

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ МАГНИТНОЙ ДЕПРИВАЦИИ НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НЕЙТРОФИЛАМИ

Новиков В.В., Яблокова Е.В., Шаев И.А.

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: 06.07.2020

**Аннотация.** Предварительная инкубация суспензии нейтрофилов в «нулевом» магнитном поле (МП), создаваемом системой магнитных экранов (остаточное постоянное МП не более 20 нТл), приводит к существенному снижению интенсивности их люцигенин-зависимой хемиллюминесценции. При увеличении постоянного МП до 1 мкТл величина этого эффекта ослабленного МП сохраняется. При дальнейшем увеличении поля до 2,5 мкТл эффект действия поля исчезает, и снова проявляется при 7 мкТл. При величине постоянного МП 44 мкТл значения интенсивности хемиллюминесценции суспензии нейтрофилов уже не отличаются от контрольных. Добавка в среду для инкубации ингибитора NADPH-оксидазы, дифенилйодония, приводит к снижению интенсивности хемиллюминесценции, как в опытных, так и в контрольных образцах (геомагнитное поле). При этом, различия между группами, обусловленные действием «нулевого» поля, проявляются, как при меньших концентрациях дифенилйодония (2,5; 5; 10 мкМ), так и при больших его концентрациях (50; 100 мкМ), приблизительно в одинаковой степени. В отличие от этого, добавка разобщителя окисления и фосфорилирования в митохондриях - 2,4-динитрофенола, начиная с концентрации 5 мкМ и далее, вплоть до 200 мкМ, практически полностью нивелировала различия между контрольными и опытными образцами, которые проявлялись при более низких концентрациях этого ингибитора и в его отсутствии.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, нулевое магнитное поле, супероксидный-анион радикал, хемиллюминесценция, люцигенин, NADPH-оксидаза, митохондрии.

В литературе имеется ряд сообщений о снижении продукции активных форм кислорода (АФК) в гипомагнитных условиях в различных типах клеток и при различной экспозиции [1-4]. Ранее нами было показано, что 1,5 часовое экспонирование перитонеальных нейтрофилов мышей при магнитном экранировании в гипомагнитных условиях (остаточное постоянное магнитное поле менее 20 нТл) вызывает снижение внутриклеточной продукции активных форм кислорода, регистрируемое по изменению интенсивности флуоресценции продуктов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина и дигидрородамина 123 [5]. В нейтрофилах имеется несколько основных систем, в которых свободные радикалы образуются в качестве основного или побочного продукта. Прежде всего, это NADPH-оксидазы, мембранные ферменты, продуцирующие супероксидный анион-радикал по реакции одноэлектронного восстановления [6]. Кроме того, важной системой продукции АФК являются митохондрии [6]. О возможном участии электрон-транспортной цепи митохондрий в механизме эффекта «нулевого» поля свидетельствует снижение продукции АФК, регистрируемое методом флуоресцентной спектроскопии, при добавке ротенона, значительно более выраженное в опытных образцах, подвергшихся действию гипомагнитных условий [7]. В данной работе для оценки радикал-продуцирующей способности нейтрофилов после действия «нулевого» поля мы применили метод активированной хемиллюминесценции с использованием селективного зонда на супероксид-анион – люцигенина [8]. На этой экспериментальной модели с целью определения возможных источников продукции супероксида, реагирующих на действие гипомагнитных условий, мы применили ингибиторный анализ с использованием ингибитора NADPH-оксидазы – дифенилйодония [9] и разобщителя окисления и фосфорилирования в митохондриях – 2,4 динитрофенола [10].

### 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 цервикальной дислокации, и их брюшную полость промывали четырьмя миллилитрами охлажденного раствора Хенкса без кальция. Экссудат собирали пипеткой и центрифугировали в течение 5 мин при 600 g. Супернатант декантировали, а осадок разводили в 4 мл бескальциевого раствора Хенкса и оставляли 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 мМ NaCl, 6 мМ KCl, 1 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 5,5 мМ глюкозы, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 10 мМ HEPES, pH 7,4; Sigma, США) до концентрации 1 млн кл/мл.

Нейтрофилы инкубировали при  $37,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$  в концентрации 1 млн/мл по 0,25 мл в круглодонных кюветах из полистирола (диаметром 1,2 см и длиной 5,5 см), в которых затем измерялась хемилюминесценция. Типичное время инкубации составляло 40 минут. Заданная температура поддерживалась циркуляционным термостатом.

Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле (ГМП) с постоянной составляющей  $\sim 44$  мкТл и уровнем магнитного фона на 50 Гц 15-50 нТл при таком же температурном режиме, как и опытные образцы, и одновременно с ними. Опытные образцы помещались в установку для формирования гипомагнитных условий.

В опытах была использована специальная исследовательская аппаратура - установка для формирования гипомагнитных условий, которая позволяла получить высокую степень ослабления ГМП - до 10000 раз (остаточное постоянное поле не превышало 20 нТл), и существенно ослабляла переменные техногенные помехи (до единиц нТл). Эта установка детально описана нами ранее [11, 12]. Установка состояла из трех, вставленных соосно один в другой, цилиндрических магнитных экранов из пермаллоя (толщиной 1 мм). Определение остаточных полей внутри установки проводили прямым измерением с помощью феррозондового магнитометра Mag – 03 MS 100 (Bartington, UK). Для формирования экспериментального слабого однородного постоянного МП внутри этой установки был установлен специальный индуктор (соленоид), который мог быть подключен к источнику постоянного тока - для формирования слабого постоянного МП (ПМП) различной интенсивности (2,5; 7; 44 мкТл), используемого в ряде опытов. Размеры экспериментального участка внутри системы экранов (диаметр 20 см, длина 40 см) позволяли поместить одновременно в зону однородного слабого магнитного поля достаточное для опытов число экспериментальных образцов (не менее 6). Опыты повторяли не менее трех раз.

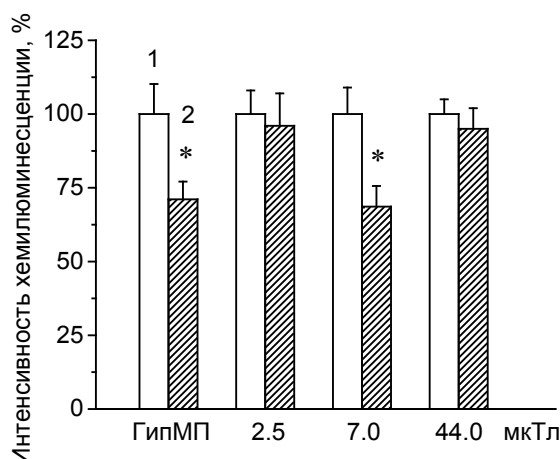
До начала инкубации к части образцов добавляли по отдельности различные химические добавки: ингибитор NADPH-оксидазы – хлорид дифенилйодония (Sigma, США) в различных концентрациях 2,5; 5; 10; 20; 50; 100 мкМ, предварительно растворенный в диметилсульфоксиде (ДМСО) (Sigma, США); а также разобцитель окислительного фосфорилирования – 2,4-динитрофенол (Sigma, США) в различных концентрациях 1; 4; 5; 10; 20; 200 мкМ и 2 мМ, предварительно растворенный также в ДМСО. Отдельно проверяли действие самой добавки ДМСО в конечной концентрации  $1 \times 10^{-3}$  М, соответствующей его присутствию в пробе с содержанием 10 мкМ дифенилйодония или 20 мкМ 2,4-динитрофенола. В ряде опытов эти ингибиторы вносили в пробы не до начала инкубации, а сразу после нее, но до введения люцигенина и регистрации хемилюминесценции.

После инкубации суспензии нейтрофилов измеряли интенсивность хемилюминесценции образцов в контрольных и опытных случаях после добавки в них раствора люцигенина (Enzo Life Sciences, США) в конечной концентрации 0,35 мМ. В работе был использован хемилюминометр Lum-1200 (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%.

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительная инкубация суспензии нейтрофилов в «нулевом» магнитном поле приводит к существенному снижению интенсивности люцигенин-зависимой хемилюминесценции (приблизительно на 30%) (рис. 1). При увеличении постоянного поля до 2,5 мкТл этот эффект не проявляется, при 7 мкТл снова возникает,



**Рисунок 1.** Влияние постоянного магнитного поля (ПМП) на интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов

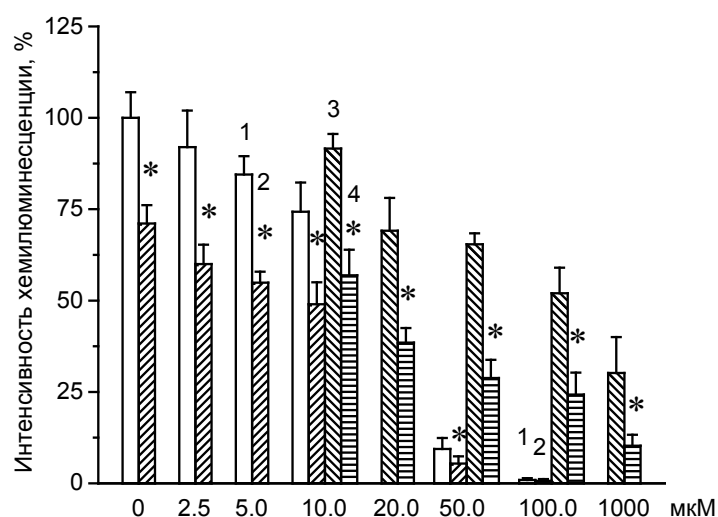
Ось ординат – максимальная интенсивность хемилюминесценции в процентах по отношению к контролю (средние значения и стандартные отклонения,  $n = 8$ ).

Ось абсцисс – величина ПМП в мкТ. «ГипоМП» соответствует ПМП не более 0,02 мкТл.

1 – контроль;

2 – опыт.

Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля ( $P < 0,05$ )



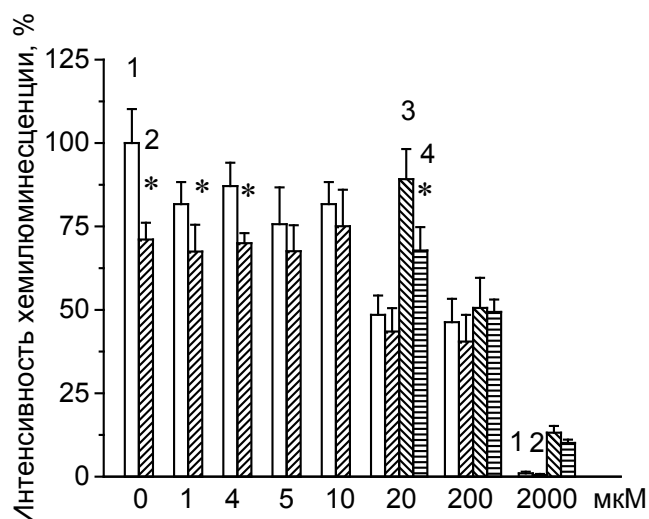
**Рисунок 2.** Влияние дифенилгидонтия на интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов после действия «нулевого» МП  
 Ось ординат – максимальная интенсивность хемилюминесценции в процентах по отношению к контролю (средние значения и стандартные отклонения,  $n = 6$ ).  
 Ось абсцисс – концентрация дифенилгидонтия в мкМ.  
 1 – контроль, добавка дифенилгидонтия перед инкубацией.  
 2 – опыт, добавка дифенилгидонтия перед инкубацией.  
 3 – контроль, добавка дифенилгидонтия после инкубацией.  
 4 – опыт, добавка дифенилгидонтия после инкубаций.  
 Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля ( $P < 0,05$ )

и исчезает при 44 мкТл (значение соответствует величине постоянного МП в контроле) (рис. 1). Такой мультипиковый (полиэкстремальный) характер зависимости ответа на слабое постоянное МП отмечался нами и ранее в опытах на нейтрофилах при регистрации продукции АФК методом флуоресценции [11], а также на других биологических объектах [13].

Добавка в среду для инкубации дифенилгидонтия приводит к снижению интенсивности хемилюминесценции, как в опытных, так и в контрольных образцах (Рис. 2). Эффект действия дифенилгидонтия приблизительно линейно зависит от его дозы (растет с увеличением концентрации), как в контрольных, так и в опытных случаях (рис. 2). При этом, различия между группами, обусловленные действием «нулевого» поля, проявляются как на меньших его концентрациях (2,5; 5; 10 мкМ), так и на больших (50; 100 мкМ), приблизительно в одинаковой степени. Отсутствие значительного действия ДМСО (различия между пробами с его добавкой в концентрации 1 мМ и соответствующими контрольными образцами не превышают 5 %), применяемого в качестве растворителя при приготовлении растворов дифенилгидонтия, позволяет связать обнаруженные эффекты с действием именно этого ингибитора.

При добавке дифенилгидонтия минуя стадию инкубации, непосредственно перед измерением хемилюминесценции, характер его влияния на контрольные и опытные образцы сохраняется, но степень выраженности его действия в зависимости от дозы снижается (рис. 2).

Качественно иной результат получен нами в опытах с разобшителем окисления и фосфорилирования – 2,4-динитрофенолом. Так, добавка этого ингибитора начиная с концентрации 5 мкМ и далее, вплоть до 200 мкМ, практически полностью нивелировала различия между контрольными и опытными образцами (рис. 3). При этом интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов в контроле снижается пропорционально концентрации 2,4-динитрофенола. На основании этих данных можно сделать вывод о том, что динитрофенол в определенных концентрациях способен полностью отменить эффект действия «нулевого» МП. По-видимому, наиболее вероятной причиной этого эффекта динитрофенола может являться некоторая «идентичность» механизма его действия с эффектом «нулевого» поля. Действительно, в этом случае, конкурируя за субстраты, химический агент мог бы подавить эффект физического фактора. Альтернативной гипотезой для объяснения этого действия динитрофенола является предположение о том, что для реализации эффекта «нулевого» магнитного поля необходимо сопряжение окисления и фосфорилирования в митохондриях нейтрофилов, то есть необходим определенный уровень продукции АТФ. Однако опыты с добавкой динитрофенола не вначале, а после инкубации в «нулевом» поле, показавшие, что и в этом случае результат его действия также проявляется и качественно не меняется (рис. 3), скорее свидетельствуют в пользу первого предположения.



**Рисунок 3.** Влияние динитрофенола на интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов после действия «нулевого» МП

Ось ординат – максимальная интенсивность хемилюминесценции в процентах по отношению к контролю (средние значения и стандартные отклонения,  $n = 6$ ).

Ось абсцисс – концентрация динитрофенола в мкМ.

1 – контроль, добавка динитрофенола перед инкубацией.

2 – опыт, добавка динитрофенола перед инкубацией.

3 – контроль, добавка динитрофенола после инкубацией.

4 – опыт, добавка динитрофенола после инкубацией.

Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля ( $P < 0,05$ )

Известно, что механизм действия динитрофенола, который является хорошо охарактеризованным разобщителем митохондриального дыхания, связан с его способностью рассеивать протонный градиент, возникающий благодаря транспорту электронов [10]. Рассеивание этого протонного градиента на внутренней митохондриальной мембране позволяет дыханию продолжаться, но при этом прекращается синтез АТФ, который обычно черпает энергию в этом протонном градиенте. Это разобщение нарушает мембранный потенциал внутренней митохондриальной мембраны [10].

Люцигенин считается селективным зондом на САР [8], поэтому его активно используют для изучения продукции АФК как NADPH-оксидазой, так и митохондриями [14]. Характер ингибирующего эффекта дифенилйодония (неспецифический ингибитор NADPH-оксидазы), обнаруженный нами в настоящей работе на нейтрофилах, подвергшихся действию «нулевого» поля, делает сомнительным предположение о том, что NADPH-оксидаза является основным источником САР, реагирующим на действие гипомангнитных условий. Напротив, опыты с динитрофенолом, разобщителем окислительного фосфорилирования, показавшие практически полную отмену эффекта действия «нулевого» магнитного поля в его присутствии, делают обоснованным предположение, что именно митохондрии, как продуценты САР, являются основной мишенью действия этого физического фактора. Важно отметить, что это отличает эффект «нулевого» и ослабленного магнитного поля от эффектов комбинированных магнитных полей, с определенными параметрами [15], в основе которых обнаруживается влияние на регуляторные кальций-зависимые механизмы [16], контролирующие респираторный взрыв в нейтрофилах.

#### Список литературы / References:

1. 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 (7), pp. 527-537.
2. Martino C.F., Castello P.R. Modulation of hydrogen peroxide production in cellular systems by low level magnetic fields. *PLoS ONE*, 2011, vol. 6(8), e22753.
3. Politanski 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.
4. Binhi V.N., Prato F.S. Biological effects of the hypomagnetic field: Analytical review of experiments and theories. *PLoS ONE*, 2017, vol. 12 (6), p. e0179340.
5. 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. (In Russ.)]

6. 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.)]

7. 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 the molecular mechanisms of the effect of a zero magnetic field on the production of reactive oxygen species in inactivated neutrophils. *Biophysics*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 371-375. (In Russ.)]

8. Aasen T.B., Bolann B., Glette J., Ulvik R.J., Schreiner A. Lucigenin-dependent chemiluminescence in mononuclear phagocytes. Role of superoxide anion. *Scand J Clin Lab Invest*, 1987, vol. 47, pp. 673-679.

9. Cross A.R., Jones O.T. The effect of the inhibitor diphenyleneiodonium on the superoxide-generating system of neutrophils: specific labeling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem J*, 1986, vol. 237, pp. 111-116.

10. El-Guindy M.M., Neder A.C., Gomes C.B. 2,4-Dinitrophenol - mechanism of action. *Cell Mol Biol*, 1981, vol. 27, pp. 399-402.

11. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Шаев И.А., Фесенко Е.Е. Влияние слабого постоянного магнитного поля в диапазоне величин от «нулевого» поля (0,01 мкТл) до 100 мкТл на продукцию активных форм кислорода в неактивированных нейтрофилах. *Биофизика*, 2020, т. 65, № 2, с. 524-529. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Shaev I.A., Fesenko E.E. The effect of a weak static magnetic field in the range of magnitudes from a “Zero” Field (0.01  $\mu$ T) to 100  $\mu$ T on the production of reactive oxygen species in nonactivated neutrophils. *Biophysics*, 2020, vol. 65, no. 2, pp. 443-447. (In Russ.)]

12. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Снижение интенсивности респираторного взрыва в нейтрофилах после воздействия определенных режимов слабых комбинированных магнитных полей. *Биофизика*, 2020, т. 65, № 1, с. 97-103. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. A decrease of the respiratory burst in neutrophils after exposure to weak combined magnetic fields of a certain duration. *Biophysics*, 2020, vol. 65, no. 1, pp. 82-87. (In Russ.)]

13. Новиков В.В., Шейман И.М., Фесенко Е.Е. Действие слабого и сверхслабого постоянного магнитного поля на интенсивность бесполого размножения планарий *Dugesia tigrina*. *Биофизика*, 2007, т. 52, № 5, с. 912-915. [Novikov V.V., Sheiman I.M., Fesenko E.E. Multimodal effects of nearly complete geomagnetic field deprivation on fission of the planarian *Dugesia tigrina*. *Biophysics*, 2007, vol. 52, no. 5, p. 498. (In Russ.)]

14. Джатдоева А.А., Проскурина Е.В., Нестерова А.М. и др. Митохондрии как источники супероксидного анион-радикала в тромбоцитах. *Биологические мембраны*, 2017, т. 34, № 6, с. 116-123. [Dzhatdоеva A.A., Proskurina E.V., Nesterova A.M. Mitochondria as a Source of Superoxide Anion Radical in Human Platelets. *Biochemistry (Moscow)*, Supplement Series A: *Membrane and Cell Biology*, 2018, vol. 12, pp. 43-49. (In Russ.)]

15. 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. 429-434. (In Russ.)]

16. 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*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 209-213. (In Russ.)]

**MOLECULAR MECHANISMS OF MAGNETIC DEPRIVATION ON THE PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES BY NEUTROPHILS****Novikov V.V., Yablokova E.V., Shaev I.A.**

Institute of Cell Biophysics RAS

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

**Abstract.** Preincubation of neutrophil suspension when exposed to near null magnetic field created by a system of magnetic shields (the residual static magnetic field not greater than 20 nT) is associated with a significant decrease in the intensity of lucigenin-dependent chemiluminescence of neutrophils. The effect of weak magnetic field persists while increasing static magnetic field up to 1  $\mu$ T. This effect disappears when the level of exposure increases further up to 2.5  $\mu$ T and appears again in the range of 7  $\mu$ T. Then, when static magnetic field is 44  $\mu$ T in magnitude, the values of the chemiluminescence intensity of neutrophils do not really differ from a control. Addition of the NADPH-oxidase inhibitor diphenyliodonium to the incubation medium caused attenuation in the chemiluminescence activity both in the exposed and control samples (geomagnetic field). Differences induced by near null magnetic field were observed almost to the same extent between exposed and control samples at both lower (2.5; 5; 10  $\mu$ M), and higher (50; 100  $\mu$ M) concentrations of diphenyliodonium. In contrast, the presence of 2,4-dinitrophenol, the uncoupler of oxidative phosphorylation in mitochondria, at concentrations of 5  $\mu$ M up to 200  $\mu$ M virtually completely blunted differences which were observed between exposed and control samples at lower concentrations of this inhibitor or in the absence of it.

**Key words:** *neutrophils, near null magnetic field, superoxide anion radical, chemiluminescence, lucigenin, NADPH-oxidase, mitochondria*