ՀԱՍՏԱՏՎԱԾ Է
ԵՊԲՀ ԳԻՏԱԿՈՈՐԴԻՆԱՑԻՈՆ
ԽՈՐՀՐԴԻ ՆԻՍՏՈՒՄ

ՆԱԽԱԳԱՀ՝ Կ.Գ.Դ., ՊՐՈՖԵՍՈՐ

Կ.Բ. ԵՆԿՈՅԱՆ

_____

Արձանագրություն N _____ “ _____” _____ 201_թ.

Կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման

ատենախոսության

ՊԼԱՆ-ԱՆՈՏԱՑԻԱ

Ասպիրանտ -	Սենիկ Վալերիկի Մատինյան,
	ԵՊԲՀ Նեյրոգիտության լաբորատորիայի կրտսեր գիտաշխատող
Թեզի վերնագիրը -	Ստրիատումի ստիմուլյացիայի դերը կաթված-մակածված նյարդային պրոգենիտոր բջիջների հասունացման գործընթացում
Գիտական ղեկավար	ԵՊԲՀ գիտության գծով պրոռեկտոր
	Կ. Գ. Դ., պրոֆեսոր, Կոնստանտին Բորիսի Ենկոյան
Մասնագիտական դասիչը	Գ.00.04 «Կենսաքիմիա»

2019թ.

1. ԹԵՄԱՅԻ ԱՐԴԻԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆԸ

1.1 Ներածություն

Կաթվածը, որը բնութագրվում է գլխուղեղի արյան շրջանառության սուր խանգարմամբ, հանդիսանում է մահացածության հիմնական պատճառներից մեկը, իսկ հաշմանդամության գլխավոր պատճառը: Քանի որ գլխուղեղի արյան շրջանառության սուր խանգարումների մեծ մասը իշեմիկ բնույթի են, առաջին գիծ է մղվում այսպիսի դեպքերում թիրախային մոտեցման մշակումը, որը կնվազեցնի մահացածությունը, ինչպես նաև կնպաստի կաթվածի հետևանքով հաշմանդամ դարձած մարդկանց ռեաբիլիտացիային և լիարժեք վերադարձին սոցիում:

Առ այսօր առկա բուժման ռադիկալ միջոցներին են դասվում հյուսվածքային պլազմինոգենի ակտիվատորի ներարկումը կամ թրոմբէկտոմիան: Ցավոք, վերոնշյալ միջամտությունները հասանելի են իշեմիկ կաթված ստացած կոնտինգենտի միայն 5%-ին , որը պատճառաբանվում է այսպիսի մեթոդների ինչպես հասանելիությամբ, այնպես էլ կիրառման կարճ թերապևտիկ պատուհանով (Durukan et al., 2007): Այն պացիենտները, ովքեր ժամանակին չեն ստացել համապատասխան բուժում, կամ մահանում են կյանքի համար անհամատեղելի տեղաշարժերի առաջացման հետևանքով, կամ վերականգնվում են՝ որի աստիճանը կախված է մի շարք գործոններից: Այնպիսի գործոններ, ինչպիսիք են ժամանակին պլանավորված ռեաբիլիտացիոն միջոցառումները, շարժողական ակտիվացումը, դեղորայքային համուղղումը այս կամ այն չափով նպաստում են կոգնիտիվ և շարժողական ռեաբիլիտացիային: Վերջին տարիներին լայնորեն քննարկվում է նաև կաթվածի հետևանքով ուղեղի սուբվենտրիկուլյար զոնայում ակտիվացած ցողունային բջիջների թերապևտիկ պոտենցիալը, չնայած այդ բջիջների ինչպես բազմացման, այնպես էլ միգրացիայի և հասունացման աստիճանը մնում են բավականին ցածր : Այս փուլերից յուրաքանչյուրը՝ որպես շղթան ձևավորող կարևոր օղակ ենթակա է առանձին քննարկման:

1.1.1 Պրոլիֆերացիա

Կաթված-ինդուկցված պրոլիֆերացիան սուբվենտրիկուլյար զոնայում (այսուհետ՝ ՍՎԶ) համարվում է ուղեղի պաշտպանական ռեակցիա՝ ուղղված վնասվմանը: Այս գործընթացը՝ կախված մի շարք հանգամանքներից, հանգեցնում է տրամագծորեն տարբեր արդյունքների: Օրինակ, բացահայտվել է ուռուցքի նեկրոզի ֆակտորի բացասական ազդեցությունը ՍՎԶ բջիջների պրոլիֆերացիայի գործընթացում՝ միջին ուղեղային զարկերակի օկլյուզիայով պայմանավորված կաթվածի կենդանական մոդելում (Iosif et al 2008), և ընդակառակը, օրալ ոչ ստերոիդ հակաբորբոքային

դեղամիջոցի ինդոմետացինի՝ խթանիչ ազդեցությունը: (Hoehn et al. 2005): Գիտականորեն փաստարկված է, որ էրիթրոպոետինի ինտրապերիտոնեալ ներարկումը նույնպես ակտիվացնում է այս պրոցեսը: (Wang et al. 2004, Tsai et al. 2006): Նույն էֆֆեկտը դիտվում է նաև գրանուլոցիտ խթանող գործոնիի ենթամաշկային ներարկման դեպքում (Zhang et al. 2001, Kawada et al. 2006). Գործոնների ցանկը, որոնք այս կամ այն կերպ ազդում են այս պրոցեսի վրա ընդգրկում են նաև Brain-derived neurotrophic factor(BDNF)-ը, Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)-ը, cerebrolysin-ը, citicoline-ը, ինչպես նաև ֆիզիկական ակտիվությունը և էլեկտրական ստիմուլյացիան: (Kobayashi et al. 2006, Keiner et al.2009, Zhang et al., 2010, Diederich et al. 2012, Zhang et al. 2013 and Liu et al. 2013.): Հիմնական մեխանիզմը կապված է NOTCH ազդակային մեխանիզմի ապաակտիվացման և հետագա sonic hedgehog-ի ակտիվացման հետ (Nyfeler et al. 2005, Androutsellis-Theotokis et al. 2006, Wang et al. 2006a and 2006b).

1.1.2 Միգրացիա

Կաթված մակածված փոփոխությունները, ինչպիսիք են ռեակտիվ աստրոգլիոզը, միկրոգլիայի և էնդոթելիալ բջիջների ակտիվացումը, միջնորդավորում են քեմոկինների, աճի գործոնների և մետաղ-պրոտեինազների արտազատումը: Այս պրոցեսները, զուգակցված նեռանգիոնեգենզի հետ, ոչ միայն նպաստում են ցողունային բջիջների պրոլիֆերացիային, այլ նաև ուղղորդում են նրանց դեպի իշեմիկ օջախ: (Robin et al., 2006): Հետազոտությունները վկայում են միգրացիայից հետո այս բջիջների հասունացման և ԳԱԿԹ-երգիկ, խոլիներգիկ նեյրոնների, ինչպես նաև տարատեսակ ինտերնեյրոնների վերածման մասին (Hou et al., 2008, Marin et al., 2000). Ցույց է տրվել ՍՎՋ-ի Brdu - նշակրված բջիջների միգրացիան դեպի ստրիատում (Parent et al., 2002): Բջիջ-սպեցիֆիկ վիրուսային ինֆեկցման մեթոդով հայտնաբերվել են GFAP - էքսպրեսող բջջային ագրեգատներ ստրիատումում, որոնք մորֆոլոգիապես նման են ՍՎՋ բջիջներին: (Yamashita et al., 2006): Այլ հետազոտությամբ ցույց է տրվել կաթված-ինդուկցված նեյրոբլաստները էքսպրեսում են calretinin, ինչը վկայում է նրանց հնարավոր հասունացման պոտենցիալի մասին (Liu et al., 2009): Teramoton-ն և համահեղինակները ցույց են տվել, որ parvalbumin էքսպրեսող նեյրոբլաստների ավելի քան 20 տոկոսը փոխարինվում են ինտերնեյրոնների (Teramoto et al., 2003):

1.1.3 Հասունացում

Նեյրոգենեզի յուրաքանչյուր փուլում տեղի է ունենում նոր առաջացող բջիջների կորուստ, որը կրիտիկական է հատկապես վերջին՝ նեյրոնալ հասունացման և ինտերգրացիայի փուլում (Luis Federico Bátiz et al. 2016, Jianfei Lu et al. 2017): Ըստ հետազոտություններից մեկի, նոր առաջացած նեյրոնների ավելի քան 80%-ը մահանում են իշեմիկ վնասումից հետո երկու շաբաթվա ընթացքում: (Arvidsson et al.

2002)։ Միկրոշրջապատը, ինչպես նաև ներքին ազդակային մեխանիզմներն են այն հիմնական ուղենիշները, որոնք «որոշում» են նեյրոնի ճակատագիրը։ Մասնավորապես NMDA ռեցեպտորներով միջնորդավորված գլուտամատային ազդակները, CREB1 ֆոսֆորիլացումը, BDNF և mTOR ազդակային մեխանիզմները նպաստում են նեյրոնների գոյատևմանը։ (Ulrich Pfisterer & Konstantin Khodosevich, 2017). Կաթվածի դեպքում միկրոշրջավայրում նեյրոտրոֆիկ ֆակտորների պակասի կոմպենսացումը, բորբոքային կասկադի ինհիբիցիան կարող են նպաստել նոր առաջացող նեյրոնների ապրելիության ինդեքսի բարձրացմանը (Jianfei Lu et al. 2017)։

1.2 Ստիմուլյացիայի դերը հետկաթվածային նեյրոգենեզում

Վերջին տարիներին գնալով ավելի է կարևորվում բուժման ոչ դեղորայքային մեթոդների կիրառությունը հետինֆարկտային էֆֆեկտիվ ռեաբիլիտացիոն մեխանիզմերի մշակման հարցում։ Մասնավորապես արված հետազոտությունները ցույց են տալիս, որ քրոնիկ ստիմուլյացիան նպաստում է նոր արաջացած նեյրոնալ գծերի հասունացմանը։ Այս նպատակով մինչ այժմ կիրառվել են տրանսկրանիալ ուղղակի ստիմուլյացիան, ինչպես նաև ուղղակի էպիդուրալ ստիմուլյացիան։ Toda et al. ցույց են տվել մեկ ժամ տևողությամբ բարձր հաճախության ստիմուլյացիայի դրական ազդեցությունը թալամուսի առաջնային կորիզի վրա (Toda et al., 2008)։ Էլեկտրական ազդակները ակտիվացրել են նեյրոգենեզը հիպոկամպում, ինչպես նաև համակշռել գլյուկոկորտիկոիդ-ինդուկցված նեյրոգենեզի սուպրեսիային։ Morimoto et al. ցույց են տվել, որ ստրիատումի ստիմուլյացիան կարող է նպաստել կաթված-հարուցված նեյրոնալ փոփոխությունների դրական դինամիկային միջին ուղեղային զարկերակի խցանումից մեկ ամիս հետո (Morimoto et al., 2011)։ Կան նաև առաջնային տվյալներ ուղեղի խոր խթանման միջոցով ցողունային բջիջների՝ դեպի վնասված օջախ գաղթի և հասունացման վերաբերյալ։ ՄԵխանիզմներից է նաև կոնտրալատերալ գերակտիվ կիսագնդի ակտիվության ճնշումը, որը բերում է վնասված իպսիլատերալ հատվածի գրգռականության բարձրացման։ (Plow et al., 2009).

1.3 Ժամանակակից գրականության քննադատական վերլուծություն

Striatal Stimulation Nurtures Endogenous Neurogenesis and Angiogenesis in Chronic-Phase Ischemic Stroke Rats

Հետազոտության նպատակը կաթվածի քրոնիկ փուլումտրիատալ ստիմուլյացիայի (SS) ազդեցության ուսումնասիրումն ՍՎԶ-ում առկա ցողունային բջիջների վրա։ Միջին ուղեղային զարկերակի խցանում (MCAO) մոդելավորելուց 1 ամիս անց Wistar առնետներին 1 շաբաթ շարունակ ենթարկել են ցածր հաճախությամբ ստրիատալ ստիմուլյացիայի։ Ազդեցության արդյունավետությունը ստուգելու համար

իրականացվել են վարքային թեստեր, ՄՌՇ հետազոտություններ և հիստոքիմիական վերլուծություն: Ստացված տվյալները վկայում են այն մասին, որ SS-ը փոքրացնում է կաթվածի ծավալը, խթանում է նյարդային ցողունային բջիջների պրոլիֆերացիան, միգրացիան դեպի վնասված օջախ և տարբերակումը, ճնշում է մակրոֆագերի ակտիվացումը և նպաստում կենդանու շարժողական ակտիվության վերականգնմանը:
Թեև այս հետազոտությունը փաստում է ՍՍ-ի դրական ազդեցության մասին, սակայն այն չի կոնկրետացնում մի շարք այնպիսի հարցեր, ինչպիսիք են էլեկտրական ստիմուլյացիան սկսելու առավել նպատակահարմար ժամանակն ու ազդեցության օպտիմալ տևողությունը: Նույնքան կարևոր են նաև ստիմուլյացիայի հաճախության և տեղամասի որոշումը: Նախկին հետազոտություններում կիրառված 100 Հց հաճախությունն ունեցել է ոչ թե ստիմուլացնող, այլ, ընդհակառակը, ճնշող ազդեցություն: Նշված հետազոտության մեջ կատարվել է ինտրապարենքիմալ ստիմուլյացիա 2 Հց հաճախությամբ: Հայտնի են նաև նեյրոգենեզի պրոցեսում աճի գործոններ VEGF-ի, GDNF-ի, BDNF-ի, ընկերքային աճի գործոնի՝ PlGF-ի մասնակցության բազմաթիվ փաստեր: Նշված հետազոտության ընթացքում դիտարկվել են միայն VEGF-ի և GDNF-ի քանակությունների փոփոխությունները: Չբացահայտված հարցերից է նաև SS-ի հակաբորբոքային ազդեցության մեխանիզմը: SS-ով հարուցված VEGF-ի և GDNF-ի մեծ քանակներն ունեն հակառակ ազդեցություններ: Մասնավորապես 1-ինը խթանում, իսկ 2-րդը ճնշում է միկրոգլիայի ակտիվությունը, հետևաբար նաև բորբոքային երևույթների զարգացումը: Առաջիկայում պլանավորվող հետազոտական աշխատանքները նպատակաուղղված են աճի գործոնների, հակաբորբոքային մեխանիզմների ավելի մանրամասն պարզաբանմանը, SS-ի կաթվածի ենթասուր շրջանում ունցած ազդեցության ուսումնասիրությանը, ինչպես նաև ստիմուլյացիայի արդյունավետության գնահատմանը:

2. Հետազոտության նպատակն ու խնդիրները

Հետազոտության **նպատակն** է պարզել ստրիատումի ստիմուլյացիայի դերը կաթված-մակածված նյարդային պրոգենիտոր բջիջների հասունացման գործընթացում:

Հետազոտության հիմնական խնդիրներն են.

1. Ուղեղի խոր խթանման համար համակարգի և ալգորիթմի մշակում
2. Նեյրոգենեզի գործոնների (Nestin, Vimentin, SOX2, Ascl1, Doublecortin, Neun) որոշում ուղեղի սուբվենտրիկուլյար զոնայում և ստրիատումում:

3. Աճի գործոնների(Brain-derived neurotrophic factor(BDNF), Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), Vascular endothelial growth factor(VEGF)) որոշում ուղեղի սուբվենտրիկուլյար զոնայում և ստրիատումում
4. Ապոպտոզոի մարկերների (Bax ,Bcl) որոշում ուղեղի սուբվենտրիկուլյար զոնայում և ստրիատումում :
5. Միկրոգլիայի ակտիվության գնահատում (Iba-1 և laminine-իմմունոդրական) ուղեղի սուբվենտրիկուլյար զոնայում և ստրիատումում
6. Brdu, Brdu/DCX և Brdu/MAP2B դրական բջիջների հայտնաբերումը ՍՎԶ-ում և ստրիատումում իմմունոֆլուորեսցենցիայի եղանակով:
7. Համեմատական անալիզ վարքային տեղաշարժերի հետ
8. Ստացված տվյալների վրա առավել էֆֆեկտիվ ալգորիթմների մշակում:

3. **Հետազոտության տեսակը՝**

փորձարարական

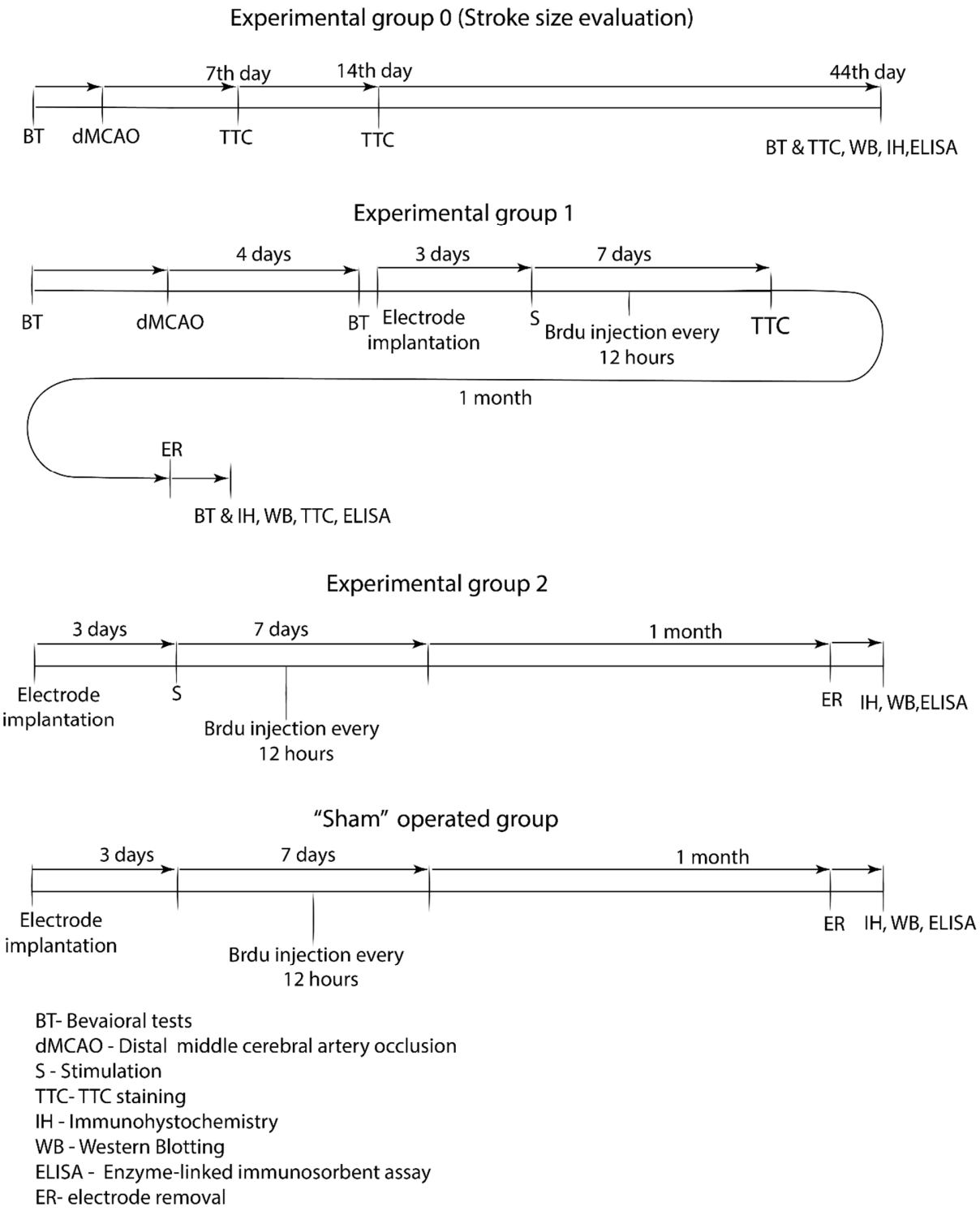
4. **Հետազոտության նյութը և մեթոդները**

4.1 **Հետազոտության նյութը**

Հետազոտությունները կատարվելու են սպիտակ արու առնետների վրա (180-210 գ քաշով): Կենդանիները տրամադրվելու են ԵՊԲՀ վիվարիումի կողմից:

4.2 Հետազոտության մեթոդները

- Հետազոտության էքսպերիմենտալ դիզայն



Նկար 1.

- Կաթվածի մոդելավորում

Կիրառվելու է միջին ուղեղային զարկերակի դիստալ սեգմենտի (ներքին ուղեղային զարկերակից դիստալ) կոագուլյացիայի մոդելը:

- Ուղեղի խոր խթանման համար էլեկտրոդների պատրաստում

Օգտագործվելու են վոլֆրամի՝ պոլիիմիդով ինսուլացված մինչև 200 մկմ հաստությամբ հաղորդիչներ: Հաղորդիչները հատուկ պտուտակի միջոցով փաթաթվում են իրար շուրջ և միացվում էլեկտրոդի համար նախատեսված ինտերֆեյսին: Այնուհետև ինտերֆեյսը միացվում է ստիմուլյացիայի համակարգին: Ստիմուլյացիայի համակարգը մշակվել է ANEL գիտահետազոտական կենտրոնում: Այն ներառում է PXI -4130 գերճշգրիտ համակարգը: Տրվող հոսանքի պարամետրերն են: 2Հց, 100 մԱ:

- Մինիմալ ինվազիվ վիրահատության մշակում

Էլեկտրոդները ստերեոմանրադիտակի օգնությամբ ստերեոտաքսիկ սարքավորման միջոցով պետք է իջեցվեն կենդանու ստրիատալ զոնա՝ միջին ուղեղային զարկերակի օկլյուզիայից 7 օր անց: Էլեկտրոդների տեղադրման կոորդինատներ՝ բրեգմայից 1մմ առաջ, 3,5 մմ լատերալ և 4 մմ խոր:

Ապահովվելու է էթիկական նորմերին համապատասխան անէսթեզիա և անալգեզիա:

- Ստրիատումի ստիմուլյացիա

Ստիմուլյացիան կաթվածի ենթարկված կենդանիների խմբում տրվելու է միջին ուղեղային զարկերակի կոագուլյացիայից յոթ օր անց՝ մեկ շաբաթ տևողությամբ: Օրվա չափաբաժինը՝ 1 ժամ:

Կենսաքիմիական հետազոտության մեթոդները

- Հյուսվածքային հոմոգենատի սուպերնատանտի պատրաստում.

Պրեպարատի պատրաստում Ստրիատումը և հարփորոքային զոնան առանձնացնում են ըստ անատոմիական կառուցվածքի, կշռում և Պոտտերի ապակյա հոմոգենիզատորում սառը պայմաններում (սառույցի վրա) հոմոգենիզացնում են (հարաբերությունը 1:30) բուֆեր 1-ում և բուֆեր 2 - ում, համապատասխանաբար հետագա իմմունոֆերմենտային անալիզի և իմմունոբլոտինգի համար: Հոմոգենատը ցենտրիֆուգում են 15000պտույտ / րոպե արագությամբ , t=4°C, 20 րոպե տևողությամբ:Ստացված սուպերնատանտները օգտագործվում են աճի գործոնները (BDNF, GDNF, VEGF), նեյրոգենետիկ (DCX, Ascl1, Nestin, Vimentin, SOX2,) ապոպտոտիկ և հակաապոպտոտիկ մարկերները որոշելու համար (Bax, Bcl) Բուֆեր 1: 50 մՄ Tris- HCl,1% Triton X-100, պրոտեազաների ինհիբիտոր (1 դեղahաբը 50 մլ լուծույթի համար), pH7.2-7.6 Բուֆեր 2: 20 մՄ Tris- HCl, 150 մՄ NaCl , 2 մՄ ԷԴՏԱ, 1% Triton X-100, պրոտեազաների ինհիբիտոր (1 դեղահաբը 50 մլ լուծույթի համար), pH7.2-7.6

- Նեյրոգենեզի ֆակտորների և ապոպտոզի մարկերների որոշում Վեստերն բլոտտինգի եղանակով ըստ սխեմայ (Նկար 1).

Վերը նշված սպիտակուցների դետեկցիայի համար օգտագործվում է իմմունոբլոտինգի քանակական որոշման մեթոդը:

Իմմունոբլոտի առաջին փուլում սպիտակուցները բաժանվում են էլեկտրոֆորեզի եղանակով 12,5% պոլիակրիլամիդային գելում, հետո կատարում են սպիտակուցների տրանսֆերնիտրոցելյուլոզային թաղանթի վրա:
Հետազոտվող սպիտակուցների իմմունոբլոտինգը շարունակվում է՝ կատարվում է թաղանթի ինկուբացիա առաջնային հակամարմինների լուծույթում՝ հրահանգներում նշված տևողությամբ: Երկրորդային հակամարմիններով ինկուբացիայից հետո, պիտակավորված ծովաբողկի պերօքսիդազով կամ ֆլյուրոսցենտային ներկերով,կիրականացվի դետեկցիա քեմիլյումինիսցենտային կամ ֆլյուրոսցենտային ազդակով՝ Fusion FX գել դոկումենտացնող համակարգի միջոցով :

- Աճի գործոնների որոշում ELISA եղանակով.

Աճի գործոնները որոշվելու են ՍՎԶ-ում և ստրիատումում ըստ սխեմայի: Ակնկալվում է որոշել

1. Brain-derived neurotrophic factor(BDNF)
2. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)
3. Vascular endothelial growth factor(VEGF)

աճի գործոնները:

Իմմունոֆերմենտային անալիզի համար օգտագործվելու են կոմերցիոն հավաքածուներ: Սրվակի մակերեսը այս դեպքում աբսորդված է սպեցիֆիկ սպտակուցի հանդեպ հակամարմիններով: Կալորիմետրիկ չափումը իրականացվելու է Multiscan Go սպեկտրոֆոտոմետրի օգնությամբ:

Մորֆոլոգիական հետազոտության մեթոդներ

- Պրոլիֆերացիայի մակարդակի գնահատում իմունոմորֆոլոգիական ներկման միջոցով
    1. Brdu և Brdu/DCX Brdu/MAP2B դրական բջիջների հայտնաբերումը ՍՎԶ-ում և ստրիատումում :
    2. Լամինին դրական ստրուկտուրաների գնահատում վերոնշյալ զոնաներում:
    3. Iba1 ներկում՝ միկրոգլիայի ակտիվացումը վերոնշյալ զոնաներում գնահատելու համար

Դեպարաֆինիզացիա և ռեհիդրատացիայից հետո ապակիները թրջվում են լիմոնաթթվի աշխատանքային բուֆերով և տեղադրվում միկրոալիքային վառարանում: Կատարվում է բլոկինգ 5% BSA-ով: Առաջնային հակամարմինները նոսրացվում են 1% BSA/PBS լուծույքում և ավելացնելով ապակիներին՝ կատարում ինկուբացիա: Նույնը՝ համապատասխան կոնցետրացիաներով կատարվում է երկրորդային հակամարմիններով: Վերջում կատարվում է դետեկցիա: Այն կատարվելու է EVOS համակարգի միջոցով:

- **Ինֆարկտի ծավալի գնահատում TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) ներկման միջոցով:**

Ինֆարկտի ծավալը որոշելու համար կատարվելու է դեկապիտացիա առանց պերֆուզիայի՝ անեսթեզիայով: Ուղեղները հեռացվում են շատ արագ և տեղափոխվում սառնարան 0 °C ջերմաստիճան 10 րոպեով, հետո կտրտում են 6 մասերի, շերտի հաստությունը՝ 2mm: Ուղեղի կտորները 10 րոպեով ընկղմվում են 2% TTC-ի մեջ՝ սենյակային ջերմաստիճանում (22-24): TTC ներկված ուղեղի կտորները պոստֆիքսվում են 4% -ոց պարաֆորմալդեհիդի լուծույթի մեջ ամբողջ գիշերը: ՈՒղեղի կտորները ներկելուց և պոստֆիքսացիայից հետո սկանավորում են:

- **Կեղևի արյան շրջանառության անկման գնահատում speckle imaging - ի միջոցով:**

Կարմիր տիրույթի լազերը անկյան տակ ընկնելով կենդանու գագաթային շրջանում տեղադրված պատուհանի վրա, անդրադարձվում է դեպի օբյեկտիվ, իսկ ցրման աստիճանը կախված է այդ կետում առկա արյան հոսքի ինտենսիվությունից: Ստացված պատկերը վերլուծվում է ImageJ հատուկ ալգորիթմի միջոցով:

Վարքային թեստեր

Օգտագործվելու է վարքային թեստերի հետևյալ մարտկոցը՝

- Novel object recognition test
- Limb placement test
- Cylinder test

Վերլուծությունը իրականացվելու է Anymaze ծրագրային փաթեթով:

Անհրաժեշտ նյութեր և սարքավորումներ

STG4000 սերիայի ստիմուլյացիայի համակարգ	1	Նախատեսված է ճշգրիտ պարամետրով ստիմուլյացիա իրականացնելու համար
Anymaze	1	Նախատեսված է վարքային թեստերի վերլուծության համար
Գազ անէսթեզիայի համակարգ	1	Մեկ կամ մի քանի , մինչև 7 կգ կշռող կենդանու իզոֆլյոորանով անէսթեզիայի սարք
Թվային ստերերոտաքսի համակարգ ներարկման հնարավորությամբ	1	Համակարգը բաղկացած է՝ 1) ուլտրաճշգրիտ թվային նոր ստանդարտ ստերեոտակսիկ սարքից, 2) ստերեոտակսիկ սարքին ամրացվող ստերեոտակսիկ ներարկումների համար նախատեսված շարժիչից, 3) ստերեոտակսիկ սարքին ամրացվող միկրոշարժիչային գայլիկոնիչից համապատասխան փորիչներով, 4)

		ստերեոտակսիկ սարքին ամրացվող ԼԵԴ լուսային լամպից՝ նախատեսված ստերեոտակսիկ վիրահատությունների համար, 5) կարգավորվող տաքացնող համակարգից Ուլտրաճշգրիտ թվային նոր ստանդարտ ստերեոտակսիկ սարք՝ նախատեսված մկների և առնետների համար:
Լաբորատորային կենդանու ոչ ինվազիվ ճնշաչափ (A non-invasive blood pressure controller)	:1	Նախատեսված է 8գ մկանից մինչեվ 950 գ առնետի զարկերակային ճնշման ոչ ինվազիվ չափման համար: Չափում է սիստոլիկ, դիաստոլիկ ճնշումները, միջին ճնշումը, սրտի կծկումների թիվը, պոչի արյան հոսքի արագությունը
Լաբորատորային կենդանու սրտի զարկերի և թթվածնային հագեցվածության գնահատման մոնիտոր (Pulse Oximeter and Heart Rate Monitor)	1	Չափում է լաբորատորային կենդանու արյան թթվածնային հագեցվածությունը, շնչառության ռիթմը, սրտի զարկերի թիվը: MouseSTAT կամ համարժեք
Multiscan Go սպեկտրոֆոտոմետր	1	Նախատեսված է սպիտակուցների քանակական չափման համար
EVOS համակարգ	1	Նախատեսված է իմմունոմորֆոլոգիական հետազոտությունների համար
Լազեր դոպլեր հոսքի գրացման համակարգ Laser Doppler flowmeter	Արյունքահոսքը՝ լազեր դոպլեր մեխանիզմով աշխատող գրանցող սարք moorVMS-LDF կամ համարժեք	Նախատեսված է սպիտակուցների քանակական չափման համար
Դիաթերմոկագուլյատոր	1	Նախատեսված է անոթի կոագուլյացիայի համար
Fusion FX գել դոկումենտացնող համակարգ	1	Նախատեսված է իմմունոբլոտինգի համար
Նիկել/քրոմ-մեկուսացված լար(Nickel/Chromium - Insulated Wire)	փաթեթ (50մ)	Նախատեսված է ստիմուլյացիայի համար
Էլեկտրոդ	հավաքածու(100 հատ)	Նախատեսված է ստիմուլյացիայի համար

Ստերեոմանրադիտակ	1 հատ	Նախատեսված է վիրահատական միջամտություն իրականացնելու համար
2,3,5-թրիֆենիլտրետազոլի քլորիդ	սրվակ՝ 100 գ պարունակությամբ	Նախատեսված է կաթվածի ծավալը գնահատելու համար
BDNF-ELISA Kit	հավաքածու	3, յուրաքանչյուրը նախատեսված 96 նմուշի ստուգման համար
GDNF- Elisa Kit	հավաքածու	3, յուրաքանչյուրը նախատեսված 96 նմուշի ստուգման համար
VEGF- Elisa Kit	հավաքածու	3, յուրաքանչյուրը նախատեսված 96 նմուշի ստուգման համար
Հակա ASCl-1 առաջնային հակամարմին	մլ	1
Հակա Neun առաջնային հակամարմին	մլ	1
Հակա Vimentin առաջնային հակամարմին	մկլ	500
Հակա Nestin առաջնային հակամարմին	մկլ	500
Հակա Doublecortin առաջնային հակամարմին	մկլ	500
Հակա Sox2 առաջնային հակամարմին	մկլ	300
Հակա Bax առաջնային հակամարմին	μg	300
Հակա Bcl-XL առաջնային հակամարմին	մկլ	500
Հակա MAP2B և MAP2A առաջնային հակամարմին	μg	300
Հակա լամինին առաջնային հակամարմին	մկլ	250
Հակա Iba1 առաջնային հակամարմին	մկլ	500

5. ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ՀԱՄԱՊԱՏԱՍԽԱՆՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԱՍՏԱՏՎԱԾ ԹԵՄԱՅԻՆ

5.1 Աշխատանքը համահունչ է ԵՊԲՀ Գիտակոորդինացիոն խորհրդի կողմից հաստատված գիտական գերակա ուղղություն ընտրված Նեյրոգիտությանը և ուղեղի հիմնարար հետազոտություններին:

5.2 Աշխատանքը ամբողջությամբ իրականացվելու է ասպիրանտի կողմից:

6. Կրթական ծրագրերի ԺԱՄԱՆԱԿԱՑՈՒՅՑ

Կրեդիտային համակարգով դասընթացներ,քննություններ		Քանակ	Ժամանակահատված Աշուն/գարուն
1.	Ընդհանուր կրթական դասընթացներ	20 կրեդիտ	
2.	Մասնագիտական դասընթացներ	20 կրեդիտ	
3.	Որակավորման քննություն		

7. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿԱՑՈՒՅՑ

Ուսումնառության ժամանակաշրջանում անհրաժեշտ գործառույթներ		Ժամանակաշրջան
1.	Սկզբնաղբյուրների վերլուծություն	2018թ. դեկտեմբեր-2019թ.փետրվար
2.	Հետազոտության մեթոդների տիրապետում	2019թ. փետրվար- 2019թ. հուլիս
3.	Ընթացիք ատեստավորում (1)	2019
4.	Հետազոտությունների նյութերի հավաքում	2019թ. հուլիս - 2021թ. հուլիս
5.	Ընթացիք ատեստավորում (2)	2020
6.	Գիտական հոդվածների հրատարակում	2021թ. -2022թ.
7.	Ընթացիք ատեստավորում (3)	2021
8.	Սեփական հետազոտությունների արդյունքների հիման վրա Web of Science շտեմարանի Thomson Reuters կազմակերպության ազդեցության գործակից ունեցող ամսագրում գիտական հոդված	2022 թ.
9.	Աշխատանքի ձևակերպում	2021թ.հուլիս-2022թ.ապրիլ
10.	Ամփոփիչ ատեստավորում	2022
11.	Զեկույցների ներկայացում	2019թ., 2020թ., 2021թ.
12.	Գործուղումներ	2021թ., 2022թ.
13	Աշխատանքի նախնական փորձաքննություն	2022թ. մայիս
14	Ատենախոսության պաշտպանություն	2022թ. նոյեմբեր

8. Նախագծի վերաբերյալ աշխատանքներ, գիտական զեկուցումներ

- Low-cost Electrode Arrays for Recordings of Neural Activity. Serob Muradyan, Amalya Hakobyan, Lusine Hovhannisyan, Sensors & Transducers, Vol. 220, Issue 2, February 2018, pp. 45-50.

- Design of an Electrical Circuit for Local Field Potential Conditioning. A.H. Hakobyan, L.E. Hovhannisyan, A.S. Alaverdyan, A.H. Yarijanyan Namagerdi, S.V. Matinyan, M.R. Movsisyan, K.B. Yenkoyan, S.T. Muradyan, National Polytechnic University of Armenia Bulletin Collection of Scientific Papers, 2017, Yerevan

9. Օգտագործված գրականության ցանկ

1. Iosif RE, Ahlenius H, Ekdahl CT, Darsalia V, Thored P, Jovinge S, Kokaia Z, Lindvall O. 2008. Suppression of stroke-induced progenitor proliferation in adult subventricular zone by tumor necrosis factor receptor 1. J Cereb Blood Flow Metab 28: 1574–1587.
2. Hoehn BD, Palmer TD, Steinberg GK. 2005. Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin. Stroke 36: 2718–2724.
3. Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, Liu X, Wu H, Carmichael ST. 2006. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. J Neurosci 26: 1269–1274.
4. Wang L, Zhang Z, Zhang R, Hafner MS, Wong HK, Jiao Z, Chopp M. 2004. Erythropoietin up-regulates SOCS2 in neuronal progenitor cells derived from SVZ of adult rat. Neuroreport 15: 1225–1229.
5. Zhang R, Zhang L, Zhang Z, Wang Y, Lu M, Lapointe M, Chopp M. 2001. A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats. Ann Neurol 50: 602–611.
6. Kawada H, Takizawa S, Takanashi T, Morita Y, Fujita J, Fukuda K, Takagi S, Okano H, Ando K, Hotta T. 2006. Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic neural stem/progenitor cells and transition of bone marrow derived neuronal cells. Circulation 113: 701–710.
7. Kobayashi T, Ahlenius H, Thored P, Kobayashi R, Kokaia Z, Lindvall O. 2006. Intracerebral infusion of glial cell line derived neurotrophic factor promotes striatal neurogenesis after stroke in adult rats. Stroke 37: 2361–2367.
8. Keiner S, Witte OW, Redecker C. 2009. Immunocytochemical detection of newly generated neurons in the perilesional area of cortical infarcts after intraventricular application of brain-derived neurotrophic factor. J Neuropathol Exp Neurol 68: 83–93.
9. Zhang C, Chopp M, Cui Y, Wang L, Zhang R, Zhang L, Lu M, Szalad A, Doppler E, Hitzl M, Zhang ZG. 2010. Cerebrolysin enhances neurogenesis in the ischemic brain and improves functional outcome after stroke. J Neurosci Res 88: 3275–3281.
10. Diederich K, Frauenknecht K, Minnerup J, Schneider BK, Schmidt A, Altach E, Eggert V, Sommer CJ, Schabitz WR. 2012. Citicoline enhances neuroregenerative processes after experimental stroke in rats. Stroke 43: 1931–1940.

11. Zhang L, Hu X, Luo J, et al. Physical exercise improves functional recovery through mitigation of autophagy, attenuation of apoptosis and enhancement of neurogenesis after MCAO in rats. BMC Neurosci. 2013;14:46.
12. Liu XS, Chopp M, Wang XL, Zhang L, Hozeska-Solgot A, Tang T, Kassis H, Zhang RL, Chen C, Xu J, Zhang ZG. 2013. MicroRNA-17-92 cluster mediates the proliferation and survival of neural progenitor cells after stroke. J Biol Chem 288: 12478–12488.
13. Nyfeler Y, Kirch RD, Mantei N, Leone DP, Radtke F, Suter U, Taylor V. 2005. Jagged1 signals in the postnatal subventricular zone are required for neural stem cell self-renewal. EMBO J 24: 3504–3515.
14. Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, Hoeppner DJ, Ravin R, Poser SW, Rueger MA, Bae SK, Kittappa R, McKay RD. 2006. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. Nature 442: 823–826.
15. Wang L, Chopp M, Zhang RL, Zhang L, Letourneau Y, Feng YF, Jiang A, Morris DC, Zhang ZG. 2009a. The Notch pathway mediates expansion of a progenitor pool and neuronal differentiation in adult neural progenitor cells after stroke. Neuroscience 158: 1356–1363.
16. Wang X, Mao X, Xie L, Greenberg DA, Jin K. 2009b. Involvement of Notch1 signaling in neurogenesis in the subventricular zone of normal and ischemic rat brain in vivo. J Cereb Blood Flow Metab 29: 1644–1654.
17. Robin, A. M., Zhang, Z. G., Wang, L., Zhang, R. L., Katakowski, M., Zhang, L., … Chopp, M. (2006). Stromal cell-derived factor 1 a mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia, 125–134.
18. Parent, J. M., Vexler, Z. S., Gong, C., Derugin, N., & Ferriero, D. M. (2002). Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Annals of Neurology*, *52*(6), 802–813.
19. Yamashita, T., Ninomiya, M., Hernandez Acosta, P., Garcia-Verdugo, J. M., Sunabori, T., Sakaguchi, M., … Sawamoto, K. (2006). Subventricular Zone-Derived Neuroblasts Migrate and Differentiate into Mature Neurons in the Post-Stroke Adult Striatum. *Journal of Neuroscience*, *26*(24), 6627–6636.
20. Liu, F., You, Y., Li, X., Ma, T., Nie, Y., Wei, B., … Yang, Z. (2009). Brain Injury Does Not Alter the Intrinsic Differentiation Potential of Adult Neuroblasts, *29*(16), 5075–5087.
21. Teramoto, T., Qiu, J., Plumier, J., & Moskowitz, M. A. (2003). EGF amplifies the replacement of parvalbumin-expressing striatal interneurons after ischemia, *111*(8), 1125–1132.
22. Arvidsson, A. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke.
23. Pfisterer, U. and Khodosevich, K. (2017). Neuronal survival in the brain: neuron type-

specific mechanisms. *Cell Death & Disease*, 8(3), pp.e2643-e2643.

24. Lu, J., Manaenko, A. and Hu, Q. (2017). Targeting Adult Neurogenesis for Post Stroke Therapy. *Stem Cells International*, 2017, pp.1-10

25. Toda, H., Hamani, C., Fawcett, A. P., Hutchison, W. D., & Lozano, A. M. (2008). The regulation of adult rodent hippocampal neurogenesis by deep brain stimulation. *Journal of Neurosurgery*, *108*(1), 132–138.
26. Plow, E. B., Carey, J. R., Nudo, R. J., & Pascual-Leone, A. (2009). Invasive cortical stimulation to promote recovery of function after stroke: A critical appraisal. *Stroke*, *40*(5), 1926–1931.
27. Morimoto, T., Yasuhara, T., Kameda, M., Baba, T., Kuramoto, S., Kondo, A., … Date, I. (2011). Striatal stimulation Nurtures endogenous neurogenesis and angiogenesis in chronic-phase ischemic stroke rats. *Cell Transplantation*, *20*(7), 1049–1064

28. Sharifi K, Morihiro Y, Maekawa M, Yasumoto Y, Hoshi H, Adachi Y, Sawada T, Tokuda N, Kondo H, Yoshikawa T et al.: FABP7 expression in normal and stab-injured brain cortex and its role in astrocyte proliferation. Histochem Cell Biol 2011, 136:501-513

29. Niu W, Zang T, Zou Y, Fang S, Smith DK, Bachoo R, Zhang CL: In vivo reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain. Nat Cell Biol 2013, 15:1164-1175.

30. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. Pharmacol Biochem Behav. 2007;87(1):179-97.

Գիտական ղեկավար՝ _____

Հայցորդ՝ _____ Ս.Վ. Մատինյան

Հեռախոս:. 055220144/077014412

e-mail: senik.matinyan@gmail.com