

## ПРОСТРАНСТВЕННОЕ ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ БЕЛЫХ КРЫС В ВОДНОМ ЛАБИРИНТЕ МОРРИСА ПОД ВЛИЯНИЕМ БИОМАССЫ ШТАММОВ СТРЕПТОМИЦЕТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА

Гарбузник Анастасия<sup>1</sup>, Шептицкий Владимир<sup>1</sup>,  
Бурцева Светлана<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии и санокреатологии, Молдавский  
Государственный Университет,

<sup>2</sup>Институт микробиологии и биотехнологии, Технический  
университет Молдовы, Кишинэу, Республика Молдова,

[11\\_lav\\_11@mail.ru](mailto:11_lav_11@mail.ru)

**Abstract.** *The aim of the work is to investigate the effect of long-term consumption of biomass of local strains of streptomycetes - Streptomyces massasporeus CNMN-Ac-06 and Streptomyces fradiae CNMN-Ac-11 on the spatial learning and memory in rats in the Morris water maze. It was found that biomass of strains Streptomyces massasporeus CNMN-Ac-06 and, to a greater extent, Streptomyces fradiae CNMN-Ac-11 leads to a noticeable decrease in such indicators, recorded during the training of animals in the Morris water maze, as the duration of the latent period of the animals the platform, the length of the path to the platform and the duration of the animal's stay in the non-target sectors of the maze, while the duration of the animals' stay in the target sector of the maze increased significantly. Thus, the biomass of studied local strains of streptomycetes contributes to the intensification of spatial orientation learning, improvement of working memory and the process of consolidation of spatial memory in rats, and these strains are promising for further research in order to isolate and identify substances with neuroprotective and nootropic properties.*

**Key words.** *Spatial learning and memory, working and long-term memory, Morris water maze, streptomycetes, biomass.*

### Введение

Исследование обучения и памяти на разных уровнях организации, несмотря на свою длительную историю, остается одним из центральных разделов как нейрофизиологии, так и фундаментальной науки вообще. Обучение и память тесно связаны

между собой, имея фундаментальное значение для живого организма [8, 11].

Выяснения причин преждевременного нарушения когнитивных процессов, в том числе, памяти, и поиск способов его профилактики приобрели в настоящее время особую актуальность. Человечество стало гораздо больше сталкиваться с патологиями, которые сопровождаются нейродегенеративными процессами такими, как болезни Альцгеймера, Паркинсона и др. [7, 16, 21], они быстро прогрессируют, особенно в развитых странах [22], и одними из наиболее важных причин увеличения распространённости когнитивных нейропсихических нарушений, является хронический психогенный стресс, стрессогенный образ жизни, резкие изменения условий жизнедеятельности современного человека [1, 2].

Одним из способов решения проблемы преждевременного угасания памяти является поиск веществ с нейропротекторными и антиоксидантными свойствами, влияющими на различные нейрональные образования головного мозга, участвующих в процессах обучения и памяти [7, 12]. Санокреатологические подходы к повышению саногенности организма и предотвращению ранней дегградации функций, в том числе, психических, включают и получение саногенных веществ природного происхождения [1].

В последние годы было обнаружено, что вторичные метаболиты ряда штаммов стрептомицетов способны оказывать нейропротекторное действие при применении различных моделей нейродегенерации, показано их значение как мощных нейропротекторных веществ в условиях индукции липидной перекисидации [10, 18]. Более того, некоторые из метаболитов стрептомицетов, обладают способностью стимулировать нейритогенез, оказывая влияние на ультраструктурную организацию различных нейрональных образований головного мозга [14, 20], и дифференцировку нейральных стволовых клеток [6]. Несмотря на увеличивающееся число сообщений о воздействии продуктов жизнедеятельности стрептомицетов на нейрональные процессы, их влияние на поведение животных еще очень мало исследовано. Ранее в Институте физиологии и санокреатологии было обнаружено, что длительное потребление белыми крысами обеих полов культуральной жидкости и, особенно, биомассы

штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ас-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, выделенных из почв Республики Молдова, облегчает выработку оборонительных условных рефлексов и способствует увеличению скорости целенаправленных двигательных реакций, а также вызывает существенную стимуляцию формирования условно-рефлекторной памяти [4, 5, 17]. При изучении воздействия метаболитов штаммов *Streptomyces avermectilis* и *Streptomyces lincolniensis* на поведенческие реакции крыс выявлен, в частности, их анксиолитический эффект [19].

Целью работы является изучение влияния длительного потребления биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ас-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, выделенных из почв центральной части Республики Молдова, на пространственное обучение и память белых крыс линии *Wistar* в водном лабиринте Морриса.

### Материалы и методы

Исследования выполнены на белых крысах-самцах линии *Wistar* в возрасте 5-ти месяцев, содержащихся в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. Начиная с возраста 2-х месяцев, животные 2-ух опытных групп в течение 90 дней в качестве пищевой добавки к рациону питания получали высушенную биомассу штаммов стрептомицетов – *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ас-06 (ВМ1) или *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 (ВМ2) в дозе 250 мг/кг массы тела в сутки. Животные контрольной группы содержались на стандартном рационе питания. Используемые в работе штаммы стрептомицетов выделены из почв центральной части Республики Молдова и находятся на хранении в Национальной коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии и биотехнологии Технического университета Молдовы. Культивирование штаммов стрептомицетов проведено на стандартной комплексной питательной среде SP-1.

Особенности пространственного обучения и памяти у крыс исследовали с помощью современной и хорошо зарекомендовавшей себя в лабораториях различных стран методики «Водный лабиринт Морриса» (ВЛМ). Этот метод позволяет исследовать процессы пространственного обучения и памяти (рабочей и долговременной), где рабочая память рассматривается как оперативная составляющая кратковременной памяти [3]. Методика ВЛМ, основана на том, что

животное обучается находить кратчайшую дистанцию до спрятанной под водой платформы [13, 15]. С помощью данного теста исследовали длительность латентного периода, в течение которого крыса находила платформу и забиралась на нее (ЛП, с), и длину пройденного пути, который животное проходило от места помещения в воду до платформы (ПП, см). Лабиринт Морриса представляет собой бассейн, заполненный непрозрачной, окрашенной порошковым обезжиренным молоком, водопроводной водой, поверхность которого условно разделена на четыре сектора (I – целевой; II, III, IV – не целевые). В целевом секторе находится платформа, скрытая на 0,5 см под водой. Движения животного внутри бассейна регистрировали с помощью цифровой видеокамеры [3]. Опыт состоял из фазы обучения и фазы тестирования. Животное в течение 4 дней проходило фазу обучения. Ежедневное обучение включало 3 попытки с интервалом 30 с. ЛП и ПП для каждого дня вычисляли как среднее значение. Эффективность обучения и активацию рабочей памяти оценивали по уменьшению значений ЛП и ПП. Проверку активации долговременной пространственной памяти проводили на 5-й день эксперимента – убирали скрытую платформу, животное с интервалом 30 с 3 раза помещали в центр бассейна, далее в течение 1 минуты проводили наблюдения за его движениями. Определяли время нахождения в каждом из секторов (в % от общего времени нахождения в бассейне). Статистически значимое превышение времени нахождения в целевом секторе над случайным свидетельствовало о том, что крыса помнит расположение платформы. На 9-й день и 30-й день эксперимента оценивали сохранность следов пространственной памяти и длительность их удержания. Статистический анализ данных выполнен при помощи программы Microsoft Excel 2016.

### **Результаты и их обсуждение**

Анализ полученной динамики показателей пространственного обучения и рабочей памяти в ВЛМ – ЛП и ПП показывает существенные их изменения под влиянием биомассы стрептомицетов (рис. 1 и 2). Обнаружено, что длительное потребление биомассы способствует существенному облегчению процесса пространственного обучения, при этом обнаружено, что штаммы *Streptomyces massaporeus* CNMN-Ас-06 и *Streptomyces*

*fradiae* CNMN-Ac-11 в разной степени способствует облегчению обучения в ВЛМ.

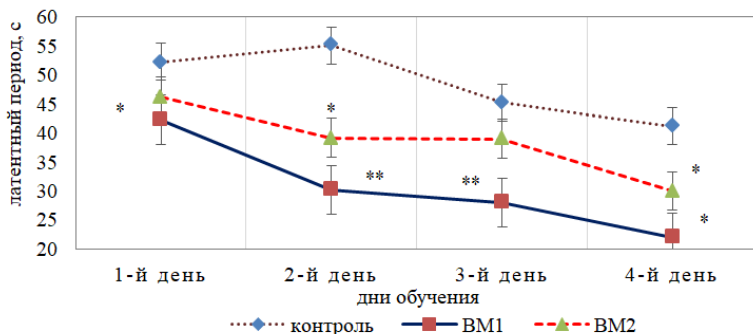


Рисунок 1. Динамика ЛП в процессе обучения крыс в ВЛМ под влиянием биомассы стрептомицетов. \* – достоверные отличия от контроля, \*\* – достоверные различия между VM1 и VM2,  $p < 0,01-0,05$ .

В отличие от VM2, VM1 уже на 1-й день обучения вызывает достоверное снижение ЛП (на  $20,2 \pm 6,2\%$ ), на 2-й день обучения ЛП у крыс, потреблявших VM2 на  $29,9 \pm 4,6\%$  ниже контроля, а VM1 – на  $45,2 \pm 5,9\%$ , на 3-й день, соответственно, – на  $16,0 \pm 6,3\%$  и на  $38,2 \pm 4,9\%$ , на 4-й день, соответственно, – на  $27,2 \pm 5,4\%$  и на  $46,7 \pm 4,6\%$  (рис. 1). Сходная картина наблюдается и при исследовании другого показателя пространственного обучения в ВРЛ – ПП (рис. 2).

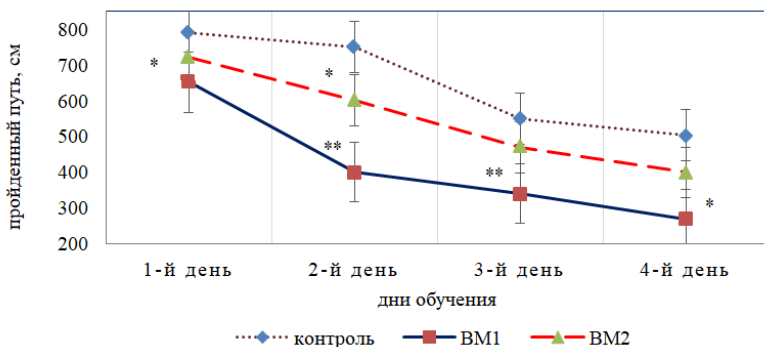


Рисунок 2. Динамика ПП в процессе обучения крыс в ВЛМ под влиянием биомассы стрептомицетов. \* – достоверные отличия от контроля, \*\* – достоверные различия между VM1 и VM2,  $p < 0,01-0,05$ .

Согласно методике, для исследования активации долговременной пространственной памяти находили классический критерий запоминания – время нахождения крыс в целевом секторе после окончания обучения (на 5-й день), когда платформу убирали из бассейна. Обнаружено, что животные, потреблявшие биомассу стрептомицетов, большую часть времени проводили в целевом секторе по сравнению с контролем, что свидетельствует о стимуляции у них процесса активации долговременной пространственной памяти, процесса консолидации энграммы. При этом, животные, потреблявшие ВМ1 и ВМ2, находились в целевом секторе примерно одинаковую часть времени ( $37,2 \pm 3,5\%$  и  $40,1 \pm 4,2\%$ , соответственно) (рис. 3).

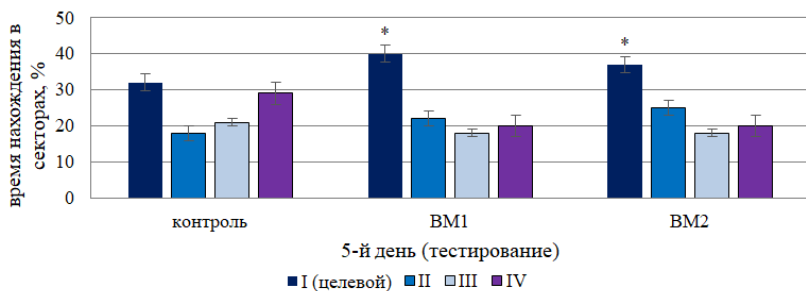


Рисунок 3. Относительная продолжительность пребывания крыс в секторах ВЛМ на 5-й день тестирования под влиянием биомассы стрептомицетов. \* – достоверные отличия от контроля,  $p < 0,01-0,05$ .

Для оценки сохранности следа памяти и, соответственно, пространственной долговременной памяти, согласно методике, тестирование повторили на 9-й, а затем 30-й день после начала обучения. Полученные результаты показали, что на 9-й день опыта, т.е. спустя 5 дней после окончания обучения крысы, получавши с кормом ВМ1 и ВМ2, относительно больше времени находятся в целевом секторе по сравнению с контролем и даже несколько больше по сравнению с 5-м днем опыта ( $45,3 \pm 3,3\%$  и  $40,1 \pm 2,8\%$ , соответственно), что свидетельствует о сохранности следов памяти и эффективности метаболитов стрептомицетов в отношении собранности следа памяти (рис. 4).

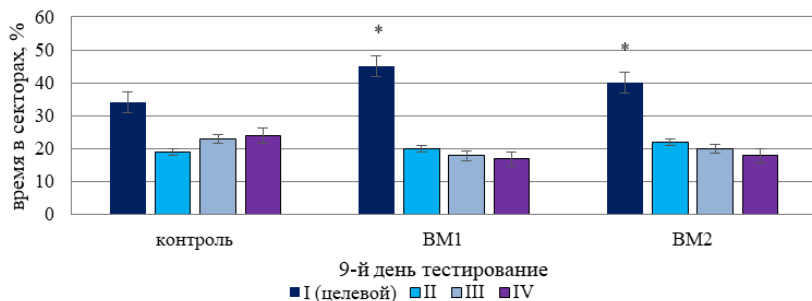


Рисунок 4. Относительная продолжительность пребывания крыс в секторах ВЛМ на 9-й день тестирования под влиянием биомассы стрептомицетов. \* – достоверные отличия от контроля,  $p < 0,01-0,05$ .

Результаты тестирования на 30-й день опыта, показывают, что даже спустя длительное время, крысы, потреблявшие биомассу стрептомицетов, в отличие от контроля, сохраняют следы памяти о месте нахождения платформы и чаще находятся в целевом секторе ВЛМ (рис. 5), при этом, эффективность BM1 больше по сравнению с BM2.

Таким образом, биомасса штаммов *Streptomyces massaporeus* CNMN-Ас-06 (в большей степени) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 способствует стимуляции процесса пространственного обучения, активизации рабочей и долговременной пространственной памяти и улучшению сохранности следов памяти.

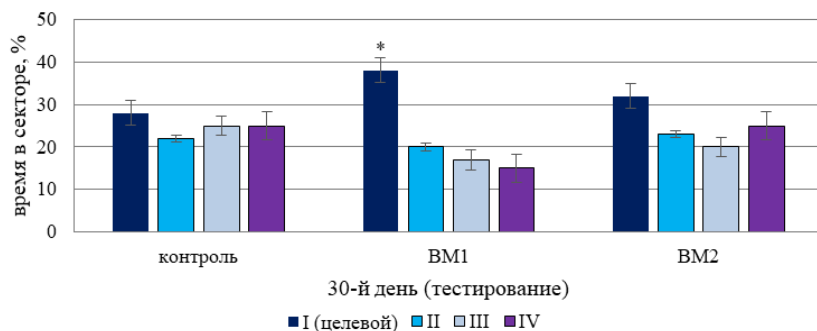


Рисунок 5. Относительная продолжительность пребывания крыс-самцов в секторах водного лабиринта Морриса на 30-й день тестирования под влиянием биомассы стрептомицетов. \* – достоверные отличия от контроля,  $p < 0,01-0,05$ .

Следует отметить, что исследование процесса пространственного обучения и памяти лабораторных животных в водном лабиринте Морриса под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ас-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 были проведены впервые. Полученные данные могут косвенно демонстрировать влияние вторичных метаболитов биомассы исследуемых штаммов на те или иные механизмы обучения, рабочей и долговременной памяти у лабораторных животных, что, по-видимому, определяется неодинаковым составом биомассы штаммов.

Эффективность биомассы исследуемых штаммов в отношении процессов обучения и памяти, очевидно, обусловлена, нейропротекторным действием входящих в ее состав антиоксидантов (хорошо известно, что плавание в воде в модели ВЛМ, является достаточно сильным стрессовым фактором для крыс на начальном периоде обучения [13, 15]), а также метаболитов, способных стимулировать и поддерживать нейрональные процессы, лежащие в основе обучения и памяти, о чем свидетельствуют и результаты, полученные нами ранее [4, 5, 9, 17].

### **Выводы**

1. Биомасса штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ас-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, выделенных из почв центральной части Республики Молдова, способствует существенному облегчению процесса пространственного обучения белых крыс-самцов в водном лабиринте Морриса, активации рабочей и долговременной пространственной памяти, увеличению длительности хранения следа памяти.

2. Сравнительный анализ показателей пространственного обучения и памяти в водном лабиринте Морриса под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ас-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11, культивируемых на комплексной среде SP-I, показывает, что биомасса штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ас-06 обладает большей эффективностью в отношении процессов обучения и памяти по сравнению с биомассой штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11.

3. Существенное изменение динамики процессов пространственного обучения и памяти под влиянием длительного потребления белыми крысами биомассы исследуемых штаммов стрептомицетов свидетельствует о перспективности дальнейших исследований по идентификации биологически активных веществ штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ас-06 (в первую очередь) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11 с нейропротекторными и ноотропными свойствами.

### Библиография

1. Фурдуй Ф.И., Чокинэ В.К., Фурдуй В.Ф., Глижин А.Г., Врание В.Г., Шептицкий В.А. Трактат о научных и практических основах санокреатологии. Том 1. Проблема здоровья. Санокреатология. Потребность общества в ее развитии. Chişinău: Tipografia AŞM, 2016, 228 p.
2. Фурдуй Ф.И., Чокинэ В.К., Фурдуй В.Ф., Глижин А.Г., Врание В.Г., Шептицкий В.А. Трактат о научных и практических основах санокреатологии. Том 2. Психическое здоровье. Психосанокреатология. Необходимость общества в ее развитии. Chişinău: Tipogr. AŞM, 2018. 360 p.
3. Хоцкин Н.В., Куликов В.А., Завьялов Е.Л. и др. Проведение и автоматизация теста «водный лабиринт Морриса» в условиях SPF-вивария. В: *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015, № 19, с. 388-393.
4. Шептицкий В.А., Березюк Ю.Н., Бурцева С.А. Условно-рефлекторная деятельность белых крыс при длительном потреблении биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ас-11. In: *Buletinul AŞM, Ştiinţele vieţii*. 2017, nr. 1 (331), p. 16-24.
5. Шептицкий В.А., Братухина А.А., Бурцева С.А. Условно-рефлекторная деятельность белых крыс при длительном потреблении биопрепаратов на основе метаболитов *Streptomyces massasporeus*. In: *Buletinul AŞM. Ştiinţele vieţii*. 2007, nr. 2 (302), p. 7-12.
6. Arai M.A., Koryudzu K., Ishibashi M. Inubosins A, B, and C are acridine alkaloids isolated from a culture of *Streptomyces* sp. IFM 11440 with *Ng2* promoter activity. In: *J. Nat. Prod.* 2015, vol. 78, nr. 2, p. 311-314.
7. Bonda D.J., Wang X., Perry G. et al. Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention. In: *Neuropharmacology*. 2010, vol. 59, p. 290–294.
8. Brem A., Ran K., Pascual-Leone A. Learning and memory. In: *Handbook of clinical neurology. Elsevier. Brain stimulation*. 2013, vol. 116, p. 693–737.
9. Garbuzneac A., Sheptitsky V. Conditioned reflex learning and memory of white rats of different ages under the influence of the biomass of streptomycetes isolated from the soils of the Republic of Moldova. In: *Life*

*sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community*. Chisinau, 2022, p. 131.

10. El-Naggar N., El-Ewasy S. Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. In: *Scientific Reports*, 2017, nr. 7, p. 1-19.

11. Josselyn S.A., Frankland P.W. Memory Allocation: Mechanisms and Function. *Annu. In: Rev. Neurosci.* 2018, vol. 41, p. 389–413.

12. Morén C., De Souza R.M., Giraldo D.M. et al. Antioxidant Therapeutic Strategies in Neurodegenerative Diseases. In: *J. Mol. Sci.* 2022, vol. 23, p. 9328.

13. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. In: *J. Neuroscience Methods*. 1984, vol. 11, nr. 1, p. 47-60.

14. Ōmura S., Crump A. Lactacystin: first-in-class proteasome inhibitor still excelling and an exemplar for future antibiotic research. In: *The Journal of Antibiotics*, 2019, vol. 72, p. 189–201.

15. Penley S.C., Gaudet C.M., Threlkeld S.W. Use of an eight-arm radial water maze to assess working and reference memory following neonatal brain injury. In: *J. Vis. Exp.* 2013, vol. 82, p. 78-84.

16. Samadian M., Gholipour M., Hajiesmaeili M. et al. The Eminent Role of microRNAs in the Pathogenesis of Alzheimer's disease. In: *Front. Aging Neurosci.* 2021, vol. 13, p. 641.

17. Şeptiţchi V., Vasilciuc A., Garbuzneac A. et al. Influenţa consumului pe termen lung al biomasei tulpinilor *Streptomyces massasporeus* CNMN-36 şi *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 asupra învăţării şi memoriei reflector-condiţionate a şobolanilor albi de diferite vârste. In: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*. 2021, nr. 2, p. 72-82.

18. Ser H.L., Palanisamy U.D., Yin W. et al. Presence of antioxidative agent, pyrrolo[1,2-a] pyrazine-1,4-dione, hexahydro- in newly isolated *Streptomyces mangrovisoli* sp. nov. In: *Front. Microbiol.*, 2015, vol. 6, p. 854.

19. Spinosa H.S., Stilck S.R., Bernardi M.M. Possible anxiolytic effects of ivermectin in rats. In: *Vet. Res. Commun.* 2002, vol. 26, nr. 4, p. 309-321.

20. Sunazuka T., Hirose T., Omura S. Efficient total synthesis of novel bioactive microbial metabolites. In: *Acc. Chem. Res.* 2008, vol. 41, p. 302–314.

21. Xincui F., Jing Z., Jianping Z. et al. Effect of Resveratrol Combined with Donepezil Hydrochloride on Inflammatory Factor Level and Cognitive Function Level of Patients with Alzheimer's Disease. In: *Journal of Healthcare Engineering*. 2022, p. 1-7.

22. Zheng J.C., Chen S. Translational Neurodegeneration in the era of fast-growing international brain research. In: *Transl. Neurodegener.* 2022, p. 45-48.