

УДК 577.3

**ПРОТЕКТОРНА ДІЯ МЕЛАНІНУ НА ПЕРОКСИД-ІНДУКОВАНЕ УШКОДЖЕННЯ
ТА ЗАПРОГРАМОВАНУ ЗАГИБЕЛЬ ТИМОЦИТІВ В УМОВАХ ВПЛИВУ
ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ПОЛЯ ЧАСТОТОЮ 8 Гц**

Собко В.М., Мартинюк В.С., Гудкова Д.О.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, біологічний факультет,
01601 Київ, вул. Володимирська, 64
e-mail: svitya@ua.fm; mavis@science-center.net*

Надійшла до редакції 10.01.2010

Методом подвійного прижиттєвого фарбування клітин за допомогою флуоресцентних барвників Hoechst-33258 та пропідіум йодид досліджували вміст живих, некротичних та апоптуючих тимоцитів щурів, а також їх морфологічні особливості у суспензії після годинної та трьохгодинної інкубації з 0,1мМ пероксидом водню та при впливі електромагнітного поля частотою 8 Гц, як при наявності меланіну так і без нього. Знайдено, що в умовах пероксид-індукованого пошкодження клітин вплив електромагнітного поля частотою 8 Гц на суспензію тимоцитів призводить до збільшення загальної кількості апоптуючих клітин в основному за рахунок клітин з конденсованим хроматином, однак при наявності меланіну їхня кількість суттєво зменшується. Зроблено припущення, що вплив 8 Гц в певній мірі активує запуск механізмів апоптозу, а меланін, як потужний антиоксидант, гальмує індукцію апоптичних процесів.

Ключові слова: апоптоз, низькочастотне електромагнітне випромінювання, меланін, конденсований хроматин, фрагментоване ядро, апоптичні тільця, пероксид водню.

ВСТУП

Меланін, який синтезується багатьма клітинами, виконує різноманітні фізіологічні функції. Він є важливим фотопротекторним фактором, що поглинає ультрафіолетове випромінювання. Ця речовина також демонструє антиоксидантні [1,2,3], імуномодулюючі [4,5], антиканцерогенні [4,6] та стрес-протекторні [7,8] властивості, що дозволяє його використовувати в медицині. Водночас з цим, меланін все ширше використовується у харчовій промисловості [9].

Давно відомо, що електромагнітний фон природного та техногенного походження в діапазоні наднизьких частот є важливим фактором навколишнього середовища. Електромагнітні хвилі здатні викликати різноманітні біологічні ефекти [10], серед яких окремих інтерес викликає їх можливий вплив на запрограмовану загибель клітин [11,12]. На цей час механізми впливу електромагнітних хвиль низькочастотного діапазону на клітинні процеси мало досліджені і потребують ретельного вивчення. Але дослідження комбінованих впливів низькочастотного електромагнітного випромінювання в поєднанні з різними хімічними факторами, зокрема такими, як меланін або пероксид водню, викликають значний інтерес, тому що в реальних умовах в навколишньому середовищі живі організми піддаються декільком впливам одночасно. У зв'язку з цим метою роботи було дослідити рівень життєздатності, ранні морфологічні

зміни структури хроматину тимоцитів та оцінити рівень фрагментації ДНК при дії меланіну, пероксиду водню та змінного електромагнітного поля частотою 8 Гц при різному комбінуванні впливів і при різних експозиціях.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Моделлю для дослідження впливу електромагнітних хвиль низькочастотного діапазону на процеси, спричинені дією меланіну, як протектора, та пероксиду водню (0,1 мМ), як пошкоджуючого фактора, було обрано суспензію ізольованих тимоцитів, оскільки вони є неповністю диференційованими клітинами, які характеризуються певною нестабільністю геному, порівняно з іншими клітинами, та низькою активністю систем репарації одноланцюгових розривів ДНК, що полегшує активацію шляхів апоптозу за дії різноманітних чинників. Використання ізольованих тимоцитів для дослідження апоптозу *in vitro* дозволяє здійснювати морфологічний контроль стану тимоцитів і виявити клітини з фрагментованим хроматином та апоптичні тільця, тоді як *in vivo* останні швидко поглинаються фагоцитами.

Тимоцити отримували з тимусу щурів лінії Вістар масою 120-150 г., котрі утримувались на стандартному раціоні віварію. Виділений тимус перетирали через ситечко із синтетичного волокна ($\varnothing = 0,1$ мм) в буферному розчині наступного складу (г/л): NaCl –

6,796; KCl – 0,274; CaCl₂ – 0,288; NaHCO₃ – 2,091; KH₂PO₄ – 0,299; MgSO₄ – 0,144; глюкоза – 1,8; (pH 7.4). Кількість клітин підраховували за допомогою світлового мікроскопа у камері Горяєва з використанням барвника (0,4 % р-н трипанового синього).

Інкубацію тимоцитів ($2-4 \times 10^6$ кл/мл) здійснювали у водному термостаті при 37°C в стаціонарному середовищі RPMI-1640 з додаванням 2,05 мМ глутаміну. Інкубація проводилася протягом 3 годин.

Клітини (тимоцити) у вигляді суспензії піддавали дії досліджуваних чинників – перекису водню, меланіну, електромагнітного поля (ЕМП) та їх комбінації. Після одно- або трьохгодинної експозиції спостерігали морфологічні зміни, виявлені методом подвійного прижиттєвого фарбування клітин за допомогою флуоресцентних барвників. Зокрема Hoechst-33258, котрий вільно проникає через клітинні мембрани, зв'язується в ядрі з ДНК на зовнішньому боці спіралі, зумовлюючи при цьому флуоресценцію в синій (блакитній) області спектра [13]. Пропідіум йодид проникає лише в некротичні клітини та зв'язується з ДНК, зумовлюючи флуоресценцію в червоній області спектра [14]. Для оцінки вмісту життєздатних, некротичних та апоптичних клітин після інкубації клітинних суспензій з меланіном в умовах впливу ЕМП клітини відмивали буфером, після чого їх фарбували флуоресцентними барвниками протягом 15 хв у темряві при кімнатній температурі. Забарвлені клітини знову відмивали та фіксували в темряві 4% забуференим розчином формаліну (pH 7.4) протягом 5 хв і відмивали від формаліну тим же буфером. Аліквоту клітинної суспензії наносили на предметне скло, робили мазок та висушували у темряві. Морфологічну оцінку стану клітин проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопа Leica DM1000 (окуляр×10, об'єктив×100). У кожному зразку аналізували не менше 2000 клітин (4 підрахунку по 500 клітин).

Окисний стрес є одним з типових механізмів пошкодження клітин шляхом індукції некрозу та апоптозу, саме тому було обрано цю робочу модель. Поширеним методологічним підходом дослідження клітин при окисному стресі є вплив на культуру клітин екзогенних активних форм кисню (АФК). В нашому експерименті в ролі такого агента виступав пероксид водню в кінцевій концентрації 0,1 мМ [15]. Меланін використовували в якості антиоксидантного агента в розрахунку 5 мкг цієї речовини на 1 мл клітинної суспензії. Згідно з даними ріних дослідників така концентрація виявилась ефективною для пригнічення перекисного окиснення ліпідів і захисту клітин від пошкодження [16,17]. Препарат меланіну (комерційна назва: поліфенолкарбоксильний комплекс Антарктичних чорних дріжджів «Nadsoniella nigra») вироблено компанією «Чага» (Україна) з дріжджів *Nadsoniella nigra* штам X-1 і люб'язно надано професором Т.В. Береговою.

Клітинні суспензії піддавали впливу ЕМП наднизької частоти, яке створювали за допомогою кілець Гельмгольца. Імпульси були прямокутної форми

та різної полярності. Частота магнітного поля складала 8 Гц, індукція - 25 мкТл. Частота магнітного поля вибрана на основі її екологічної та геофізичної значущості [10,18]. Вектор індукції магнітного поля був паралельним вектору геомагнітного поля. Досліджувані зразки поміщали в кільця Гельмгольца. Контрольні проби знаходились в умовах фонових значень електромагнітного поля наднизьких частот, характерних для даної лабораторії (20-65 нТл). Для оцінки можливого впливу різниць у рівні фонових магнітних полів в місцях розташування дослідних та контрольних зразків проводили експерименти з псевдовпливом магнітного поля. В цьому випадку досліджувані зразки поміщали в кільця Гельмгольца, не піддаючи дії магнітного поля.

Статистичну обробку результатів проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики, використовуючи t-критерій Стьюдента для оцінки достовірності різниць між статистичними вибірками.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті проведення серії експериментів отримано дані щодо кількісної оцінки вмісту живих, некротичних та апоптичних клітин у суспензії тимоцитів у контролі та після дії досліджуваних чинників. Апоптичні клітини було розділено та класифіковано за морфологічними ознаками в результаті прижиттєвого фарбування клітин із застосуванням двох флуоресцентних барвників (рис.1). Така класифікація використовується у дослідженнях процесів апоптозу. [11,13,14].

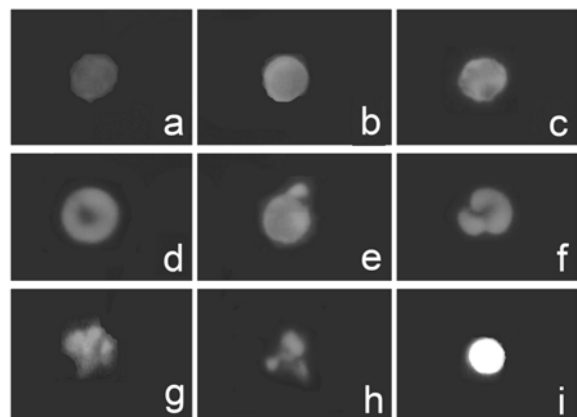
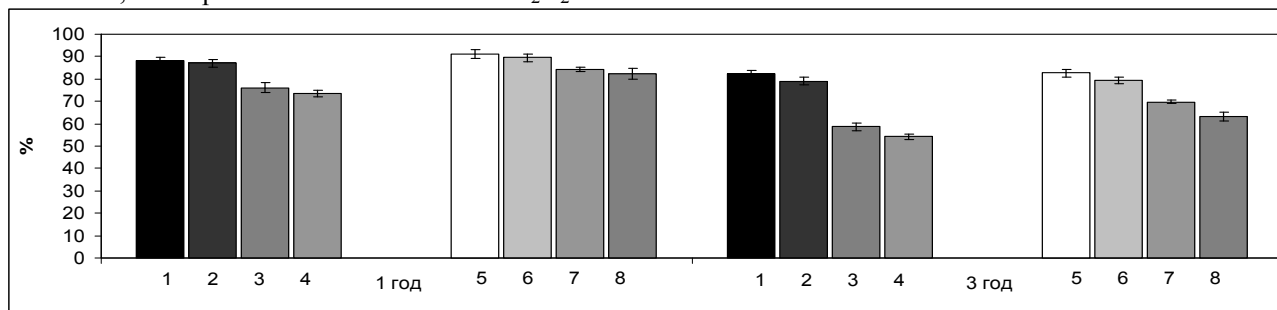


Рис.1. Ядра тимоцитів за даними флуоресцентної мікроскопії (флуоресцентні барвники Hoechst-33258, пропідіум йодид). а – нормальна клітина; b,c,d – клітини з конденсованим хроматином; e,f,g – клітини з фрагментованим ядром; h – апоптичні тільця; i – некротична клітина.

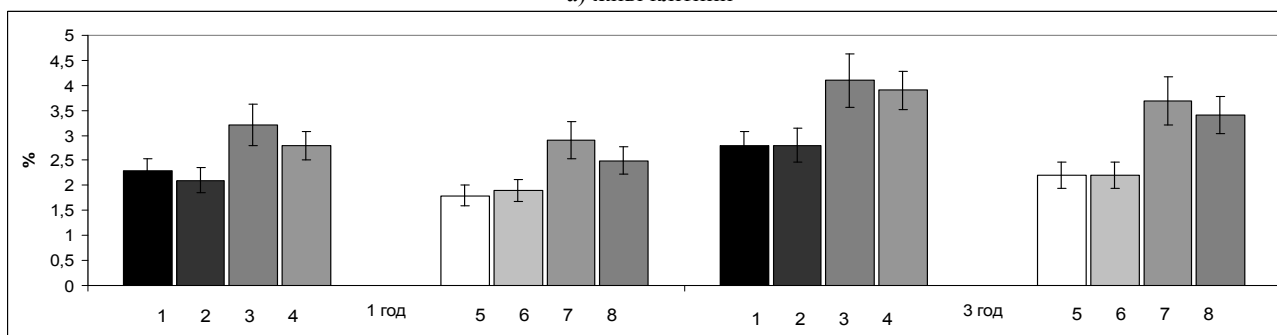
Дані, наведені на рис.2а, свідчать, що після годинної та трьохгодинної експозиції при впливі електромагнітного поля частотою 8 Гц кількість життєздатних клітин майже не змінюється порівняно з контролем. При впливі 0,1 мМ H₂O₂ кількість життєздатних клітин зменшується на 11,8% (P<0.05) та 23,5% (P<0.05) відповідно порівняно з контролем, а при комбінованому впливі з ЕМП кількість життєздатних клітин зменшується відповідно на

14,7% та 28 % ($P<0.05$) порівняно з контролем. При наявності меланіну в суспензії відслідковується його протекторна дія, зокрема як антиоксиданту. Так, при годинній експозиції меланіну з H_2O_2 кількість життєздатних клітин зростає на 8,1% порівняно з впливом лише H_2O_2 , а при комбінованому впливі меланіну з H_2O_2 та ЕМП частотою 8 Гц їхня кількість зростає на 8,9% порівняно з впливом лише H_2O_2 та 8

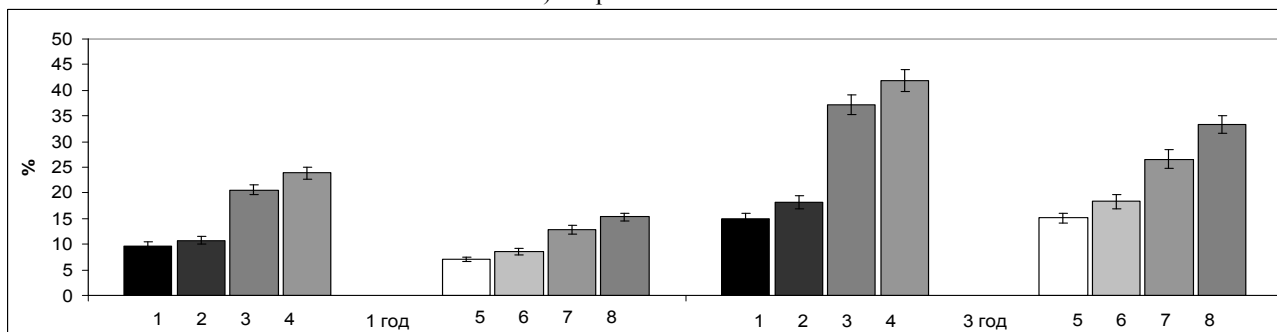
Гц. Коли експозиція тривала три години, то спостерігаються схожі зміни: при впливі меланіну з H_2O_2 кількість життєздатних клітин зростає на 11% порівняно з впливом лише H_2O_2 , а при комбінованому впливі меланіну з H_2O_2 та ЕМП частотою 8 Гц їхня кількість зростає на 9,1% порівняно з впливом лише H_2O_2 та 8 Гц.



а) живі клітини



б) некротичні клітини



в) апоптичні клітини

Рис.2. Життєздатність клітин.

1) контроль; 2) ЕМП, частота 8 Гц; 3) H_2O_2 ; 4) ЕМП, частота 8 Гц+ H_2O_2 ; 5) меланін; 6) меланін+ЕМП, частота 8 Гц; 7) меланін+ H_2O_2 ; 8) меланін+ЕМП, частота 8 Гц+ H_2O_2

Кількість некротичних клітин суттєво не змінюється відносно контролю як при годинній, так і трьохгодинній експозиції тимоцитів при впливі ЕМП 8 Гц, 0,1 мМ H_2O_2 , меланіну та при комбінованому впливі (рис.2б).

Як видно з даних, наведених на рис. 2в, кількість апоптичних клітин при впливі ЕМП 8 Гц як при годинній, так і трьохгодинній експозиції майже не змінюється порівняно з контролем, тоді як при впливі 0,1 мМ H_2O_2 та комбінованому впливі 0,1 мМ H_2O_2 й ЕМП 8 Гц кількість апоптичних клітин збільшується на 10,9% та 14,2% відповідно після годинної експозиції порівняно з контролем та на 22,2% і 26,9% відповідно після трьохгодинної експозиції порівняно з контролем. Отже, варто звернути увагу на те, що при

комбінованому впливі апоптичних клітин достовірно ($P<0,05$) більше, ніж при дії лише перексиду водню, що може вказувати на важливу роль МП ННЧ в ініціації каскадів захисних механізмів клітини, а також на зміну інших фізіологічних функцій, що спричинюються ЕМП 8 Гц саме у відповідь на пошкоджуючі фактори. При наявності меланіну у суспензії кількість апоптичних клітин значно знижується. Так, після годинної експозиції при впливі меланіну з H_2O_2 кількість апоптичних клітин зменшується на 7,8% порівняно з впливом лише H_2O_2 , а при комбінованому впливі меланіну з H_2O_2 та ЕМП частотою 8 Гц їхня кількість зменшується на 8,6% порівняно з впливом лише H_2O_2 та поля частотою 8 Гц. Після трьохгодинної експозиції спостерігаються

схожі зміни: при впливі меланіну з H_2O_2 кількість апоптичних клітин зменшується на 10,6% порівняно з впливом лише H_2O_2 , а при комбінованому впливі меланіну з H_2O_2 та ЕМП частотою 8 Гц їхня кількість зменшується на 8,6% порівняно з впливом лише H_2O_2 та 8 Гц.

Основною морфологічною ознакою апоптозу тимоцитів, спричиненого дією H_2O_2 у відповідній концентрації, є збільшення кількості клітин із конденсованим хроматином. А як відомо, конденсація хроматину – це проміжний етап апоптозу, який у випадку, коли спостерігається значна кількість розривів ДНК, супроводжується її фрагментацією та появою апоптичних тілець [11]. Таку ж тенденцію ми спостерігали і в нашому експерименті, коли кількість апоптичних клітин збільшується в основному за рахунок клітин з конденсованим хроматином (рис. 3а). У зразках, що піддавалися впливу ЕМП частотою 8 Гц не спостерігалось суттєвого коливання показника апоптичних клітин, тоді як при дії H_2O_2 та комбінованому впливі H_2O_2 й ЕМП частотою 8 Гц кількість апоптичних клітин з конденсованим хроматином достовірно збільшується на 6,5% та 10,5% ($p < 0,05$) відповідно після годинної експозиції порівняно з контролем та на 13,9% і 19,5% ($p < 0,05$) відповідно після трьохгодинної експозиції порівняно з

контролем. При впливі меланіну з H_2O_2 кількість апоптичних клітин з конденсованим хроматином зменшується на 4,7% після годинної експозиції та на 4,8% після трьохгодинної експозиції порівняно з впливом лише H_2O_2 , а при комбінованому впливі меланіну з H_2O_2 та ЕМП частотою 8 Гц їхня кількість зменшується на 5,8% після годинної експозиції та на 3,4% після трьохгодинної експозиції порівняно з впливом лише H_2O_2 та 8 Гц.

Після годинної та трьохгодинної експозиції тимоцитів при дії всіх варіантів досліджуваних чинників кількість апоптичних клітин з фрагментованим ядром та апоптичними тільцями майже не змінюється відносно контролю, за винятком трьохгодинної експозиції тимоцитів при впливі H_2O_2 та комбінованому впливі H_2O_2 й ЕМП частотою 8 Гц з меланіном та без нього (рис. 3б). При впливі H_2O_2 та комбінованому впливі H_2O_2 й ЕМП частотою 8 Гц кількість клітин з апоптичними тільцями зростає на 7,5% та 6,4% відповідно, порівняно з контрольними зразками. При впливі меланіну з H_2O_2 кількість клітин з апоптичними тільцями зменшується на 5% порівняно з впливом лише H_2O_2 , а при комбінованому впливі меланіну з H_2O_2 та ЕМП частотою 8 Гц їхня кількість зменшується на 4% порівняно з впливом лише H_2O_2 та 8 Гц (рис 3в).

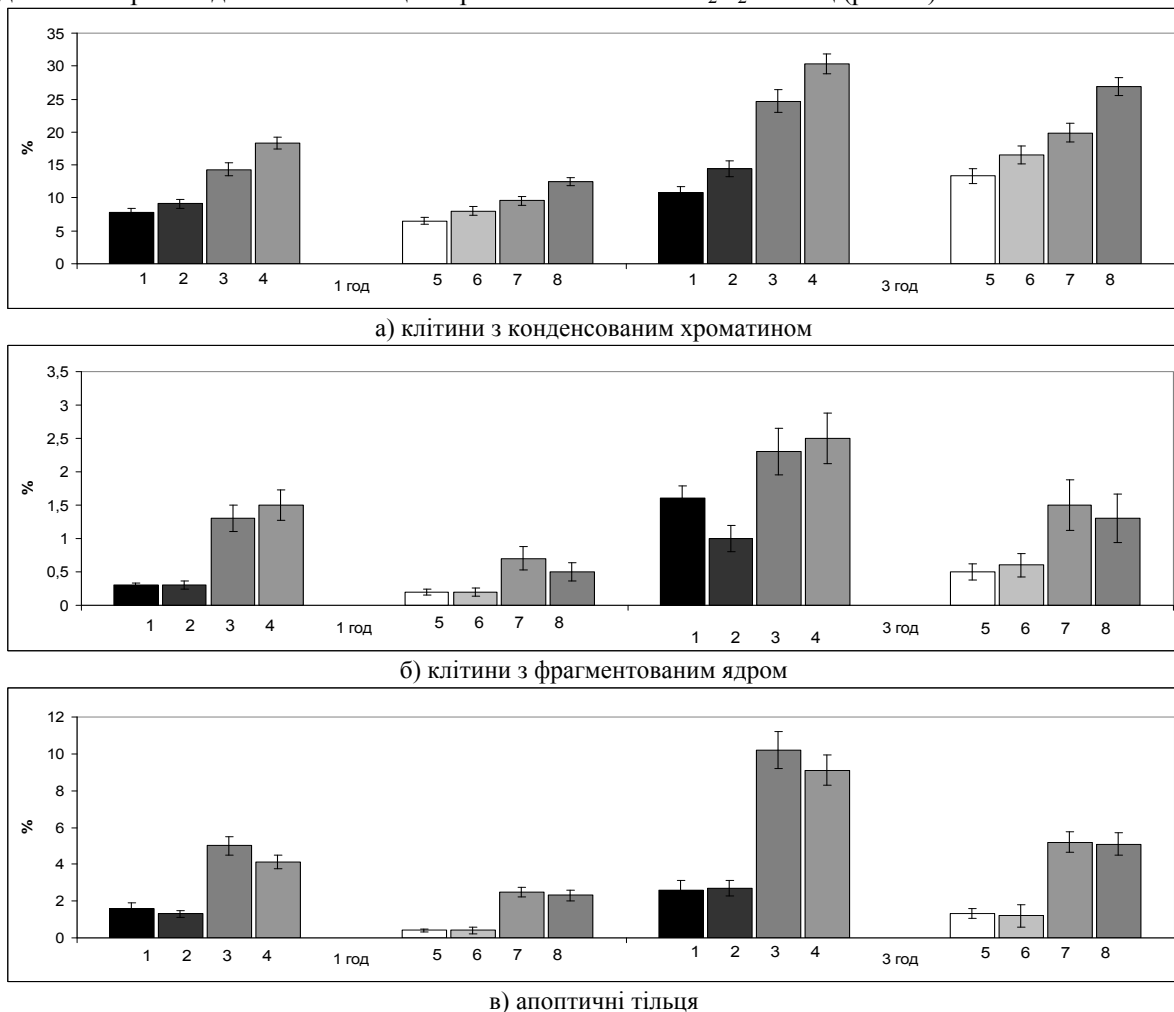


Рис.3. Апоптичні клітини у процентах від загальної кількості клітин.

1) контроль; 2) ЕМП, частота 8 Гц; 3) H_2O_2 ; 4) ЕМП, частота 8 Гц+ H_2O_2 ; 5) меланін; 6) меланін+ЕМП, частота 8 Гц; 7) меланін+ H_2O_2 ; 8) меланін+ЕМП, частота 8 Гц+ H_2O_2

З отриманих результатів можна зробити висновок, що вплив ЕМП частотою 8 Гц в певній мірі активує запуск механізмів апоптозу, оскільки після трьохгодинної експозиції тимоцитів при комбінованому впливі 0,1 мМ Н₂О₂ і ЕМП 8 Гц кількість апоптичних клітин достовірно збільшується на 5% (p<0,05) порівняно з кількістю апоптичних клітин після трьохгодинної експозиції тимоцитів при впливі тільки 0,1 мМ Н₂О₂. Як і передбачалося, меланін здійснює антиоксидантний вплив на клітини тимоцитів, підвищуючи їхню життєздатність та знижуючи кількість ушкоджених клітин. Але, як свідчать результати, в умовах впливу електромагнітного поля наднизьких частот захисний ефект меланіну не проявляється в повній мірі. У зв'язку з цим можна припустити, що механізми дії електромагнітного поля наднизьких частот можуть бути пов'язані не тільки з їх впливом на процеси вільнорадикального пошкодження, що гальмуються меланіном, як потужним антиоксидантом. Інші механізми можуть бути пов'язані з іншими фізико-хімічними явищами, наприклад, такими, як зміни гідрофільно-гідрофобного балансу [19] і розчинності речовин в колоїдних системах [20], а також зміни спорідненості білків і нуклеїнових кислот до іонів Са²⁺ і Mg²⁺ [21], що у свою чергу може спричинити активацію альтернативних шляхів апоптозу.

ВИСНОВКИ

1. При дії перекису водню спостерігається збільшення кількості апоптуючих клітин порівняно з контролем, а при комбінованому впливі з ЕМП частотою 8 Гц цей ефект посилюється.

2. Збільшення кількості апоптуючих клітин при впливі перекису водню та комбінованому впливі з 8 Гц відбувається в основному за рахунок клітин з конденсованим хроматином, що, ймовірно, свідчить про посилення активації механізмів ініціації апоптозу при впливі ЕМП частотою 8 Гц в присутності перекису водню.

3. По відношенню до перекис-індукованого пошкодження тимоцитів меланін демонструє протекторну дію, яка проявляється не в повній мірі в умовах впливу електромагнітного поля частотою 8 Гц.

Література

- Brenner M, Hearling V.G. The protective role of melanin against UV damage in human skin // *Photochem Photobiol.* – 2008. – Vol. 84(3). – P. 539-549.
- Goding CR. Melanocytes: the new Black// *Int J Biochem Cell Biol.* – 2007. – Vol.39. – P.275–279.
- Holleran WM, Uchida Y, Halkier-Sorensen L, Haratake A, Hara M, Epstein JH, Elias PM. Structural and biochemical basis for the UVB-induced alterations in epidermal barrier function// *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* – 1997. – Vol.13. – P.117–128.
- Kripke ML. Skin cancer, photoimmunology, and urocanic acid//*Photodermatology.* – 1984. – Vol.1. – P.161–163.
- Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation // *Nature.* – 2007. – Vol.445. – P.843–850.
- Mackintosh JA. The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin // *J Theor Biol.* – 2001. – Vol.211. – P.101–113.
- Gibbs S, Murlı S, De Boer G, Mulder A, Mommaas AM, Ponc M. Melanosome capping of keratinocytes in pigmented reconstructed epidermis—effect of ultraviolet radiation and 3-isobutyl-1-methyl-xanthine on melanogenesis // *Pigment Cell Res.* – 2000. – Vol.13. – P.458–466.
- Steinert PM. The complexity and redundancy of epithelial barrier function // *J Cell Biol.* – 2000. – Vol.151. – P.5–8.
- Chen T.C, Chimeh F, Holick MF. Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D // *Arch Biochem Biophys.* – 2007. – Vol. 460. – P. 213-217.
- Мартынюк В.С., Темуриянц Н.А., Владимирский Б.М. У природы нет плохой погоды: космическая погода в нашей жизни. - Киев: Издатель В.С. Мартынюк, 2008. - 179 с.
- Гринюк І.І., Корнійчук Г.М., Капранов О.О., Матишевська О.П. Зміни структурного стану хроматину в тимоцитах на ранньому етапі апоптозу за індукції перекисом водню і радіацією // *Укр. біохім. журн.* – 2004. – том 76, №5. – С. 90-95.
- Коваль Т.В., Назарова О.О., Матишевська О.П. Зміна вмісту глутатіону в тимоцитах шурів за індукції апоптозу під впливом Н₂О₂ або радіації // *Укр. біохім. журн.* – 2008. – том 80, №2. – С. 114-119.
- Hawley R., Hawley T. *Flow Cytometry Protocols // Methods in Molecular Biology* - 2004. - Vol. 263. – P. 34-37.
- Schlegel K., Füllekrug M. Weltweite Ortung von Blitzen: 50 Jahre Schumann-Resonanzen // *Physik in unserer Zeit* – 2002. Vol. 33, №6. - P. 256-261.
- Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Часовских Н.Ю., Кайгородова Е.В., Старикова Е.Г., Стариков Ю.В., Радзивил Т.Т., Крат И.В. Роль редокс-зависимых сигнальных систем в регуляции апоптоза при окислительном стрессе // *Цитология* – 2009. - том 51, №4. – С. 329-334.
- Савицький Я.М., Кімакович В.Й., Федевич Ю.М. Вплив меланіну на цитопротекторні процеси у слизовій оболонці шлунка. // *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія.* — 2001, №1. — С. 29-30.
- Чижанська Н.В., Цирюк О.І., Берегова Т.В. Рівень кортизолу в крові шурів до та після стресу на фоні дії меланіну // *Вісник проблем біології і медицини.* - 2007. - Вип.1. - С. 40-44.
- Пресман А. С. Электромагнитные поля и живая природа. – М.: Наука, 1968. – 288 с.
- Miyakoshi J. Effects of static magnetic fields at cellular level // *Prog Biophys Mol Biol.* – 2005. – Vol. 87. – P.213-223.
- Panagopoulos DJ, Karabarbounis A, Margaritis LH. Mechanism for action of electromagnetic fields on cells // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2002. – Vol.298. – P.95-102.
- Zhang XR, Kobayashi H, Hayakawa A, Ishigaki T. An evaluation of the biological effects of three different modes of magnetic fields on cultured mammalian cells // *Nagoya J Med Sci.* – 1995. – Vol. 58. – P.157-164.

ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕЛАНИНА НА ПЕРОКСИД-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ И ПРОГРАММИРОВАННУЮ ГИБЕЛЬ ТИМОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЯ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ ЧАСТОТОЙ 8 Гц**Собко В.М. , Мартынюк В.С., Гудкова Д.О.**

Методом двойного прижизненного окрашивания клеток с помощью флуоресцентных красителей Hoechst-33258 и пропидиум йодид исследовали содержание живых, некротических и апоптических тимоцитов крыс, а также их морфологические особенности в суспензии после часовой и трехчасовой инкубации с 0,1 мМ пероксидом водорода и при воздействии электромагнитного поля частотой 8 Гц, как при наличии меланина так и без него. Установлено, что в условиях пероксид-индуцированного повреждения клеток воздействие электромагнитного поля частотой 8 Гц на суспензию тимоцитов приводит к увеличению общего количества апоптических клеток в основном за счет клеток с конденсированным хроматином, однако при наличии меланина их количество существенно уменьшается. Сделано предположение, что влияние МП 8 Гц активизирует запуск механизмов апоптоза, а меланин, как мощный антиоксидант, тормозит индукцию апоптических процессов.

Ключевые слова: апоптоз, низкочастотное электромагнитное излучение, меланин, конденсированный хроматин, фрагментированное ядро, апоптические тельца, пероксид водорода.

PROTECTSVE EFFECT OF MELANINE ON THE H₂O₂-INDUSED INJURY AND PROGRAMMED CELL DEATH OF RAT'S THYMOCYTES UPON INFLUENCE ELECTROMAGNETIC FIELD WITH FREQUENCY OF 8 Hz**Sobko V.M. , Martynyuk V.S., Gudkova D.O.**

Using the method of double cell staining by fluorescent dyes (Hoechst-33258 and propidium iodide) content of alive, apoptic and necrotic cells in suspension of isolated rat thymocytes and also their morphological features after one and three hour of incubation with 0.1 mM hydrogen peroxide and exposure to electromagnetic fields, considering both individual and combined effects, were studied. It was found that the exposure of the suspension of thymocytes to electromagnetic fields with frequency of 8 Hz combined with the action of hydrogen peroxide led to the increased number of apoptic cells mainly due to cells with condensed chromatin, nevertheless melanin essentially reduced their quantity if added. It was supposed that the influence of MF 8 Hz in some way activates apoptosis execution mechanisms, and melanin as powerful antioxidant diminished the initiation of apoptosis processes.

Key words: apoptosis, electromagnetic fields of low frequencies, melanin, condensed chromatin, nucleus fragmentation, apoptic bodies, hydrogen peroxide.
