

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ «НУЛЕВОГО» И КОМБИНИРОВАННЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В НЕЙТРОФИЛАХ

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

¹ФГБУН Институт биофизики клетки РАН

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

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

проспект Науки, 6, г. Пущино Московской области, 142290, РФ

Поступила в редакцию: 15.05.18

Аннотация. Показано, что 1,5 часовое экспонирование перитонеальных нейтрофилов мышей при физиологических температурах в слабых комбинированных постоянном (42 мкТл) и коллинеарном ему низкочастотном переменном (сумма частот 1,0; 4,4 и 16,5 Гц, амплитуда 0,86 мкТл) магнитных полях вызывает усиление внутриклеточной продукции активных форм кислорода, регистрируемое по изменению интенсивности флуоресценции продуктов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина и дигидрорадамина 123. Дополнительное введение малых концентраций активаторов респираторного взрыва (формилированного пептида N-formyl-Met-Leu-Phe или форболового эфира форбол-12-меристат-13-ацетата) значительно усиливает степень выраженности этого эффекта слабых магнитных полей. В отличие от этого экспонирование нейтрофилов при магнитном экранировании в гипомагнитных условиях (остаточное постоянное магнитное поле 20 нТл) вызывает снижение внутриклеточной продукции активных форм кислорода. При дополнительном введении малых концентраций активаторов респираторного взрыва этот эффект гипомагнитного поля сохраняется.

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

Возможность влияния на продукцию активных форм кислорода (АФК) рассматривается как один из перспективных подходов к анализу механизмов биологического действия слабых магнитных полей [1-4]. Ранее в экспериментах на цельной крови млекопитающих и отдельных клеточных субпопуляциях (нейтрофилах) методами активированной хемилюминесценции и флуоресцентной спектроскопии нами было показано усиление генерации свободных радикалов и других активных форм кислорода и хлора в результате действия комбинированных постоянного и низкочастотного переменного магнитных полей (КМП) с очень слабой переменной составляющей (менее 1 мкТл) [5-12]. В отдельных опытах мы показали, что «нулевое» магнитное поле (гипомагнитные условия - остаточное постоянное магнитное поле 20 нТл) вызывает снижение базовой продукции внутриклеточных АФК в нейтрофилах. В этой связи представляет интерес сравнительный анализ эффектов КМП и «нулевого» МП, так как это может способствовать выявлению первичных мишеней и биофизических механизмов трансдукции магнитного сигнала в суспензии нейтрофилов.

На данном этапе для анализа эффектов этих МП мы применили метод флуоресцентной спектроскопии с использованием хорошо изученных проникающих в клетки флуоресцентных зондов на АФК - 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата (H₂DCF-DA) и дигидрорадамина 123 (DHR 123) [13-16]. H₂DCF-DA проникает в клетку, где под действием внутриклеточных эстераз переходит в форму H₂DCF. H₂DCF – слабо флуоресцирующий агент, который в реакциях с окислителями превращается в сильно флуоресцирующий продукт – дихлорфлуоресцеин (DCF). Дигидрорадамин 123 так же, как и H₂DCF-DA, является липофильным соединением, которое легко проникает в клетку. При окислении DHR 123 превращается во флуоресцирующий родамин 123. При окислении одна из аминогрупп красителя приобретает заряд, что препятствует его выходу из клетки в окисленной форме.

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 (Пущино 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 ультразвуковой 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 °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 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.

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 [17], 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 $37,0 \pm 0,2$ °С в концентрации 1 млн кл/мл по 250 мкл в полипропиленовых пробирках типа Эппендорф. Типичное время инкубации составляло 1,5 часа. При экспонировании суспензии нейтрофилов в гипомагнитном поле для формирования гипомагнитных условий использовалась установка, которая состояла из трех, вставленных соосно один в другой, цилиндрических экранов МП из пермаллоя (толщиной 1 мм), закрытых крышками. Величины остаточных постоянных МП не превышали 20 нТл. Контрольные (геомагнитное поле) и опытные образцы по 10 штук инкубировали при $37,0 \pm 0,2$ °С 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.

После 1,5 часовой инкубации к суспензии нейтрофилов добавляли флуоресцентные зонды на внутриклеточные АФК $H_2DCF-DA$ или DHR 123 до конечной концентрации 0,01 мг/мл. В ряд контрольных и опытных образцов также добавляли один из активаторов генерации АФК: хемотаксический формилированный пептид N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF) (Sigma, США) в концентрациях 0,1-0,5 мкМ или форбол-12-меристат-13-ацетат (ФМА) (Sigma, США) в концентрациях 0,01-0,05 мкМ. Пробы продолжали инкубировать при 37 °С в темноте, чтобы минимизировать фотооксидацию красителей. В случае с $H_2DCF-DA$ время инкубации составило 30 минут. При использовании DHR 123 – 10 минут. 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 длине волны 488 нм.

Результаты статистически обработаны с применением t -критерия Стьюдента. Часть результатов 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 слабых КМП вызывает значительное (на 22 %) увеличение интенсивности флуоресценции внутриклеточного DCF (рис. 1). При использовании дополнительной стимуляции клеток после воздействия КМП с помощью fMLF (0,2 мкМ) степень различий между контролем и опытом увеличивается до 43 %. Стимуляция нейтрофилов активатором ФМА (0,02 мкМ) вызывает увеличение интенсивности флуоресценции внутриклеточного DCF в контрольных группах в среднем на 35 %, а проведенная после обработки полем, приводит к двукратному усилению интенсивности флуоресценции в опыте по сравнению с соответствующим контролем (рис. 1).

Интенсивность флуоресценции родамина 123 в опыте (воздействие КМП без дополнительной стимуляции) существенно выше (на 47 %) чем в контроле (рис. 2). Использование активатора ФМА приводит к двукратному усилению флуоресценции в контрольных группах. После предварительной обработки суспензии клеток КМП и введения ФМА различия между контролем и опытом достигают 100 % (рис. 2). Следует отметить, что максимальные значения интенсивности флуоресценции родамина 123 в этой серии опытов отмечены при использовании дополнительной стимуляции ФМА. При воздействии КМП наблюдается рост флуоресценции DCF и родамина 123 приблизительно в два раза по сравнению с контрольными образцами, также простимулированными ФМА (рис. 1, 2).

Экспонирование перитонеальных нейтрофилов в гипомагнитных условиях (при ослаблении геомагнитного поля \sim в 2000 раз) вызывает значительное (на 25 %) уменьшение интенсивности флуоресценции внутриклеточного DCF (Рис. 3). При использовании дополнительной стимуляции клеток с помощью fMLF (0,5 мкМ) степень различий между контролем (геомагнитное поле) и опытом (гипомагнитное поле) сохраняется (\sim 23 %). Стимуляция нейтрофилов активатором ФМА (0,05 мкМ) вызывает увеличение интенсивности флуоресценции внутриклеточного DCF в контрольных группах в среднем на 30 %, а проведенная после пребывания в гипомагнитных условиях, на 22 % по сравнению с соответствующим контролем (рис. 3).

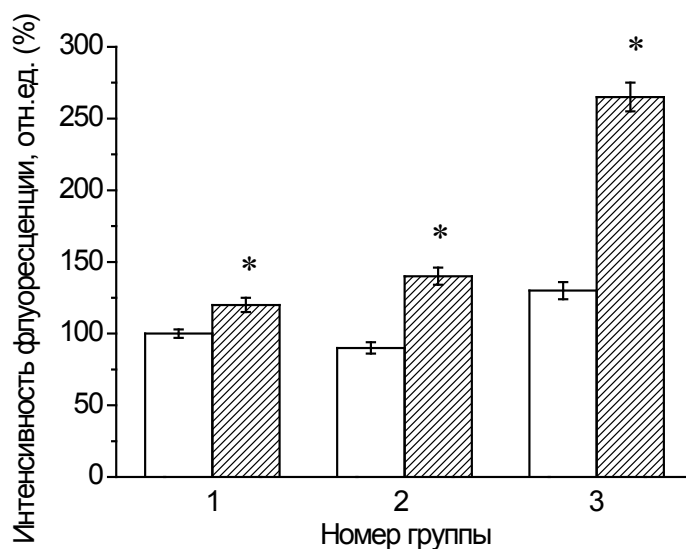


Рисунок 1. Влияние слабых комбинированных магнитных полей (постоянное МП 42 мкТл; переменное МП 0,86 мкТл - сумма трех частот 1; 4,4 и 16,5 Гц при соотношении амплитуд 6; 1 и 1,6) на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в отсутствии и в присутствии активаторов респираторного взрыва.

Ось ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю без активаторов (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$).

Ось абсцисс – номер группы.

1 – контроль и опыт без активаторов.

2 – контроль и опыт с добавками fMLF.

3 – контроль и опыт с добавками ФМА.

Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$)

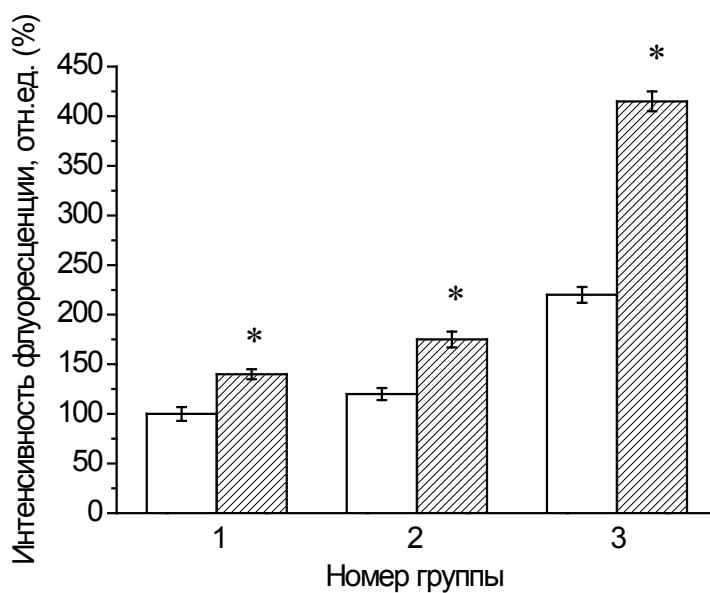


Рисунок 2. Влияние слабых комбинированных магнитных полей (постоянное МП 42 мкТл; переменное МП 0,86 мкТл - сумма трех частот 1; 4,4 и 16,5 Гц при соотношении амплитуд 6; 1 и 1,6) на интенсивность флуоресценции родамина 123 в суспензии нейтрофилов в отсутствии и в присутствии активаторов респираторного взрыва.

Ось ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю без активаторов (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$).

Ось абсцисс – номер группы.

1 – контроль и опыт без активаторов.

2 – контроль и опыт с добавками fMLF.

3 – контроль и опыт с добавками ФМА.

Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$)

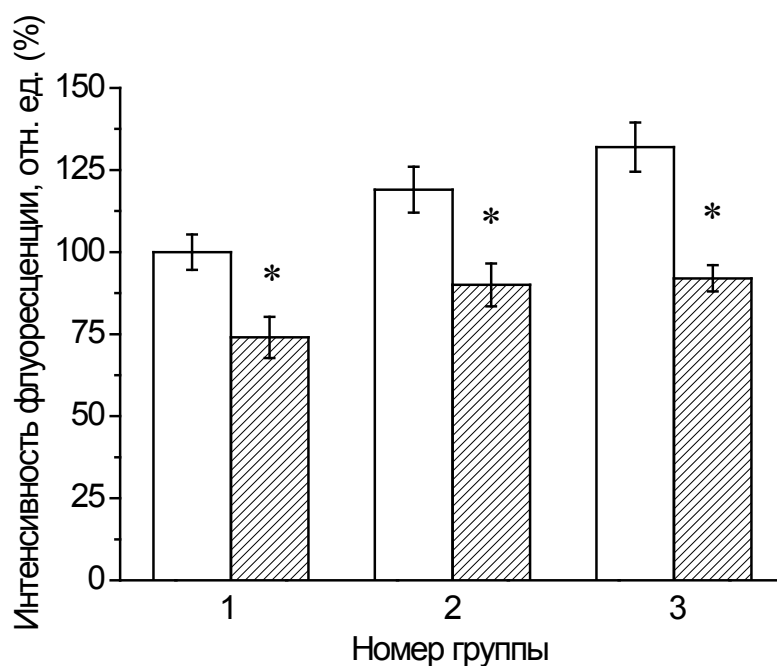


Рисунок 3. Влияние гипомангнитного поля на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в отсутствие и в присутствии активаторов респираторного взрыва. Ось ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю без активаторов (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$). Ось абсцисс – номер группы.
 1 – контроль и опыт без активаторов.
 2 – контроль и опыт с добавками fMLF.
 3 – контроль и опыт с добавками ФМА.
 Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$)

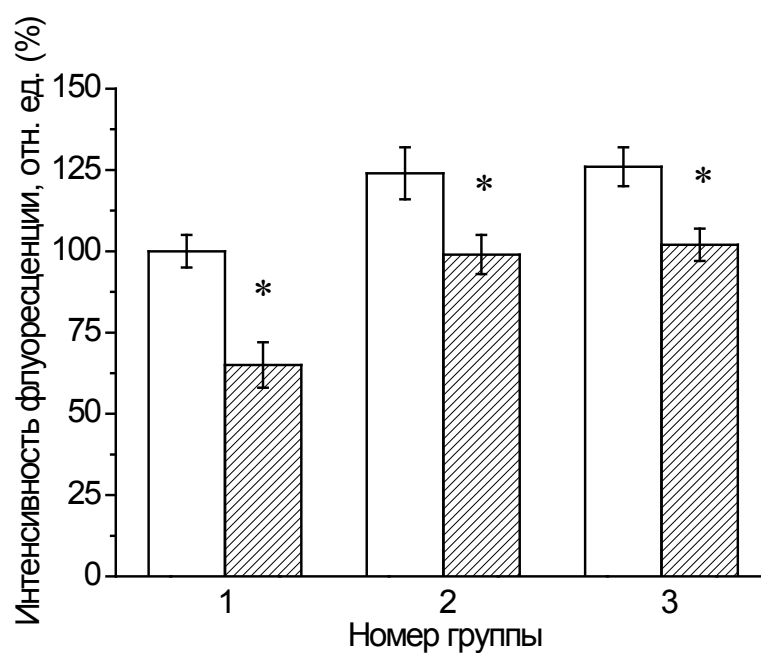


Рисунок 4. Влияние гипомангнитного поля на интенсивность флуоресценции родамина 123 в суспензии нейтрофилов в отсутствие и в присутствии активаторов респираторного взрыва. Ось ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю без активаторов (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$). Ось абсцисс – номер группы.
 1 – контроль и опыт без активаторов.
 2 - контроль и опыт с добавками fMLF.
 3 - контроль и опыт с добавками ФМА.
 Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$)

Интенсивность флуоресценции родамина 123 в опыте (гипомагнитные условия без дополнительной стимуляции) существенно ниже (на 35 %) чем в контроле (рис. 4). Эффект дополнительной стимуляции с помощью fMLF составляет 23 % в контроле и 35 % в опыте. В этом случае (стимуляция fMLF) различия между контролем и опытом составляют 20 %. Аналогичным образом проявляется эффект дополнительной стимуляции нейтрофилов с помощью ФМА (рис. 4).

Таким образом, воздействие гипомагнитных условий вызывает снижение базовой продукции внутриклеточных АФК в нейтрофилах, что отмечается во всех опытах с обоими флуоресцирующими зондами. В опытах с дополнительной последующей стимуляцией нейтрофилов химическими активаторами респираторного взрыва fMLF или ФМА этот эффект действия гипомагнитного поля также проявляется, но обусловлен в большей степени исходной разницей в продукции АФК, чем нарушением ответа нейтрофилов на эти активаторы.

Известными сайтами образования внутриклеточных АФК в нейтрофилах, являются фагосомы, однако, АФК могут синтезироваться и вне фагосом, в цитохром b-содержащих гранулах [18-20]. Помимо НАДФН-оксидазы в фагоцитах есть и другие АФК-образующие системы (например, НАДФН-оксидазы, включающие другие члены NOX-семейства [18], NO-синтазы [19], а также единичные митохондрии [18-20]). Но именно ферментный комплекс оксидазы фагоцитов, содержащей NOX2, образует значительно более высокий уровень АФК, чем другие клеточные оксидазы [18-20]. Сборка оксидазы на цитоплазматической мембране ведет к выходу АФК во внеклеточное окружение (внеклеточные АФК), а сборка оксидазы на внутриклеточных мембранах приводит к синтезу АФК, остающихся внутри мембранных органелл (внутриклеточные АФК). Ключевым моментом в регуляции активности НАДФН-оксидазы нейтрофилов, является степень фосфорилирования ее субъединиц, определяющая возможность сборки этого ферментативного комплекса в мембране из нескольких специфических цитоплазматических и мембранных белков [21,22]. Фосфорилирование субъединиц НАДФН-оксидазы находится под контролем прежде всего протеинкиназы С, активность которой сильно зависит от уровня внутриклеточного Ca^{2+} [19-22], а также сопряжена с активностью фосфолипазы С, обеспечивающей уровень инозитолтрифосфата (стимулирует выход ионов кальция из эндоплазматического ретикула) и диацилглицерола (напрямую активирует протеинкиназу С).

На основании полученных нами данных можно предположить, что в гипомагнитных условиях тормозятся именно процессы фосфорилирования компонентов НАДФН-оксидазы, что и приводит к снижению внутриклеточной продукции АФК. Напротив, при действии комбинированных магнитных полей с определенными нами параметрами отмечается преактивация (прайминг) нейтрофилов, блокируемая низкими концентрациями внутриклеточного хелатора Ca^{2+} [7,9], что также свидетельствует об участии процессов фосфорилирования НАДФН-оксидазы в механизме биологического действия слабого МП. Без сомнения, эти вопросы заслуживают специальных детальных исследований.

Список литературы / References:

1. Бинги В.Н. *Принципы электромагнитной биофизики*. М: Физматлит, 2011, 592 с. [Binhi V.N. *Principles of Electromagnetic Biophysics*. Moscow: Fizmatlit, 2011, 592 p. (In Russ.)]
2. 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*, 2010, vol. 55, no. 4, pp. 631-639. (In Russ.)]
3. Бучаченко А.Л. Магнитно-зависимые молекулярные и химические процессы в биохимии, генетике и медицине. *Успехи химии*, 2014, т. 83, № 1, с. 1-12. [Buchachenko A.L. Magnetic-dependent molecular and chemical processes in biochemistry, genetics and medicine. *Usp. Khim*, 2014, vol. 83, no. 1, pp. 1-12. (In Russ.)]
4. Пономарев В.О., Новиков В.В. Действие низкочастотных переменных магнитных полей на скорость биохимических реакций, приводящих к образованию активных форм кислорода. *Биофизика*, 2009, т. 54, № 2, с. 235-241. [Ponomarev V.O., Novikov V.V. Effect of low-frequency alternating magnetic fields on the rate of biochemical reactions proceeding with formation of reactive oxygen species. *Biophysics*, 2009, vol. 54, no. 2, pp. 235-241. (In Russ.)]
5. 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*, 2015, vol. 60, no. 3, pp. 530-530. (In Russ.)]
6. 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*, 2016, vol. 61, no. 1, pp. 126-130. (In Russ.)]
7. 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*, 2016, vol. 61, no. 3, pp. 510-515. (In Russ.)]

8. 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*, 2016, vol. 61, no. 6, pp. 1159-1163. (In Russ.)]

9. 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*, 2017, vol. 62, no. 3, pp. 547-551. (In Russ.)]

10. 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*, 2017, vol. 62, no. 5, pp. 926-931. (In Russ.)]

11. 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*, 2018, vol. 63, no. 2, pp. 277-281. (In Russ.)]

12. 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 «zero» magnetic field on production of reactive oxygen species in neutrophils. *Biophysics*, 2018, vol. 63, no. 3, pp. 484-488. (In Russ.)]

13. Crow J.P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 1997, vol. 1, iss. 2, pp. 145-157.

14. Hempel S.L., Buettner G.R., O'Malley Y.Q., Wessels D.A., Flaherty D.M. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med*, 1999, vol. 27, iss. 1-2, pp. 146-159.

15. Bartosz G. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clin Chim Acta*, 2006, vol. 368, pp. 53-76.

16. Freitas M., Lima J.L., Fernandes E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils oxidative burst. *Anal Chim Acta*, 2009, vol. 649, pp. 8-23.

17. 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.

18. 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.)]

19. 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.)]

20. Воробьева Н.В. НАДФН-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.)]

21. 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.

22. 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.

SPECIALITIES OF INFLUENCE OF «ZERO» AND COMBINED MAGNETIC FIELDS ON PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN NEUTROPHILS**Novikov V.V.¹, Yablokova E.V.¹, Novikova N.I.²**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 was shown that a 1.5 hour-long exposure of mouse peritoneal neutrophils to a combination of a weak constant magnetic field (42 μ T) and low-frequency alternating magnetic field collinear to the weak constant magnetic field (the sum of the frequencies 1.0, 4.4, and 16.5 Hz; amplitude, 0.86 μ T) at physiological temperatures caused an increase in the intracellular production of reactive oxygen species, as measured by the changes in fluorescence of the products of 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 oxidation. The effect of weak magnetic fields was significantly more pronounced in the presence of low concentrations of respiratory burst activators (N-formyl-Met–Leu–Phe or phorbol-12-meristate-13-acetate). In contrast, exposure of neutrophils under magnetic shielding in hypomagnetic conditions (residual static magnetic field of 20 nT) causes a decrease in intracellular production of reactive oxygen species. The effect of the hypomagnetic field is observed after respiratory burst activators applied at low concentrations are additionally added.

Key words: *magnetic field, hypomagnetic field, neutrophils, blood, reactive oxygen species, fluorescence.*