

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ  
ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱՐԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՄՏԵՓԱՆՅԱՆ ԱՆԻ ՍՄՐԱՏԻ

ԿՈՄՊԼԵՄԵՆՏԻ ՀԱՄԱԿԱՐԳԻ ԵՎ ՍԻՆԱՊՏԻԿ ՊԼԱՍՏԻԿՈՒԹՅԱՆ  
ԿԱՐԳԱՎՈՐԻՉՆԵՐԻ ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ՊՈԼԻՄՐՖԻԶՄՆԵՐԸ ԻՇԵՄԻԿ  
ԿԱԹՎԱԾԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

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

**ՍԵՂՄԱԳԻՐ**

ԵՐԵՎԱՆ – 2016

---

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

СТЕПАНЯН АНИ СМБАТОВНА

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ РЕГУЛЯТОРОВ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА И  
СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

ЕРЕВАН – 2016

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

Գիտական ղեկավարներ՝

ՀՀ ԳԱԱ թղթ. անդամ, կենս. գիտ. դոկտոր,  
պրոֆ. Ա.Ս. Բոյաջյան

կենս. գիտ. թեկնածու Գ.Վ. Յականովա

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. Լ.Մ. Եպիսկոպոսյան  
կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. Հ.Ռ. Վարդապետյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի պետական համալսարան

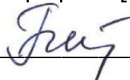
Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2016թ. հուլիսի 1-ին, ժամը 14<sup>00</sup>-ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, Փորձարարական կենսաբանության 042 մասնագիտական խորհրդում (ՀՀ, 0014, ք.Երևան, Հասարակության 7):

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

Սեղմագիրն առաքվել է 2016թ. մայիսի 31-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,  
կենս. գիտ. թեկնածու

Գ.Մ. Մկրտչյան



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

Научные руководители:

член корр. НАН РА, доктор биол. наук,  
проф. Бояджян А.С.

канд. биол. наук Цаканова Г.В.

Официальные оппоненты:

доктор биол. наук, проф. Епископосян Л.М.  
доктор биол. наук, проф. Вардапетян Г.Р.

Ведущая организация:

Ереванский государственный университет

Защита диссертации состоится 1 июля 2016г. в 14<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 31 мая 2016г.

Ученый секретарь специализированного совета 042,  
кандидат биол. наук

Մկրտչյան Գ.Մ.



## ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

**Հիմնահարցի արդիականությունը:** Ըստ Առողջապահության համաշխարհային կազմակերպության տվյալների, աշխարհում տարեկան գրանցվում է կաթվածի 795 հազար դեպք, որոնցից 619 հազարը բաժին է ընկնում սուր իշեմիկ կաթվածին (ԻԿ): Կաթվածը հանդիսանում է աշխարհում մահացության 3-րդ պատճառը՝ սրտի ինֆ.արկտից և քաղցկեղից հետո [Caplan, 2011]: Ըստ ՀՀ Առողջապահության նախարարության տվյալների, ԻԿ-ով տառապողների թիվը 2014 թվականին կազմել է 2320, որոնցից 1026-ի մոտ հիվանդությունն ավտորոշվել է առաջին անգամ:

Համաձայն ժամանակակից պատկերացումների, ԻԿ-ը բազմագործոն հիվանդություն է, որի առաջացման, զարգացման և բարդացման գործընթացներում ներգրավված են ինչպես գենետիկական, այնպես էլ ոչ գենետիկական բազմաթիվ գործոններ: Գենետիկական գործոնների հայտնաբերմանն ուղղված հետազոտությունները դեռևս նոր են զարգանում, ինչը զգալիորեն խոչընդոտում է կաթվածով հիվանդների բուժման և լիարժեք վերականգնման արդյունավետ եղանակների մշակմանը [Markus, 2013]:

ԻԿ-ի առաջացման, զարգացման և բարդացման ընթացքում վճռորոշ դեր են խաղում համակարգային և տեղային բորբոքային պատասխանի անկառավարելի գերակտիվացումը, ինչպես նաև սինապտիկ պլաստիկության խախտումները: Մասնավորապես, այս պաթոլոգիական գործընթացները բերում են ԻԿ-ի ժամանակ առողջ բջիջների չկարգավորվող վնասման և մահվան:

Իշեմիայի հետ ասոցացված բորբոքային պատասխանի կարևորագույն միջնորդանյութ է հանդիսանում կոմպլեմենտի համակարգը, որի չկարգավորվող գերակտիվացման դեպքում խթանվում են առողջ բջիջների վնասումը և մահը [Cole & Morgan, 2003; Nauta et al., 2004]: Մեր լաբորատորիայում նախկինում կատարված աշխատանքները ցույց են տվել, որ ԻԿ-ի ժամանակ գերակտիվացված է կոմպլեմենտի համակարգի այլընտրանքային ուղին [Бояджян и соавт., 2007], ինչպես նաև դրա կարևոր բաղադրիչ կոմպլեմենտի В գործոնը և կարգավորիչներ Н և I գործոնները [Айвазян и соавт., 2005]:

Սինապտիկ պլաստիկության կարևոր կարգավորիչներից են նեուրին G1-ը, կոմպլեքսին-2-ը, նեյրոնների աճի գործոնը, նեյրոնների աճի գործոնի ռեցեպտորը և ուղեղի նեյրոտրոֆիկ գործոնը [Lu et al., 2003]: Ներկայումս, նշված սպիտակուցները կոդավորող գեների ֆունկցիոնալ կարգավիճակի և ԻԿ-ի առաջացման և զարգացման կապի վերաբերյալ գիտական գրականության մեջ տվյալները բացակայում են: Այս հարցի պարզաբանումը զգալիորեն կնպաստի ԻԿ-ի զարգացման և բարդացման հիմքում ընկած բորբոքային պատասխանի և սինապտիկ պլաստիկության խախտումների մոլեկուլազենետիկական մեխանիզմների բացահայտմանը:

**Հետազոտության նպատակը և խնդիրները:** Տվյալ աշխատանքի հիմնական նպատակն է հանդիսացել ուսումնասիրել կոմպլեմենտի այլընտրանքային ուղու և սինապտիկ պլաստիկության կարգավորիչները կոդավորող գեների հնարավոր ներգրավվածությունն ԻԿ-ի պաթոգենեզում:

**Հետազոտության խնդիրները:** Ենելով աշխատանքի հետազոտական նպատակից, աշխատանքի խնդիրներն են հանդիսացել.

- Ուսումնասիրել կոմպլեմենտի համակարգի այլընտրանքային ուղու կարգավորիչները կողավորող գեների (*CFB*, *CFH* և *CFI*) եզակի նուկլեոտիդային պոլիմորֆիզմների (ԵՆՊ) հնարավոր ասոցիացիան ԻԿ-ի հետ:
- Ուսումնասիրել սինապտիկ պլաստիկության կարգավորիչները կողավորող գեների (*NTNG1*, *CPLX2*, *NGF*, *NGFR* և *BDNF*) ԵՆՊ-ների հնարավոր ասոցիացիան ԻԿ-ի հետ:
- Պարզաբանել հայտնաբերված հապլոտիպերի հնարավոր ասոցացիան ԻԿ-ի զարգացման հետ:

**Աշխատանքի գիտական նորույթը և գիտագործնական արժեքը:**

Ներկայացված աշխատանքի արդյունքները զգալիորեն հարստացնում և հստակեցնում են ԻԿ-ի առաջացման և զարգացման հետ ասոցացված բորբոքային պատասխանի և սինապտիկ պլաստիկության գենետիկական գործոնների վերաբերյալ ժամանակակից պատկերացումները: Կատարված հետազոտությունների արդյունքում ցույց է տրվել կոմպլեմենտի այլընտրանքային ուղու կարգավորիչները (*H* և *I* գործոններ), ինչպես նաև սինապտիկ պլաստիկության կարգավորիչները (նեոտրին *G1*, կոմպլեքսին-2, նեյրոնների աճի գործոն և նեյրոնների աճի գործոնի ռեցեպտոր) կողավորող գեների ԵՆՊ-ների ներգրավվածությունն ԻԿ-ի էթիոպաթոգենեզում:

Ցույց է տրվել կոմպլեմենտի այլընտրանքային ուղու և սինապտիկ պլաստիկության կարգավորիչները կողավորող *CFH*, *NTNG1*, *NGF* և *NGFR* գեների պոլիմորֆ հատվածների ասոցիացիան ԻԿ-ի զարգացման ռիսկի հետ: Հետազոտության մեջ ընդգրկված 17 ԵՆՊ-ներից 15-ն առաջին անգամ են ուսումնասիրվել ԻԿ-ի ժամանակ: Հետազոտության արդյունքներն ապացուցում են վերը նշված գեների ներգրավվածությունն ԻԿ-ի պաթոգենեզում: Այս փաստը հաստատում է ԻԿ-ի ժամանակ նշված գեների և դրանց կողմից կողավորվող սպիտակուցների դերի պարզաբանման և հստակեցման անհրաժեշտությունը:

Ներկայացված ուսումնասիրության արդյունքում ԻԿ-ի զարգացման ռիսկի նոր գործոնների հայտնաբերումը ոչ միայն ընդլայնում է ԻԿ-ի մոլեկուլագենետիկական էթիոպաթոմեխանիզմների վերաբերյալ առկա գիտելիքները, այլ նաև նպաստում է ԻԿ-ի կանխարգելման և արդյունավետ բուժման նոր թիրախների հայտնաբերմանը և մոտեցումների մշակմանը:

**Աշխատանքի նախապաշտպանությունը:** Աշխատանքի հիմնական արդյունքները ներկայացվել և քննարկվել են ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի Մարդու գենոմիկայի և իմունոմիկայի լաբորատորիայում պարբերաբար կազմակերպվող սեմինարներում և ինստիտուտի գիտական խորհրդի նիստերում (Երևան, ՀՀ, 2011-2015), ինչպես նաև հետևյալ միջազգային գիտաժողովներում (ընդհանուր թվով 6)՝ Postgenomic methods of analysis in biology, and laboratory and clinical medicine (ՌԴ, Կազան, 2012),

Perspectives for development of molecular and cellular biology-3 (ՀՀ, Երևան, 2012), 14th European Meeting on Complement in Human Disease (Գերմանիա, Յենա, 2013), Perspectives for development of molecular and cellular biology-4 (ՀՀ, Երևան, 2013), 24 European Stroke Conference (Ավստրիա, Վիեննա, 2015), International youth conference Science and innovation 2015 (ՀՀ, Ծաղկաձոր, 2015):

**Հրատարակումները:** Հետազոտության հիմնական արդյունքները հրատարակվել են 10 գիտական աշխատությունների տեսքով, այդ թվում՝ 2 հոդված միջազգային ամսագրերում, 2՝ հանրապետական ամսագրերում և 6 զեկույց միջազգային գիտաժողովների նյութերում:

**Ատենախոսության ծավալը և կառուցվածքը:** Ատենախոսությունը շարադրված է համակարգչային տեքստի 144 էջում, պարունակում է 27 նկար ու 37 աղյուսակ և բաղկացած է օգտագործված հապավումների և նշանակումների ցանկից, ներածությունից, գրական ակնարկից, փորձարարական մասից, հետազոտության արդյունքները և դրանց քննարկումը ներկայացնող բաժնից, ամփոփումից, եզրակացություններից (թվով 3) և օգտագործված գրականության ցանկից, որը ներառում է ռուսերեն և անգլերեն լեզուներով 248 հոդում:

### ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈՂՆԵՐ

Աշխատանքը կատարվել է ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի մարդու գենոմիկայի և իմունոմիկայի լաբորատորիայում:

**Հետազոտության սուբյեկտները:** Հետազոտության մեջ ընդգրկվել են միմյանց հետ ազգակցական կապ չունեցող, ազգությամբ հայ, ՀՀ Առողջապահության նախարարության բժշկական կենտրոններում համապատասխան բուժօգնություն ստացող 225 ԻԿ-ով հիվանդներ և «Էրեբունի» բժշկական կենտրոնի 225 արյան դոնորներ: Հետազոտությունն իրականացնելու իրավունքը հաստատվել է ինստիտուտի էթիկայի հանձնաժողովի կողմից (IRB #00004079):

**Հետազոտության օբյեկտներ** են հանդիսացել հետազոտության մեջ ներգրավված սուբյեկտների արյան էրիթրոցիտներից անջատված գենոմային ԴՆԹ-ի նմուշները:

**Գենոմային ԴՆԹ-ի նմուշների անջատումն** իրականացվել է ֆենոլ-քլորոֆորմային [Sambrook & Russel, 2001] և քլորոֆորմ-աղային մեթոդներով [Miller et al., 1988]: **Ստացված ԴՆԹ-ի նմուշների մաքրության որոշումն** իրականացվել է սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով՝ չափելով նմուշների կլանման ինտենսիվությունը 280նմ, 260նմ և 230նմ ալիքի երկարությունների դեպքում: **ԴՆԹ-ի գենոմային նմուշների ամբողջականության գնահատումն** իրականացվել է ազարոզային ժելում էլեկտրոֆորեզի միջոցով:

**Հետազոտվող գեններում ԵՆՊ-ների ընտրությունն** ԻԿ-ի հետ հնարավոր ասոցիացիայի հայտնաբերման նպատակով իրականացվել է՝ օգտագործելով միջազգային HapMap [International Haplotype Map Project; <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>] ծրագրի տվյալների բազան: Ընտրությունն իրականացվել է ԵՆՊ-ների ֆունկցիոնալ նշանակության, միտոքային ալելի (ՄԱ) հանդիպման հաճախականության և «tagging»-անալիզի արդյունքների հիման վրա:

**ԻԿ-ի հետ ընտրված ԵՆՊ-ների հնարավոր ասոցիացիայի ուսումնասիրությունն** իրականացվել է ԴԼԹ-ի նմուշների գենոտիպավորման միջոցով՝ ալել-սպեցիֆիկ պրայմերներով պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի մեթոդի (ԱՄՊ-ՊՇՌ) կիրառմամբ [Bunce et al., 1995]: **ԱՄՊ-ՊՇՌ-ի համար պրայմերների դիզայն** իրականացվել է «GenBank» [nucleotide sequence database; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>] և ԱՄՆ-ի կենսատեխնոլոգիական ինֆորմացիայի ազգային կենտրոնի [www.ncbi.nlm.nih.gov] տվյալների բազայի նուկլեոտիդային հաջորդականությունների հիման վրա: **Ամպլիֆիկացիայի** իրականացման համար օգտագործվել են ալել-սպեցիֆիկ պրայմերներ և ռեակցիայի կանգնեցման համար անհրաժեշտ կոնստանտ պրայմեր: **ԴԼԹ-ի ամպլիֆիկացիայի արգասիքների էլեկտրոֆորեզն** իրականացվել է էթիդիումի բրոմիդ պարունակող 2% ագարոզային ժելում, որի վիզուալիզացիայի համար կիրառվել է կոնտակտային ուլտրամանուշակագույն լամպ:

**Ստացված տվյալների վիճակագրական վերլուծությունն** իրականացվել է «Graphpad Prism» (GraphPad Software Inc., ԱՄՆ), SPSS 16.0 (IBM Corp., ԱՄՆ), Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corp., ԱՄՆ) և SNPAnalyzer2 (ISTECH Inc., ԱՄՆ) ծրագրային փաթեթների միջոցով՝ կիրառելով Հարդի-Վայնբերգի օրենքը, Ֆիշերի ստույգ թեստը, Բոնֆերոնիի ճգրտման և Հոլմի-Բոնֆերոնիի, բինար լոգիստիկ ռեգրեսիոն (կրկնակի տրամաբանական հետընթաց) վերլուծության մեթոդները ճշմարտացիության հարաբերակցության (Log likelihood) և Հոսմերի Լեմեշովի թեստերը, Ման-Ուիթնիի Ս-թեստը, հավանականության առավելագույնացման (expectation maximisation՝ EM) ալգորիթմը, շղթայակցման անհավասարակշռության և հապլոտիպերի ասոցիացիայի վերլուծությունը, Գաբրիելի մեթոդը:

## **ԼԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԸ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ**

### **1. Կոմպլեմենտի H գործոնը կոդավորող CFH գենի ուսումնասիրությունն իշեմիկ կաթվածի ժամանակ**

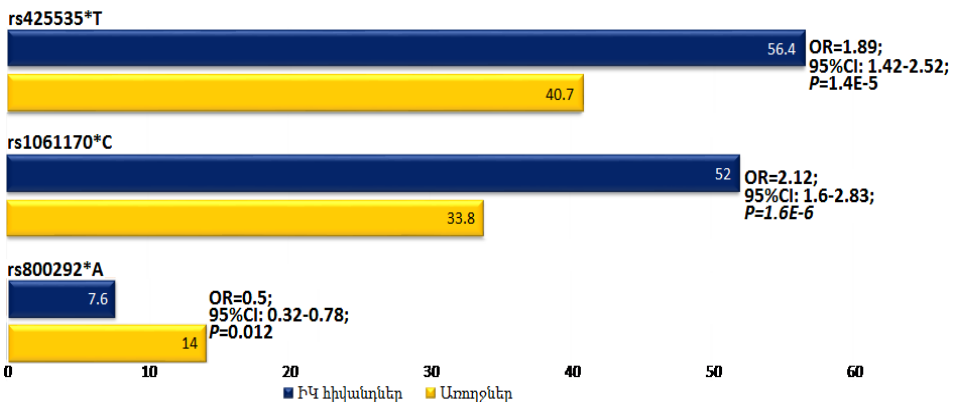
Տվյալ հետազոտության նպատակն էր ուսումնասիրել CFH գենի 3 ԵՆՊ-ների՝ rs800292-ի, rs1061170-ի և rs424535-ի հնարավոր ասոցիացիան ԻԿ-ի հետ: Այդ ԵՆՊ-ներից 2-ը՝ 162V-ը (rs800292) և Y402H-ը (rs1061170) ֆունկցիանալ են և ազդում են համապատասխանաբար կոմպլեմենտի H գործոնի՝ C3b բաղադրիչը և CRP-ն կապելու ուժի վրա [Ermini et al., 2011]: Մեր կողմից ընտրված 3-րդ ԵՆՊ-ը rs424535 ԵՆՊ-ն է, որը, ի տարբերություն մյուս երկուսի գտնվում է գենի չկոդավորող հատվածում՝ 17-րդ ինտրոնում [Wang et al., 2013]: Ստացված գենոտիպերի բաշխումը համապատասխանում է Հարդի-Վայնբերգի հավասարակշռության բանաձևին:

Համաձայն ստացված արդյունքների, հիվանդների խմբում rs800292\*А ՄԱ-ի հանդիպման հաճախականությունը 1.85 անգամ (0.076 vs. 0.14; OR=0.5; 95% CI: 0.32-0.78;  $P_{nom}$ =0.002; վիճակագրական ուժը=73.36%), իսկ ՄԱ-ը կրողների քանակը 1.9 անգամ (0.136 vs. 0.262; OR=0.45; 95%CI: 0.28-0.73;  $P_{nom}$ =0.001;

վիճակագրական ուժը=73.36%) փոքր է ստուգիչ խմբի համեմատ (Նկար 1):

Ինչ վերաբերվում է մեր կողմից ուսումնասիրված մյուս 2 ԵՆՊ-ներին, ապա ԻԿ-ով հիվանդների խմբում rs1061170\*С և rs424535\*Т ՄԱ հանդիպման հաճախականությունները, համապատասխանաբար, 1.54 անգամ (0.52 vs. 0.338; OR=2.12; 95%CI: 1.6-2.83;  $P_{nom}=2E-7$ ) և 1.39 անգամ (0.564 vs. 0.407; OR=1.89; 95%CI: 1.42-2.52;  $P_{nom}=1.1E-5$ ) մեծ է առողջների խմբում նշված ավելի հանդիպման հաճախականությունից (Նկար 1): Բացի դրանից, ԻԿ-ով հիվանդների խմբում, համեմատած առողջների հետ, վիճակագրորեն նշանակալի ավելի հաճախ են հանդիպում rs1061170\*С և rs424535\*Т ՄԱ-ները կրողները՝ համապատասխանաբար 1.33 (0.764 vs. 0.573; OR=2.43; 95%CI: 1.6-3.8;  $P_{nom}=6E-5$ ) և 1.18 անգամ (0.778 vs. 0.658; OR=2.05; 95%CI: 1.3-3.19;  $P_{nom}=0.004$ ):

ԻԿ-ի հետ CFH գենի ԵՆՊ-ների ասոցիացիայի վրա տարիքային տարբերության ազդեցությունը պարզաբանելու համար իրականացվել է ռեգրեսիոն վերլուծություն՝ ըստ որի, հաշվի առնելով տարիքային տարբերությունը, միայն rs800292 ԵՆՊ-ն է ցուցաբերել ասոցիացիա ԻԿ-ի հետ (OR=0.209; 95%CI: 0.073-0.603;  $P=0.004$ ): Այսպիսով, համաձայն հետազոտության արդյունքների CFH rs800292\*А ՄԱ-ը ցուցաբերում է բացասական ասոցիացիա ԻԿ-ի հետ, և դրա ժառանգումը նվազեցնում է ԻԿ-ով հիվանդանալու ռիսկը հայկական պոպուլյացիայում:



**Նկար 1. CFH գենի rs424535\*Т, rs1061170\*С և rs800292\*А ՄԱ-ների հաճախականությունը (%) ԻԿ-ով հիվանդների և առողջների խմբերում:**

ԻԿ-ով հիվանդների խմբում ՄԱ-ը չկրողների մոտ վիճակագրորեն նշանակալի փոքր է Գլազգոյի միավորը և մեծ է բուժման տևողությունը՝ համեմատած rs800292\*А ՄԱ-ը կրողների հետ (համապատասխանաբար՝ Ման-Ուիթնիի Ս թեստ  $P=0.037$  և  $P=0.032$ ), որը ևս մեկ անգամ հաստատում է նշված ԵՆՊ-ի ՄԱ-ի պաշտպանական դերն ԻԿ-ի առաջացման և զարգացման գերծում:

Մեր լաբորատորիայում նախկինում կատարված հետազոտություններում հայտնաբերվել է, որ rs1061170 և rs424535 ԵՆՊ-ների ՄԱ-ների ժառանգումը

բարձրացնում է շիզոֆրենիայով հիվանդանալու ռիսկը հայկական պոպուլյացիայում, իսկ rs800292 ԵՆՊ-ի ՄԱ-ի հաճախականության տարբերություն շիզոֆրենիայով հիվանդների և առողջների միջև չի հայտնաբերվել, չնայած այն հանգամանքին, որ rs800292\*А ՄԱ-ով հոմոզիգոտ գենոտիպ կրողների քանակը առողջների համեմատ ավելի քան 2 անգամ մեծ էր հիվանդների խմբում [Boyajyan et al., 2013]: Ցույց է տրվել, որ rs800292 ԵՆՊ-ը ասոցացված է դեղին բծի տարիքային դեգեներացիա (ԴԲԴ) հիվանդության զարգացման ցածր ռիսկի հետ [Hageman et al., 2005], իսկ ասիացիների մոտ դրական ասոցացված է պոլիպոլիդային խորոիդալ վասկուլոպաթիայի հետ [Wang et al., 2013]: Նշված ԵՆՊ-ի ՄԱ-ի և AA գենոտիպի հանդիպման հաճախականությունը ավելի ցածր է շաքարային ռեթինոպատիայով հիվանդների խմբում, քան առողջների մոտ [Wang et al., 2013]:

Այսպիսով, մեր կողմից ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ *CFH* գենը ասոցացված է ԻԿ-ի հետ, ինչը համապատասխանում է գրականության մեջ առկա տվյալներին՝ կապված բորբոքային պատասխանի ռեակցիաներում կոմպլեմենտի H գործոնի կարևոր դերի հետ [Volcik et al., 2008]:

## 2. Կոմպլեմենտի I գործոնը կոդավորող *CFI* գենի ուսումնասիրությունն իշեմիկ կաթվածի ժամանակ

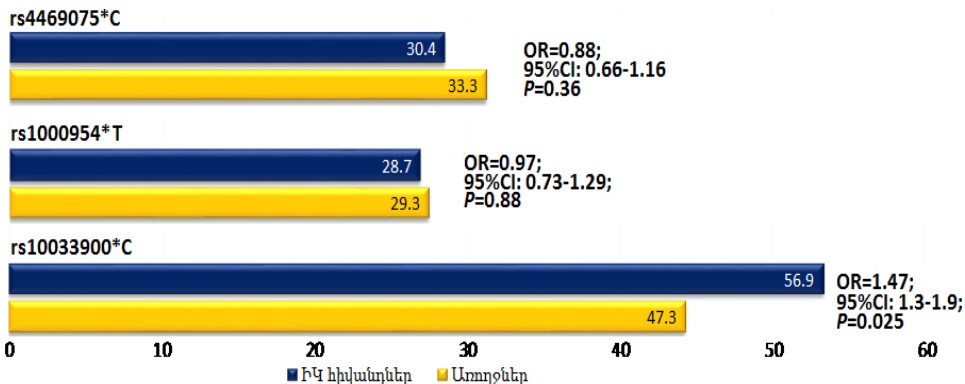
Կոմպլեմենտի I գործոնը կոդավորող *CFI* գենի մուտացիաները բերում են ծանր, վարակների, գլոմերուլոնեֆրիտի, աուտոիմունային հիվանդությունների և այնպիսի հիվանդությունների, որոնք ասոցացված են կոմպլեմենտի անվերահսկելի ակտիվացմամբ [Nilsson et al., 2011; Broderick et al., 2013; Qian et al., 2014]:

*CFI* գենի ԵՆՊ-ների հնարավոր ասոցիացիան ԻԿ-ի հետ ուսումնասիրելու նպատակով ընտրվել են 3 ԵՆՊ-ներ՝ rs10033900, rs1000954 և rs4469075: Ստացված գենոտիպերի բաշխումը համապատասխանում է Հարդի-Վայնբերգի հավասարակշռության բանաձևին:

Ըստ ստացված արդյունքների, rs10033900\*С ՄԱ-ի հանդիպման հաճախականությունը և նշված ավելը կրողների հանդիպման հաճախականությունը հիվանդների մոտ 1.2 անգամ (0.569 vs. 0.473; OR=1.47; 95%CI: 1.3-1.91;  $P_{nom}=0.005$ ; վիճակագրական ուժը=70.61%) և 1.18 անգամ (0.822 vs. 0.693; OR=2.05; 95%CI: 1.3-3.19;  $P_{nom}=0.002$ ; վիճակագրական ուժը=70.61%) գերազանցում է առողջների խմբում համապատասխան ցուցանիշը (Նկար 2):

ԻԿ-ի հետ *CFI* գենի ԵՆՊ-ների ասոցիացիայի վրա տարիքային տարբերության ազդեցությունը պարզաբանելու համար իրականացված ռեգրեսիոն վերլուծության արդյունքների համաձայն, չի նկատվում նշանակալի ասոցացիա 3 ԵՆՊ-ների և ԻԿ-ի միջև: Սակայն, ԻԿ-ով հիվանդների խմբում *CFI* գենի ուսումնասիրված 3 ԵՆՊ-ների ՄԱ-ները կրողների և չկրողների համեմատությունը ըստ կլինիկական ցուցանիշների ցույց տվեց, որ rs10033900\*С ՄԱ-ը կրողների մոտ ախտահարված օջախի մեծությունը նշանակալի մեծ է՝ չկրողների համեմատ (Ման-Ուիթնիի U թեստ  $P=0.007$ ):





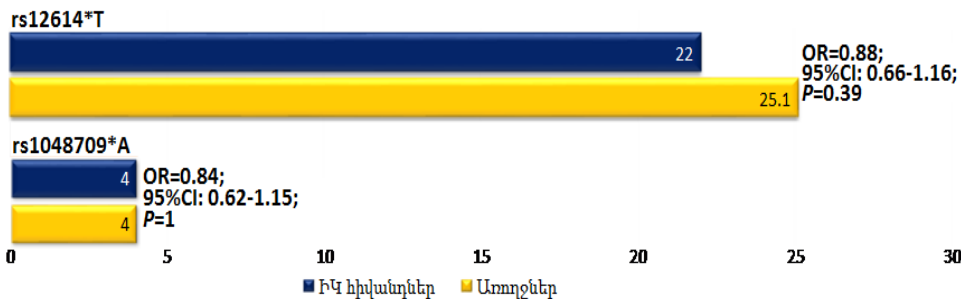
**Նկար 2. CFI գենի rs4469075\*C, rs1000954\*T և rs10033900\*C ՄԱ-ների հաճախականությունը (%) ԻԿ-ով հիվանդների և առողջների խմբերում:**

Այսպիսով, rs10033900, rs1000954 և rs4469075 եՆՊ-ները չեն ցուցաբերում որևէ ասոցիացիա ԻԿ-ի առաջացման հետ, մինչդեռ rs10033900 եՆՊ-ն ասոցացված է ԻԿ-ի պաթոգենեզի հետ: Բազմաթիվ աշխատանքներ վկայում են բորբոքային և նորանոթային հիվանդությունների հետ CFI գենի եՆՊ-ների ասոցիացիայի մասին [Leveziel et al., 2012]: Մեր լաբորատորիայում կատարված աշխատանքներում հայտնաբերվել է, որ rs10033900 եՆՊ-ի ՄԱ-ի ժառանգումը բարձրացնում է շիզոֆրենիայով և <ՏՄԻ-ով հիվանդանալու ռիսկը հայկական պոպուլյացիայում, իսկ rs1000954 և rs4469075 եՆՊ-ների ասոցացիան շիզոֆրենիայի և <ՏՄԻ-ի հետ բացակայում է [Boyajyan et al., 2013; Boyajyan et al., 2015]: Հայտնաբերվել է, որ rs10033900 եՆՊ-ն ասոցացված է անոթենո նորանոթագոյացման հետ [Leveziel et al., 2012]:

Այսպիսով, ստացված արդյունքները ևս մեկ անգամ հաստատում են կոմպլեմենտի I գործոնի ներգրավածությունն ԻԿ-ի պաթոմեխանիզմներում:

### **3. Կոմպլեմենտի B գործոնը կողավորող CFB գենի ուսումնասիրությունն իշեմիկ կաթվածի ժամանակ**

Հաշվի առնելով, որ մեր լաբորատորիայում նախկինում կատարված աշխատանքները ցույց են տվել ԻԿ-ի ժամանակ արյան պլազմայում կոմպլեմենտի B գործոնի մակարդակի նվազումը [Айвазян и соавт., 2005], մեր կողմից ուսումնասիրվեց CFB գենի rs12614 և rs1048709 եՆՊ-ների հնարավոր ասոցիացիան ԻԿ-ի ռիսկի հետ: Ըստ ստացված արդյունքների, rs12614\*T և rs1048709\*A ՄԱ-ների հանդիպման հաճախականության և նշված ալելները կրողների քանակի (Նկար 3) վիճակագրորեն նշանակալի տարբերություն ԻԿ-ով հիվանդների և առողջների խմբերի միջև չի գրանցվել:



**Նկար 3. CFB գենի rs12614\*T և rs1048709\*A ՄԱ-ների հաճախականությունը (%) ԻԿ-ով հիվանդների և առողջների խմբերում:**

Համաձայն ԻԿ-ով հիվանդների խմբում CFB գենի ուսումնասիրված 2 ԵՆՊ-ների ՄԱ-ները կրողների և չկրողների մոտ կլինիկական բնութագրերի տարբերությունները պարզաբանելու համար իրականացված վիճակագրական վերլուծության արդյունքների, նշված ԵՆՊ-ների և ԻԿ-ով հիվանդների կլինիկական բնութագրերի միջև որևէ տարբերություն չի հայտնաբերվել:

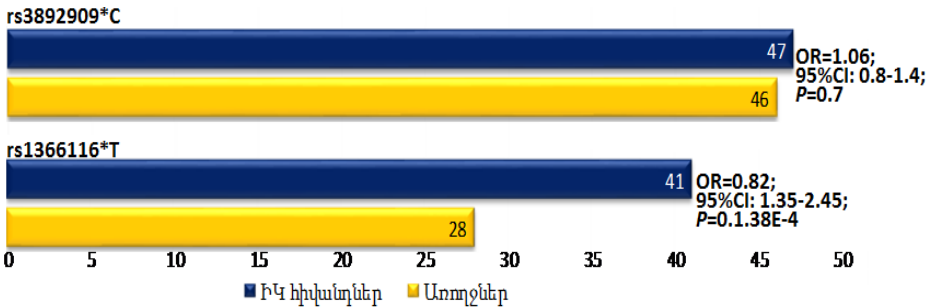
#### **4. Կոմպլեքսին 2 սպիտակուցը կոդավորող CPLX2 գենի ուսումնասիրությունն իշեմիկ կաթվածի ժամանակ**

Տվյալ հետազոտության նպատակն էր ուսումնասիրել կոմպլեքսին-2 սպիտակուցը կոդավորող գենի rs1366116 և rs3892909 ԵՆՊ-ների հնարավոր ասոցիացիան ԻԿ-ի ռիսկի հետ: Ստացված գենոտիպերի բաշխումը համապատասխանում է Հարդի-Վայնբերգի հավասարակշռության բանաձևին:

Ստացված արդյունքների համաձայն, rs1366116\*T ՄԱ-ի հանդիպման հաճախականությունը և նշված ալելը կրողների հանդիպման հաճախականությունը հիվանդների մոտ վիճակագրորեն նշանակալի մեծ է՝ համապատասխանաբար 1.45 (0.414 vs. 0.28; OR=1.82; 95% CI: 1.35-2.45;  $P_{nom}=6.9E-5$ ; վիճակագրական ուժը=74.12%) և 1.35 (0.629 vs. 0.47; OR=0.5; 95% CI: 0.338-0.755;  $P_{nom}=0.0008$ ) անգամ, ի համեմատ առողջների: Իսկ rs3892909\*C ՄԱ-ի հանդիպման հաճախականության և նշված ալելը կրողների քանակի վիճակագրորեն նշանակալի տարբերություն ԻԿ-ով հիվանդների և առողջների խմբերի միջև չի հայտնաբերվել (Նկար 4):

ԻԿ-ի հետ CPLX2 գենի ԵՆՊ-ների ասոցիացիայի վրա տարիքային տարբերության ազդեցությունը պարզաբանելու համար իրականացված ռեգրեսիոն վերլուծության արդյունքների համաձայն, rs1366116 ԵՆՊ-ը ցուցաբերել է դրական ասոցիացիա ԻԿ-ի հետ (OR=2.357; 95% CI: 1.355-4.099;  $P_{nom}=0.002$ ):

CPLX2 գենի rs1366116 ԵՆՊ-ը հայերի մոտ հանդիսանում է ռիսկի գործոն ոչ միայն ԻԿ-ի առաջացման և զարգացման, այլ նաև շիզոֆրենիայի [Zakharyan et al., 2014] և <SUՒ-ի համար [Boyajyan et al., 2015]:



**Նկար 4. *CPLX2* գենի rs3892909\*C և rs1366116\*T ՄԱ-ների հաճախականությունը (%) ԻԿ-ով հիվանդների և առողջների խմբերում:**

#### **5. Նետրին G1 սպիտակուցը և ուլեղի նեյրոտրոֆիկ գործոնը կողավորող *NTNG1* և *BDNF* գենների ուսումնասիրություն իշեմիկ կաթվածի ժամանակ**

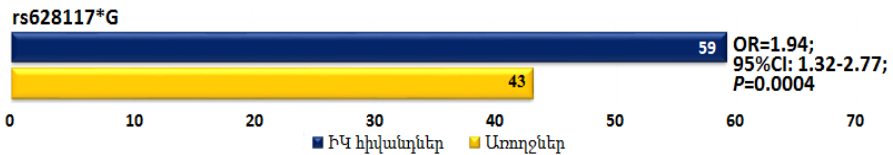
Սինապտիկ պլաստիկության խախտումների հետ կապված գեներն ազդում են և՛ ԻԿ-ի առաջացման և զարգացման, և՛ կաթվածից հետո վատ վերականգնման վրա: Այդ առումով հետաքրքրություն են ներկայացնում սինապտիկ պլաստիկության մեջ ներգրավված սպիտակուցները կողավորող գեները, որոնցից են նետրին G1 սպիտակուցը (*NTNG1*) և ուլեղի նեյրոտրոֆիկ գործոնը (*BDNF*) [Cramer et al., 2010]:

*BDNF* գենի ԵՆՊ-ներն ուսումնասիրվել են տարբեր հիվանդությունների հետ հնարավոր ասոցիացիաների բացահայտման նպատակով, մինչդեռ կաթվածի հետ հնարավոր ասոցիացիաների կլինիկական ուսումնասիրությունները բավականին քիչ են հանդիպում [Gao et al., 2010; Cerasa et al., 2010]:

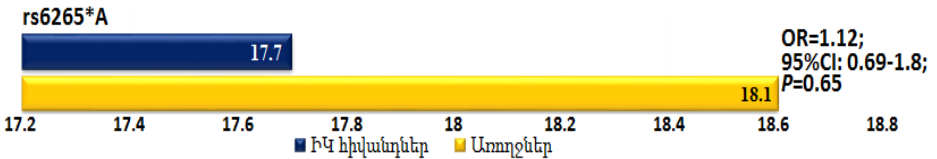
Աշխատանքի այս փուլում հետազոտության նպատակն էր ուսումնասիրել *NTNG1* և *BDNF* գենների համապատասխանաբար rs628117 և rs6265 ԵՆՊ-ների հնարավոր ասոցիացիան ԻԿ-ի հետ: Գենոտիպավորման արդյունքում ստացված գենոտիպերի բաշխումը համապատասխանում է Հարդի-Վայնբերգի օրենքին:

Ստացված արդյունքների համաձայն, *NTNG1* գենի rs628117\*G ՄԱ-ի հանդիպման հաճախականությունը և նշված ալելը կրողների հաճախականությունն ԻԿ-ով հիվանդների մոտ վիճակագրորեն նշանակալի մեծ է՝ համապատասխանաբար 1.38 (0.59 vs. 0.43; OR=1.94; 95% CI: 1.37-2.77;  $P_{nom}=0.0002$ ; վիճակագրական ուժը=95.24%) և 1.31 (0.83 vs. 0.625; OR=0.35; 95% CI: 0.195-0.625;  $P_{nom}=0.0003$ ; վիճակագրական ուժը=95.24%) անգամ, համեմատած առողջ անձանց հետ (Նկար 5):

*BDNF* գենի rs6265\*A ՄԱ-ի հանդիպման հաճախականության և նշված ալելը կրողների քանակի վիճակագրորեն նշանակալի տարբերություն (Նկար 6) ԻԿ-ով հիվանդների և առողջների խմբերի միջև չի հայտնաբերվել (համապատասխանաբար 0.5 vs. 0.33; OR=1.12; 95% CI: 0.69-1.8;  $P_{nom}=0.65$  և 0.34 vs. 0.35; OR=0.95; 95% CI: 0.56-1.61,  $P_{nom}=0.85$ ):



**Նկար 5. *NTNG1* գենի rs628117\*G ՄԱ-ի հաճախականությունը (%) ԻԿ-ով հիվանդների և առողջների խմբերում:**



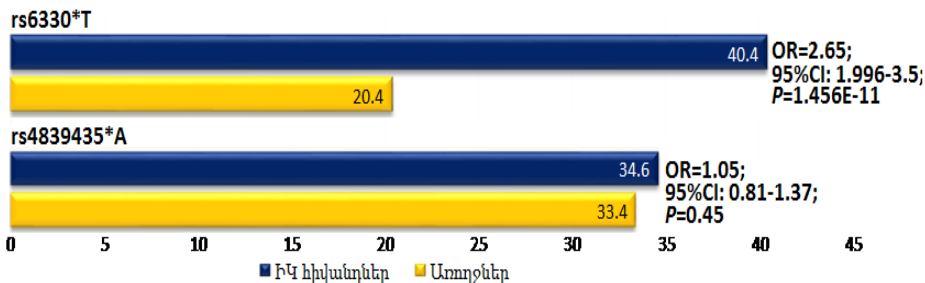
**Նկար 6. *BDNF* գենի rs6265\*A ՄԱ-ի հաճախականությունը (%) ԻԿ-ով հիվանդների և առողջների խմբերում:**

ԻԿ-ի հետ *NTNG1* գենի ԵՆՊ-ների ասոցիացիայի վրա տարիքային տարբերության ազդեցության գնահատման համաձայն, rs628117 ԵՆՊ-ի ՄԱ-ի GG գենոտիպով հիվանդների քանակը վիճակագրորեն նշանակալի մեծ է համեմատած առողջների խմբի հետ (OR=9.289; 95% CI: 1.293-66.738;  $P=0.027$ ): Այսպիսով, առաջին անգամ ցույց է տրվել *NTNG1* գենի ասոցիացիան ԻԿ-ի հետ:

## 6. Նեյրոնների աճի գործոնը և դրա ռեցեպտորը կողավորող *NGF* և *NGFR* գենների ուսումնասիրությունն իշեմիկ կաթվածի ժամանակ

Նեյրոնների աճի գործոնը և դրա ռեցեպտորը հանդիսանում են սինապտիկ պլաստիկության կարևոր միջնորդանյութեր [McAllister et al., 1999]: Հաշվի առնելով նշված սպիտակուցների և դրանք կողավորող գենների ներգրավվածությունը նեյրոդեգեներատիվ և բորբոքային հիվանդությունների պաթոգենեզում [Cai et al., 2014] և դրանց կարևոր դերը սինապտիկ պլաստիկության և բորբոքային գործընթացներում, մեր կողմից ուսումնասիրվել է *NGF* գենի rs6330 և rs4839435 և *NGFR* գենի rs734194, rs2072446 և rs11466155 ԵՆՊ-ների հնարավոր ասոցիացիան ԻԿ-ի հետ: Ստացված գենոտիպերի բաշխումը համապատասխանում է Հարդի-Վայնբերգի հավասարակշռության բանաձևին:

Համաձայն ստացված արդյունքների, *NGF* գենի rs6330\*T ՄԱ-ի հանդիպման հաճախականությունը և այն կրողների թիվն ԻԿ-ով հիվանդների խմբում մեծ էր, համեմատած առողջ անձանց հետ (Նկար 7): *NGF* գենի rs4839435 ԵՆՊ-ի և ԻԿ-ի միջև չի հայտնաբերվել որևէ ասոցիացիա:



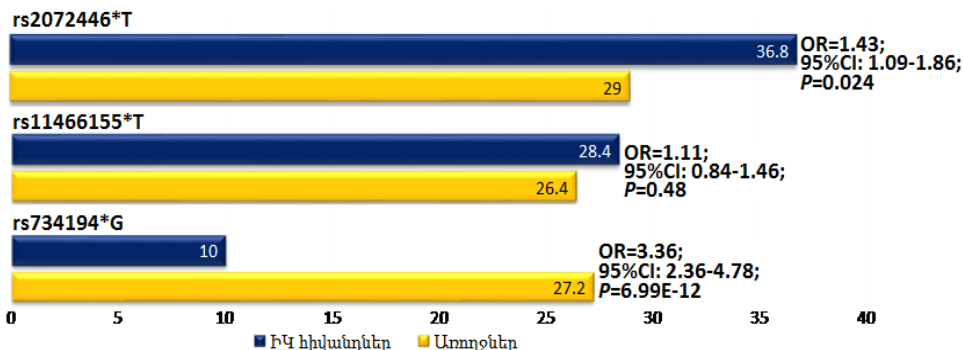
**Նկար 7. *NGF* գենի rs6330\*T և rs4839435\*A ՄԱ-ների հաճախականությունը (%) ԻԿ-ով հիվանդների և առողջների խմբերում:**

Ըստ ԻԿ-ի հետ *NGF* գենի ԵՆՊ-ների ասոցիացիայի վրա տարիքային տարբերության ազդեցությունը պարզաբանելու համար իրականացված ռեգրեսիոն վերլուծության արդյունքների, rs6330 ԵՆՊ-ն ցուցաբերել է դրական ասոցիացիա ԻԿ-ի հետ ( $OR=9.433$ ; 95% CI: 2.558-34.791;  $P=0.001$ ): Բացի այդ, rs6330\*T ՄԱ-ը կրողների մոտ վիճակագրորեն նշանակալի մեծ են կրկնվող ԻԿ-ի դեպքերը (համապատասխանաբար՝ 39.3% և 10.5%, Ֆիշերի ստույգ թեստ  $P=0.032$ ) և ախտահարված օջախի մեծությունը (Ման-Ուիթնիի U թեստ  $P=0.023$ ): Այս արդյունքները հաստատում են rs6330 ԵՆՊ-ի ասոցիացիան ԻԿ-ի առաջացման, զարգացման և բարդացման հետ:

*NGFR* գենի rs734194\*G ՄԱ-ի հանդիպման հաճախականությունը և այն կրողների քանակն հիվանդների մոտ համապատասխանաբար 2.72 (0.1 vs. 0.272;  $OR=3.36$ ; 95% CI: 2.36-4.78;  $P_{nom}=2.33E-12$ ; վիճակագրական ուժը=99.5%) և 2.42 անգամ փոքր է (0.118 vs. 0.456;  $OR=3.62$ ; 95% CI: 2.42-5.42;  $P_{nom}=1.7E-10$ ; վիճակագրական ուժը=99.5%), քան առողջների մոտ, իսկ rs2072446\*T ՄԱ-ի համար նշված ցուցանիշները, ընդհակառակը, համապատասխանաբար 1.26 (0.368 vs. 0.29;  $OR=1.43$ ; 95% CI: 1.09-1.86;  $P_{nom}=0.008$ ; վիճակագրական ուժը=58.35%) և 1.27 անգամ մեծ են (0.6 vs. 0.472;  $OR=1.68$ ; 95% CI: 1.18-2.39;  $P_{nom}=0.004$ ; վիճակագրական ուժը=58.35%) հիվանդների մոտ: *NGFR* գենի rs11466155\*T ՄԱ-ի հանդիպման հաճախականության և այն կրողների թվի տարբերություն հիվանդների և առողջների միջև չի բացահայտվել (Նկար 8):

Համաձայն ԻԿ-ի հետ *NGFR* գենի 3 ԵՆՊ-ների ասոցիացիայի վրա տարիքային տարբերության ազդեցությունը պարզաբանելու համար իրականացված ռեգրեսիոն վերլուծության արդյունքների, rs734194 ԵՆՊ-ը ցուցաբերել է բացասական ասոցիացիա ԻԿ-ի հետ ( $OR=0.034$ ; 95% CI: 0.002-0.543;  $P=0.017$ ), իսկ rs2072446 ԵՆՊ-ի TT գենոտիպի ժառանգումը բարձրացնում է ԻԿ-ի զարգացման ռիսկը ( $OR=4.469$ , 95% CI: 1.293-15.454,  $P=0.018$ ):

Այսպիսով, *NGF* գենի rs6330 և *NGFR* գենի rs2072446 ԵՆՊ-ները դրական ասոցացված են ԻԿ-ի հետ, իսկ *NGFR* գենի rs734194 ԵՆՊ-ի ՄԱ-ի ժառանգումը նվազեցնում է ԻԿ-ի առաջացման ռիսկը հայկական պոպուլյացիայում:



**Նկար 8. *NGFR* գենի rs2072446\*T, rs11466155\*T և rs734194\*G ՄԱ-ների հաճախականությունը (%) ԻԿ-ով հիվանդների և առողջների խմբերում:**

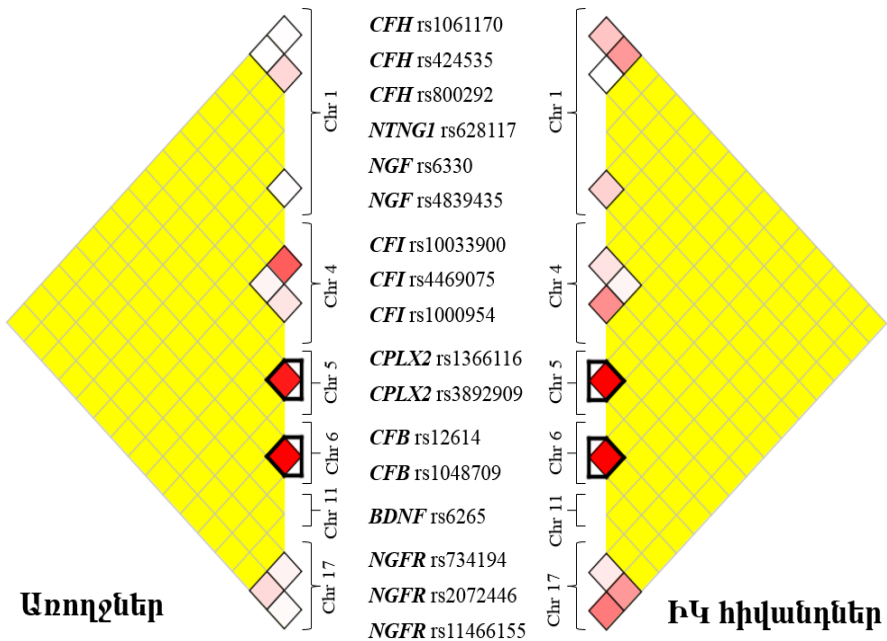
## 7. Ուսումնասիրված ԵՆՊ-ների միջև շղթայակացման անհավասարակշռության և հապլոտիպերի վերլուծությունը

Աշխատանքի հաջորդ փուլում իրականացվել է ուսումնասիրված ԵՆՊ-ների ՇԱ վերլուծություն: Վիճակագրական վերլուծության արդյունքում ստացված տվյալները ներկայացված են նկար 9-ում:

Համաձայն Գաբրիելի մեթոդով ստացված արդյունքների, մեր կողմից հայտնաբերվել են ՇԱ երկու բլոկներ, որոնցից առաջինը գտնվում է 5-րդ քրոմոսոմի վրա և կազմված է *CPLX2* գենի rs1366116 և rs3892909 պոլիմորֆիզմներից, իսկ երկրորդը գտնվում է 6-րդ քրոմոսոմի վրա և կազմված է *CFB* գենի rs12614 և rs1048709 պոլիմորֆիզմներից:

ՇԱ վերլուծությունից հետո իրականացվել է ԻԿ-ի հետ *CPLX2* գենի rs1366116/rs3892909 և *CFB* գենի rs12614/rs1048709 բլոկների հապլոտիպերի ասոցիացիայի վերլուծություն, որի արդյունքները ներկայացված են աղյուսակ 1-ում: Համաձայն ստացված արդյունքների, *CPLX2* գենի rs1366116/rs3892909 բլոկի CT հապլոտիպի հանդիպման հաճախականությունն ԻԿ-ով հիվանդների մոտ վիճակագրորեն նշանակալի փոքր է առողջների համեմատ (0.16 vs. 0.24; OR=0.437; 95% CI: 0.249-0.766;  $P_{nom}=0.004$ ;  $P_{nom}=0.01$ ): Ինչ վերաբերվում է *CPLX2* գենի rs1366116/rs3892909 բլոկի մյուս երեք՝ CC, TT և TC հապլոտիպերին, ապա ԻԿ-ով հիվանդների և առողջների միջև չի հայտնաբերվել որևէ վիճակագրորեն նշանակալի տարբերություն:

ԻԿ-ով հիվանդների և առողջ անձանց մոտ երկրորդ՝ *CFB* գենի rs12614/rs1048709 բլոկի հապլոտիպերի հանդիպման հաճախականությունների տարբերության ուսումնասիրությունը ցույց է տվել, որ TG հապլոտիպը վիճակագրորեն նշանակալի հաճախ է հանդիպում ԻԿ-ով հիվանդների մոտ (0.19 vs. 0.13; OR=1.772; 95% CI: 1.3-1.37;  $P_{nom}=0.016$ ;  $P_{corr}=0.04$ ), համեմատած առողջ անձանց հետ:



**Նկար 9. Գաբրիելի մեթոդով հայտնաբերված ՇԱ բլոկներն առողջ անձանց և ԻԿ-ով հիվանդների խմբերում:**

Այսպիսով, ՇԱ վերլուծության արդյունքում հայտնաբերվել են շղթայակցման երկու բլոկներ: Ավելին, հապլոտիպերի ասոցիացիայի վերլուծության արդյունքների համաձայն, առաջին բլոկի՝ *CPLX2* գենի rs1366116/rs3892909 CT հապլոտիպի ժառանգումն իջեցնում է, իսկ երկրորդ բլոկի՝ *CFB* գենի rs12614/rs1048709 TG հապլոտիպի ժառանգումը, ընդհակառակը, բարձրացնում է ԻԿ-ի զարգացման ռիսկը հայկական պոպուլյացիայում:

Հարկ է նշել նաև, որ Գաբրիելի մեթոդով հայտնաբերված ՇԱ երկու բլոկները, որոնք կազմված են *CPLX2* գենի rs1366116/rs3892909 և *CFB* գենի rs12614/rs1048709 ԵՆՊ-ներից, գտնվում են, համապատասխանաբար, 5-րդ և 6-րդ քրոմոսոմների վրա:

Գիտական գրականության մեջ առկա են բազմաթիվ աշխատանքներ, որոնց համաձայն, 5-րդ քրոմոսոմի 5q ուսում տեղակայված է ԻԿ-ի նկատմամբ հակվածությունը պայմանավորող լոկուս: Բազմաթիվ հետազոտություններ ցույց են տվել, որ այս քրոմոսոմային հատվածում տեղակայված են 2-ից ավելի գեններ, որոնք պայմանավորում են կաթվածի նկատմամբ նախատրամադրվածությունը: Ընդ որում, դրանցից ամենամեծ դերը պատկանում է ֆոսֆոդիէսթերազա 4D սպիտակուցը կոդավորող *PDE4D* գենի պոլիմորֆ ալելներին ու հապլոտիպերին

[Nilsson-Ardnor et al., 2005; Bevan et al., 2008; Shao et al., 2014]: Մեր հետազոտության արդյունքների համաձայն, *CPLX2* գենի rs1366116\*Т ՄԱ-ը, ինչպես նաև rs1366116/rs3892909 CT հաալլոտիախ սաոցացվաժ են ԻԿ-ի հետ, իսկ *CPLX2* գենը գտնվում է 5q35.2 լոկուսում:

**Աղյուսակ 1.**

**Հաալլոտիաերի սաոցացիալի վերլուծությունն ԻԿ-ով հիվառնդների և առողջ անձանց խմբերում:**

| Բլոկ                                                         | Հաալլոտիալ | Հաճախ. (%) |               |          | OR<br>(95% CI)         | <i>P</i> <sup>nom</sup><br>( <i>P</i> <sup>corr</sup> ) |
|--------------------------------------------------------------|------------|------------|---------------|----------|------------------------|---------------------------------------------------------|
|                                                              |            | Ընդհանուր  | ԻԿ հիվառնդներ | Առողջներ |                        |                                                         |
| <b>Բլոկ 1</b><br><i>CPLX2</i> գեն<br>rs1366116/<br>rs3892909 | CC         | 0.47       | 0.46          | 0.48     | 0.726<br>(0.395-1.334) | 0.3<br>(1)                                              |
|                                                              | TT         | 0.32       | 0.37          | 0.26     | 1.525<br>(0.901-2.58)  | 0.115<br>(0.4)                                          |
|                                                              | CT         | 0.2        | 0.16          | 0.24     | 0.437<br>(0.249-0.766) | 0.004<br>(0.01)                                         |
|                                                              | TC         | 0.002      | 0             | 0.005    | 0<br>(0)               | 0.94<br>(1)                                             |
| <b>Բլոկ 2</b><br><i>CFB</i> գեն<br>rs12614 /<br>rs1048709    | CG         | 0.77       | 0.74          | 0.8      | 1.369<br>(0.445-4.21)  | 0.582<br>(1)                                            |
|                                                              | TG         | 0.165      | 0.19          | 0.13     | 1.772<br>(1-3.137)     | 0.016<br>(0.048)                                        |
|                                                              | TA         | 0.06       | 0.06          | 0.06     | 1.302<br>(0.575-2.946) | 0.525<br>(1)                                            |

Վերջին շրջանի հետազոտություններում հայտնաբերվել է ԻԿ-ի ռիսկի հետ սաոցացվաժ *SUPT3H/CDC5L* գենալիռ հատվաժը, ինչպես նաև միջգենալիռ ԵՆՊ-ներ, որոնք գտնվում են 6p21.1 լոկուսում [Holliday at al., 2012]: Հարկ է նշել, որ 6p21.33 լոկուսում է տեղակալվաժ նաև մեր կողմից ուսումնասիրվաժ *CFB* գենը: Եվ, համաձայն մեր հետազոտության արդյունքների, *CFB* գենի rs12614/rs1048709 TG հաալլոտիալ ժառանգումը բարձրացնում է ԻԿ-ի զարգացման ռիսկը հալկական ալոպոլլացիալում:



## ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Կոմպլեմենտի համակարգի գեներում եզակի նուկլեոտիդային պոլիմորֆիզմներն ասոցացված են ինչպես իշեմիկ կաթվածի ռիսկի նվազման հետ (*CFH* գենի rs800292 պոլիմորֆիզմ), այնպես էլ հիվանդության կլինիկական ընթացքի ցուցանիշների հետ: Այսպես, *CFH* գենի rs800292 պոլիմորֆիզմը կապված է հիվանդության ժամանակ դիտվող գիտակցության խանգարման և կոմատոզ վիճակի ցածր աստիճանի, ինչպես նաև հիվանդների արագ վերականգնման հետ, իսկ *CFI* գենի rs10033900\*С միոթային ալելն ասոցացված է իշեմիկ կաթվածի ժամանակ դիտվող ախտահարված օջախի մեծության հետ:
2. Սինապտիկ պլաստիկության գործընթացներում ներգրավված գեներն ասոցացված են ինչպես իշեմիկ կաթվածի առաջացման բարձր ռիսկի (*CPLX2* գենի rs1366116, *NTNG1* գենի rs628117 և *NGF* գենի rs6330 պոլիմորֆիզմներ), այնպես էլ ռիսկի նվազման (*NGFR* գենի rs734194 պոլիմորֆիզմ) հետ: Ընդ որում, *NGF* գենի rs6330 պոլիմորֆիզմն ասոցացված է ուղեղում ախտահարված օջախի մեծության հետ և դրա ժառանգումը մեծացնում է իշեմիկ կաթվածի կրկնվելու ռիսկը:
3. Իշեմիկ կաթվածով հիվանդների և առողջների խմբերում հայտնաբերվել են 2 շղթայակցման բլոկներ, որոնցից մեկը ներառում է *CPLX2* գենի rs3892909 և rs1366116, իսկ մյուսը՝ *CFB* գենի rs12614 և rs1048709 պոլիմորֆիզմները: Ընդ որում, *CPLX2* գենի rs3892909 և rs1366116 պոլիմորֆիզմների CT հապլոտիպի ժառանգումն իջեցնում է իշեմիկ կաթվածով հիվանդանալու ռիսկը, իսկ *CFB* գենի rs12614 և rs1048709 պոլիմորֆիզմների TG հապլոտիպն ասոցացված է իշեմիկ կաթվածի զարգացման բարձր ռիսկի հետ:

**Հոդվածներ**

1. Stepanyan A., Zakharyan R., Boyajyan A. The netrin G1 gene rs628117 polymorphism is associated with ischemic stroke. // Neuroscience Letters. 2013; 549:74-77.
2. Boyajyan A., Stepanyan A., Avetyan D., Ghazaryan H., Atshemyan S., Zakharyan R., Pirumyan K., Tsakanova G. Genetic variations associated with brain disorders: Focus on synaptic plasticity and apoptosis regulatory genes in schizophrenia, posttraumatic stress disorder and ischemic stroke. // International Journal of Genetics and Genomics. 2014; 2(2):19-29.
3. Stepanyan A.S. Association of the complement factor H gene variants and ischemic stroke in Armenian population. // Biological Journal of Armenia. 2014; 66 (1):66-71.
4. Stepanyan A.S., Atshemyan S.A., Boyajyan A.S. Association of the complexin-2 gene rs1366116 polymorphism with ischemic stroke. // Biological Journal of Armenia. 2014; 66 (1):92-96.

**Հրատարակումներ գիտաժողովների նյութերում**

5. Степанян А., Захарян Р., Бояджян А. Ассоциация rs628117 полиморфизма нетрина G1 с ишемическим инсультом. // Материалы III международной конференции “Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине”. Казань, РФ, 2012, р. 357-358.
6. Stepanyan A., Zakharyan R., Boyajyan A. Association of the netrin G1 gene rs628117 polymorphism with ischemic stroke in Armenian population. // Proceedings of the International young scientists Conference “Perspectives for development of molecular and cellular biology-3”. Yerevan, RA, 2012, p. 189-193.
7. Boyajyan A., Ghazaryan H., Stepanyan A., Zakharyan R. Genetic polymorphisms of CFH in schizophrenia and ischemic stroke. // Proceedings of the 14<sup>th</sup> European Meeting on Complement in Human Disease, Jena, Germany. Molecular Immunology. 2013; 56(3):294.
8. Stepanyan A. Study of association between ischemic stroke and genetic polymorphisms of the complement alternative pathway factor H. // Proceedings of the International young scientists Conference “Perspectives for development of molecular and cellular biology-4”, Yerevan, RA. Biological Journal of Armenia. 2013; 65 (Suppl 1):139-140.
9. Stepanyan A., Boyajyan A. Genetic variations of complement factors in ischemic stroke. // Proceedings of the 24<sup>th</sup> European Stroke Conference, Vienna, Austria. Cerebrovascular Diseases. 2015; 39(2):202.
10. Stepanyan A., Tsakanova G. Association of synaptic plasticity genes polymorphisms with ischemic stroke in Armenian population. // Proceedings of the International youth conference “Science and innovation 2015”, Tsaghkadzor, RA. 2015, p.195-200.

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ РЕГУЛЯТОРОВ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА И СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

### Р Е З Ю М Е

**Ключевые слова** - ишемический инсульт, регуляторы системы комплемента, регуляторы синаптической пластичности, однонуклеотидные полиморфизмы, генотипирование.

По данным Всемирной организации здравоохранения, во всем мире ежегодно регистрируется 795 тысяч случаев инсульта, из которых 619 тысяч являются ишемическими. Инсульт занимает 3-е место по смертности, уступая лишь инфаркту миокарда и онкологическим заболеваниям. Согласно официальным данным Министерства здравоохранения РА, в Армении в 2014г. число больных ишемическим инсультом (ИИ) достигло 2320, из которых у 1026 инсульт диагностировался в первый раз.

Важную роль в повреждении и гибели клеток при ИИ играют неконтролируемая гиперактивация воспалительного ответа и нарушение синаптической пластичности, которые являются ключевыми патогенными факторами, приводящими к неконтролируемой гибели клеток, усугубляющими состояние больных ИИ и предопределяющими его неблагоприятный исход. В настоящее время, однако, нет четкого представления о молекулярно-генетических компонентах и механизмах, задействованных в развитии этих процессов, а существующие знания немногочисленные и спорны.

Важнейшим медиатором развития воспалительных реакций является каскад комплемента. Активация комплемента по классическому, альтернативному и лектиновому путям, отличающимися механизмами инициации и составом компонентов, приводит к формированию опсоинов, анафилатоксинов, хемотаксинов и цитолитического мембраноатакующего комплекса. При неконтролируемой гиперактивации комплемента эти соединения индуцируют повреждение и гибель здоровых клеток. Предыдущие исследования, проведенные в нашей лаборатории, свидетельствуют, что системная гиперактивация альтернативного пути активации комплемента вовлечена в патогенез ИИ. Важнейшим компонентом альтернативного пути является фактор В, а регуляторами - факторы Н и I, данные о которых при ИИ до настоящего времени не были представлены.

Важнейшими регуляторами синаптической пластичности являются нетрин G1, комплексин-2, фактор роста нейронов, рецептор фактора роста нейронов и нейротрофический фактор мозга.

Данные о функциональном статусе изучаемых белков при ИИ до настоящего

времени в литературе не были представлены. Пополнение знаний о молекулярно-генетических механизмах нарушений воспалительного ответа и синаптической пластичности при ИИ может способствовать разработке новых подходов, позволяющих снижать риск развития инсульта, а также влиять на его течение и исход.

**Основная цель настоящей работы** состояла в изучении возможного вовлечения генов, кодирующих регуляторы альтернативного пути комплемента и синаптической пластичности в этиопатогенез ИИ у человека. **Задачи исследования, направленные на достижение отмеченной цели, включали:** 1) исследование возможной ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов генов, кодирующих регуляторы альтернативного пути комплемента (*CFB*, *CFH* и *CFI*) с ИИ; 2) исследование возможной ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов генов, кодирующих регуляторы синаптической пластичности (*NTNG1*, *CPLX2*, *NGF*, *NGFR* и *BDNF*) с ИИ; 3) выявление возможной ассоциации обнаруженных гаплотипов с развитием ИИ.

Объектами исследования являлись образцы геномной ДНК больных ИИ и здоровых лиц. Исследования проводились с использованием методов фенол-хлороформной и хлороформ-солевой экстракции геномной ДНК, спектрофотометрического определения чистоты полученных образцов ДНК, оценки целостности полученных образцов ДНК, полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами (PCR-SSP), горизонтального электрофореза. Статистическая обработка полученных данных проводилась согласно закону Харди-Вайнберга, точному тесту Фишера, методу бинарной логистической регрессии, анализам неравновесия по сцеплению и ассоциации гаплотипов, критерию максимизации ожидания и методу Габриэля.

Полученные данные наглядно демонстрируют вовлечение в этиопатогенез ИИ однонуклеотидных полиморфизмов генов, кодирующих факторы Н и I, которые являются важными регуляторами альтернативного пути комплемента, а также генов, кодирующих белки нетрин G1 и комплексин-2, фактор роста нейронов и рецептор фактора роста нейронов.

Впервые выявлена ассоциация полиморфных участков генов *CFH*, *NTNG1*, *NGF* и *NGFR*, кодирующих регуляторы альтернативного пути комплемента и синаптической пластичности, с риском развития ИИ. 15 исследованных однонуклеотидных полиморфизмов среди 17-и исследованных изучены впервые при ИИ. Результаты исследований доказывают вовлечение вышеотмеченных генов в этиопатогенез ИИ, что подтверждает необходимость выявления и уточнения роли этих генов и кодируемых ими белков при ИИ в последующих исследованиях.

Таким образом, выявление новых факторов риска развития ИИ не только расширяет существующие знания относительно молекулярно-генетических этиопатомеханизмов ИИ, но и способствует разработке новых мишеней и подходов для предотвращения и эффективного лечения ИИ.

GENETIC POLYMORPHISMS OF THE REGULATORS OF THE COMPLEMENT  
SYSTEM AND SYNAPTIC PLASTICITY IN ISCHEMIC STROKE

S U M M A R Y

**Keywords:** *ischemic stroke, complement system regulators, synaptic plasticity regulators, single nucleotide polymorphisms, genotyping.*

According to the data provided by World Health Organization, worldwide 795 thousand cases of stroke are registered annually, 619 thousands of which are ischemic strokes (IS). Worldwide stroke is the third leading cause of mortality and morbidity after cancer and heart diseases. According to the official data of the Ministry of Health RA, in 2014 the number of IS patients achieved 2320, 1026 of which were diagnosed as a first episod IS.

The uncontrolled hyperactivation of the inflammatory response and the alteration in synaptic plasticity play a crucial role in the cell damage and death in IS. Inflammatory response and synaptic plasticity are the key pathogenic factors leading to uncontrolled cell death, which badly influences stroke progression and outcome. However, the molecular-genetic components and mechanisms involved in the development of these processes are not clear yet, and the existing knowledge is very limited and controversial.

The major mediator of the development of the inflammatory reactions is the complement cascade. Activation of the complement by the classical, alternative, and lectin pathways, differing from each other by the initiation mechanisms and components, leads to the formation of opsonins, anaphylatoxins, chemotaxins, and cytolytic membrane attack complex. In the conditions of uncontrolled hyperactivation of the complement the above mentioned compounds may induce cell damage and death. Our previous studies indicated that systemic hyperactivation of the complement alternative pathway is involved in the pathogenesis of IS. Factor B is the major component, and factor H and I are the regulators of complement alternative pathway. However, there is no data in the literature regarding these factors in IS.

The major regulators of synaptic plasticity are netrin G1, complexin-2, nerve growth factor (NGF), nerve growth factor receptor (NGFR) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). However, there is no data in the literature regarding these factors in IS. The enlargement of the knowledge about the molecular and genetic mechanisms of the alterations of inflammatory response and synaptic plasticity in IS could help to develop new approaches to decrease the risk of stroke development, as well as to influence stroke progression and outcome.

**The present study aimed** to reveal the possible involvement of the genes encoding the regulators of complement alternative pathway and synaptic plasticity in the etiopathogenesis of human IS. To achieve this goal, we performed:

- 1) assessment of the possible association of IS with the single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes encoding the regulators of complement alternative pathway (*CFB*, *CFH* and *CFI*);
- 2) assessment of the possible association of IS with the SNPs in the genes encoding the regulators of synaptic plasticity (*NTNG1*, *CPLX2*, *NGF*, *NGFR* and *BDNF*);
- 3) identification of the possible association of revealed haplotypes with the development of IS.

The experiments involved samples of genomic DNA of IS patients and healthy volunteers. The studies were performed using a series of methods, including phenol-chloroform and salt-chloroform extraction of genomic DNA, spectrophotometric analysis for nucleic acid quantitation (to determine the purity of obtained DNA samples), evaluation of the integrity of obtained DNA samples, polymerase chain reaction with allele-specific primers (PCR-SSP) and horizontal electrophoresis. The data were analyzed using Hardy-Weinberg equilibrium, Fisher's exact test, binary logistic regression, linkage disequilibrium, haplotype association test, expectation maximization, Gabriel's method.

The results obtained demonstrated the involvement of studied SNPs in genes encoding the major regulators of complement alternative pathway, factors H and I, and in genes encoding netrin G1, complexin-2, nerve growth factor and nerve growth factor receptor in the etiopathogenesis of IS.

Our study for the first time revealed the association of the polymorphic regions of genes encoding the regulators of complement alternative pathway and synaptic plasticity, *CFH*, *NTNG1*, *NGF* and *NGFR*, with the risk of IS development. Moreover, 15 studied SNPs among 17 studied SNPs were studied in IS for the first time. The results obtained show the involvement of these genes in the etiopathogenesis of IS, that confirms the necessity to reveal and define more exactly the role of these genes and their proteins in IS in further studies.

Thus, the revelation of new risk factors for IS development not only enlarges the existing knowledge about the molecular and genetic etiopathomechanisms of IS, but also helps to develop new target and approaches for the prevention and effective treatment of IS.

