

СНИЖЕНИЕ ФОНОВОЙ ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НЕЙТРОФИЛАМИ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ГИПОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НЕ СОПРОВОЖДАЕТСЯ НАРУШЕНИЕМ ИХ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ОТВЕТА НА АКТИВАТОРЫ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА

© 2023 г. В.В. Новиков*,#, Е.В. Яблокова*, И.А. Шаев*, Н.И. Новикова**, Е.Е. Фесенко*

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

#E-mail: dostag@mail.ru

**Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, просп. Науки, 6, Пущино Московской области, 142290, Россия

Поступила в редакцию 30.08.2023 г.

После доработки 03.09.2023 г.

Принята к публикации 06.09.2023 г.

Показано, что снижение фоновой продукции активных форм кислорода в перитонеальных нейтрофилах мышей после кратковременного (40 минут) пребывания в гипоманнитных условиях (остаточное поле ~ 10 нТл) при физиологических температурах, выявляемое методом люцигенин-зависимой хемилюминесценции, не сопровождается нарушением хемилюминесцентного ответа на активаторы респираторного взрыва: формилированный пептид N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLF) и форболовый эфир форбол-12-меристат-13-ацетата (ФМА). Эти результаты получены методами активированной хемилюминесценции с использованием люцигенина и люминола и различных комбинаций применения активаторов продукции активных форм кислорода (форбол-12-меристат-13-ацетат и/или N-formyl-Met-Leu-Phe). Проведенное исследование, в совокупности с ранее полученными результатами, позволяет исключить системы, контролируемые респираторный взрыв в нейтрофилах, из числа основных мишеней и акцепторов, реагирующих на кратковременную депривацию магнитного поля.

Ключевые слова: гипоманнитное поле, нейтрофилы, активные формы кислорода, люцигенин, люминол, хемилюминесценция.

DOI: 10.31857/S0006302923060091, EDN: RORBZG

Гипоманнитное поле относится к биологически активным физическим факторам, и биофизические механизмы его действия нуждаются в детальном изучении [1–5]. Ранее мы показали, что в результате пребывания нейтрофилов в ослабленном (в ~2500 раз) с помощью системы магнитных экранов геомагнитном поле фоновая продукция активных форм кислорода (АФК) в них существенно снижалась [6]. Эти результаты были получены методами флуоресцентной спектроскопии с использованием проникающих в клетку флуоресцентных зондов (дихлордигидрофлуоресцеина-диацетата и дигидрородиамина 123), а также методом хемилюминесцентного анализа с

использованием люцигенина [7], активатора хемилюминесценции, относительно селективного для супероксидного радикала [8]. При добавке малых концентраций (<1 мкМ) активаторов респираторного взрыва, формилированного пептида N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLF) или форболового эфира форбол-12-меристат-13-ацетата (ФМА), в случае детекции флуоресцентным методом этот эффект гипоманнитного поля сохранялся, но по величине соответствовал эффектам, полученным в опытах без этих активаторов [6]. На основании этих результатов было сложно сделать выводы об основных источниках АФК, реагирующих на изменение магнитных условий. Далее с использованием ингибиторного анализа в опытах на неактивированных нейтрофилах было показано, что добавка динитрофенола — разобщителя окисления и фосфорилирования в мито-

Сокращения: АФК — активные формы кислорода, fMLF — N-formyl-Met-Leu-Phe, ФМА — форбол-12-меристат-13-ацетат.

хондриях — практически полностью нивелирует различия в продукции АФК между контрольными (геомагнитное поле) и опытными (гипомагнитное поле) группами, в отличие от дифенилгидония — неспецифического ингибитора НАДФН-оксидазы, добавка которого приводила к снижению продукции АФК в обоих случаях и сохранению различий между контролем и опытом [7]. Также на величину эффекта гипомагнитного поля влияла добавка ротенона (ингибитора комплекса I ЭТС в митохондриях) [9]. Все эти результаты в большей степени свидетельствовали о роли митохондрий, а не НАДФН-оксидазы в эффектах ослабленного геомагнитного поля. В связи с этим для более полного анализа эффектов гипомагнитного поля в данной работе были проведены специальные эксперименты, чтобы определить, как пребывание в гипомагнитном поле влияет на хемилюминесцентный ответ нейтрофилов на введение активаторов респираторного взрыва.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Действие гипомагнитного поля проверяли на способность осуществлять преактивацию (прайминг)/деактивацию нейтрофилов. Для проверки этого действия суспензию нейтрофилов предварительно инкубировали на протяжении 40 мин в гипомагнитных условиях, затем к ней добавляли активатор хемилюминесценции (люминол или люцигенин) и один из активаторов респираторного взрыва (формилированный пептид fMLF или другой активатор генерации АФК, форболовый эфир ФМА). Также проверяли варианты совместного использования этих двух активаторов продукции АФК, о чем будет сказано ниже.

Работа выполнена на перитонеальных нейтрофилах мышей. Для получения перитонеальных нейтрофилов использованы лабораторные мыши-самцы линии Balb/c массой 24–26 г, полученные из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Пушино, Московская область). Для выполнения измерений в рамках одного экспериментального дня использовали суспензию нейтрофилов, полученную из одной мыши. Выделение клеток проводили в день проведения измерений. Для получения клеток в перитонеальную полость мыши инъецировали 150 мкл суспензии опсонизированного зимозана с концентрацией 5 мг/мл (Zymozan A из *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma, США). После этого через 16 ч животных умерщвляли методом цервикальной дислокации, их брюшную полость промывали 3 мл охлажденного раствора Хенкса без кальция. Экссудат собирали пипеткой и центрифугировали в течение 5 мин при 600 g. Супернатант декантировали, а осадок разводили в 1 мл бескальциевого раствора Хенкса и оставляли не менее чем на 1 ч при 4°C. Эта процедура позволяла снизить спонтанную хе-

милюминесценцию нейтрофилов и перевести эти клетки в «одинаковое» состояние, характеризующееся их равномерным хемилюминесцентным ответом, что обеспечивало возможность стабильной работы с ними в течение экспериментального дня. Количество выделенных клеток подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определяли, используя витальный краситель трипановый синий. Содержание живых клеток при этом составляло не менее 98%.

Для выполнения экспериментов суспензию нейтрофилов разводили модифицированной средой Хенкса (138 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaHCO₃, 5.5 mM глюкозы, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4; Sigma, США) до концентрации 1 млн кл/мл. Образцы объемом 0.25 мл помещали в круглодонные кюветы из полистирола ($d = 1.2$ см, $l = 5.5$ см), в которых в дальнейшем проводили измерение хемилюминесценции. Нейтрофилы инкубировали при $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ в течение 40 мин. Заданную температуру поддерживали с помощью циркуляционного водного термостата УН 4 (MLW, Германия).

Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле с постоянной составляющей ~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 (также одновременно проводилась последующая регистрация хемилюминесценции контрольных и экспериментальных образцов). В опытах была использована специальная исследовательская аппаратура — установка для формирования гипомагнитных условий, которая позволяла получить высокую степень ослабления геомагнитного поля — до 10000 раз (остаточное постоянное поле не превышало 10 нТл) и существенно ослабляла переменные техногенные помехи (до единиц нТл). Эта установка детально описана нами ранее [10]. Установка состояла из трех, вставленных соосно один в другой цилиндрических магнитных экранов из пермаллоя (толщиной 1 мм) и была снабжена внутри специальным индуктором (соленоидом) для проведения размагничивания системы и подачи в случае необходимости слабого постоянного тока для формирования постоянного магнитного поля заданной величины. Определение остаточных полей внутри установки проводили прямым измерением с помощью феррозондового магнитометра Mag-03 MS 100 (Bartington, Великобритания). 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).

После инкубации нейтрофилов измеряли интенсивность хемилюминесценции полученных образцов при добавке в них раствора люминола (Enzo Life Sciences, США) в конечной концентрации 0.35 мМ. В суспензию нейтрофилов помимо люминола был добавлен активатор генерации АФК — хемотаксический формилированный пептид N-формил-Met-Leu-Phe (Sigma, США) в конечной концентрации 1 мкМ. В разных вариантах опытов были использованы и другие концентрации fMLF. Для регистрации хемилюминесценции был использован 12-канальный хемилюминометр Lum-1200 (ООО «ДИСофт», Россия). Для анализа результатов использована программа PowerGraph.

В части опытов вместо fMLF был добавлен другой активатор генерации АФК — форболовый эфир форбол-12-меристат-13-ацетат (Sigma, США) в низких концентрациях (5 или 20 нМ).

В другой части опытов была использована схема двойной последовательной стимуляции нейтрофилов [11]. Для этого до начала инкубации в гипоманнитном поле в суспензию клеток был добавлен активатор генерации АФК — ФМА в концентрации 5 нМ, а после окончания инкубации хемилюминесцентный ответ регистрировали в ответ на введение люминола и пептида fMLF. В этом случае на первом этапе опытов нейтрофилы стимулировали ФМА, агентом с внутриклеточным механизмом действия (имитирующим диацилглицерол и напрямую активирующим мембранную протеинкиназу С [12]), а на втором этапе (при регистрации хемилюминесценции) проводили основную стимуляцию fMLF, агентом с внеклеточным механизмом действия (осуществляющим передачу сигнала через рецепторы fMLP [13]). Такая двойная стимуляция приводила к более полному ответу нейтрофилов на эти стимулы и, следовательно, к возможности повышения чувствительности использованного метода [11].

Наряду с люминол-зависимой хемилюминесценцией регистрировали люцигенин-зависимую хемилюминесценцию нейтрофилов для определения спонтанной продукции АФК, а также при использовании активаторов АФК. Для этого после инкубации суспензии нейтрофилов измеряли интенсивность хемилюминесценции образцов в контрольных и опытных случаях после добавки в них раствора люцигенина (Enzo Life Sciences, США) в конечных концентрациях 0.2 или 0.4 мМ. Следует отметить, что в ряде случаев дополнительную стимуляцию активаторами продукции АФК (ФМА или fMLF) не проводили, то есть в этих опытах определяли фоновую продукцию супероксидного анион-радикала в нейтрофилах. В других вариантах опытов были использованы fMLF и/или ФМА в тех же концентрациях и последовательности, что и ранее, при проведении опы-

тов и регистрации люминол-зависимой хемилюминесценции.

Результаты статистически обработаны с применением *t*-критерия Стьюдента. Значения интенсивности люминесценции соответствовали световому потоку, т.е. количеству фотонов в единицу времени: 1 вольт (В) соответствовал ≈ 1000 фотонов/сек. Часть результатов представлена для наглядности в процентах по отношению к амплитудам хемилюминесцентного ответа в контроле, принятым за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После инкубации суспензии нейтрофилов в течение 40 мин в гипоманнитных условиях регистрируется существенное снижение (примерно на 30%) хемилюминесцентного сигнала на введение 0.4 мМ люцигенина (табл. 1, рис. 1), что согласуется с данными предыдущих работ [7, 14]. Введение активатора продукции АФК — 1 мкМ fMLF — приводит к существенному (двукратному) росту амплитуды сигнала люцигенин-зависимой хемилюминесценции и нивелирует различия между контрольными и опытными образцами (табл. 1, рис. 2). Также не проявляются различия при инкубации нейтрофилов в присутствии 5 нМ ФМА и последующем введении 0.2 мМ люцигенина (табл. 1, рис. 3), и в опытах с двойной последовательной стимуляцией 5 нМ ФМА и 1 мкМ fMLF (табл. 1, рис. 4). Таким образом, эти эксперименты, проведенные методом люцигенин-зависимой хемилюминесценции, в совокупности показывают, что реакция систем нейтрофилов по продукции супероксида на введение активаторов респираторного взрыва после кратковременного пребывания в гипоманнитных условиях полностью сохраняется.

Хемилюминесцентный ответ на введение 0.35 мМ люминола у нейтрофилов после 40 мин пребывания в гипоманнитном поле не изменяется (табл. 1, рис. 5). Также не выявлено достоверных отличий в реакции на введение 2 мкМ fMLF в присутствии люминола (табл. 1, рис. 6), в опытах с двойной последовательной стимуляцией (табл. 1, рис. 7) и в реакции на ФМА (табл. 1, рис. 8). Таким образом, эксперименты, проведенные методом люминол-зависимой хемилюминесценции, дополнительно к опытам с люцигенином, показывают, что продукция и других АФК (перекиси водорода, гипохлорита), помимо супероксида, не нарушается в ответ на активаторы респираторного взрыва после кратковременного пребывания нейтрофилов в гипоманнитных условиях. Единственным выявленным значительным эффектом гипоманнитного поля является снижение фоновой продукции супероксида, регистрируемое в опытах с люцигенином без активаторов продукции АФК.

Таблица 1. Значения максимальной интенсивности хемилюминесценции суспензии нейтрофилов после действия «нулевого» магнитного поля

№	Методика определения хемилюминесценции, (соответствие рисункам)	Интенсивность хемилюминесценции V , %		
		Контроль	Опыт	p
1	Люцигенин 0.4 мМ (рис. 1)	3.41 ± 0.36 ($100 \pm 10.5\%$)	2.40 ± 0.16 ($70.4 \pm 4.7\%$)	0.00029
2	Люцигенин 0.4 мМ, fMLF 1 мкМ (рис. 2)	6.37 ± 0.68 ($100 \pm 10.6\%$)	6.05 ± 0.51 ($95.0 \pm 8.0\%$)	0.41921
3	Люцигенин 0.2 мМ, ФМА 5 нМ в пробе (рис. 3)	8.65 ± 1.60 ($100 \pm 18.5\%$)	10.94 ± 3.44 ($126.5 \pm 39.8\%$)	0.20986
4	Люцигенин 0.2 мМ, fMLF 1 мкМ, ФМА 5 нМ в пробе (рис. 4)	13.31 ± 2.69 ($100 \pm 20.2\%$)	14.40 ± 4.00 ($108.2 \pm 30.1\%$)	0.62516
5	Люминол 0.35 мМ (рис. 5)	2.49 ± 0.22 ($100 \pm 9.00\%$)	2.41 ± 0.34 ($96.8 \pm 13.7\%$)	0.66769
6.1	Люминол, fMLF 2 мкМ (рис. 6)	7.80 ± 1.59 ($100 \pm 20.4\%$)	6.78 ± 1.31 ($86.9 \pm 16.8\%$)	0.29786
6.2	Люминол, fMLF 2 мкМ, повторный опыт	6.69 ± 0.89 ($100 \pm 13.4\%$)	6.78 ± 1.31 ($101.4 \pm 19.6\%$)	0.90230
7.1	Люминол, fMLF 2 мкМ, ФМА 20 нМ в пробе (рис. 7)	9.89 ± 0.64 ($100 \pm 6.51\%$)	8.48 ± 1.40 ($85.7 \pm 14.1\%$)	0.07258
7.2	Люминол, fMLF 2 мкМ, ФМА 20 нМ в пробе, повторный опыт	9.73 ± 0.64 ($100 \pm 6.51\%$)	10.29 ± 0.85 ($85.7 \pm 14.1\%$)	0.23412
8.1	Люминол, ФМА 20 нМ добавлен при регистрации ХЛ* (рис. 8)	6.70 ± 0.23 ($100 \pm 3.39\%$)	6.50 ± 0.13 ($97.0 \pm 1.9\%$)	0.12049
8.2	Люминол, ФМА 20 нМ добавлен при регистрации ХЛ** (рис. 8)	6.70 ± 0.34 ($100 \pm 5.09\%$)	6.43 ± 0.24 ($96.0 \pm 3.6\%$)	0.37415

Примечание. Количество экспериментов $n = 6$; * — приведены средние максимальные значения по 20 точкам из кинетических кривых, ** — приведены максимальные значения в 1 точке из кинетических кривых.

При анализе полученных результатов следует учесть, что в нейтрофилах имеется несколько источников АФК, в том числе электрон-транспортная цепь митохондрий и системы респираторного взрыва [15, 16]. При этом метод флуоресцентной спектроскопии, примененный нами ранее для исследования эффекта гипомангнитного поля [6], ввиду особенностей используемых зондов (после превращения в активный флуоресцирующий продукт они теряют способность проходить через мембраны) и протокола выполнения процедур

(отмывка красителя) позволяет определить концентрации АФК исключительно внутриклеточной локализации [6]. В то же время метод люминол-зависимой хемилюминесценции фиксирует совокупный пул АФК, поскольку ввиду способности АФК перераспределяться между внутри- и внеклеточным пулами определение места происхождения этих метаболитов данным методом является нетривиальной задачей. Тем не менее, в опытах на нейтрофилах было показано, что примерно за половину свечения отвечают сами клет-

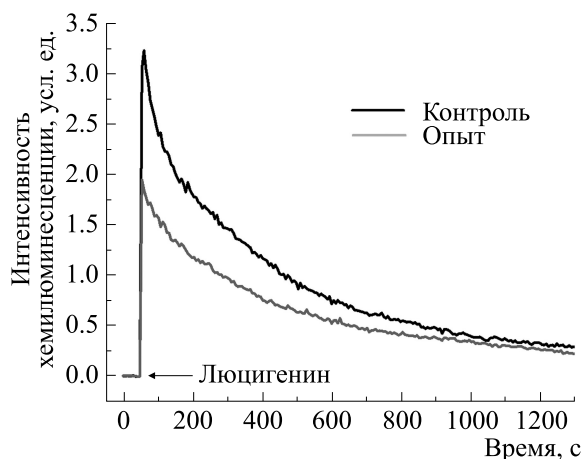


Рис. 1. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на добавку 0.4 мМ люцигенина после действия «нулевого» магнитного поля.

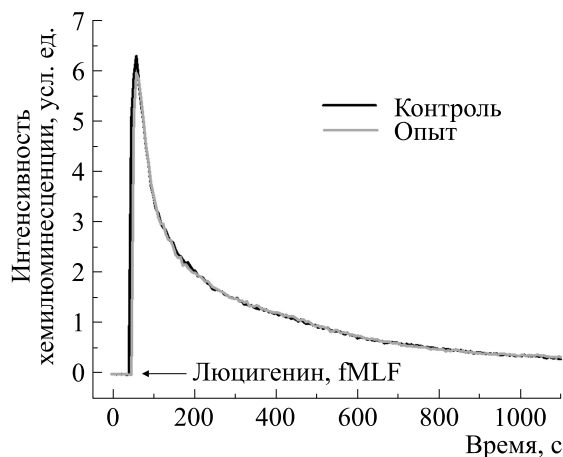


Рис. 2. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на добавку 0.4 мМ люцигенина и 1 мкМ fMLF после действия «нулевого» магнитного поля.

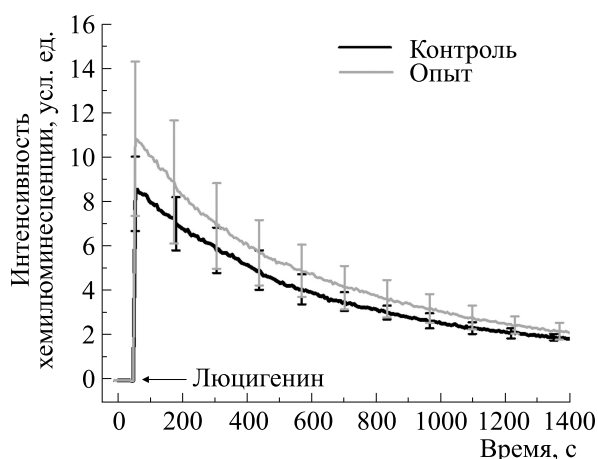


Рис. 3. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на добавку 0.2 мМ люцигенина после действия «нулевого» магнитного поля в присутствии 5 нМ ФМА.

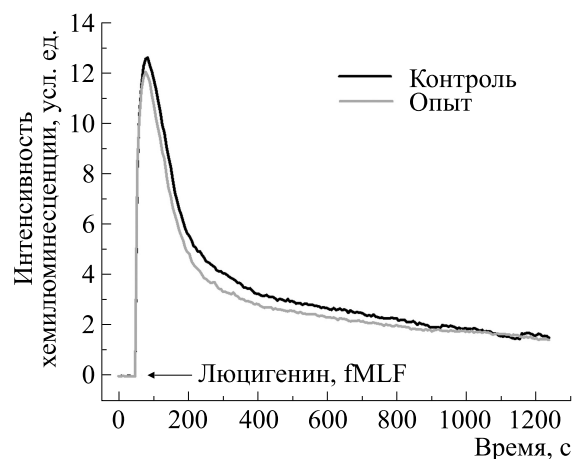


Рис. 4. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на добавку 0.2 мМ люцигенина и 1 мкМ fMLF после действия «нулевого» магнитного поля в присутствии 5 нМ ФМА.

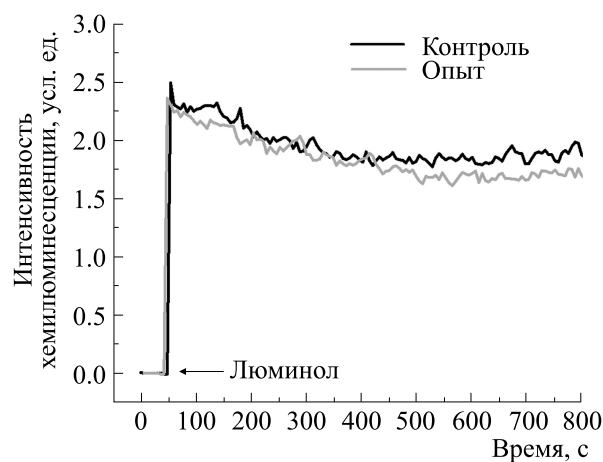


Рис. 5. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на добавку 0.35 мМ люминола после действия «нулевого» магнитного поля.

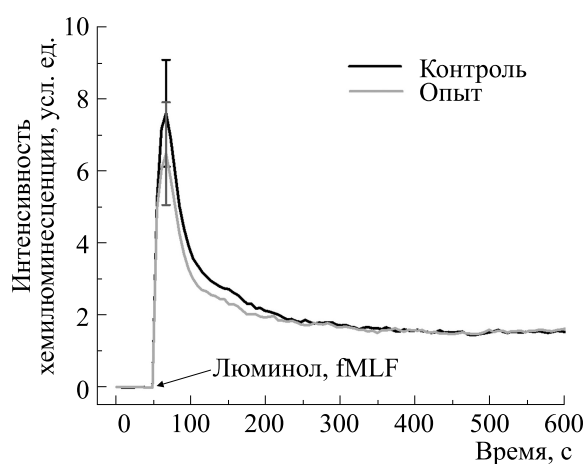


Рис. 6. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на добавку 0.35 мМ люминола и 2 мкМ fMLF после действия «нулевого» магнитного поля.

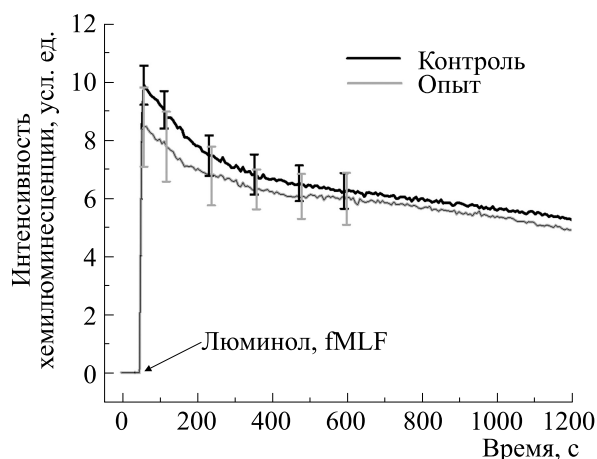


Рис. 7. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на добавку 0.35 мМ люминола и 2 мкМ fMLF после действия «нулевого» магнитного поля в присутствии 20 нМ ФМА.

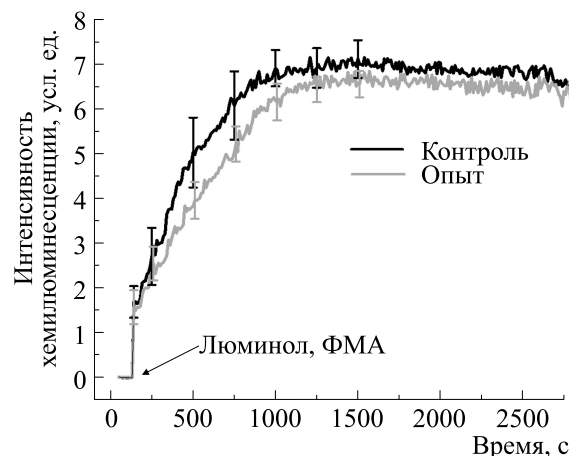


Рис. 8. Кинетические кривые хемилюминесцентного ответа суспензии нейтрофилов на добавку 0.35 мМ люминола и 20 нМ ФМА после действия «нулевого» магнитного поля.

ки (этот сигнал тушат проникающие через мембраны дитиотреитол и N-ацетилцистеин), а другая половина формируется вне клеток и полностью блокируется непроникающим восстановленным глутатионом [17]. С учетом этого можно предположить, что люминол-зависимая хемилюминесценция не фиксирует изменений АФК гипомангнитной этиологии ввиду затухивания искомого сигнала, имеющего скорее всего внутриклеточное происхождение, на фоне общего свечения. Такого же результата, возможно, следует ожидать и от изолюминола, так как пространственная изомерия аминогруппы фталатного кольца в этом соединении определяет его большую гидрофильность и меньшую способность к преодолению биомембран [18].

При респираторном взрыве нейтрофилы могут генерировать АФК как внутриклеточно, так и внеклеточно, в зависимости от локализации сборки оксидазы, которая, в свою очередь, зависит от природы стимула [18]. Было показано, что при стимуляции нейтрофилов fMLF запускалось внеклеточное высвобождение АФК, при этом продукция внутриклеточных АФК обнаружена не была [19]. Ввиду этого тот факт, что магнитная депривация не отражается на продукции АФК при респираторном взрыве (при регистрации методом активированной хемилюминесценции), может быть объяснен доминированием сигнала от внеклеточных АФК, системы генерации которых невосприимчивы к действию «нулевого» поля. Таким образом, системы генерации активных форм преимущественно во внутриклеточном компартменте характеризуются чувствительностью к магнитной депривации [6] (данные ингибиторного анализа свидетельствуют, что в числе этих систем важную роль играют митохондриаль-

ные электрон-транспортные цепи [7, 9]), в отличие от систем, продуцирующих АФК во внеклеточное пространство при активации нейтрофилов хемоаттрактантами. Следует отметить, что сама активация не устраняет гипомангнитный эффект, поскольку он обнаруживается флуоресцентным методом и в случае стимулированных нейтрофилов [6].

В свете полученных данных с учетом использованных методов регистрации продукции АФК можно сделать вывод о наличии минорной компоненты АФК внутриклеточного происхождения, модулируемой воздействием «нулевого» поля и связанной, в том числе, с функцией митохондриального аппарата, и основной, за которую отвечают системы респираторного взрыва, не испытывающей влияния депривационного фактора. Это позволяет более уверенно исключить системы, контролирующие респираторный взрыв в нейтрофилах, из числа основных мишеней и акцепторов, реагирующих на магнитное экранирование.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для эксперимента и других научных целей» Основным документом, регламентирующим проведение настоящего исследования, являлось «Руководство по работе с лабора-

торными животными ИБК РАН» № 57 от 30.12.2011 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. V. N. Binhi and F. S. Prato, PLoS One, **12** (6), e0179340 (2017).
2. B. Zhang and L. Tian, Bioelectromagnetics, **41** (8), 573 (2020).
3. В. В. Крылов, Труды Ин-та биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, № 84 (87), 7 (2018).
4. H. Zadeh-Haghighi, R. Rishabh, and C. Simon, Front. Physiol., **11**, 1026460 (2023). DOI: 10.3389/fphys.2023.1026460.
5. И. А. Шаев, В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика, **67** (2), 319 (2022).
6. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика, **63** (3), 484 (2018).
7. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, И. А. Шаев и Е. Е. Фесенко, Биофизика, **65** (4), 735 (2020).
8. T. B. Aasen, B. Bolann, J. Glette, et al., Scand. J. Clin. Lab. Invest., **47**, 673 (1987).
9. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, Э. Р. Валеева и Е. Е. Фесенко, Биофизика, **64** (4), 720 (2019).
10. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, И. А. Шаев и Е. Е. Фесенко, Биофизика, **65** (2), 524 (2020).
11. Е. В. Проскурнина, М. М. Созарукова, А. М. Полимова и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины, **161** (2), 288 (2016).
12. F. Rossi, P. Bellavite, G. Bertonet, et al., Adv. Exp. Med. Biol., **141**, 283 (1982).
13. В. Г. Сафронова, А. Г. Габдулхакова, А. В. Миллер и др., Биохимия, **66**, 840 (2001).
14. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, И. А. Шаев и Е. Е. Фесенко, Биофизика, **66** (3), 511 (2021).
15. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурнина, Успехи биол. химии, **49**, 341 (2009).
16. G. Fossati, D. A. Moulding, D. G. Spiller, et al., J. Immunol., **170**, 1964 (2003).
17. М. А. Мурина, Д. И. Рошупкин, Н. С. Белакина и др., Биофизика, **50**, 1100 (2005).
18. C. Dahlgren and A. Karlsson, J. Immunol. Methods, **232** (1–2), 3 (1999).
19. H. Fu, J. Bylund, A. Karlsson, et al., Immunology, **12** (2), 201 (2004).

Background Formation of Lower Levels of Reactive Oxygen Species by Neutrophils after Hypomagnetic Field Exposure Is Not Accompanied by the Impairment of Chemiluminescence Response of Neutrophils to Respiratory-Burst Stimuli

V.V. Novikov*, E.V. Yablokova*, I.A. Shaev*, N.I. Novikova**, and E.E. Fesenko*

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

**Branch of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki 6, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

This study shows that the background formation of lower levels of reactive oxygen species in mouse peritoneal neutrophils after short-term (40 minutes) exposure to hypomagnetic fields with ~10 nT residual field at physiological temperatures, which has been detected by use of lucigenin-dependent chemiluminescence, is not accompanied by the impairment of chemiluminescence response of neutrophils to respiratory-burst stimuli: the formylated tripeptide N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLF) and phorbol ester phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA). These results were obtained with lucigenin or luminol-enhanced activated chemiluminescence and various combinations of reactive oxygen species production stimuli (phorbol-12-myristate-13-acetate and/or N-formyl-Met-Leu-Phe). Based on the results of the present work as well as on those of previous studies, this study reveals that the systems that control the respiratory burst in neutrophils can be excluded from a list of main targets and acceptors that respond to short-term deprivation of the magnetic field.

Keywords: hypomagnetic field, neutrophils, reactive oxygen species, lucigenin, luminol, chemiluminescence