

УДК 577.334

ГИПОМАГНИТНОЕ ПОЛЕ МОДУЛИРУЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫСЫ К *трет*-БУТИЛГИДРОПЕРОКСИДУ

© 2019 г. М.А. Терпиловский*, Д.А. Хмелевской*, Б.Ф. Щеголев** ***, С.В. Сурма**, В.Е. Стефанов****, С.М. Сухаржевский*****, Н.В. Гончаров*

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44

**Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

***Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

****Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7–9

*****Научный Парк Санкт-Петербургского государственного университета, 198504, Петергоф, Ботаническая ул., 17

E-mail: ngoncharov@gmail.com

Поступила в редакцию 23.01.2018 г.

После доработки 23.07.2018 г.

Принята к публикации 12.02.2019 г.

Эритроциты крысы выдерживали в магнитном поле Земли, а также подвергали воздействию ослабленным магнитным полем Земли в присутствии *трет*-бутилгидропероксида как индуктора оксидативного стресса. Проводили спектральный анализ (в диапазоне 500–700 нм) трех форм гемоглобина: оксигемоглобина, метгемоглобина и гемихрома, высвобождавшихся при гемолизе эритроцитов. Концентрацию кислородных радикалов в пробах определяли методом электронного парамагнитного резонанса по методике спиновых ловушек. Установлено, что после 4 ч инкубации с высокими концентрациями *трет*-бутилгидропероксида (>700 мкМ) экспонировавшиеся в ослабленном магнитном поле эритроциты высвобождали значительно больше ($p < 0,05$) гемоглобина, преимущественно в форме метгемоглобина. В свою очередь, после 24 ч инкубации с низкими концентрациями *трет*-бутилгидропероксида (≤ 350 мкМ) эритроциты под воздействием магнитного поля Земли высвобождали сравнительно больше ($p < 0,001$) гемоглобина в форме метгемоглобина (в пропорции от всего гемоглобина). Эритроциты, подвергавшиеся воздействию ослабленным магнитным полем, продуцировали больше кислородных радикалов, чем экспонировавшиеся в магнитном поле Земли. В условиях оксидативного стресса ослабленное магнитное поле может нарушать функциональное состояние эритроцитов и способствовать гибели клеток. В то же время низкие концентрации активных форм кислорода могут нейтрализовать эффекты ослабленного магнитного поля.

Ключевые слова: эритроциты, гемоглобин, ослабленное магнитное поле Земли, активные формы кислорода, гибель клеток.

DOI: 10.1134/S0006302919030086

Все живые организмы подвержены действию магнитного поля Земли (МПЗ), которое меняется в зависимости от широты, увеличиваясь к полюсам, так что средняя величина индукции МПЗ составляет 42 мкТл [1]. Величина индукции магнитного поля в околоземном пространстве значительно ниже, чем на поверхности Земли, и достигает, в частности, 0,0066 мкТл в межпланет-

ном пространстве, 0,3 мкТл на лунной поверхности, ~ 0,7 мкТл на высоте 200 км от поверхности Марса [2–4].

В работе [5] были классифицированы и проанализированы результаты различных работ, в которых изучались эффекты воздействия гипомангнитного поля на биологические объекты. Подобные исследования имеют высокую значимость при планировании межпланетных экспедиций для поддержания нормального состояния и работоспособности космонавтов во время космических полетов и пребывания на космических станциях. В ряде экспериментальных работ было

Сокращения: МПЗ – магнитное поле Земли, ОМП – ослабленное магнитное поле, АФК – активные формы кислорода, ТБГ – *трет*-бутилгидропероксид, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс.

показано, что воздействие статического магнитного поля, ослабленного экранированием (ослабленное магнитное поле — ОМП) с величиной индукции меньше, чем 20 мкТл, нарушает функциональное состояние живых организмов [6–9]. ОМП способно влиять на скорость и продолжительность клеточного цикла, причем эффекты воздействия ОМП на лимфоциты человека более значимы в G1-фазе [10,11]. Снижение величины индукции МПЗ до 300 нТл ведет к ингибированию пролиферации и дифференцировке клеток скелетных мышц новорожденных мышей [9,12].

Предполагается, что механизм действия слабых магнитного и электромагнитного полей на биологические системы связан с генерацией активных форм кислорода (АФК) [13,14]. В то же время имеются данные о подавлении внутриклеточного образования АФК в раковых клетках, эндотелиальных клетках артерий и перитонеальных макрофагах в условиях ОМП [15–17]. Согласно одной из гипотез, геомагнитная чувствительность живых организмов зависит от генерации супероксид-аниона (O_2^-) [18,19]. В частности, гипомагнитные поля способны модулировать переход синглетной формы кислорода в триплетную и наоборот при участии супероксид-аниона [19–21].

Генерация АФК эритроцитами сопряжена с автоокислением, суть которого состоит в спонтанном окислении гемового железа (Fe^{2+}). Этот процесс, если он выходит из-под контроля антиоксидантной системы, обуславливает образование метгемоглобина (Fe^{3+}) и O_2^- [22]. Супероксид способен реагировать с гемоглобином и дисмутировать под действием супероксиддисмутазы с образованием H_2O_2 . Если продуцируется слишком много АФК (окислительный стресс), происходит разрушение эритроцитов (гемолиз), гемоглобин высвобождается во внутрисосудистое пространство, а нейтрализация эндотелиального оксида азота супероксид-анионом с образованием пероксинитрита вызывает спазм сосудов или гипертензию [23]. Кроме этого, оксидативный стресс может повысить ригидность эритроцитов в результате эритропоза и нарушение микроциркуляции крови [24].

Цель настоящего исследования — изучить влияние ОМП на состояние эритроцитов крысы *in vitro* в условиях оксидативного стресса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В работе были использованы НЕРЕС и ТЕМРО (4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) производства Sigma (США), остальные реактивы приобретены в АО «Вектон» (Санкт-Петербург, Россия).

Подготовка эритроцитов. Эритроциты получали из гепаринизированной крови аутбредных крыс линии Вистар массой 200–240 г в соответствии с «Правилами доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)» (РД 64-126-91) и требованиями Приказа Минздравсоцразвития РФ №708н от 23.08.2010. Кровь, полученную при декапитации, центрифугировали 3 мин при 3000 об/мин, после чего отбирали плазму и слой лимфоцитов-тромбоцитов. Эритроцитарную массу ресуспендировали в Ca^{2+} -НЕРЕС-буфере (конечные концентрации в мМ: NaCl — 140, $MgCl_2$ — 3, глюкоза — 10, 10 НЕРЕС, $CaCl_2$ — 2,5 и KCl — 5), pH 7,4 и центрифугировали дважды 2 мин при 2000 об./мин. Один объем Ca^{2+} -НЕРЕС-буфера добавляли к промытым эритроцитам, ресуспендировали и проводили анализ крови на гематологическом анализаторе Medonic M16 (Boule Medical AB, Швеция). Количество лимфоцитов в суспензии составляло $<0,1 \cdot 10^9$ /л, тромбоцитов $<0,01 \cdot 10^9$ /л. Полученную суспензию эритроцитов доводили до концентрации $0,5 \cdot 10^{12}$ /л, используя Ca^{2+} -НЕРЕС-буфер, и разливали в тестовые пробирки. Трет-бутилгидропероксид (ТБГ) использовали для индукции оксидативного стресса. Рабочие растворы ТБГ получали *ex tempore* разведением маточного раствора с концентрацией 7,7 М. Тестовые пробирки инкубировали на орбитальном шейкере OS-20 (BioSan, Латвия) при 100 об/мин в течение 4 и 24 ч. При инкубации пробирки находились в горизонтальном положении при комнатной температуре (24°C) под воздействием ОМП или МПЗ.

Определение форм гемоглобина. После инкубации пробы центрифугировали (3000 об/мин). Затем на спектрофотометре UV-2401PC (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн 500–700 нм были зарегистрированы их спектры оптического поглощения с шагом 1 нм. Измерения проводили в кювете толщиной 0,8 см. Данные спектры использовали для вычисления молярной концентрации общего гемоглобина и трех его форм — оксигемоглобина, метгемоглобина и гемихрома — по значениям величин абсорбции, полученным на длинах волн 577, 630 и 560 нм, и следующим микромолярным коэффициентам экстинкции [25]:

$$oxyHb = 119 \cdot A_{577} - 39 \cdot A_{630} - 89 \cdot A_{560},$$

$$metHb = 28 \cdot A_{577} + 307 \cdot A_{630} - 55 \cdot A_{560},$$

$$Hb = -133 \cdot A_{577} - 114 \cdot A_{630} + 233 \cdot A_{560}.$$

Концентрации гемоглобина выражали в микромолях на 0,2 мл суспензии эритроцитов при концентрации клеток $5 \cdot 10^{11}$ /л.

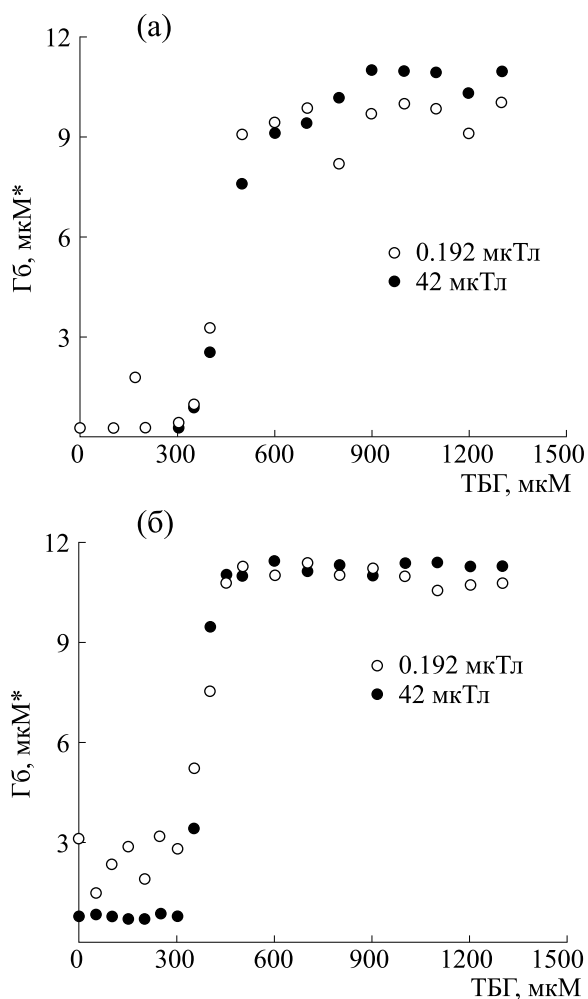


Рис. 1. Выделение общего гемоглобина (в мкМ в 0,2 мл суспензии с $5 \cdot 10^{11}$ эритроцитов) в супернатант эритроцитов под воздействием МПЗ (48 мкТл) или ОМП (0,192 мкТл) после 4 ч инкубации (а) и 24 ч инкубации (б) с различными концентрациями ТБГ (0–1500 мкМ). Каждая точка представляет собой среднее значение по меньшей мере трех повторов; погрешности не отображаются из-за неудобства шкалы.

Определение концентрации кислородных радикалов методом спиновой ловушки с использованием электронного парамагнитного резонанса. Для определения количества короткоживущих кислородных радикалов в пробе использовался метод спиновых ловушек [26]. Идея метода состоит в том, что в биологическую систему, в которой ожидается образование короткоживущих радикалов, вводится спиновая ловушка — некое биологически инертное вещество, способное вступать в реакцию с этими радикалами и образовывать персистентные парамагнитные соединения — спиновые аддукты. Как правило, такими аддуктами яв-

ляются нитроксильные радикалы, которые достоверно регистрируются методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Интегральная интенсивность (площадь под линией сигнала) пропорциональна количеству радикалов в исследуемой пробе. Поскольку нитроксильные радикалы химически и термически стабильны, их можно надежно регистрировать в биологических тканях *in vitro* и *in vivo* [27,28].

После 24 ч инкубации пробы замораживали в жидком азоте (77 К). ЭПР-спектры полученного лизата суспензии эритроцитов измеряли на ЭПР-спектрометре Elexsys E580 (BRUKER, Германия) при температуре 297,2 К. Для количественной регистрации в пробе гидроксильного радикала OH^- в наших исследованиях была использована спиновая ловушка TEMPO (4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) (Sigma, США).

Ослабление магнитного поля Земли в экранирующих камерах. Для физического моделирования слабого статичного магнитного поля были сконструированы две цилиндрические экранирующие камеры ($d = 10$ см и $l = 30$ см; $d = 25$ см и $l = 60$ см), покрытые десятками слоев экранирующего материала AMAG172 [29]. Все измерения индукции магнитных полей проводили с использованием магнитометров: Fluxmaster (Stefan Mayer Instruments, Dinslaken, Германия) в диапазоне 1 нТл – 200 мкТл с разрешением 1 нТл и НВ0302.1А (ООО «Магнитные приборы», Санкт-Петербург, Россия) в диапазоне 0,1–100 мкТл с разрешением 0,1 мкТл.

Статистика. Формы гемоглобина определяли в десяти независимых экспериментах ($n = 10$). В каждом эксперименте кровь получали от одной крысы и делили на несколько образцов, которые экспонировали в ОМП и МПЗ. Статистический анализ проводили с использованием программы GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., San Diego, США). Данные были проанализированы с использованием парного *t*-теста Стьюдента, после чего к *p*-величинам применяли поправку Беньямини–Кригера–Екутиели [30].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гемоглобин в супернатанте эритроцитов после воздействия ОМП или МПЗ. Определение общего гемоглобина показало, что образцы с относительно низкими концентрациями ТБГ (до 350 мкМ) и относительно небольшим временем инкубации (4 ч) высвобождали одинаковое количество гемоглобина при воздействии как МПЗ, так и ОМП (рис. 1а). Однако при высоких концентрациях ТБГ (выше 700 мкМ) инкубация в течение 4 ч в условиях МПЗ обусловила высвобождение меньшего количества гемоглобина, чем в условиях

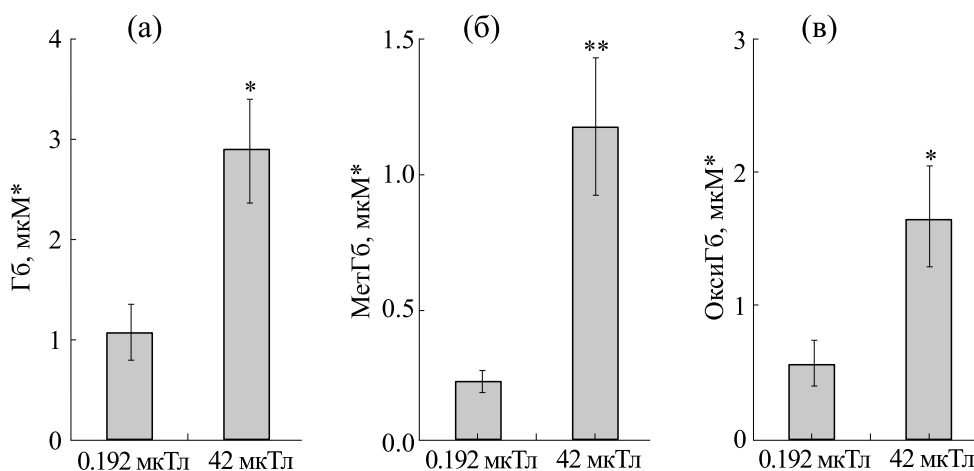


Рис. 2. Выделение общего гемоглобина (а), метгемоглобина (б) и оксигемоглобина (в) (в мкМ в 0,2 мл суспензии с $5 \cdot 10^{11}$ эритроцитов) в супернатант эритроцитов под воздействием МПЗ (48 мкТл) или ОМП (0,192 мкТл) после 24 ч инкубации в отсутствие ТБГ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

ОМП, в среднем на 12% ($p < 0,05$) (рис. 1а). Напротив, после 24 ч инкубации в условиях МПЗ в образцах с низкими концентрациями ТБГ (до 350 мкМ) общий выход гемоглобина был значительно выше (от 74 до 316%, $p < 0,001$), чем в образцах, которые инкубировали в условиях ОМП (рис. 1б). В присутствии высоких концентраций ТБГ (выше 700 мкМ) высвобождение гемоглобина в образцах в условиях ОМП и МПЗ было практически одинаковым. Примерно 90% гемоглобина высвобождается в узком диапазоне концентраций ТБГ: 400–500 мкМ через 4 ч и 350–450 мкМ через 24 ч. По-видимому, имеет место кооперативность лизиса за счет лавинообразного нарастания количества АФК в эритроцитах, свидетельствующая о принципиальном вкладе гемоглобина в процесс генерации АФК. Выход кривой на плато свидетельствует о разрушении большей части эритроцитов, некоторое снижение плато свидетельствует о денатурации гемоглобина.

Определение трех форм гемоглобина показало, что в образцах с относительно высокими концентрациями ТБГ после 4 ч инкубации разница была обнаружена главным образом по уровню высвободившегося метгемоглобина (от 52 до 72% от общей концентрации гемоглобина). В образцах с низкими концентрациями ТБГ (до 350 мкМ) после 24 ч инкубации разница была выявлена главным образом по уровню высвободившегося оксигемоглобина (от 46 до 68% от общей концентрации гемоглобина), хотя метгемоглобин составлял значительную часть общего гемоглобина.

Следует отметить, что в случае спонтанного окисления эритроцитов в отсутствие ТБГ после 24 ч инкубации высвобождение общего гемогло-

бина из клеток, инкубированных в условиях ОМП, было на 162% ниже, чем для клеток, инкубированных при МПЗ ($p < 0,01$) (рис. 2а). Количество метгемоглобина и оксигемоглобина в супернатанте образцов после инкубации в условиях МПЗ составило соответственно 457% ($p < 0,001$) и 198% ($p < 0,05$) по сравнению с образцами, находящимися в условиях ОМП (рис. 2б и 2в).

Уровень кислородных радикалов в супернатанте эритроцитов после инкубации в условиях ОМП или МПЗ. Измерение относительного содержания кислородных радикалов (главным образом гидроксильного радикала и супероксид-аниона) с помощью ЭПР с использованием спин-ловушки ТЕМРО выявило статистически значимое повышение интенсивности спектра после 24 ч инкубации эритроцитов в присутствии малых концентраций ТБГ (100 и 250 мкМ) в условиях ОМП (рис. 3а, 3б; 4). Это означает, что в условиях ОМП эритроциты генерируют АФК и относительно низкие концентрации экзогенного ТБГ суммируются с эндогенными радикалами в суспензии эритроцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ

В наших экспериментах установлено, что при относительно низких концентрациях ТБГ через 4 ч инкубации эритроцитов в условиях ОМП или МПЗ различий в высвобождении общего гемоглобина нет. Также нет никакой разницы по уровню высвобождаемого гемоглобина при действии высоких концентраций ТБГ через 24 ч инкубации в условиях ОМП или МПЗ. В то же время выявлено повышенное высвобождение общего гемоглобина — в основном в виде метгемо-

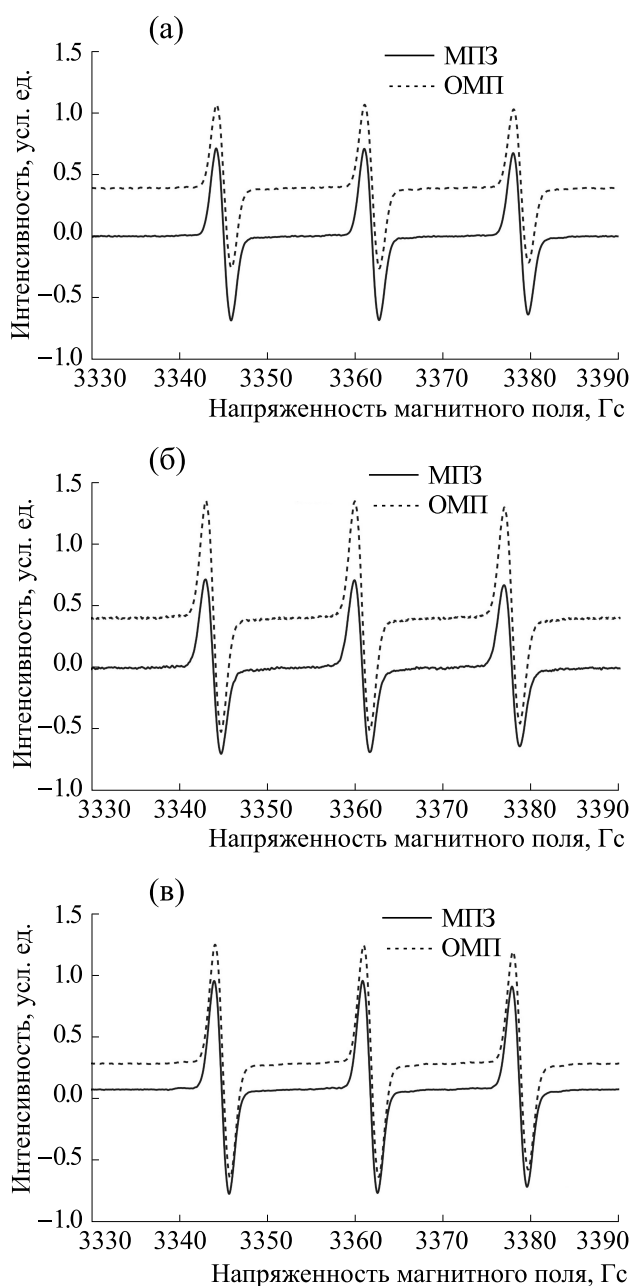


Рис. 3. Спектр ЭПР ТЕМРО в лизате эритроцитов: (а) 24 ч экспозиции в МПЗ и ГМП; (б) – в присутствии 100 мкМ ТБГ после 24 ч экспозиции в МПЗ и ГМП; (в) – в присутствии 250 мкМ ТБГ после 24 ч экспозиции в МПЗ и ГМП.

глобина – после 4 ч инкубации в условиях ОМП по сравнению с МПЗ при наличии в среде инкубации высоких концентраций ТБГ. Это свидетельствует об увеличении лизиса клеток, т.е. о повышении интенсивности гибели эритроцитов по некротическому пути и, следовательно, о потенцировании действия ТБГ гипомангнитным полем. Уровень общего гемоглобина в среде через 24 ч

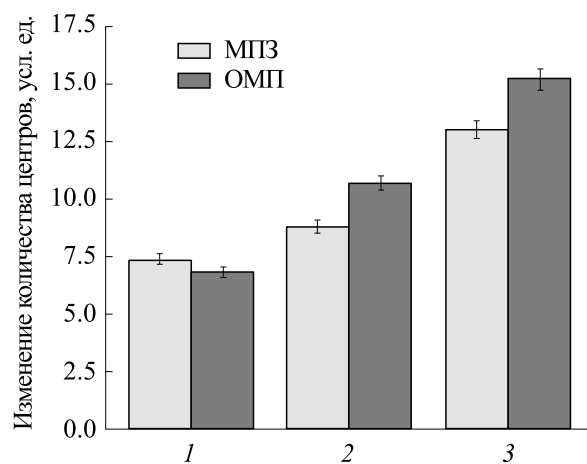


Рис. 4. Изменение количества парамагнитных центров ТЕМРО (площади под линиями спектра ЭПР, точность определения $\pm 3\%$) лизата суспензии эритроцитов после 24 ч инкубации при экспозиции МПЗ (48 мкТл) или ГМП (0,192 мкТл) для различных концентраций ТБГ – 0,0 мкМ (1), 100,0 мкМ (2) и 250,0 мкМ (3).

инкубации в условиях ОМП и МПЗ в присутствии высоких концентраций ТБГ практически одинаков, что объясняется временной зависимостью процесса лизиса (некротической гибели) и его выходом на плато. Наиболее интересным результатом эксперимента является повышенный выход гемоглобина в условиях МПЗ как в отсутствие ТБГ, так и при низких концентрациях ТБГ, когда форма оксигемоглобина преобладает, а метгемоглобин составляет значительную часть общего гемоглобина. Этот эффект может показаться парадоксальным в связи с тем, что данные ЭПР свидетельствуют о повышенном уровне АФК в лизате эритроцитов, инкубированных в условиях ОМП, по сравнению с эритроцитами, инкубированными в условиях МПЗ. Объяснение этому кажущемуся парадоксу состоит в том, что, в отличие от лизата, в суспензии эритроцитов АФК находятся в разных компартментах, причем внеклеточная среда является одним из них, и определенная часть АФК, в том числе и в первую очередь экзогенный внеклеточный ТБГ, служит акцепторами электронов, предотвращая накопление АФК в одном из внутриклеточных компартментов и преждевременное разрушение клеток. Таким образом, ТБГ при относительно низких концентрациях может выполнять антиоксидантную функцию, подавляя образование кислородных радикалов в суспензии эритроцитов. Мы не нашли в литературе данных подобного рода. В многочисленных работах экспериментального и обзорного характера представлены лишь сигнальные и токсические характеристики АФК

[31–33], тогда как двоякое действие (замедление или ускорение гибели клеток) присуще некоторым нутрицевтикам [34,35]. Что касается данных о подавлении генерации АФК в условиях ОМП [15–17], причин этому может быть несколько, и они могут дополнять друг друга. Наиболее очевидным комплексом причин представляется следующий: использование флуоресцентных зондов (чаще всего DCFH-DA) для исключительно внутриклеточного измерения АФК, главным (или первичным) из которых является супероксид-анион (особенно в случае перитонеальных макрофагов, где основным «генератором» супероксида является NADPH-оксидаза 2-го типа, или NOX2). Супероксид выделяется во внеклеточную среду, где может спонтанно или ферментативно (супероксиддисмутаза 3-го типа, СОД3) дисмутировать с образованием пероксида водорода, который через аквапорины проникает внутрь клеток и там либо расщепляется пероксидазой, либо при наличии ионов двухвалентного железа образует гидроксил-радикал (реакция Фентона). Супероксид-анион через анионные каналы может вернуться в клетку и там спонтанно или ферментативно (супероксиддисмутаза 1-го типа, СОД1) дисмутировать, ну а судьба образующегося H_2O_2 описана выше. Проблема в том, что DCFH не реагирует напрямую ни с супероксидом, ни даже с пероксидом водорода, но окисляется с образованием флуоресцентного продукта (DCF) лишь при взаимодействии с гидроксил-радикалом, хлорноватистой кислотой (HClO) и продуктами распада пероксинитрита [36]. Дополнительно следует учесть ложноположительные эффекты: окисление DCFH происходит в два этапа, а продукт одноэлектронного окисления $DCF^{\bullet-}$ реагирует с кислородом с образованием супероксид-аниона и далее по описанной выше схеме. Следующий важный фактор — гидрофильная фаза, в которой преимущественно находится и «работает» DCFH. Далее — время воздействия ОМП, которое при работе с клетками часто ограничено часами и редко сутками. Следует помнить и о том, что NOX2 — это РКС-, Ca- и NADPH-зависимый фермент. Поэтому когда используют зонды (чаще всего — DCFH-DA) и говорят о снижении АФК под действием какого-либо агента, возникает целый ряд вопросов: это результат воздействия на активность РКС, на уровень Ca^{2+} или NADPH, на активность супероксиддисмутазы или каталазы, на уровень железа, аквапоринов или анионных обменников, на скорость образования разных АФК в разных компартментах клетки, гидрофильной или гидрофобной фазе, на уменьшение ложноположительных эффектов или на что-то еще в отделимости, или на все вместе взятое?

В отличие от «полноценных» ядерных клеток, да еще таких специализированных, как макрофаги (так называемые профессиональные фагоциты), мы имели дело с эритроцитами, в которых отсутствуют ядро и митохондрии. Плотность (концентрация) их намного больше (как в организме, так и в пробе), и в них намного больше двухвалентного железа в составе гемоглобина, являющегося одним из основных генераторов АФК, тогда как имеющаяся активность NADPH-оксидазы не является определяющей; имеется многокомпонентная система антиоксидантной защиты; наконец, измерение АФК (главным образом гидроксил-радикала) осуществляется в лизате с помощью ЭПР, а спиновая ловушка TEMPO находится и «работает» преимущественно в гидрофобной фазе и не дает таких ложноположительных эффектов как DCFH; наконец, время инкубации эритроцитов в условиях ОМП перед измерением на ЭПР составило 24 ч.

В недавнем исследовании *in vivo* на крысах [37] не наблюдали никакого эффекта воздействия ОМП на гематологические параметры, в частности, не было выявлено влияние на количество и средний объем эритроцитов или концентрацию гемоглобина внутри них. Это не означает, что эффект воздействия ОМП на биохимию эритроцитов отсутствует в долгосрочной перспективе, но может указывать либо на быстрое замещение поврежденных клеток благодаря гемопоэзу в компенсаторной фазе и/или на отсутствие проявлений слабого эффекта воздействия ОМП на гематологических параметрах в течение ограниченного времени эксперимента *in vivo*. Кроме того, отсутствие ощутимого эффекта воздействия ОМП при обычных условиях существования животных не означает, что в условиях окислительно-или других типов стресса эффект действия ОМП не проявится раньше и сильнее. Аддитивность, синергизм или потенцирование различных эффектов может усилить эффект воздействия ОМП. Понимая существующие ограничения, присущие экспериментам *in vivo* с крысами, в настоящей работе мы разработали модель *in vitro* для экспресс-определения возможного влияния ОМП на эритроциты. В связи с этим следует отметить, что в предыдущих экспериментах *in vivo* не было получено доказательств повреждения эритроцитов из-за применения общедоступных и низкоспецифических методов клинической биохимии. Получив новые данные *in vitro*, уместно рассмотреть вопрос о разработке новой методологии, с помощью которой можно было бы выявить небольшие сдвиги в состоянии эритроцитов крысы *in vivo*.

Воздействие на живые клетки высоких концентраций ТБГ приводит к значительному увели-

чению цитотоксичности, генерации АФК и перекисного окисления липидов. ТБГ генерирует трет-бутоксильные ($t\text{-BuO}$) и трет-бутилпероксильные ($t\text{-BuOO}$) радикалы. Окислительные процессы, вызванные ТБГ в эритроцитах, приводят к образованию свободных радикалов (в реакции между ТБГ и клеточным гемоглобином), которые реагируют с липидами в реакциях перекисного окисления [38]. Кроме того, высокие концентрации ТБГ (0,5 мМ) вызывают снижение активности каталазы и супероксиддисмутазы [37]. Эффекты воздействия антиоксиданта/прооксиданта не только коррелируют с молекулярной структурой, но и с состоянием их распределения в реакционной системе [40]. Следует учитывать, что окислительно-восстановительный потенциал $\Delta\xi^{\circ}$ редокс-пары ТБГ ($t\text{-BuO}_2^{\bullet}/t\text{-BuO}_2\text{H}$) находится на уровне 1050 мВ, а $\log P$ составляет 1,23 [41,42]. Это означает, что при низких концентрациях ТБГ может акцептировать электроны кислородных радикалов, таких как супероксидный анион и пероксид водорода ($\Delta\xi^{\circ}$ этой редокс-пары составляет около 360 мВ [43]) в гидрофобной фазе, защищая мембрану эритроцитов от окисления. А в случае медленного развития прооксидантных эффектов они могут инициировать развитие эритроцитоза с повышением ригидности мембран эритроцитов, устойчивых к лизису, что мы и наблюдали после 24 ч воздействия низких доз ТБГ.

Механизм усиления оксидативного стресса в условиях воздействия ОМП можно объяснить с точки зрения цитотоксической мощности, которая предполагает расчет скорости развития цитотоксических эффектов за единицу времени [44]. Сочетание цитотоксического эффекта высокой мощности (ТБГ в высокой концентрации), обуславливающего некротический тип гибели клеток, с низким цитотоксическим эффектом воздействия ОМП, обуславливающим апоптозную гибель клеток, приводит к усилению и ускорению некротического пути. В то же время совместное действие двух относительно слабых воздействий, каждое из которых индуцирует апоптотический путь, может либо ускорять развитие апоптоза, либо даже замедлять его (явление типа аннигиляции или нейтрализации одних АФК другими) в случае разделения общего пула АФК клеточной мембраной или внутриклеточными структурами. Чтобы прояснить молекулярные механизмы взаимодействия ТБГ и ОМП, необходимо оценить уровень восстановленного глутатиона, активность основных антиоксидантных защитных систем эритроцитов, активность NADPH-оксидазы и систему трансмембранного переноса электронов. Этим аспектам мы планируем уделить особое внимание в наших дальнейших исследованиях.

Измерения на ЭПР-спектрометре Elexsys E580 (BRUKER, Германия) были выполнены в Ресурсном Центре «Магнитно-резонансные методы исследования» СПбГУ.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Государственной программы АААА-А18-118012290142-9 и Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2014–2020 годы (SP-14, раздел 63).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. C. Finlay, S. Maus, C. D. Beggan, et al., *Geophys. J. Intern.* **183** (3), 1216 (2010).
2. F. Steinhilber, J. A. Abreu, J. Beer, et al., *J. Geophys. Res.* **115**, 1 (2010).
3. M. S. Berguig, M. Hamoudi, and J. L. Lemoueel, *Arab. J. Geosci.* **6** (4), 1063 (2011).
4. T. R. Watters, P. J. McGovern, and R. P. Irwin III, *Annu. Rev. Earth Planetary Sci.* **35**, 621 (2007).
5. J. Ouyang and H. Li, *J. Life Sci. Res.* **4** (2), 14 (2017).
6. A. P. Dubrov, *The geomagnetic field and life: geomagnetobiology* (Plenum, New York, 1978).
7. N. A. Belyavskaya, *Adv. Space Res.* **34**, 1566 (2004).
8. B. Jia and P. Shang, *Space Medicine & Medical Engineering* **22**, 308 (2009).
9. S. V. Surma, G. B. Belostotskaya, B. F. Shchegolev, et al., *Bioelectromagnetics* **35** (8), 537 (2014).
10. C. F. Martino, H. Perea, U. Hopfner, et al., *Bioelectromagnetics* **31**, 296 (2010).
11. I. Y. Belyaev, Y. D. Alipov, and M. Harms-Ringdahl, *Biochim. Biophys. Acta* **1336**, 465 (1997).
12. И. С. Елдашев, Б. Ф. Шеголев, С. В. Сурма и др., *Биофизика* **55** (3), 868 (2010).
13. И. М. Спивак, М. Л. Куранова, Г. Р. Мавропуло-Столяренко и др., *Биофизика* **61** (3), 435 (2016).
14. A. L. Buchachenko and R. G. Lawler, *Accounts Chem. Res.* **50** (4), 877 (2017).
15. C. F. Martino and P. R. Castello, *PLoS One* **6** (8), e22753 (2011).
16. C. F. Martino, L. Portelli, K. McCabe, et al., *Bioelectromagnetics* **31**, 649 (2010).
17. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **63** (3), 484 (2018).
18. T. Ritz, R. Wiltschko, P. J. Hore, et al., *Biophys. J.* **96**, 3451 (2009).
19. I. A. Solov'ov and K. Schulten, *Biophys. J.* **96**, 4804 (2009).
20. T. Ritz, S. Adem, and K. Schulten, *Biophys. J.* **78**, 707 (2000).
21. R. J. Usselman, C. Chavarriaga, P. R. Castello, et al., *Sci. Reports* **6**, 1 (2016).
22. P. H. Misra and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* **10**, 6960 (1972).
23. C. Giulivi and E. Cadenas, *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 269 (1998).
24. E. Lang and F. Lang, *Seminars in Cell and Developmental Biology* **39**, 35 (2015).

25. I. I. Stepuro, N. A. Chaikovskaya, V. P. Vodoevich, et al., *Biochemistry* **62** (9), 967 (1997).
26. O. L. Lebedev and S. N. Kazarnovskii, *Zhurn. Obshch. Khim.* **30** (5), 1631 (1960).
27. T. Ide, H. Tsutsui, S. Kinugawa, et al., *Circ. Res.* **86** (2), 152 (2000).
28. H. Utsumi, E. Muto, S. Masuda, and A. Hamada. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 1342 (1990).
29. С. В. Сурма, П. А. Кузнецов, Р. С. Хрусталева и др., Патент на изобретение № 2454675 «Устройство для исследования влияния электромагнитных полей на биологические объекты» (зарегистрировано в Гос. реестре изобретений РФ 27 июня 2012 г.).
30. Y. Benjamini, A. M. Krieger, and D. Yekutieli. *Biometrika* **93**, 491 (2006).
31. А. Д. Надеев, В. П. Зинченко, П. В. Авдонин и др., *Токсикологич. вестн.* **2**, 22 (2014).
32. А. Д. Надеев, И. В. Кудрявцев, М. К. Серебрякова и др., *Цитология* **57** (12), 909 (2015).
33. N. V. Goncharov, P. V. Avdonin, A. D. Nadeev, et al., *Curr. Pharm. Des.* **21** (9), 1134 (2015).
34. I. Mindukshev, I. Kudryavtsev, M. Serebriakova, et al., in *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*, Ed. by R. C. Gupta (Academic Press/Elsevier, Amsterdam, 2016), pp. 319–332.
35. N. Goncharov, A. Orekhov, N. Voitenko, et al., in *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*, Ed. by R. C. Gupta (Academic Press/Elsevier, Amsterdam, 2016), pp. 555–568.
36. B. Kalyanaraman, V. Darley-Usmar, K. J. Davies, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **52** (1), 1 (2012).
37. В. Е. Стефанов, Б. Ф. Щеголев, О. В. Крячко и др., *Клеточная биология* **461** (4), 485 (2015).
38. A. V. Domanski, E. A. Lapshina, and I. B. Zavodnik. *Biochemistry (Moscow)* **70** (7), 761 (2005).
39. I. Sadowska-Woda, I. B. Sychta, M. Rachel, et al., *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **30** (2), 141 (2010).
40. Z. Liu, K. Han, Y. Lin, and X. Luo, *Biochim. Biophys. Acta* **1570**, 97 (2002).
41. T. N. Das, T. Dhanasekaran, Z. B. Alfassi, et al., *J. Phys. Chem. A* **102** (1), 280 (1998).
42. http://en.wikipedia.org/wiki/Tert-Butyl_hydroperoxide/
43. P. S. Rao and E. Hayon, *J. Phys. Chem. A* **79** (4), 397 (1975).
44. N. V. Goncharov, M. A. Terpilowski, A. D. Nadeev, et al., *Biochemistry (Moscow), Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology* **12** (2) 180 (2018).

A Hypomagnetic Field Modulates Susceptibility of Erythrocytes to *tert*-Butyl Hydroperoxide

M.A. Terpilovskii*, D.A. Khmelevskoy*, B.F. Shchegolev ***, S.V. Surma**, V.E. Stefanov*****, S.M. Sukharzhevskii*****, and N.V. Goncharov* *******

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, prosp. Toreza 44, St. Petersburg, 194223 Russia

**Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034 Russia

***Almazov National Medical Research Center, ul. Akkuratova 2, St. Petersburg, 197341 Russia

****Saint Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

*****Research Park of Saint Petersburg State University, Botanicheskaya ul. 17, Peterhof, 198504 Russia

Rat red blood cells were exposed to the Earth's magnetic field and an attenuated magnetic field, in the presence of *tert*-butyl hydroperoxide used as an inducer of oxidative stress. Spectral analysis (within the wavelength range of 500–700 nm) was used to estimate the concentration of three forms of hemoglobin – oxyhemoglobin, methemoglobin, and hemichrome being released throughout erythrocyte hemolysis. Concentration of reactive oxygen species was determined in samples by spin trapping using electron paramagnetic resonance. It was found that after 4-hour incubation at high *tert*-butyl hydroperoxide concentrations (>700 μM), red blood cells, which were exposed to an attenuated magnetic field, released considerably more ($p < 0.05$) hemoglobin, mostly methemoglobin. After 24-hour incubation at low *tert*-butyl hydroperoxide concentrations ($\leq 350 \mu\text{M}$), erythrocytes, which were exposed to the Earth's magnetic field released relatively more ($p < 0.001$) hemoglobin, with methemoglobin as a major form of total hemoglobin. Red blood cells exposed to the attenuated magnetic field generated more oxygen radicals than cells exposed to the Earth's magnetic field. Under certain oxidative stress conditions, the attenuated magnetic field can impair the functional state of red blood cells and provoke cell death. However, low reactive oxygen species concentrations can neutralize attenuated magnetic field effects. .

Keywords: erythrocytes, hemoglobin, attenuated magnetic field, reactive oxygen species, cell death