

*На правах рукописи*

**ЗАЛОЗНЯЯ**

**Ирина Владимировна**

**ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЯ  
КАК ФАКТОР ВОЗРАСТНОГО НАРУШЕНИЯ  
ЦЕНТРАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ  
И КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ У САМОК КРЫС**

**14.01.30 – геронтология и гериатрия**

**03.01.04 – биохимия**

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

**Санкт-Петербург – 2018**

Работа выполнена в лаборатории биохимии отдела клеточной биологии и патологии Автономной научной некоммерческой организации высшего образования Научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» и в ФГБУН «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта»

**Научные руководители:**

заслуженный деятель науки РФ,  
доктор биологических наук, профессор  
**Арутюнян Александр Варганович**  
доктор биологических наук, профессор  
**Козина Людмила Семеновна**

**Официальные оппоненты:**

**Виноградова Ирина Анатольевна**, доктор медицинских наук, профессор, ВГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», кафедра фармакологии, организации и экономики фармации медицинского института, заведующая кафедрой.

**Наливаева Наталия Николаевна**, доктор биологических наук, ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, лаборатория сравнительной физиологии и патологии ЦНС, ведущий научный сотрудник.

**Ведущая научная организация:**

ФГБУН Институт физиологии им. акад. И.П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

Защита диссертации состоится «18» мая 2018 г. в 14.00 часов на заседании Диссертационного Совета Д 521.103.01 в АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» по адресу: 197119, Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» <http://www.gerontology.ru>.

Автореферат разослан «          »            2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного Совета,  
доктор биологических наук,  
профессор

Козина Людмила Семеновна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Гипергомоцистеинемия как состояние, развивающееся в организме человека с возрастом, характеризуется интенсификацией процессов окисления макромолекул активными формами кислорода во всех органах и тканях, в том числе и в тканях мозга. Это, в свою очередь, вызывается увеличением содержания в кровяном русле аминокислоты L-гомоцистеина, обладающего цитотоксической активностью, а также продукта ее спонтанного окисления - гомоцистеиновой кислоты - с еще более выраженным цитотоксическим эффектом [Topal G. et al., 2004; Boldyrev A.A., 2009; Lopez-Torres M., Barja G., 2008].

Связь развивающейся с возрастом гипергомоцистеинемии с постепенным угасанием репродуктивной функции женского организма относится к числу важных и мало изученных вопросов экологической биохимии. Этой проблеме посвящены экспериментальные исследования, направленные на изучение механизмов действия гомоцистеина, как эндогенного нейротоксического соединения, на систему нейромедиаторов в гипоталамусе, в первую очередь биогенных аминов, под контролем которых осуществляется регуляция репродуктивных циклов [Wise P.M., 2002; Арутюнян А.В. и др., 2015]. Большой интерес представляет также исследование влияния ГГЦ на когнитивные процессы у животных различных возрастных групп и вовлеченность в них нейромедиаторных систем гиппокампа, что обусловлено, прежде всего, тем, что в гиппокампе осуществляются процессы нейрогенеза, вовлеченного в механизм обновления нейрональных сетей мозга [Eriksson P.S. et al., 1998]. В проведенных в последнее десятилетие исследованиях было установлено, что гонадотропин-рилизинг-гормон, или гонадолиберин (ГнРГ), образующийся в гипоталамусе, помимо своей основной функции регуляции синтеза гонадотропинов в гипофизе и контроля над функциональной активностью репродуктивной системы, способен также влиять на процессы нейрогенеза в гиппокампе [Zhang G. et al., 2013; Tang Y, Cai D., 2013].

Используемая в данной работе модель хронической гипергомоцистеинемии у самок крыс, возникающей в условиях пищевой нагрузки метионином, является адекватным инструментом исследования молекулярного действия гомоцистеина и гомоцистеиновой кислоты *in vivo*. Сам гомоцистеин, оказывающий в целом угнетающее действие на все структуры головного мозга, в том числе контролирующие репродукцию (гипоталамус, гипофиз) и отвечающие за когнитивные функции (гиппокамп, неокортекс), является также, как и любой другой нейротоксикант, катализатором всех процессов старения в организме, действуя на структуры, напрямую контролируемые

адаптивные реакции («командный центр старения» - гипоталамус) и процессы нейрогенеза, также влияющие на формирование адаптивных возможностей к окружающей среде (гиппокамп).

Настоящее исследование способствует более глубокому пониманию механизмов центральной регуляции сложных процессов старения разных систем организма и их взаимосвязи между собой, что обуславливает его актуальность.

### **Цель и задачи исследования**

Цель работы: исследовать у крыс разного возраста взаимосвязь между уровнем гомоцистеина при метиониновой нагрузке и интенсивностью развивающегося при ней окислительного стресса с уровнем биогенных аминов, принимающих участие в регуляции репродуктивной и когнитивной функций в различных структурах нервной системы (медиальная преоптическая область и срединное возвышение с аркуатными ядрами гипоталамуса, гиппокамп и пинеальная железа).

Для достижения данной цели были поставлены и последовательно решены следующие задачи:

1. провести сравнительное изучение уровня содержания гомоцистеина в плазме крови и различных структурах мозга при метиониновой нагрузке у самок крыс разного возраста, в зависимости от наличия и течения эстральных циклов (6-7 мес. – молодые крысы, 13-14 мес. - зрелые крысы, 20-22 мес. – старые крысы);
2. выявить изменения в содержании гонадолиберина в срединном возвышении с аркуатными ядрами гипоталамуса у самок крыс разного возраста;
3. провести сравнительное изучение интенсивности окислительного стресса в плазме крови у самок крыс разного возраста;
4. выявить изменения в содержании биогенных аминов (дофамина, серотонина, норадреналина) в структурах гипоталамуса, ответственных за синтез (медиальная преоптическая область) и секрецию (срединное возвышение с аркуатными ядрами) гонадолиберина, а также в содержании серотонина в пинеальной железе самок крыс разного возраста;
5. выявить изменения в содержании биогенных аминов в гиппокампе крыс разного возраста, и оценить нарушение когнитивных способностей в физиологических тестах, характеризующих разные виды памяти.

### **Научная новизна работы**

Впервые проведено изучение зависимости содержания биогенных аминов в гипоталамусе, гиппокампе и пинеальной железе крыс и продуктов окислительной модификации макромолекул в сыворотке крови и гипоталамусе от степени

выраженности гипергомоцистеинемии. Выявлены возрастные особенности исследуемых показателей биогенных аминов и окислительного стресса. Установлено, что гипергомоцистеинемия, вызванная метиониновой нагрузкой, приводит к нарушению когнитивных функций самок крыс, в то время как на репродуктивную функцию большее влияние оказывает возраст исследуемых животных.

Впервые получены данные о том, что в структурах гипоталамуса, ответственных за синтез и секрецию гонадолиберина, с возрастом наблюдалось снижение содержания норадреналина и дофамина по сравнению с молодыми крысами. Наряду с этим при гипергомоцистеинемии отмечалось повышение уровня норадреналина у молодых и зрелых самок крыс в медиальной преоптической области, тогда как уровень дофамина не менялся ни в одной из возрастных групп крыс и ни в одной из исследованных областей гипоталамуса под влиянием метиониновой нагрузки. Это свидетельствует о том, что в условиях гипергомоцистеинемии возрастает потребность в норадреналине, оказывающем стимулирующее влияние на продукцию гипофизарных гонадотропинов.

Уровень гонадолиберина во всех 3-х возрастных группах крыс также оставался неизменным, достоверно и резко снижаясь только в группе старых крыс, что указывает на то, что фактором, определяющим изменение его содержания при гипергомоцистеинемии, является возраст животных.

Оригинальный характер также носят полученные нами данные о достоверном снижении в гиппокампе норадреналина, дофамина, 5-оксииндолуксусной кислоты не только с возрастом, но и под влиянием гомоцистеина, тогда как уровень серотонина достоверно снижался только с увеличением возраста, а гипергомоцистеинемия на него влияния не оказывала. Заметное снижение содержания перечисленных нейромедиаторов в гиппокампе под влиянием гипергомоцистеинемии у молодых крыс хорошо коррелирует с данными, полученными при проведении физиологических тестов, свидетельствующих о нарушениях разных видов памяти у крыс после метиониновой нагрузки.

Впервые показано, что показатели окислительного стресса достоверно повышались в сыворотке крови молодых самок крыс после метиониновой нагрузки. В то же время в гипоталамусе гипергомоцистеинемия никакого влияния на показатели окислительного стресса не оказывала ни в одной из возрастных групп крыс, что, вероятно, свидетельствует о более сбалансированной работе про- и антиоксидантной систем, действующих в мозге.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Экспериментальное исследование возрастных изменений в содержании биогенных аминов в различных отделах мозга в зависимости от выраженности гипергомоцистеинемии и индуцированного ею окислительного стресса в процессах центральной регуляции репродуктивной функции расширяет имеющиеся представления о механизмах выключения репродуктивной функции, а также когнитивных нарушений в процессе старения женского организма. Установлено, что использование экспериментальной модели гипергомоцистеинемии позволяет обнаружить проявление под ее влиянием ранних функциональных нарушений в гипоталамусе и гиппокампе у животных разных возрастных групп. Изучение молекулярных механизмов выявленных нарушений имеет важное практическое значение для разработки профилактических мер, направленных на ослабление или устранение действия на организм гипергомоцистеинемии и других повреждающих факторов.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. При гипергомоцистеинемии, вызванной метиониновой нагрузкой, наблюдается зависимое от возраста нарушение моноаминергического звена гипоталамической регуляции репродуктивной функции самок крыс, обусловленное изменением содержания норадреналина, дофамина и метаболита серотонина 5-оксииндолуксусной кислоты в медиальной преоптической области и срединном возвышении гипоталамуса. Снижение содержания норадреналина у зрелых самок крыс с иррегулярными эстральными циклами, характерное для старых животных, подчеркивает ключевую роль норадренергической системы гипоталамуса в угасании репродуктивной системы.
2. Снижение при метиониновой нагрузке уровня содержания биогенных аминов в гиппокампе молодых крыс, сопровождающееся нарушением когнитивной функции при распознавании новых объектов и нахождении пищевого подкрепления в поведенческих тестах, характерное для стареющих животных, является признаком ухудшения кратковременной, долговременной и пространственной памяти у молодых особей после перенесенной хронической гипергомоцистеинемии.
3. У старых самок крыс происходит выраженное снижение содержания серотонина, являющегося предшественником мелатонина, в пинеальной железе самок крыс, что указывает на ослабление его корригирующей роли в регуляции репродуктивной функции при старении.

## **Апробация и реализация результатов диссертационной работы**

Результаты исследования представлены на VIII Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 220-летию со дня рождения акад. К.М. Бэра, «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, Россия, 2012); II Российском симпозиуме с международным участием «Световой режим, старение и рак» (Петрозаводск, Россия, 2013); научно-практической конференции с международным участием, посвященной памяти акад. В.В. Фролькиса, «Актуальные проблемы геронтологии и гериатрии: от теории к практике» (Киев, Украина, 2013); научной конференции с международным участием, посвященной 20-летию со дня основания Геронтологического общества при РАН, «Фундаментальные проблемы геронтологии и гериатрии» (Санкт-Петербург, Россия, 2014); Всероссийской конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (Санкт-Петербург, Россия, 2014); Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы физиологии высшей нервной деятельности, сенсорных и висцеральных систем», посвященной 90-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, Россия, 2015).

Данная работа поддержана грантом РФФИ 14-04-00776 и была одобрена при обсуждении на семинаре, проведенном в Отделе иммунологии и межклеточных взаимодействий НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 9 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 1 статья в сборнике научных трудов и 6 тезисов докладов.

### **Связь с научно-исследовательской работой института**

Диссертационная работа является научной темой, выполняемой по основному плану НИР АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии».

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, главы описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Текст диссертации изложен на 145 страницах, содержит 2 таблицы и иллюстрирован 25 рисунками. Указатель литературы содержит 394 источника, из которых отечественных – 51 зарубежных – 343.

### **Личный вклад автора**

Личный вклад автора состоит в планировании диссертационного исследования, разработке дизайна необходимых экспериментов, работе с животными, наблюдении за

эстральными циклами и анализе полученных данных в экспериментальной модели хронической гипергомоцистеинемии по изучению ее влияния на возрастные нарушения центральной регуляции репродуктивной системы и когнитивных функций. В ходе выполнения исследований была окончательно отработана и стандартизована модель перорального введения через зонд L-метионина самкам крыс для создания *in vivo* состояния хронической гипергомоцистеинемии и налажена методика выделения структур гипоталамуса и цельного гиппокампа из головного мозга.

Автор моделировала состояние гипергомоцистеинемии у самок крыс линии Вистар, участвовала в анатомическом препарировании необходимых структур мозга, проводила исследование содержания биогенных аминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в мозговых структурах, участвовала в определении методами иммуноферментного анализа уровня продуктов окислительной модификации макромолекул и гомоцистеина в сыворотке крови и гипоталамусе, а также гонадолиберина в гипоталамусе, определяла содержание белка в изучаемых структурах мозга. Участвовала в оформлении статей и тезисов по тематике данной работы, производила статистический анализ данных.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Экспериментальные исследования были проведены на 210 самках белых крыс линии Wistar (питомник «Рапполово», Санкт-Петербург).

Крысы содержались в виварии с искусственной вентиляцией и контролируемым режимом освещения: (день 7.00 – 19.00), помещение вивария было оборудовано в соответствии с санитарными требованиями, по 5 животных в клетке, температура воздуха стандартная  $22 \pm 2$  °С [Белоусов Ю.Б., 2005]. Вся экспериментальная работа была выполнена в соответствии с положениями Хельсинкской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации о гуманном отношении к животным (ред. 2000 г.), а также принципами гуманности, изложенными в директиве Европейского Сообщества №86/609 ЕС (2005 г.).

### **Схемы экспериментов**

В соответствии с задачами данного исследования было проведено 3 серии экспериментов. Экспериментальные животные делились на 3 возрастные группы, соответствующие различной степени развития репродуктивной системы: 1-ую группу составили молодые самки крыс половозрелого возраста (6-7 мес.; масса тела около 220-230 г.), имеющие регулярные 4-х дневные эстральные циклы; во 2-ую группу входили



зрелые самки крыс с преобладающими иррегулярными эстральными циклами (13-14 мес.; масса тела примерно 250-260 г.), отдельные эстральные циклы у которых еще встречаются, но имеет место удлинение отдельных стадий (эструса или диэструса); 3-ю группу составили старые самки крыс (20-22 мес., масса тела 300-320 г.), половая цикличность у которых полностью прекращается, вследствие чего наблюдается стадия постоянного диэструса или реже эструса. Декапитацию животных проводили на стадии полового цикла диэструса или проэструса. Самки крыс были разделены также на контрольную группу (104 животных разного возраста) и подопытную, получавшую метиониновую нагрузку (106 животных разного возраста).

В ходе экспериментов по соотношению клеток разных типов во влагалищных мазках определялись стадии эстрального цикла (проэструс, эструс и диэструс) [Marcondes F.K. et al., 2002], правильное определение дня эстрального цикла подтверждалось в эксперименте *post mortem* визуальной оценкой обводненности матки, а также измерением массы яичников. В исследовании был использован разработанный и модифицированный ранее в лаборатории биохимии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта метод экспериментальной гипергомоцистеинемии (ГГЦ), основанный на строго дозированной метиониновой нагрузке путем принудительного перорального введения крысам через зонд раствора метионина (0,12-0,15 г., растворенного в 1 мл. отстоявшейся водопроводной воды), поскольку оригинальный метод не позволял строго дозировать потребление метионина [Арутюнян А.В. и др., 2012].

В первой серии опытов были поставлены эксперименты с однократным введением перорально аминокислоты метионина для оценки того, как происходит повышение уровня гомоцистеина (ГЦ) в сыворотке крови и исследованных нами структурах мозга (гиппокампе, мозжечке и гипоталамусе). Крысам каждой из возрастных групп вводился раствор L-метионина однократно через зонд в дозе 0,12-0,15 г. в пересчете на одно животное. Животным из соответствующих контрольных групп однократно вводилась через зонд в таком же объеме вода.

В структурах мозга и сыворотке крови у исследуемых животных определялось содержание ГЦ перед введением воды или L-метионина, и далее через 1, 3, 6 и 24 часа после введения перорально L-метионина. На основании проведенных экспериментов с однократной метиониновой нагрузкой был сделан вывод об эффективности данной модели для повышения уровня гомоцистеина в крови и структурах мозга у крыс. Следующий эксперимент был связан с моделированием хронической ГГЦ, вызванной ежедневной метиониновой нагрузкой в течение 30 дней, в количестве, также

необходимом для достижения суточной дозы 0,12-0,15 г в расчете на одну самку крысы. Поскольку ранее полученные данные показали, что модель перорального введения через зонд L-метионина самкам крыс является более эффективной и приводит к более выраженному повышению уровня общего ГЦ в сыворотке крови, чем потребление L-метионина с питьевой водой [Арутюнян А.В. и др., 2012], в данном исследовании также была выбрана экспериментальная модель хронической ГГЦ с пероральным введением L-метионина.

Завершающий этап эксперимента был направлен на выяснение роли хронической ГГЦ в изменении уровня биогенных аминов в цельном гиппокампе и связанных с этим когнитивных нарушениях у самок крыс.

У достигших 6-ти месячного возраста самок крыс создавали по уже отработанной в предыдущих экспериментах схеме модель хронической ГГЦ, затем отслеживали течение эстрального цикла. Для работы отбирались самки, у которых цикл составлял 4 дня. Начиная со стадии диэструса, проводили оценку кратковременной и долговременной памяти животных.

#### **Препарирование структур мозга, принимающих участие в регуляции эстральных циклов и когнитивных функций**

Из мозга декапитированных животных выделяли гипоталамические структуры (медиальная преоптическая область – МПО, срединное возвышение с аркуатными ядрами – СВ-Арк), гиппокамп и мозжечок. Топографическая идентификация анатомических образований осуществлялась с использованием атласов анатомии мозга крыс [Ноздрачев А.Д., Поляков Е.Л., 2001; Paxinos G., Watson C., 2007]. После выделения структуры мозга замораживали в жидком азоте и хранили при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  до начала анализа.

#### **Исследование биохимических и физиологических показателей**

После декапитации животных исследовали уровень гомоцистеина, биогенных аминов в структурах мозга и интенсивность свободнорадикального окисления в крови и структурах мозга. Уровень общего гомоцистеина определяли методом иммуноферментного анализа, используя тест-систему фирмы Axis Homocysteine EIA.

В сыворотке крови самок крыс после декапитации также определяли уровень продуктов окислительной модификации белков (3-нитротирозина), ДНК (8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина) и перекисного окисления липидов (малонового диальдегида). Для иммуноферментного определения концентрации нитротирозина использовали тест-систему Nitrotyrosine – Nycult Biotech (Нидерланды). Содержание 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина в сыворотке крови и гомогенатах головного мозга определяли

иммуноферментным методом с использованием тест-системы DNA Damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) Enzo Life Sciences (США). Принцип измерения уровня МДА основан на определении образующийся в результате реакции с тиобарбитуровой кислотой триметинового комплекса, имеющего характерный спектр поглощения с максимумом при 535 нм [Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н., 2000].

Исследование содержания нейромедиаторов (норадреналина – НА, дофамина – ДА, 5 оксииндолуксусной кислоты – 5-ОИУК) в структурах гипоталамуса (МПО, СВ-Арк) и гиппокампе, а также серотонина (5-ОТ) в пинеальной железе проводилось методом ВЭЖХ с электрохимическим детектором. Количественное определение НА, ДА и его метаболита 3,4 – диоксифенилуксусной кислоты (3,4-ДОФУК), 5-ОТ и его метаболита 5-ОИУК в экстрактах структур мозга проводили методом обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием [Кудрин В.С. и др., 1995].

Содержание определяемых веществ рассчитывали в нанограммах на миллиграмм общего белка, который определяли по методу Лоури [Lowry O.H. et al., 1951] или Вера [Vera J.C., 1988].

Содержание гонадолиберина в СВ-Арк гипоталамуса оценивалось методом иммуноферментного анализа, основанного на конкуренции за сайты связывания с моноклональными антигонадолибериновыми антителами между ГнРГ в образце и биотинилированным ГнРГ у молодых и зрелых самок крыс.

#### **Когнитивные тесты**

Животных перед тестированием в течение 5 минут адаптировали к условиям эксперимента, для чего их помещали на специальную площадку 100x100 см, расчерченную на квадраты (5x5) и ограниченную непрозрачными стенками высотой 20 см. В это время также регистрировали двигательную активность крыс по количеству пересеченных квадратов. Через 2 часа после адаптации, в течение 5 минут на экспериментальной площадке проводили тренировочное предъявление животному двух предметов (№1 и №2). При последующих тестированиях объект №2 заменяли новыми предметами, а объект № 1 оставляли неизменным, но меняли место его расположения. Кратковременную память оценивали через 10 минут после тренировки: животному предъявляли пару объектов, состоящую из известного (№1) и нового (№3) предметов. Анализ долговременной памяти проводили через 24 часа после тренировки, предъявляя крысе новое сочетание пары известного и нового предметов – №1 и №4. Регистрировали время, проведенное в непосредственном тактильном или обонятельном контакте животного с каждым объектом, и выражали его в процентах от суммарного времени

исследования пары объектов. Для оценки пространственной памяти проводили тестирование самок крыс в двухуровневом 8-лучевом лабиринте. Для формирования у крыс пищевой мотивации за 2-е суток до и в течение всего последующего эксперимента ограничивали суточный объем их питания до 70%. В ходе тестирования крысу помещали на середину центральной платформы, к стенке которой крепились пронумерованные лучи. Проводили регистрацию количества правильных побегов (однократных посещений луча с подкреплением) в течение одного цикла тестирования, которое заканчивалось, когда животное осуществляло 8 правильных побегов, и вычисляли вероятность правильного выполнения задачи. Тестирование каждой самки начиналось в стадии диэструса и продолжалось 6 дней.

### **Статистическая обработка результатов**

Статистическая обработка данных выполнялась при помощи пакета программ STATISTICA 5.0 и EXCEL методами вариационной статистики [Лапач С.Н. и др., 2001; Зайцев В.М., Лифляндский В.Г., Маринкин В.И., 2006]. Данные представлены в виде: среднее арифметическое  $\pm$  ошибка среднего арифметического ( $M \pm m$ ). Для определения статистической значимости результатов использованы: параметрический  $t$ -критерий Стьюдента ( $t$ -тест), непараметрический  $U$ -критерий Манна-Уитни ( $U$ -тест), критерий согласия Пирсона ( $\chi^2$ -тест). Достоверно различающимися признавали значения при  $p < 0,05$ ; при  $0,05 < p < 0,10$  отмечали тенденции к изменению; при  $p > 0,1$  различия считали недостоверными. При оценке содержания гомоцистеина в мозге данные представляли в виде медианы и интерквартильного интервала между 25-й перцентилью (значение признака, слева от которого лежит 1/4 (или 25%) всех вариантов) и 75-й перцентилью (точка, слева от которой находится 3/4 или 75% вариантов ряда). Вид распределения определяли при помощи критерия Шапиро-Уилка. Уровень статистической значимости показателей был определен как  $p < 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

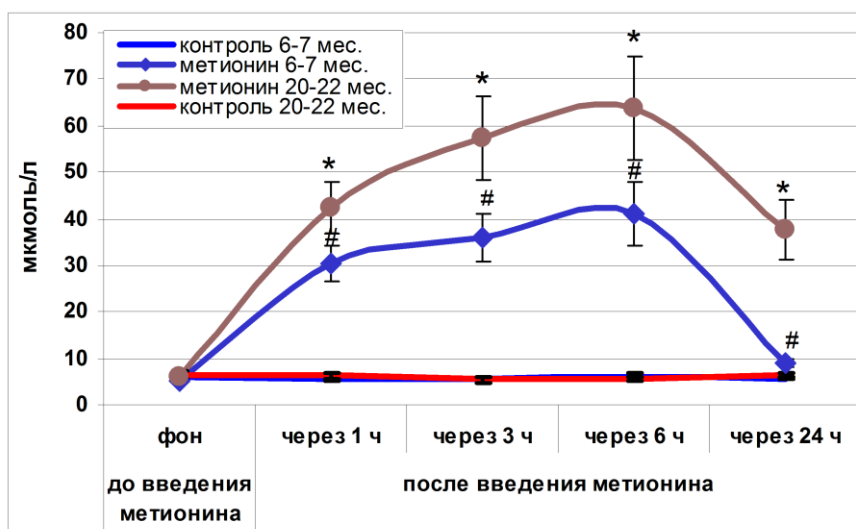
### **Содержание гомоцистеина в сыворотке крови крыс разного возраста**

#### **в норме и при метиониновой нагрузке**

Установлено, что уровень ГЦ в крови у молодых крыс начинает достоверно повышаться уже через час после однократного введения метионина, через 6 часов достигая своих максимальных значений. Через 24 часа после начала метиониновой нагрузки содержание ГЦ у молодых крыс снижается до значений, близких к тем, которые наблюдались до введения метионина (рис. 1). У старых самок крыс наблюдалось значительно более выраженное повышение уровня ГЦ, также достигающее

своих максимальных значений через 6 часов после начала метиониновой нагрузки, как и у молодых животных. Однако, в отличие от молодых самок крыс, у старых крыс через сутки не происходит возвращения к нормальной концентрации ГЦ в сыворотке крови, и его уровень остается достоверно повышенным.

При 30-дневном пероральном введении метионина (хроническая ГГЦ) было выявлено достоверное повышение содержания ГЦ в сыворотке крови как у молодых, так и у старых животных, приводящее к развитию ГГЦ. Показано, что оно наиболее выражено у старых самок крыс и составляет  $77,79 \pm 22,41$  мкмоль/л по сравнению с молодыми и зрелыми животными –  $19,71 \pm 4,07$  и  $10,4 \pm 0,73$  мкмоль/л соответственно.



**Рисунок 1. Суточная динамика изменения концентрации ГЦ в сыворотке крови молодых и старых самок крыс в норме и после однократного введения метионина**

### **Суточная динамика содержания гомоцистеина в различных структурах мозга после однократной метиониновой нагрузки**

Показано, что однократная метиониновая нагрузка приводит к увеличению содержания ГЦ не только в сыворотке крови, но и в некоторых структурах мозга крыс. Так, до начала метиониновой нагрузки базовый уровень ГЦ в гипоталамусе составлял  $4,9 [2,77; 5,78]$  нг/мг белка, тогда как через 1 час после введения метионина отмечалось увеличение концентрации ГЦ в данной структуре с максимумом, зафиксированным через 3 часа от введения метионина, с дальнейшим возвращением к базовому уровню ГЦ через 24 часа. В гиппокампе концентрация ГЦ до метиониновой нагрузки составляла  $20,3 [16,88; 21,51]$  нг/мг белка, достоверно повышаясь через 6 часов после введения метионина и возвращаясь к базовому уровню через 24 часа от начала метиониновой

нагрузки. В мозжечке крыс достоверных изменений обнаружено не было, отмечалась только тенденция к повышению ГЦ во временном интервале 3-6 часов от начала метиониновой нагрузки. Полученные данные сопоставимы с уже известными фактами о том, что животные, подвергшиеся хронической ГЦ, накапливают его не только в крови, но и в тканях мозга [Algaidi, S.A. et al., 2005; De Rezende, M. M. D'Almeida, V., 2014; Streck E.L. et al., 2002].

Метиониновая нагрузка не приводила к достоверным изменениям содержания гонадолиберина в СВ-Арк ни в одной из 3-х возрастных групп, и только у старых крыс этот показатель снижался как в контроле, так и при ГЦ. У зрелых же самок достоверного снижения уровня гонадолиберина по сравнению с молодыми животными не отмечалось (таблица 1). Для раскрытия механизмов воздействия ГЦ на уровень содержания ГнРГ в гипоталамусе, обуславливающим секрецию гонадотропинов гипофизом, было изучено влияние экспериментальной ГЦ на нейромедиаторные системы гипоталамуса, ответственные за регуляцию репродуктивных циклов.

#### **Содержание катехоламинов в структурах гипоталамуса и гиппокампе крыс разного возраста в норме и под влиянием метиониновой нагрузки**

НА, выполняющий стимулирующую роль в синтезе ГнРГ, под влиянием метиониновой нагрузки достоверно повышается в МПО в группах крыс молодого и зрелого возраста от  $23,8 \pm 0,9$  и  $18,38 \pm 1,6$  нг/мг белка в контроле до значений  $27,2 \pm 1,0$  и  $22,81 \pm 1,1$  нг/мг белка (таблица 1). К моменту полного прекращения у старых животных репродуктивных циклов содержание этого нейромедиатора также достоверно снижается по сравнению с молодыми и зрелыми животными, у которых еще сохраняются половые циклы, составляя  $6,51 \pm 0,8$  и  $7,68 \pm 0,9$  нг/мг белка соответственно в контрольной группе и группе крыс с метиониновой нагрузкой. Но следует отметить, что достоверное снижение НА в МПО отмечается уже у зрелых самок крыс по сравнению с молодыми, что, вероятно, может считаться начальным этапом угасания репродуктивной функции самок крыс, при пока сохраняющимся без изменений уровне гонадолиберина в гипоталамусе и еще встречающихся нормальных эстральных циклах. В СВ-Арк содержание катехоламинов (НА, ДА) также, как и метаболита серотонина 5-ОИУК не изменялось под влиянием метиониновой нагрузки во всех трех возрастных группах как у животных с нормальными, так и с нарушенными половыми циклами, а также у животных с полностью отсутствующей половой цикличностью. В СВ-Арк также было отмечено аналогичное биогенным аминам в МПО значительное снижение содержания всех трех нейромедиаторов у старых крыс как в контрольной группе, так и в группе с метиониновой нагрузкой.

Отмеченное изменение среднесуточного содержания НА у крыс с еще сохраняющейся половой цикличностью при метиониновой нагрузке в МПО гипоталамуса, позволяет предположить, что при ГГЦ возрастает потребность в НА, оказывающем положительное действие на процессы синтеза и секреции ГнРГ. Резкое же снижение содержания ДА, как и НА, у старых животных, играет важную роль в снижении содержания гонадолиберина в гипоталамусе и угасании репродуктивной функции.

Результаты исследования содержания биогенных аминов в гиппокампе крыс разного возраста представлены в таблице 2. В мозге молодых животных при ГГЦ отмечено достоверное снижение содержания НА, ДА и метаболита серотонина 5-ОИУК. У старых крыс наблюдалось снижение концентрации нейромедиаторов по сравнению с молодыми животными как в контрольной, так и в группе крыс с метиониновой нагрузкой. Достоверных различий между контрольной и опытной группами у старых крыс выявлено не было. Снижение содержания ДА и 5-ОИУК под влиянием метиониновой нагрузки в группе молодых крыс и более резкое снижение у старых крыс, по сравнению с молодыми животными наблюдалось как в контрольной группе, так и в группе с метиониновой нагрузкой. Содержание 5-ОТ не изменялось под влиянием метиониновой нагрузки ни в одной из возрастных групп крыс, но наблюдалось резкое снижение этого показателя у старых животных по сравнению с молодыми как в контрольной группе, так и в группе с метиониновой нагрузкой.

Полученные результаты согласуются с данными других авторов о влиянии ГГЦ на метаболизм биогенных аминов в гиппокампе [Jakubowski H., 2004; Zhao W.Q. et al., 2001; Kumar M. et al., 2017], но при этом указывают на то, что их содержание в этой структуре мозга снижается при старении независимо от метиониновой нагрузки.

Исследование содержания серотонина (5-ОТ) в пинеальной железе, оказывающей синхронизирующее влияние на функциональную активность различных структур мозга, включая гипоталамус и гиппокамп, показало, что потребление метионина с водой не оказывает действия на уровень 5-ОТ во всех трех возрастных группах, но достоверно снижается у старых животных к моменту, когда овариальные циклы у самок крыс уже полностью отсутствуют.

**Таблица 1 - Содержание катехоламинов и гонадолиберина в структурах гипоталамуса у самок крыс разного возраста в норме и при метиониновой нагрузке (M±m, нг/мг белка; n=6-22)**

Структура гипоталамуса	Параметр	Самки крыс из контрольной группы			Самки крыс из группы с метиониновой нагрузкой		
		Молодые	Зрелые с иррегулярными циклами	Старые	Молодые	Зрелые с иррегулярными циклами	Старые
Медиальная преоптическая область	Норадреналин	23,80±1,24	18,38±1,64	6,51±0,84*	27,21±1,02 #	22,81±1,07 #	7,68±0,90*
	Дофамин	12,01±1,16	12,32±2,60	5,05±1,03*	12,84±0,83	10,30±1,00	4,77±0,91*
Срединное возвышение с аркуатными ядрами	Гонадолиберин	8,91±0,71	8,35±0,76	4,27±0,62**	10,63±1,21	7,79±0,96	4,54±0,64**
	Норадреналин	33,66±1,72	31,64±2,25	11,49±0,82*	37,24±1,68	37,75±1,70 #	12,64±1,15*
	Дофамин	29,79±1,91	30,75±2,03	13,20±1,58*	28,53±1,88	34,82±2,69	14,85±2,42*

Примечание: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$  достоверные отличия по сравнению с животными молодого и зрелого возраста с иррегулярным циклированием (*U*-тест); # -  $p < 0,05$  достоверные отличия по сравнению с животными из соответствующего контроля, (*U*-тест).

**Таблица 2 - Содержание моноаминов и 5-ОИУК в гиппокампе у самок крыс разного возраста в норме и при метиониновой нагрузке (M±m, нг/мг белка; n=7-21)**

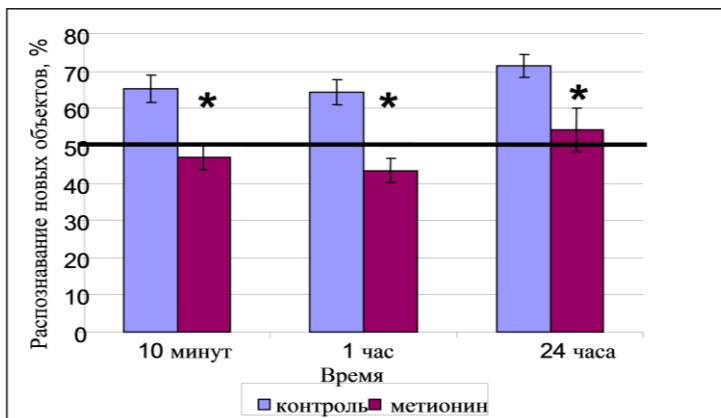
Возраст, мес.	Показатели, нг/мг белка							
	Норадреналин		Дофамин		Серотонин		5-ОИУК	
	Контрольная группа	Группа с метиониновой нагрузкой	Контрольная группа	Группа с метиониновой нагрузкой	Контрольная группа	Группа с метиониновой нагрузкой	Контрольная группа	Группа с метиониновой нагрузкой
Молодые	7,35±0,29	6,20±0,28*	4,60±0,32	3,57±0,26*	6,65±0,49	6,20±0,47	2,94±0,18	2,18±0,16*
Зрелые с иррегулярными циклами	7,23±0,42	7,60±0,49	6,18±0,50	8,22±1,57	7,23±0,42	7,60±0,49	5,08±0,52	4,44±0,41
Старые	2,58±0,23**	2,36±0,15**	1,84±0,28**	1,50±0,12**	2,59±0,31**	2,41±0,23**	1,78±0,27**	1,52±0,26**

Примечание: \* -  $p < 0,05$  достоверные различия по сравнению с контрольной группой (*U*-тест); \*\* -  $p < 0,05$  достоверные различия по сравнению с животными молодого и зрелого возраста с иррегулярным циклированием (*U*-тест).

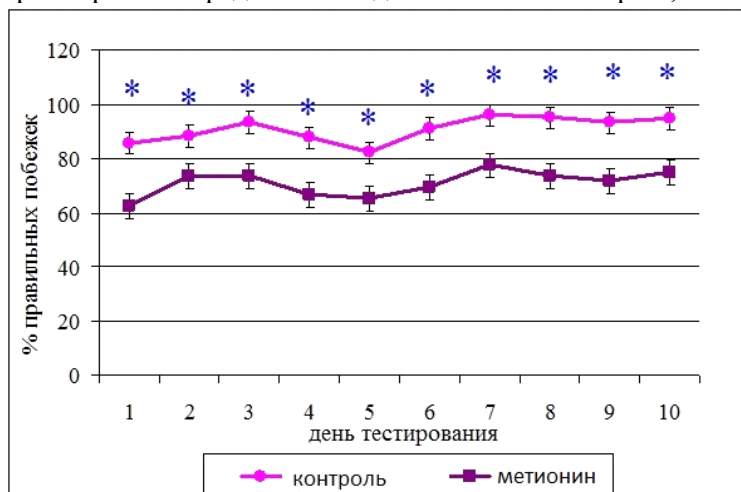


## Поведенческие реакции крыс разного возраста при хронической гипергомоцистеинемии

Исходя из полученных данных о снижении под влиянием ГГЦ содержания биогенных аминов у молодых крыс репродуктивного возраста в гиппокампе, который отвечает за такие важные функции в организме, как формирование памяти и ее консолидация, у этих животных были исследованы поведенческие реакции.



**Рисунок 2.** - Распознавание новых объектов молодыми самками крыс через 10 мин, 60 мин и 24 часа после тренировочного предъявления пары объектов. Ордината: среднее значение ( $M \pm m$ ,  $n=12-13$ ) времени распознавания, выраженное в процентах от общего времени исследования известного и нового объектов для контрольных и перенесших метиониновую нагрузку крыс. Горизонтальная линия обозначает 50%-ный уровень, который соответствует одинаковому времени распознавания объектов при их равном предпочтении для животного. \* –  $p < 0,05$ .



**Рисунок 3.** - Влияние метиониновой нагрузки на поведение молодых самок крыс в восьмилучевом радиальном лабиринте. Ордината: среднее значение ( $M \pm m$ ,  $n=12-13$ ) правильных посещений рукавов восьмилучевого лабиринта, выраженное в процентах от общего числа посещений. \* –  $p < 0,05$ .

При использовании теста «распознавание новых объектов» контрольные животные, которые потребляли воду, тратили больше времени на исследование новых объектов, в то время как у подопытных крыс 30-дневная метиониновая нагрузка

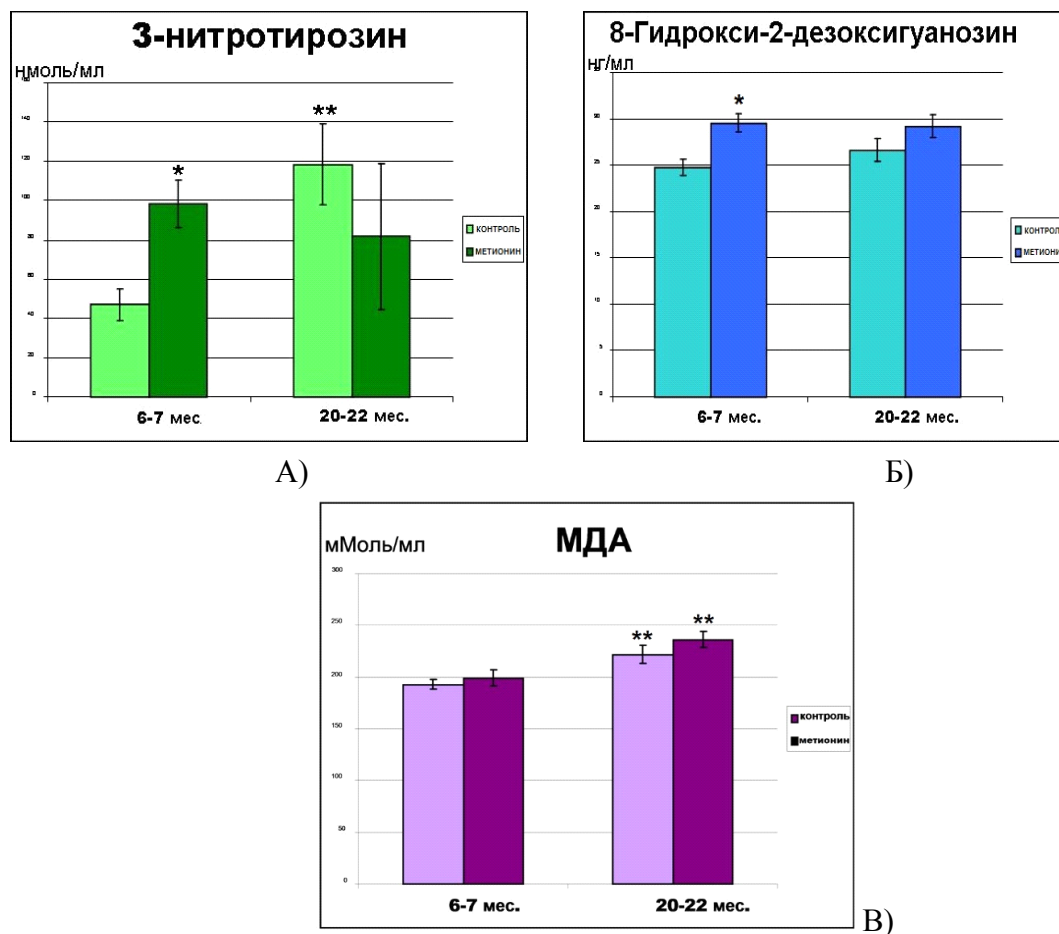
вызывала нарушение кратковременной (10 мин.) и долговременной памяти (24 ч.). У крыс, перенесших хроническую ГГЦ, не наблюдалось предпочтения обследования новых объектов по сравнению с ранее предъявленным, что свидетельствовало о нарушении процесса запоминания предыдущего объекта, вследствие чего он представлял такой же интерес для исследования животным, как и новые объекты. Такие животные тратили одинаковое время на исследование знакомого и нового объектов во всех трех сериях эксперимента (рисунок 2).

При исследовании пространственной памяти в двухуровневом восьмилучевом лабиринте обнаружено, что среднее время нахождения контрольных крыс внутри рукава ( $19,08 \pm 2,21$  секунд) не отличалось от времени для крыс подопытной группы ( $23,30 \pm 3,76$  секунд) на 10-й день тестирования. Однако, число правильных посещений кормушек у животных с хронической метиониновой нагрузкой ( $94,70 \pm 2,49\%$  на 10-й день тестирования) было достоверно ( $p < 0,05$ ) ниже по сравнению с контролем ( $75,04 \pm 7,96\%$  на 10-й день тестирования), в течение всего периода тестирования (рисунок 3), что указывает на нарушение пространственной памяти у подопытных крыс.

#### **Показатели окислительного стресса в норме и при метиониновой нагрузке, в сыворотке крови и мозге самок крыс разного возраста**

Использование нами модели экспериментальной ГГЦ позволило провести анализ влияния возраста и ГЦ как независимых факторов на изменение показателей окислительного стресса, развивающегося в крови и мозге, в частности, в гипоталамусе самок крыс. Данные исследования показали, что метиониновая нагрузка приводит к интенсификации свободнорадикальных процессов в сыворотке крови молодых крыс, что выражается в достоверном повышении продуктов окислительной модификации белков (3-нитротирозина) и ДНК (8-окси-2-дезоксигуанозина) (рисунок 4).

В сыворотке крови старых крыс после метиониновой нагрузки достоверных различий в содержании прооксидантных компонентов обнаружено не было. У старых крыс, по сравнению с молодыми, достоверно повышались уровни 3-нитротирозина и МДА в сыворотке. В гипоталамусе животных после метиониновой нагрузки, не было обнаружено изменения показателей окислительного повреждения макромолекул между контрольной и опытной группами, а также между соответствующими группами различного возраста, что указывает на их резистентность к повреждающему действию гомоцистеина, возможно, обусловленную сбалансированной работой про- и антиоксидантной систем.



**Рисунок 4 - Показатели окислительного повреждения белков А), ДНК Б) и липидов В) в сыворотке крови крыс разного возраста. ( $M \pm m$ ;  $n=8-22$ ); \* -  $p < 0,05$  по сравнению с животными из контрольной группы этого же возраста, \*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с животными 6-7 мес. каждой из групп (*U-тест*)**

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На протяжении 20 с лишним лет в лаборатории перинатальной биохимии Института акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта проводились экспериментальные исследования, посвященные изучению механизмов действия ксенобиотиков на центральную регуляцию репродуктивной функции [Arutjunyan A.V. et al., 1997]. Было установлено, что ведущая роль в этом процессе принадлежит биогенным аминам гипоталамуса, нарушение суточных ритмов которых в медиальной преоптической области и срединном возвышении носит неспецифический характер и является одной из основных причин негативного влияния различных нейротоксических ксенобиотиков (толуол, формальдегид, 1,2-диметилгидразин и др.) на течение эстральных циклов у крыс [Арутюнян А.В. и др., 1998; 2004].

На основании изучения показателей про- и антиоксидантной системы и протекторного действия мелатонина в этих условиях, а также пептидных препаратов, обладающих антиоксидантной активностью, было сделано заключение, что приведенные нарушения обусловлены развитием окислительного стресса.

Последующие исследования показали, что нарушение репродуктивных циклов у крыс может происходить также под воздействием гомоцистеина, повышенное содержание которого в крови при метиониновой нагрузке приводит к изменению катехоламинергического звена гипоталамической регуляции репродуктивной функции [Милютин Ю.П. и др., 2012; Корневский А.В. и др., 2014]. Значительный интерес представляло выяснить, изменяется ли с возрастом чувствительность репродуктивной системы к нейротоксическому влиянию гомоцистеина. Представленные в данной работе результаты свидетельствуют о том, что ГГЦ не оказывает существенного влияния на содержание гонадолиберина в СВ-Арк гипоталамуса ни в одной из исследуемых групп, его уровень не претерпевает изменений у животных с иррегулярными эстральными циклами по сравнению с половозрелыми и снижается в 2 раза у старых крыс. Наряду с этим показано, что в МПО и СВ-Арк гипоталамуса при ГГЦ возрастает уровень НА у зрелых животных, также как в МПО молодых крыс. Можно полагать, что это обусловлено тем, что при ГГЦ возрастает потребность в НА, оказывающем положительное действие на процессы синтеза и секреции ГнРГ. Уровень ДА, являющегося ингибитором этих процессов, не претерпевает изменений в МПО и СВ-Арк в обеих исследуемых группах, но также, как и уровень НА, резко снижается у старых животных, что может играть существенную роль в снижении содержания гонадолиберина в гипоталамусе и угасании репродуктивной функции. Обнаружено также снижение с возрастом содержания серотонина, являющегося предшественником мелатонина, в пинеальной железе исследуемых групп животных при ГГЦ, что косвенно указывает на ослабление корригирующей роли мелатонина в регуляции репродуктивной функции при старении. Как показали результаты проведенного нами исследования действия ГГЦ на течение эстрального цикла самок крыс, возраст представляет значительно большее значение для появления иррегулярных циклов чем метиониновая нагрузка.

Представленные в работе данные о содержании биогенных аминов в гиппокампе, а также данные поведенческих тестов подтверждают факт нарушения когнитивных функций под влиянием ГГЦ при старении [Reynolds E.H., 1992; Miller A.L., 2008]. Полученные нами результаты дают основание полагать, что изменение содержания

биогенных аминов, вызванное гипергомоцистеинемией, играет важную роль в выключении репродуктивной функции и угнетении когнитивных процессов при преждевременном старении организма.

## ВЫВОДЫ

1. Однократное пероральное введение L-метионина самкам крыс приводит к достоверному повышению содержания гомоцистеина в сыворотке крови, достигая через 6 часов максимальных значений. Через 24 часа после начала метиониновой нагрузки содержание гомоцистеина у молодых крыс снижается до значений, близких к контрольным, тогда как у старых самок крыс наблюдается значительно более выраженное повышение уровня гомоцистеина. В гипоталамусе и гиппокампе исследуемых животных при однократном введении метионина уровень гомоцистеина также повышается, достигая максимума через 3 и 6 ч. соответственно и снижаясь через 24 ч., как и в сыворотке крови, практически до контрольного уровня. Хроническая 30-ти дневная гипергомоцистеинемия приводит к достоверному повышению уровня гомоцистеина в сыворотке крови как у молодых, так и у старых животных.

2. При 30-дневной метиониновой нагрузке у молодых самок крыс содержание гонадолиберина в срединном возвышении с аркуатными ядрами гипоталамуса достоверно не изменялось на стадии проэструса в 9,5 часов циркадианного времени, соответствующего пику секреции гонадолиберина. Гипергомоцистеинемия не оказывала существенного влияния также на среднесуточное содержание гонадолиберина в срединном возвышении с аркуатными ядрами гипоталамуса ни в одной из 3-х возрастных групп крыс (молодых, зрелых и старых животных). Снижение уровня гонадолиберина при гипергомоцистеинемии также, как и у контрольных животных наблюдалось только у старых животных к возрасту 20-22 месяца (приблизительно в 2 раза по сравнению с молодыми животными). У зрелых самок крыс с иррегулярными эстральными циклами достоверного снижения этого показателя по сравнению с молодыми животными не отмечалось.

3. При хронической ГГЦ наблюдается интенсификация свободнорадикальных процессов в сыворотке крови молодых крыс, что проявляется в повышении содержания продуктов окислительной модификации белков (3-нитротирозина) – более чем в 2 раза, и нуклеиновых кислот (8-окси-2-дезоксигуанозина), а также прослеживается тенденция к повышению уровня малонового диальдегида, отражающего интенсивность процессов перекисного окисления липидов. В сыворотке крови старых крыс метиониновая нагрузка на содержание всех 3-х исследованных прооксидантных компонентов не влияла. У

старых крыс, по сравнению с молодыми, достоверно повышались уровни 3-нитротирозина и малонового диальдегида в сыворотке крови. В гипоталамусе исследуемых животных подобные изменения отсутствуют.

4. Под влиянием хронической гипергомоцистеинемии в медиальной преоптической области гипоталамуса уровень норадреналина возрастал у молодых и зрелых самок крыс, тогда как в срединном возвышении с аркуатными ядрами содержание этого нейромедиатора достоверно повышалось только у зрелых животных. Содержание дофамина и 5-оксииндолуксусной кислоты не зависело от метиониновой нагрузки в медиальной преоптической области и срединном возвышении с аркуатными ядрами во всех 3-х возрастных группах крыс. Вместе с тем в обеих гипоталамических структурах отмечается резкое снижение уровня норадреналина, дофамина и 5-оксииндолуксусной кислоты у старых животных более чем в 2 раза по сравнению с молодыми, причем достоверное уменьшение содержания норадреналина наблюдается уже у зрелых крыс, когда появляются в значительном количестве иррегулярные циклы.

5. Экспериментальная гипергомоцистеинемия приводит к снижению содержания биогенных аминов, таких как норадреналина, дофамина, 5-оксииндолуксусной кислоты, в гиппокампе, наглядно проявляющемуся у молодых крыс в отличие от зрелых и старых животных, снижаясь, в среднем, на 15-20%. Содержание серотонина не изменялось под влиянием метиониновой нагрузки ни в одной из возрастных групп крыс. Вместе с тем содержание всех исследованных биогенных аминов снижалось в 2-2,5 раза при старении животных, как в контрольной группе, так и в группе с метиониновой нагрузкой. Снижение уровня биогенных аминов в группе молодых крыс под влиянием хронической гипергомоцистеинемии сопровождается нарушением их когнитивных функций, что подтверждалось увеличением времени, затраченным животными после метиониновой нагрузки на распознавание новых объектов и нахождение пищевого подкрепления в поведенческих тестах.

6. В пинеальной железе самок крыс под влиянием гипергомоцистеинемии уровень 5-окситриптамина (серотонина) во всех трех возрастных группах не изменялся, но отмечалось его достоверное снижение с возрастом.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Исходя из полученных результатов, указывающих на ослабление корригирующей роли эндогенного мелатонина в регуляции репродуктивной функции при старении, рекомендуется провести исследование с использованием препаратов мелатонина и стимулирующих их синтез коротких геропротекторных пептидов

- для профилактики, развивающейся с возрастом гипергомоцистеинемии.
2. По результатам данного исследования целесообразно при клинико-лабораторном обследовании женщин предклимактерического возраста с нарушением менструального цикла проводить определение гомоцистеина в крови для рекомендации соответствующей терапии.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи в журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России**

1. Влияние гипергомоцистеинемии на моноаминергические системы гипоталамуса и гиппокампа у самок крыс при старении / А.В. Арутюнян, И.В. Залозная, Г.О. Керкешко, Ю.П. Милютина, А.В. Корневский // *Успехи геронтологии*. – 2015. – Т. 28, N 3. – С. 472-478.
2. Влияние гипергомоцистеинемии на катехоламинергическое звено гипоталамической регуляции репродуктивной функции крыс / Ю.П. Милютина, А.В. Корневский, М.Г. Степанов, А.В. Пустыгина, Т.И. Опарина, И.В. Залозная, А.В. Арутюнян // *Журнал акушерства и женских болезней*. – 2012. – Т. 61, №1. – С. 41-46.
3. Возрастные изменения содержания серотонина в пинеальной железе самок крыс при гипергомоцистеинемии / Ю.П. Милютина, А.В. Корневский, И.В. Залозная, М.Г. Степанов, А.В. Арутюнян // *Успехи геронтологии*. – 2014. – Т. 27, №2 (приложение) – С. 49-50.
4. Возрастные изменения биогенных аминов и показателей окислительного стресса при гипергомоцистеинемии в гипоталамусе крыс / Ю.П. Милютина, А.В. Пустыгина, И.В. Залозная, А.В. Арутюнян // *Успехи геронтологии*. – 2016. – Т. 29, №2. – С. 239-246.
5. Динамика содержания катехоламинов в гипоталамических структурах самок крыс в преовуляторный период / А.В. Разыграев, Ю.П. Милютина, А.В. Корневский, И.В. Залозная, М.Г. Степанов, А.В. Пустыгина, А.В. Арутюнян // *Журнал акушерства и женских болезней*. – 2010. – Т. 59, №4. – С. 76-80.
6. Использование различных экспериментальных моделей гипергомоцистеинемии в нейрохимических исследованиях / А.В. Арутюнян, Ю.П. Милютина, И.В. Залозная, А.В. Пустыгина, Л.С. Козина, А.В. Корневский // *Нейрохимия*. – 2012. – Т. 29, №1. – С. 83-88.
7. *Милютина, Ю.П.* Изменения норадренергической системы гипоталамической регуляции репродуктивной функции самок крыс при старении / Ю.П. Милютина, И.В. Залозная // *Медицинский академический журнал*. – 2010. – Т. 10, № 5. – С. 60-63.
8. Пинеалон восстанавливает нарушенный в результате гипергомоцистеинемии суточный ритм содержания норадреналина в гипоталамусе самок крыс / А.В. Корневский, А.В. Арутюнян, Ю.П. Милютина, И.В. Залозная, Л.С. Козина // *Нейрохимия*. – 2014. – Т. 31, № 3. – С. 236-238.
9. Сравнение показателей окислительного стресса в сыворотке крови крыс при различных моделях гипергомоцистеинемии / Ю.П. Милютина, А.В. Пустыгина, А.Д. Щербицкая, И.В.

Залозняя, А.В. Арутюнян // Бюлл. Восточно-Сибирского научного центра Сибирского Отделения РАН. – 2016. – Т. 1, № 3 (109), – С.120-123.

### **Статьи в других журналах**

10. Суточные ритмы биогенных аминов в гипоталамусе самок крыс в экспериментальной модели преждевременного старения репродуктивной функции, вызванного введением канцерогена 1,2-диметилгидразина, и их коррекция мелатонином и пептидными препаратами пинеальной железы / А.В. Корневский, Ю.П. Милютин, И.В. Залозняя, Г.О. Керкешко, А.В. Арутюнян // Сб. науч. трудов II Росс. симп. с междунар. участием «Световой режим, старение и рак». – Петрозаводск, 2013. – С. 165-174.

### **Тезисы докладов**

11. Влияние гипергомоцистеинемии на гипоталамическое звено регуляции репродуктивной функции самок крыс / Ю.П. Милютин, А.В. Арутюнян, А.В. Корневский, А.В. Пустыгина, И.В. Залозняя // Матер. VIII Всерос. конф. с междунар. участием, посвященной 220-летию со дня рождения акад. К. М. Бэра, «Механизмы функционирования висцеральных систем». Санкт-Петербург, 2012. – С. 155-156.
12. Влияние нейротоксического соединения 1,2-диметилгидразина на гипоталамическое звено регуляции репродуктивных циклов / Г.О. Керкешко, А.В. Корневский, Ю.П. Милютин, И.В. Залозняя, А.В. Арутюнян // Тез. докл. Всерос. конф. с междунар. участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга». Санкт-Петербург-Колтуши, 2014. – С. 70.
13. Возрастное изменение содержания гомоцистеина в сыворотке крови в норме и при метиониновой нагрузке / Ю.П. Милютин, А.В. Арутюнян, И.В. Залозняя, А.В. Пустыгина // Проблемы старения и долголетия. Научно-практическая конференция, посвященная памяти акад. В.В. Фролькиса «Актуальные проблемы геронтологии и гериатрии: от теории к практике», Киев, 2013. С. 47.
14. Изменение показателей окислительного стресса в сыворотке крови и гипоталамусе молодых и старых крыс при метиониновой нагрузке / Залозняя И.В., Милютин Ю.П., Пустыгина А.В., Арутюнян А.В. // Тез. Докл. Всерос. конф. с междунар. участием «Современные проблемы физиологии высшей нервной деятельности, сенсорных и висцеральных систем». Санкт-Петербург-Колтуши, 2015. С. 34.
15. Коррекция пинеалом нарушенного в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии суточного ритма содержания норадреналина в гипоталамусе самок крыс / Корневский А.В., Милютин Ю.П., Залозняя И.В., Степанов М.Г., Арутюнян А.В. // Тез. докл. Всерос. конф. с междунар. участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга». Санкт-Петербург-Колтуши, 2014. – С. 76.



16. Нарушение суточных ритмов катехоламинов, регулирующих репродуктивную функцию самок крыс, под влиянием нейротоксикантов и их коррекция с помощью мелатонина и пептидных препаратов пинеальной железы / А.В. Корневский, Ю.П. Милютин, М.Г. Степанов, Г.О. Керкешко, Залозная И.В. // Матер. VIII Всеросс. конф. с межд. участием, посвященная 220-летию со дня рождения акад. К.М. Бэра «Механизмы функционирования висцеральных систем». Санкт-Петербург, 2012. – С. 113-114.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

<b>3,4-ДОФУК</b>	3,4-диоксифенилуксусная кислота
<b>5-ОИУК</b>	5-оксииндолилуксусная кислота
<b>5-ОТ</b>	5-окситриптамин (серотонин)
<b>ВЭЖХ</b>	высокоэффективная жидкостная хроматография
<b>ГГЦ</b>	гипергомоцистеинемия
<b>ГнИГ</b>	гонадотропин-ингибирующий рилизинг-гормон
<b>ГнРГ</b>	гонадотропин-рилизинг-гормон, гонадолиберин
<b>ГЦ</b>	L-гомоцистеин
<b>ДА</b>	дофамин
<b>ДНК</b>	дезоксирибонуклеиновая кислота
<b>ИФА</b>	иммуноферментный анализ
<b>МДА</b>	малоновый диальдегид
<b>МПО</b>	медиальная преоптическая область
<b>НА</b>	норадреналин
<b>ПОЛ</b>	перекисное окисление липидов
<b>СВ-Арк</b>	срединное возвышение с аркуатными ядрами

**Залозная Ирина Владимировна** ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЯ КАК ФАКТОР ВОЗРАСТНОГО НАРУШЕНИЯ ЦЕНТРАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ И КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ У САМОК КРЫС // Автореф. дис. канд. биол. наук: 14.01.30; 03.01.04 – СПб., 2018. – 25 с.

Подписано в печать «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018. Формат 60\*84

1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Печ. л. 2,0.

Тираж 100 экз. Заказ \_\_\_\_\_

Отпечатано с готового оригинал-макета.

ЗАО «Принт - Экспресс»

197376, С.-Петербург, ул. Большая Монетная, 5 лит. А

## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Арутюнян А.В.* и др. Нарушение нейромедиаторного звена гипоталамической регуляции репродуктивной функции под влиянием нейротоксических ксенобиотиков // *Нейрохимия.* – 1998. – Т. 15 (4). С. 264 -272; *А.В.Арутюнян, Е.Е.Дубинина, Н.Н.Зыбина.* – Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: методические рекомендации / СПб.: Фолиант, 2000. – 104 с.; *Арутюнян А.В. и др.* Роль биогенных аминов в гипоталамической регуляции репродуктивной функции // *Журн. акуш. и женск. бол.* – 2004. – Т. 53, №1. – С. 98-106; *Арутюнян А.В. и др.* Использование различных экспериментальных моделей гипергомоцистеинемии в нейрохимических исследованиях // *Нейрохимия.* – 2012. – Т. 29, №1. – С. 83-88; *Арутюнян, А.В. и др.* Влияние гипергомоцистеинемии на моноаминергические системы гипоталамуса и гиппокампа у самок крыс при старении// *Успехи геронтологии.* – 2015. – Т. 28, №3. – С. 472-478; *В.М.Зайцев, В.Г.Лифляндский, В.И.Маринкин.* Прикладная медицинская статистика–СПб.: Фолиант. – 2006. – 432 с.; *Корневский, А.В. и др.* Восстановление под влиянием пинеалона суточного ритма содержания норадреналина в гипоталамусе самок крыс, нарушенного при гипергомоцистеинемии // *Нейрохимия.* – 2014. – Т. 31, №3. – С. 236-239.; *Кудрин, В.С. и др.* Влияние бромантана на дофамин- и серотонинергические системы мозга // *Экспер. и клин. фармакол.* – 1995. – Т. 58, №4. – С. 8-11.; *С.Н.Лапач, А.В.Чубенко, П.Н.Бабич.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel//– К.: Морион. – 2001. – 408 с.; *Милютина Ю.П. и др.* Влияние гипергомоцистеинемии на катехоламинергическое звено гипоталамической регуляции репродуктивной функции крыс // *Журнал акушерства и женских болезней.* – 2012. – Т. LXI, №1. – С. 41-46.; // *А.Д.Ноздрачев, Е.Л.Поляков.* Анатомия крысы (лабораторные животные) – СПб.: Лань, 2001. – 464 с.; *Arutjunyan, A.V. et al.* The disturbances of circadian rhythms hypothalamic regulation in female rats under the influence of xenobiotics//*A.W.Teelken, J.Korf (Eds.) Neurochemistry: cellular, molecular and clinical aspects.* – N.Y.: Plenum Press, 1997. – P. 529-534; *Boldyrev, A.A.* Molecular mechanisms of homocysteine toxicity // *Biochemistry (Mosc.).* – 2009. – Vol. 74, No. 6. – P. 589-598.; *Eriksson P.S. et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus // *Nat Med.* – 1998. – Vol. 4, No. 11. – P. 1313-1317; *Jakubowski, H.* Molecular basis of homocysteine toxicity in humans // *Cell Mol. Life Sci.* – 2004. – Vol. 61, No. 4. – P. 470-487.; *Kumar, M. et al.* Hydrogen sulfide attenuates homocysteine-induced cognitive deficits and neurochemicalalterations by improving endogenous hydrogen sulfide levels// *Biofactors.* – 2017. – Vol. 43, No. 3. – P. 434-450. *M.López-Torres, G.Barja.* Calorie restriction, oxidative stress and longevity // *Rev Esp Geriatr Gerontol.* – 2008. – Vol. 43, No. 4. – P. 252-60; *Lowry, O.H. et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent//*J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, No. 2. – P. 265-275; *Marcondes, F.K. et al.* Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations // *Braz. J. Biol.* – 2002. – V. 62, No.4a. – P. 609-614.; *Miller, A.L.* The methylation, neurotransmitter, and antioxidant connections between folate and depression // *Altern Med Rev.* – 2008. – Vol. 13, No. 3. – P. 216-226.; *Paxinos, G., C.Watson.* The rat brain in stereotaxic coordinates (sixth edition – San Diego: Academic Press, 2007. – 456 p.; *Reynolds, E.H.* Multiple sclerosis and vitamin B12 metabolism *J. Neuroimmunol.* – 1992. – Vol. 40. – P. 225–30; *Y.Tang, D.Cai* Hypothalamic inflammation and GnRH in aging development / // *Cell Cycle.* – 2013. – Vol. 12, No. 17. – P. 2711-22.; *Topal, G. et al.* Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of NO synthase activity through reduction of tetrahydrobiopterin // *Free Radic. Biol.* – 2004. – Vol. 36, No. 12. – P. 1532–1541; *Vera, J.C.* Measurement of microgram quantities of protein by a generally applicable turbidimetric procedure // *Analyt. Biochem.* – 1988. – Vol. 174, No. 1. – P. 187-196.; *Wise, P.M. et al.* Neuroendocrine modulation and repercussions of female reproductive // *Recent Prog. Horm. Res.* – 2002. – Vol. 57. – P. 235-256.; *Zhang, G. et al.* Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- $\beta$ , NF- $\kappa$ B and GnRH *G.Liu, D.Cai* // *Nature.* – 2013. – Vol. 97(7448). – P. 211-6.; *Zhao W.Q. et al.* L-dopa upregulates the expression and activities of methionine adenosyl transferase and catechol-O-methyltransferase // *Exp Neurol.* – 2001. – Vol. 171. – P. 127–38.