

При выборе мер решения глобальных экономических проблем, таких как создание безотходного производства, создание теплоэнергоресурсосберегающих технологий, использование альтернативных источников энергии, сохранение животного и растительного мира, ликвидация экологической безграмотности, также было предложено выбрать из них три наиболее важных. Наиболее эффективными мерами студенты-экологи и студенты-экономисты определили создание безотходного производства и теплоэнергоресурсосберегающих технологий.

Также студентам было предложено выбрать, кто должен заниматься решением глобальных экологических проблем. Мнения студентов холерического типа личности экологического и экономического профиля совпали: они считают, что проблемами должны заниматься организации и специалисты в области охраны окружающей среды. Также у студентов сангвинического типа личности совпали мнения о том, что каждому человеку необходимо заниматься решением экологических проблем.

Мнения студентов двух групп флегматического и меланхолического типа личности не совпали в полной мере, однако были близки друг к другу: ответственным за решение глобальных проблем флегматики разделили между наукой и каждым человеком.

У студентов-меланхоликов двух групп также не совпало единое мнение. Ответы крутились около вариантов наука, каждый человек и организации и специалисты в области охраны окружающей среды.

В открытых вопросах студенты высказывали свою позицию относительно глобальных экологических проблем. На вопросы «По вашему мнению, экологические знания имеют первостепенное значение для современного человека?» и «Как Вы считаете, что сегодня надо делать в первую очередь, чтобы сохранить нашу экологию чистой?» и юноши и девушки дали развернутые ответы. Согласно результатам, данных двух вопросов, студенты-холерики мыслят масштабно и выбирают наиболее весомые проблемы, например, глобальное потепление, и тяжело осуществимые меры, к примеру создание безотходного производства. С другой стороны – респонденты-меланхолики – насчет опасных экологических проблем также выделяют наиболее весомые, но в выборе мер определяются в более приземленных (например, использование альтернативных источников энергии).

Таким образом, согласно результатам анкетирования, студенты в общем оценивают глобальные проблемы серьезно, но каждый в виду своего типа личности дает свою эмоциональную реакцию на них. Студент с холерическим темпераментом оценивает глобальные экологические проблемы серьезно и дает сильные эмоциональные реакции на них. Эмоции у холерика возникают легко, и они более интенсивны и продолжительны. Человек с сангвиническим темпераментом склонен рассматривать глобальные экологические проблемы более оптимистично. Он считает их важными и разрешимыми, верит в успехи науки и прогресса в их преодолении. Флегматик склонен оценивать глобальные экологические проблемы более глубоко, понимая всю полноту трудностей, с которыми сталкиваются ученые; он рассматривает их с рациональных позиций, позиций логики и анализа. Человек с меланхолическим темпераментом плохо оценивает решение глобальных экологических проблем, считает их реальной катастрофой и не верит в возможность их решения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арзаканьян, И. Г. Экология и культура / И. Г. Арзаканьян. – Москва: Литер, 2009. – 93 с.
2. Михальченко, К.А. Развитие личности в период взрослости в концепциях А. Маслоу, Э. Эриксона и К. Роджерса // Психология в России и за рубежом: материалы международной научной конференции, Санкт-Петербург, октябрь 2011 г. – Санкт-Петербург: Реноме, 2011.
3. Зимбардо, Ф. Психология личности / Ф. Зимбардо. – СПб.: Питер, 2012. – 569 с.

ДЕЙСТВИЕ КРЕАТИНА В КАЧЕСТВЕ ПИЩЕВОЙ ДОБАВКИ НА ГЕНОМНУЮ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ РЕНТГЕНОВСКОМУ ИЗЛУЧЕНИЮ

THE EFFECT OF CREATINE AS DIETARY SUPPLEMENT ON GENOMIC INSTABILITY OF MONONUCLEAR CELLS OF PERIPHERAL BLOOD AND HEPATOCYTES OF RATS IMPACTED BY X-RAY RADIATION

М. С. Петросян, Л. С. Нерсесова

M. S. Petrosyan, L. S. Nersesova

Институт молекулярной биологии НАН РА, Ереван, Армения

marypetrosyan1990@gmail.com

Institute of Molecular Biology of NAS RA, Yerevan, Armenia.

Изучено действие креатина (Кр) в качестве пищевой добавки (креатин моногидрат в растворе 0,9% глюкозы, per os в дозе 1г/кг веса крысы, за 2 недели до и 2 недели после облучения) на динамику пострадиационных повреждений ДНК мононуклеарных клеток периферической крови и нарушений распределения

ядер по плоидности гепатоцитов крыс, индуцированных общим однократным рентгеновским излучением в дозах 4,5 и 6,5 Гр. Показано протекторное действие Кр на исследованные параметры, что способствует уменьшению геномной нестабильности этих клеток, вызванной радиацией, свидетельствуя, таким образом, о противолучевой активности Кр.

The effect of creatine (Cr) as a dietary supplement (creatine monohydrate in a 0.9% glucose solution per os at the 1g/kg of rat weight dosage, for two weeks prior to and two weeks after the irradiation) on the post-radiation DNA damage of peripheral blood mononuclear cells and the distribution disorders per rats' hepatocyte ploidy, induced by the total one-time irradiation in the dosage of 4.5 and 6.5 Gy, has been studied. The results have demonstrated that Cr has a protective effect per the parameters observed, which helps reduce the radiation-induced genomic instability of the respective cells, thus testifying to the radioprotective activity of Cr.

Ключевые слова: креатин, рентгеновское излучение, мононуклеарные клетки периферической крови, нитевые разрывы ДНК, плоидность гепатоцитов, крыса.

Key words: creatine, X ray irradiation, peripheral blood mononuclear cells, DNA strand breaks, hepatocyte ploidy, rat.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-1-310-313>

Креатин (Кр) – азотсодержащая карбоновая кислота, которая поступает в организм человека в составе пищи, а необходимая оставшаяся часть синтезируется в самом организме. Из крови, через которую Кр переносится в ткани, он поглощается с помощью специфического Кр-транспортёра клеток [1]. Кр в качестве пищевой добавки повышает энергетический статус организма, усиливает его активность и выносливость, предотвращает атрофию мышц, в том числе возрастную, поэтому широко применяется как эргогоническое средство в спорте, а также пожилыми людьми для повышения физической активности [1]. В последние десятилетия в доклинических исследованиях убедительно показано нейропротекторное действие Кр, однако клинические испытания его в качестве адъювантной терапии в случаях предотвращения и/или лечения нейродегенеративных заболеваний, а также артритов, мышечной дистрофии и др. все еще продолжаются [1]. Как считают многие исследователи в основе протекторного действия Кр лежат его антиоксидантные и антиапоптотические свойства. Так, например, показана эффективность Кр как в прямом перехвате ряда реакционноспособных радикалов [1], так и в регуляции окислительного фосфорилирования. Кр в составе креатин-креатинфосфат-кратинкиназной-системы принимает участие в поддержании энергетического и кальциевого гомеостаза клетки, а также в защите структурно-функциональной целостности митохондрий и, в частности, оказывает протекторное действие на открытие митохондриальных временных проницаемых пор, а, следовательно, влияет на процессы апоптоза и некроза [1]. Как известно, рентгеновское излучение вызывает окислительный стресс (ОС), который, в свою очередь, индуцирует повреждения ДНК, нарушения в биоэнергетических процессах и в процессах деления клеток; последнее приводит к нарушениям в распределении ядер клеток по плоидности, что, как и повреждения ДНК, стимулирует геномную нестабильность клеток. Исходя из вышеприведенного, целью настоящей работы было оценить протекторное действие Кр на повреждения ДНК мононуклеарных клеток периферической крови и распределение ядер гепатоцитов по плоидности у крыс, подвергнутых общему однократному рентгеновскому излучению в дозе 4,5 и 6,5 Гр.

В 2 разных сериях опытов (однократное общее облучение крыс в дозе 4,5 Гр и 6,5 Гр, соответственно) использовано 135 белых беспородных крыс-самцов весом 180–210 г, которые содержались в стандартных условиях. Облучение проводили в изолированном помещении, на рентгеновской установке «РУМ-17» (напряжение 200 кВ, сила тока 20 миллиампер, Cu-Al фильтр; кожно-фокусное расстояние 50 см, мощность дозы облучения 1,78 Гр/мин). В каждой серии опытов животные были разделены на 1 опытную и 2 контрольные группы. Опытной группе за 2 недели до и 2 недели после облучения давали per os креатин-моногидрат в 0,9% растворе глюкозы, которая увеличивает биодоступность Кр и не обладает радиопротекторными свойствами [2] в дозе 1 г/кг веса животного, а контрольной группе – воду. Кроме того, в качестве исходного контроля была использована равноценная по числу крыс группа интактных животных. Пострадиационные эффекты в первой серии опытов оценивались на 1, 7, 15, а во второй – на 30 сутки после лучевого воздействия.

Пострадиационные повреждения ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови крыс оценивали с помощью щелочной версии метода ДНК-комет (гель электрофорез индивидуальных клеток), согласно протоколу, описанному в работе. Анализ изображений ДНК-комет проводился с использованием компьютерной программы CASP. Уровень повреждений ДНК определяли на основе значений «Olive Tail Moment» (OTM). Для статистической обработки данных использован метод two way ANOVA программного пакета Graphpad prism 5.1. Определение количества ДНК в условно сравнимых единицах проводили телевизионным методом на цитоспектрофотометре, созданном на базе микроскопа-фотометра SMP. На основании данных по содержанию ДНК в ядре гепатоцитов крыс в условных единицах плоидности (с), соотношенных с эталоном, выявляли распределение гепатоцитов по плоидности в % и определяли соотношение эу- и анэуплоидных клеток с 10% отклонением от среднего значения для каждого класса. Для статистической обработки полученных данных использована программа SPSS 16. Характер распределения полученных данных определен методом Колмогорова-Смирнова. Сравнительный анализ проведен с использованием непараметрического теста Манна-Уитни.

Известно, что определённый уровень нитевых разрывов ДНК всегда присутствует в клетках млекопитающих вследствие нормального метаболизма. Разрывы ДНК, индуцированные радиацией, подвергаются репарации в течение нескольких часов после облучения, хотя этот процесс может быть и более длительным, растягиваясь на дни. В случае некорректной репарации они могут привести к индукции геномной нестабильности, выражающейся в структурных aberrациях хромосом, генных мутациях, образовании микроядер, анеуплоидии, полиплоидии и т.п. [3].

Согласно использованному методу, уровень повреждения ДНК определяли как степень миграции ДНК с использованием ОТМ (olive tail moment), который представляет собой относительное количество ДНК в хвосте кометы, умноженное на медиану расстояния миграции. На рис. 1 представлена динамика изменений значений ОТМ, из которых следует, что облучение индуцирует значительное повышение величин ОТМ в облученных группах по сравнению с интактным контролем, свидетельствующее о повреждениях ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови животных этих групп. Обогащение рациона крыс Кр снижает в 1,8 раз значения ОТМ в группе облучение/Кр+глю в сравнении с группой облучённый контроль, не получавшей Кр, что свидетельствует о радиозащитном эффекте Кр на повреждения ДНК. На 7-е пострадиационные сутки в этой же опытной группе (облучение/Кр+глю) наблюдается снижение значений ОТМ до уровня повреждений ДНК в интактном контроле, а в облучённом контроле резкое снижение значений ОТМ приводит к уровню повреждений ДНК достоверно ниже в сравнении с соответствующим уровнем интактного контроля. На 15 пострадиационные сутки уровень повреждений ДНК в опытной группе не изменяется, оставаясь стабильно на уровне интактного контроля, а в облучённом контроле имеет место статистически достоверное повышение значений ОТМ, как в сравнении с интактной группой, так и в сравнении с опытной группой, получавшей Кр, что указывает на появление новых повреждений ДНК под воздействием отсроченных эффектов ОС. Что касается резкого уменьшения количества клеток с сильно поврежденной ДНК в облучённом контроле на 7 пострадиационные сутки, которые обладают низкой ДНК-репарирующей активностью, то это может быть объяснено скорее их элиминацией, чем репарацией, в то время как компенсаторная репопуляция ведет к обновлению клеточной популяции [3] и, таким образом, к уменьшению значений ОТМ. В этом контексте, очевидный радиозащитный эффект Кр, наблюдаемый в первые пострадиационные сутки, а также проявляющийся в одинаковых с интактным контролем значениях уровней повреждений ДНК на 7 и 15 пострадиационные сутки, имеет, по-видимому, системный характер, поскольку изменения значений ОТМ, отмеченные выше для облученного контроля, в данном случае не наблюдаются. В связи с вышеперечисленным, представляют интерес недавно представленные в литературе данные о цитопротекторном действии Кр на повреждения, индуцированные окислительными агентами в лимфоцитах и эритроцитах, выделенных из крови человека [4].

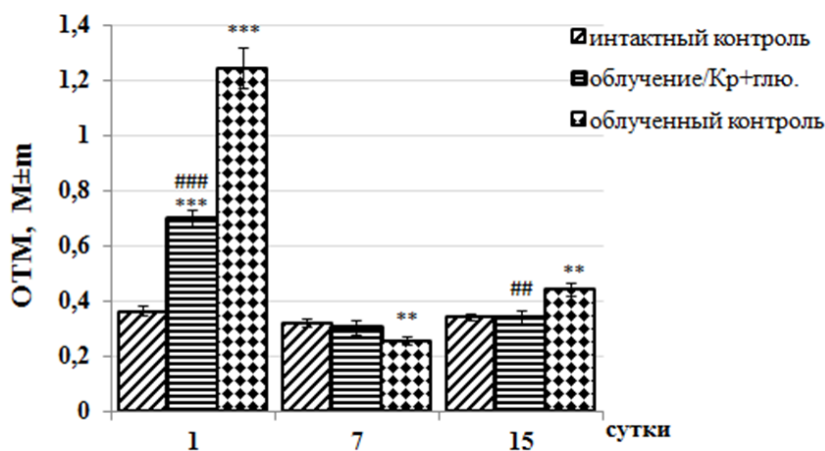


Рис. 1 – Динамика изменений уровней повреждений ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови крыс через 1, 7 и 15 дней после рентгеновского облучения в дозе 4,5 Гр. $n=10$ для каждой группы.

1 – интактный контроль; 2 – опытная группа, получавшая креатин в дозе 1г/кг веса за 2 недели до и 2 недели после облучения; 3 – облучённый контроль; отличие от интактного контроля достоверно при: ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; отличие от облученного контроля достоверно при: ### $p<0,01$; ### $p<0,001$

Полиплоидия и анеуплоидия это виды геномной нестабильности, которые возникают под воздействием клеточного стресса, каковыми являются токсическая стимуляция, окислительные повреждения, метаболическая перегрузка, хирургическая резекция, а также радиация [5]. Полиплоидные клетки обнаруживаются в разных органах, однако, это явление особенно характерно для печени, при этом предполагается, что плоидность служит повышению функциональной активности гепатоцитов, поскольку позволяет в 2–4 раза увеличить экспрессию соответствующих генов/белков и тем самым активизировать специфические метаболические функции этого органа [5].

На рис.2 представлена гистограмма распределения ДНК ядер гепатоцитов по плоидности на 30-е сутки после облучения крыс в дозе 6,5 Гр и влияния Кр на пострадиационные изменения этого распределения. В контроле были получены следующие результаты (рис.2): 87% клеток составляют эуплоидные гепатоциты.

Из них около 45% популяции приходится на диплоидные гепатоциты, 38% – на тетраплоидные клетки, 4% популяции – октаплоидные ядра, 6% – гипертетраплоидные и 7% – триплоидные гепатоциты, что примерно соответствует данным литературы [3]. Наличие синтезирующих ДНК клеток с «промежуточными» между 2с и 4с и 4с и 8с значениями, суммарная доля которых достаточно около 13%, скорее всего объясняется прохождением клетками S-фазы клеточного цикла или задержкой во второй ее половине. Как следует из сравнительного анализа гистограмм распределения гепатоцитов по классам пloidности для интактного и облученного контролей (рис.2), в последней группе крыс выявляется значительное количество гиподиплоидных клеток при полном отсутствии их в группе интактных животных, что свидетельствует о гибели гепатоцитов в течение исследуемого срока, причем, в основном, за счет гибели эуплоидных гепатоцитов, суммарное количество которых уменьшается почти вдвое. Кроме того, в облученном контроле доля анеуплоидных гепатоцитов значительно возрастает и за счет 5с клеток, число которых втрое больше по отношению к нативному контролю, что может свидетельствовать о сохранении у этих животных через 30 дней определенного уровня геномной нестабильности. Раствор Кр в 0,9% глюкозе оказывает выраженное протекторное действие: полностью отсутствуют гиподиплоидные гепатоциты, возрастает доля как диплоидных, так и тетраплоидных клеток и общая картина распределения ядер по пloidности почти полностью повторяет данные нативного контроля, за исключением триплоидных клеток, относительная доля которых превышает этот показатель контроля почти вдвое, что свидетельствует о повышении синтеза ДНК в гепатоцитах крыс этой группы. Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что Кр в растворе 0,9% глюкозы оказывает противолучевое действие на повреждения ДНК моноклеарных клеток периферической крови и распределение ДНК ядер гепатоцитов по пloidности и таким образом нивелирует геномную нестабильность указанных клеток крыс, индуцированную рентгеновским излучением.

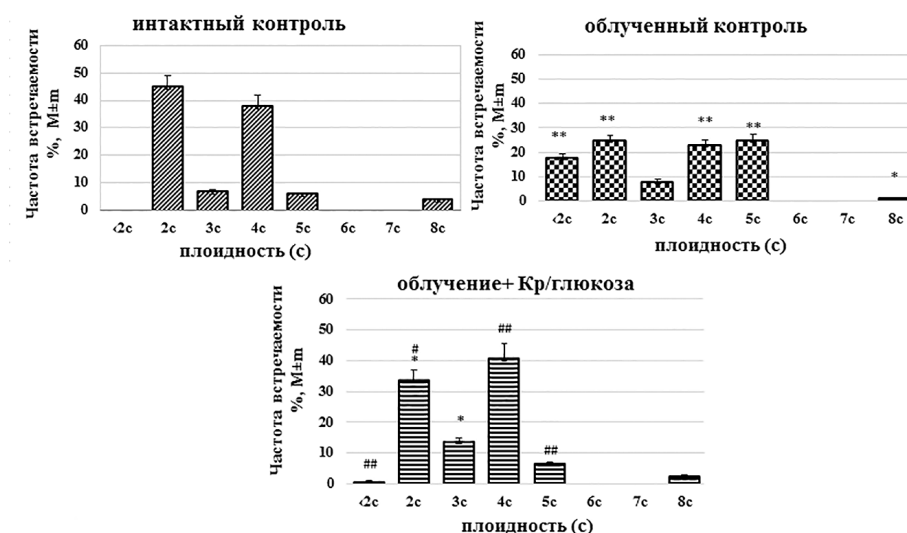


Рис. 2 – Противолучевое действие Кр на распределение ядер по пloidности в гепатоцитах крыс на 30-е сутки после рентгеновского облучения в дозе 6,5Гр. $n=15$ для каждой группы. Отличие от интактного контроля достоверно при: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; отличие от облученного контроля достоверно при: # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$

ЛИТЕРАТУРА

1. Wallimann T. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine / Wallimann T, Tokarska-Schlattner M, Schlattner U // Amino Acids. 2011; 40:5:1271–1296.
2. Петросян, М.С. Влияние ионизирующего излучения на креатин-креатинкиназную систему мозга крыс и противолучевое действие креатина / М.С. Петросян, Л.С. Нерсесова, Н.А. Адамян, М.Г.Газарянц, Ж.И. Акопян // Нейрохимия. 2019;36:3:246–253.
3. Мазурик, В.К. Радиационно-индуцируемая нестабильность генома: феномен, молекулярные механизмы, патогенетическое значение / В.К. Мазурик, В.Ф. Михайлов // Радиационная биология. Радиоэкология. 2001;41:3:272–289.
4. Qasim N. Diminution of oxidative damage to human erythrocytes and lymphocytes by creatine: possible role of creatine in blood. / N. Qasim, R. Mahmood // PLoS one. 2015;10:11:e0141975.
5. Wang MJ. Hepatocyte polyploidization and its association with pathophysiological processes./ Wang MJ, Chen F, Lau JTY, Hu YP. // Cell Death Dis. 2017;8:5:e2805.