



Հաստատում եմ՝

Երևանի Մ. Հերացու անվան պետական բժշկական համալսարանի ռեկտոր,  
բ.գ.դ. պրոֆեսոր Ա.Ա. Մուրադյան  
«24» սեպտեմբերի 2020 թ.

**ԱՌԱՋԱՏԱՐ ԿԱԶՄԱԿԵՐՊՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԾԻՔ**

ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտի հայցորդ *Վարդուհի Հարությունի Քնարյանի* «Նեյրոդեգեներացիայի եվ նեյրոպրոտեկցիայի մեխանիզմները ողնուղեղում փորձարարական Պարկինսոնի հիվանդության ժամանակ» թեմայով, Գ.00.04. «Կենսաքիմիա» մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների դոկտորի գիտական աստիճանի հայցմանը ներկայացված ատենախոսության վերաբերյալ

Ատենախոսությունը քննարկվել է և կարծիք է տրվել Երևանի Մ. Հերացու անվան պետական բժշկական համալսարանի (ԵՊԲՀ) կենսաքիմիայի ամբիոնի նիստում 17 սեպտեմբերի 2020 թ.:

Նիստին ներկա էին՝ ԵՊԲՀ կենսաքիմիայի ամբիոնի վարիչ, կ.գ.դ., պրոֆ. Մ.Ի. Աղաջանովը, ամբիոնի աշխատակիցներ՝ կ.գ.դ., պրոֆ. Գ.Ա. Վարդանյանը, կ.գ.թ., դոցենտ Ա.Լ. Շայջյանը, կ.գ.թ. դոցենտ Ա.Վ. Սահարյանը, կ.գ.թ. Ն.Ա. Զաքարյանը, կ.գ.թ. Ռ.Խ. Սահակյանը, դասախոս Հ.Ս. Հարությունյանը, ասիստենտ Մ.Լ. Սիրումյանը:

Լսեցին ատենախոս *Վարդուհի Հարությունի Քնարյանի* ելույթը, ով ներկայացրեց դոկտորական թեզի հիմնադրույթները, դրանց արդիականությունը և նպատակը, ստացված արդյունքները և եզրակացությունները: Քննարկման ընթացքում բազմաթիվ հարցեր տրվեցին, որոնց ատենախոսը տվեց սպառիչ պատասխաններ:

**Ատենախոսության թեմայի արդիականությունը:** Պարկինսոնի հիվանդությունը (ՊՀ) աստիճանաբար զարգացող քրոնիկ բնույթի նեյրոդեգեներատիվ հիվանդություն է: Այն կլինիկապես արտահայտվում է շարժողական խանգարումների ձևով, որոնք զարգանում և ի հայտ են գալիս գլխուղեղում գտնվող սև մարմնի (substantia nigra pars compacta) և զուլավոր մարմնի (striatum) դոֆամինային նեյրոնների դեգեներացիայի հետևանքով: ՊՀ-ին բնորոշ են նաև ոչ շարժողական բնույթի ֆունկցիոնալ խանգարումներ (ավտոնոմ կամ ինքնավար, զգայական, նյարդահոգեբանական), որոնք

նկատելի են դեռևս հիվանդության զարգացման վաղ շրջանում: Նման բարդ պաթոլոգիայի պատճառն այն է, որ նեյրոդեգեներացիայի պրոցեսները զարգանում են կենտրոնական նյարդային համակարգի այլ հատվածներում:

Արդի պատկերացումների համաձայն՝ ողնուղեղը նույնպես ներգրավվում է ՊՀ-ն պաթոլոգիական պրոցեսների մեջ: Գրականության սովյալների համաձայն ողնուղեղը մասնակցում է ինչպես շարժողական, այնպես էլ ոչ շարժողական խանգարումների ձևավորման մեջ: ՊՀ-ով ախտորոշված հիվանդների մոտ վեգետատիվ գործառույթների խանգարումները, ինչպիսիք են դանդաղեցված քայլերը, սոմատիկ ցավերը, սեռական խանգարումները, օրթոստատիկ հիպոտենզիան, առաջանում են ողնուղեղի կառուցվածքների վնասման պատճառով: Փորձարարական ՊՀ-ի *in vivo* մոդելներում կենդանիների մոտ զարգացող ինքնավար խանգարումները կապակցված են ողնուղեղի կառուցվածքային և ֆունկցիոնալ փոփոխությունների հետ: Ողնուղեղում, ինչպես և գլխուղեղի վնասված դոֆամինային նեյրոններում, հայտնաբերվել են ՊՀ-ն պաթոզենեզին բնորոշ Լևիի մարմինները և  $\alpha$  -սինուկլեինի կուտակումները: Սյդ ներառումները ողնուղեղում նեյրոբոքոբային գործընթացների զարգացման պատճառ են հանդիսանում, խափանում են ֆիզիոլոգիական պրոցեսների բնականոն ընթացքը և կործանարար են մոտոնեյրոնների համար:

Ի տարբերություն գլխուղեղի, ողնուղեղի նեյրոդեգեներացիայի մեխանիզմները ՊՀ-ի ժամանակ քիչ են ուսումնասիրվել: Սկզբունքային պատճառներից է այն, որ փորձարարական մոդելները մշակվել և կիրառվել են հիմնականում գլխուղեղի նշված հատվածների ուսումնասիրման նպատակով: Հայտնի է, որ ողնուղեղի նեյրոններն ու մոտոնեյրոնները կարևոր դեր են խաղում գլխուղեղից դեպի մկաններ գնացող նյարդային ազդակների հաղորդակցման և համակարգման, ինչպես նաև շարժողական ֆունկցիաների կարգավորման գործընթացներում: Հետևաբար, ողնուղեղի նեյրոնների և հատկապես մոտոնեյրոնների դեգեներացիան կարող է բարդացնել հիվանդության ընթացքը և վատթարացնել այն ախտանշանները, որոնք պայմանավորված են ողնուղեղի նեյրոֆիզիոլոգիական ֆունկցիաներով:

Վերը նշվածը թույլ է տալիս եզրակացնել, որ Վ.Հ. Քնարյանի ատենախոսական աշխատանքը, որը նվիրված է ողնուղեղում նեյրոնների և աքսոնների դեգեներացիայի կենսաքիմիական և մոլեկուլային մեխանիզմների ուսումնասիրմանը, ինչպես նաև նեյրոդեգեներացիայի կանխարգելման ուղիների բացահայտմանը ՊՀ-ն փորձարարական մոդելներում, արդիական է և հանդիսանում է ներկայիս նյարդագիտության առաջնակարգ խնդիրներից մեկը:

**Ատենախոսության գիտական նորույթը:** Ներկայացված աշխատանքը հիմնարար և ավարտված հետազոտություն է արդի նեյրոկենսաբանության և նեյրոքիմիայի բնագավառներում: Աշխատանքում ցույց է տրվել, որ C57BL/6N գծային մկների մոտ 1-

մեթիլ-4-ֆենիլ-1,2,3,6-տետրահիդրոպիրիդինոլ (ՄՖՏՊ) և Lewis առնետների մոտ ռոտենոնոլ առաջացրած ՊՀ-ի *in vivo* փորձարարական մոդելները կարելի է կիրառել նաև ողնուղեղում նեյրոդեգեներացիայի մեխանիզմները ուսումնասիրելու նպատակով: Ցույց է տրվել ՄՖՏՊ-ից 1-մեթիլ-4-ֆենիլպիրիդին (ՄՖՊ<sup>+</sup>) ակտիվ տոքսինի առաջացումը C57BL/6N մկների ողնուղեղում, ինչը հիմնավորում է ՄՖՏՊ-ով առաջացրած ՊՀ-ն փորձարարական մոդելի կիրառումը ողնուղեղը ուսումնասիրելու նպատակով: Բացահայտվել են ՄՖՏՊ-ի մետաբոլիզմի բաղադրիչները՝ MAO-B ֆերմենտը, դոֆամինի փոխադրիչը (DAT) և ՄՖՊ<sup>+</sup> հետադարձ կլանումը, ինչը փաստում է ՄՖՊ<sup>+</sup>-ի անմիջական ազդեցությունը ողնուղեղի նեյրոնների վրա:

Ուսումնասիրվել են ողնուղեղի նեյրոդեգեներացիայի կենսաքիմիական մեխանիզմները, մասնավորապես  $Ca^{2+}$ -կախյալ պրոտեազի՝ կալպաինոլ միջնորդավորված ուղին *in vivo* և *in vitro* պայմաններում: Ցույց է տրվել, որ ՄՖՏՊ-ի և ռոտենոնի ազդեցության ներքո վնասվում են ողնուղեղի գորշ նյութի արջևի և հետին եղջյուրների նեյրոնները և մոտոնեյրոնները: Ողնուղեղում գրանցվել է կալպաինի և կաապազ-3-ի ակտիվացում, ինչը բերում է նեյրոնների կառուցվածքային սպիտակուցների՝ սպեկտրինի և նեյրոֆիլամենտների թեթև սպիտակուցի քայքայմանը: Դա կարող է նեյրոնների և աքսոնների կառուցվածքային և ֆունկցիոնալ խանգարումների հանգեցնել: Արձանագրվել են մի շարք երևույթներ, ինչպիսիք են նեյրոբոթոքային գործոնների (Cox-2, NOS2, caspase-1) մակարդակի բարձրացումը, աստրոգլիոզը, միկրոգլիոզը, T բջջիջների (CD3, CD4, CD8) և մակրոֆագերի ինֆիլտրացիան, որոնք վկայում են ողնուղեղում նեյրոբոթոքային պրոցեսների ակտիվացման մասին: C57BL/6N մկների մոտ ՄՖՏՊ-ն քայլվածքի ցուցանիշների (քայլի երկարություն և հաճախականություն) կական փոփոխություններ է առաջացրել: ՄՖՏՊ-ով հարուցված մոդելում կալպաինի սինթետիկ ինհիբիտորը՝ կալպեպտինը զգալիորեն նվազեցնում է նեյրոդեգեներացիայի և նեյրոբոթոքային պրոցեսների զարգացումը ողնուղեղում: Կալպեպտինի ազդեցության տակ կարգավորվում են ՄՖՏՊ-ով հարուցված քայլվացքի շեղումները:

Հստակ ապացույցներ են ներկայացված ՊՀ-ով ախտորոշված հիվանդների (postmortem) ողնուղեղի նեյրոնների և աքսոնների դեգեներացիայի և նեյրոբոթոքային գործոնների մակարդակի բարձրացման վերաբերյալ: Ակտիվ կալպաինի առկայությունը ենթադրում է այդ պրոտեազի միջնորդությունը նեյրոդեգեներացիայի գործընթացներում:

Նեյրոդեգեներացիայի մեխանիզմները ուսումնասիրվել են ՄՖՊ<sup>+</sup>-ով և ռոտենոնոլ հարուցված ՊՀ-ի *in vitro* բջջային մոդելներում: Տարբերակված VSC 4.1 մոտոնեյրոններում և SH-SY5Y բջջիջներում սահմանվել է կալպաինոլ միջնորդավորված բջջիջների ապոպտոզի ազդանշանային ներքին ուղին: Նշված բջջիջներում ցույց է տրվել կալպաինի սինթետիկ ինհիբիտորների՝ կալպեպտինի և SNJ-1945-ի պաշտպանիչ դերը:

Այսպիսով, փորձարարական ՊՀ-ի տարբեր մոդելների վրա հաստատվել է կալպաինի առանցքային դերը ողնուղեղի նեյրոնների, մոտոնեյրոնների և աքսոնների դեգեներացիայի գործընթացներում և ապացուցվել է, որ կալպաինի ինհիբիտորները՝ կալպեպտինը և SNJ-1945-ն ճնշում և նվազեցնում են նեյրոդեգեներացիայի և նեյրոբոլորոքային պրոցեսների զարգացումը բարելավելով քայլը:

**Ատենախոսության գործնական արժեքը:** Ատենախոսության մեջ ներկայացված հետազոտության արդյունքները ունեն ինչպես հիմնարար, այնպես էլ հնարավոր կիրառական նշանակություն: Ներկայացված նյութը լրացնում է ՊՀ-ի պաթոգենեզի արդի պատկերացումները և նորովի բացատրում ՊՀ-ի զարգացման բարդ պաթոլոգիական պրոցեսները: Ստացված տվյալները հստակ ցույց են տալիս, որ գլխուղեղի նիգրոստրիատումի հետ մեկտեղ կենտրոնական նյարդային համակարգի ստորին հատվածը՝ ողնուղեղը նույնպես ներգրավվում է ՊՀ-ի պաթոլոգիայի մեջ: Գլխուղեղին զուգընթաց ողնուղեղի նեյրոնների և, հատկապես, մոտոնեյրոնների դեգեներացիան կարող է անբարձրադաս կիվանդության ընթացքի վրա, բարդացնել և վատթարացնել այն ախթանիշները, որոնք պայմանավորված են ողնուղեղի նեյրոֆիզիոլոգիական ֆունկցիաներով: Հետևաբար, ողնուղեղի նեյրոդեգեներացիայի կալպաինով միջնորդավորված հանգուցային ուղին և դրա բաղադրիչները կարող են թիրախ հանդիսանալ նյարդապաշտպանիչ դեղամիջոցների համար:

Ստացված արդյունքները ապացուցում են կալպաինի առանցքային դերը ողնուղեղի նեյրոդեգեներացիայի և նեյրոբոլորոքային գործոնների զարգացման գործընթացներում: Այս տվյալները թույլ են տալիս կալպաինը դիտարկել որպես թիրախային մոլեկուլ, որի ընկճման ճանապարհով կարելի է կանխարգելել ՊՀ-ի ժամանակ ընթացող նեյրոդեգեներացիան և գլխուղեղում, և ողնուղեղում: Կալպաինի ինհիբիտորների՝ կալպեպտինի և SNJ-1945-ի կանխարգելիչ և նեյրոպաշտպանիչ ազդեցության փաստը հիմք է հանդիսանում ֆարմակոլոգիական նյարդապաշտպանիչ միացություններ ստեղծելու համար ՊՀ-ի ժամանակ ողնուղեղում պաթոլոգիական պրոցեսների տարածումը արգելակելու կամ կանխելու նպատակով: Ողնուղեղի նեյրոդեգեներացիայի և նեյրոպրոտեկցիայի մեխանիզմների վերաբերյալ ստացված նորագույն տվյալները կարող են ընդգրկվել բժշկական նյարդագիտության և նյարդաբանության դասախոսական նյութերի ցանկերում:

**Ատենախոսության բովանդակությունը և ձևավորման գնահատականը:** Ատենախոսության մեջ ներկայացված են ՊՀ-ի փորձարարական *in vivo* (գճային C57BL/N մկներ, Lewis առնետներ) և *in vitro* (տարբերակված VSC 4.1 մոտոնեյրոններ, SH-SY5Y բջիջներ) մոդելների վրա կատարած, ինչպես նաև ՊՀ-ով ախտորոշված հիվանդների (postmortem) ողնուղեղի նմուշների հետազոտությունների արդյունքները: Ներկայացված տվյալները հստակորեն ապացուցում են ողնուղեղում նեյրոնների, մոտոնեյրոնների և

աքսոննորի դեգեներացիայի փաստը և կալպահինի առանցքային դերը այդ պրոցեսներում:

Ատենախոսության մեջ նշված են հետազոտությունների համար օգտագործված լաբորատոր կենդանիների և բջջային կուլտուրաների տեսակները, նկարագրված են ՊՇ-ն մոդելավորման մոտեցումները, վնասված նեյրոնների և աքսոնների բացահայտմանն դասական կենսաքիմիական մեթոդները, այդ թվում նմուշների իմունոբլոտավորումը և իմունոհիստոքիմիան, քայլվածքի ցուցանիշների թվային գրանցումն ու վերլուծությունը (DigiGait) և մի շարք մեթոդներ, որոնք համապատասխանում են դրված խնդիրների լուծմանը: Ստացված տվյալների վիճակագրական մշակումը ցույց է տալիս, որ դրանք հավաստի են և հիմնավորված:

Վ.Հ. Քնարյանի կողմից կատարված հետազոտությունների արդյունքները լիովին ընդգրկված են ատենախոսության թեմայով հրապարակված 20 գիտական հոդվածներում, որոնցից 15-ը գրախոսվող միջազգային և 5-ը տեղական ամսագրերում: Առանց համահեղինակների աշխատանքների թիվը 4-ն է: Ատենախոսության նյութերը ներկայացվել և քննարկվել են բազաթիվ միջազգային գիտաժողովներում և տպագրվել են գիտաժողովների պարբերականներում (22 թեզիս):

Դոկտորական ատենախոսությունը ձևավորված է դասական ձևով, բաղկացած է ներածությունից, գրական ակնարկից, փորձարարական մասից, հետազոտության արդյունքներից և քննարկումից, վերջաբանից, եզրակացություններից և գրականության ցանկից, որը ներառում է 390 անվանում: Հապավումները և փորձերի ընթացքում օգտագործված հատուկ հակամարմինների ցանկը տեղադրված են սկզբում: Աշխատանքը շարադրված է 209 էջի վրա, պարունակում է 5 աղյուսակ ու 44 նկար:

**Ատենախոսության եզրահանգումները** բխում են փորձերի արդյունքներից, սրամաբանական են և հիմնավորված:

Սեղմագիրը համապատասխանում է ատենախոսության բովանդակությանը: Աշխատանքը շարադրված է գրագետ ռուսերեն լեզվով, սակայն գերծ չէ որոշ թերություններից և վրիպակներից, մանավորապես, տեքստում որոշ կենսաբանական մոլեկուլների անվանումները օգտագործվում են ի ռուսերեն, և անգլերեն լեզուներով: Բացի այդ առաջացել են պարզաբանման կարիք ունեցող որոշ հարցեր, մասնավորապես.

- Աշխատանքում ուսումնասիրվել է ՊՇ-ով ախտորոշված մարդկանց ողնուղեղը հետմահու: Արդյո՞ք հեղինակը ունեցել է մարդու ողնուղեղի նմուշները հետազոտելու թույլտվություն:
- Ի՞նչ հիմունքներով է ՊՇ-ի փորձարարական մոդելը կիրառվել ողնուղեղը ուսումնասիրելու նպատակով:
- Աշխատանքում նշված է, որ սպեկտրինի և նեյրոֆիլամենտի թեթև սպիտակուցի



քայքայումը վկայում է պրոտեզների ակտիվացման մասին: Որո՞նք են նշված սպիտակուցների քայքայման արդյունքում առաջացած միացությունները:

- Ինչո՞վ է բացատրվում այն, որ Cox-2 ֆերմենտը ատենախոսությունում նշվում է որպես բորբոքային գործոն կամ միջնորդ:
- Ատենախոսությունում որպես նյարդապաշտպանիչ օգտագործվել է կալպահինի սինթետիկ ինհիբիտորը՝ կալպեպտինը: Ցանկալի կլիներ նաև նշվեր կալպահինի ներբջջային բնական ինհիբիտորի՝ կալպաստատինի մասին:
- Հստակեցնել, թե ո՞ր դեպքում է կալպահինի և կասպագ-3-ի ակտիվացումը հանգեցնում նեյրոնների կառուցվածքային և ֆունկցիոնալ խանգարումների:
- Ցանկալի կլիներ ուսումնասիրություններ իրականացնել նաև  $\alpha$ -սինուկլեինի կուտակումների առաջացման ուղղությամբ:

### Եզրակացություն

Հաշվի առնելով վերը նշվածը, կարելի է եզրակացնել, որ Վարդուհի Հարությունի Քնարյանի «Նեյրոդեգեներացիայի եվ նեյրոպրոտեկցիայի մեխանիզմները ողնուղեղում փորձարարական Պարկինսոնի հիվանդության ժամանակ» թեմայով դոկտորական ատենախոսական աշխատանքը ավարտուն գիտական ուսումնասիրություն է: Այն ամբողջությամբ բավարարում է ՀՀ-ում գիտական աստիճանաշնորհման կանոնակարգի 8-րդ կետով դոկտորական ատենախոսություններին ներկայացվող պահանջներին, իսկ հեղինակը արժանի է կենսաբանական գիտությունների դոկտորի աստիճանին Գ.00.04 «Կենսաքիմիա» մասնագիտությամբ:

Կարծիքը քննարկվել և հաստատվել է Երևանի Մ. Հերացու անվան պետական բժշկական համալսարանի կենսաքիմիայի ամբիոնի ամբիոնի նիստում 24 սեպտեմբերի 2020 թ. (արձանագրություն թիվ 3):

Նիստի նախագահ,  
ԵՊԲՀ կենսաքիմիայի ամբիոնի վարիչ  
Կ.գ.դ., պրոֆեսոր



Մ.Ի. Աղաջանով

Պրոֆ. Մ.Ի. Աղաջանովի ստորագրությունը հաստատում եմ  
ԵՊԲՀ գիտքարտուղար, բ.գ.դ., պրոֆեսոր



Տ.Գ. Ավագյան