ՀԱՍՏԱՏՎԱԾ Է

ԵՊԲՀ ԳԻՏԱԿՈՈՐԴԻՆԱՑԻՈՆ

ԽՈՐՀՐԴԻ ՆԻՍՏՈՒՄ

ՆԱԽԱԳԱՀ՝ Կ.Գ.Դ., ՊՐՈՖԵՍՈՐ

Կ.Բ. ԵՆԿՈՅԱՆ

_____

Արձանագրություն N _____ “ _____” _____ 2018թ.

Կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՊԼԱՆ-ԱՆՈՏԱՑԻԱ

Հայցորդ -	Գոհար Արկադիի Կարապետյան Կենսաքիմիայի ամբիոնի ասպիրանտ
Թեզի վերնագիրը -	**«Ոսկրածուծի մոնոցիտների ներգրավվածությունը ալցհեյմերյան տիպի նեյրոդեգեներատիվ գործընթացում »**
Գիտական ղեկավար	ԵՊԲՀ գիտության գծով պրոռեկտոր, կ.գ.դ., պրոֆեսոր, Կոնստանտին Բորիսի Ենկոյան
Մասնագիտական դասիչը	**Գ.00.04.** «Կենսաքիմիա »

2018թ.

1. ԹԵՄԱՅԻ ԱՐԴԻԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆԸ

1. Ներածություն

1.1. Ընդհանուր պատկերացում

Մի շարք նեյրոդեգեներատիվ վիճակներ և, մասնավորապես Ալցհեյմերի հիվանդությունը (ԱՀ), համակցվում են նեյրոբորբոքման հետ, որը դրդվում է գլխուղեղի միկրոգլիայի կողմից: «Վնասված գլխուղեղի» պարագայում միկրոգլիան, մի կողմից, կարող է կարգավորել նեյրովերականգնիչ գործընթացներ, որոնք միտված են վերակագնելու նեյրոնների ֆունկցիան: Սակայն մյուս կողմից միկրոգլիայի բջիջների ֆունկցիան կարող է խանգարվել և այդ դեպքում վերջիններս սկսում են սինթեզել մեծ քանակությամբ նախաբորբոքային և ցիտոտոքսիկ միջնորդանյութեր, որոնք խոչընդոտում են նեյրոնների վերականգնումը և հանգեցնում նեյրոնային դիսֆունկցիային և բջջի վնասմանը: Մակրոֆագերը, որոնք սերվում են ոսկրածուծում առաջացող մոնոցիտներից, ծայրամասային հյուսվածքային պաշտպանության բանալի բջիջներն են և կոնկրետ իրավիճակների դեպքում ինֆիլտրացնում են կենտրոնական նյարդային համակարգը (ԿՆՀ), որտեղ դրանք, ունենալով նմանօրինակ դեր՝ մեծ հավանականությամբ կարող են օժանդակել միկրոգլիայի ֆունկցիային:

Այդ է պատճառը, որ տվյալ հետազոտությունն ուղղված է բացահայտելու ոսկրածուծում մոնոցիտների առաջացման և գլխուղեղ միգրացիայի գործընթացները նեյրոդեգեներացիայի դեպքում:

1.2. Նեյրոբորբոքումը և ԱՀ-ն

ԱՀ ծեր մարդկանց շրջանում ամենահաճախ հանդիպող նեյրոդեգեներատիվ խանգարումն է, որը 60-65 բարձր տարիքային խմբում թուլամտության հիմնական պատճառն է. հիվանդությունը կլինիկորեն արտահայտվում է ճանաչողական ֆունկցիաների հարաճող նվազմամբ: ԱՀ քրոնիկական հիվանդություն է, որը բնութագրվում է գլխուղեղի պարենքիմայում բետա-ամիլոիդային (Aβ) վահանիկների (հայտնի են նաև որպես ծերունական վահանիկներ) և նեյրոֆիբրիլյար հանգույցների առկայությամբ (Thériault P., Elali A., Rivest S., 2015), որոնք հիմնականում առաջանում են հիպոկամպում և կեղևում: Նեյրոտոքսիկ Aβ1–40 և Aβ1–42 պեպտիդներն առաջանում են ամիլոիդ նախորդող սպիտակուցի (անգլ.՝ APP՝ amyloid precursor protein) հաջորդական քայքայմամբ: Այս պրոցեսը միջնորդվում է β- և γ-սեկրետազ ֆերմենտներով: Արդյունքում առաջացնում են լուծելի օլիգոմերներ, որոնք, ժամանակի ընթացքում

ագրեգացվելով, վերածվում եմ անլուծելի արտաբջջային բետա-ամիլոիդի (Aβ) (Selkoe D., 2012): Մի քանի հետազոտություններ հայտնաբերել են սերտ կապ նեյրոբորբոքման և ԱՀ միջև: Ապացուցված է, որ Aβ-հրահրված բորբոքումը միջնորդվում է տարբեր մեխանիզմներով՝ ներառելով ինֆլամասոմի (Halle A., et al., 2008; Heneka M., et al., 2013), միկրոգլիայի ակտիվացում (Bornemann K., et al., 2001), ռեակտիվ աստրոցիտների (White J., et al., 2005) և մոնոցիտների ինֆիլտրացիա գլխուղեղի պարենքիմա և դրանց հաջորդական ակտիվացում (Gonzalez-Velasquez F., Moss M., 2008): Չնայած նեյրոբորբոքման և Ալցհեյմերի հիվանդության միջև առկա կապն ապացուցվել է՝ այնուամենայնիվ, թե ինչպես է ակտիվանում գլխուղեղի բնածին իմունիտետն, դեռևս մնում է բանավեճի առարկա: ԱՀ հիմնական «մոլեկուլային բուժման» ռազմավարությունը կայանում է Aβ-ի քանակի նվազման մեջ: Aβ-ի նվազեցմանը կարելի է հասնել կամ վերջինիս սինթեզի և ագրեգացիայի ընկճմամբ, կամ նպաստելով նրա դեգրադացիային և վերացմանը:

1.3. Միկրոգլիայի դերը ԱՀ պաթոգենեզում

Միկրոգլիայի բջիջները՝ գլխուղեղի տեղային մակրոֆագերն են և տեղային իմուն համակարգի ակտիվ բջիջները: Թեև միկրոգլիայի ծագման վերաբերյալ կան բազում վարկածներ, այնուամենայնիվ, ընդունված է դրանց հեմոպոետիկ ծագման վարկածը, ըստ որի միկրոգլիան առաջանում է միելոիդ նախորդող բջիջներից, որոնք անցնում են ԿՆՀ էմբրիոնալ զարգացման ընթացքում: Տեղային միկրոգլիայի՝ պատանեկան և հասուն գլխուղեղում կենսագործունեության վերաբերյալ շատ հարցեր դեռևս մնում են չբացահայտված (Chan et al., 2007): Վերջին տարիների հետազոտությունները վկայում են, որ միկրոգլիան ձևավորվում է պոստնատալ զարգացման շրջանում հեմատոէնցեֆալիկ պատնեշի զարգացումից անմիջապես հետո (Prinz M., Priller J., 2014):

Որոշ ախտաբանական վիճակներում (օրինակ, տարբեր նեյրոդեգեներատիվ հիվանդությունների, կաթվածի, ուռուցքի ներաճի դեպքում), միկրոգլիան ակտիվանում է, շրջապատում վնասված ու մահացած բջիջները և իմուն համակարգի ֆագոցիտար բջիջների անալոգիայով մաքրում բջջային խարամը (Fetler and Amigorena, 2005): Այս պրոցեսը նեյրոնային օղակի վերակառուցման կարևոր մասն է, այն վերականգնում է բջջի վնասման ընթացքում խափանված մեխանիզմները (Neumann et al., 2009; Neher et al., 2011): Ակտիվանալիս միկրոգլիան սինթեզում է այնպիսի բորբոքային

միջնորդանյութեր, ինչպիսիք են ցիտոկինները, քեմոկինները, պրոստագլանդինները, ինդուցիբել NO-սինթետազ (iNOS), ցիկլոօքսիգենազ-2 (COX-2), ազատ ռադիկալներ և խթանում ադապտիվ իմուն պատասխանը (Nimmerjahn et al., 2005; Ransohoff and Perry, 2009): Այս գործընթացում միկրոգլիան ենթարկվում է նաև արտահայտված մորֆոլոգիական փոփոխությունների՝ ճյուղավորված բջիջներից մինչև ամեոբանման միկրոգլիա (Kreutzberg, 1996): Ամիլոիդային պեպտիդները և ամիլոիդ նախորդող սպիտակուցը գլիայի ակտիվատորներ են (Barger and Harmon, 1997), Aβ-ն ունակ է կապելու և ակտիվացնելու միկրոգլիան: Այս գործողության մեխանիզմի հիմքում ընկած են pattern recognition receptors (PRRS):

Համաձայն առաջարկված վարկածի միկրոգլիայի վաղաժամ ակտիվացումը հանգեցնում է բետա-ամիլոիդի վերացմանը՝ դրանով ձգձգում ԱՀ առաջխաղացումը: Հնարավոր է, որ գլիալ ակտիվացումը հիվանդության սկզբում պաշտպանողական մեխանիզմ է (Wyss-Coray et al., 2003; Maragakis and Rothstein, 2006; Wyss-Coray, 2006): ԱՀ-ի վաղ շրջանում ակտիվացած միկրոգլիան նվազեցնում է Aβ-ի կուտակումը՝ բարձրացնելով ֆագոցիտոզը, դեգրադացիան և հեռացումը (Frautschyet al., 1998; Qiu et al., 1998): Մեխանիզմը, որի միջոցով Aβ-ն ենթարկվում է ֆագոցիտոզի, կախված է դրա ֆիզիկական հատկություններից՝ այն լուծելի, թե անլուծելի (ֆիբրիլյար) վիճակում է: Արտազատված Aβ1-40 և Aβ1-42 սպիտակուցները հաջորդաբար ոչնչանում են նեպրիլիզինով և ինսուլին քայքայող ֆերմենտով (IDE): Վերջինս ձերբազատվում է միկրոգլիայի և այլ նյարդային բջիջների կողմից, որոնց ֆերմենտային ակտիվությունը բարձրացած է բորբոքային գործընթացների ազդեցությամբ, ինչպես, օրինակ, խթանումը լիպոպոլիսախարիդով (Qiu et al., 1997): Հյուսվածաբանական հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ակտիվացած միկրոգլիան (ամեոբանման) աստրոցիտների հետ միասին ԱՀ տառապող հիվանդների գլխուղեղում շրջապատում է ծերունական վահանիկները: Ավելին, այս բջիջները կարող են արտադրել հիստոհամատեղելիության գլխավոր կոմպլեքս (MHC II), ցիկլոօքսիգենազ (COX)-2, մոնոցիտ քեմոատրակտանտ սպիտակուց (MCP)-1, ուռուցքի նեկրոզի գործոն-ալֆա (TNF-α), ինտերլեյկին-1β (IL-1β) կամ IL-16 (Akiyama et al., 2000 and Glass et al., 2010), որոնք, ի դեպ, հանդիսանում են բորբոքման միջնորդանյութեր:

1.4. Մոնոցիտների դինամիկան ԱՀ դեպքում

Միկրոգլիայից բացի գլխուղեղում առկա են մոնոցիտներից սերված մակրոֆագեր (Schwartz and Shechter, 2010): Մոնոցիտները շրջանառող լեյկոցիտների խումբ են, որոնք բնածին իմուն համակարգի բջիջներ են: Դրանք ծագում են ոսկրածուծում միելոիդ նախորդող բջիջներից և դուրս են գալիս արյան հուն, որտեղ նրանք շրջանառում են մինչև օրգանների մեջ անցումը և տարբերակումը հյուսվածք սպեցիֆիկ մակրոֆագերի և դենդրիտային բջիջների (Ziegler-Heitbrock, 2007): Մոնոցիտները բաժանվում են երկու խմբի՝ կարճատև ապրող բորբոքային մոնոցիտների խումբ, որոնք տեղափոխվում են օջախ հյուսվածքի վնասման ժամանակ, և տեղային մոնոցիտների խումբ, որոնք տեղային հոմեոստազի մասն են կազմում (Lebson L., 2008): Հյուսվածքային հոմեոստազը պահպանելու նպատակով մոնոցիտների իմուն ֆունկցիան և տարբերակումը պայմանավորված է այլ բջիջների հետ փոխազդեցությամբ, ինչն իրականացվում է մակերեսային սպիտակուցների միջոցով:

Ծայրամասային արյան մոնոցիտները բնութագրելու նպատակով տարբեր խմբեր ներկայացնում են CD14 և CD16 մոնոցիտների տարբերակիչ էքսպրեսիա (Lagasse and Weissman 1996; Sunderkotter, Nikolic et al. 2004): Այդ խմբերը բաժանվում են երկու մեծ ենթամիավորի՝ CCR2+CD62L+Cx3CR1+ կամ Ly6C+ կամ Gr-1 մկների մոնոցիտներ, որոնք համապատասխանում են CD14 ցածր CD16+ մարդու դասական մոնոցիտներին, որոնք կարծես թե տեղաշարժվում են ոչ բորբոքային տեղամաս, և CCR2+Cx3CR1 ցածր կամ Ly6C-/ցածր կամ Gr-1 ցածր, որոնք համապատասխանում են CD14 բարձր CD16$^-$ մարդու մոնոցիտներին, որոնք էլ CCL2/MCP-1-ի ճանաչման միջոցով տեղափոխվում են բորբոքային ծայրամասային տեղամաս (Geissmann, Jung et al. 2003; Tacke, Ginhoux et al. 2006; Tacke and Randolph 2006):

Սակավ է ֆիզիոլոգիական պայմաններում մոնոցիտի և գլխուղեղի փոխազդեցության վերաբերյալ ինֆորմացիան: Պաթոֆիզիոլոգիական վիճակների դեպքում նախաբորբոքային մոնոցիտները ոսկրածուծից մոբիլիզացվում են արյան հոսք և ինֆիլտրացնում գլխուղեղը (Mildner A, Mack M, Schmidt H, Bruck W, Djukic M, Zabel MD et al., 2009): Մոնոցիտներով ինֆիլտրացիայի հաճախականությունն աճում է ի պատասխան գլխուղեղում ծագող բորբոքային ազդանշանների (Malm T, Koistinaho M, Muona A, Magga J, Koistinaho J., 2010)՝ արգելակելով իմունոսուպրեսիվ TGF-β կամ կառավարելով մակրոֆագ գաղութ խթանող գործոնը (M-CSF), գրանուլոցիտ գաղութ

խթանող գործոնը (G-CSF), գրանուլոցիտ-մակրոֆագ գաղութ խթանող գործոնը (GM-CSF), խիտինը, լիպոպոլիսախարիդը, նյարդի աճի գործոնը: Այս ազդեցությունների շնորհիվ է, որ միկրոգլիան կարող է թուլացնել ալցհեյմերային պաթոլոգիան: Արդյունքում նվազում է պարենքիմային և գլխուղեղանոթային Aβ քանակը, ինչը, օրինակ, ԱՀ առնետային մոդելի դեպքում բերում է կենդանիների ճանաչողական անբավարարության լավացմանը (Boissonneault et al., 2009, Hawkes and McLaurin, 2009, Malm et al., 2010, Naert and Rivest, 2013, Rezai-Zadeh et al., 2009, Town et al., 2008, Yong and Rivest, 2009 and Hohsfield et al., 2014): Հաջորդելով վնասված գլխուղեղի ինֆիլտրացիային՝ մոնոցիտները կարող են տարբերակվել ակտիվ մակրոֆագերի, որոնք ներառված են տարբեր բորբոքային մոլեկուլների, ինչպիսին են ինտերլեյկին-1β և ուռուցքի նեկրոզի գործոն α-ի սինթեզի (Ginhoux F, Jung S., 2014) և տոքսիկ գործոնների, ներառյալ Aβ-ն, ֆագոցիտոզի մեջ (Malm T, et al., 2010): Հարկ է նշել, որ այս մոնոցիտ-սերված մակրոֆագերը մորֆոլոգիապես չեն տարբերվում գլխուղեղի տեղային միկրոգլիայից, բայց դրանք ցուցաբերում են ֆունկցիոնալ ավելի էֆեկտիվ ֆագոցիտար ակտիվություն (Malm T, et al., 2010): Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ արյունից սերված մակրոֆագերն ունակ են էֆեկտիվ ոչնչացնել ամիլոիդը և պաշտպանել նյարդային համակարգը՝ արտազատելով աճի գործոններ, ինչպիսին է, օրինակ, գլիայից սերվող նեյրոտրոֆիկ ֆակտոր (GDNF), որոնք կարևոր են նեյրոնների գոյության համար (Liu and Hong, 2003): Չնայած ինտենսիվ հետազոտությունների՝ միկրոգլիայի՝ գլխուղեղի տեղային մակրոֆագերի ճշգրիտ ծագումը և բջջային «տոհմածառը» դեռևս քննարկման առարկա են:

Գլխուղեղը օգտագործում է իմուն համակարգի մի քանի մեխանիզմներ կարգավորելու բորբոքման գործընթացը և դրանով հարուցված պոտենցիալ վնասակար գործոնների ազդեցությունը (Rezai-Zadeh et al., 2009): Այդ պրոցեսի մեջ իմուն համակարգի գլխավոր առանձնահատկություններից մեկը հեմատոէնցեֆալիկ պատնեշի առկայությունն է, որը պատասխանատու է տարբեր սուբստրատների և բջիջների թափանցման սահմանափակման համար (Rezai-Zadeh et al., 2009): Էֆեկտիվ իմուն պատասխանի դեպքում անոթային թափանցելիությունն աճում է, և արյան հոսքն ուղղվում է դեպի բորբոքման և վնասման օջախ: Դա ուղեկցվում է պերիֆերիկ արյան իմուն բջիջների թափանցմամբ գլխուղեղի մազանոթային վենուլներ (Yong and Rivest,

2009) և ներառում քեմոկինների, դրանց ռեցեպտորների և ադհեզիվ մոլեկուլների միջնորդությամբ ընթացող մի քանի հաջորդական պրոցեսներ:

Այսպիսով, ներկայիս ուսումնասիրության նպատակն է փորձել լույս սփռել, թե ինչպես իմունային գործընթացները կարող են սահմանափակել ԱՀ հարաճումը՝ հիմքում դնելով այն, որ արյունից սերված մոնոցիտները գլխուղեղը «կմաքրեն» այնտեղ առաջացած Aβ-ից: Ավելին, ԿՆՀ վնասված տեղամասերում մոնոցիտների դերի վերաբերյալ հետազոտությունները վերծանելով (Kokovay E. and Cunningham L., 2005)՝ չի բացառվում, որ այս բջիջները կարող են թերապևտիկ գործոնների մատակարար լինել:

1.2. ԺԱՄԱՆԱԿԱԿԻՑ ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՔՆՆԱԴԱՏԱԿԱՆ ՎԵՐԼՈՒԾՈՒԹՅՈՒՆԸ
(յուրաքանչյուրի համար լրիվ մատենագիտական հղումներով)

ա) Danielyan L., Schafer R., von Ameln-Mayerhofer A, Bernhard F., Veryelsdonk S. et al. Therapeutic efficacy of intranasally delivered mesenchymal stem cella in a rat model of Parkinson disease. 2011. Rejuvenation Research,vol.14, pp. 3-14

Բջիջների հուսալի և արդյունավետ մատակարարումը մնում է նեյրոդեգեներատիվ խանգարումների ժամանակ բջջային թերապիայի գլխավոր մարտահրավերներից մեկը: Տրանսպլանտանտի կենսունակությունը, գլխուղեղում թերապևտիկ բջիջներով բավարար հարստացումը, նրանց դեպի պերիֆերիկ օրգաններ թափացման խոչընդոտումը զգալիորեն կախված են ներմուծման մեթոդից: Աշխատանքում ցուցադրված է առաջին անգամ մեզենքիմիալ ցողուային բջիջների (MSCs) մատակարարումը գլխուղեղ՝ ոչ ինվազիվ, ինտրանազալ (IN) ճանապարհով միակողմանի 6-հիդրոքսիդոֆամինով վնասված առնետների վրա: MSCs IN կիրառումը հանգեցրել է բջիջների հայտնաբերմանը հոտառական կոճղեզում, կեղևում, հիպոկամպում, ստրիատումում, ուղեղիկում, ցողունում, ողնուղեղում: Ինտրանազալ կիրառված 1×10^6 MSCs-ից, 24%-ը կենսունակ էին առնետների ուղեղում առնվազն 4.5 ամիս, ինչը գնահատվել է EGFP-ի ԴՆԹ-ի քանակական հետազոտմամբ: EGFP-MSCs անտիգեն-դրական բջջային կորիզների պրոլիֆերացիայի քանակական որոշումը ցույց է տվել, որ կիրառված MSCs-ի 3%-ը պրոլիֆերացված էին 4.5 ամիս կիրառումից հետո: MSCs-ի IN ներմուծումը բարձրացնում է թիրոքսին հիդրոքսիլազի մակարդակը միակողմանի վնասված ստրիատումում և սև սուբստանցիայում և ամբողջությամբ էլիմինացնում 6-ODHA-ով հարուցված տերմինալ դեզոքսինուկլեոտիդիլտրասֆերազ (TdT) պարունակող 2'-դեզոքսիուրիդինի բարձրացումը: EGFP-պիտակավորված MSCs-ը ինրտանազալ ներարկմամբ կանխել են դոֆամինի մակարդակի

ցանկացած իջեցում վնասված կիսագնդում, այն դեպքում երբ վերահսկվող խմբի կենդանիների մոտ վնասված հաստվածում նկատվել է դոֆամինի մակարդակի զգալի նվազում 6-ODHA-ով բուժումից 4.5 ամիս հետո: Վարքային թեստերը ցույց են տվել կենդանու դիմացի պարկինսոնյան թաթիկի շարժական ֆունկցիայի նկատելի և էական լավացում՝ նորմայի արժեքից մինչև 68% ,40-110 օրվա ընթացքում 1×10^6 բջիջների IN ներարկման ժամանակ: MSC-INA նվազեցնում է բորբոքային ցիտոկինների ՝ ինտերլեյկիններ IL-1β, IL-2, -6, -12; TNF; IFN-γ, GM-CSF կոնցենտրացիաները վնասված կիսագնդում մինչև նրանց մակարդակները չվնասվածում:

բ) Danielyan L., Beer-Hammer S., Stolzing A, Schafer R et al. Intranasal delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells,macrophages, and microglia to the brain in mouse models of Alzheimer's and Parkinson's disease. 2014. Cell Transplantation, Vol. 23, pp. S123–S139.

Հաշվի առնելով նեյրոդեգեներատիվ խանգարումների, ուղեղի տրավմատիկ վնասվածքի եւ ուռուցքների բջիջների վրա հիմնված բուժման արագ նախակլինիկական զարգացումը, թերապևտիկ բջիջների անվտանգ, արդյունավետ առաքումը և թիրախավորումը կենտրոնական նյարդային համակարգում կարևոր նշանակություն ունի բուժման արդյունավետությունը և անվտանգությունը պահպանելու համար համապատասխան հիվանդությունների մոդելներներում: Այս հետազոտության մեջ ուսումնասիրվել է ոսկրածուծից սերված մեզենքիմյալ ցողունային բջիջների (MSCs), մակրոֆագերի և միկրոգլիայի մատակարարումը գլխուղեղ Պարկինսոնյան հիվանդության [Thy1)- h[A30P] aS] և Ալցհեյմերյան հիվադության APP/PS1 տրանսգենային մոդելներում ինտրանազալ ներարկման միջոցով: Միկրոգլիայի ինտրանազալ ներարկումը BL/6 մկների մոտ հանգեցրեց բջիջների նպատակային և արդյունավետ մատակարարումը գլխուղեղ: eGFP-ի ԴՆԹ-ի քանակական անալիզը ցույց է տվել, որ գլխուղեղը պարունակում է eGFP-միկրոգլիայի ամենամեծ քանակությունը (մինչև 2.1×10^4) բջիջների 1×10^6 ինրանազալ ներարկումից հետո (INA), այն դեպքում երբ պերիֆերիկ օրգաններում հայտնաբերված բջիջների ընդհանուր քանակը չի գերազանցել 3.4×10^3: INA 7 օր հետո eGFP էքսպեսող MSCs հայտնաբերվել են of (Thy1)-h[A30P] aS տրանսգենային մկների հոտառական կոճղեզում, կեղևում, amygdala, ստրիատումում, հիպոկամպում, ուղեղիկում և երկարավուն ուղեղում, մեծ մասամբ տարածված լինելով հոտառական կոճղեզում և երկարավուն ուղեղում: eGFP-էքսպրեսող մակրոֆագերի ինտրանազալ ներարկումը 13-ամսական APP/PS1 մկների մոտ հանգեցրել է բջիջների մատակարարմանը ՀԿ, հիպոկամպ, կեղև և ուղեղիկ: Ե՛վ MSCs, և՛ մակրոֆագերը պարունակել են Iba-1 դրական փոքր միկրոգլիայի նման բջիջների պոպուլյացիա և Iba-1-նեգատիվ խոշոր կլոր բջիջներ ցույց տալով կամ ներբջջային ամիլոիդ b (մակրոֆագերը APP/PS1 մոդելում) կամ a-սինուկլեինի [MSCs in (Thy1)-h[A30P] aS մոդել] իմունոռեակտիվությունը: Այտեղ, առաջին անգամ ցույց է տրվում, բջիջների

ինտրանազալ ներարկումը գլխուղեղ տրանսգենային մկների ՊՀ և ԱՀ մեղելում: Լրացուցիչ աշխատանք է պետք օպտիմալ քանակը սահմանելու համար (միանգամյա կամ կրկնակի ներարկում) ֆուկցիոնալ բարելավման համար այս մոդելներում ներքթային միկրոգլիա/մակրոֆագ և մեզենքիմյալ ցողունային բջիջների օգնությամբ:

գ) M. M. Miyake, M.D., Benjamin S. Bleier. The blood-brain barrier and nasal drug delivery to the central nervous system. 2015. American Journal of Rhinology & Allergy, Vol. 29, pp. 124-127(4)

Դեղերի ինտրանազալ մատակարարումը հայտվել է որպես պոտենցիալ ալտերնատիվ մեթոդ դեղերի ԿՆՀ ուղիղ ներմուծման համար և առաջին անգամ մշակվել է 1989 թ. ուղեղում նեյրոտրոֆիկ գործոնները թիրախավորելու համար: Այս մեթոդը ենթադրում է, որ դեղամիջոցները, այդ թվում մեծ և բևեռային, կարող են ուղիղ և արագ մատակարարված լինել ԿՆՀ: Սա հնարավոր է, որովհետև քթային խոռոչը մարդու օրգանիզմում միակ մասն է, որտեղ նյարդային համակարգը ուղիղ կապի մեջ է շրջակա միաջավայրի հետ: Հայտնի է, որ դեղերի ներքթային ներմուծումը ուղիղ փոխանցվել է ողնուղեղային խոռոչ հոտառական ուղիով, որտեղ սուբարախնոիդ տարածությունը ընդլայնվում է դեպի քթային խոռոչ: Ինտրանազալ մեթոդը թույլ է տալիս խուսափել գլխուղեղի վնասումներից կամ օտար մարմինների տեղադրումից և կրճատում է կողմակի էֆեկտները կապված համակարգային ներմուծման հետ: Կենդանիների վրա կատարված բազմաթիվ ուսումնասիրություններ ցույց են տվել դեղանյութերի մոլեկուլների կլանումը՝ որպես պոտենցիալ ուղի, դրանց դեպի ԿՆՀ մատակարարումը: Այնուամենայնիվ, բազմաթիվ հակասություններ դեռևս մնում են: Ուղիղ ինտրանազալ մատակարարումը միշտ չէ ակնհայտ և նույնիսկ նմանատիպ մոլեկուլների ժամանակ արդյունքները երբեմն միանշանակ չեն: Մի քանի գործոն ինչպիսիք են՝ կենդանիների գլխի դիրքը, դեղամիջոցի ներմուծման տեխնիկան, ծավալը, ԿՆՀ-ի և դեղերի բախշման գնահատումը, կարող են ազդել դեղերի մատակարարման վրա: Ավելին, չնայած հոտառական էպիթելը գրավում է առնետների քթային խոռոչի 50%-ը, մարդու մոտ այն կազմում է քթային լորձաթաղանթի 3%-ը՝ ընդհանուր 1-2 սմ^2 տարածությամբ: Մարդու մոտ հոտառական լորձաթաղանթի այս հարաբերական փոքր լինելը իր տեղակայման հետ մեկտեղ (կապված դժվար հասանելիության հետ), ենթադրում է, որ առնետների վրա կարարված ուսումնասիրությունները հավանաբար գերագնահատում են կլինիկական պոտենցիալը, հատկապես մեծահասակ բնակչության դեպքում: Ուսումնասիրվել է 100-ից ավելի հրապարակված հոդվածներ, որոնք նկարագրուլ եմ քիթ – ԿՆՀ ուղին և նկատվել է, որ ուսումնասիրությունների մեծ մասում կիրառվել են անիրական մեթոդներ, որոնք չի կարելի կիրառել մարդկանց հետ, նեռարյալ դեղամիջոցների մերարկման չափազանց ագրեսիվ մեթոդներ՝բարձր ճնշում, ներարկման երկար ժամանակ կամ մեծ ծավալներ, լորձաթաղանթի

թափանցելիությունը բարձրացնող պրեպարատների օգնագործումը մեծ կոնցենտրացիաներով, նույնիսկ վիրահատական գործողություններ ինչպիսիք են կերակրափողի փակումը կլանումը կանխելու նպատակով: Այս եզրակացությունները ենթադրում են, որ կա չբավարարված կարիք լայն սպեկտրով նեյրոֆարմակոլոգիական գործոնների հուսալի ինտրանազալ մատակարարման համար:

1.3. Օգտագործված գրականություն ցանկ

1. Akiyama H., Arai T., Kondo H., Tanno E., Haga C., Ikeda K. (2000). Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. Alzheimer Dis Assoc Disord. 14(1):S47-53.
2. Barger S., Harmon A. (1997). Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. Nature. 388(6645):878-81.
3. Boissonneault V., Filali M., Lessard M., Relton J., Wong G., Rivest S. (2009). Powerful beneficial effects of macrophage colony-stimulating factor on beta-amyloid deposition and cognitive impairment in Alzheimer's disease. Brain.
4. Bornemann K., Wiederhold K., Pauli C., Ermini F., Stalder M., Schnell L., Sommer B., Jucker M., Staufenbiel M. (2001). Abeta-induced inflammatory processes in microglia cells of APP23 transgenic mice. Am J Pathol. 158(1):63-73.
5. Chan, W., et al. (2007). The origin and cell lineage of microglia: new concepts. Brain Res Rev 53(2):344-354.
6. Danielyan L., Schäfer R. et al. (2011). Therapeutic efficacy of intranasally delivered mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson disease. Rejuvenation Res 14(1):3-16.
7. Dickey C., Kraft C., Jinwal U., Koren J., Johnson A., Anderson L., Lebson L., Lee D., Dickson D., de Silva R., Binder L., Morgan D., Lewis J. (2009). Aging analysis reveals slowed tau turnover and enhanced stress response in a mouse model of tauopathy.Am J Pathol. 174(1):228-238.
8. Fetler L., Amigorena S. (2005). Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. Science. 309(5733):392-393.
9. Francke A., Herold J., Weinert S., Strasser R., Braun-Dullaeus R. (2011). Generation of Mature Murine Monocytes from Heterogeneous Bone Marrow and Description of Their Properties. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 59(9):813–825.
10. Frautschy S., Yang F., Irrizarry M., Hyman B., Saido T., Hsiao K., Cole G. (1998)
11. Geissmann F., Jung S., Littman D. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity. 19(1):71-82.
12. Ginhoux F., Jung S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. Nat Rev Immunol. 14(6):392-404.
13. Giunta B., Fernandez F., Nikolic W., Obregon D., Rrapo E., Town T., Tan J. (2008). Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease. J Neuroinflammation. 5:51.
14. Gonzalez-Velasquez F., Moss M. (2008). Soluble aggregates of the amyloid-beta protein activate endothelial monolayers for adhesion and subsequent transmigration of monocyte cells. J Neurochem. 104(2):500-513.
15. Goto Y. et al. (2003). A novel method to quantify the turnover and release of monocytes from the bone marrow using the thymidine analog 5'-bromo-2'-deoxyuridine. Am J Physiol Cell Physiol 285(2):C253-259.

16. Halle A., Hornung V., Petzold G., Stewart C., Monks B., Reinheckel T., Fitzgerald K., Latz E., Moore K., Golenbock D. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. Nat Immunol. 9(8):857-865.
17. Hasegawa A. et al. (2009). Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. Joachim Weischenfeldt and Bo Porse 114(14): 2917–2925.
18. Hawkes C., McLaurin J. (2009). Selective targeting of perivascular macrophages for clearance of beta-amyloid in cerebral amyloid angiopathy. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(4):1261-1266.
19. Heneka M., Kummer M., Stutz A., Delekate A., Schwartz S., Vieira-Saecker A., Griep A., Axt D., Remus A., Tzeng T., Gelpi E., Halle A., Korte M., Latz E., Golenbock D. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. Nature. 493(7434):674-678.
20. Hohsfield L., Daschil N., Orädd G., Strömberg I., Humpel C. (2014). Vascular pathology of 20-month-old hypercholesterolemia mice in comparison to triple-transgenic andAPPSwDI Alzheimer's disease mouse models. Mol Cell Neurosci. 63:83-95.
21. Imamoto K., Leblond C. (2004). Presence of labeled monocytes, macrophages and microglia in a stab wound of the brain following an injection of bone marrow cells labeled with 3H-uridine into rats. Journal of comparative neurology 174(2):255-279.
22. Kokovay E., Cunningham L. (2005). Bone marrow-derived microglia contribute to the neuroinflammatory response and express iNOS in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. Neurobiol Dis. 19(3):471-478.
23. Kreutzberg G. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci. 19(8):312-318.
24. Lagasse E., Weissman I. (1996). Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. J Immunol Methods. 197(1-2):139-150.
25. Malm T., Koistinaho M., Muona A., Magga J., Koistinaho J. (2010).The role and therapeutic potential of monocytic cells in Alzheimer's disease. Glia.
26. Maragakis N., Rothstein J. (2006). Mechanisms of Disease: astrocytes in microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science 308:1314–1318.
27. Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. Am J Pathol. 152(1):307-317.
28. Mildner A., Mack M., Schmidt H., Brück W., Djukic M., Zabel M., Hille A., Priller J., Prinz M. (2009). CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. Brain. Sep;132(Pt 9):2487-2500.
29. Naert G., Rivest S. (2013). A deficiency in CCR2+ monocytes: the hidden side of Alzheimer's disease. J Mol Cell Biol. 5(5):284-293.
30. Neher M., Weckbach S., Flierl M., Huber-Lang M., Stahel P. (2011). Molecular mechanisms of inflammation and tissue injury after major trauma--is complement the "bad guy"? J Biomed Sci. 18:90.
31. Neumann H., Kotter M., Franklin R. (2009). Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. Brain : a journal of neurology. 132:288–295.
32. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F. (2005). Resting microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. Nat Rev Neurosci. 15(5):300-312.
33. Qiu W., Walsh D., Ye Z., Vekrellis K., Zhang J., Podlisny M., Rosner M., Safavi A., Hersh L., Selkoe D. (1998). Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. J Biol Chem. 273(49):32730-32738.

34. Qiu W., Ye Z., Kholodenko D., Seubert P., Selkoe D. (1997). Degradation of amyloid beta-protein by a metalloprotease secreted by microglia and other neural and non-neural cells. J Biol Chem. 272(10):6641-6646.
35. Ransohoff R., Perry V. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. Annu Rev Immunol. 27:119-145.
36. Rezai-Zadeh K., Gate D., Szekely C., Town T. (2009). Can peripheral leukocytes be used as Alzheimer's disease biomarkers? Expert Rev Neurother. 9(11):1623-1633.
37. Selkoe D. (2012). Preventing Alzheimer's disease. Science 337(6101):1488-1492.
38. Soheili M., Tavirani M., Salami M. (2011). Clearance of Amyloid Beta Plaques from Brain of Alzheimeric Rats by Lavandula angustifolia. Neuroscience & Medicine 3:362-367
39. Sunderkötter C., Nikolic T., Dillon M., Van Rooijen N., Stehling M., Drevets D., Leenen P. (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. J Immunol. 172(7):4410-4417.
40. Tacke F., Ginhoux F., Jakubzick C., van Rooijen N., Merad M., Randolph G. (2006). Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. J Exp Med. 203(3):583-597.
41. Tacke F., Randolph G. (2006). Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. Immunobiology. 211(6-8):609-618.
42. Thériault P., ElAli A., Rivest S. (2015). The dynamics of monocytes and microglia in Alzheimer's disease. Alzheimers Res Ther 7(1):41.
43. White J., Manelli A., Holmberg K., Van Eldik L., Ladu M. (2005). Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta 1-42 on astrocyte-mediated inflammation. Neurobiol Dis. 18(3):459-465.
44. Wyss-Coray T. (2006). Tgf-Beta pathway as a potential target in neurodegeneration and Alzheimer's. Curr Alzheimer Res. 3(3):191-195.
45. Wyss-Coray T., Loike J., Brionne T., Lu E., Anankov R., Yan F., Silverstein S., Husemann J. (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. Nat Med. 9(4):453-457.
46. Yong V., Rivest S. (2009).Taking advantage of the systemic immune system to cure brain diseases. Neuron. 64(1):55-60.
47. Ziegler-Heitbrock L. (2007). The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. J Leukoc Biol. 81(3):584-592.

2. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՆՊԱՏԱԿՆ ՈՒ ԽՆԴԻՐՆԵՐԸ

1-էջ

- Տվյալ հետազոտության նպատակն է բացահայտել ոսկրածուծի մոնոցիտների ներգրավածությունը ալցհեյմերյան տիպի նեյրոդեգեներատիվ գործընթացում: Այն ուղղված է բացահայտելու, թե ինչ է կատարվում ոսկրածուծի միելոիդային ծիլի հետ նեյրոդեգեներացիայի պայմաններում և արդյոք հնարավոր է, որ ծայրամասային մոնոցիտները գաղթեն գլխուղեղ և «մաքրեն» այն առաջացած Aβ –ից:
- Նպատակին հասնելու համար առաջ են քաշվում հետևյալ խնդիրները.
- նեյրոդեգեներացիայի in vivo մոդելավորում,

- մոդելի ռելեվանտության գնահատում՝ վարքային և մորֆոլոգիական թեստերի հիման վրա
- ոսկրածուծի բջիջների in vitro կուլտիվացիա,
- միելոիդ նախորդող բջիջների *in vitro* աճի խթանում՝ պրոլիֆերացիայի և մակրոֆագ/մոնոցիտ ծիլի բջիջներ տարբերակելու ակնկալիքով,
- մոնոցիտային գաղութների *in vitro* անջատում ու պիտակավորում, դրանց ներփորոքային և ներքթային ճանապարհով ներարկում գլխուղեղ,
- ոսկրածուծից սերված մակրոֆագերի ($CD45^+/CD11b^+/Ly6G^-/CD115^+$)՝ գլխուղեղի թիրախային օջախներում (հոտառական կոճղեզ, հիպոկամպ, ճակատային կեղև) հայտնաբերում
- գլխուղեղում GFAP-, CD-68 հայտնաբերում:

3. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՏԵՍԱԿԸ

ա. փորձարարական

4. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹԵՐԸ ԵՒ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

- հետազոտությունները կատարվելու են սպիտակ արու հասուն առնետների վրա՝ ստացված համալսարանական կենդանանոցից: Կենդանիները տեղավորվում են յուրաքանչյուր վանդակում 4-ական, 12:12 լույս/մութ ցիկլով և կերակրվում ըստ պահանջի: Կենդանիների վրա հետազոտությունները կատարվելու են համաձայն European Communities Council Directive (86/609/EEC), իսկ փորձերի պրոտոկոլները համաձայնեցվում են համալսարանական Էթիկայի Կոմիտեի հետ:
- փորձարարական ԱՀ մոդելավորում ամիլոիդի $A\beta_{1-42}$ ֆրագմենտ, երկաթի սուլֆատ և բութիոնին սուլֆքոսիմին պարունակող լուծույթի ներարկմամբ գլխուղեղի կողմնային փորոքներ ներփորոքային ճանապարհով;
- առնետի ազդրից ոսկրածուծի անջատում և գրանուլոցիտ-մակրոֆագ գործոնի միջավայրում աճեցում,
- ոսկրածուծի կուլտուրայից մոնոցիտների անջատում և դրանց պիտակավորում բրոմդեզօքսիուրիդինով (BrdU),
- պիտակավորված մոնոցիտների ներքթային և ներգանգային ներարկում առնետներին (Imamoto K., Leblond C. 2004; Danielyan L., Schäfer R. et al, 2004.),

- պիտակավորված մոնոցիտների հայտնաբերումը գլխուղեղի տարբեր բաժիններում իմունոհիստաքիմիական մեթոդով՝ կիրառելով $CD45^+/CD11b^+/Ly6G^-/CD115^+$ մարկերները

5. ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ՀԱՄԱՊԱՏԱՍԽԱՆՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԱՍՏԱՏՎԱԾ ԹԵՄԱՅԻՆ 1-էջ

Ամբիոնական գիտական աշխատանքների՝ « » վերնագրով մաս է կազմում

6. ՆԱԽԱԳԾԻ ՎԵՐԱԲԵՐՅԱԼ ՀՐԱՏԱՐԱԿՎԱԾ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ, ԳԻՏԱԿԱՆ ԶԵԿՈՒՅՑՈՒՄՆԵՐ

-

7. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿԱՅՈՒՅՑ

1. Սկզբնաղբյուրների վերլուծություն	2016-2020
2. Հետազոտության մեթոդների տիրապետում	2016-2018
3. Հետազոտությունների նյութերի հավաքում	2017-2019
4. Գիտական հոդվածների հրատարակում	2018-2020
5. Աշխատանքի ձևակերպում	2019-2020
6. Աշխատանքի նախնական փորձաքննություն	2020
7. Ատենախոսության պաշտպանություն	2020

Գիտական ղեկավար՝ _____
ստորագրություն

Հայցորդ՝ _____
ստորագրություն

հեռախոս (093) 86-06-48
(097)26-06-48
e-mail: googakarapetyan@gmail.com