils under hypomagnetic field exposure 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'-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 unactivated neutrophils increased and it was 2 time 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. All this sharply distinguishes the effect of the “zero” field from the effects of combined magnetic fields, which are based on the effect on the calcium-dependent regulatory mechanisms that control the respiratory burst in neutrophils.

Key words: *hypomagnetic conditions, combined magnetic fields, fluorescence, chemiluminescence, reactive oxygen species, neutrophils.*