

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ  
ՄՈՒԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՀԱԿՈՔՁԱՆՑԱՆ ԱՆԱՀԻՏ ԱՐՄԵՆԻ

ԿԱՐԳԱՎՈՐԻՉ ՄՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ԳԵՆԵՐԻ ԷՔՍՊՐԵՍԻԱՆ ԵՎ ՕՔՍԻԴԱՅԻՆ  
ԳՈՐԾՆԹԱՑՆԵՐԸ ԾԵՐԱՅՄԱՆ ԵՎ ՈՒՂԵՂԻ ԻՇԵՄԻԿ ԿԱԹՎԱԾԻ ԴԵՊԹՈՒՄ

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

ՍԵՂՄՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ - 2014

---

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

АКОПДЖАНЫН АНАИТ АРМЕНОВНА

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ  
ПРОЦЕССЫ ПРИ СТАРЕНИИ И ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ МОЗГА

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности:  
03.00.03 – “Молекулярная и клеточная биология”

ЕРЕВАН - 2014

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

Գիտական ղեկավար՝ կենս. գիտ. թեկնածու Լ. Մ. Հովսեփյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր Զ. Ա. Կարալյան  
բժշկ. գիտ. դոկտոր Ռ. Ա. Հովհաննիսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի պետական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2014թ. դեկտեմբերի 24-ին, ժամը 13<sup>00</sup>-ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, Փորձարարական կենսաբանության 042 մասնագիտական խորհրդում (0014, Երևան, Հասարկության 7):

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

Սեղմագիրն առաքվել է 2014թ. նոյեմբերի 24-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,  
կենս. գիտությունների թեկնածու



Գ. Մ. Մկրտչյան

---

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

Научный руководитель: кандидат биол. наук Л. М. Овсепян

Официальные оппоненты: доктор биол. наук З. А. Каралян  
доктор мед. наук Р. А. Ованнисян

Ведущая организация: Ереванский государственный университет

Защита диссертации состоится 24 декабря 2014г. в 13<sup>00</sup> часов на заседании специализированного совета 042 по Экспериментальной биологии, в Институте молекулярной биологии НАН РА (РА, 0014, г. Ереван, ул. Асратяна 7).

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

Автореферат разослан 24 ноября 2014г.

Ученый секретарь специализированного совета 042,  
кандидат биол. наук



Г. М. Мкртчян

## Ներածություն

**Թեմայի արդիականությունը:** Ծերացման գործընթացի մեխանիզմների պարզաբանումը մոլեկուլային ու բջջային կենսաբանության արդի հուզող և ուշագրավ խնդիրներից է:

Օրգանիզմի ծերացումն ուղեկցվում է տարիք-կախյալ որոշ ախտաբանական գործընթացների զարգացմամբ, ինչպիսիք են կաթվածներն, ուղեղի արյան շրջանառության և իմունային համակարգի խանգարումները: Վերջին տարիներին դիտվում է նշված հիվանդությունների «երիտասարդացում», նրանցով հիվանդացածության աճ 40-60 տարեկան տիրույթում, ինչը պայմանավորված է ուղեղի տարիքային փոփոխությունների ավելի վաղ զարգացմամբ:

Տարիք-կախյալ հիվանդությունների մեջ յուրօրինակ տեղ են զբաղեցնում գլխուղեղի իշեմիկ ախտահարումները: Կաթվածների մոտ 80%-ը տեղի է ունենում 65 տարեկանից բարձր տարիքի մարդկանց մոտ, ընդ որում տարիքը մեծ ազդեցություն ունի կաթվածի էլքի վրա: Ծեր մարդկանց մոտ կաթվածի զարգացման հավանականության ավելացումը պայմանավորված է ուղեղի տարիքային փոփոխություններով [Baltan S., 2012]: Կաթվածի զարգացման ռիսկի գործոնները, ուղեղի իշեմիկ ախտահարման մեխանիզմները տարբերվում են ծեր և երիտասարդ մարդկանց մոտ: Ծեր հիվանդներին բնորոշ է կաթվածին հաջորդող գործընթացների ավելի ծանր ընթացք:

Ծերացման և կաթվածների զարգացման հիմքում ընդհանուր շատ կետեր կան: Մարդու բջիջների ծերացման մեջ կարևոր են գենետիկական փոփոխությունները և օքսիդային սթրեսը [Goldsmith T.C., 2013; Анисимов В.Н., 2003]: Կաթվածի առաջացումը ևս պայմանավորված է գլխուղեղում օքսիդային սթրեսի զարգացմամբ [Olmez I, Ozyurt H., 2012]: Օքսիդային ռեակցիաները հանգեցնում են բջջային հումեոստազի կարգավորման խանգարմանը, որն էլ նպաստում է հիվանդությունների զարգացմանը կամ ինդուցում վաղաժամ ծերացման գործընթացը [Хавинсон В.Х. и др, 2003; Дубинина Е.Е., 2006]: Ազատ ռադիկալները, առաջանալով զգալի քանակությամբ, մոդիֆիկացնում են բջջի լիպիդները, սպիտակուցները և ժառանգական ապարատը, վերջինս՝ հաճախ անդարձելիորեն [Martin I, Grotewiel M.S., 2006]:

Լիպիդները մասնակցում են ոչ միայն բջջաթաղանթների գործունեությանը, այլև քրոմատինի և քրոմոսոմների մոլեկուլային կազմակերպմանը, ԴՆԹ-ի տրանսկրիպցիայի և ռեպլիկացիայի կարգավորմանը [Martelli A.M. et al, 2005]: Արժեքավոր նշանակություն ունեն սֆինգոլիպիդներն ու գլիկոսֆինգոլիպիդները, ինչպես նաև նրանց հիդրոլիտիկ ճեղքավորման արդյունքներ սֆինգոզինը և ցերամիդը, որոնք բջջում ապոպտոզի միջնորդանյութեր են իրենցից ներկայացնում [Tirodkar T.S., Voelkel-Johnson C., 2012; Mullen T.D., Obeid L.M., 2012]:

Ծերացման հիմնական պատճառներից են իմունային համակարգի ընդհանուր և առանձին օղակների գործունեության խանգարումները: Իմունային համակարգի աշխատանքի խանգարումները նպաստում են ծերունական շատ հիվանդությունների առաջացմանը, որոնցից են սրտանոթային համակարգի ախտաբանությունը, ինֆեկցիոն հիվանդությունները [Larbi A. et al, 2013]:

Ներկայումս լեյկոցիտները դիտարկվում են որպես իշեմիկ կաթվածի թերապևտիկ կանխարգելման թիրախ: Լեյկոցիտների ներթափանցումն ուղեղի միկրոշրջանառությունն զուգորդվում է ադիերենտ թրոմբոցիտների կուտակմամբ, որը հավանաբար բարձրացնում է թրոմբոցիտներին կապվող լեյկոցիտների ցիտոտոքսիկ պոտենցիալը: Գլխուղեղի բորբոքումը և լեյկոցիտների հետագա կուտակումը նպաստում են իշեմիկ կաթվածից հետո ուղեղի վնասվածքի առաջացմանը և զարգացմանը [Yilmaz G., Granger D.N., 2010]:

**Հետազոտության նպատակն ու խնդիրները:** Հետազոտության նպատակն է եղել ուսումնասիրել ուղեղի իշեմիկ կաթվածի (ՌԻԿ) դեպքում և ծերացման ժամանակ դիտվող օքսիդային սթրեսի և ապոպտոզի մակարդակների փոփոխությունները, իմունային համակարգի բջիջների վարքագիծը (այդ բջիջների համար մարկեր ծառայող որոշ գեների (*TBX21*, *GATA3*, *IL23A*, *IL2*, *IL2RG*, *E4FI*, *ANXA11*)) էքսպրեսիայի մակարդակի որոշման միջոցով և համեմատել ստացված տվյալներն առողջ երիտասարդների համանման տվյալների հետ:

Աշխատանքում ուսումնասիրվել են հետևյալ խնդիրները.

1. *TBX21*, *GATA3*, *IL23A*, *IL2*, *IL2RG*, *E4FI*, *ANXA11* գեների իՌՆԹ-ների էքսպրեսիայի մակարդակի ժամանակագրական փոփոխությունները,
2. *TBX21*, *GATA3*, *IL23A*, *IL2*, *IL2RG*, *E4FI*, *ANXA11* գեների իՌՆԹ-ների էքսպրեսիայի մակարդակների համեմատությունն առողջ երիտասարդների ու ծերերի և ՌԻԿ-ով հիվանդների մոտ,
3. Լիմֆոցիտների ապոպտոտիկ ակտիվության փոփոխության աստիճանի գնահատումը ծերերի և ՌԻԿ-ով հիվանդների մոտ,
4. Սպիտակուցների օքսիդային մոդիֆիկացիայի ուսումնասիրությունն երիտասարդների, ծերերի և ՌԻԿ-ով հիվանդների մոտ,
5. Երիտասարդ և ծեր առնետների այրյան մեջ լիպիդների ազատռալիկային օքսիդացման գործընթացների ինտենսիվության (մալոնային երկալդեհիդի պարունակության որոշում) համեմատական գնահատումը,
6. Գլիկոսֆինգոլիպիդների պարունակության և նրանց հիդրոլիտիկ ճեղքավորման արդյունք սֆինգոզինի նյութափոխանակային վերակառուցումների բնույթի ուսումնասիրությունը ծերացման ժամանակ՝ առնետների ուղեղի հյուսվածքում,
7. Երիտասարդ և ծեր առնետների այրյան մեջ, գլխուղեղի հյուսվածքի միտոքոնդրիումային և կորիզային ֆրակցիաներում սպիտակուցների օքսիդային մոդիֆիկացման փոփոխությունների համեմատական գնահատումը:

**Աշխատանքի գիտական նորույթը և գիտազործառնական նշանակությունը:**

Աշխատանքի արդյունքներն ընդարձակում և խորացնում են ծերացման և ՌԻԿ-ի հիմքում ընկած մոլեկուլային-գենետիկական և նյութափոխանակային մեխանիզմների մասին առկա պատկերացումները: Ստացված տվյալները գործնական նշանակություն ունեն բժշկության համար և օգտակար են սպիտակուցների, լիպիդների օքսիդային վնասվածքների բացահայտման

տեսանկյունից, որոնք հիմնականում ուղեկցվում են հյուսվածքների անդառնալի վնասվածքներով:

Այստեղ առաջին անգամ առողջ ծերերի և ՌԻԻԿ-ով հիվանդների մոտ ուսումնասիրվել է *ANXA11* և *E4F1* գեների էքսպրեսիան ծայրամասային արյան սպիտակ բջիջներում: Ցույց է տրվել, որ թեև առողջ երիտասարդների համեմատությամբ սպարպտոզի մակարդակն ավելանում է և՛ ծերերի, և՛ կաթվածով հիվանդների մոտ, այնուամենայնիվ կաթվածով հիվանդների մոտ նրա մակարդակը ավելի ցածր է առողջ ծերերի մակարդակից:

Համեմատվել են *TBX21*, *GATA3*, *IL2*, *IL2RG* և *IL23A* գեների էքսպրեսիաներն առողջ ծերերի և ՌԻԻԿ-ով հիվանդների մոտ: Ուսումնասիրվել են վերը նշված բոլոր գեների էքսպրեսիայի մակարդակների ժամանակագրական փոփոխություններն առողջ պոպուլյացիայում, ինչը թույլ է տալիս գնահատել իմունային համակարգում տարիքի մեծացման հետ զուգահեռ տեղի ունեցող փոփոխությունները և տարբերակել հիվանդություններով պայմանավորված խանգարումները տարիք-կախյալ փոփոխություններին:

*GATA3*-ի, *IL2*-ի և *ANXA11*-ի էքսպրեսիայի վերաբերյալ աշխատանքում ստացված տվյալները կարող են նպաստել ՌԻԻԿ-ի պիտոքոզման, հիվանդության ընթացքին հետևելու նոր մոտեցումների մշակմանը, ինչպես նաև այդ հիվանդության բուժման մեջ նոր դեղամիջոցների ներմուծմանը՝ թիրախ հանդիսանալով վերջիններիս համար:

**Աշխատանքի նախապաշտպանությունը:** Աշխատանքը ներկայացվել և քննարկվել է «Մոլեկուլային և բջջային կենսաբանության զարգացման հեռանկարներ II, III, IV» երիտասարդ գիտնականների միջազգային կոնֆերանսներում (Հայաստան, 2010, 2012, 2013), Իմունաբանության 15-րդ միջազգային կոնգրեսում (Իտալիա, 2013), «Երիտասարդների ավանդը կենսատեխնոլոգիայի զարգացման գործընթացում» երիտասարդ գիտնականների 2-րդ միջազգային գիտաժողովում (Հայաստան, 2013):

**Հրատարակումներ:** Աշխատանքի արդյունքները ներկայացվել են 8 գիտական աշխատություններում:

**Աշխատանքի կառուցվածքը և ծավալը:** Աշխատանքը շարադրված է 134 տպագրական տեքստի էջերի վրա, պարունակում է 5 աղյուսակ և 28 նկարներ, կազմված է օգտագործված հապավումների ցանկից, ներածությունից, գրական ակնարկից, հետազոտության նյութեր և մեթոդներ մասից, հետազոտության արդյունքներից և քննարկումներից, ամփոփումից, եզրակացություններից և ցիտված գրականության ցանկից: Գրական ակնարկում բերված են գրականությունում առկա տվյալները ծերացման, ՌԻԻԿ-ի, ինչպես նաև նրանցում օքսիդային սթրեսի և իմունային համակարգի նշանակության մասին: «Հետազոտության նյութեր և մեթոդներ» գլխում ներկայացված են հետազոտության մեջ օգտագործված օբյեկտներն ու մեթոդները: «Հետազոտության արդյունքներ և քննարկումներ» գլուխը կազմված է երեք մասից, որոնցում ներկայացված են հետազոտության արդյունքները: Ստացված տվյալների հիման վրա կատարվել են 7 եզրակացություններ: Գրականության ցանկը պարունակում է 231 աղբյուր:

## ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

**Հետազոտության օբյեկտները:** Ուսումնասիրությունն իրականացվել է երիտասարդ ու միջին տարիքի (միջին տարիք $\pm$ SE=37.43 $\pm$ 1.05, 76 մարդ, որից՝ 44 կին, 32 տղամարդ, տարիքային սահման՝ 20-54), ծեր առողջ (միջին տարիք $\pm$ SE=66.71 $\pm$ 1.5, 35 մարդ, որից՝ 22 կին, 13 տղամարդ, տարիքային սահման՝ 57-85) և ՈՒԻԿ-ով հիվանդ մարդկանց (միջին տարիք $\pm$ SE=71.96  $\pm$ 1.5, 63 մարդ, որից՝ 32 կին, 31 տղամարդ, տարիքային սահման՝ 42-89), ինչպես նաև երիտասարդ ու ծեր առնետների վրա: Առողջ 40-89 տարեկան մարդկանց խմբում 68 մարդ է ընդգրկվել (45 կին, 23 տղամարդ, միջին տարիք $\pm$ SE=55.88 $\pm$ 1.55):

Հետազոտության օբյեկտ են հանդիսացել մարդու արյան պլազման ու սպիտակ բջիջները, առնետների արյան շիճուկն, ուղեղի ընդհանուր հյուսվածքը և ուղեղի հյուսվածքի միտոքոնդրիումային ու կորիզային ֆրակցիաները: ՈՒԻԿ-ի պատրոշումն իրականացվել է՝ հիմնվելով հիվանդության պատմության և նյարդաբանական հետազոտությունների վրա, և հաստատվել ուղեղի համակարգչային տոմոգրաֆիայի պատկերներով: Կաթվածի ենթատեսակի դասակարգումն իրականացվել է ըստ TOAST-ի որոշիչի [Adams H.P. Jr. et al, 1993]:

Ուսումնասիրության ընթացքում մարդկանց առողջ և ՈՒԻԿ-ով հիվանդ պոպուլյացիաները բաժանվել են տարիքային ենթախմբերի 10 տարվա կտրվածքով:

Առնետների վրա կատարվող փորձերում օգտագործվել են երիտասարդ (4-7 ամսեկան) և ծեր (25 և ավել ամսեկան) սպիտակ ոչ գծային առնետներ:

**Արյան պլազմայի և շիճուկի ստացումը:** Արյան պլազման անջատվել է ԷԵՔՔ-ով (Էթիլեն երկամին քառաքացայաթթու) մշակված ամբողջական արյունից, իսկ շիճուկը՝ առնետի ամբողջական (քիմիական նյութերով չմշակված) արյունից ցենտրիֆուգմամբ (250g $\times$ 10ր):

**Միտոքոնդրիումների և կորիզների անջատումն ուղեղի հյուսվածքի բջիջներից:** Միտոքոնդրիումների և կորիզների անջատումն իրականացվել է ուղեղի հոմոգենացված հյուսվածքից 2 փուլով:

**Սպիտակուցների օքսիդային մոդիֆիկացման որոշումը:** Սպիտակուցների օքսիդային մոդիֆիկացիան ուսումնասիրվել է 2,4-երկնիտրոֆենիլհիդրազինի (ԵՆՖՀ) ածանցյալների կլանման սպեկտրի չափմամբ (356նմ, 370նմ, 430նմ և 530նմ) Լևինի մեթոդով [Levine R.L. et al, 1990]:

**Մալոնային երկալդեհիդի (ՄԵԱ) որոշումը:** ՄԵԱ-ի կլանումը չափվել է 532նմ-ում [под ред. Ореховича В.Н., 1977]:

**Սուլֆոզալակտոզիլցերամիդների (ՍԳալՑեր) ու գալակտոզիլցերամիդների (ԳալՑեր) և սֆինգոզինի քանակության գնահատումը:** ՍԳալՑեր-երի քանակությունը գնահատվել է ըստ սուլֆատային խմբի (կլանումը 640նմ-ում), իսկ ԳալՑեր-երի քանակությունը՝ ըստ ածխաջրային պարունակության (կլանումը 505նմ-ում): Փորձանմուշների կլանման հաշվարկը կատարվել է ստուգիչ լուծույթի կլանման նկատմամբ:

ԳալՑեր-երի և ՍԳալՑեր-երի ընդհանուր լուծույթում սֆինգոզինի (ԳալՑեր-երի և ՍԳալՑեր-երի բաղկացուցիչ մաս) քանակական գնահատումն իրականացվել է

415մ-ում քրոմատոգրաֆիայի միջոցով անջատված էթիլացետատի կլանման չափամաք [под ред. Прохоровой М.И., 1982]:

**Արյան սպիտակ բջիջների անջատում:** Արյան սպիտակ բջիջների անջատումը կատարվել է ԷԵՔՔ-ով մշակված 2-4մլ արյունից: Անջատման համար էրիթրոցիտները լիզիսի են ենթարկվել համապատասխան լիզիս բուֆերով (155 մՄ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 մՄ  $\text{KHCO}_3$  և 0.1 մՄ  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH7.4, արյուն:բուֆեր=1:3 հարաբերությամբ): Լեյկոցիտների ստացված նստվածքը վերասուսպենզվել է 50մկլ ֆոսֆատային բուֆերային լուծույթ (PBS, phosphate buffered saline, նատրիումի ֆոսֆորական բուֆեր, pH=7.4) և 150մկլ RNAlater (Ambion®, Austin, TX, USA) (ՌՆԹ կայունացնող ռեագենտ) պարունակող լուծույթում ու պահվել  $-20^\circ\text{C}$ -ում՝ մինչև ՌՆԹ-ի հետագա անջատումը:

**Լեյկոցիտներից ՌՆԹ-ի անջատման մեթոդ:** Լեյկոցիտներից ՌՆԹ-ի անջատումը կատարվել է Roche ֆիրմայի High Pure miRNA Isolation Kit կիսով (Roche, Cat. No. 05 080 576 001)՝ համաձայն ամբողջական (total) ՌՆԹ-ի անջատման համար նախատեսված արձանագրության: Անջատված ամբողջական ՌՆԹ-ին ավելացվել է 2մկլ RNaseOUT-ի (ռիբոնուկլեազի ռեկոմբինասոն ինհիբիտոր) լուծույթ: ՌՆԹ-ի լուծույթը պահվել է  $-80^\circ\text{C}$ -ում:

**կԴՆԹ-ի ստացման մեթոդ:** կԴՆԹ-ի ստացման համար կիրառվել է հետադարձ տրանսկրիպցիայի մեթոդը՝ Reverse-iT RTase Blend-ի (ABgene, Epsom, UK) օգտագործմամբ: Ստացված կԴՆԹ-ն պահվել է  $-20^\circ\text{C}$ -ում:

**ՌՆԹ-ի էքսպրեսիայի մակարդակի գնահատումը իրական ժամանակի ՊՇՌ-ի միջոցով:** ՌՆԹ-ի էքսպրեսիայի մակարդակի գնահատումն իրականացվել է իրական ժամանակի պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի (ՊՇՌ՝ PCR) միջոցով: Որպես ռեֆերենս գեն օգտագործվել է *PSMB2*-ը (աջ պրայմեր՝ 5'-agggtggcagattcaggatg, ձախ պրայմեր՝ 5'-agaggcagtggaactcctt): *GATA3* (աջ պրայմեր՝ 5'-gtctgacagttcgcacagga, ձախ պրայմեր՝ 5'-ctattaagcccaagcgaag), *IL2* (աջ պրայմեր՝ 5'-aagtgaagatttttgccttgagc, ձախ պրայմեր՝ 5'-aggccacagaactgaaacatc), *IL2RG* (աջ պրայմեր՝ 5'-gctgggattcactcagttgt, ձախ պրայմեր՝ 5'-gacaggccacacagatgcta), *IL23A* (աջ պրայմեր՝ 5'-agctctgcctgagctgtc, ձախ պրայմեր՝ 5'-ctggggagcagagctgtaat), *ANXA11* (աջ պրայմեր՝ 5'-tcttccccagacacacac, ձախ պրայմեր՝ 5'-ggccttctgctgcttcata) գեների էքսպրեսիայի գնահատման համար օգտագործվել են Roche ֆիրմայի պրայմերները, *E4F1*-ի (աջ պրայմեր՝ 5'-agaggagccatcactgt, ձախ պրայմեր՝ 5'-tcaccgtctcccagctc) և *PSMB2*-ի համար IDT ֆիրմայի պրայմերները, իսկ *TBX21*-ի համար՝ Applied Biosystems-ի պրայմերները: Real-time PCR-ը կատարվել է RotorGene 3000 system սարքով (Corbett Research, Sydney, Australia): Հարաբերական էքսպրեսիան հաշվարկվել է երկրորդային ածանցյալի մեթոդով (RotorGene Software 6.1.71, Corbett Research):

**Ստացված արդյունքների վիճակագրական մշակում:** Սպիտակուցների և լիպիդների ուսումնասիրության արդյունքում ստացված տվյալները, ինչպես նաև ուսումնասիրված խմբերի տարիքը, ներկայացվում են միջիններով՝ միջին արժեք  $\pm$  ստանդարտ սխալ  $\text{mean (M)} \pm \text{SE}$ , տեսքով, իսկ իՌՆԹ-ի ուսումնասիրության արդյունքները՝ մեդիանների տեսքով: Հետազոտվող խմբերի միջև ուսումնասիրված ցուցանիշների առկա տարբերությունների զգալիությունը տարորոշելու համար օգտագործվել է Մանն-Ուիթնիի Ս-թեստը: Ստացված արդյունքների

պարամետրիկությունն որոշվել է Կոլմոգորով-Սմիրնովի թեստով: Տվյալների միջև կորելացիան որոշվել է ըստ Սպիրմանի կորելացիայի գործակցի: Հաշվարկներն իրականացվել են SPSS 13.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) և GraphPad Prism5 ծրագրերով:  $p < 0.05$  համարվել է զգալի:

## ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԸ

### 1.2 Ծերացման ժամանակ օրգանիզմի իմունային համակարգում տեղի ունեցող փոփոխությունները

**1.2 Th1, Th2 և Th17 իմունային բջիջները և ձերացումը:** Քանի որ ձերացման ժամանակ Th բջիջների ենթախմբերի դիֆերենցման և ձերացող օրգանիզմում այդ ենթախմբերի քանակությունների վերաբերյալ առկա տեղեկատվությունը հակասական է, աշխատանքում փորձ է արվել պարզել Th1, Th2 և Th17 բջիջների քանակության փոփոխությունները ձերացման ժամանակ՝ չափելով նրանց համար մարկեր հանդիսացող TBX21 (Th1 բջիջներ), GATA3 (Th2 բջիջներ) և IL23A (Th17 բջիջներ) գեների իՌՆԹ-ների էքսպրեսիայի մակարդակներն առողջ պոպուլյացիայի երիտասարդ և ձեր տարիքային խմբերում: Ուսումնասիրվել է նաև նրանց ժամանակագրական փոփոխություններն ավելի նեղ ժամանակային կտրվածքներով:

Երիտասարդների հետ համեմատած՝ ձերերի մոտ TBX21-ի և IL23A-ի էքսպրեսիայի մակարդակները զգալիորեն նվազել են (նկ. 1): Կանանց ենթախմբում զգալիորեն նվազում է միայն IL23A-ի էքսպրեսիայի մակարդակը ( $p < 0.05$ ,  $p = 0.0023$ ), իսկ տղամարդկանց մոտ IL23A-ի և TBX21-ի:

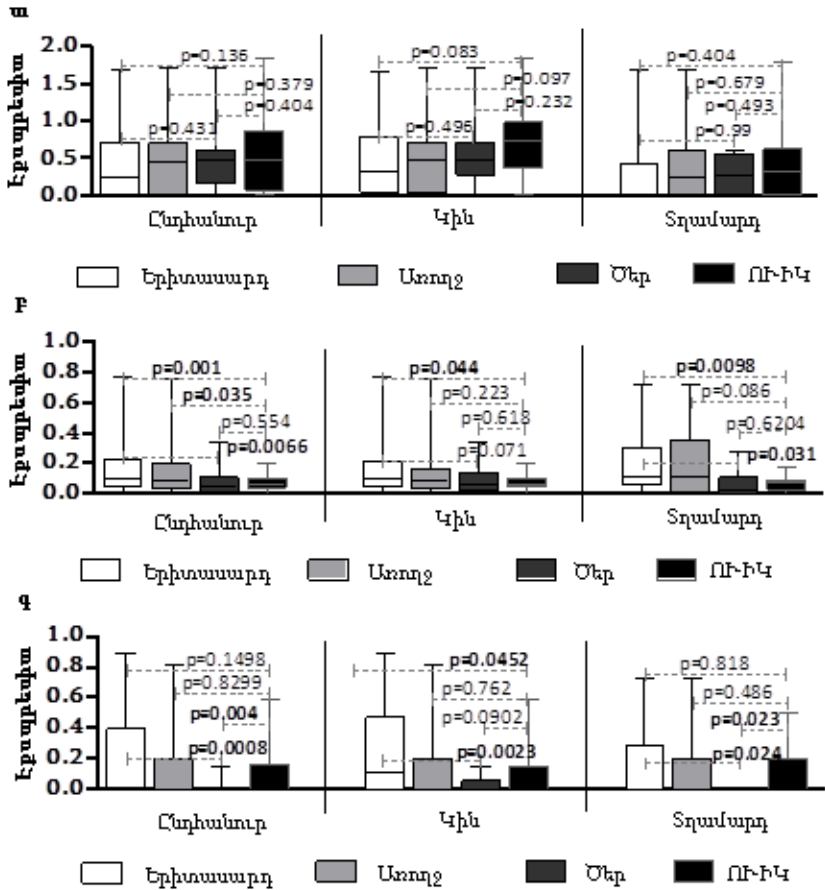
Th1, Th2 և Th17 բջիջների առավելագույն քանակությունը դիտվում է 40-49 տարեկան տարիքային տիրույթում: Th1 և Th17 բջիջներ համար երկրորդ առավելագույն արժեքը գրանցվում է 80-89 տարեկան տարիքային տիրույթում, որտեղ Th2 բջիջները նվազագույն քանակություն են ապահովում (նկ. 4):

Կանանց մոտ GATA3-ի և IL23A-ի էքսպրեսիայի նվազագույն արժեքը 50-59 տարեկան տարիքային տիրույթում, իսկ TBX21-ի էքսպրեսիայի նվազագույն արժեքը՝ 60-69: Տղամարդկանց մոտ ևս 50-59 տարեկան տարիքային տիրույթը բնութագրվում է այդ երեք գեների էքսպրեսիայի կտրուկ անկմամբ: Դա ցույց է տալիս, որ ձերացման գործընթացների զարգացման մեջ այդ տարիքային սահմանը բեկումնային է երկու սեռերի ներկայացուցիչների համար:

Բոլոր տարիքային խմբերում նշված գեների էքսպրեսիայի, հետևաբար նաև այդ գեներով պայմանավորված իմունային բջիջների՝ սեռից կախված տարբեր քանակությունը պայմանավորում են նրանց հիվանդությունների նկատմամբ նախատրամադրվածության տարբեր աստիճանները և հիվանդությունների նկատմամբ պայքարի ոչ միանման ինտենսիվություններն ու ուղիները:

Ըստ Սպիրմանի կորելացիոն բանաձևի (քանի որ ուսումնասիրված գեների բաշխվածությունը Գաուսյան կորի համաձայն չէ՝ GATA3-ի, TBX21-ի և IL23A-ի միջև առկա է դրական կորելացիա (GATA3-TBX21՝  $\rho = 0.254$ ,  $p = 0.005$ ; GATA3-IL23A՝  $\rho = 0.326$ ,  $p = 1.2 \times 10^{-4}$ ): Դա ցույց է տալիս, որ այդ երեք գեների էքսպրեսիաների ավելացումը և նվազումը միմյանց հետ փոխկապված են դրականորեն. մեկի նվազումը հանգեցնում է մյուսների նվազմանը և հակառակը:





Նկար 1. ՈՒԻԿ-ով հիվանդ պարուլյացիայում *GATA3* (ա), *TBX21* (բ) և *IL23A* (գ) գեների իՌՆԹ-ի էքսպրեսիայի մակարդակների համեմատումն առողջ պարուլյացիայի երիտասարդ ու ծեր ենթախմբերում, ինչպես նաև հիվանդներին համարժեք տարիքի առողջ ենթախմբում այդ գեների էքսպրեսիայի մակարդակների հետ:

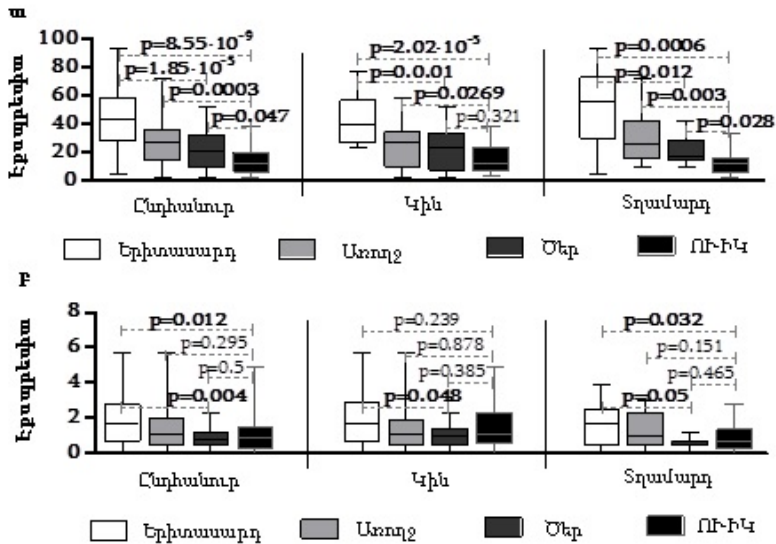
Կանանց և տղամարդկանց մոտ *GATA3*-ի և *TBX21*-ի միջև կորելացիայի տարբերությունները պայմանավորում են կանանց մոտ Th1 և Th2 բջիջների տարիքի հետ փոխկապակցված, իսկ տղամարդկանց մոտ՝ չփոխկապակցված փոփոխությունները (կիև՝  $\rho=0.28$ ,  $p=0.025$ ; տղամարդ՝  $\rho=0.259$ ,  $p=0.102$ ):

Ծեր տարիքում իմունային բջիջների ենթապարուլյացիաների քանակության տատանումը հավանաբար նպաստում է տարբեր հիվանդությունների նկատմամբ ծերերի դիմադրողականության անկմանը:

**1.2 IL2-ը և IL2RG-ն ծերացման գործընթացում:** Քանի որ ծերացմանը զուգընթաց մեր ուսումնասիրած T բջիջների ենթախմբերից որոշների քանակության նվազում է գրանցել, ապա փորձել ենք պազել IL2 և IL2RG գեների իՌՆԹ-ների էքսպրեսիաների տարբերությունը երիտասարդ և ծեր ենթապոպուլյացիաների միջև:

Հայտնի է, որ առանց IL2-IL2R ալֆա-բետա համալիրի հետ IL2RG-ի կապմանը T բջիջների պրոլիֆերացման համար անհրաժեշտ կայուն մակրոմոլեկուլային IL2/IL2R համալիրը չի ձևավորվում [Rickert M. et al, 2004]:

Տարիքի մեծացմանը զուգընթաց IL2-ի և IL2RG-ի էքսպրեսիայի մակարդակները զգալիորեն նվազում են (նկ. 2): Դա ցույց է տալիս, որ T բջիջների պրոլիֆերացիան ծերերի մոտ նվազում է՝ մեծացնելով ծեր օրգանիզմների զգայունությունը հիվանդությունների նկատմամբ: Կանանց և տղամարդկանց ենթախմբերում պատկերը, ընդհանուր առմամբ, կրկնվում է (նկ. 2):



*Նկար 2. ՌԻԻԿ-ով հիվանդ պոպուլյացիայում IL2 (ա) և IL2RG (բ) գեների իՌՆԹ-ի էքսպրեսիայի մակարդակների համեմատումն առողջ պոպուլյացիայի երիտասարդ ու ծեր ենթախմբերում, ինչպես նաև հիվանդներին համարժեք տարիքի առողջ ենթախմբում այդ գեների էքսպրեսիայի մակարդակների հետ:*

Առողջ պոպուլյացիայի ժամանակագրական ուսումնասիրությունից ակնհայտ է, որ IL2-ի և IL2RG-ի էքսպրեսիաներն իրենցից ներկայացնում են էքսպոնենցիալորեն մարող կորեր (նկ. 4): Գրականության մեջ նշվում է, որ IL2-ը պաշտպանում է բջիջներն ապոպտոզից [Ginaldi L. et al, 2004]: Այստեղից և մեր տվյալներից կարելի է եզրակացնել, որ տարիքի մեծացմանը զուգընթաց ավելանում է ծայրամասային արյան սպիտակ բջիջների ապոպտոզի մակարդակը: IL2-ի քանակության նվազումն ազդում է նաև ԲՄ բջիջների վրա:

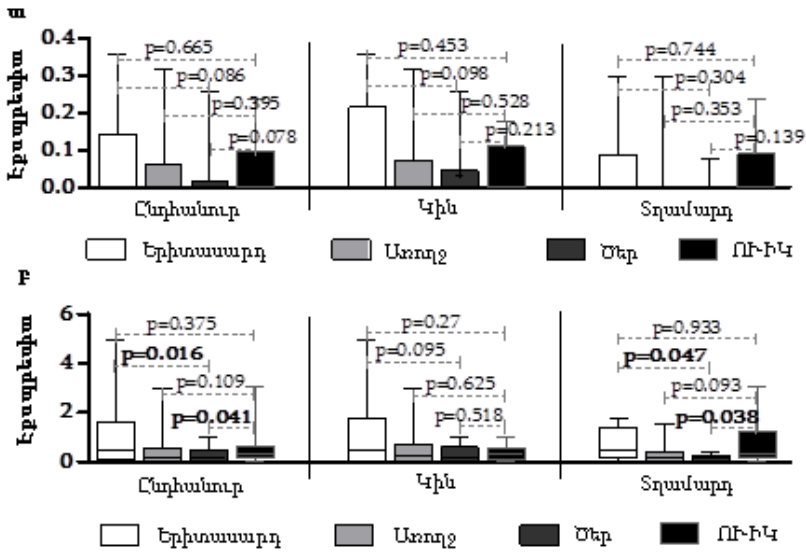
Th1 տեսակի բջիջները հիմնականում արտադրում են IL2 [Sakata-Kaneko S. et al, 2000; Lefebvre J.S., Haynes L., 2012], և IL2-ը, ինչպես TBX21-ը, անհրաժեշտ է Th1 բջիջների ակտիվացման համար [Dybkaer K. et al, 2007]: Սա ևս ցույց է տալիս, որ Th1 բջիջների քանակությունը տարիքի հետ նվազում է:

Ըստ Սպիրմանի կորելացիայի բանաձևի՝ IL2-ի և IL2RG-ի միջև առկա է դրական կորելացիա ( $\rho=0.411$ ,  $p=0.001$ ), ինչը հաստատում է IL2-ի և IL2RG-ի նկ. 4-ում դիտվող փոխկապված փոփոխությունները 40-79 տարեկան տարիքային տիրույթում: Դրական կորելացիա է առկա այդ գեների և TBX21-ի միջև (IL2-TBX21՝  $\rho=0.259$ ,  $p=0.026$ ; IL2RG-TBX21՝  $\rho=0.438$ ,  $p<0.001$ ), ինչը փաստում է Th1 բջիջների առաջացման և ակտիվացման համար այդ բոլոր երեք գեների առկայության անհրաժեշտությունը:

Ընդհանուր առմամբ, ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ մարդկանց մոտ տարիքի հետ ծայրամասային արյան սպիտակ բջիջների քանակությունը նվազում է: Դրա մասին է վկայում IL2-ի բացասական կորելացիան տարիքի հետ ( $\rho=-0.609$ ,  $p<0.001$ ):

**1.3 E4F1 և ANXA11 գեները և ձերացումը:** Քանի որ մեր

ուսումնասիրությունում տարիքի հետ իմունային բջիջների քանակությունը նվազում է, սպա փորձել ենք պարզել այդ բջիջներում ապոպտոզի և սենեսցենսի մակարդակը՝ E4F1-ի և ANXA11-ի էքսպրեսիայի գնահատման միջոցով (նկ. 3):



Նկար 3. ՈՒԻԳ-ով հիվանդ պոպուլյացիայում E4F1 (ա) և ANXA11 (բ) գեների իՆՆԹ-ի էքսպրեսիայի մակարդակների համեմատումն առողջ պոպուլյացիայի էրիտասարդ ու ձեր ենթախմբերում, ինչպես նաև հիվանդներին համարժեք տարիքի առողջ ենթախմբում այդ գեների էքսպրեսիայի մակարդակների հետ:

Ընդհանուր պոպուլյացիայում և տղամարդկանց մոտ *ANXA11* գենի էքսպրեսիայի մակարդակը (նկ. 3բ) տարիքի հետ զգալիորեն նվազում է ( $p < 0.05$ ): Դա ցույց է տալիս, որ տարիքի մեծացմանը զուգընթաց զգալիորեն ավելանում է ապոպտոզի մակարդակը, ինչը հանգեցնում է տարիքի մեծացմանը զուգընթաց տարբեր հիվանդությունների առաջացմանն ու զարգացմանը: Այս տվյալները համընկնում են *IL2*-ի համար ստացված տվյալների հետ:

Մեր փորձում *E4F1*-ի էքսպրեսիայի մակարդակի զգալի փոփոխություններ չեն գրանցվել:

Ըստ Մայիրանսի՝ տարիքի և *ANXA11*-ի միջև առկա է բացասական կորելացիա ( $\rho = -0.38$ ,  $p = 0.001$ ), իսկ *E4F1*-ի էքսպրեսիայի և տարիքի միջև կորելացիա չկա ( $\rho = 0.02$ ,  $p = 0.842$ ): *IL2*-ի, *IL2RG*-ի հետ *ANXA11*-ի դրական կորելացիան (*IL2-ANXA11*՝  $\rho = 0.571$ ,  $p < 0.001$ , *IL2RG-ANXA11*՝  $\rho = 0.402$ ,  $p < 0.001$ ) ցույց է տալիս, որ այդ երեք գենների էքսպրեսիայի ավելացումը և նվազումն իրականացվում են զուգահեռաբար, ինչից կարելի է եզրակացնել, որ Th, նաև ԲՄ բջիջների քանակության ավելացումը և ապոպտոզի արագության անկումը տեղի են ունենում միաժամանակ: Դա ակնհայտ է նաև այդ գենների ժամանակագրական կորերի համեմատումից:

Մեր տվյալներից կարելի է եզրակացել, որ *E4F1*-ի ազդեցությամբ բջիջների առաջացման արագության անկում տեղի չի ունենում, և բջիջների քանակության փոփոխմանը մասնակցում է միայն *ANXA11*-ն՝ ապահովելով տարիքի հետ ապոպտոզի մակարդակի ավելացումը և նպաստելով օրգանիզմի հումեստազի խախտմանը:

## **2. ՈՒԻԿ-ի ժամանակ օրգանիզմի իմունային համակարգում տեղի ունեցող փոփոխությունները**

Քանի որ կաթվածը հանգեցնում է T բջիջների ակտիվացմանը [Vogelgesang A. et al, 2010], միաժամանակ, ինդուցում լիմֆոցիտների անմիջական կորուստ [Urra X. et al, Stroke, 2009; Urra X. et al, 2009; Prass K. et al, 2003], փորձել ենք ուսումնասիրել ՈՒԻԿ-ի ժամանակ օրգանիզմում իմունային համակարգում տեղի ունեցող փոփոխությունները:

**2.1 *Th1*, *Th2* և *Th17* բջիջներն իշեմիկ կաթվածի ժամանակ:** Աշխատանքում ուսումնասիրվել են *GATA3*, *TBX21* և *IL23A* գենների էքսպրեսիայի մակարդակի փոփոխություններն իշեմիկ կաթվածով հիվանդների մոտ՝ կաթվածին հաջորդող առաջին երկու օրվա ընթացքում: Հիվանդների տվյալները համեմատվել են առողջ երիտասարդ և ծեր, ինչպես նաև հիվանդներին տարիքով համարժեք առողջ մարդկանց ենթապոպուլյացիաների տվյալների հետ՝ ընդհանուր խմբում, կանանց և տղամարդկանց ենթախմբերում (նկ. 1):

Ընդհանուր խմբում, կանանց և տղամարդկանց ենթախմբերում առողջ երիտասարդների հետ համեմատած իշեմիկ կաթվածով հիվանդների մոտ *TBX21*-ի էքսպրեսիված քանակությունը զգալիորեն նվազել է (նկ. 1բ): Բոլոր դեպքերում ծեր առողջների և իշեմիկ կաթվածով հիվանդների մոտ *TBX21*-ի էքսպրեսիայի մակարդակը չի տարբերվում զգալիորեն, իսկ ընդհանուր առողջ պոպուլյացիայում և առողջ տղամարդկանց ենթախմբում երիտասարդների հետ համեմատած ծերերի

մոտ դիտվում է նրա էքսպրեսիայի զգալի անկում: Այստեղից կարելի է ընդունել, որ կաթվածի ժամանակ *TBX21*-ի էքսպրեսիայի մակարդակի անկումը պայմանավորված է ծեղացման գործընթացով, այլ ոչ թե բուն կաթվածով:

Ընդհանուր խմբում և տղամարդկանց ենթախմբում *IL23A*-ի էքսպրեսիայի մակարդակը (նկ. 1գ) ՌԻԿ-ով հիվանդների մոտ զգալիորեն բարձր է ծեղերի մոտ գրանցված մակարդակից ( $p < 0.05$ ): Առողջ երիտասարդների հետ համեմատելիս ակնհայտ է, որ այն պայմանավորված է բուն կաթվածի գործընթացներով:

Ժամանակագրական ուսումնասիրության արդյունքում ստացված պատկերը հետաքրքիր է (նկ. 4): *GATA3*-ի էքսպրեսիայի փոփոխությունները կամ պատճառ են հանդիսացել կաթվածի համար, կամ առաջացել են նրա հետևանքով: *TBX21*-ի էքսպրեսիան կաթվածով հիվանդների մոտ իր նվազագույն մակարդակում է: Հիվանդների մոտ *IL23A*-ի (նկ. 4գ) էքսպրեսիայի առավելագույն արժեքը գրանցվել է 50-59 տարեկան տարիքային տիրույթում, իսկ նվազագույնը՝ 60-89:

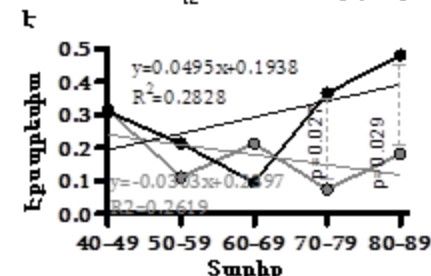
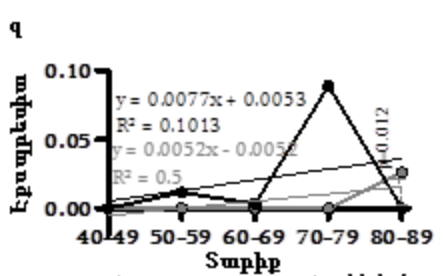
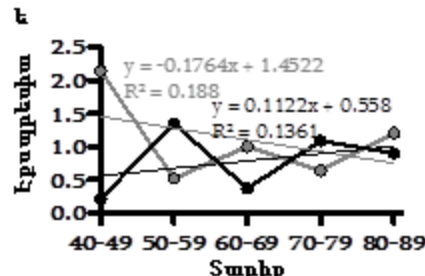
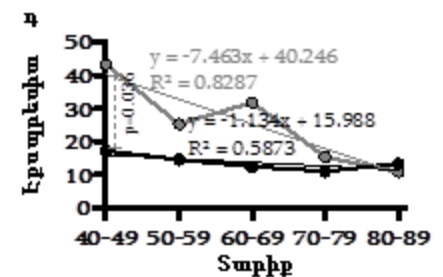
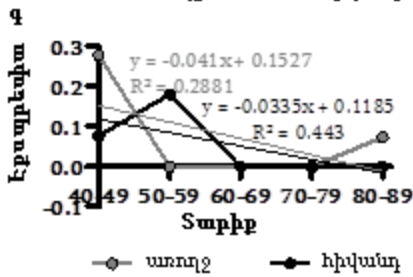
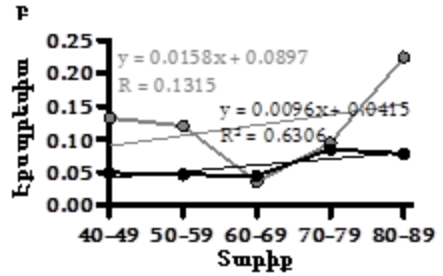
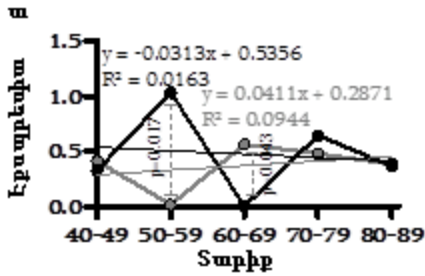
Ուսումնասիրության տվյալները ցույց են տալիս, որ Th1, Th2 և Th17 բջիջների ընդհանուր սպեկտրի ժամանակագրական փոփոխությունները կաթվածով հիվանդների խմբում հակադրվում են առողջ մարդկանց խմբում գրանցված այդ բջիջների ժամանակագրական փոփոխություններին (նկ. 4): Դա հասկապես վերաբերվում է Th1 և Th2 բջիջներին: Այդ փոփոխությունները կարող են պատճառ հանդիսանալ կաթվածի համար, կամ նրանք կաթվածի հետևանք են:

Հիվանդների բոլոր տարիքային խմբերում մեր ուսումնասիրած երեք բջջային զծերի ընդհանուր ֆոնի վրա հարաբերաբար կայուն է մնում Th1 բջիջների քանակությունը (նկ. 4բ), իսկ Th2 բջջային ենթախումբը ենթարկվում է մեծ տատանումների:

Ըստ ժամանակագրական տվյալների՝ կաթվածից հետո զոյատևելու համար ամենաբարդ տարիքային տիրույթը 60-69 տարեկան տարիքային հասվածն է, որտեղ ուսումնասիրվող Th2 և Th17 բջիջների քանակությունը համարյա զրոյական է, իսկ Th1-ինը՝ համեմատաբար կայուն (1.27 անգամ ավել նույն տարիքային խմբի առողջների Th1 բջիջների քանակությունից): Տարիքային այդ խմբում օրգանիզմի իմունային պաշտպանության ողջ ծանրությունն ընկնում է Th1 բջջների խմբի վրա, իսկ օրգանիզմը նման պայմաններում խիստ զգայուն է դառնում կաթվածի հետևանքների նկատմամբ (նկ. 4):

Այսպիսով, կաթվածին հաջորդող առաջին երկու օրվա ընթացքում Th1 և Th2 բջիջների քանակության մեծ փոփոխություններ են գրանցվում: Ժամանակագրական ուսումնասիրության տեսանկյունից այդ փոփոխությունները առողջ մարդկանց մոտ ստացված տվյալների համեմատությամբ կայուն, հաստատուն ու նմանատիպ բնույթ չեն կրում: Միակ ակնհայտ օրինաչափությունն այն է, որ յուրաքանչյուր տարիքային խմբում հիվանդների մոտ Th1/Th2 հարաբերությունը հակադարձ է առողջների նույն հարաբերությանը:

**2.2 *IL2* և *IL2RG* գեների էքսպրեսիան իջեմիկ կաթվածի ժամանակ:** Մեր ուսումնասիրության մեջ հիվանդների խմբում *IL2*-ի էքսպրեսիան զգալիորեն ցածր է առողջ երիտասարդների, ծեղերի և համարժեք տարիքի առողջների ենթախմբերի մոտ գրանցված էքսպրեսիայից (նկ. 2ա):



Նկար 4. 40-89 տարեկան տարիքային տիրույթում GATA3 (ա), TBX21 (բ), IL23A (գ), IL2 (դ), IL2RG (ե), E4F1 (զ) և ANXA11 (է) գեների իՌՆԹ-ների էքսպրեսիան առողջ և հիվանդ պոպուլյացիաներում:

Դա նշանակում է, որ հիվանդների խմբում T բջիջների պրոլիֆերացիան խիստ նվազում է, այսինքն՝ T բջիջների ֆունկցիան խիստ վնասված է:

ՈՒԻԿ-ով հիվանդների մոտ արյան շրջանառության մեջ T բջիջների քանակության անկումը վկայող տվյալները կարող են պայմանավորված լինել ոչ միայն T բջիջների պրոլիֆերացման անկմամբ, այլև դեպի ուղեղի վնասված հատված նրանց ներհոսքով: Բացի այդ, այդ բջիջների ապոպտոզի մակարդակի բարձրացումը և սենեսցենսի ավելացումը ևս հավանական են ՈՒԻԿ-ով հիվանդների մոտ:

Հիվանդների մոտ *IL2RG*-ի (նկ. 2բ) էքսպրեսիայի զգալի անկում գրանցվել է միայն երիտասարդ առողջների հետ համեմատելիս (ընդհանուր խմբում և տղամարդկանց ենթախմբում, սակայն ոչ կանանց ենթախմբում): Ակնհայտ է, որ *IL2RG*-ի փոփոխությունը տարիք-կախյալ է և պայմանավորված չէ գուտ ՈՒԻԿ-ով, ի տարբերություն *IL2*-ի, որտեղ ՈՒԻԿ-ն իր ուրույն ազդեցությունն ունի էքսպրեսիայի մակարդակի նվազման վրա:

Ժամանակագրական ուսումնասիրությունից (նկ. 4) պարզ երևում է, որ հիվանդների խմբում *IL2*-ը համեմատաբար կայուն է ողջ տարիքային տիրույթում. նրա առավելագույն արժեքը գրանցվել է 40-49 տարեկան տարիքային տիրույթում: *IL2RG*-ի տարիքային տատանման ամպլիտուդը բավականին մեծ է իշեմիկ կաթվածով հիվանդների մոտ:

Հիվանդների խմբում *IL2RG*-ի և *IL2*-ի ժամանակագրական փոփոխությունները ժամանակագրական փոփոխությունները իրար նկատմամբ հակադիր են: *IL2RG*-ի նշված փոփոխությունները հայելայնորեն հակադրվում են նաև առողջ պոպուլյացիայում նույն տարիքային տիրույթներում գրանցված արժեքներին (նկ. 4ե):

Հիվանդների մոտ *IL2RG*-ի էքսպրեսիայի մակարդակը, լինելով ցածր երիտասարդ առողջների մոտ գրանցված էքսպրեսիայի մակարդակից, բարձր է ծեր առողջների մոտ դիտվող էքսպրեսիայի մակարդակից: Այստեղից կարելի է եզրակացնել, որ ծեր առողջների հետ համեմատած հիվանդների մոտ խմուսային բջիջների պրոլիֆերացիայի ակտիվությունն ավելի բարձր է:

**2.3 *E4F1*-ի և *ANXA11*-ի էքսպրեսիայի մակարդակների փոփոխություններն իշեմիկ կաթվածի դեպքում:** Մեր փորձերում ընդհանուր խմբում և տղամարդկանց մոտ *ANXA11*-ի իՌՆԹ-ի էքսպրեսիայի մակարդակի զգալի տարբերություն առկա է միայն ծեր առողջների և հիվանդների միջև: Կանանց մոտ զգալի տարբերություն չի գրանցվել (նկ. 3բ): Ակնհայտ է, որ հիվանդների մոտ էքսպրեսիայի փոփոխությունը տարիք-կախյալ չէ: *ANXA11*-ի էքսպրեսիայի մակարդակը երիտասարդների հետ համեմատած ցածր է հիվանդների և առողջ ծերերի մոտ. միաժամանակ, հիվանդների մոտ ծերերի համեմատությամբ այն ավելի բարձր է:

*E4F1*-ի էքսպրեսիայի մակարդակի զգալի փոփոխություններ ուսումնասիրված խմբերի միջև չեն գրանցվել (նկ. 3ա):

Ստացված տվյալներից կարելի է եզրակացնել, որ իշեմիկ կաթվածով հիվանդների մոտ ապոպտոզի մակարդակը նվազում է, ինչի համար պատճառ

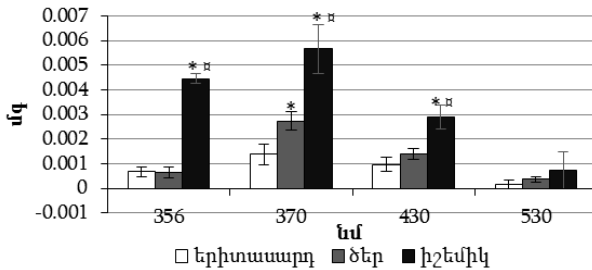
կարող է հանդիսանալ բջջում ապոպտոզին անհրաժեշտ էներգիայի բացակայությունը, հետևաբար նաև բջջի միտոքոնդրիումների վնասված լինելը:

Ապոպտոզի մակարդակի անկումը մի կողմից դրական է, քանի որ կաթվածին՝ հաջորդող փուլում բջիջների մեծ քանակություն չի ոչնչանում, մյուս կողմից՝ բացասական, քանի որ մեծանում է բջիջների թիվը, որոնց մոտ բարձր է նեկրոզի ենթարկվելու հավանականությունը:

### 3. Օքսիդացման գործընթացների ուսումնասիրությունը ծերացման ժամանակ և ՈՒԻԿ-ի դեպքում

**3.1 Սպիտակուցների օքսիդային մոդիֆիկացման աստիճանի գնահատումը ծերացման ժամանակ և ՈՒԻԿ-ի դեպքում:** Ելնելով մեր նախորդ սվյալներից, որոնք թույլ են տալիս ենթադրել ծերերի և ՈՒԻԿ-ով հիվանդների մոտ ապոպտոզի մակարդակի ավելացման մասին, ուսումնասիրել ենք սպիտակուցների օքսիդային՝ մոդիֆիկացման աստիճանի փոփոխություններն ՈՒԻԿ-ով հիվանդների մոտ՝ համեմատած երիտասարդների և ծերերի հետ: Օքսիդային գործընթացների ակտիվացումը և նրանով պայմանավորված մոլեկուլային վնասվածքների ավելացումը նպաստում են օրգանիզմի ծերացմանը:

Ինչպես երևում է նկարից (նկ. 5), օքսիդացած սպիտակուցների քանակությունը ծերերի և կաթվածով հիվանդների մոտ ավելի բարձր է, քան երիտասարդների մոտ: Ուղեղի կաթվածի դեպքում օքսիդային մոդիֆիկացման ինտենսիվացման արդյունքում օրգանիզմում ավելանում է սպիտակուցների չեզոք կետոնային (356նմ) ու ալդեհիդային (370նմ), ինչպես նաև հիմնային կետոնային (430նմ) ածանցյալների քանակությունը:



Նկար 5. ԵՆՏՃ-ի ածանցյալների քանակությունն երիտասարդ, ծեր և իշեմիկ խմբերի մոտ:

- 356նմ – չեզոք կետոնային ածանցյալներ,
- 370նմ – չեզոք ալդեհիդային ածանցյալներ,
- 430նմ – հիմնային կետոնային ածանցյալներ,
- 530նմ – հիմնային ալդեհիդային ածանցյալներ:

\* - p-ի արժեքն երիտասարդ խմբի նկատմամբ, □ - p-ի արժեքը ծեր խմբի նկատմամբ:



Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ ուղեղի կաթվածի ժամանակ օքսիդացման գործընթացներն օրգանիզմում ավելի շատ են ակտիվանում, քան ծերացման ժամանակ. ակտիվանում են օքսիդացման ավելի շատ մեխանիզմներ, ինչն էլ ապահովում է սպիտակուցային մոդիֆիկացման տարբեր տեսակի ածանցյալների առկայությունն օրգանիզմում (չեզոք կետոնային ու ալդեհիդային և հիմնային կետոնային) ի տարբերություն ծերացման գործընթացի, որտեղ ավելանում է միայն չեզոք ալդեհիդային ածանցյալների քանակությունը:

Սովորաբար օքսիդացված սպիտակուցները հեռացվում են բջջից պրոտեոլիզի միջոցով [Bader N., Grune T., 2006]: Մեր փորձում նրանց քանակության ավելացումը վկայում է պրոտեոլիզն ապահովող պրոտեասոմների կամ այլ վնասազերծող համակարգերի վնասված լինելու մասին:

**3.2 Օքսիդային գործընթացների ուսումնասիրությունը ծերացման ժամանակ առնետների գլխուղեղում:** Քանի որ անհնար է օքսիդացման գործընթացներն ուսումնասիրել մարդու ուղեղի հյուսվածքում, այն իրականացվել է առնետների վրա:

Առնետների մոտ ուսումնասիրվել են սպիտակուցների օքսիդային մոդիֆիկացիաների տարիք-կախյալ փոփոխություններն այրյան շիճուկում, ուղեղային հյուսվածքի բջիջների միտոքոնդրիումային և կորիզային ֆրակցիաներում: Ուղեղի հյուսվածքի բջիջների կորիզներում տարիքի հետ սպիտակուցների օքսիդացման մակարդակը զգալիորեն բարձրանում է (530նմ-ում՝  $p < 0.05$ ), ինչը վկայում է բջիջներում ապոպտոզի հավանականության մեծացման մասին: Սպիտակուցների ազատ-ռադիկալային օքսիդացման արգասիքները կարող են միջամտել ԴՆԹ-ի օքսիդային վնասմանը [Stadtman E.R., Levine R.L., 2000]: Վերջինս չվերանորոգվելու դեպքում կարող է ազդանշան դառնալ ապոպտոզի համար: Կորիզում մոդիֆիկացված սպիտակուցների քանակության ավելացումը թույլ է տալիս ենթադրել բջջի պրոտեասոմի գործունեության ճնշման մասին:

Մեր փորձերում ծեր առնետների գլխուղեղի միտոքոնդրիումային ֆրակցիայում ՄԵԱ-ի քանակությունն ավելի բարձր է, քան երիտասարդների մոտ: Դա ցույց է տալիս, որ տարիքի մեծացմանը զուգահեռ գլխուղեղում ակտիվանում են ազատ ռադիկալային գործընթացները:

Այսպիսով, ակնհայտ է, որ ծերացմանը զուգընթաց գլխուղեղում ակտիվանում են օքսիդային վնասման գործընթացները, ինչը նպաստում են ուղեղի հյուսվածքի բջիջների մակրոմոլեկուլների կառուցվածքային և գործառնական խախտումներին:

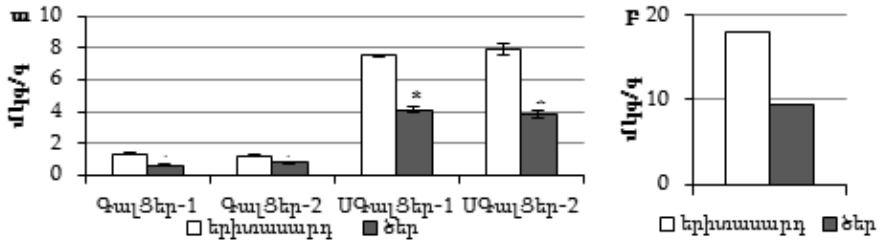
**3.3 Չեզոք լիպիդների պարունակության տարիք-կախյալ փոփոխությունները ծերացման ժամանակ:** Հայտնի է, որ գլիկոաֆինոլպիդները մտնում են կենդանիների և մարդու օրգանիզմում տեղի ունեցող բազմաթիվ ֆիզիոլոգիական գործընթացներին (իմունային պատասխան, նեյրոնային ինֆորմացիայի փոխանցում, բորբոքում, ապոպտոզ) մասնակցող կենսաբանական կարգավորիչների կարևորագույն համակարգի կազմության մեջ: Մեր փորձերում առնետների ուղեղային հյուսվածքում ծերացման ժամանակ չեզոք (ԳալՅեր-եր և

ՄԳալՑեր-եր) լիպիդների քանակական փոփոխությունների ուսումնասիրության արդյունքում հայտնաբերվել են ԳալՑեր-երի երկու ֆրակցիաներ, որոնք միմյանցից տարբերվում են ճարպաթթուների պարունակությամբ: Օերացման դեպքում գլխուղեղում նվազում է չեզոք գլիկոլիպիդների ինչպես գումարային, այնպես էլ ֆրակցիային քանակությունը (նկ. 6):

Քանի որ ԳալՑեր-երը գլխավորապես տեղաբաշխված են միելինում, իսկ ՄԳալՑեր-երը՝ սպիտակ նյութի ոչ միելինային մասում [Eckhardt M., 2008], ապա կարելի է եզրակացնել, որ ծեր առնետների մոտ ուսումնասիրված ֆրակցիաների քանակության նվազումը կարող է ծերացման ժամանակ դիտվող գլխուղեղի ֆունկցիաների խանգարումների պատճառ հանդիսանալ:

Մեր ուսումնասիրությունում, երիտասարդների հետ համեմատած, ծեր առնետների գլխուղեղում չեզոք գլիկոլիպիդների հիդրոլիտիկ ճեղքավորման արգասիք սֆինգոզինի քանակությունն ավելացել է ( $p < 0.001$ ):

Սֆինգոզինը, ինհիբիցելով պրոտեինկինազ c-ի ակտիվությունը, մասնակցում է բջիջների պրոլիֆերացման և մահվան կարգավորման գործընթացներին [Алесе́нко А.В. и др., 1999]: Ցերամիդները և սֆինգոզինն ապոպտոզի մեդիատորներ են, և նրանց կուտակումը գլխուղեղում հանգեցնում է ապոպտոզի ակտիվացմանը:



Նկար 6. Չեզոք գլիկոլիպիդների քանակությունն երիտասարդ և ծեր առնետների գլխուղեղում (n=10):

w – ԳալՑեր-երի ու ՄԳալՑեր-երի քանակությունն առանձին;

r – ԳալՑեր-երի ու ՄԳալՑեր-երի գումարային քանակությունը:

\* -  $p < 0.001$ :

Ստացված տվյալները վկայում են, որ ծեր առնետների գլխուղեղի բջիջների թաղանթների կառուցվածքային ամբողջականությունը խախտվում է: Այն փաստում է նաև բջիջների ֆունկցիաների խանգարումների մասին: Այդ ամենը իրիստ վտանգավոր է բջջի կենսունակության համար և հանգեցնում է ապոպտոզի մակարդակի բարձրացմանը:

## ՎԵՐՋԱԲԱՆ

Ծերացումը մարդկությանը հուզող կարևոր հարցերից է, որն առայսօր միանշանակ բացատրություն չունի: Պատճառներից մեկը ծերացմանը զուգորդող հիվանդություններն են, որոնք աղավաղում են ծերացման գործընթացների իրական պատկերը: Նմանատիպ հիվանդություններից է ՈՒԻԿ-ը (ուղեղի իջեմիկ կաթված), որով հիվանդանալու հավանականությունը տարիքի հետ մեծանում է:

Տարիքի մեծացմանը զուգընթաց օրգանիզմում տեղի են ունենում վնասակար անդառնալի փոփոխություններ: Վնասվող համակարգերից է իմունային համակարգը: Վերջինս օրգանիզմի պաշտպանության կարևոր օղակներից է: Նրա գործունեությունը կարևոր է նաև ՈՒԻԿ-ի ընթացքի և ելքի համար:

Այն, որ ծերացումը լուրջ փոփոխություններ է առաջացնում գլխուղեղում, մեր ուսումնասիրություններում ակնհայտ է առնետների գլխուղեղի հյուսվածքներում սպիտակուցների օքսիդային մոդիֆիկացման և չեզոք լիպիդների օքսիդացման փորձերից: Ծերացումը կարող է նպաստել ՈՒԻԿ-ի առաջացմանը, միաժամանակ խանգարել ՈՒԻԿ-ի առաջացմանը նպաստող իրական գործոնների բացահայտմանը, ինչպես նաև բուժման արդյունավետ մեխանիզմների հայտնաբերմանն ու կիրառմանը:

Մեր ուսումնասիրության արդյունքները թույլ են տալիս բացահայտել օրգանիզմի իմունային համակարգում տեղի ունեցող փոփոխությունները, որոնցով ՈՒԻԿ-ը տարբերվում է բնականոն ծերացումից:

Սպիտակուցների օքսիդային մոդիֆիկացման տվյալներից ակնհայտ է, որ ՈՒԻԿ-ի դեպքում օքսիդացման մակարդակն ավելի բարձր է, և նրանում ներգրավված են օքսիդացման ավելի շատ ուղիներ՝ համեմատած բնականոն ծերացման հետ: Այս տվյալները թույլ են տալիս նաև ենթադրել, որ և ծերացման և ՈՒԻԿ-ի դեպքում բարձրանում է արյան բջիջների ապոպտոզի մակարդակը: Ծերության առումով դրա մասին են վկայում նաև առնետների մոտ կատարված գերօքսիդացման մակարդակի ուսումնասիրությունները:

Ինչպես ցույց են տալիս *ANXA11*-ի էքսպրեսիայի արդյունքները, թեև երիտասարդների համեմատությամբ առողջ ծեր մարդկանց և ՈՒԻԿ-ով հիվանդների մոտ լեյկոցիտների ապոպտոզի մակարդակը բարձր է, ՈՒԻԿ-ով հիվանդների մոտ այն ավելի ցածր է, քան առողջ ծերերի մոտ: Կարելի է ենթադրել, որ ՈՒԻԿ-ի դեպքում բջջում այնպիսի փոփոխություններ են տեղի ունենում, որոնց հետևանքով վերջինս խիստ վնասվում է և չի կարողանում ապահովել ապոպտոզի իրականացման համար անհրաժեշտ գործընթացներն ու էներգիան:

Ապոպտոզի մակարդակի ավելացման անուղղակի ապացույց կարելի է համարել *IL2*-ի և *IL2RG*-ի էքսպրեսված քանակության անկումը, ինչը հանգեցնում է արյան մեջ T լիմֆոցիտների քանակության անկմանը: Հատկապես ակնհայտ է Th1 և Th17 բջիջների քանակության նվազումը: ՈՒԻԿ-ով հիվանդների մոտ այդ բջիջների քանակության անկումը կարող է պայմանավորված լինել ոչ միայն ապոպտոզով, այլև նրանց ներհոսքով դեպի ուղեղի վնասված հատված, ինչի համար փաստ կարող է հանդիսանալ հիվանդների մոտ, առողջ ծերերի հետ համեմատած, *ANXA11*-ի համեմատաբար բարձր մակարդակը:

Առողջ պոպուլյացիայում Th1, Th2 և Th17 բջիջների ժամանակագրական փոփոխությունները (համապատասխանաբար ըստ *TBX21*-ի, *GATA3*-ի և *IL23A*-ի էքսպրեսիայի մակարդակի փոփոխությունների) միանշանակ չեն: Th1-ի տատանումները համարյա աննշան են համեմատած մյուս երկու տեսակի բջիջների հետ: Բացի այդ, առողջ պոպուլյացիայում 50-59 տարեկան տարիքային տիրույթում Th1-ը հիմնականակ բջջային պոպուլյացիան է մեր ուսումնասիրած երեք բջջային պոպուլյացիաներում: Իմունային համակարգի բարձր խոցելիությունն այդ տարիքային տիրույթում օրգանիզմն անպաշտպան է դարձնում տարբեր վնասակար ազդեցությունների նկատմամբ: Միաժամանակ, ՈՒԻԿ-ով հիվանդների ժամանակագրական ուսումնասիրությունը ցույց է տալիս, որ իմունային տեսանկյունից հիվանդությունն առավել ծանր ընթացք և հետևանքներ կարող է ունենալ 60-69 տարեկան տարիքային տիրույթում գտնվող հիվանդների համար՝ նրանց մոտ իմունային համակարգի ճնշված լինելու հետևանքով:

Պատկերը գրեթե նույնն է կանանց և տղամարդկանց ենթախմբերում: Բացառություն են կազմում տղամարդկանց ենթախմբում ՈՒԻԿ-ով հիվանդների մոտ *TBX21*-ի ընդհանուր քանակության անկումը և *IL2*-ի ընդհանուր քանակության ավելացումը՝ ի հակադրություն մնացած խմբերի ու ենթախմբերի համապատասխան տվյալների:

*GATA3*-ի, *IL2RG*-ի և 50-79 տարեկան տարիքային տիրույթում նաև *ANXA11*-ի համեմատական վերլուծությունից երևում է, որ առողջ պոպուլյացիայի մոտ նրանց էքսպրեսիայի բարձր մակարդակներին համապատասխանում են հիվանդների պոպուլյացիայում դիտվող ցածր մակարդակները և հակառակը, ինչը թույլ է տալիս նրանց դիտարկել որպես ՈՒԻԿ-ը բնորոշող մարկերներ և հետագայում քննարկել ՈՒԻԿ-ի ախտորոշման ու բուժման ընթացքի վերահսկման մեջ նրանց կիրառման հավանականությունը: Այդ առումով *GATA3*-ն առավել հարմար մարկեր կարող է համարվել 50-69 տարեկան տարիքային տիրույթում, *ANXA11*-ը՝ 70-89, իսկ *IL2*-ը՝ 40-49 տարեկան տարիքային տիրույթում: Հետաքրքիր է՝ առողջ պոպուլյացիայում *GATA3*-ի աճող էքսպրեսիայի կորին հակադրվում է հիվանդների մոտ գրանցված նրա մարդկ էքսպրեսիայի կորը, իսկ *IL2RG*-ի և *ANXA11*-ի դեպքում առողջներին բնորոշ մարդկ էքսպրեսիայի կորին համապատասխանում է հիվանդների աճող էքսպրեսիայի կորը:

Մեր ուսումնասիրություններից ակնհայտ է, որ յուրաքանչյուր տարիքային տիրույթ ունի իր ուրույն իմունային պատկերը, և ՈՒԻԿ-ի ազդեցությամբ այդ պատկերի փոփոխությունը յուրաքանչյուր տարիքային տիրույթում տեղի է ունենում ոչ միանման ձևով: Դա ենթադրում է բոլոր տարիքային տիրույթներում ՈՒԻԿ-ի միանման բուժման մեխանիզմների կիրառման նվազ արդյունավետությունն իմունային համակարգի տեսանկյունից: Յուրաքանչյուր տարիքային խմբի համար անհրաժեշտ է մշակել որոշակի բուժման համակարգ էլնելով այդ տարիքային խմբին բնորոշ իմունային պատկերից և ՈՒԻԿ-ի ժամանակ դիտվող փոփոխություններից:

## ԵԶՐԱԿԱՅ ՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Ժամանակագրության առումով առողջ մարդկանց պոպուլյացիայում իմունային բջիջների քանակությունը նվազում է էքսպոնենցիալորեն մարդկ կրի տեսքով: Այն ուղեկցվում է Th2 բջիջների քանակության էքսպոնենցիալ ավելացմամբ:
2. Ուղեղի իշեմիկ կաթվածի դեպքում ծայրամասային արյան մեջ իմունային բջիջների քանակության նվազումն ավելի արտահայտված է, քան ծերացման ժամանակ: Ժամանակագրության առումով դիտվում է Th2 բջիջների քանակության էքսպոնենցիալ նվազում: Հիվանդների մոտ իմունային բջիջների փոքր քանակությունը բնորոշ է ուսումնասիրվող տարիքային ողջ տիրույթին: Ուղեղի իշեմիկ կաթվածով հիվանդանալու տեսանկյունից ամենավտանգավորը 60-69 տարեկան տարիքային տիրույթն է, որտեղ իմունային համակարգը ճնշված վիճակում է:
3. Ծայրամասային արյան մեջ իմունային բջիջների ապոպտոզի մակարդակը բարձր է և ծերերի, և ուղեղի իշեմիկ կաթվածով հիվանդների մոտ: Միաժամանակ, ծերերի հետ համեմատած, հիվանդների մոտ այն ավելի ցածր է: Հիվանդների դեպքում այդ բջիջների քանակության նվազումն ավելի մեծ հավանականությամբ պայմանավորված է նրանց ուղեղի վնասված հատված ներհոսքով, եթե հաշվի առնենք ծերերի հետ համեմատած ապոպտոզի ավելի ցածր մակարդակը:
4. Ժամանակագրական ուսումնասիրությունների արդյունքների համեմատությունից ակնհայտ է, որ GATA3 (Th2 բջիջներ), IL2RG և ANXA11 գեների էքսպրեսիայի մակարդակների փոփոխություններն առողջ և ուղեղի իշեմիկ կաթվածով հիվանդ մարդկանց մոտ միմյանց հակադիր են: Այդ տարբերությունները որոշակի տարիքային տիրույթներում զգալի են, ինչը թույլ է տալիս նշված գեներին դիտարկել որպես ուղեղի իշեմիկ կաթվածի համար հավանական մարկերներ համապատասխան տարիքային տիրույթներում:
5. Սպիտակուցների օքսիդային մոդիֆիկացման աստիճանը բարձր է Առողջ ծերերի և ուղեղի իշեմիկ կաթվածով հիվանդների մոտ: Ուղեղի իշեմիկ կաթվածով հիվանդների մոտ այն ավելի ակնառու է և տեղի է ունենում օքսիդային գործընթացներն ակտիվացնող գործընթացների ավելի լայն շրջանակի ազդեցության տակ:
6. Առնետների մոտ օքսիդային գործընթացների ուսումնասիրությունից ակնհայտ է ծերացման ժամանակ նրանց ակտիվացման փաստը, ինչը թույլ է տալիս ծերացումը դիտարկել որպես ուղեղի իշեմիկ կաթվածին նպաստող գործոն: Ակնհայտ է նաև, որ ծերացման ժամանակ դիտվող ապոպտոզի ակտիվացումը չի սահմանափակվում միայն ծայրամասային արյան բջիջներով, այլ ինտենսիվորեն տեղի է ունենում նաև գլխուղեղում՝

մեկ անգամ ևս հաստատելով ծերացման ուղեղի իշեմիկ կաթվածին նպաստող գործոն լինելու հանգամանքը:

7. Չեզոք գլիկոլիպիդների քանակության նվազումը և նրանց քայքայման արգասիք սֆինգոզինի քանակության ավելացումը ծեր առնետների մոտ վկայում են ծերացման ժամանակ ուղեղի հյուսվածքներում ապոպտոզի մակարդակի բարձրացման մասին:

### **Ատենախոսության թեմայով հրատարակված աշխատանքների ցանկ**

1. Hakobjanyan A.A., Kazaryan G.S., Hovsepyan L.M. Age-dependent changes in protein oxidative modification. // Biological journal of Armenia. 2010; 62(1), p. 32-35.
2. Овсепян Л.М., Казарян Г.С., Акопджанян А.А., Львов М.В. Возраст зависимые изменения содержания фосфолипидов и нейтральных липидов при старении. // Успехи геронтологии. 2012; 25(2), p. 250-254.
3. Հակոբջանյան Ա.Ա. Օքսիդային գործընթացների ուսումնասիրությունը առնետների գլխուղեղում ծերացման ժամանակ: // Հայաստանի կենսաբանական հանդես: 2012; 64(4), էջ 97-99.
4. Hakobjanyan A.A., Hovsepyan L.M. Oxidative modification of proteins during aging and after brain ischemia. // Proceedings of the Young Scientists International Conference “Perspectives for development of molecular and cellular biology-3”, Yerevan. 2012. p. 85-88.
5. Акопджанян А.А., Овсепян Л.М., Бояджян А.С., Петрек М. Анализ vrbовня экспрессии ИЛ-2 и ИЛ-2РГ Т-клеток и окислительная модификация белков при старении и инсульте мозга. // Вопросы теоретической и клинической медицины. Научно-практический журнал. 2013; 16 (7), с. 20-23.
6. Hakobjanyan A., Boyajyan A., Hovsepyan L., Navratilova Z., Klevcova P., Petrek P. Expression of selected Th1/Th2 transcription factors and immune-response genes in cerebral ischemia and senescence. // Book of abstracts. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology. Milan, Italy, August 22-27, 2013, p. 750.
7. Hakobjanyan A.A., Hovsepyan L.M., Boyajyan A.S., Petrek M. Expression levels of IL2 and IL2RG mRNAs during aging and brain ischemia. // International Scientific Conference on Biotechnology, General and Applied Microbiology, Chemistry, Biochemistry, Molecular Biology and Genetics, Environmental Protection “Contribution of young generation in the development of biotechnology”. Yerevan. 2013, p. 81-82.
8. Hakobjanyan A., Boyajyan A., Hovsepyan L., Petrek M. Changes of ANXA11 expression level and apoptosis during aging and brain ischemic stroke. // Young Scientists Conference «Perspectives for Development of Molecular and Cellular Biology -4», Biological Journal of Armenia. 2013, 65(Suppl.1), p. 66-67.

## АКОПДЖАНЫН АНАИТ

### ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ СТАРЕНИИ И ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ МОЗГА

#### РЕЗЮМЕ

**Ключевые слова:** старение, ишемический инсульт головного мозга, окислительный стресс, иммунные клетки, *IL2*, *IL2RG*, *IL23A*, *ANXA11*, апоптоз, транскрипционные факторы *TBX21* и *GATA3*, окислительная модификация белков, гликофинголипиды.

Проблема старения является одной из наиболее серьёзных биомедицинских и социально-экономических проблем. Старение, не являясь само по себе болезнью, создаёт предпосылки развития ряда патологий, способствуя возникновению множества болезней. В процессе старения значительную роль играют иммунологические механизмы. Нарушения работы иммунной системы считаются одной из основных причин старения. Различные звенья иммунореактивности при старении нарушаются в разной степени, в результате чего возрастает ряд возрастзависимых заболеваний.

Среди возрастзависимых патологий особое место занимают ишемические поражения головного мозга. Около 80% инсультов возникает у людей старше 65 лет, при этом возраст оказывает большое влияние на исходы инсульта. Увеличение вероятности развития инсульта у пожилых людей обусловлено возрастными изменениями мозга. Факторы риска развития инсульта, механизмы ишемического поражения мозга различаются у людей пожилого и молодого возраста.

В этой связи, предпринятое нами исследование по изучению экспрессии некоторых генов (*TBX21*, *GATA3*, *IL23A*, *IL2*, *IL2RG*, *E4F1*, *ANXA11*) в иммунных клетках, а также выяснение молекулярных механизмов развития окислительного стресса, апоптоза и обмена гликолипидов при старении и при инсульте являются весьма актуальными.

Исследование было проведено на здоровых людях в возрасте от 20 до 85 лет, которые были подразделены на группы молодых и старых, а также на группы с 10-летним интервалом и на подгруппы мужчин и женщин. При исследовании больных ишемическим инсультом головного мозга (ИИМ) нами были взяты люди в возрасте от 42 до 89, которые тоже подразделились на подгруппы мужчин и женщин. Для изучения окислительных процессов при старении исследование проводилось также на субклеточных фракциях головного мозга молодых и старых белых беспородных крыс.

В наших экспериментах мы исследовали изменения количества иммунных клеток Th1, Th2 и Th17 при старении и ИИМ с помощью измерения экспрессии генов *TBX21*, *GATA3* и *IL23A*, которые соответственно являются их маркерами.

Как показали результаты наших исследований, у здоровых людей изменения Th1, Th2 и Th17 клеток не однозначны. Th1 является основной клеточной популяцией в возрастной группе 50-59 лет, что делает организм более уязвимым к повреждающим

факторам. Одновременно, исследование больных ИИМ показывает, что болезнь с иммунной точки зрения имеет более тяжелое течение у больных в возрасте 60-69 лет.

Особую значимость представляет исследования *IL2* и *IL2RG*. Известно, что *IL2* считается фактором роста Т клеток. *IL2* и *IL2RG* необходимы для пролиферации Т клеток, и отсутствие одного из них может привести к иммунной недостаточности. В наших экспериментах по сравнению с молодыми наблюдается увеличение уровня апоптоза у старых здоровых людей и больных ИИМ (результаты экспрессии *IL2*, *IL2RG* и апоптотического фактора *ANXA11*), что приводит к уменьшению количества Т клеток в крови. Особенно это касается Th1 и Th17 клеток. Картина почти та же у подгрупп женщин и мужчин.

Анализ экспрессии *GATA3*, *IL2* и *ANXA11* показал высокий уровень экспрессии у здоровых людей по сравнению больными с ИИМ в возрастной группе 50-59 лет и 70-79 лет. В возрастной группе 60-69 лет картина была обратной.

Механизмы развития инсультов и процессов старения имеют много точек соприкосновения. И при старении, и при инсульте имеет место развитие окислительного стресса. В этой связи, нами проведено исследование окислительной модификации белков. Результаты исследований показали, что при старении и при инсульте уровень окисления белков выше по сравнению с молодыми. Но если при старении повышается только уровень нейтральных альдегидных динитрофенольных производных, то при инсульте повышаются также уровни нейтральных и основных кетонных динитрофенольных производных. Полученный факт указывает на активацию свободнорадикальных процессов при старении и инсульте, что связано с окислительным стрессом приводящему к нарушению клеточных функций и индукции апоптоза.

В настоящее время большое значение придается метаболизму гликофинголипидов в лимфоцитах. Метаболизм гликофинголипидов в клетках иммунной системы является регуляторным механизмом развития, дифференцировки, активации и апоптоза. Проведенные нами исследования по содержанию нейтральных гликолипидов (галактозилцерамидов и сульфогалактозилцерамидов) показали уменьшение их количества при старении. Отмеченный факт связан с гидролитическим распадом указанных гликолипидов с повышенным образованием сфингозина – медиатором апоптоза в различных клетках. Повышенное образование сфингозина индуцирует развитие апоптоза.

Согласно нашим исследованиям, установлено, что каждая возрастная зона имеет свою уникальную иммунную картину, и при инсульте изменяется иммунный ответ в каждой возрастной зоне не однозначно. Для каждой возрастной группы необходимо разработать определенную систему лечения, исходя из иммунной картины в соответствующей возрастной группе и изменений наблюдаемых при ишемическом инсульте мозга.



**GENE EXPRESSION OF REGULATORY PROTEINS AND OXIDATIVE  
PROCESSES AT AGING AND BRAIN ISCHEMIC STROKE**

**SUMMARY**

*Keywords:* aging, brain ischemic stroke, oxidative stress, immune cells, *IL2*, *IL2RG*, *IL23A*, *ANXA11*, apoptosis, transcription factors *TBX21* and *GATA3*, oxidative modification of proteins, glycosphingolipids.

Ageing is one of the most serious biomedical and socio-economic problems. Not being a disease by itself, aging develops preconditions for the development of a number of pathologies and contributes to the emergence of many diseases. Immunological processes play significant role during aging. Disorders of the immune system are considered one of the main causes of aging. Various units of the immune system are disturbed at varying degrees with aging, resulting in increase of probability of a number of age-related diseases.

Ischemic brain lesions occupy a special place among the age-related pathologies. About 80% of strokes occur in people over 65 years, and age has a great influence on the outcome of strokes. Likelihood of stroke is increased in the elderly due to the age-related changes of the brain. Risk factors for stroke and the mechanisms of ischemic brain lesions differ in elderly and young patients.

According aforementioned, our study of the expression of some genes (*TBX21*, *GATA3*, *IL23A*, *IL2*, *IL2RG*, *E4F1*, *ANXA11*) in immune cells, as well as elucidation of the molecular mechanisms of oxidative stress, apoptosis and glycolipid metabolism in aging and stroke are very relevant.

The study was done on healthy people aged 20 to 85 years old that were divided into groups of young and old, as well as into groups with a 10-year intervals and subgroups of men and women. In the study of patients with brain ischemic stroke (BIS) people aged 42 to 89 were taken that were also divided into the subgroups of men and women. Young and old white outbred rats were also used for the oxidation processes study in the aging research.

In our experiments, we studied the quantitative changes of the Th1, Th2 and Th17 immune cells during aging and BIS via measurement of the expression of the genes *TBX21*, *GATA3* and *IL23A*, which respectively are markers of these cells.

As the results of our studies showed the changes of Th1, Th2 and Th17 cells are not univocal in healthy people. Th1 is the major cell population in the age group 50-59 years, which makes the body more vulnerable to damaging factors. At the same time, the study of

BIS patients shows that from the immunity standpoint the disease is more severe in patients aged 60-69 years.

The study of *IL2* and *IL2RG* has a particular importance. It is known that *IL2* is a T cell growth factor. It is required for the proliferation of T cells, and the absence of one of them can cause immune deficiency. In our experiments, compared with young ones, the level of apoptosis is increased in the healthy old people and BIS patients (results expression of *IL2*, *IL2RG* and apoptotic factor *ANXA11*), which leads to a reduction in the number of T cells in the blood. This concerns especially to the Th1 and Th17 cells. The picture is almost the same in the subgroups of females and males.

Expression analysis of *GATA3*, *IL2* and *ANXA11* showed high level of expression in healthy individuals compared to BIS patients in the age groups 50-59 and 70-79 years. In the age group 60-69 years the picture was reversed.

The mechanisms of stroke and aging processes have a lot of common points. The oxidative stress develops in both cases. In this context, we studied the oxidative modifications of proteins. The results showed that the oxidation level of proteins is higher at aging and BIS compared with the young. But if only neutral dinitrophenol aldehyde derivatives are increased at aging, the increases of the levels of neutral and basic dinitrophenol ketone derivatives are also observed at stroke. The results indicate the activation of free radical processes at aging and BIS that is associated with oxidative stress, which leads to the disruption of cellular functions and to the induction of apoptosis.

Currently, great attention is paid to the study of metabolism of glycosphingolipids in lymphocytes. The metabolism of glycosphingolipids is a regulatory mechanism for the development, differentiation, activation and apoptosis of the immune cells. Our studies about the content of neutral glycolipids (galactosyl ceramides and sulfo galactosyl ceramides) showed a decrease in their number during aging. This is related to the hydrolytic decomposition of those glycolipids with increased formation of sphingosine, which is a mediator of apoptosis in various cells. Increased sphingosine production induces apoptosis.

According to our research, it was found that each age period has its own unique immune picture and in each age period the immune response is changed by an ambiguous way at BIS. For each age group a specific treatment system should be developed, based on the immune picture of the relevant age group and on the changes observed in ischemic stroke brain.

