

УДК 612.44.018:616.893-053.8-092.9

**Электрофизиологическое исследование  
нейропротекторной эффективности синэстрола и  
гидропонического дубровника на нейронах гиппокампа  
после билатеральной овариэктомии**

**В.А. Чавушян<sup>1</sup>, К.В. Симомян<sup>1</sup>, А.М. Галстян<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА*

<sup>2</sup>*Институт проблем гидропоники им. Г.С. Давтяна НАН РА  
0028, Ереван, ул. Бр. Орбели, 22*

*Ключевые слова:* синаптическая активность, овариэктомия, нейродегенерация, синэстрол, гидропонический дубровник беловойлочный, нейропротекция

Центральная нервная система является одной из наиболее важных нерепродуктивных мишеней для женских половых гормонов. Специфические рецепторы к этим гормонам локализованы, в частности, в гиппокампе, коре, базальных ганглиях переднего мозга и других структурах головного мозга, подтверждая участие половых стероидов в контроле когнитивной функции и процессов памяти. Гормональный дисгомеостаз, обусловленный старением, повышает риск развития когнитивных нарушений. Эпидемиологические учения свидетельствуют, что эстрогензаместительная гормональная терапия (ЭЗГТ) у женщин редуцирует риск развития болезни Альцгеймера (БА) [21], и у пременопаузальных овариэктомированных (ОВХ) женщин повышенный риск деменций Альцгеймеровского типа превентивуется ЭЗГТ [26]. За последние два десятилетия при лечении БА в клинике используются различные вариации ЭЗГТ [18], дающие противоречивые результаты, что свидетельствует о недостатке знаний в парадигмах лечения нейродегенеративных заболеваний. Расположение применяемых эстрогенов в ряду антиамилоидогенической активности таково: эстриол > эстрадиол = эстрон (синэстрол) >> и = тестостерон [16]. Наиболее ЭЗГТ премарином (Premarin, "Wyeth Pharmaceuticals"), а синтетический препарат синэстрол по эстрогенной активности равноценен эстрону (фолликулин). И в синэстроле, и в премарине основная форма эстрогенов – эстрон (> 50%) в виде сульфата, который с легкостью абсорбируется в кровь и конвертируется в эстрадиол –

активный эстроген женского организма. Эстрон – преобладающий эстроген у постменопаузальных женщин.

Отмечены позитивные когнитивные эффекты премарина при старении и поздней менопаузе у женщин [20]. Известно, что премарин способствует нейрональному росту в гиппокампе, коре и базальном переднем мозге [9], оказывает нейропротекторный эффект на моделях  $\beta$ -амилоидной и глутаматной токсичности [27], проявляет когнитивно-повышающий, седативный и просоциальные эффекты [3]. Однако остаются актуальными изучения по раскрытию механизмов и мишеней этих эффектов.

С другой стороны, показано, что в ряде растений семейства *Lamiaceae* – *Salvia triloba* L., *Melissa officinalis* L., *Teucrium polium* L., проявляющих антихолинэстеразную и антиоксидантную активность, *Teucrium polium* L. (дубровник беловойлочный) наиболее достойный кандидат для испытаний в качестве растительной альтернативы при терапии БА [4]. Нами выдвинута гипотеза о нейропротекторной эффективности дубровника беловойлочного при ОВХ-индуцированной нейродегенерации, основанной на флавоноидах в его составе (рутин, катехин, апигенин, лютеолин), некоторые из которых имеют эстрогеноподобную активность [23] и селективно связываются с эстрогеновыми рецепторами (ЭР) [14].

Перечисленные флавоноиды входят в состав гидропонического дубровника беловойлочного, отличающегося высоким содержанием флавоноидов (не менее 1,5%) и фенилпропаноидных гликозидов (не менее 3%) – основных функциональных составляющих фитопрепаратов [11].

Целью данного изучения явилось сравнительное электрофизиологическое исследование спайковой активности нейронов гиппокампа (НГ) крыс на стимуляцию энторинальной коры (ЭК) при ОВХ в плацебо-контроле и в условиях системного применения синэстрола и гидропонического дубровника беловойлочного.

### Материал и методы

Синэстрол (Synoestrolum, “Биофарм”, Украина) по химическому строению отличается от стероидных эстрогенных гормонов, но по биологическим и лечебным свойствам близок к ним [2]. Синэстрол по эстрогенной активности равноценен эстрону (фолликулин): 1 мг синэстрола соответствует 10 000 ЕД.

Химический состав использованного в экспериментах гидропонического дубровника беловойлочного обогащен флавоноидными гликозидами (апигенин, лютеолин) и фенолгликозидами (вербаскозид, полиумозид, теуполиозид) [11]. За терапевтическую дозу водной фракции этанольного экстракта гидропонического дубровника беловойлочного нами приняты 5% от максимально переносимой дозы (400 мг/кг), что составляет 20 мг/кг [8], которую в/м в течение 3 недель начиная с 3-й недели после ОВХ получали крысы группы ОВХ+дубровник (n=6). Животные группы ОВХ+синэстрол (n=6) в течение 3 недель начиная с 3-й недели после ОВХ в/м получали синэстрол (0.1 мл 2%). Животные группы ОВХ плацебо-контроль (n= 6) в том же режиме получали стерильный бидистиллят.

В микроэлектрофизиологических исследованиях производили экстраклеточную регистрацию фоновой и вызванной спайковой активности единичных НГ (в норме n=157; в плацебо-контроле n=143; в группе ОВХ+дубровник n=186; в группе ОВХ+синэстрол n=202) при высокочастотной стимуляции (ВЧС) ипсилатеральной ЭК. В остром эксперименте животных обездвигивали дитилином (25 мг/кг в/б) и переводили на искусственное дыхание. Модель изолированного головного мозга крысы получали трансекцией спинного мозга (T2-T3) под местной новокаиновой анестезией. Раздражающий биполярный цилиндрический электрод вживляли в ЭК по стереотаксическим координатам AP-9, L±3.5, DV+4.0 мм, а стеклянный регистрирующий микроэлектрод с диаметром кончика 1 мкм многократно погружали в гиппокамп по координатам AP-3.2-3.5, L±1.5-3.5, DV+3.0-4.0 мм. ВЧС (100 Гц в течение 1сек) осуществляли током амплитудой 0,16 мА. В on-line режиме импульсный поток единичного НГ после селекции посредством амплитудного дискриминатора подвергался программному анализу, с последующим выводом перистимульных временных гистограмм (peri-event time histogram – PETH) (разработчик программы В.С. Каменецкий). Целью анализа является определение статистической достоверности различий межспайковых интервалов до, после и на время действия ВЧС (время тетанизации). Для решения этой задачи строятся гистограммы межспайковых интервалов, определяются основные параметры распределения спайкинга – средние значения частоты, моды, дисперсии для отдельных нейронов и/или усредненных по количеству испытаний для всей популяции. Традиционным методом проверки однородности двух независимых выборок являлся t-критерий Стьюдента. Для повышения надежности статистических оценок применяли также непараметрический метод проверки с использованием

двухвыборочного критерия Вилкоксона [1], учитывающего асимптотическую нормальность данного критерия и позволяющего сравнивать расчетные значения с табличными значениями стандартного нормального распределения. Для избираемых сравниваемых групп спайкинга нейрональной активности программно строили усредненные перистимульные гистограммы (PETN Average).

## Результаты и обсуждение

Возбудительные / ингибиторные входы гиппокампа способны модулировать обработку информации в гиппокампальных сетях строгим детерминированием возбудимости, и тем самым оказывать влияние на пластичность и жизнеспособность нейронов [19]. Процесс синаптической пластичности (включая кратковременную и долговременную потенциацию и депрессию), рассматриваемый как клеточный коррелят обучения / памяти и многих неврологических расстройств, сопровождаемых когнитивным дефицитом, проявляется аномальной синаптической функцией.

Согласно нашим экспериментальным данным, на ВЧС ЭК ответы НГ проявлялись в виде тетанической потенциации (ТП) и депрессии (ТД), посттетанической потенциации (ПТП) и депрессии (ПТД) – принятых показателей синаптической пластичности. В группе интактных крыс (норма) характерные эффекты в многократных испытаниях достоверно воспроизводились как в отдельных нейронах, так и в пределах популяции, со следующим балансом комбинаций компонентов ответов: ТД+ПТД (67 из 157 – 42,7%), ТД+ПТП (64 из 157 – 40,8%) и ТП+ПТП (26 из 157 – 16,6%) (рисунок). В ОВХ группе выявлена следующая диспропорция в типах ответов НГ на ВЧС ЭК: ТД+ПТД (47 из 143 – 32,86%), ТД+ПТП (11 из 143 – 7,69%), ТП+ПТП (20 из 143 – 13,98%); доминирующие ареактивные единицы составляли 45,5% (65 из 143 НГ) (рис., В). Системное применение как синэстрола, так и дубровника белойочного обеспечивает резкое снижение числа ареактивных на ВЧС ЭК НГ (1% и 8% соответственно) (рис., В), что свидетельствует о восстановлении нейромедиаторной активности. Известно, что лютеолин в состоянии повышать базальную синаптическую трансмиссию и облегчать индуцирование долговременной потенциации в зубчатой извилине гиппокампа крыс активацией протеина CREB (сAMP response element-binding), что указывает на потенциал лютеолина как терапевтический агент для протектирования синаптической функции и улучшения памяти при нейро-

дегенеративных нарушениях [25]. Изучения когнитивных эффектов лечения премарином на животных моделях демонстрируют изменения в гиппокампальных генах, сцепленных с пластичностью и когнитивной функцией [10]. Под воздействием ЭЗГТ при ОВХ повышается обучаемость у крыс (увеличение долговременной потенциации и плотности дендритных синапсов СА3-СА1 полей гиппокампа) [22].

Процентная доля НГ с тормозным типом ответов (ТД, ПТД, ТД+ПТД) уменьшается как в плацебо-контроле (от 42% в норме до 32,86%), так и в группах ОВХ+синэстрол и ОВХ+дубровник (21,78 и 28,49% соответственно) (рис., В). Процентная доля нейронов с возбуждающим типом ответов (ТП, ПТП, ТП+ПТП) в плацебо-контрольной группе претерпевает наименьшие изменения – спад от 16,6% в норме до 13,98% к 6-й неделе ОВХ (рис., В), в то время как к 6-й неделе ОВХ дубровник обеспечивает резкое увеличение таковых (52,15%), а синэстрол – снижение (5,94%) (рис., В). К 6-й неделе число нейронов

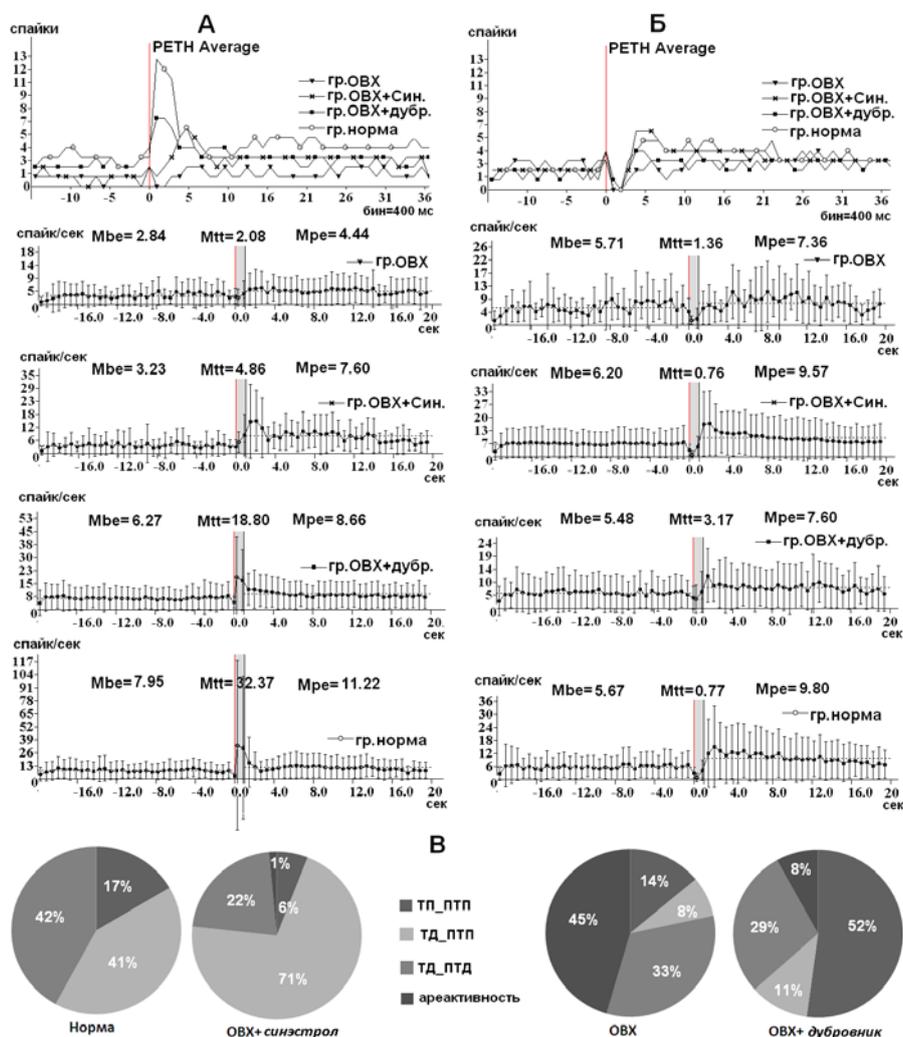


Рис. 1. Сравнительные усредненные перистимульные (PETN Average) гистограммы для возбуждательных (А) и ТД+ПТП (Б) эффектов в нейронах гиппокампа на высокочастотную стимуляцию энторинальной коры в группах ОВХ, ОВХ+синэстрол, ОВХ+дуброник и норма. Снизу – их же диаграммы средней частоты спайков с указанием средних цифровых значений в реальном времени 20 сек до (Mbe) и 20 сек после (Mpe) ВЧС (в течение 1 сек – Mtt). Сокращения: be (before event) – временной отрезок до стимуляции, pe (post event) – временной отрезок после стимуляции, tt (time tetanization) – время ВЧС. В – процентное соотношение числа гиппокампальных нейронов с возбуждательными (ТП–ПТП), тормозными (ТД–ПТД) и ТД+ПТП типами ответов, а также ареактивных единиц в вышеуказанных экспериментальных группах

с ТД+ПТП типом ответов в плацебо-контрольной группе составляет 7,69%, т. е. минимальную долю всех зарегистрированных типов ответов; в группе ОВХ+дубровник тенденция спада таковых сохраняется (11,29%), в то время как в группе ОВХ+синэстрол число НГ с ТД+ПТП ответами увеличивается (70,79%), приближаясь к пропорции таковых в норме (рис., В).

У млекопитающих обнаружены три основные формы эстрогенов: эстрадиол, фолликулин (синэстрол) и эстриол; фолликулин (синэстрол) ослабляет контекстуальное обусловливание страха [5]. Премарин проявляет протекторные свойства при скополамининдуцированной амнезии регулированием уровней холинацетилтрансферазных протеинов в гиппокампе и коре [6]. Эстроген регулирует ГАМК- и глутаматные сигналы через нуклеарные и мембранные механизмы [17]. Возросший в последнее время интерес к флавоноидам синтетического и растительного происхождения обусловлен их модуляторной функцией на рецепторы ГАМК (А) в головном мозге [12]. Апигенин модулирует ГАМК-ергическую и глутаматергическую трансмиссию в культуре кортикальных нейронов: потенциал нейропротекторной активности обеспечивается антагонистическими эффектами на ГАМК и глутаматные каналы [15]. Известно, что флавоноиды повторяют свойства некоторых гормонов и нейромедиаторов [13], а апигенин стимулирует нейрогенез у зрелых грызунов [24].

Демонстрируемые на рисунке (А, В) сравнительные РЕТН Average и диаграммы средней частоты, построенные на основе анализа всего массива НГ с возбудительными (А) и ТД+ПТП (Б) типами ответов в норме и группах ОВХ, ОВХ+дубровник, ОВХ+синэстрол, свидетельствуют, что возбудительные ответы на время тетанизации (1 сек) в группе ОВХ+дубровник не восстановлены до нормы, но значительно более выражены по сравнению с таковыми в плацебо-контроле; в группе ОВХ+синэстрол к норме приближена выраженность ПТП (рис., А). Диаграммы средней частоты в каждой группе демонстрируют цифровые значения возбудительных ответов на время тетанизации (Mtt) и постстимульное время (Mpe) по сравнению со средней частотой фоновой / престоимой спайковой активностью (Mbe). В группе ОВХ+дубровник ТП ответы выражены в 2,9 раза (18,8 : 6,27) по сравнению со слабыми возбудительными постстимульными ответами (4,44 : 2,84 = 1,5 раза) в группе ОВХ, однако, не восстановлены до таковых, более выраженных в норме (32,45 : 8,11 = 4 раза). Отсутствие ответов на время ВЧС свидетельствует о нарушениях в процессах

нейромедиации и, наоборот, определенное воспроизведение частотного стимула – показатель восстановления нейромедиаторного статуса в группе ОВХ+дубровник. В группе ОВХ+синэстрол более выражены ПТП ответы ( $7,6 : 3,23 = 2,4$  раза) по сравнению с ТП ( $4,86 : 3,23 = 1,5$  раза) (рис., А). В популяциях нейронов с ТД+ПТП ответами таковые в группе ОВХ+синэстрол составляют 70,79%. РЕТН Average и диаграммы средней частоты демонстрируют выраженность ТД ( $6,20 : 0,76 = 8$  раз) и ПТП ( $9,57 : 6,2 = 1,5$  раза) в группе ОВХ+синэстрол, близкую к таковым в норме ( $5,67 : 0,77 = 7,4$  раза и  $9,8 : 5,67 = 1,7$  раза соответственно).

В заключение, нейропротекторный / регуляторный эффект синэстрола более выражен, поскольку дефицит синаптической активности (по сравнению с нормой) в нейронной цепи ЭК – гиппокамп компенсируется увеличением доли / числа нейронов с ТД+ПТП ответами, с соответствующим норме балансом типов ответов. В то же время уменьшению числа ареактивных нейронов в группе ОВХ+дубровник, способствует резкое увеличение доли возбуждательных ответов.

И наконец, полученные результаты считаем необходимым оценивать с учетом современных изучений, сфокусированных на время- и дозозависимых эффектах (в частности нейрогенез и уровни синаптических протеинов) разных типов эстрогенов на гиппокампальную пластичность [5]. Отмечается также необходимость учета вовлечения фактора «критических окон» в ЭЗГТ: так, пролонгированная депривация овариальных гормонов изменяет способность ЭЗГТ регулировать уровни протеинов ЭР в областях головного мозга, ассоциированных с когнитивной функцией [7]. В этом контексте представленные результаты могут пролить свет на выявление механизмов воздействия синэстрола и дубровника беловойлочного в регулировании ОВХ-индуцированных нейродегенеративных расстройств.

*Поступила 19.07.11*

**Երկկողմանի օվարիումէկտոմիայից հետո սինէստրոլի եւ  
հիդրոպոնիկ մարիամախտոի նյարդապաշտպան  
արդյունավետության էլեկտրաֆիզիոլոգիական  
ուսումնասիրությունը հիպոկամպի նեյրոններում**

**Վ. Ա. Չավուշյան, Կ. Վ. Միմոնյան, Հ. Մ. Գալստյան**

Նեյրոդեգեներատիվ հիվանդությունների հիմքում, կապված ծերացման հետ, հորմոնային խանգարումը վճռական դեր է խաղում: Երկկողմանի օվարիումեկտոմիան (ՕՎԷ) Էգ առնետների մոտ, առաջարկվել է որպես փորձարարական մոդել, որը կրծողների նյարդային համակարգում առաջացնում է նեյրոդեգեներացիա և ընդօրինակում է հետմենոպաուզային շրջանի կանացի օրգանիզմի համակարգային խանգարումները: Էստրոգենային փոխարինող թերապիայի մոլեկուլային մեխանիզմների բացահայտման գործընթացներում կարևոր դեր ունի էստրոգենի միջոցով սինապսային կարգավորումը: Մինէստրոլը (սինթետիկ էստրոգեն) կովալենտ կապով բարձր արդյունավետությամբ և ընտրողականությամբ կապվում է էստրոգենային ռեցեպտորների հետ: Ֆիտոֆլավոնոիդների նկատմամբ բարձր հետաքրքրությունը պայմանավորված է սինապսային գործընթացների մեխանիզմներում նրանց միջամտությամբ՝ վերարտադրելով որոշ հորմոնների և նյարդափոխարիչների հատկությունները: Նպատակ ունենալով հարստացնել մարիամախոտի (*Teucrium polium* L.) քիմիական կազմը ֆլավոնոիդներով և ֆենիլգլիկոզիդներով՝ այն կուլտիվացվել է հիդրոպոնիկ պայմաններում: Ներկա աշխատանքի նպատակն է՝ երկկողմանի ՕՎԷ պայմաններում գնահատել սինէստրոլի և մարիամախոտի համեմատական ազդեցությունները առնետի հիպոկամպի սինապսային հաղորդման, պլաստիկականության և բջջի վերապրման գործընթացներում: Էլեկտրաֆիզիոլոգիական ուսումնասիրությունները իրականացվել են հիպոկամպի առանձին նեյրոնների սեպային ակտիվության արտաբջջային գրանցման պայմաններում՝ ի պատասխան իպսիլատերալ էնտորինալ կեղևի բարձր հաճախականությամբ գրգռման հետևյալ խմբերում. 1) ինտակտ ալբինո առնետներ, 2) ՕՎԷ 6 շաբաթ անց (պլացեթո ստուգիչ), 3) ՕՎԷ 6 շաբաթ անց (3 շաբաթ անց սինէստրոլ 0.1մլ 2%, ն/մ), 4) ՕՎԷ 6 շաբաթ անց (3 շաբաթ անց մարիամախոտ 20 մգ/կգ, ն/մ): Ինտակտ առնետների մոտ դրդիչ և արգելակիչ պատասխանների տեսակները հետևյալն են՝ տետանիկ պոտենցիալացիա (ՏՊ) համակցված պոստտետանիկ պոտենցիալացիայի (ՊՏՊ) հետ (ՏՊ+ՊՏՊ – 17%), տետանիկ դեպրեսիա (ՏԴ) համակցված պոստտետանիկ դեպրեսիայի (ՊՏԴ) հետ (ՏԴ+ՊՏԴ – 42%) և տետանիկ դեպրեսիա պոստտետանիկ պոտենցիալացիայի հետ (ՏԴ+ՊՏՊ 41%): ՕՎԷ 6 շաբաթ անց հիպոկամպի CA1 և CA3 դաշտերում գերակշռում են առեակտիվ նեյրոնները (45%)՝ ի պատասխան իպսիլատերալ էնտորինալ կեղևի բարձր հաճախականությամբ գրգռման: Մյուս նեյրոնները բնութագրվում են ցածր հաճախականությամբ և դրդունակությամբ՝ ՏԴ+ՊՏԴ – 33%, ՊՏՊ – 14 %, ՏԴ+ՊՏՊ – 8 %, ՏՊ – 0 %:

Մեր տվյալները վկայում են, որ ՕՎԷ նվազեցնում է հիպոկամպի սինապսային ակտիվությունը և ձախողում է նորմալում առկա դրդիչ և արգելակիչ պատասխանների հաշվեկշիռը: ՕՎԷ+սինեստրոլ և ՕՎԷ+մարիամախոտ խմբերում պատասխանների մասնաբաժինը հետևյալն է՝ ՏՊ+ՊՏՊ – 6 և 52%, ՏԴ+ՊՏԴ – 22 և 29%, ՏԴ+ՊՏՊ – 71 և 11% և առեակտիվ միավորներ 1 և 8% համապատասխանաբար:

Սինեստրոլը և մարիամախոտը խթանում են կեղև – հիպոկամպ նեյրոնային շղթաների վերակազմավորումը՝ կարգավորելով խախտված սինապտիկ ակտիվությունը, ինչպես նաև ռեակտիվ և առեակտիվ միավորների հաշվեկշիռը:

### **Electrophysiological study of neuroprotective efficiency of sinestrol and hydroponic *Germander* on hippocampal neurons after bilateral ovariectomy**

**V. A. Chavushyan, K. V. Simonyan, H. M. Galstyan**

On the basis of neurodegenerative diseases associated with ageing hormonal disbalance plays a decisive role. Bilateral OVX in female rats, suggested as an experimental model, causes neurodegeneration in the nervous system of rodents and imitates systemic disorders in postmenopausal women's organism. Synaptic modulation by estrogen is essential to understand the molecular mechanisms of estrogen replacement therapy. Sinestrol (a synthetic estrogen) covalently labels estrogen receptors with high efficiency and selectivity. Increased interest in phytoflavonoids is stipulated by its modulator intervention in functioning of synaptic mechanism, by replication of properties of some hormones and neurotransmitters. For the purpose of enrichment of chemical composition by flavonoids and phenilglycosides of *Teucrium polium L. (Germander)* it was cultivated in hydroponic condifions. The aim of the present work was to determine the comparative action of *Sinestrol* and *Germander* on rats' hippocampal synaptic transmission, plasticity, and cell survival in condition of estrogen deprivation induced by bilateral OVX. Electrophysiological studies by extracellular recording of hippocampal single-neuronal spike activity under high-frequency stimulation (HFS) of ipsilateral entorhinal cortex (EC) were performed on: 1) intact albino rats, 2) after 6 weeks of OVX (placebo-control), 3) after 6 weeks of OVX (after 3 weeks i/m injection of Sinestrol, 0.1ml 2%), 4) after 6 week of OVX (after 3 weeks i/m injection of *Germander*, 20 mg/kg). In intact rats the type of excitatory and inhibitory

responses are as follows: tetanic potentiation (TP) in combination with posttetanic potentiation (PTP) (TP+PTP 17%), tetanic depression (TD) in combination with posttetanic depression (PTD) (TD+PTD 42%) and TD conjoined with PTP (TD+PTP 41%). After 6 weeks of OVX dominates areactivity in neurons of CA1 and CA3 fields of hippocampus (45%) in response to HFS EC. The other neurons were characterized by low repeatability and excitability: TD+PTD - 33%, PTP -14 %, TD+PTP - 8 %, TP - 0 %. Our data suggest that OVX reduces hippocampal synaptic activity and failures the balance of excitatory and inhibitory responses of norm. In OVX+*Sinestrol* and OVX+*Germander* groups the proportion of effects are as follows: TP+PTP – 6 and 52%, TD+PTD – 22 and 29%, TD+PTP – 71 and 11% and areactive units – 1 and 8% respectively. *Sinestrol* and *Germander* promote the reorganization of neuronal circuitries of cortex-hippocampus by modulation of anomalous synaptic activity as well as the balance of areactive and reactive units.

### Литература

1. Орлов А. И. Прикладная статистика. М., 2004.
2. Суцевич Л. В. Краснова И. А. Лактионова О. Е. Заместительная гормональная терапия после тотальной овариэктомии. Вестник Российской ассоциации акушеров-гинекологов. 2000, 2, с. 55-60.
3. Alicia A. Wolf and Cheryl A. Frye Conjugated equine estrogen enhances rats' cognitive, anxiety, and social behavior. Neuroreport, 2008, 19, 7, p. 789–792.
4. Bahramikia S., Ardestani A., Yazdanparast R. Protective effects of four Iranian medicinal plants against free radical-mediated protein oxidation. Food Chemistry, 2009, p. 37-42.
5. Barha C.K., Galea L.A. Influence of different estrogens on neuroplasticity and cognition in the hippocampus. , 2010, 1800, 10, p.1056-1067.
6. Bohacek J., Bearl A.M., Daniel J. M. Long-term ovarian hormone deprivation alters the ability of subsequent oestradiol replacement to regulate choline acetyltransferase protein levels in the hippocampus and prefrontal cortex of middle-aged rats. J. Neuroendocrinol., 2008, 20, p. 1023–1027.
7. Bohacek J., Daniel J.M. The ability of oestradiol administration to regulate protein levels of oestrogen receptor alpha in the hippocampus and prefrontal cortex of middle-aged rats is altered following long-term ovarian hormone deprivation. J. Neuroendocrinol., 2009, 21, 7, p. 640-647.
8. Chavushyan V. A., Simonyan K. V., Galstyan H. M. Toxicity studies of Teucrium polium Lamiaceae growing in nature and in culture. The second international symposium “BIOPHARMA-2010: from science to industry” Yerevan, Armenia, May 17-20, 2010, p.11.

9. *Diaz Brinton R., Chen S., Montoya M., Hsieh D., Minaya J., Kim J., Chu H.P.* The women's health initiative estrogen replacement therapy is neurotrophic and neuroprotective. *Neurobiol. Aging*, 2000, 21, p. 475–496.
10. *Engler-Chiurazzi E., Tsang C., Nonnenmacher S., Liang W.S., Corneveaux J. J., Prokai L., Huentelman M. J., Bimonte-Nelson H. A.* Tonic Premarin dose-dependently enhances memory, affects neurotrophin protein levels and alters gene expression in middle-aged rats. *Neurobiol. Aging*, 2011, 32, 4, p. 680–697.
11. *Galstyan H. M., Revazova L. V., Topchyan H. V.* Digital indices and microscopic analyses of wild growing and overgrowing of *Teucrium polium* L. in hidroponic conditions. *The New Armenian Medical Journal*, 2010, 4, 3, p. 104.
12. *Hanrahan J. R., Chebib M., Johnston G. A.* Flavonoid modulation of GABA(A) receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 2011, 163, 2, p. 234–245.
13. *Havsteen B. H.* The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 2002, 96, 2-3, p. 67–202.
14. *Jarry H., Spengler B., Porzel A., Schmidt J., Wuttke W., Christoffel V.* Evidence for estrogen receptor beta-selective activity of *Vitex agnus-castus* and isolated flavones. *Planta Med.*, 2003, 69, 10, p. 945–947.
15. *Losi G., Puià G., Garzon G., de Vuono M.C., Baraldi M.* Apigenin modulates GABAergic and glutamatergic transmission in cultured cortical neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, 2004, 502, 1-2, p. 41–46.
16. *Morinaga A., Hirohata M., Ono K., Yamada M.* Estrogen has anti-amyloidogenic effects on Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, 359, 3, p. 697–702.
17. *Moura P. J., Petersen S. L.* Estradiol acts through nuclear- and membrane-initiated mechanisms to maintain a balance between GABAergic and glutamatergic signaling in the brain: implications for hormone replacement therapy. *Rev. Neurosci.*, 2010, 21, 5, p. 363–380.
18. *Mulnard R. A.* Methodological issues in estrogen treatment trials for Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2005, 1052, p. 173–181.
19. *Otmakhova N. A., Lewey J., Asrican B., Lisman J. E.* Inhibition of perforant path input to the CA1 region by serotonin and noradrenaline. *J. Neurophysiol.*, 2005, 94, 2, p. 1413–1422.
20. *Sherwin B. B., Henry J. F.* Brain aging modulates the neuroprotective effects of estrogen on selective aspects of cognition in women: a critical review. *Front. Neuroendocrinol.*, 2008, 29, p. 88–113.
21. *Simpkins J. W., Singh M.* More than a decade of estrogen neuroprotection. *Alzheimers Dement.*, 2008, V. 4 (1 Suppl 1), p. 131–136.
22. *Smith C. C., McMahon L. L.* Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission is increased. *J. Neurosci.*, 2005, 25, p. 7780–7791.
23. *Tang X., Zhu X., Liu S., Nicholson R.C., Ni X.* Phytoestrogens induce differential estrogen receptor beta-mediated responses in transfected MG-63 cells. *Endocrine*, 2008, 34, 1-3, p. 29–35.
24. *Taupin P.* Apigenin and related compounds stimulate adult neurogenesis. *Expert. Opin. Ther. Pat.*, 2009, 19, 4, p. 523–527.
25. *Xu B., Li X.X., He G.R., Hu J.J., Mu X., Tian S., Du G.H.* Luteolin promotes long-term potentiation and improves cognitive functions in chronic cerebral hypoperfused rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 2010, 627, 1-3, p. 99–105.

26. *Yao J., Irwin R., Chen S., Hamilton R., Cadenas E., Brinton R.D.* Ovarian hormone loss induces bioenergetic deficits and mitochondrial  $\beta$ -amyloid. *Neurobiol. Aging.*, 2011 Apr 22.
27. *Zhao L., Brinton R. D.* Select estrogens within the complex formulation of conjugated equine estrogens (Premarin) are protective against neurodegenerative insults: implications for a composition of estrogen therapy to promote neuronal function and prevent Alzheimer's disease. *BMC Neurosci.*, 2006, 7, p. 24.