

8. Pollack G. *The fourth phase of water: beyond solid, liquid and vapor*. Ebner & Sons publisher, Seattle WA, USA, 2013, 357 p, http://www.ivoviz.hu/files/GHP_thefourthphaseofwater.pdf.
9. So E., Stahlberg R., Pollack G.H. Exclusion zone as intermediate between ice and water. *WIT Transactions on Ecology and The Environment*, 2011, vol. 153, doi:10.2495/WS110011.
10. Дерягин Б.В. Мир коллоидно-поверхностных явлений. *Вестник АН СССР*, 1990, т. 9, с. 68-74. [Derjagin B.V. The world of colloid-surface phenomena. *Vestnik AN SSSR*, 1990, vol. 9, pp. 68-74. (In Russ.)]
11. Zheng J., Chin W-C, Khijniak E. [et al.] Surfaces and interfacial water: Evidence that hydrophilic surfaces have long-range impact. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2006, vol. 127, pp. 19-27, <http://courses.washington.edu/bioe555/Zheng.pdf>.
12. Дерягин Б.В. Новые данные о сверхплотной воде. *УФН*, 1970, т. 4, с. 726-728. http://ufn.ru/ufn70/ufn70_4/Russian/r704j.pdf. [Derjagin B.V. New data on superdense water. *Physics – Uspekhi*, 1970, vol. 13, no. 2, pp. 305-308. http://ufn.ru/ufn70/ufn70_4/Russian/r704j.pdf (In Russ.)]
13. Rousseau D.L., Porto S.P. Polywater: Polymer or Artifact? *Science*, 1970, vol. 167, no. 3926, pp. 1715-9.
14. Davis R.E., Rousseau D.L., Board R.D. "Polywater:" evidence from electron spectroscopy for chemical analysis (ESCA) of a complex salt mixture. *Science*, 1971, vol. 171, no. 3967, pp. 167-70.
15. Rousseau D.L. "Polywater" and sweat: similarities between the infrared spectra. *Science*, 1971, vol. 171, no. 3967, pp. 170-172.

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ СЛАБЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ И НЕЙТРОФИЛОВ

Новиков В.В.¹, Яблокова Е.В.¹, Новикова Н.И.², Пономарев В.О.¹

¹ФГБУН Институт биофизики клетки РАН

ул. Институтская, 3, г. Пушино, Московская обл., 142290, РФ

e-mail: docmag@mail.ru

²Филиал ФГБУН Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

просп. Науки, 6, г. Пушино, Московская обл., 142290, РФ

Аннотация. Показано, что воздействие комбинированными постоянным (42 мкТл) и коллинеарным ему очень слабым переменным низкочастотным (1 Гц, 600 нТл; 4,4 Гц, 100 нТл; 16,5 Гц, 160 нТл) магнитными полями на гепаринизированную и разбавленную кровь при физиологических температурах вызывает значительное усиление ее хемилюминесценции после добавки люминола. Для проявления этого эффекта не требуется дополнительное применения химических активаторов респираторного взрыва. В отличие от этого, предварительное часовое экспонирование суспензии нейтрофилов в слабых КМП вызывает значительное усиление хемилюминесценции этих клеток только в ответ на введение малых концентраций активатора респираторного взрыва - формилированного пептида N-formyl-Met-Leu-Phe в присутствии люминола. Сама реакция нейтрофилов на введение люминола без активаторов респираторного взрыва слабо выражена.

Ключевые слова: магнитное поле, кровь, нейтрофилы, активные формы кислорода, хемилюминесценция.

SPECIALITIES OF INFLUENCE OF WEAK MAGNETIC FIELDS ON CHEMILUMINESCENCE OF WHOLE BLOOD AND NEUTROPHILS

Novikov V.V.¹, Yablokova E.V.¹, Novikova N.I.², Ponomarev V.O.¹

¹Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences

Institutskaya St., 3, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia

e-mail: docmag@mail.ru

²Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences

6 avenue of Science, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia

Abstract. It is shown that the combined effect of a static magnetic field (42 mT) and low-frequency collinear very weak alternating magnetic field with low frequency (1 Hz, 600 nT; 4.4 Hz, 100 nT; 16.5 Hz, 160 nT) on heparinized and diluted blood at physiological temperatures, resulted in a sharp increase in its chemiluminescence after addition of luminol. No additional use of chemical respiratory explosion activators is required for manifestation of this effect. In contrast, preliminary hourly exposure of a neutrophil suspension in weak magnetic fields significantly increases the chemiluminescence of these cells only in response to addition of small concentrations of the respiratory burst activator - the formylated peptide N-formyl-Met-Leu-Phe in presence of luminol. The response of the neutrophils on addition of luminol without activators of respiratory explosion is poorly expressed.

Key words: magnetic field, blood, neutrophils, reactive oxygen species, chemiluminescence.

Нами в экспериментах на цельной крови млекопитающих [1-3] и отдельных клеточных субпопуляциях (нейтрофилах) [4,5] методами активированной хемилюминесценции и флуоресцентной спектроскопии показано усиление генерации свободных радикалов и других активных форм кислорода (АФК) в результате действия комбинированных постоянного и низкочастотного переменного магнитных полей (КМП) с очень слабой переменной составляющей (менее 1 мкТл). В этих работах был в частности зарегистрирован праймирующий

эффект слабых комбинированных постоянного (42 мкТл) и коллинеарного ему низкочастотного переменного (1; 4,4 и 16,5 Гц; 0,86 мкТл) МП, который проявлялся как более выраженное усиление хемилюминесценции суспензии нейтрофилов, после их предварительной обработки КМП, в ответ на введение бактериального пептида N-формил-Met-Leu-Phe (fMLP) или форболового эфира форбол-12-меристат-13-ацетата в присутствии люминола. Было показано, что низкие концентрации хелатора внутриклеточного кальция ВАРТА АМ блокируют этот эффект слабых КМП [6]. При этом уровень внеклеточного кальция практически не влиял на степень выраженности праймирования респираторного взрыва.

Для всестороннего анализа механизмов обнаруженных нами эффектов представляет интерес выяснение особенностей реакции на воздействие КМП у цельной крови и нейтрофилов.

Материалы и методы. Работа выполнена на нейтрофилах мышей. Для получения нейтрофилов использовали лабораторных мышей самцов линии Balb массой 22–25 г. 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 5 мин при 600 g. Супернатант декантировали, а осадок разводили в 1 мл бескальциевого раствора Хенкса и оставляли на 40 мин при 4° С. 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.

Для исследований использовались также свежие образцы крови с гепарином в качестве антикоагулянта. Кровь разводили стандартной средой Хенкса с $pH = 7,4$. В основном для опытов готовили образцы следующего состава и объема 200 мкл среды Хенкса, 25 мкл гепаринизированной (20 М.Е. на 1 мл) крови (предварительно разведенной в соотношении 1 к 3).

Нейтрофилы инкубировали при $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$ в концентрации 1 млн/мл по 0,25 мл в полипропиленовых пробирках. Типичное время инкубации составляло 1 час. Заданная температура поддерживалась циркуляционным термостатом. Аналогичным образом инкубировали образцы разведенной в 30 раз крови. Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле с постоянной составляющей ~ 42 мкТл и уровнем магнитного фона на 50 Гц 15–50 нТл, соответствующим этим показателям в экспериментальных группах, за исключение заданной искусственно переменной компоненты поля. Установка для воздействия слабыми КМП состояла из двух пар коаксиально расположенных колец Гельмгольца диаметром 140 см, ориентированных вдоль вектора геомагнитного поля. На одну пару колец подавали постоянный ток для формирования заданной величины постоянной составляющей КМП $42 \pm 0,1$ мкТл. На вторую пару колец подавали электрический ток от генератора синусоидальных сигналов 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 опытах [1–7], 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).

После часовой инкубации измерялась интенсивность хемилюминесценции образцов крови в контрольных и опытных случаях после добавки в них раствора люминола (Enzo Life Sciences, США) в концентрации 0,35 мМ. В случаях с суспензией нейтрофилов помимо люминола добавляли активатор генерации АФК - хемотаксический формилированный пептид N-формил-Met-Leu-Phe (Sigma, США) в концентрации 1 мкМ. В работе использован хемилюминиметр Lum-5773 (ООО ДИСОфт, Россия). Для анализа данных хемилюминесценции использована программа PowerGraph. Результаты статистически обработаны с применением t -критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. В результате экспериментов обнаружено, что воздействие слабых КМП с параметрами, соответствующими диапазону естественных (геомагнитных) и искусственных (техногенных) магнитных полей – нанотесловые интенсивности и низкие частоты, на гепаринизированную и разбавленную кровь при физиологических температурах вызывает значительное усиление ее хемилюминесценции после добавки люминола (см. рис. 1). Для проявления этого эффекта не требуется дополнительного применения химических активаторов респираторного взрыва.

В случае же обработки полев суспензии нейтрофилов показано, что их предварительное часовое экспонирование в слабых КМП вызывает значительное усиление хемилюминесценции клеток только в ответ на введение малых концентраций активатора респираторного взрыва - формилированного пептида N-formyl-Met-Leu-Phe в присутствии люминола (см. рис. 2). Сама реакция этих клеток на введение люминола без активаторов респираторного взрыва слабо выражена.

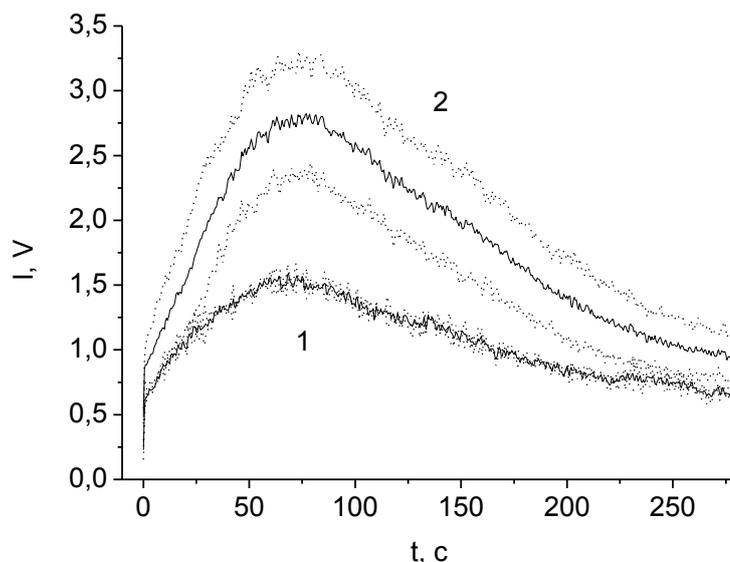


Рисунок 1 – Влияние слабых КМП (постоянное МП 42 мкТл, переменное МП 16,5 Гц, 160 нТл; 4,4 Гц, 100 нТл; 1 Гц, 600 нТл) на хемилюминесценцию цельной крови при добавлении люминола. Контрольные (1) и опытные (2) образцы инкубировали 60 минут при 37°C. Пунктирными линиями обозначены стандартные отклонения.

Ось абсцисс – время в секундах (t, c) с момента введения люминола; Ось ординат – интенсивность хемилюминесценции в V (I), где 1000 фотон/с=1V

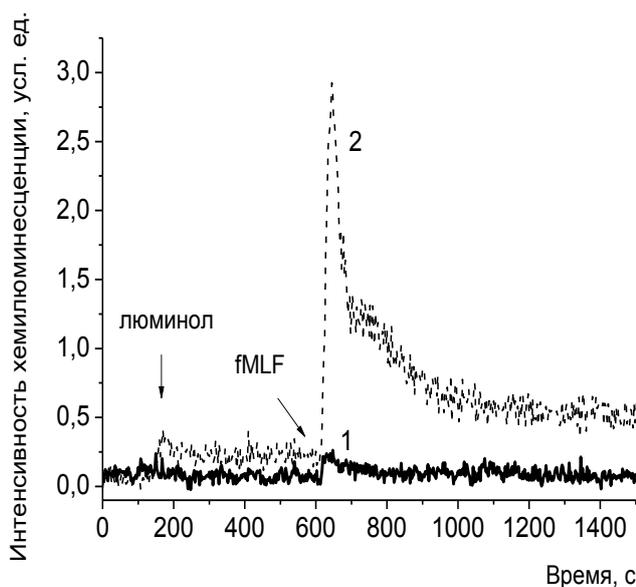


Рисунок 2 – Влияние предварительной обработки слабым КМП (постоянное МП 42 мкТл, переменное МП 16,5 Гц, 160 нТл; 4,4 Гц, 100 нТл; 1 Гц, 600 нТл) на хемилюминесценцию нейтрофилов из брюшной полости мыши при стимуляции клеток fMLP в присутствии люминола. Контрольные (1) и опытные (2) образцы инкубировали при 37 °С

Эти особенности люминол-зависимой хемилюминесценции цельной крови и отдельных нейтрофилов показывают не полную идентичность процессов в этих двух случаях, и заставляют провести более детальный анализ источников свободных радикалов в крови млекопитающих, реагирующих на действие слабых КМП. Известно, что одними из основных продуцентов АФК в крови являются фагоцитирующие клетки [8], в том числе нейтрофилы. Генерация АФК в активированных нейтрофилах в основном инициируется в результате работы мультиферментного комплекса НАДФН – оксидазы, локализованного в плазматической мембране, и производящего супероксид анион-радикал [8-10]. При праймировании респираторного взрыва в нейтрофилах, как это отмечается и в наших опытах, следует ожидать активации протеинкиназ и процессов фосфорилирования оксидазных компонентов [9,11,12]. Помимо нейтрофилов, источниками АФК в крови являются мононуклеарные клетки, в которых важную роль в генерации АФК выполняют митохондрии, а также одноэлектронное восстановление кислорода, связанное с окислением двухвалентного железа в гемоглобине эритроцитов. По-

видимому, нужны специальные эксперименты, которые позволят уточнить вклад отдельных процессов в общую продукцию АФК в крови, усиливающуюся при действии слабых магнитных полей.

Работа поддержана грантом № 14-44-03676 р_центр_а РФФИ и Министерства инвестиций и инноваций Московской области.

Список литературы / References:

1. 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. (In Russ.)]

2. 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. (In Russ.)]

3. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Действие слабых магнитных полей на хемилюминесценцию крови у крыс в опытах *in vitro* и *in vivo*. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2016, т. 1, с. 23-27. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. Effects of weak magnetic fields on blood chemiluminescence in experiments on rats *in vitro* and *in vivo*. *Aktualnie voprosy biologicheskoy fiziki i himii*, 2016, vol. 1, pp. 23-25. (In Russ.)]

4. 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. (In Russ.)]

5. 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. (In Russ.)]

6. 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 respiratory burst in neutrophils and strengthening of the luminol-dependent blood chemiluminescence under the influence of combined magnetic fields with a very weak low-frequency alternating component. *Biophysika*, 2017, vol. 62, no. 3, pp. 547-551. (In Russ.)]

7. Novikov V.V., Novikov G.V., Fesenko E.E. Effect of weak combined static and extremely low-frequency alternating magnetic fields on tumor growth in mice bearing the Ehrlich ascites carcinoma. *Bioelectromagnetics*, 2009, vol. 30, pp. 343-351.

8. 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.)]

9. Маянский А.Н. НАДФН-оксидаза нейтрофилов: активация и регуляция. *Цитокины и воспаление*, 2007, т. 6, № 3, с. 3-13. [Mayanskiy A.N. NADPH-oxidase of neutrophils: activation and regulation. *Cytokines and inflammation*, 2007, vol. 6, no. 3, pp. 3-13. (In Russ.)]

10. Воробьева Н.В. NADPH-оксидаза нейтрофилов и заболевания, связанные с ее дисфункцией. *Иммунология*, 2013, т. 34, № 4, с. 227-233. [Vorobyeva N.V. NADPH-oxidase of neutrophils and diseases associated with its dysfunction. *Immunology*, 2013, vol. 34, no. 4, pp. 227-233. (In Russ.)]

11. El-Benna J., Dang P.M., Gougerot-Pocidallo M.A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol.*, 2008, vol. 30, pp. 279-289.

12. Sheppard F.R., Kelher M.R., Moore E.E. et al. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J. Leukocyte Biol.*, 2005, vol. 78, pp. 1025-1042.