ՀԱՍՏԱՏՎԱԾ Է

ԵՊԲՀ ԳԻՏԱԿՈՈՐԴԻՆԱՑԻՈՆ

ԽՈՐՀՐԴԻ ՆԻՍՏՈՒՄ

ՆԱԽԱԳԱՀ՝ Կ.Գ.Դ., ՊՐՈՖԵՍՈՐ

Կ.Բ. ԵՆԿՈՅԱՆ

_____

Արձանագրություն N _____ “ _____” _____ 20__թ.

Բժշկական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՊԼԱՆ-ԱՆՈՏԱՑԻԱ

Հայցորդ -	Էլլա Արայի Բաղդասարյան ԵՊԲՀ Նեյրոգիտության լաբորատորիայի ասպիրանտ
Թեզի վերնագիրը -	«Վալպրոյաթթվով միջնորդավորված սինապտոգենեզի որոշ փոփոխությունների ուսումնասիրումը աուտիզմի պրե- և պոստնատալ կենդանական մոդելներում»
Գիտական ղեկավար	Բ. Գ. Դ., պրոֆեսոր Կոնստանտին Բորիսի Ենկոյան, ԵՊԲՀ գիտության գծով պրոռեկտոր, ՈՒՀՀԳԿ կենտրոնի գլխավոր գիտնական
Մասնագիտական դասիչը	**Գ.00.04 «Կենսաքիմիա»**

2024թ.

1. ԹԵՄԱՅԻ ԱՐԴԻԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆԸ

1.1. Ներածություն

Ամերիկյան հոգեբուժության ասոցիացիան սահմանում է աուտիստիկ սպեկտրի խանգարումները որպես նեյրոզարգացման հիվանդություններ, որոնց դեպքում խանգարվում է սոցիալական շփումը, առկա են արտահայտված կրկնվող վարքագիծ, սահմանափակ հետաքրքրություններ և նույնը անելու ձգտում:(1)

Միջինացված տվյալներով աշխարհում յուրաքանչյուր 100 երեխայից 1-ը ունի աուտիզմ, ընդ որում այս ցուցանիշի մեծ աճ դիտվել է վերջին տարիներին:(2)

Չնայած այս թեմայով իրականացվող մեծաքանակ հետազոտություններին, վերջնական պաթոգենետիկ մեխանիզմ դեռևս հայտնաբերված չէ: Կան որոշակի տվյալներ, որոնք խոսում են հնարավոր գենետիկ բաղադրիչի մասին, բայց դրանք դեպքերի միայն մոտավորապես 40%-ի պատկերն են: Այդ գեները հիմնականում կոդավորում են կամ սինապտիկ սպիտակուցներ, կամ քրոմատինի կարգավորմանը և էպիգենետիկ փոփոխություններին մասնակցող սպիտակուցներ և էնզիմներ:(3)

Սինապսների ձևավորումը ընդգրկում է նեյրոնալ փոխազդեցություն, տեղաշարժ, աքսոնալ ուղղորդում և դենդրիտային մորֆոգենեզ: Չնայած այս պրոցեսներին, սինապտոգենեզը պահանջում է ճշգրիտ կարգավորումներ: Նախասինապտիկ և հետսինապտիկ թաղանթները պարունակում են սպիտակուցներ, որոնք սինապտոգենեզի ժամանակ պետք է դասավորվեն ըստ իրենց նախատեսված տեղի և ոչ թե պատահականորեն:(4)

Այսպիսի սպիտակուցներից են սինապտոֆիզինը, որը սինապտիկ թաղանթային սպիտակուց է, և սինապտոբրևինը, որը վեզիկուլների ձուլման պրոցեսն է կարգավորում: Այս սպիտակուցները համարվում են սինապտիկ մարկերներ, ուստի նրանց ուսումնասիրումը հնարավորություն է տալիս վիզուալիզացնելու սինապսները:(5)

Նյարդային համակարգում զարգացման սկզբնական շրջանում ընթանում է ակտիվ սինապտոգենեզ, նույնիսկ սինապսների քանակը ստացվում է պահանջվածից շատ: Երբ օրգանիզմը ադապտացվում է միջավայրին, սինապտիկ ցանցը վերաձևավորվում է: Տեղի է ունենում ավելորդ և ոչ պետքական սինապսների էտում, իսկ պետքական սինապսները հզորանում են: Ընդ որում նյարդային ակտիվության և սինապտոգենեզի միջև կա կապ. նախ՝ նեյրոնալ ակտիվությունից կարող է փոփոխվել տվյալ սինապսի միջնորդանյութը, և հետո որոշ տվյալներ փաստում են, որ նեյրոնալ կուլտուրաները դեպոլյարիզացիա առաջացնող լուծույթներով լվանալուց հետո դիտվում է դենդրիտային փշերի ավելացում: (4,6)

Սինապսների էտման պրոցեսը ընթանում է պոստնատալ զարգացման ընթացում և հասուն տարիքում: Այս գործընթացում կարևոր նշանակություն ունի միկրոգլիան:

Վերջինս, իր հանգստի վիճակում որոշակի ազդանշաններ ճանաչելով, կարողանում է կարգավորել էտման պրոցեսը: Այդպիսի ազդանշաններից են CX3CR1 ռեցեպտորի և CX3CL1 լիգանդի կապը, SIRP-alfa-յի և CD47-ի կապը և այլն: (7)

Ուսումնասիրելու համար աուտիստիկ սպեկտրի հիվանդությունների մոլեկուլյար, կենսաքիմիական և վարքային փոփոխությունները՝ ստեղծվել են մի քանի կենդանական մոդելներ: Այդ մոդելներից մեկը վալպրոյաթթվով մակածված մոդելն է:

Վալպրոյաթթուն էպիլեպսիայի և այլ նեյրոհոգեբանական հիվանդությունների բուժման մեջ օգտագործվող դեղամիջոց է: Հղի առնետների շրջանում վալպրոյաթթվի կիրառումը գեստացիայի կրիտիկական ժամանակահատվածում՝ 12.5-րդ օրը, լայնորեն կիրառվող մոդել է՝ ուսումնասիրելու աուտիստիկ սպեկտրի խանգարումները: Այս մոդելի կիրառումը կապված է մարդկանց շրջանում կատարված հետազոտությունների հետ, որոնք ցույց են տվել կապ հղիության ընթացքում վալպրոյաթթվի օգտագործման և երեխայի մոտ հետագայում աուտիստիկ սպեկտրի հիվանդությունների զարգացման միջև: Մի շարք հետազոտություններ փաստում են, որ մոդելը առաջացնում է ոչ միայն փոփոխություններ ուղեղի որոշ հատվածներում՝ համանման աուտիզմով հիվանդ մարդկանց աուտոպսիայի տվյալներին, այլև վարքային թեստերի համարժեք փոփոխություններ (8, 9, 10, 11):

Այն, թե ինչպես է վալպրոյաթթուն մակածում որոշակի փոփոխություններ, որոնք մարդկանց շրջանում հանգեցնում են աուտիզմի զարգացման, իսկ առնետների շրջանում՝ համանման վարքային փոփոխությունների, դեռ բացահայտված չէ: Որոշ հետազոտողներ այդ երևույթը կապում են վալպրոյաթթվի՝ հիստոն դեացետիլազայի ինհիբիտոր հատկությամբ:(12)

Մայրական իմուն ակտիվացիայով աուտիզմի մոդելով հետազոտություններից մեկը նշում է CD68 և Iba1 դրական միկրոգլիայի ավելացում ԻԼ-17-ի ներփորոքային ներարկմամբ առնետների էմբրիոնների ուղեղի վենտրիկուլյար՝ գոտկային գալարի հատվածում: Ընդ որում, Iba1 դրական միկրոգլիան քանակապես չէր ավելացել, այլ դրա կուտակումն էր առավելապես այդ հատվածում: (13)

Կան շատ հետազոտություններ, որոնք ուսումնասիրել են վալպրոյաթթվով մակածված մոդելը՝ գնահատելով հետագա վարքային և կենսաքիմիական փոփոխությունները: Սակայն դրանք գնահատել են այդ փոփոխությունները ժամանակի որոշակի ընտրված պահի: Այնպիսի հետազոտություն, որը ժամանակի լայն միջակայքում կգնահատի այդ փոփոխությունների դինամիկան, չկա: Նաև չկա որևէ հետազոտություն, որը գնահատել է վալպրոյաթթվի կիրառմամբ մոդելի դեպքում միկրոգլիայի վիճակը և դրա ակտիվացիան:

1.2. **ԺԱՄԱՆԱԿԱԿԻՑ ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՔՆՆԱԴԱՏԱԿԱՆ ՎԵՐԼՈՒԾՈՒԹՅՈՒՆԸ**

ա) Kumamaru E, Egashira Y, Takenaka R, Takamori S. Valproic acid selectively suppresses the formation of inhibitory synapses in cultured cortical neurons. Neurosci Lett. 2014 May 21;569:142-7. doi: 10.1016/j.neulet.2014.03.066. Epub 2014 Apr 5. PMID: 24708928.

Այս հետազոտության ընթացքում հետազոտողները վալպրոյաթթվի ազդեցությանն են ենթարկել պոստնատալ 1-ին օրը ստացված նեյրոնների մի խմբին ին վիտրո առաջին օրը: Մյուս երկու խմբերից մեկը ստացել է տրիխոստատին, իսկ մյուսը վալպրոմիդ: Հետազոտողները հետևել են սինապտիկ փոփոխություններին և արդյունքները գնահատել են ին վիտրո 4, 7, 12, և 14-րդ օրերին: Մասնավորապես գնահատվել է վեզիկուլյար ԳԱԿԹ փոխադրիչի (VGAT) էքսպրեսիան, որը նվազած էր, իսկ այլ սինապտիկ մարկերներ, ինչպիսիք են վեզիկուլյար գլյուտամատային փոխադրիչ 1-ը և 2-ը (VGLUT1,2), անփոփոխ էին: Հասկանալու համար՝ արդյոք վալպրոյաթթվի ազդեցությանը ենթարկելու օրը կրիտիկական է, հետազոտողները վալպրոյաթթվի ազդեցությանն են ենթարկել բջիջները տարբեր փուլերում: Դա ցույց է տվել, որ փոփոխությունները դիտվում են մինչև ին վիտրո 8-րդ օրը ազդման դեպքում: վալպրոյաթթվի այս էֆեկտը պայմանավորված էր նրա՝ հիստոն դեացետիլազաները ընկճելու կարողությամբ, քանի որ արդյունքը համանման էր հիստոն դեացետալազի ինհիբիտոր տրիխոստատին Ա-յից ստացված արդյունքին, իսկ վալպրոյաթթվի ածանցյալ վալպրոմիդը, որը չունի հիստոն դեացետալազի ինհիբիտոր ազդեցություն, չի տվել նման արդյունք:

Ինչքան էլ հետազոտությունը որոշակի պատկերացում է տալիս վալպրոյաթթվի ազդման մասին, այնուամենայնիվ կան որոշ սահմանափակումներ, որոնք պետք է հաշվի առնել: Նախ բջջային կուլտուրայով ստացված մոդելը պարզունակ է, և ստացված արդյունքները կարող են ոչ լիարժեք պատկերացում տալ ին վիվո պրոցեսների մասին, որտեղ համադրվում են միջավայրի և այլ տեսակի բջիջների ազդեցությունները: Հետո փորձի համար օգտագործվել է 0.3-5.0 mM վալպրոյաթթու, որը նշվում է որպես էքսպերիմենտալ դոզա, ինչը կարող է չարտացոլել այն դոզան, որը հասնում է պտղի բջիջներին մարդկային օրգանիզմում: Մեկ այլ սահմանափակում է վալպրոյաթթվի՝ միայն հիստոն դեացետալազի ինհիբիտոր ազդեցության դիտարկումը: Այնուամենայնիվ վալպրոյաթթուն ունի մի շարք այլ մոլեկուլյար թիրախներ, որոնք ևս կարող են իրենց դերը ունենալ: Եվ բացի դրանից հիստոն դեացետալազի ինհիբիտորի ընդգրկումը պարզապես մեկ հավանական մեխանիզմ է, և պետք չէ ողջ պրոցեսը բացատրել միայն այդ մեխանիզմով: Եվս մեկ սահմանափակում է վալպրոմիդի՝ միայն հիստոն դեացետալազի ինհիբիտոր ակտիվությունից զուրկ լինելու հատկությունը հաշվի առնել. այնուամենայնիվ, այն կարող է ունենալ ազդման մեխանիզմներ, որոնք տարբեր են վալպրոյաթթվից:

Հետազոտությունը նշում է սինապտիկ մարկերների, աքսոնալ աճի մասին որոշ փոփոխություններ, բայց չի նշում դրանց ֆունկցիոնալ հետևանքները: Հաշվի առնելով, որ մոդելը ին վիտրո է, կարելի էր կիրառել էլեկտրաֆիզիոլոգիական հետազոտություն՝ գրանցելու սինապտիկ ակտիվությունը: Ի վերջո, հետազոտության ամենամեծ սահմանափակումը մոդելի՝ ին վիտրո լինելն է, որը կարիք ունի ին վիվո վալիդացման:

բ) Takeda K, Watanabe T, Oyabu K, Tsukamoto S, Oba Y, Nakano T, Kubota K, Katsurabayashi S, Iwasaki K. Valproic acid-exposed astrocytes impair inhibitory synapse formation and function. Sci Rep. 2021 Jan 8;11(1):23. doi: 10.1038/s41598-020-79520-7. PMID: 33420078; PMCID: PMC7794250.

Այս հետազոտության ընթացքում վալպրոյաթթվի ազդեցությանը ենթարկվել են ոչ թե նեյրոնները, այլ աստրոցիտները: Ուստի այն միտված է ցույց տալու վալպրոյաթթվի՝ աստրոցիտ-միջնորդավորված ազդեցությունը սինապտոգենեզի վրա: Փորձի ընթացքում կուլտուրան ուսումնասիրվել է իմունոցիտոքիմիական, էլեկտրաֆիզիոլոգիական, ՊՇՌ մեթոդներով: Էլեկտրաֆիզիոլոգիական հետազոտությունը ցույց է տվել, որ վալպրոյաթթվի ազդեցությանը ենթարկված աստրոցիտների հետ աճեցված նեյրոններում թուլացել է ինհիբիտոր սինապտիկ տրանսմիսիան, ընդ որում ազդեցությունը կոնցենտրացիա-կախյալ էր: Իմունոցիտոքիմիական հետազոտությամբ էլ բացահայտվել է ԳԱԿԹ-երգիկ սինապսների նվազում, իսկ դենդրիտիկ ճյուղավորումները և աքսոնալ աճը անփոփոխ էին: ՊՇՌ մեթոդը բացահայտեց Ptprd մ-ՌՆԹ-ի նվազում, մինչդեռ մնացյալ ստուգվող մ-ՌՆԹ-ների մակարդակը նորմալ էր: Ptprd մ-ՌՆԹ-ն, ինչպես և մնացած ստուգված մ-ՌՆԹ-ները մասնակցում են ԳԱԿԹ-երգիկ սինապսների ձևավորմանը: Չնայած այս ամենին, ուղղակի կապ այս փոփոխության և աուտիստիկ դրսևորումների միջև դեռևս հայտնաբերված չէ:

Այնուամենայնիվ, առկա են որոշակի սահմանափակումներ: Նախ ին վիտրո մոդելը ոչ լիարժեք կարող է ցույց տալ այն բազմազան պրոցեսները, որոնք ընթանում են ին վիվո պայմաններում՝ ավելի բարդ ուղեղային միկրոմիջավայրի և այլ օրգան-համակարգերի ազդակների պատճառով: Սահմանափակում է նաև աստրոցիտների ընտրությունը. վերջիններս հետերոգեն բջջային պոպուլյացիա են ներկայացնում, որի տարբեր ներկայացուցիչների շրջանում հնարավոր է վալպրոյաթթվի հանդեպ տարբեր պատասխանների դրսևորում: Օգտագործված վալպրոյաթթվի կոնցենտրացիան և տևողությունը հնարավոր է՝ համադրելի չլինեն հղիի կողմից վալպրոյաթթվի օգտագործման հետևանքով պտղի գլխուղեղի բջիջներում վալպրոյաթթվի կոնցենտրացիայի հետ: Որպես սինապտիկ մարկերներ օգտագործվել են MAP2, VGLUT1, VGAT և tau սպիտակուցները, բայց միայն սրանց ուսումնասիրումը

թույլ չի տալիս լիարժեք պատկերացում կազմել սինապտիկ փոփոխությունների մասին: Մեկ այլ սահմանափակում է միայն ին վիտրո մոդելի դիտարկումը. արդյունքը պետք է համադրվի ին վիվո մոդելի հետ: Բացի դրանից ստացված փոփոխությունների ֆունկցիոնալ դրսևորումը կենդանու մոտ ևս պարզ չէ. կարիք կա վարքային թեստերի: Եվ ի վերջո, աստրոցիտների և նեյրոնների միջև ընթանում է բարդ բջջային փոխազդեցություն, որը դեռևս ուսումնասիրությունների կարիք ունի:

գ) Hernandez A, Delgado-González E, Durairaj RV, Reyes-Haro D, Martínez-Torres A, Espinosa F. Striatal synaptic changes and behavior in adult mouse upon prenatal exposure to valproic acid. Brain Res. 2023 Sep 15;1815:148461. doi: 10.1016/j.brainres.2023.148461. Epub 2023 Jun 10. PMID: 37308047.

Այս հետազոտությունը ուսումնասիրել է էմբրիոնիկ 12,5-րդ օրը ներորովայնային 500մգ/կգ վալպրոյաթթվի ներարկում ստացած առնետների սերնդին՝ վերցնելով միայն արական սեռը, ինչը արդեն իսկ որոշակի սահմանափակում է: Հեղինակները հավանաբար այս ընտրությունը կատարել են՝ ելնելով այն փաստից, որ աուտիզմը առավել հաճախ դիտվում է արական սեռի մոտ, բայց հաշվի առնելով մարդու և մկան օրգանիզմների տարբերությունները, այս փաստը վիճարկելի է առնետի մոդելի դեպքում: Հետազոտությունը օգտագործել է նաև ստուգիչ խումբ: Նորածին առնետները բաժանվել են 4-ական անդամից կազմված խմբերի՝ յուրաքանչյուր վանդակի համար մեկական հասուն էգ սնող առնետի հաշվով: 60-օրական արու առնետները ենթարկվել են վարքային փորձերի, որի ընթացքում փորձ կատարողը չի իմացել, թե որ խմբից է տվյալ առնետը: Չնայած նրան, որ թե վալպրոյաթթու ստացած առնետները և թե ստուգիչ խումբը միևնույն հասակում են անցել վարքային թեստերը, այնուամենայնիվ թեստերի որոշ տեսակներ կատարվել են միայն մեկ անգամ, ինչը թույլ չի տալիս գնահատել այն փոփոխությունները, որոնք առաջացել են դրանից առաջ կամ հետո: Թեստերից մեկը open field թեստն էր, որը, չնայած ստանդարտ մեթոդ է, այնուամենայնիվ կարող է ունենալ վարիացիաներ՝ կախված վանդակի որակից: Բացի դրանից 1 ժամ հետազոտումը կարող է լիարժեք պատկերացում չտալ պոտենցիալ փոփոխությունների մասին, որոնք ի հայտ կգան ժամանակի այլ պահի: Կիրառվել է նաև Marble burying թեստ, որը գնահատում է միայն փորելու վարքը և շրջանցում է գիտակցության և վարքագծի այլ ասպեկտներ: Grooming թեստը կատարվել է միայն մեկ անգամ, ինչը ևս պատկերացում չի տալիս ժամանակային փոփոխությունների մասին: Ջրային Y-maze թեստի ժամանակ որպես փախուստի մեխանիզմ օգտագործվել է պլատֆորմի վրա բարձրանալը, բայց վերջինիս արդյունքը կարող է կախված լինել ոչ միայն կոգնիտիվ, այլև մոտոր ֆունկցիաներից: Վարքային թեստերից հետո կենդանիները ենթարկվել են դեկապիտացիայի՝ ուղեղի

հյուսվածքներում որոշ սպիտակուցների գնահատման նպատակով: Այնուամենայնիվ, չի նշվում ժամանակային ինտերվալը՝ ընկած էվթանազիայի և ուղեղի հյուսվածքը վերցնելու միջև: Նաև չի նշվում, թե հետագայում ինչքան ժամանակ է պահպանվել տվյալ հյուսվածքը: Կախված ժամանակից կարող են ի հայտ գալ որոշակի փոփոխություններ և սխալներ:

Հետազոտությունը ցույց տվել, որ վալպրոյաթթվի խմբում չի փոփոխվել լոկոմոտոր ակտիվությունը և անհանգիստ վարքագիծը: Սակայն, ելնելով Marble burying թեստի արդյունքներից, դիտվել է կրկնվող վարքագծի ավելացում, իսկ ջրային Y-maze թեստի արդյունքները խոսում են խանգարված կոգնիտիվ ճկունության մասին: Պրենատալ վալպրոյաթթվի ազդեցությամբ առնետների դորզալ հիպոկամպում և ստրիատումում նվազած էր նեյրոլիգին-1-ի էքսպրեսիան, որը գլուտամատերգիկ սինապսների ադհեզիոն սպիտակուց է: Նեյրոլիգին-3-ի էքսպրեսիան փոփոխված չէր, ինչը ենթադրում է գլուտամատերգիկ տրանսմիսիայի սելեկտիվ ալտերացիա՝ կապված վարքային փոփոխությունների հետ: PSD-95 սպիտակուցի էքսպրեսիան նշանակալի նվազած էր ստրիատումում, իսկ դորզալ հիպոկամպում դիտվել էր NMDA ռեցեպտորի NR2A ռեցեպտորի էքսպրեսիայի աճ: Սինապտոֆիզինի էքսպրեսիան անփոփոխ էր:

Գիտական Նորույթը

Հետազոտության գիտական նորույթը վալպրոյաթթվի պրենատալ և պոստնատալ մոդելներում սինապտիկ խտության փոփոխության և միկրոգլիալ ակտիվացման մարկերների գնահատումն է, դրանց համեմատումը երկու մոդելների միջև, ինչպես նաև ստուգիչ խմբերի հետ, նաև այս ամենի իրականացումը մի քանի անգամ՝ զարգացման տարբեր փուլերում: Սա կարող է նոր պաթոգենետիկ օղակների հայտնաբերման հիմքը լինել՝ աուտիզմի սպեկտրի խանգարումների առաջացման հարցում:

2. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՆՊԱՏԱԿՆ ՈՒ ԽՆԴԻՐՆԵՐԸ

Հետազոտության նպատակն է ուսումնասիրել վալպրոյաթթվի պրենատալ և պոստնատալ կիրառման ազդեցությունը սինապտոգենեզի վրա և գնահատել միկրոգլիայի դերը այդ ազդեցության մեջ:

Հետազոտության նպատակին համահունչ՝ առաջադրվել են հետևյալ խնդիրները.

1. գնահատել սինապտիկ խտությունը և սինապսների տեսքը նորածին առնետի գլխուղեղի <u>պրեֆրոնտալ կեղևում և հիպոկամպում</u>՝ վալպրոյաթթվի պրենատալ E12.5-րդ և պոստնատալ PN7-րդ օրերին կիրառմամբ խմբերում՝ հաշվի առնելով, որ E12.5-րդ օրը հեմատոպոեզի երկրորդ ալիքն է, երբ միկրոգլիայի

սուբպոպուլյացիան հասնում է ուղեղ, իսկ PN7-րդ օրը միկրոգլիայի ամենաակտիվ պրոլիֆերատիվ շրջանն է:

2. գնահատել հետևյալ սինապտիկ սպիտակուցների քանակը վալպրոյաթթվի ազդեցությանը պրենատալ և պոստնատալ ենթարկված նորածին առնետի գլխուղեղում, արդյունքը համեմատել ստուգիչ խմբերում ստացված արդյունքի հետ.
    - սինապտոֆիզին
    - VGLUT1
    - VGLUT2
    - VGAT
    - GluN1
    - Neurexin(պրեսինապտիկ)
    - Neuroligin(պոստսինապտիկ)
    - PSD 95(պոստսինապտիկ)
3. վերոնշյալ խմբերում գնահատել սպիտակուցների մ-ՌՆԹ-ների էքսպրեսիան:
4. գնահատել պրենատալ վալպրոյաթթվի ազդեցության երկարաժամկետ հետևանքները վերոնշյալ սպիտակուցների, վերջիններիս մ-ՌՆԹ-ի էքսպրեսիայի և սինապտիկ խտության դինամիկայի վրա՝ որոշելով սինապտոգենեզի կրիտիկական պահերը և փոփոխությունների պահպանումը:
5. Հայտնաբերել վալպրոյաթթվի ազդեցությունը միկրոգլիայի ակտիվացման վրա՝ գնահատելով CD68 և Iba1 միկրոգլիալ ակտիվացիայի մարկերները:

3. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՏԵՍԱԿԸ

ա. հիմնարար, փորձարարական

4. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹԸ ԵՒ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Հետազոտության առաջին շրջափուլի համար օգտագործվելու են Sprague–Dawley ցեղատեսակի 3-4 ամսական 8-12 էգ առնետներ: Կենդանիները պետք է պահվեն Քոբրեյն ուղեղի հետազոտման կենտրոնի կենդանանոցում՝ հաստատուն ջերմաստիճանի (22 ± 1 °C) պայմաններում՝ 12:12 ժամ լուսային-մթնային ռեժիմով: Կենդանիները պետք է բնակեցվեն վանդակներում՝ 3-5-ական յուրաքանչյուրում՝ ըստ ցանկության ջրի և կերակուրի առկայությամբ: Փորձերի ընթացքում պետք է հնարավորինս նվազագույնի հասցվի օգտագործվող կենդանիների քանակը, իսկ փորձերը պետք է իրականացվեն համաձայն Լաբորատոր կենդանիների խնամքի և պահման միջազգային ստանդարտների:

Հետազոտական մեթոդները.

Հետազոտության նպատակով օգտագործվելու են 8-12 էգ առնետներ: Բեղմնավորումից հետո հղի առնետները բաժանվելու են 4 խմբի՝ յուրաքանչյուր խմբում 2-ական: Առաջին խմբում գեստացիոն 12.5-րդ օրը ստանալու են 500մգ/կգ վալպրոյաթթվի ներորովայնային ներարկում: Երկրորդ խմբում առնետները չեն ստանալու ներարկումներ, իսկ նրանց նորածինները հետծննդյան 7-րդ օրը ստանալու են 500մգ/կգ վալպրոյաթթվի ներորովայնային ներարկում: Երրորդ խմբի առնետները ստանալու են ներորովայնային 500մգ/կգ ֆիզլուծույթի ներարկում հետծննդյան 12.5-րդ օրը: Չորրորդ խմբի առնետների նորածինները ստանալու են հետծննդյան 7-րդ օրը ներորովայնային 500մգ/կգ ֆիզլուծույթի ներարկում:

Առաջին և երրորդ խմբերի նորածինները բաժանվելու են 3 խմբերի և ենթարկվելու են դեկապիտացիայի հետծննդյան 3-րդ, 7-րդ, 12-րդ օրերին: Երկրորդ և չորրորդ խմբորի նորածինները ենթարկվելու են դեկապիտացիայի հետծննդյան 12-րդ օրը: Ստացված ուղեղի հյուսվածքների մի մասը ենթարկվելու է Վեստերն բլոտ անալիզի՝ գնահատելու սինապտոֆիզին, VGLUT1, VGLUT2, VGAT, GluN1, Neurexin, Neuroligin և PSD 95 սպիտակուցների քանակը և ՊՇՌ անալիզի՝ գնահատելու վերջիններիս մ-ՌՆԹ-ների էքսպրեսիան: Մյուս մասը օգտագործվելու է սինապսները վիզուալիզացնելու նպատակով՝ գնահատելու դրանց խտությունը: Գնահատելու համար միկրոգլիայի ակտիվացումը՝ որոշվելու է նաև CD68 և Iba1 դրական բջիջների առկայությունը: Զարգացման տարբեր փուլերում կատարված դեկապիտացիան և ուղեղային հյուսվածքի նմուշառումը հնարավորություն կտան գնահատելու փոփոխությունների դինամիկան:

Բոլոր հետազոտությունները կատարվելու են ՔՈԲՐԵՅՆ ուղեղի հիմնարար հետազոտությունների գիտակրթական կենտրոնում:

Մոտավոր արժեքներ

Western blotting

- սինապտոֆիզին հակամարմին 0,1մգ 450 EURO*2[1]
- VGLUT1 հակամարմին 0.05 mg 406 EURO*2
- VGLUT2 հակամարմին 0.1ml 450 EURO*2
- VGAT հակամարմին 0.1 ml 430$*2
- GluN1 հակամարմին 0.05ml 595$*2
- Neurexin հակամարմին 0.1ml 487$*2
- Neuroligin հակամարմին 0.1ml 319$*2
- PSD 95 հակամարմին 0.1ml 400$*2
- CD68 հակամարմին 0.1ml 470$*2

- Iba1 հակամարմին 0,1ml 400$*2
- Երկրորդային հակամարմին 5մգ 2080EURO*2

RT-PCR

RNA Extraction Kit. 400$*2
Synaptophysin-specific Primers 142 EUR*2
PSD95-specific Primers 142 EUR*2
VGLUT1-specific Primers 142 EUR*2
VGLUT2-specific Primers 142 EUR*2
VGAT-specific Primers 142 EUR*2
GluN1-specific Primers **NA**
Neurexin-specific Primers 142 EUR*2
Neuroligin-specific Primers 142 EUR*2
First Strand cDNA Synthesis Kit 518 EUR*2
PCR Master Mix: 100*0.05reactions 369 EUR*2
Positive Control RNA: RNA sample or cDNA known to contain the target mRNAs.
Gel Electrophoresis Materials.
PCR Cleanup Kit.

[1]Հաշվի են առնվում դեպի Հայաստան տեղափոխման ծախսերը:

5. ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ՀԱՄԱՊԱՏԱՍԽԱՆՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԱՍՏԱՏՎԱԾ ԹԵՄԱՅԻՆ

Գիտակոորդինացիոն խորհրդի կողմից հաստատված ԵՊԲՀ *գերակա գիտական ուղղություն* շրջանակում է պլանավորվում սույն հետազոտությունը.

6. ԿՐԹԱԿԱՆ ԾՐԱԳՐԵՐԻ ԺԱՄԱՆԱԿԱՑՈՒՅՑ

Կրեդիտային համակարգով դասընթացներ, քննություններ		Քանակ	Ժամանակահատված Աշուն/գարուն
1.	Ընդհանուր կրթական դասընթացներ	20 կրեդիտ	2023 աշուն
2.	Մասնագիտական դասընթացներ	20 կրեդիտ	2024 գարուն
3.	Որակավորման քննություններ		2023, 2025

7. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿԱՑՈՒՅՑ

Ուսումնառության ժամանակաշրջանում անհրաժեշտ գործառույթներ		Ժամանակաշրջան
1.	Սկզբնաղբյուրների վերլուծություն	2023 - 2026
2.	Հետազոտության մեթոդների տիրապետում	2023- 2024
3.	Ընթացիկ ատեստավորում (1)	2024

4.	Հետազոտությունների նյութերի հավաքում	2025- 2026
5.	Ընթացիկ ատեստավորում (2)	2025
6.	Գիտական հոդվածների հրատարակում	2024-2026
7.	Ընթացիկ ատեստավորում (3)	-
8.	Սեփական հետազոտությունների արդյունքների հիման վրա Web of Science շտեմարանի Thomson Reuters կազմակերպության ազդեցության գործակից ունեցող ամսագրում գիտական հոդված	2025
9.	Աշխատանքի ձևակերպում	2025-2026
10.	Ամփոփիչ ատեստավորում	2026
11.	Զեկույցների ներկայացում	2024-2026
12.	Գործուղումներ	201_, 201_, 201_
13	Աշխատանքի նախնական փորձաքննություն	2026 մայիս
14	Ատենախոսության պաշտպանություն	2026 նոյեմբեր

8. ԹԵՄԱՅԻ ՇՐՋԱՆԱԿՆԵՐՈՒՄ ԱՌԿԱ ՀՐԱՏԱՐԱԿՈՒՄՆԵՐ, ԳԻՏԱԿԱՆ ԶԵԿՈՒՅՑՈՒՄՆԵՐ

-

9. ՕԳՏԱԳՈՐԾՎԱԾ ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՆ ՑԱՆԿ

1. American Psychiatric Association. 2013 Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-5. Washington, DC: Am. Psychiatr. Assoc
2. Zeidan J, Fombonne E, Scorah J, Ibrahim A, Durkin MS, Saxena S, Yusuf A, Shih A, Elsabbagh M. Global prevalence of autism: A systematic review update. Autism Res. 2022 May;15(5):778-790. doi: 10.1002/aur.2696. Epub 2022 Mar 3. PMID: 35238171; PMCID: PMC9310578.
3. Tremblay MW, Jiang YH. DNA Methylation and Susceptibility to Autism Spectrum Disorder. Annu Rev Med. 2019 Jan 27;70:151-166. doi: 10.1146/annurev-med-120417-091431. PMID: 30691368; PMCID: PMC6597259.
4. Qi C, Luo L-D, Feng I and Ma S (2022) Molecular mechanisms of synaptogenesis. Front. Synaptic Neurosci. 14:939793. doi: 10.3389/fnsyn.2022.939793
5. Böttner M, Harde J, Barrenschee M, Hellwig I, Vogel I, Ebsen M, Wedel T. GDNF induces synaptic vesicle markers in enteric neurons. Neurosci Res. 2013 Nov;77(3):128-36. doi: 10.1016/j.neures.2013.08.012. Epub 2013 Sep 8. PMID: 24025431.
6. Kim HJ, Cho MH, Shim WH, Kim JK, Jeon EY, Kim DH, Yoon SY. Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects. Mol Psychiatry. 2017 Nov;22(11):1576-1584. doi: 10.1038/mp.2016.103. Epub 2016 Jul 12. PMID: 27400854; PMCID: PMC5658669.

7. Cornell J, Salinas S, Huang HY, Zhou M. Microglia regulation of synaptic plasticity and learning and memory. Neural Regen Res. 2022 Apr;17(4):705-716. doi: 10.4103/1673-5374.322423. PMID: 34472455; PMCID: PMC8530121.
8. Christensen J, Grønborg TK, Sørensen MJ, Schendel D, Parner ET, Pedersen LH, Vestergaard M. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. JAMA. 2013 Apr 24;309(16):1696-703. doi: 10.1001/jama.2013.2270. PMID: 23613074; PMCID: PMC4511955.
9. Schneider T, Ziółkowska B, Gieryk A, Tyminska A, Przewłocki R. Prenatal exposure to valproic acid disturbs the enkephalinergic system functioning, basal hedonic tone, and emotional responses in an animal model of autism. Psychopharmacology (Berl). 2007 Sep;193(4):547-55. doi: 10.1007/s00213-007-0795-y. Epub 2007 May 13. PMID: 17497229.
10. Chaliha D, Albrecht M, Vaccarezza M, Takechi R, Lam V, Al-Salami H, Mamo J. A Systematic Review of the Valproic-Acid-Induced Rodent Model of Autism. Dev Neurosci. 2020;42(1):12-48. doi: 10.1159/000509109. Epub 2020 Aug 18. PMID: 32810856.
11. Nicolini C, Fahnestock M. The valproic acid-induced rodent model of autism. Exp Neurol. 2018 Jan;299(Pt A):217-227. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.04.017. Epub 2017 May 2. PMID: 28472621.
12. Hernandez A, Delgado-González E, Durairaj RV, Reyes-Haro D, Martínez-Torres A, Espinosa F. Striatal synaptic changes and behavior in adult mouse upon prenatal exposure to valproic acid. Brain Res. 2023 Sep 15;1815:148461. doi: 10.1016/j.brainres.2023.148461. Epub 2023 Jun 10. PMID: 37308047.
13. Sasaki T, Tome S, Takei Y. Intraventricular IL-17A administration activates microglia and alters their localization in the mouse embryo cerebral cortex. Mol Brain. 2020 Jun 16;13(1):93. doi: 10.1186/s13041-020-00635-z. PMID: 32546246; PMCID: PMC7298827.

Գիտական ղեկավար՝ _____

ստորագրություն

Հայցորդ՝ _____

ստորագրություն

բջջ. 099 69 31 32,
e-mail: baghdasaryanella96@gmail.com