

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ ՄԱՐԻԱՄ ՍԱՄՎԵԼԻ

ԿՐԵԱՏԻՆԻ ՈԱԴԻՈՊԼԱՇՏՊԱՆԻՉ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԲԶՋԻ ԷՆԵՐԳԵՏԻԿ
ՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԿՈՐԻՋԻ ՄՈՐՖՈՖՈՒՆԿՈՆԿՅՈՒՆԱԼ
ԿԱՐԳԱՎԻՃԱԿԻ ՎՐԱ

Գ.00.03 – «Մոլեկուլային և բջջային կենսաբանություն» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման
ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ - 2020

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ПЕТРОСЯН МАРИАМ САМВЕЛОВНА

РАДИОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ КРЕАТИНА НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН И
МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС ЯДРА КЛЕТКИ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности

03.00.03 - «Молекулярная и клеточная биология»

ЕРЕВАН – 2020

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝ կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ Լ.Ս.Ներսեսովա

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. Ս.Բ.Մելնով
կենս. գիտ. դոկտոր Կ.Ռ.Մայիլյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի պետական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2020թ. դեկտեմբերի 18-ին,
ժամը 14⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, 042
մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ, Երևան 0014, Հասրաթյան 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտի գրադարանում և <http://molbiol.sci.am> կայքում:

Սեղմագիրն առաքվել է 2020թ. նոյեմբերի 6-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար
կենս. գիտ. թեկնածու



Գ.Մ. Մկրտչյան

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Института молекулярной
биологии НАН РА.

Научный руководитель: кандидат биол. наук, доцент Нерсесова Л.С.

Официальные оппоненты: доктор биол. наук, проф. Мельнов С.Б.
доктор биол. наук Маилян К.Р.

Ведущая организация: Ереванский государственный университет

Защита диссертации состоится 18 декабря 2020г. в 14⁰⁰ часов на заседании
специализированного совета 042, в Институте молекулярной биологии НАН РА (РА,
0014, г. Ереван, ул. Асратяна 7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии
НАН РА и на сайте <http://molbiol.sci.am>.

Автореферат разослан 6 ноября 2020г.

Ученый секретарь специализированного совета 042
кандидат биол. наук



Մկրտչյան Գ.Մ.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Расширение контактов человека с источниками ионизирующего излучения (ИИ) в медицине и технике, возможность возникновения аварийных ситуаций при применении ядерных технологий в военных и мирных целях и т.п. неизбежно ставят перед человечеством вопросы обеспечения радиационной безопасности. Не менее актуальной проблемой в этом контексте является возрастающее искусственное “электромагнитное загрязнение” окружающей среды.

Недостатки фармакохимических радиопротекторов, к которым относятся высокая токсичность и побочные эффекты, а также ограниченная продолжительность действия и высокая их стоимость объясняют тот факт, что, несмотря на описание многочисленного ряда синтетических радиопротекторов, сегодня только амифостин одобрен в США Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов при том, что и он не лишен токсических эффектов [Mun G. et al., 2018]. В связи с этим исследование радиопротекторных свойств малотоксичных веществ биологического происхождения приобретает особую **актуальность**, тем более, что число одобренных к применению природных радиопротекторов в настоящее время также невелико: это рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, под лекарственным названием Леукин (сарграмостим) и рекомбинантный фактор роста кератиноцитов под лекарственным названием Кепиванс (палифермин) [Singh V. et al., 2017].

Известно, что радиация вызывает в клетке окислительный стресс (ОС) [Akbari A. et al., 2019; Reisz J. et al., 2014]. Поддержание энергетического статуса клетки - одно из основных условий защиты клетки против ОС [Kojima S. et al., 2017]. Креатинкиназа (КК) со своими субстратами креатином (Кр) и креатинфосфатом (КФ) образует Кр-КФ-КК-азную систему, которая наряду с ключевой ролью в обеспечении энергетического и кальциевого гомеостаза клетки осуществляет и ряд других функций, среди которых особое место занимает функция поддержания структурного и функционального статуса митохондрий, связанная с антиоксидантными и антиапоптотическими свойствами Кр-КК системы: в совокупности эти функции обуславливают протекторные свойства Кр против ОС [Wallimann T. et al., 2011]. При этом следует отметить, что КК отличается высокой чувствительностью к действию стрессорных факторов, что послужило основанием для использования изменения уровня ее активности в качестве показателя энергетического статуса клетки [Schlattner U. et al., 2018]. Радиация вызывает индукцию геномной нестабильности в виде различных нарушений генетического аппарата, как то: одно- и двуцентные разрывы ДНК, структурные aberrации хромосом, генные мутации, анеуплоидия и полиплоидия [Wang M. et al., 2017]. Таким образом, одним из первичных показателей функциональных изменений, происходящих в клетках при действии радиации, служит изменение морфофункционального статуса ядра клетки, выражающееся, в частности, и в изменениях содержания ДНК и морфофункционального состояния ее ядерно-ядрышкового аппарата [Штейн Г. и др., 1999].

Креатин сегодня является одним из наиболее популярных адаптогенов. Основную часть необходимого Кр организм человека получает через пищу, а оставшаяся часть синтезируется в печени, селезенке и почках. Кр в качестве биологической добавки повышает энергетический статус организма, поэтому как эргогоническое средство широко используется как в профессиональном, так и в любительском спорте уже не одно десятилетие. Многочисленными исследованиями *in vitro* и *in vivo* показано его протекторное действие против ОС, являющегося причиной старения, а также ряда нейробиологических заболеваний и последствий воздействия ксенобиотиков и ультрафиолетового излучения [Smith N. et al., 2014], что стало весомым основанием для возрастания популярности Кр, как адаптогена. Не так давно выявлено существенное генопротекторное действие Кр на митохондриальную ДНК клеток кожи человека,

подвергнутых ОС, что предполагает возможность использования Кр для предотвращения или облегчения заболеваний, связанных с мутациями митохондриальной ДНК [Guidi C. et al., 2008; Berneburg M. et al., 2005]. В настоящее время обсуждаются следующие механизмы протекторного действия Кр - механизм поддержания энергетического и кальциевого гомеостаза клетки и механизмы его антиоксидантного и антиапоптотического действия, благодаря действию которых Кр улучшает сопротивляемость клеток стрессу [Wallimann T. et al., 2011]. Учитывая это, а также тот факт, что в основе радиационного поражения лежит ОС, было высказано предположение о наличии у Кр высокого радиомодифицирующего потенциала.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы было изучение радиопротекторного эффекта Кр на основании анализа пострадиационных изменений энергетического метаболизма и морфофункционального статуса ядра клетки в отсутствие и в присутствии Кр.

Для достижения поставленной цели были сформулированы 2 комплекса задач:

- 1) изучить динамику пострадиационных изменений:
 - а) активности Кр-КК системы в мозге и печени, как показателя энергетического статуса клетки,
 - б) а также показателей морфофункционального статуса ядра клетки: общего содержания ДНК и ее распределения по плоидности, а также морфометрических показателей ядерно-ядрышкового аппарата гепатоцитов крыс, подвергнутых общему однократному рентгеновскому и общему однократному/дробному радиочастотному облучению;
- 2) оценить радиомодифицирующее действие Кр на индуцированные рентгеновским излучением пострадиационные изменения:
 - а) креатин-креатинкиназной системы мозга и печени,
 - б) ядерно-ядрышкового аппарата гепатоцитов,
 - в) повреждения ДНК мононуклеарных клеток периферической крови,
 - г) популяционного состава клеток периферической крови,
 - д) выживаемости крыс.

Научная новизна работы и практическая значимость. Кр впервые исследован в качестве потенциального радиопротектора против рентгеновского излучения. Кроме того, проведена комплексная оценка как действия рентгеновского и радиочастотного излучений на Кр-КК систему мозга и печени крыс, так и оценка ее адаптационных возможностей. Вместе с тем для Кр, как пищевой добавки, впервые выявлено: радиопротекторное действие на выживаемость крыс (67%); генопротекторное действие на пострадиационные повреждения ДНК мононуклеарных клеток периферической крови крыс; цитопротекторное действие на пострадиационные изменения популяционного состава периферической крови крыс; гепатопротекторное действие, направленное на снижение геномной нестабильности гепатоцитов, индуцированных рентгеновским излучением. Фундаментальная значимость данной работы состоит в том, что ее результаты, с одной стороны, обогащают и дополняют существующие представления о физиологической роли Кр-КФ-КК системы в клетке как в целом, так и на уровне адаптационных возможностей этой системы и, с другой стороны, расширяют представления о протекторном потенциале Кр.

Результаты работы дают основание рекомендовать Кр в качестве потенциального радиопротектора, что определяет практическую значимость проведенного исследования. В соавторстве с Нерсесовой Л.С., Газарянц М.Г. и Акопяном Ж.И. получен патент N 3345A "Использование креатина в качестве радиозащитного средства" решением АМ20190093 от 08.08.2019. При этом немаловажно отметить преимущества Кр в контексте соответствия его требованиям, предъявляемым к идеальному радиопротектору [Mun G. et al., 2018; Cheki M. et al., 2016]: Кр легко доступен, не вызывает токсические

эффекты даже в высоких дозах, не имеет кумулятивных эффектов при повторных приемах, обладает способностью действовать через ряд механизмов, способен вводиться перорально, защитное действие его распространяется на ряд систем органов, устойчив при хранении и, наконец, имеет доступную цену [Kreider R. et al, 2017].

Объем и структура работы. Работа изложена на 122 страницах машинописного текста, иллюстрирована 4 таблицами, 18 рисунками. Состоит из списка использованных сокращений и обозначений, введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (220 источников).

Апробация работы. Основные результаты настоящего исследования были доложены и обсуждены на 18-й и 15-й международных конференциях „Сахаровские чтения: Экологические проблемы XXI века” (Белоруссия, Минск, 2018 и 2015), международном семинаре “The "BRITE": Robust tools for risk assessment” (Armenia, Yerevan, 2017), Международном конгрессе «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине» (Санкт Петербург, 2015), V Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов с международным участием “Окружающая среда и здоровье. Здоровая среда-здоровое наследие” (Москва, 2014), международных научных конференциях «Dialogues on science» (Yerevan, Armenia, 2015) и «Актуальные проблемы радиационной безопасности» (Ереван, Армения, 2014), а также семинарах и заседаниях ученого совета ИМБ НАН РА (2014-2020).

Публикации. Основные результаты настоящего исследования отражены в 16 научных работах, из коих семь статей в зарубежных журналах, две статьи в отечественном журнале, семь публикаций в материалах международных конференций и один патент.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в лаборатории молекулярной энзимологии при сотрудничестве с лабораторией клеточной биологии и вирусологии и группой клеточных технологий ИМБ НАН РА. Работа одобрена Биоэтическим комитетом ИМБ НАН РА (IRB #00004079).

Опыты проводили на половозрелых белых беспородных крысах-самцах весом 180–210г, содержащихся в стандартных условиях и на стандартном рационе питания. **Объектом исследований** являлись мозг, печень, сыворотка крови, а также клетки периферической крови. Однократное общее рентгеновское облучение крыс проводили на рентгеновской установке „РУМ-17” (напряжение 200кВ, сила тока 20мА, Cu-Al фильтр; кожно-фокусное расстояние 50см, мощность дозы облучения 1,78Гр/мин.). Время экспозиции рассчитывали исходя из мощности дозы облучения и требуемой дозы для данной серии экспериментов (3,5; 4,5; 6,5Гр). В качестве источника радиочастотного излучения использовали генераторный блок “панорамного измерителя Х1-42” с мощностью на выходе 8мВт, диапазоном генерируемых частот 0.1–1250МГц, позволявшим с большой точностью устанавливать как центральную частоту, так и полосу генерации во всем диапазоне перестройки генератора. Излучателем служила компактная антенна (117×120мм²) Минковского фрактального типа нового поколения. Резонансная частота антенны была рассчитана таким образом, чтобы ее центральная частота соответствовала 900МГц. Плотность потока энергии была 25мкВт/см². Представленные результаты являются средними 2-3 независимых экспериментов.

Активность креатинкиназы определяли спектрофотометрически по накоплению продукта реакции Кр, **содержание Кр** - согласно α -нафтол-диацетиловому методу [Петрова Т., Лызлова С., 1985; Wong T. et al., 1971]. Определение активности аланин- и аспартат-аминотрансфераз проводили на основе измерения убыли восстановленного никотинамидадениндинуклеотида в сопряженных реакциях с лактатдегидрогеназой и малатдегидрогеназой, соответственно [Bergmeyer H.U. et al., 1986; 1980].

Пострадиационные повреждения ДНК оценивали методом ДНК-комет в щелочных условиях [Tice R. et al., 1991]. Анализ изображений ДНК-комет проводился с использованием компьютерной программы CASP (CASP Lab, Польша). Уровень повреждения ДНК определяли как степень миграции ДНК с использованием “Olive Tail Moment” (ОТМ). Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием программного пакета Graphpad Prism 5.01 (GraphPad Software, США), методом two way ANOVA с последующим post hoc тестом Данна.

Определение количества ДНК и цитоморфометрию ядер проводили телевизионным методом на цитоспектрофотометре, созданном на базе микроскопа-фотометра SMP 05 (OPTON, ФРГ) [Магакян Ю., Каралова Е., 1989]. На основании данных по содержанию ДНК в ядре гепатоцитов крыс в условных единицах плоидности (с), соотношенных к эталону, выявляли распределение гепатоцитов по плоидности (в %) и определяли соотношение эу- и анэуплоидных клеток с 10% отклонением от среднего значения для каждого класса. В условно сравнимых единицах определяли также площадь ядер и ядрышек и высчитывали среднее число ядрышек на ядро.

Определение популяционного состава периферической крови крыс осуществлялось стандартным методом с использованием свежесобранной периферической крови из сонной артерии крыс [Houwen B., 2002]. Популяционный состав клеток крови в контрольных и опытных образцах оценивался с помощью светового микроскопа согласно описанному методу [Ромейс Б., 1953].

Для **статистической обработки** результатов опытов использован пакет SPSS Statistics 16 (SPSS Inc., США) [Landau S., Everitt B., 2004]. Характер распределения полученных данных определен методом Колмогорова-Смирнова. Сравнительный анализ их был проведен с использованием U-теста Манна-Уитни или по t-критерию Стьюдента. Различия считались значимыми при $p < 0.05$ - $0,01$ и $p < 0,01$ - $0,001$. Корреляционный анализ проведен с использованием непараметрического теста Спирмена. Показатели $M \pm \sigma$, $M \pm m$ где M (mean) – средняя арифметическая величина значений, σ – стандартное отклонение, m – стандартная ошибка, переведены в проценты и представлены графически.

Противолучевую эффективность Кр оценивали в течение 30 суток наблюдения после облучения согласно статистическому методу Каплан-Мейер используя критерии выживаемость, средняя продолжительность жизни, возросшая продолжительность жизни крыс. Для сравнительного анализа экспериментальных групп были использованы тесты Log Rank (Mantel Cox) и Chi-Square [Goel M. et al., 2010; Rich J. et al., 2010].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов было исследовано *действие сублетальных доз рентгеновского излучения на активность КК в различных органах крыс и на состояние ядерно-ядрышкового аппарата гепатоцитов*. Как следует из данных, представленных на рис.1, почечная КК проявляет значительную радиорезистентность; радиочувствительность КК мозга и печени выражается в разнонаправленных изменениях уровня ее активности во времени: если в мозге на 6 сутки имело место достоверное падение активности фермента ($p < 0,05$), которое к 13 суткам сменялось тенденцией к повышению активности, то в печени уже на 6-сутки обнаруживалось компенсаторное повышение активности КК ($p < 0,05$), которое сохранялось и на 13 сутки. Эти различия по-видимому связаны с включением в этих органах в разные сроки различных адаптационных механизмов. Обсуждение всплесков активности КК селезенки представляется затруднительным по причине наложения активности сывороточной КК из-за трудно отмываемой крови. Что касается КК-активности сыворотки крови, то ее изменения во времени также носили разнонаправленный характер и не коррелировали с изменениями уровней КК-активности исследованных органов. В последующих экспериментах в качестве объекта исследования были выбраны мозг, который отличается

высоким уровнем энергетического обмена и высоким содержанием КК и Кр, и печень, отличающуюся высокой чувствительностью к действию вредных экологических факторов и при этом низким содержанием КК и Кр, но высокой способностью к адаптивной экспрессии КК [Auricchio A. et al, 2001; Hatano E. et al, 1996].

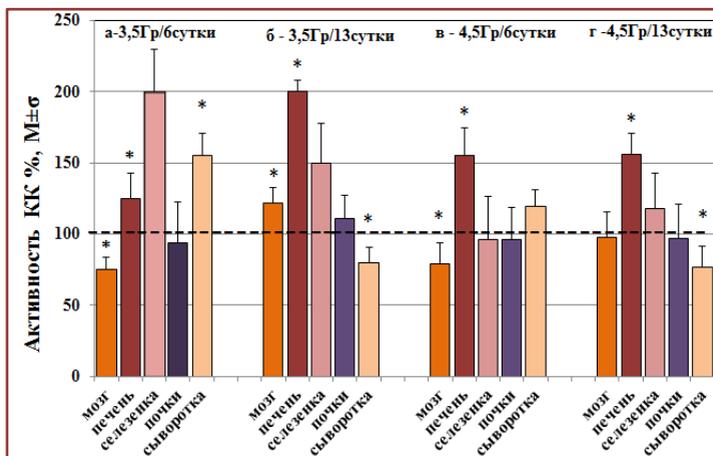


Рис.1. Динамика пострadiационных изменений уровней активности КК, индуцированных рентгеновским излучением. n=8 для каждой группы; отличие от контроля достоверно при *p<0,05. Здесь и далее пунктирная линия - контрольный уровень, выражающий активность КК интактных крыс.

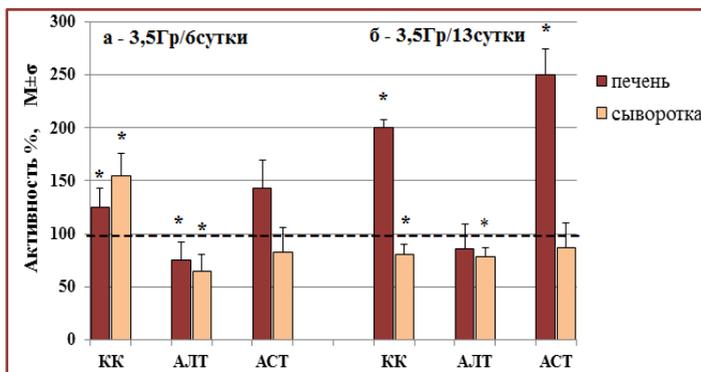


Рис.2. Динамика пострadiационных изменений уровней активности КК, АЛТ, АСТ в печени и сыроворотке крови крыс после облучения в дозе 3,5Гр. n=8 для каждой группы; отличие от контроля достоверно при *p<0,05.

Как в случае рентгеновского, так и в случае радиочастотного излучений в печени параллельно с определением пострadiационных изменений уровня активности КК были определены таковые АСТ и АЛТ, ферментов, сопрягающих аминокислотный и энергетический обмен. Динамика пострadiационных изменений уровней активности КК и АСТ (рис.2) имела одинаковый характер и была направлена на компенсаторное повышение уровня активности обоих ферментов, особенно выраженное на 13 сутки после

облучения ($p < 0,05$). Указанное скорее всего связано с участием этих ферментов в адаптивном ответе митохондрий на радиостресс, что хорошо согласуется с последними данными ряда авторов об адаптивном пострадиационном репрограммировании энергетического обмена митохондрий, направленном на использование в качестве субстратов вместо глюкозы жирных кислот и глутамина [Kim E. et al., 2019; Kiang J. et al., 2019]. Корреляционный анализ не выявил связи между изменениями уровней активности этих ферментов, что скорее всего объясняется пострадиационным разбалансированием регуляторных механизмов клеточного метаболизма [Бурлакова Е.Б., Конрадов А. 2003].

В указанных выше группах крыс одновременно было оценено состояние **ядерно-ядрышкового аппарата гепатоцитов**. Как следует из данных табл.1, среднее содержание ДНК в ядрах гепатоцитов крыс в опытных группах 4.5Гр/6сутки и 4.5Гр/13сутки достоверно повышается по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$), что может быть связано с их полиплоидизацией, индуцированной радиострессом. При этом в группе 3,5Гр/6сутки достоверно уменьшаются: площадь ядер более чем на 20% ($p < 0,01$) и периметр, а также число ядрышек на ядро, что свидетельствует о развитии деструктивных процессов. В группах 4.5Гр/6 сутки и 4.5Гр/13 сутки достоверных изменений площади и периметра ядер по сравнению с контрольной группой не наблюдается. Содержание ДНК в ядрышках гепатоцитов при обеих дозах облучения на 6-е сутки остается неизменным и возрастает в среднем на 50% к 13-м суткам после облучения в дозе 4.5Гр ($p < 0,05$). В то время как площадь ядрышек в группах 3.5Гр/6 сутки и 4.5Гр/6 сутки лишь проявляет тенденцию к уменьшению (различия недостоверны, $p = 0,219$), в группе 4.5Гр/13сутки она достоверно увеличивается ($p < 0,05$). Изменения периметра ядрышек носят примерно тот же характер (табл.1). Интересно отметить, что в группе 4.5Гр/13сутки имеет место увеличение всех трех указанных выше параметров ядрышек, а также увеличение среднего числа ядрышек на ядро ($p < 0,05$), что может указывать на возрастание транскрипционной активности гепатоцитов.

Табл. 1. Содержание ДНК (в ед. плоидности), площадь (S), периметр (P) ядер и ядрышек (в усл.ед.) и среднее число ядрышек на ядро ($M \pm m$) в гепатоцитах контрольных и опытных крыс, облученных в дозах 3,5 и 4,5Гр. $n=8$ для каждого срока исследования.

Группы	Ядро			Ядрышко			
	ДНК	S	P	ДНК	S	P	Число ядрышек/ядро
Контроль	3.2с ± 0.1	50.0±1.9	16.3± 0.3	2.2±0.3	3.5± 0.3	4.0± 0.2	0.7± 0.09
3.5Гр/6 сутки	3.1с ± 0.1	38.3±1.4**	14.6±0.3**	2.4±0.4	3.0± 0.5	4.0± 0.4	0.6± 0.08*
4.5Гр/6 сутки	3.5с ± 0.1**	50.0±1.2	17.4±0.6	3.2±0.4	2.7± 0.3	3.7± 0.3	0.7± 0.09
4.5Гр/13 сутки	3.9с ± 0.1**	50.9±1.4	16.7±0.3	4.0±0.2*	4.6± 0.4*	5.5± 0.4*	0.8± 0.10*

отличие от контроля достоверно при: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Одновременно было исследовано распределение ядер гепатоцитов по плоидности (рис.3). Результаты, полученные в контроле, соответствуют данным других авторов [Wang M. et al, 2017; Штейн Г. и др., 1999]: более 90% составляют эуплоидные гепатоциты, представленные в равных долях диплоидными и тетраплоидными клетками, число октаплоидных клеток не превышают 5% популяции, анеуплоидных клеток - 7%.

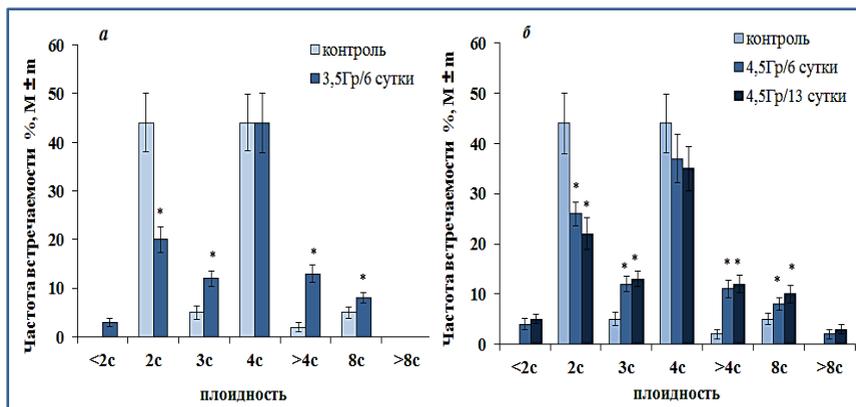


Рис. 3. Пострадиационные изменения распределения ядер гепатоцитов по плоидности после рентгеновского облучения крыс в дозах 3,5 (а) и 4,5Гр (б). $n=8$ для каждой группы; отличие от контроля достоверно при $*p \leq 0,05$.

Под влиянием облучения число эуплоидных ядер уменьшается в среднем на 25–30%, в основном, за счет уменьшения в 2 и более раз числа диплоидных клеток ($p < 0,05$). При этом суммарный процент анеуплоидных ядер в опытных образцах увеличивается в среднем в 4 раза по сравнению с таковым контроля, что, с одной стороны, может быть связано с увеличением числа клеток, синтезирующих ДНК, а, с другой стороны, с пострадиационным нарушением процесса деления клеток, что приводит к геномной нестабильности и, как результат, гибели части гепатоцитов вследствие апоптоза, о чем свидетельствует появление в опытных группах небольшого числа гиподиплоидных ядер. В облученных образцах клетки почти не делятся, что указывает на то, что в данном случае компенсаторные механизмы направлены не на замещение погибших клеток новыми клетками, а на изменение функциональной активности выживших гепатоцитов за счет их полиплоидизации: об этом наглядно свидетельствует и обнаружение в популяции гепатоцитов гипероктаплоидных клеток.

В следующей серии экспериментов были изучены **пострадиационные изменения уровня активности КК мозга и печени после однократного 2-часового и равноценного по времени дробного радиочастотного облучения**. Как следует из приведенных данных (рис.4), исследованные пострадиационные эффекты, как и в случае рентгеновского облучения, носят фазовый характер и имеют компенсаторно-адаптационную природу. В случае однократного облучения начавшееся в первые сутки после облучения понижение активности мозгового фермента в последующие сутки сменяется постепенным компенсаторным повышением активности КК ($p < 0,01$). Для печеночной КК отмечается постепенное повышение активности фермента, начиная с первых суток ($p < 0,01$).

После дробного облучения уровень активности мозговой КК остается на уровне контроля во все сроки исследования, а для печеночной КК отмечается замедленное повышение активности к 10 суткам ($p < 0,01$), с тенденцией к возвращению к контрольному уровню к 20 суткам. В сыворотке крови наблюдается та же тенденция. Таким образом биологический эффект однократного облучения более выражен, чем дробного облучения. Кроме того, приведенные данные подтверждают значительные адаптационные возможности Кр-КК системы, направленные на восстановление энергетического гомеостаза клетки.

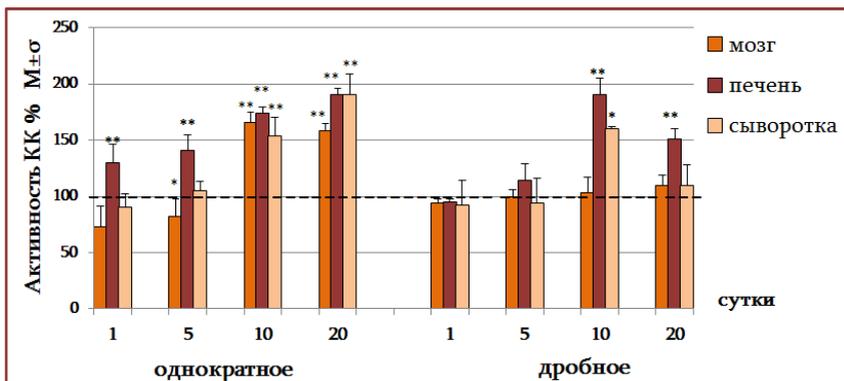


Рис.4. Динамика пострадиационных изменений уровней активности КК мозга, печени и сыворотки крови после воздействия ЭМИ с частотой 900МГц. n=10 для каждого срока, кроме контрольной группы: n=6; отличие от контроля достоверно при: *p≤0,05;**p≤0,01.

Радиомодифицирующее действие креатина.

Учитывая данные литературы о повышении усвоения клетками Кр, поступившего в организм *per os*, в присутствии моносахаров [Cooke M., Cribb P., 2015], мы использовали раствор Кр как в воде, так и в 0,9% глюкозе. Предварительные опыты по выживаемости крыс показали, что: 1) наиболее эффективная доза креатиновой добавки составляет 1г/кг веса крысы, 2) наиболее эффективный способ введения – за 2 недели до и 2 недели после облучения. На рис.5 представлены данные по динамике изменений значений ОТМ, рассчитанных на основе анализа комет. В облученном контроле и опытной группе имеет место значительное повышение значений ОТМ по сравнению с интактным контролем ($p < 0,001$), свидетельствующее о повреждении ДНК в лимфоцитах крыс этих групп. Кр-добавка приводит к примерно 2-кратному снижению значений ОТМ в сравнении с облученным контролем ($p < 0,001$), что однозначно указывает на радиозащитный эффект Кр. Через 7 дней после облучения в этой же опытной группе падение значений ОТМ достигает уровня повреждений ДНК в интактном контроле. В облученном контроле уровень повреждений ДНК также падает и оказывается достоверно ниже по сравнению с соответствующим уровнем интактного контроля ($p < 0,01$): можно предположить, что поскольку исследуемые клетки крови обладают низкой ДНК-репарирующей активностью [Noussipikel T., 2007] резкое уменьшение количества клеток с сильно поврежденной ДНК в облученном контроле может быть связано с их элиминацией, а компенсаторная репопуляция за счет выживших стволовых клеток, приводит к уменьшению значений ОТМ [Garau M. et al, 2011]. На 15 день после облучения уровень повреждений ДНК в опытной группе остается на уровне интактного контроля, в то время как в облученном контроле выявляется статистически достоверное повышение значений ОТМ ($p < 0,01$), свидетельствующее о появлении новых повреждений ДНК, обусловленных, по-видимому, системным воздействием облучения, такими как индуцированные радиацией кластогенные факторы плазмы, пертурбации окислительного метаболизма и хронические воспалительные реакции, приводящие к отдаленным эффектам ИО [Noda A., 2018; Garau M. et al, 2011]. Таким образом, представленные данные свидетельствуют о генопротекторном действии Кр на мононуклеарные клетки периферической крови крыс, подвергнутых рентгеновскому облучению.

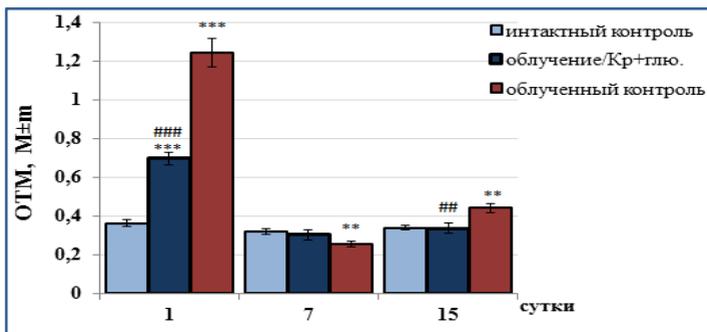


Рис. 5. Динамика изменений уровней пострадиационных повреждений ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови крыс после рентгеновского облучения в дозе 4,5Гр. $n=10$ для каждой группы; отличие от интактного контроля достоверно при: $**p<0,01$; $***p<0,001$; отличие от облученного контроля достоверно при: $##p<0,01$; $###p<0,001$.

В рамках этой же серии экспериментов были получены данные по динамике изменений уровней активности КК (А) и содержания креатина (Б) в мозге и печени крыс после облучения их в дозе 4,5Гр и влиянию креатиновой биодобавки на эти изменения (рис.6). В первые пострадиационные сутки во всех исследованных группах активность мозговой КК достоверно падает ($p<0,05$), однако в опытной группе крыс, получавших Кр, этот показатель вдвое меньше. Достоверных изменений уровней активности печеночной КК в этот срок не отмечается.

Развитие пострадиационных эффектов во времени приводит к компенсаторному повышению КК-ой активности как в мозге, так и в печени опытных крыс, но с определенными различиями, связанными, по-видимому, с тканеспецифическими механизмами адаптации. Кр-КК система мозга, который отличается высоким уровнем энергетического обмена и значительно более высоким содержанием КК и Кр, чем печень, проявляет большую радиочувствительность и большую адаптационную пластичность к радиострессу, чем Кр-КК система печени, которая во временном аспекте позднее реагирует на радиостресс. Если на 15 сутки активность мозговой КК возвращается к нативному контрольному уровню, то в случае печеночной КК повышение уровня активности во времени продолжается ($p<0,05$), что может быть связано со сменой механизмов адаптации с краткосрочной, основанной на постсинтетической регуляции активности фермента, на долгосрочную, связанную с экспрессией КК, стимулированной, возможно, не только облучением, но и Кр-добавкой. В контрольных группах 2 и 3 наблюдающееся для печеночной КК на 7-ые сутки компенсаторное повышение активности фермента ($p<0,01$), а для мозговой КК - стабилизация на уровне контроля, на 15 сутки сменяется достоверным снижением активности фермента, причем для КК мозга ниже контрольного ($p<0,05$). Последнее, по-видимому связано с истощением нативных адаптационных возможностей Кр-КК-системы мозга и печени животных этих контрольных групп. Что касается содержания Кр в мозге и печени, то во все сроки отмечаются всплески его уровня, но они достоверно не отличаются от контрольного уровня, за единственным исключением. При этом, адаптационные свойства фермента отличаются высокой пластичностью и имеют тканеспецифический характер. Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о радиозащитном действии Кр на Кр-КК систему, способствующем адаптации энергетического обмена гепатоцитов к воздействию ИИ.

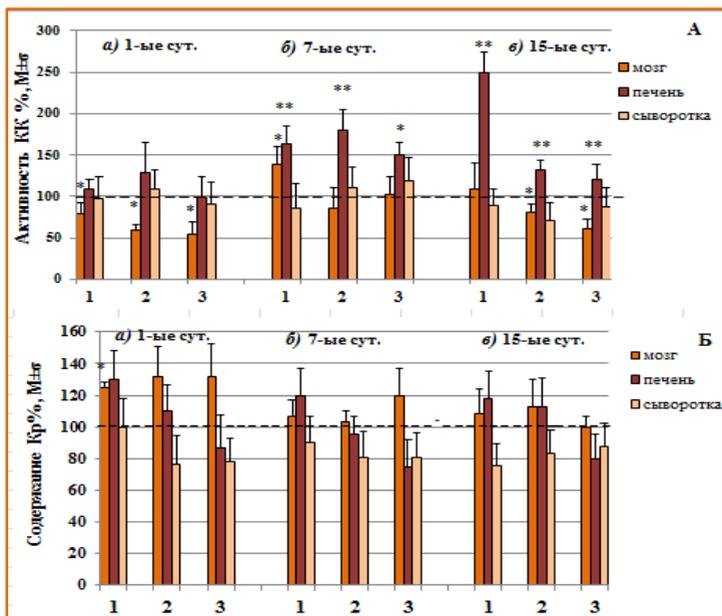
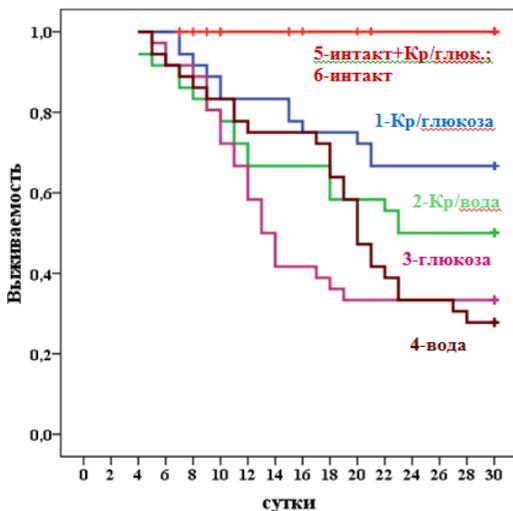


Рис. 6. Динамика изменений уровней активности КК (А) и содержания креатина (Б) в мозге, печени и сыворотке крови крыс после их однократного общего облучения в дозе 4,5Гр в присутствии и в отсутствие креатина. 1 – креатин/глюкоза, 2 – вода, 3 – глюкоза. n=10 для каждой группы; отличие от контроля достоверно при: * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

В следующей серии опытов *радиомодифицирующее действие Кр* было оценено с использованием наиболее принятой модели выживаемости. При облучении крыс в дозе 6,5-7,0Гр развивается острая лучевая болезнь средней степени тяжести. Разгар болезни приходится на 5-10 сутки, стабилизация состояния длится 3-4 недели, выздоровление после которой может затягиваться на 4-6 месяцев и более [Шевцов В. и др., 2004; Киришин А. и др., 1990]. На рис.7 представлены кривые выживаемости крыс, облученных в дозе ЛД_{70/30}=6,5Гр. Сравнительный анализ данных показывает, что средняя продолжительность жизни крыс в группе Кр/глюкоза – 24,4 дня, в группе Кр/вода- 21,2 дней, в контрольных группах, получавших глюкозу и воду – 17,6 и 20,0 дней, соответственно. Если в опытных группах Кр/глюкоза и Кр/вода гибель животных заканчивается на 21 день и 23 день соответственно, то в облученной контрольной группе продолжается до 28 дня. При этом увеличенная продолжительность жизни в случае обогащения диеты Кр/глюкозой по отношению к соответствующей контрольной группе (0,9% глюкоза+облучение) составляет 38,6%. Выживаемость в группе Кр/глюкоза составляет 67%, в группе Кр/вода – 50%, а в контрольных группах с глюкозой и водой - 33,3%, и 27,8%, соответственно. В группах интактных животных 5 и 6, получавших и не получавших Кр/глюкозу, соответственно, смертельные случаи не были зарегистрированы. Согласно тесту Log-rank (Mantel Cox), выживаемость в группе животных, получавших Кр/глюкозу достоверно отличается от таковой при сравнении с контрольной группой, получавшей глюкозу ($p<0.003$). В то же время отличие по выживаемости в группе животных, получавших Кр/воду, было недостоверным по отношению к облученной контрольной группе животных, получавших воду ($p<0.169$). Согласно результату теста Chi Square исследованные 6 групп по выживаемости отличаются друг от друга с высокой степенью достоверности ($p<1,24 \times 10^{-12}$) (рис.7).



- 1 - Кр/глюкоза,
 - 2 - Кр/вода,
 - 3 - глюкоза,
 - 4 - вода;
 - 5 - интактные + Кр/глюкоза;
 - 6 - интактные;
- n=36 для групп 1-4;
n=24 для групп 5 и 6. $p < 1.24 \times 10^{-12}$
(Chi Square test).

Рис. 7. Кривые выживаемости крыс, подвергнутых общему однократному рентгеновскому облучению в дозе ЛД_{70/30} = 6,5Гр при применении креатина в дозе 1г/кг веса.

Для сравнения отметим соответствующие величины выживаемости для наиболее широко исследуемых радиомодифицирующих натуральных препаратов: рутин - 69,7% кверцетин - 69,2%, мелатонин - 60% [Patil L., et al, 2012]. Одобренный Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США природный радиопротектор, рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор под лекарственным названием Сарграмостим, при введении его через 48 часов после общего облучения приматов, понижал уровень смертности в группе ЛД_{50-60/60} на 36% и в группе ЛД_{70-80/60} - на 44% [Clayton N. et al., 2016]. Таким образом, полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что Кр повышает резистентность крыс к рентгеновскому излучению.

В рамках опыта по выживаемости представляло интерес оценить также радиомодифицирующее действие Кр на адаптационные свойства Кр-КК системы мозга и печени и ядерно-ядрышковый аппарат на 30-е сутки после облучения, когда течение ее стабилизируется. Как следует из диаграммы на рис.8 в группах 1 и 2, получавших Кр, в мозге крыс как активность, так и содержание креатина почти не отличаются от контрольного уровня, что свидетельствует о стабилизации к этому сроку энергетического обмена мозговых клеток, в то время как в печени эти показатели остаются все еще повышенными, что скорее всего связано с уже отмеченными тканеспецифическими адаптационными свойствами Кр-КК систем этих органов. В сыворотке крови этих животных также выявляются повышенные уровни КК активности и содержания креатина ($p < 0,01$), что может быть связано, с одной стороны, с повышенным поступлением фермента в кровь из различных органов и клеток крови, и, с другой стороны, с уменьшением скорости деградации циркулирующей в крови КК [Рыбина И., 2015; Lyzlova S. et al., 1991]. Особый интерес представляют данные относительно выживших контрольных облученных крыс (группа 3), которые свидетельствуют о нативных адаптационных свойствах Кр-КК системы. У них определяется повышенный уровень активности как мозговой КК ($p < 0,01$), так и печеночной КК, при повышенном уровне содержания Кр в печени, что может быть следствием активации эндогенного синтеза Кр. Приведенные данные свидетельствуют о том, что Кр-КК система мозга и печени крыс обладает определенными нативными адаптационными свойствами к действию рентгеновского излучения, которые возрастают в присутствии Кр.

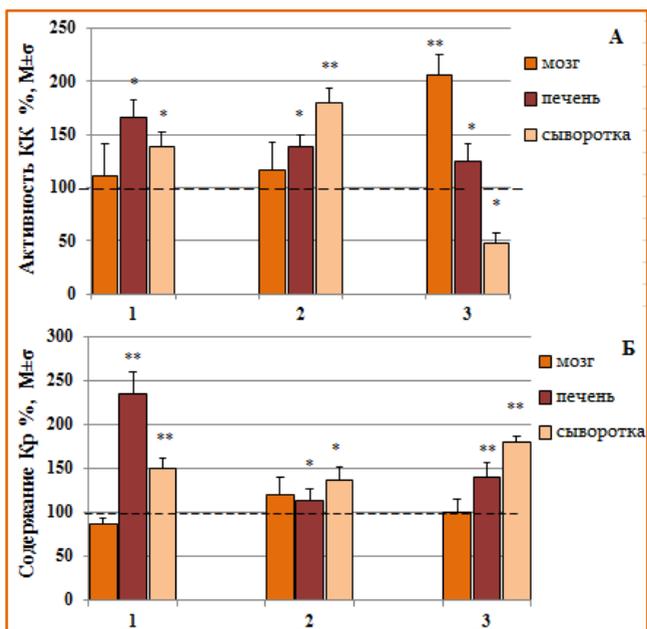


Рис. 8. Активность КК и содержание Кр в мозге, печени и сыворотке крыс на 30-ые сутки после облучения их в дозе 6,5Гр в присутствии и в отсутствие Кр.

1 – креатин/глюкоза, 2 – креатин/вода, 3 – облученный контроль.

n=15 для каждой группы, за исключением контрольной группы: n=10; отличие от контроля достоверно при: *p<0,05; **p≤0,01.

Наиболее интересные данные по **радиомодифицирующему действию Кр на ядерно-ядрышковый аппарат гепатоцитов** были получены относительно распределения ядер гепатоцитов по классам ploидности (рис. 9).

При сравнении с интактным контролем в группе контрольных облученных крыс обнаруживаются в большом количестве гиподиплоидные клетки, что свидетельствует о гибели гепатоцитов. В возрастание доли анеуплоидных гепатоцитов значительный вклад вносят 5c клетки, число которых втрое больше по отношению к нативному контролю (p<0,01), что может свидетельствовать о сохранении у этих животных через 30 дней определенного уровня геномной нестабильности. Водный раствор Кр значительно предотвращает гибель гепатоцитов, о чем свидетельствует уменьшение более чем в три раза числа гиподиплоидных клеток по сравнению с облученным контролем и возрастание количества эуплоидных гепатоцитов почти до уровня нативного контроля, в основном, за счет резкого увеличения числа тетраплоидных клеток (p<0,01), что и в данном случае указывает на развитие процесса компенсаторной полиплоидизации.

Раствор Кр в глюкозе оказывает более выраженное протекторное действие: полностью отсутствуют гиподиплоидные гепатоциты, а картина распределения ядер по ploидности почти повторяет данные нативного контроля, за исключением триплоидных клеток (p<0,05), относительная доля которых превышает этот показатель контроля почти вдвое, что может свидетельствовать о повышении синтеза ДНК в гепатоцитах крыс этой группы. Таким образом, Кр вызывает значительное снижение геномной нестабильности гепатоцитов, приближая картину распределения гепатоцитов по ploидности к контрольной группе.

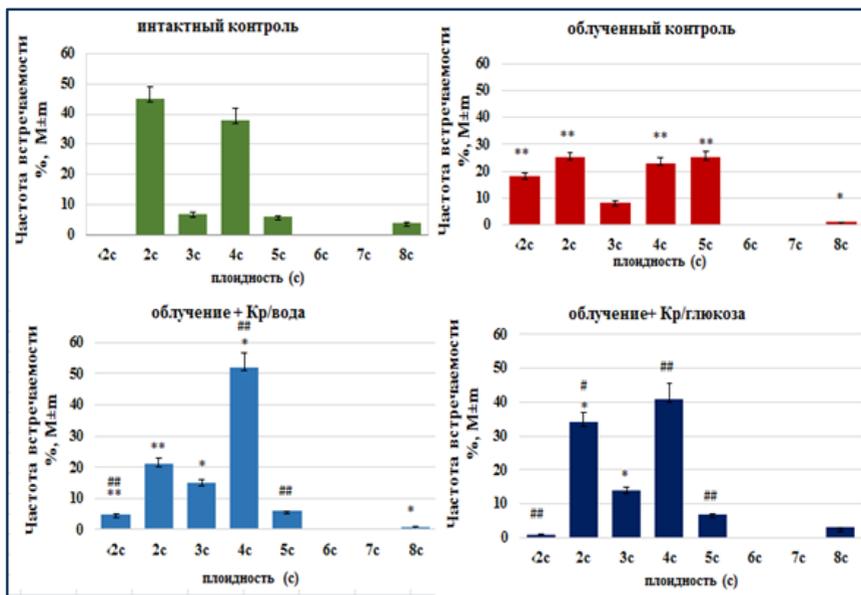


Рис. 9. Радиомодифицирующее действие Кр на распределение ядер по плоидности в гепатоцитах крыс на 30-е сутки после рентгеновского облучения в дозе 6,5Гр. n=15 для каждой группы, за исключением облученной контрольной группы: n=10. Отличие от интактного контроля достоверно при: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; отличие от облученного контроля достоверно при: # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$.

Изменения популяционного состава клеток периферической крови представляют собой наиболее объективный признак развития острой лучевой болезни. Сначала обнаруживается лейкопения, затем тромбопения и, наконец, эритропения, появляются бластные формы клеток крови, а также патологические и разрушенные клетки [Manda K. et al., 2012]. В табл.2 представлены данные об изменении популяционного состава клеток периферической крови крыс. Они свидетельствуют, с одной стороны, о развитии у крыс облученной контрольной группы классической формы острой лучевой болезни, с другой стороны, о значительном радиопротекторном действии Кр, который существенно уменьшает степень выраженности патологических изменений состава крови.

Если в контрольной группе здоровых крыс полностью отсутствуют ранние формы клеток крови, то в облученных группах появляются онобласты, лимфобласты, метамиелоциты, базофильные и полихроматофильные эритробласты, которые в суммарном количестве в контрольной группе облученных крыс составляют примерно 15%; содержание ретикулоцитов достигает более половины популяции клеток периферической крови, доходя до 60% против 15% в нативном контроле ($p < 0,01$). При этом в этой же группе резко, более чем в четыре раза, уменьшается число лимфоцитов ($p < 0,01$), что, является объективным признаком лучевой болезни, а количество нейтрофилов увеличивается в среднем 1,4 раза, по отношению к нативному контролю ($p < 0,05$). В то же время у крыс, получавших Кр в водном растворе и в растворе 0,9% глюкозы, содержание лимфоцитов в крови значительно выше, более чем в 1,5 и в 3 раза, соответственно; количество моноцитов в опытных группах также достоверно выше по

сравнению с облученным контролем ($p < 0,01$), приближаясь к содержанию в крови интактных крыс контроля, что особенно показательно в случае опытной группы облучение + Кр/глюкоза; кроме того, уменьшается количество ядерных форм эритробластов, например, в последней опытной группе почти в 7 раз ($p < 0,01$). В опытных группах уменьшается также количество патологических и разрушенных клеток.

Табл.2. Радиомодифицирующее действие креатина на популяционный состав клеток периферической крови (% , $M \pm m$) после воздействия общего однократного рентгеновского излучения в дозе 6,5Гр на 30-е сутки после облучения. $n=15$ для каждой группы, за исключением облученной контрольной группы: $n=10$.

Виды клеток	Интактный контроль	Облученный контроль	Кр/вода + облучение	Кр/глюкоза + облучение
Монобласты	0	1.0±0.5**	0.8±0.2*	0.4±0.3**
Моноциты	7.7±0.5	0.9±0.4**	2.1±0.1**	10.5±0.5*** ^{xx}
Лимфобласты	0	0.6±0.1**	0.4±0.3	0.6±0.5
Лимфоциты	62.3±2.4	14.4±0.7**	25.1±0.7*** ^{xx}	41.1±0.8** ^{xx}
Метамизлоциты	0	2.1±0.1**	1.2±0.1*** ^{xx}	1.0±0.2** ^{xx}
Палочкоядерные нейтрофилы	5.2±0.9	6.9±1.6*	1.8±0.2*** ^{xx}	8.0±0.7*
Сегментоядерные нейтрофилы	8.5±2.0	11.4±0.7*	2.5±0.1*** ^{xx}	0.6±0.2*** ^{xx}
Базофильные эритробласты	0	3.4±0.6*	1.4±1.2*** ^{xx}	0.6±0.1*** ^{xx}
Полихроматофильные эритробласты	1.1±0.4	8.0±0.2**	4.0±1.4*** ^{xx}	1.5±0.4*** ^{xx}
Ретикулоциты	15.2±1.0	60.1±5.1**	47.7±2.1*** ^{xx}	28.3±2.7*** ^{xx}
Эозинофилы	0	0	1.1±0.3*** ^{xx}	5.0±2.2*** ^{xx}
Патологические нейтрофилы	0	1.9±0.1**	0.7±0.6*** ^{xx}	1.1±0.2*** ^{xx}
Разрушенные клетки	0	0.7±0.5**	0.4±0.3*** ^{xx}	0.6±0.5*

Отличие от интактного контроля достоверно при: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; отличие от облученного контроля достоверно при: ^x $p \leq 0,05$; ^{xx} $p \leq 0,01$.

Таким образом, Кр оказывает выраженное цитопротекторное действие на патологические пострадиационные изменения популяционного состава клеток крови, нивелируя степень выраженности патологических изменений состава крови.

ВЫВОДЫ

1. Пострадиационные изменения уровня активности креатинкиназы мозга и печени, индуцированные общим однократным рентгеновским и однократным/дробным радиочастотным излучениями в отсутствие креатина, имеют компенсаторно-адаптационный характер и направлены на стимулирование энергетического обмена в тканях этих органов. При этом эффекты однократного радиочастотного облучения значительно более выражены, чем таковые в случае равноценного по длительности дробного облучения.

2. Креатин в растворе глюкозы в виде пищевой добавки существенно стимулирует тканеспецифические нативные адаптационные возможности креатин-креатинкиназной системы мозга и печени крыс к действию рентгеновского излучения, повышая таким образом радиорезистентность тканей этих органов.
3. Креатин/глюкоза в виде пищевой добавки вызывает существенное снижение индуцированной общим однократным рентгеновским излучением геномной нестабильности гепатоцитов, выражающейся в виде повышения полиплоидизации ядер и увеличения доли анеуплоидных и, особенно, гиподиплоидных гепатоцитов.
4. Креатин/глюкоза в виде пищевой добавки оказывает: радиопротекторное действие на выживаемость крыс с величиной 67% и увеличенной продолжительностью жизни в 39%; генопротекторный эффект, снижая вдвое уровень пострадиационных ДНК-разрывов мононуклеарных клеток периферической крови крыс; цитопротекторное действие, нивелируя пострадиационные изменения популяционного состава периферической крови крыс, подвергнутых облучению в дозе 6,5Гр=ЛД_{70/30}.
5. С учетом гепатопротекторного, генопротекторного, цитопротекторного и энергостимулирующего влияния, а также его радиозащитного эффекта на выживаемость крыс, природный нутриент креатин может быть рекомендован в качестве потенциального радиопротектора.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **Петросян М.С.**, Нерсесова Л.С., Каралова Е.М., Аветисян А.С., Аброян Л.О., Акопян Л.А., Газарянц М.Г., Акопян Ж.И. Постлучевые эффекты низкоинтенсивного электромагнитного излучения с частотой 900 МГц в печени крыс. // Мед. радиол. и рад. безопасность. 2020; 65(3):53-58. doi:10.12737/1024-6177-2020-65-3-53-58
2. **Petrosyan M.S.**, Nersesova L.S., Adamyan N.H., Gazaryants M.G., Akopian J.I. The effect of ionizing radiation on creatine - creatine kinase system in the rat brain and the radioprotective effect of creatine. // *Neurochemical Journal*. 2019; 13(3):295-301. doi: 10.1134/s1819712419030115
3. Нерсесова Л.С., **Петросян М.С.**, Каралова Е.М., Аветисян А.С., Аброян Л.О., Акопян Л.А., Каралаян З.А., Акопян Ж.И. Оценка радиомодифицирующего действия креатина на выживаемость, креатин-креатинкиназную систему печени, ядерно-ядрышковый аппарат гепатоцитов и клетки периферической крови крыс. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019; 59(6): 592-609. doi:10.1134/S0869803119060079
4. Нерсесова Л.С., **Петросян М.С.**, Бабаян Н.С., Тадевосян Г.Л., Хонджарян Л.Г., Акопян Ж.И. Радиозащитный эффект креатина при повреждении ДНК мононуклеарных клеток периферической крови и адаптационные возможности креатин-креатинкиназной системы мозга и печени крыс. // Радиация и риск. 2019. 28(3):119-131. doi:10.21870/0131-3878-2019-28-3-119-131
5. **Petrosyan M.S.**, Nersesova L.S., Akopian J.I. Creatine kinase as a potential marker of the biological effects of the low-intensity radio frequency electromagnetic radiation. // *Biolog. Journ. Armenia*. 2016; 68(Special issue):104-106.
6. **Петросян М.С.** Радиационно-индуцированные изменения ядерно-ядрышкового аппарата и маркерных ферментов гепатоцитов. // Экологический вестник. 2015; 31(1):37-43.
7. **Петросян М.С.**, Нерсесова Л.С., Газарянц М.Г., Меликсетян Г.О., Малакян М.Г., Баджиян С.А., Акопян Ж.И. Действие низкоинтенсивного электромагнитного излучения с частотой 900 МГц на активность ферментов, участвующих в

энергетическом обмене мозга крыс. // Радиц. биол. Радиэкол. 2015; 55(6):625-631. doi:10.7868/S0869803115060119

8. Нерсесова Л.С., **Петросян М.С.**, Акопян Ж.И. Влияние оксидативного стресса на креатинкиназу жизненно важных органов крыс. // Биолог. журн. Армении. 2015; 67(3):73-79.
9. Нерсесова Л.С., **Петросян М.С.**, Газарянц М.Г., Мкртчян З.С., Меликсетян Г.О., Погосян Л.Г., Акопян Ж.И. Действие низкоинтенсивного электромагнитного излучения с частотой 900 МГц на ферментные активности печени и сыворотки крови крыс. // Радиц. биол. Радиэкол. 2014; 54(5):522-530. doi:10.7868/S0869803114050129

Материалы конференций

10. **Петросян М.С.**, Нерсесова Л.С., Акопян Ж.И. Радиомодифицирующие свойства креатина и Са-модифицированной дуспиральной РНК. Материалы 18-й международной конференции «Сахаровские чтения 2018 года: Экологические проблемы XXI века». Белоруссия, Минск, 17-18 мая 2018г., с. 311-313.
11. **Petrosyan M.S.**, Nersesova L.S., Gazaryants M.G., Malakyan M.H., Akopian J.I. Creatine kinase effects of ionizing radiation and radioprotective potential of creatine. The «BRITE (Biomarkers of Radiation in the Environment): Robust tools for risk assessment» Advanced Research Workshop. Armenia, Yerevan, 28-30 November 2017. p. 37.
12. **Petrosyan M.S.**, Nersesova L.S., Gazaryants M.G., Malakyan R.G., Akopian J.I. Creatine kinase as a biomarker of oxidative stress induced by low-intensity radiofrequency electromagnetic radiation. Materials of the 15th International Conference «Sakharov Readings 2015: Environmental Problems of the XXI Century». Belarus, Minsk, 21-22 May 2015, p. 143.
13. **Петросян М.С.**, Нерсесова Л.С., Акопян Ж.И. Энзимологические эффекты в мозге и печени крыс, индуцированные низкоинтенсивным радиочастотным электромагнитным излучением. Научные труды Международного конгресса «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». Санкт Петербург, 7-11 сентября 2015г., том 7, с. 185-186.
14. **Petrosyan M.S.**, Nersesova L.S., Gazaryants M.G., Akopian J.I., Enzymological effects from radiofrequency radiation at low intensity exposure. Proceedings of the 3rd International Scientific Conference of Young researchers, «Dialogues on science» Dedicated to the 5th Anniversary of the SPC «Armbiotechnology» NAS RA, Armenia, Yerevan, June 23-26 2015, p. 98.
15. **Петросян М.С.**, Нерсесова Л.С., Газарянц М.Г., Акопян Ж.И., Действие электромагнитных радиочастотных волн на креатинкиназу, аланинаминотрансферазу, аспаратаминотрансферазу мозга. V Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов с международным участием «Окружающая среда и здоровье. Здоровая среда-здоровое наследие», Москва, 25-26 сентября 2014г. с. 364-366.
16. **Петросян М.С.**, Нерсесова Л.С., Газарянц М.Г., Мкртчян З.С., Меликсетян Г.О., Погосян Л.Г., Акопян Ж.И. Влияние электромагнитного излучения с частотой 900МГц на активности некоторых ферментов печени и сыворотки крови крыс. Материалы межд. конференции «Актуальные проблемы радиационной безопасности», Ереван, 2014г., с. 70-72.

Патент

17. Արտոնագիր N 3345A. Ներսեսովա Լ.Ս., Պետրոսյան Մ.Ս., Գազարյանց Մ.Գ., Հակոբյան Ժ.Ի. Կրեատինի կիրառումը որպես ռադիոպաշտպանիչ միջոց. Որոշում AM20190093 առ 08.08.2019.
https://www.aipa.am/u_files/file/TeXekagir/2019_11_2.pdf

ԿՐԵԱՏԻՆԻ ՌԱԴԻՈՊԱՇՏՊԱՆԻՉ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԲԶՋԻ ԷՆԵՐԳԵՏԻԿ ՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԿՈՐԻԶԻ ՄՈՐՖՈՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԼ ԿԱՐԳԱՎԻՃԱԿԻ ՎՐԱ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ ռադիոպաշտպանիչներ, կրեատին մոնոհիդրատ, Կր-ԿԿ-ային համակարգ, կորիզ-կորիզակային համակարգ, ապրելունակություն, ԴՆԹ-ի վնասվածքներ, առնետներ:

Սինթետիկ ռադիոպաշտպանիչներն ունեն մի շարք թերությունները, ինչպիսիք են՝ բարձր տոքսիկությունը, կողմնակի ազդեցությունը, ինչպես նաև ազդեցության սահմանափակ տևողությունն ու նրանց բարձր արժեքը, որոնք էլ հիմնավորում են ցածր տոքսիկությամբ բնական ծագման նյութերի ռադիոպաշտպանիչ հատկությունների ուսումնասիրման արդիականությունը: Ճառագայթումը առաջացնում է օքսիդացիոն սթրես (ՕՍ): Բջջի էներգետիկ կարգավիճակի պահպանումը ՕՍ դեմ պայքարի հիմնական նախապայմաններից է: Կրեատինկինազը (ԿԿ) իր սուբստրատների՝ կրեատինի (Կր) և կրեատինֆոսֆատի (ԿՖ) հետ առաջացնում է Կր-ԿՖ-ԿԿ-ային համակարգ, որը բջջում էներգետիկ և կայցիումական հոմեոստազի ապահովմանը զուգահեռ, իրականացնում է նաև միտոքոնդրիումների կառուցվածքային և ֆունկցիոնալ կարգավիճակի ապահովման ֆունկցիա, ինչն էլ կապված է այս համակարգի հակաօքսիդանտային և հակաապոպտոտիկ հատկությունների հետ: Այս ֆունկցիաների ամբողջությունն էլ պայմանավորում է Կր պաշտպանիչ հատկություններն ընդդեմ ՕՍ: Ընդ որում ԿԿ տարբերվում է սթրեսահարույց գործոնների նկատմամբ բարձր զգայունությամբ, ինչի շնորհիվ վերջինիս ակտիվության մակարդակի փոփոխությունն օգտագործվում է որպես էներգետիկ փոխանակության ցուցանիշ: Ճառագայթումը հարուցում է գենոմային անկայունություն, որն արտահայտվում է գենետիկական ապարատի մի շարք փոփոխություններով՝ ԴՆԹ-ի միաշղթա և երկշղթա վնասվածքներ, քրոմոսոմների աբերացիաներ, գենային մուտացիաներ, անեուպլոիդիա և պոլիպլոիդիա և այլն, ինչի պատճառով բջջում հետճառագայթային ֆունկցիոնալ փոփոխությունների առաջնային ցուցանիշներից մեկը հանդիսանում է բջջակորիզի մորֆոֆունկցիոնալ կարգավիճակը:

Ներկայումս Կր առավել հայտնի ադապտոգեններից մեկն է: *In vitro* և *in vivo* բազմաթիվ հետազոտություններում ցույց է տրված նրա պաշտպանիչ ազդեցությունն ընդդեմ ՕՍ, որն ընկած է ծերացման, մի շարք նյարդային հիվանդությունների ինչպես նաև քսենոբիոտիկների ազդեցության հետևանքների հիմքում: Քանի որ ռադիացիոն ազդեցության հիմքում ընկած է ՕՍ, ենթադրվեց, որ Կր որպես կենսահավելում կարող է օժտված լինել մեծ ռադիոմոդիֆիկացնող պոտենցիալով:

Ներկայացվող աշխատանքում ուսումնասիրվել է Կր ռադիոպաշտպանիչ ազդեցությունը ռենտգենյան ճառագայթման դեմ՝ բջջի էներգետիկ մետաբոլիզմի և բջջակորիզի մորֆոֆունկցիոնալ կարգավիճակի հետճառագայթային փոփոխությունների անալիզի հիման վրա: Բացի այդ կատարվել է Կր-ԿԿ

համակարգի ադապտացիոն հնարավորությունների գնահատում ռենտգենյան և ռադիոհաճախային ճառագայթման դեպքում:

Ցույց է տրվել, որ ուղեղի և լյարդի ԿԿ ակտիվության մակարդակի հետճառագայթային փոփոխությունները՝ միանվագ ընդհանուր ռենտգենյան և միանվագ/կոտորակային ռադիոհաճախային ճառագայթումներից հետո, Կր բացակայությամբ, կրում են կոմպենսատոր-ադապտիվ բնույթ և ուղղված են էներգետիկ փոխանակության խթանմանը այդ օրգաններում: Ընդ որում, միանվագ ռադիոհաճախային ճառագայթման կենսաբանական էֆեկտն առավել արտահայտված է, քան գումարային տևողությամբ հավասար կոտորակային ճառագայթման կենսաբանական էֆեկտը: Վերոնշյալ հետճառագայթային փոփոխությունների դինամիկայի համեմատական վերլուծությունը վկայում է ուղեղի և լյարդի Կր-ԿԿ համակարգի զգալի ադապտիվ պլաստիկության և հյուսվածքային սպեցիֆիկության մասին:

Կր գլյուկոզի լուծույթում որպես կենսահավելում զգալիորեն խթանում է առնետների ուղեղի և լյարդի Կր-ԿԿ համակարգի հյուսվածքային սպեցիֆիկ նատիվ ադապտացիոն հնարավորությունները ռենտգենյան ճառագայթման ազդեցության նկատմամբ՝ այդպիսով բարձրացնելով այդ օրգանների ռադիոռեզիստենտությունը: Կր/գլյուկոզը նպաստում է նաև ընդհանուր միանվագ ռենտգենյան ճառագայթմամբ հարուցված գենոմային անկայունության նվազմանը, որն արտահայտված էր կորիզների պոլիպոլիդգացիայի բարձրացմամբ, անեուպլոիդ և հատկապես հիպոդիպլոիդ հեպատոցիտների քանակի ավելացմամբ: Բացի այդ, Կր/գլյուկոզը ունի ռադիոպաշտպանիչ ազդեցություն առնետների ապրելունակության վրա (67%), բարձրացնում է նրանց կյանքի տևողությունը 39%-ով, գենապաշտպանիչ էֆեկտ՝ նվազեցնելով առնետների ծայրամասային արյան մոնոնուկլեար բջիջների ԴԼԹ-ի հետճառագայթային վնասվածքները, բջջապաշտպանիչ ազդեցություն՝ նվազեցնելով 6,5Գր= $L_{70/30}$ դոզայով ռենտգենյան ճառագայթմամբ պայմանավորված առնետների ծայրամասային արյան բջիջների պոպուլյացիոն կազմի փոփոխությունները: Հաշվի առնելով հեպատոպաշտպանիչ, գենապաշտպանիչ, բջջապաշտպանիչ, էներգախթանիչ էֆեկտները և ռադիոպաշտպանիչ էֆեկտը առնետների ապրելունակության վրա՝ Կր կարող է առաջարկվել որպես պոտենցիալ ռադիոպաշտպանիչ:

Աշխատանքի հիմնարար նշանակությունը կայանում է նրանում, որ ստացված արդյունքները մի կողմից լրացնում են բջջում Կր-ԿԿ համակարգի ֆիզիոլոգիական դերի մասին առկա պատկերացումները ընդհանուր առմամբ, ինչպես նաև այս համակարգի ադապտացիոն հնարավորությունների ենթատեքստում, իսկ մյուս կողմից՝ ընդլայնում են պատկերացումները Կր պաշտպանիչ պոտենցիալի մասով: Աշխատանքի արդյունքները հիմք են հանդիսանում առաջարկել Կր որպես պոտենցիալ ռադիոպաշտպանիչ, որն էլ պայմանավորում է կատարած հետազոտության գործնական նշանակությունը: Լ.Ս. Ներսեսյանի, Մ.Գ. Գազարյանցի և Ժ.Ի. Հակոբյանի հետ համատեղ ստացվել է արտոնագիր №3345A «Կրեատինի կիրառումը որպես ռադիոպաշտպանիչ միջոց» (որոշում AM20190093 առ 08.08.2019):

RADIOPROTECTIVE EFFECT OF CREATINE ON CELL ENERGY METABOLISM
AND MORPHOFUNCTIONAL STATUS OF NUCLEUS.

SUMMARY

Keywords: radioprotectors, creatine monohydrate, Cr-CK system, nucleus-nucleolar apparatus, survival, DNA damage, rats.

The disadvantages of synthetic radio-protectors, such as high toxicity, potential side effects, the limited duration of the effect, as well as the high monetary cost, make the study of the radioprotective properties of certain low-toxic natural compounds particularly relevant. Radiation causes cell oxidative stress (OS). The maintenance of the cell energy status is one of the main pre-conditions for the protection the cell against OS. The creatine kinase (CK), along with its creatine (Cr) and creatine phosphate (PCr) substrates, forms the Cr-PCr-CK system, which, in addition to its role in providing cell energy and calcium homeostasis, has a function of maintaining the structural and functional status of the mitochondria that is associated with antioxidant and antiapoptotic properties of this system - all together, these functions determine the protective properties of Cr against OS. At the same time, CK is highly sensitive to the impact of various stress factors; and this is why the CK activity level changes are used as an indicator of the energy metabolism status. Radiation induces genomic instability in the form of various alterations of the genetic apparatus, such as single- and double-stranded DNA breaks, aberrations of chromosomes, gene mutations, aneuploidy, and polyploidy. This is why one of the primary post-radiation indicators for the cell functional changes is the change in the cell nucleus morphofunctional status.

Creatine is one of the most popular adaptogens nowadays. Numerous *in vitro* and *in vivo* studies have shown its protective effect against the OS, which is the cause of aging, as well as a number of neurological diseases as well as the consequences of exposure to xenobiotics. Considering this, as well as the fact that the OS underlying on radiation damage, it has been suggested that Cr, as a dietary supplement, may have a high radio-modifying potential. In the present work, we have studied the radioprotective effect of Cr against X-ray radiation based on a comparative analysis of the post-radiation changes in the energy metabolism and the morphofunctional status of the cell nucleus. In addition, the adaptive response of the Cr-CK system to X-ray and radio frequency radiation has been assessed.

It has been demonstrated that the post-radiation changes in the brain and liver CK activity level, induced by total, one-time X-ray and one-time/fractional radiofrequency radiation in the absence of creatine, have a compensatory-adaptive nature and are aimed at stimulating energy metabolism in aforementioned organs. In this case, the effects of a one-time radiofrequency exposure are much more pronounced than those in the case of a fractional exposure of equal duration. Furthermore, the comparative analysis of the dynamics of aforementioned CK activity level post-radiation changes shows that the brain and liver Cr-CK systems have substantial adaptive plasticity, which in fact also manifests tissue specificity.

Cr/glucose solution as a dietary supplement significantly stimulates the tissue-specific native adaptive capabilities of the rat brain and liver Cr-CK system against the impact of X-rays, thus increasing the radio-resistance of these organs. Cr/glucose also causes a significant decrease in the genomic instability of hepatocytes, induced by a total single X-ray radiation, that was evident in the greater nuclear polyploidization and the increase in the proportion of aneuploid and, especially, hypodiploid hepatocytes. In addition, Cr/glucose leads to the following: a radioprotective effect on the rat survival rate with a value of 67% and an increased lifespan by 39%; genoprotective effect, decreasing the post-radiation level of DNA breaks of rat peripheral blood mononuclear cells; cytoprotective effect, by significantly decreasing pathological post-radiation changes in the population composition of peripheral blood cells of rats exposed to radiation at a dose of 6.5Gy = LD_{70/30}. Considering the hepatoprotective, genoprotective, cytoprotective, energy-stimulating, as well as the radioprotective effects of Cr on the rat survival rate, it can be recommended as a potential radioprotector.

The fundamental significance of this work lies in the fact that its results, on the one hand, enrich and supplement the existing perceptions about the physiological role of the cell Cr-CK system, in its entirety and at the level of the adaptive capabilities of this system, while also, on the other hand, expand the understanding of the protective potential of Cr. The results of this study provide a good reason to recommend Cr as a potential radioprotector, thus proving its practical significance. Obtained the # 3345A “Use of creatine as a radio-protective agent” patent (decree AM20190093, 8 August 2019), in co-authorship with Nersesova L.S., Gazaryants M.G., and Akopyan J.I.

