МОЛДАВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ДОКТОРСКАЯ ШКОЛА ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

Консорциум: **Молдавский Государственный Университет, Институт Информационного Общества, Государственный Университет «Богдан Петричейку Хашдеу», Кагул**

На правах рукописи
УДК: 57.02+57.024+591.1

ГАРБУЗНЯК АНАСТАСИЯ

ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ КРЫС ПРИ ПОТРЕБЛЕНИИ БИОМАССЫ СТРЕПТОМИЦЕТОВ

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук

165.01. Физиология человека и животных

Научные руководители: **ШЕПТИЦКИЙ Владимир,** доктор хабилитат биологических наук, доцент-исследователь

БУРЦЕВА Светлана, доктор хабилитат биологических наук, профессор-исследователь

Автор: **ГАРБУЗНЯК Анастасия**

Кишинэу, 2024

UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA

ȘCOALA DOCTORALĂ ȘTIINȚE ALE NATURII

Consorțiu: **Universitatea Stat din Moldova, Institutul de Dezvoltare a Societății Informaționale, Universitatea de Stat „Bogdan Petriceicu Hasdeu" din Cahul**

Cu titlu de manuscris
C.Z.U: 57.02+57.024+591.1

GARBUZNEAC ANASTASIA

ÎNVĂȚAREA ȘI MEMORIA ȘOBOLANILOR ÎN CONSUMUL BIOMASEI DE STREPTOMICETE

Teză de doctor în științe biologice

165.01. Fiziologia omului și animalelor

Conducători ştiinţifici: **ȘEPTIȚCHI Vladimir,** doctor habilitat în științe biologice, conferenţiar cercetător

BURȚEVA Svetlana, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător

Autorul: **GARBUZNEAC Anastasia**

Chişinău, 2024

© Гарбузняк Анастасия, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

АННОТАЦИЯ…….…… **7**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ…… **10**

ВВЕДЕНИЕ…… **18**

1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕХАНИЗМАХ НЕЙРОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ, БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВАХ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ СТРЕПТОМИЦЕТАМИ, И ИХ ВЛИЯНИИ НА ПРОЦЕССЫ ОБУЧЕНИЯ И ПАМЯТИ……. **25**

1.1. Современные представления о механизмах памяти и обучении……. 25

1.2. Биологически активные вещества, синтезируемые стрептомицетами и их физиологические эффекты…… 44

1.3. Влияние метаболитов стрептомицетов на нейрональные процессы, лежащие в основе обучения и памяти …… 50

1.4. Выводы к главе 1……. 57

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ……. **58**

2.1. Объект исследования..... 58

2.2. Методы получения биомассы штаммов стрептомицетов, культивированных на разных питательных средах, определение ее липидного и аминокислотного состава……..... 60

2.3. Методы исследования влияния биомассы штаммов стрептомицетов на динамику прироста массы тела и плодовитость белых крыс, развитие крысят……. 63

2.4. Методы исследования обучения и памяти белых крыс под влиянием биомассы штаммов стрептомицетов……..…….. 66

2.5. Выводы к главе 2…… 75

3. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ БИОМАССЫ ШТАММОВ *STREPTOMYCES MASSASPOREUS* CNMN-AC-06 И *STREPTOMYCES FRADIAE* CNMN-AC-11, ИСПОЛЬЗУЕМОЙ В ОПЫТАХ ПО ИЗУЧЕНИЮ ПРОЦЕССОВ ОБУЧЕНИЯ И ПАМЯТИ……. **76**

3.1. Особенности образования биомассы и липидов у штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 при культивировании на комплексных средах M-I, SP-I, SP-III …….. 76

3.2. Качественный и количественный состав липидов биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 при культивировании на комплексной среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты…… 82
3.3. Аминокислотный состав биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, выращенного на комплексной среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты разной концентрации …… 86
3.4. Выводы к главе 3……. 92
4. ВЛИЯНИЕ БИОМАССЫ СТРЕПТОМИЦЕТОВ НА ПРИРОСТ МАССЫ ТЕЛА, ПЛОДОВИТОСТЬ БЕЛЫХ КРЫС И РАЗВИТИЕ КРЫСЯТ …….. 93
4.1. Токсикологические свойства биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 …… 93
4.2. Изменение прироста массы тела лабораторных животных под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 ..……. 94
4.3 Действие биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на плодовитость самок белых крыс и развитие крысят…….. 101
4.4. Выводы к главе 4……. 103
5. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ НА ОБУЧЕНИЕ И СОХРАНЕНИЕ СЛЕДА ПАМЯТИ БИОМАССЫ ШТАММОВ *STREPTOMYCES MASSASPOREUS* CNMN-AC-06 И *STREPTOMYCES FRADIAE* CNMN-AC-11, ВЫРАЩЕННЫХ НА КОМПЛЕКСНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ SP-I ……..... 104
5.1. Влияние длительного потребления биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на условно-рефлекторное обучение и память белых крыс разного возраста в челночной камере…….. 104
5.2. Пространственное обучение и память белых крыс в восьмирукавном радиальном лабиринте под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 …….. 112
5.3. Пространственное обучение и память белых крыс в водном лабиринте Морриса под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 ……... 122
5.4. Выводы к главе 5…… 129

6. ОСОБЕННОСТИ ОБУЧЕНИЯ И ПАМЯТИ БЕЛЫХ КРЫС ПОД ДЕЙСТВИЕМ БИОМАССЫ ШТАММА *STREPTOMYCES MASSASPOREUS* CNMN-AC-06, ВЫРАЩЕННОГО НА СРЕДЕ SP-I С ДОБАВЛЕНИЕМ ПАРААМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ …… 130

6.1. Влияние длительного потребления биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты, на условно-рефлекторное обучение и память белых крыс в челночной камере…..…… 130

6.2. Пространственное обучение и память белых крыс в восьмирукавном радиальном лабиринте под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, выращенного на среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты ……. 135

6.3. Пространственное обучение и память белых крыс в водном лабиринте Морриса под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, выращенного на среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты ……. 142

6.4. Выводы к главе 6…….. 149

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ……. 150

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ…….. 151

БИБЛИОГРАФИЯ…….. 152

ПРИЛОЖЕНИЯ……... 163

Приложение 1. Акт о внедрении результатов …. …….. 163

Приложение 2. Патент на изобретение……. 164

Приложение 3. Патент на изобретение 166

Приложение 4. Дипломы и медали…..…… 168

Приложение 5. Сертификаты участия в научных мероприятиях…….. 175

ДЕКЛАРАЦИЯ ОБ ОТВЕТСТВЕННОСТИ……... 177

CV-АВТОРА…….. 178

АННОТАЦИЯ

Гарбузняк Анастасия «Обучение и память крыс при потреблении биомассы стрептомицетов», диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, Кишинэу, 2024 г.

Структура диссертации: Диссертация представлена на 125 страницах основного текста, состоит из введения, 6 глав, общих выводов и рекомендаций, содержит 5 таблиц, 48 рисунков, список литературы из 192 наименований, 5 приложений. Полученные результаты были представлены в 23 научных работах, 2 патентах.

Ключевые слова: белые крысы, условно-рефлекторное и пространственное обучение, рабочая и долговременная память, стрептомицеты, биомасса, парааминобензойная кислота, аминокислоты, липиды.

Цель работы: Изучение особенностей обучения и памяти белых крыс под влиянием длительного потребления биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выделенных из почвы центральной части Республики Молдова.

Задачи исследования: Изучить биосинтетические свойства штаммов *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 и *S. fradiae* CNMN-Ac-11, культивированных на средах разного состава для получения биомассы, предположительно, оказывающей наибольшее влияние на обучение и память; исследовать особенности динамики массы тела, плодовитости белых крыс и развития крысят под действием биомассы стрептомицетов; изучить особенности обучения и памяти белых крыс в условиях длительного потребления биомассы штаммов *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 и *S. fradiae* CNMN-Ac-11, культивированных на комплексной питательной среде SP-I, а также на среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты (ПАБК).

Научная новизна и оригинальность: Впервые выявлено стимулирующее влияние биомассы стрептомицетов на процесс пространственного обучения и памяти белых крыс в восьмирукавном радиальном лабиринте и водном лабиринте Морриса. Впервые обнаружено, что добавление в питательную среду ПАБК существенно усиливает стимулирующий эффект биомассы в отношении условно-рефлекторого и пространственного обучения и памяти. Получены новые данные об особенностях влияния биомассы стрептомицетов в отношении условно-рефлекторного обучения и памяти у крыс разного возраста. Получены новые данные о стимулирующем влиянии биомассы стрептомицетов, культивированных на питательной среде с добавлением ПАБК, в отношении массы тела и плодовитости, которые запатентованы. Предложена новая питательная среда для культивирования штамма *S. massasporeus* CNMN-Ac-06, улучшающая его биосинтетические свойства, разработка которой завершена патентованием.

Решенная научная проблема: состоит в получении новых научно обоснованных знаний об особенностях условно-рефлекторного и пространственного обучения и памяти у белых крыс в условиях потребления ими в качестве пищевой добавки биомассы местных штаммов стрептомицетов с применением комплекса физиологических (поведенческих), биохимических и микробиологических методов, что привело к установлению существенного стимулирующего влияния биомассы на исследуемые когнитивные процессы и позволило продемонстрировать перспективность штаммов *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 и *S. fradiae* CNMN-Ac-11 для получения новых биологически активных веществ с нейропротекторными и ноотропными свойствами, а также предложить новую питательную среду для культивирования стрептомицетов с добавлением ПАБК, применение которой позволяет повысить эффективность биомассы в отношении процессов обучения и памяти.

Полученные принципиально новые результаты для науки и практики: на основе современных физиологических (поведенческих), микробиологических и биохимических методов получены принципиально новые результаты о влиянии биомассы стрептомицетов на процессы обучения и памяти, которые могут найти применение при получении веществ с ноотропным и нейропротекторным действием.

Теоретическое значение: Полученные результаты расширяют и углубляют научные представления об особенностях процессов условно-рефлекторного и пространственного обучения и памяти под влиянием биологически активных веществ микробного происхождения с нейропротекторными и нейростимулирующими свойствами.

Прикладное значение: Полученные результаты демонстрируют перспективность дальнейших исследований штаммов *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 и *S. fradiae* CNMN-Ac-11 для выделения и идентификации биологически активных веществ с нейропротекторными и ноотропными свойствами. Получена новая питательная среда для культивирования штамма *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 с добавлением ПАБК, улучшены его биосинтетические свойства и стимулирующий эффект биомассы на процессы обучения и памяти. Полученные результаты демонстрируют возможность получения на основе биомассы местных штаммов стрептомицетов препаратов для животноводства с целью стимуляции привесов и плодовитости.

Внедрение научных результатов: результаты внедрены в учебный процесс естественного-географического факультета ПГУ им. Т.Г. Шевченко. Получены 2 патента, 4 медали на международных выставках инноваций.

ADNOTARE

Anastasia Garbuzneac „Învățarea și memoria șobolanilor în consumul biomasei de streptomicete", teza de doctor în științe biologice, Chișinău, 2024.

Structura tezei: Lucrarea este prezentată pe 125 de pagini de text principal, constă din introducere, 6 capitole, concluzii generale și recomandări, conține 7 tabele, 48 de figuri, bibliografie din 192 de titluri, 5 anexe. Rezultatele obţinute sunt prezentate în 23 lucrări ştiinţifice şi 2 brevete.

Cuvinte-cheie: șobolani albi, învățare reflector-condiționată și spațială, memorie operativa și de lungă durata, streptomicete, biomasă, acid para-aminobenzoic, aminoacizi, lipide.

Scopul lucrării: Studierea particularităților de învățare și memorie la șobolani albi sub influența consumului pe termen lung de biomasă a tulpinilor *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 și *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, izolate din solul din partea centrală a Republicii Moldova.

Obiectivele cercetării: Studiul proprietăților de biosinteză a tulpinilor *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 și *S. fradiae* CNMN-Ac-11, cultivate pe medii cu diferite compoziții pentru a obține biomasă, ipotetic având cel mai mare impact asupra învățării și memoriei; studiul particularităților dinamicii masei corporale, fertilității șobolanilor albi și dezvoltării puilor de șobolan sub influența biomasei de streptomicete; studiul particularităților de învățare și memorie ale șobolanilor albi în condițiile consumului pe termen lung a biomasei tulpinilor *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 și *S. fradiae* CNMN-Ac-11, cultivate pe mediul nutritiv complex SP-I, precum și pe mediul SP-I cu adăugarea acidului para-aminobenzoic (PABA).

Noutatea și originalitatea științifică: Pentru prima dată, a fost dezvăluit efectul stimulator al biomasei de streptomicete asupra procesului de învățare spațială și memorie a șobolanilor albi în labirintul radial cu opt brațe și în labirintul cu apă Morris. Pentru prima dată, s-a depistat, că adăugarea acidului PABA la mediul nutritiv îmbunătățește semnificativ efectul stimulator al biomasei asupra învățării reflector-condiționate și spațiale și a memoriei. Au fost obținute date noi cu referire la particularitățile influenței biomasei streptomicetelor în raport cu învățarea reflector-condiționată și memoria la șobolani de diferite vârste. Au fost obținute date noi, privind efectul stimulator al biomasei de streptomicete cultivate pe mediu nutritiv cu adaos de PABA în raport cu masa corporală și fertilitatea, care sunt brevetate. A fost propus un mediu nou nutritiv pentru cultivarea tulpinii *S. massasporeus* CNMN-Ac-06, care îmbunătățește proprietățile ei biosintetice, a cărui elaborare a fost finalizată prin brevetare.

Problema științifică soluționată: consta de obținerea de noi cunoștințe argumentate științific despre particularitățile învățării și memoriei reflector-condiționate și spațiale la șobolanii albi în condițiile consumului de biomasă a tulpinilor autohtone de streptomicete ca aditiv alimentar, folosind un complex de metode fiziologice (comportamentale), biochimice și microbiologice, ceea ce a condus la stabilirea efectului stimulator semnificativ al biomasei asupra proceselor cognitive studiate și a permis demonstrarea perspicacității tulpinilor *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 și *S. fradiae* CNMN-Ac-11 în scopul izolării și identificării substanțelor biologic active cu proprietăți neuroprotectoare și nootrope, precum și de a propune un mediu nutritiv nou pentru cultivarea streptomicetelor cu adaos de PABA, utilizarea căruia permite creșterea eficienții biomasei asupra proceselor de învăţare şi memorie.

Rezultatele fundamentale noi pentru știință și practică: în baza metodelor moderne fiziologice (comportamentale), microbiologice și biochimice, s-au obținut rezultate principial noi, privind impactul biomasei de streptomicete asupra proceselor de învățare și memorie, care pot fi utilizate în obținerea substanțelor cu efect nootrop și neuroprotector.

Semnificația teoretică: Rezultatele obținute extind și aprofundează abordările științifice ale particularităților proceselor învățării reflector-condiționate și spațiale și ale memoriei sub influența substanțelor biologic active de origine microbiană cu proprietăți neuroprotectoare și neurostimulatoare.

Valoarea aplicativă: Rezultatele obținute demonstrează perspectiva cercetărilor ulterioare asupra tulpinilor *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 și *S. fradiae* CNMN-Ac-11 cu scopul de a izola și identifica substanțe biologic active cu proprietăți neuroprotectoare și nootrope. A fost obținut un nou mediu nutritiv prin cultivarea tulpinii de *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 cu adaos de PABA, au fost îmbunătățite proprietățile sale biosintetice și efectul stimulator asupra proceselor de învățare și memorie. Rezultatele obținute demonstrează posibilitatea obținerii preparatelor în baza biomasei tulpinilor locale de streptomicete în zootehnie pentru a stimula creșterea în greutate și fertilitatea animalelor.

Implementarea rezultatelor științifice: rezultatele sunt implementate în procesul didactic al Facultății de Geografie și Științe Naturale a Universității de Stat din Tiraspol „T.G. Șevcenco". Au fost primite 2 brevete, 4 medalii la expoziții internaționale de inovație.

ANNOTATION

Garbuzneac Anastasia "Learning and memory of rats when consumpting streptomycetes biomass", PhD thesis in biological sciences, Chisinau, 2024.

Thesis structure: The dissertation is presented on 125 pages, consists of an introduction, 6 chapters, general conclusions and recommendations, contains 5 tables, 48 figures, a bibliography of 192 titles, 5 appendices. The results obtained were presented in 23 scientific papers and 2 patents.

Keywords: white rats, conditioned reflex and spatial learning, working and long-term memory, streptomycetes, biomass, para-aminobenzoic acid, amino acids, lipids.

Purpose: Studying the characteristics of learning and memory of white rats under the influence of long-term consumption of biomass of the strains *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 and *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, isolated from the soil of the central part of the Republic of Moldova.

Objectives: To study the biosynthetic properties of the strains *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 and *S. fradiae* CNMN-Ac-11, cultivated on media of different compositions to obtain biomass, presumably having the greatest effect on learning and memory; to study the characteristics of the dynamics of body weight, fertility of white rats and the development of rat pups under the influence of streptomycete biomass; to study the features of learning and memory of white rats under conditions of long-term consumption of biomass of the strains *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 and *S. fradiae* CNMN-Ac-11, cultivated on a complex nutrient medium SP-I, as well as on SP-I medium with the addition of para-aminobenzoic acid (PABA).

Scientific novelty and originality: The stimulating effect of streptomycete biomass on spatial learning and memory processes in white rats was revealed for the first time using an eight-arm radial maze and a Morris water maze. For the first time, it was discovered that the addition of PABA to the nutrient medium significantly enhances the stimulating effect of biomass on conditioned reflex and spatial learning and memory. New data have been obtained on the peculiarities of the influence of streptomycete biomass in relation to conditioned reflex learning and memory in rats of different ages. New data have been obtained on the stimulating effect of the biomass of streptomycetes cultivated on a nutrient medium with the addition of PABA in relation to body weight and fertility, which are patented. A novel nutrient medium for cultivating the strain *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 has been proposed, improving its biosynthetic properties, the development of which has been completed by patenting.

The solved scientific problem: new scientific knowledge about the characteristics of conditioned reflex and spatial learning and memory in white rats when they consume biomass of local strains of streptomycetes as a dietary supplement was obtained, using a complex of physiological (behavioural), biochemical and microbiological methods, which led to the establishment of a significant stimulating effect of biomass on the studied cognitive processes and made it possible to demonstrate the promise of the strains *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 and *S. fradiae* CNMN-Ac-11 in order to obtain new biologically active substances with neuroprotective and nootropic properties, as well as propose a new nutrient medium for the cultivation of streptomycetes with the addition of PABA, the use of which can increase the efficiency of biomass on learning and memory processes.

Main results: Based on modern physiological (behavioral), microbiological and biochemical methods, fundamentally new results were obtained on the effect of streptomycete biomass on learning and memory processes, which can be used in the production of substances with nootropic and neuroprotective effects.

Theoretical significance: The results obtained expand and deepen scientific understanding of the peculiarities of the processes of conditioned reflex and spatial learning and memory under the influence of biologically active substances of microbial origin with neuroprotective and neurostimulating properties.

Applicative value: The results obtained demonstrate the promise of further research on the strains *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 and *S. fradiae* CNMN-Ac-11 with the aim of isolating and identifying biologically active substances with neuroprotective and nootropic properties. A new nutrient medium was obtained by cultivating the *S. massasporeus* strain CNMN-Ac-06 with the addition of PABA, its biosynthetic properties and stimulating effect on learning and memory processes were improved. The results obtained demonstrate the possibility of obtaining drugs based on the biomass of local strains of streptomycetes in animal husbandry to stimulate weight gain and fertility.

Implementation of scientific results: The results were introduced into the educational process of the Faculty of Geography and Natural Sciences of T.G. Shevchenko Tiraspol State University. 2 patents and 4 medals at international innovation exhibitions were received.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АК - аминокислота;
АСБ - абсолютно сухая биомасса;
БАВ - биологически активные вещества;
ВЛМ - водный лабиринт Морриса;
ВМ - биомасса;
ВРЛ - восьмирукавный радиальный лабиринт;
ГАМК - гамма-аминомасляная кислота;
ДП - долговременная потенциация;
ДФЗ - длительность фазы задержки;
ЛП - латентный период;
ЛПРИ - латентный период реакции избегания;
ОБПП - общий балл пространственной памяти;
ПАБК - парааминобензойная кислота;
ПОЛ - перекисное окисление липидов;
ПП - пройденный путь;
СБПП - средний балл пространственной памяти;
СТ - стерины;
ТГ - триглицериды;
УР - условный рефлекс;
УРАИ - условная реакция активного избегания;
ФЛ - фосфолипиды.

СПИСОК ТАБЛИЦ

Табл. 3.1. Образование биомассы и общих липидов у штаммов *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 и *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 после хранения периодическими пересевами при культивировании на комплексных средах (стр. 77)

Табл. 3.2. Накопление биомассы и липидов штаммом *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 при культивировании на комплексной среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты (стр. 83)

Табл. 3.3. Содержание аминокислот в биомассе при культивировании штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-06 на среде SP-I, с добавлением парааминобензойной кислоты (стр. 90)

Табл. 3.4. Суммарное содержание аминокислот в биомассе штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивируемого на комплексной среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты (стр. 91)

Табл. 4.1. Показатели репродуктивной функции белых крыс и развития крысят при потреблении биомассы штаммов *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 и *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на комплексной среде с парааминобензойной кислотой (стр. 102)

СПИСОК РИСУНКОВ

Рис. 2.1. Дизайн исследования (стр. 59)

Рис. 2.2. Камера для исследования условно-рефлекторного обучения и памяти с аверсивным подкреплением (челночная камера) (стр. 67)

Рис. 2.3. Установка для исследования пространственного обучения и памяти с пищевым подкреплением (восьмирукавный радиальный лабиринт) (стр. 70)

Рис. 2.4. Процедура тестирования в восьмирукавном радиальном лабиринте: фазы обучения и тестирования, разделенных «задержкой» продолжительностью 30 секунд или 10 минут (стр. 70)

Рис. 2.5. Установка для исследования пространственного обучения и памяти без подкрепления (водный лабиринт Морриса) (стр. 74)

Рис. 3.1. Количество основных липидных фракций биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 при культивировании на разных средах (стр. 78)

Рис. 3.2. Количество вторичных липидных фракций биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 при культивировании на комплексных средах (стр. 79)

Рис. 3.3. Количество основных липидных фракций биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 при культивировании на разных средах (стр. 80)

Рис. 3.4. Количество вторичных липидных фракций биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 при культивировании на комплексных средах (стр. 81)

Рис. 3.5. Количество основных липидных фракций биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 после культивирования на комплексной среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (стр. 84)

Рис. 3.6. Количество вторичных липидных фракций биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 после культивирования на комплексной среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (стр. 85)

Рис. 4.1. Динамика привесов самцов белых крыс под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 и *Streptomyces massasporeus* CNMN-06, культивированного на комплексной среде с 4-аминобензоной кислотой в обычных физиологических условиях (стр. 96)

Рис. 4.2. Динамика привесов самок белых крыс под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 и *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, выращенного на питательной среде с 4-аминобензоной кислотой в обычных физиологичексих условиях (стр. 98)

Рис.4.3. Динамика привесов самцов белых крыс при потреблении биомассы штаммов *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 и *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей парааминобензойную кислоту, в условиях теплового стресса (стр. 100)

Рис. 5.1. Динамика условно-рефлекторного обучения с аверсивным подкреплением у молодых крыс при длительном потреблении биомассы *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2) (стр. 107)

Рис. 5.2. Динамика условно-рефлекторного обучения с аверсивным подкреплением у старых крыс при длительном потреблении биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2) (стр. 108)

Рис. 5.3. Динамика латентного периода активного избегания у молодых крыс в течение 45 суток после выработки условных реакций активного избегания при длительном потреблении биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2) (стр. 110)

Рис. 5.4. Динамика латентного периода реакции избегания у старых крыс в течение 45 суток после выработки условных реакций активного избегания при длительном потреблении биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2) (стр. 111)

Рис. 5.5. Динамика среднего балла пространственной памяти крыс-самцов в восьмирукавном радиальном лабиринте с задержкой на 30 с под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2) (стр.114)

Рис. 5.6. Динамика среднего балла пространственной памяти крыс-самцов в восьмирукавном радиальном лабиринте с задержкой на 10 мин под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2) (стр. 114)

Рис. 5.7. Динамика среднего балла пространственной памяти крыс-самок в восьмирукавном радиальном лабиринте с задержкой 30 с под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2) (стр. 116)

Рис. 5.8. Динамика среднего балла пространственной памяти крыс-самок в восьмирукавном радиальном лабиринте с задержкой 10 мин под влиянием

биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2) (стр. 116)

Рис. 5.9. Общий балл пространственной памяти крыс-самцов в восьмирукавном радиальном лабиринте под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2) (стр. 118)

Рис. 5.10. Общий балл пространственной памяти крыс-самок в восьмирукавном радиальном лабиринте под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2) (стр. 119)

Рис. 5.11. Динамика среднего балла долговременной памяти в восьмирукавном радиальном лабиринте у белых крыс-самцов под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2) на 30 день эксперимента (стр. 120)

Рис. 5.12. Динамика среднего балла долговременной памяти в восьмирукавном радиальном лабиринте у белых крыс-самок под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2) на 30 день эксперимента (стр. 120)

Рис. 5.13. Динамика продолжительности латентного периода в процессе обучения крыс-самцов в водном лабиринте Морриса под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2) (стр. 123)

Рис. 5.14. Динамика пройденного пути до платформы в процессе обучения крыс-самцов в водном лабиринте Морриса под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2) (стр. 123)

Рис. 5.15. Продолжительность пребывания крыс-самцов в секторах водного лабиринта Морриса на 1-й день обучения (А), на 4-й день (Б) и после обучения на 5-й день тестирования (С) под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2) (стр. 125)

Рис. 5.16. Продолжительность пребывания крыс-самцов в секторах водного лабиринта Морриса на 9-й день тестирования под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2) (стр. 126)

Рис. 5.17. Продолжительность пребывания в секторах водного лабиринта Морриса крыс-самцов на 30-й день тестирования под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2) (стр. 127)

Рис. 6.1. Динамика условно-рефлекторного обучения с аверсивным подкреплением у самцов при длительном потреблении биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, выращенного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (стр. 132)

Рис. 6.2. Динамика условно-рефлекторного обучения с аверсивным подкреплением у самок при длительном потреблении биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, выращенного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (стр. 133)

Рис. 6.3. Динамика латентного периода активного избегания у самцов в течение 45 суток после выработки условных реакций активного избегания при длительном потреблении биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, выращенного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (стр. 134)

Рис. 6.4. Динамика латентного периода активного избегания у самок в течение 45 суток после выработки условных реакций активного избегания при длительном потреблении биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, полученной на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (стр. 135)

Рис. 6.5. Динамика среднего балла пространственной памяти крыс-самцов в восьмирукавном радиальном лабиринте с задержкой на 30 с под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1), полученного при культивировании на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1 и BM1PABA2) (стр. 137)

Рис. 6.6. Динамика среднего балла пространственной памяти крыс-самцов в восьмирукавном радиальном лабиринте с задержкой на 10 мин под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1), культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1 и BM1PABA2) (стр. 137)

Рис. 6.7 Динамика среднего балла пространственной памяти крыс-самок в восьмирукавном радиальном лабиринте с задержкой на 30 с под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1),

культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1и BM1PABA2) (стр. 138)

Рис. 6.8. Динамика среднего балла пространственной памяти крыс-самок в восьмирукавном радиальном лабиринте с задержкой на 10 мин под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1), культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1 и BM1PABA2) (стр. 138)

Рис. 6.9. Общий балл пространственной памяти крыс-самцов в восьмирукавном радиальном лабиринте под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1), культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1 и BM1PABA2) (стр. 139)

Рис. 6.10. Общий балл пространственной памяти крыс-самок в восьмирукавном радиальном лабиринте под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1), полученного при культивировании на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1 и BM1PABA2) (стр. 140)

Рис. 6.11. Средний балл долговременной памяти в восьмирукавном радиальном лабиринте у белых крыс-самцов под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1), культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1 и BM1PABA2 на 30 день эксперимента (стр. 141)

Рис. 6.12. Средний балл долговременной памяти в восьмирукавном радиальном лабиринте у белых крыс-самок под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1), культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1 и BM1PABA2) на 30 день эксперимента (стр. 141)

Рис. 6.13. Динамика продолжительности латентного периода у крыс-самцов в водном лабиринте под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1), культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1 и BM1PABA2) (стр. 144)

Рис. 6.14. Динамика пройденного пути до платформы крыс-самцов в водном лабиринте Морриса под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1), культивированного на среде SP-I с

добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1 и BM1PABA2) (стр. 145)

Рис. 6.15. Продолжительность пребывания в секторах водного лабиринта Морриса крыс-самцов на 1-й день обучения (А), на 4-й день (Б) и после обучения на 5-й день тестирования (С) под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (стр. 146)

Рис. 6.16. Продолжительность пребывания в секторах водного лабиринта Морриса крыс-самцов на 9-й день тестирования под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-06, культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (стр. 147)

Рис. 6.17. Продолжительность пребывания в секторах водного лабиринта Морриса крыс-самцов на 30-й день тестирования под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (стр. 148)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и значимость исследования

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 – это сложный процесс формирования нового поведения, и его всестороннее изучение является важным для понимания механизмов функционирования нервной системы. Нейрологическая память является жизненно важным процессом, обеспечивающим приспособление живого организма ко внешней среде, адаптивные изменения в поведении, в работе нервных сетей, в молекулярной субклеточной структуре. Обучение и память тесно связаны между собой, имея фундаментальное значение для живого организма [85, 120].

В соответствии с концепцией о психическом здоровье, процессы научения рассматриваются как процессы формирования психофункциональных и оценочно-исполнительных систем [52, 54]. Согласно концепции о саногенной памяти, память - это психический процесс адекватного отражения реальности через запоминание (запечатление, закрепление), хранение (сохранение, обеспечение), распознавание и последующее воспроизведение объективной информации, ощущений, эмоций, движений, знаний предыдущего опыта, детерминирующее креативную и саногенную жизнедеятельность, объективный анализ и интерпретацию событий, феноменов, организацию рациональной повседневной деятельности, ориентацию во времени, пространстве, субъективном и объективном мире в соответствии с реальной ситуацией [58].

Выяснение причин преждевременного старения мозга, сопровождающееся нарушением когнитивных процессов, в том числе, памяти и поиск способов его профилактики приобрели в настоящее время особую актуальность. Неполноценное питание, стрессы, неблагоприятные воздействия окружающей среды, заболевания, активирующие свободно-радикальные процессы, способствуют раннему старению организма. В результате данных процессов человечество стало гораздо больше сталкиваться с патологиями, которые сопровождаются нейродегенеративными процессами, такими как болезни Альцгеймера, Паркинсона и др. [81, 165, 188], они быстро прогрессируют, особенно в развитых странах [192], и одними из наиболее важных причин увеличения распространённости когнитивных нейропсихических нарушений, является хронический психогенный стресс, стрессогенный образ жизни, резкие изменения условий жизнедеятельности современного человека [53, 54].

Одним из перспективных направлений профилактики и коррекции когнитивной патологии на начальных стадиях нейродегенеративных заболеваний, представляется

комплексное применение нейропротекторов, имеющих разные мишени, или препаратов, сочетающих ноотропную активность с нейропротективными свойствами. В этой связи, 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 [81, 143]. Санокреатологические подходы к повышению саногенности организма и предотвращению ранней деградации функций, в том числе, психических, включают и получение саногенных веществ природного происхождения [53].

В последние годы получены данные, свидетельствующие о влиянии метаболитов биомассы определенных штаммов стрептомицетов и их компонентов на способность предотвращать нейродегенерацию, спровоцированную окислительным стрессом [107, 169], показано их значение как мощных нейропротекторных веществ в условиях индукции липидной пероксидации. Более того, некоторые из метаболитов стрептомицетов, обладают способностью стимулировать нейритогенез, оказывая влияние на ультраструктурную организацию различных нейрональных образований головного мозга [151, 170], и дифференцировку нейральных стволовых клеток [71]. В настоящее время известен ряд вторичных метаболитов, синтезируемых штаммами стрептомицетов, обладающих значительными антиоксидантными свойствами [81, 107, 169]. Несмотря на увеличивающееся число сообщений о воздействии продуктов жизнедеятельности стрептомицетов на нейрональные процессы, их влияние на поведение животных еще очень мало исследовано. Ранее было обнаружено, что длительное потребление белыми крысами обоих полов культуральной жидкости и, особенно, биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выделенных из почв центральной части Республики Молдова, облегчает выработку оборонительных условных рефлексов и способствует увеличению скорости целенаправленных двигательных реакций [59, 60, 168]. При изучении воздействия вторичных метаболитов *Streptomyces avermectilis* и *Streptomyces lincolniensis* авермектинов дорамектина и ивермектина на поведенческие реакции белых крыс был выявлен, в частности, их анксиолитический эффект. С использованием методик «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт», а также «Конфликтное поведение» было обнаружено, что в терапевтических дозах вторичные метаболиты стрептомицетов снижают уровень тревожности и стресса, защищают крыс от судорожных эффектов пентилентетразола и пикротоксина [173, 174].

Исследование когнитивных процессов животных с помощью чувствительных, надежных нейроповеденческих тестов является особенно важным источником информации об их изменениях, происходящих под влиянием пищевых или фармакологических

препаратов, и обладает неоспоримым преимуществом по сравнению с моделями *in vitro*, позволяет точно оценить их способность к обучению, восприятию пространства, сохранность следа памяти, выявить наличие нарушений деятельности определенных отделов мозга [103, 154].

Исходя из литературных данных, можно обоснованно предположить наличие в биомассе стрептомицетов вторичных метаболитов, способных стимулировать и поддерживать нейрональные процессы, лежащие в основе обучения и памяти. В частности, одними из таких метаболитов являются бензастатины, которые демонстрируют мощную антиоксидантную и нейропротекторную активность [128]. В связи с этим было принято решение использовать при культивировании стрептомицетов на питательной среде парааминобензойную кислоту, которая является исходным материалом для синтеза бензастатинов - алкалоидов различных групп, ряд которых являются одними из наиболее распространенных и мощных антиоксидантов с нейропротекторными свойствами [65, 129].

Цель исследования состоит в изучении особенностей обучения и памяти белых крыс в условиях длительного потребления биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выделенных из почв центральной части Республики Молдова.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Изучить биосинтетические свойства штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированных на средах разного состава, для получения биомассы, предположительно, оказывающей наибольшее влияние на обучение и память;
2. Исследовать особенности динамики массы тела, плодовитости белых крыс и развития крысят под действием биомассы стрептомицетов;
3. Изучить особенности обучения и памяти белых крыс в условиях длительного потребления биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированных на комплексной питательной среде SP-I;
4. Исследовать особенности обучения и памяти белых крыс под действием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, выращенного на среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты.

Гипотеза исследования: стимуляция процессов условно-рефлекторного и пространственного обучения, активация рабочей памяти и увеличение длительности хранения следов памяти у белых крыс возможна путем потребления биомассы местных штаммов стрептомицетов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, а добавление в питательную среду для культивирования стрептомицетов

парааминобензойной кислоты может привести к усилению эффективности биомассы в отношении процессов обучения и памяти.

Новизна исследования: Впервые выявлено стимулирующее влияние биомассы стрептомицетов на процесс пространственного обучения и памяти белых крыс в восьмирукавном радиальном лабиринте и водном лабиринте Морриса. Впервые обнаружено, что добавление в питательную среду ПАБК существенно усиливает стимулирующий эффект биомассы в отношении условно-рефлекторного и пространственного обучения и памяти. Получены новые данные об особенностях влияния биомассы стрептомицетов в отношении условно-рефлекторного обучения и памяти у крыс разного возраста, свидетельствующие о ее нейропротекторном эффекте. Получены новые данные о стимулирующем влиянии биомассы стрептомицетов, культивированных на питательной среде с добавлением ПАБК, в отношении массы тела и плодовитости, которые запатентованы. Предложена новая питательная среда для культивирования штамма *S. massasporeus* CNMN-Ac-06, улучшающая его биосинтетические свойства, разработка которой завершена патентованием.

Решенная научная проблема в диссертации: состоит в получении новых научно обоснованных знаний об особенностях условно-рефлекторного и пространственного обучения и памяти у белых крыс в условиях потребления ими в качестве пищевой добавки биомассы местных штаммов стрептомицетов с применением комплекса физиологических (поведенческих), биохимических и микробиологических методов, что привело к установлению существенного стимулирующего влияния биомассы на исследуемые когнитивные процессы и позволило продемонстрировать перспективность штаммов *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 и *S. fradiae* CNMN-Ac-11 для получения новых биологически активных веществ с нейропротекторными и ноотропными свойствами, а также предложить новую питательную среду для культивирования стрептомицетов с добавлением ПАБК, применение которой позволяет повысить эффективность биомассы в отношении процессов обучения и памяти.

Полученные принципиально новые результаты для науки и практики: на основе современных физиологических (поведенческих), микробиологических и биохимических методов получены принципиально новые результаты о влиянии биомассы стрептомицетов на процессы обучения и памяти белых крыс, а также о предположительном наличии в биомассе стрептомицетов вторичных метаболитов с выраженными нейропротекторными и антиоксидантными свойствами.

Теоретическое значение: Полученные результаты расширяют и углубляют научные представления об особенностях процессов условно-рефлекторного и пространственного

обучения и памяти под влиянием биологически активных веществ микробного происхождения с нейропротекторными и нейростимулирующими свойствами.

Прикладная значимость: Полученные результаты демонстрируют перспективность дальнейших исследований штаммов *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 и *S. fradiae* CNMN-Ac-11 для выделения и идентификации биологически активных веществ с нейропротекторными и ноотропными свойствами. Получена новая питательная среда для культивирования штамма *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 с добавлением ПАБК, с помощью которой улучшены его биосинтетические свойства, усилен стимулирующий эффект биомассы на процессы обучения и памяти. Полученные результаты демонстрируют возможность получения на основе биомассы местных штаммов стрептомицетов новых препаратов с целью стимуляции привесов и плодовитости сельскохозяйственных животных.

Внедрение научных результатов: Результаты внедрены в учебный процесс естественного-географического факультета ПГУ им. Т.Г. Шевченко. Получены 2 патента, 4 медали на международных выставках инноваций.

Апробация работы: Материалы диссертации представлены на следующих международных конференциях: 24-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2020); Conferința ştiinţifica Microbial Biotechnology (Chișinău, 2022). Конференции с международным участием: Conferinţa ştiinţifico-practică cu participare internațională „Instruire prin cercetare pentru o societate prosperă” (Chişinău, 2021); Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community (Chişinău, 2022, 2023). Республиканские конференции: Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători (Chişinău, 2019, 2020); Metodologii contemporane de cercetare şi evaluare: Ştiinţe biologice şi chimice, Ştiinţe fizice şi matematice, Ştiinţe economice (Chişinău, 2021); Conferinţa Ştiinţifică Naţională, consacrată jubileului de 95 ani din ziua naşterii academicianului Boris Melnic (Chişinău, 2023). Материалы диссертации были апробированы на Международных выставках инноваций: European exibition of creativity and innovation „Euroinvent” (Iaşi, 2023); The 27rd internaţional exhibition of inventics „INVENTICA” (Iaşi, 2023); Salonul Internațional de Invenții și Inovații „TRAIAN VUIA” (Timişoara, 2023); Salonul Internațional al Cercetării științifice, Inovării și Invenții (Cluj-Napoca, 2023), на которых получены 4 Медали.

Личный вклад автора. Диссертационная работа основана на материалах исследований обучения и памяти белых крыс под влиянием биомассы стрептомицетов, выполненных автором за период 2018-2023 гг., автором сформулирована научная проблема,

поставлены цель и задачи, проанализированы результаты исследований, сформулированы общие выводы и практические рекомендации.

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликованы 23 научные работы (в том числе, 3 без соавторов): статьи в научных журналах из базы данных Web of Science, SCOPUS – 3, статьи в научных журналах из Национального Реестра профильных журналов – 1, публикации в материалах международных научных конференций – 10, в материалах национальных научных конференций с международным участием – 3, статьи в материалах национальных научных конференций – 4, патенты – 2.

Объем и структура работы. Диссертация представлена на 125 страницах основного текста, который включает: аннотацию (на русском, румынском и английском языках), введение, 6 глав, общие выводы, практические рекомендации, 5 приложений. Работа содержит 5 таблиц, 47 рисунков и список литературы, включающий 192 наименований.

Ключевые слова: белые крысы, условно-рефлекторное и пространственное обучение, рабочая и долговременная память, стрептомицеты, биомасса, парааминобензойная кислота, аминокислоты, липиды.

Краткое изложение разделов диссертации

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель, задачи и защищаемые положения исследования, отмечена научная новизна, указана теоретическая и практическая значимость работы.

В главе 1 проведен анализ научных публикаций и синтез накопленных знаний в области исследования нейрохимических и молекулярных механизмов различных видов памяти с нейрофизиологической точки зрения; влияние метаболитов стрептомицетов на нейрональные процессы, лежащие в основе обучения и памяти.

В главе 2 приводится описание объекта исследования, экспериментальных методов (методы оценки массы тела, плодовитости, методы обучения и выработки следа условно-рефлекторной и пространственной памяти, восьмирукавный радиальный лабиринт, водный лабиринт Морриса, методы определения количества биомассы, качественного и количественного липидного и аминокислотного состава биомассы стрептомицетов).

В главе 3 представлены результаты исследований биосинтетических свойств (образование биомассы, липидов, аминокислот) штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11. Продемонстрирована возможность применения парааминобензойной кислоты в качестве дополнительного компонента к основной питательной среде для увеличения количественного выхода биомассы, изменения качественного и количественного состава липидов, аминокислот в биомассе штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06.

Глава 4 посвящена особенностям динамики массы тела, плодовитости белых крыс и развития крысят под действием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11.

Глава 5 посвящена результатам исследования условно-рефлекторного обучения и памяти экспериментальных животных различного возраста в условиях длительного потребления биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированных на комплексной питательной среде SP-I. Описаны результаты исследования процессов пространственного обучения и памяти белых крыс разных полов в восьмирукавном радиальном лабиринте и водном лабиринте Морриса под влиянием биомассы стрептомицетов, выращенных на комплексной питательной среде SP-I.

В главе 6 представлены результаты влияния на процессы условно-рефлекторного и пространственного обучения и памяти белых крыс биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде с добавлением парааминобензойной кислоты.

В общих выводах и рекомендациях представлены основные результаты, полученные в процессе проведенных исследований, и даны практические рекомендации о возможности получения на основе штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 новых эффективных препаратов с выраженными нейропротекторными и ноотропными свойствами, а также препаратов для увеличения привеса массы тела и плодовитости сельскохозяйственных животных.

1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕХАНИЗМАХ НЕЙРОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ, БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВАХ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ СТРЕПТОМИЦЕТАМИ, И ИХ ВЛИЯНИИ НА ПРОЦЕССЫ ОБУЧЕНИЯ И ПАМЯТИ

1.1. Современные представления о механизмах памяти и обучении

Исследование процессов обучения и памяти на различных уровнях организации, несмотря на свою многолетнюю историю, остается одним из важнейших как нейрофизиологии, так и фундаментальной науки в целом. Нейрологическая память является жизненно важным процессом, обеспечивающим приспособление живого организма ко внешней среде, адаптивные изменения в поведении, в работе нервных сетей, в молекулярной субклеточной структуре. Обучение и память тесно связаны между собой, имея фундаментальное значение для живого организма [108, 136, 137, 189].

Несмотря на большое количество экспериментального материала, постоянное совершенствование различной экспериментальной техники, остается много невыясненных вопросов при создание учеными единой теории, которая объяснила бы все аспекты этого сложного явления [36, 73, 74, 102, 107]. Животные способны приспосабливаться к тем факторам, с которыми они сталкиваются в течение своей жизни. Реакция организма животного на обстоятельства при их повторном проявлении часто оказывается абсолютно другой, чем та, которая бывает при первом столкновении с ними [36, 37, 71].

Рост вероятности раннего развития нейродегенеративных заболеваний, снижение функциональных возможностей мозга – это неизбежные проявления старения, масштабы которых значительно отличаются. Нейродегенеративные заболевания характеризуются прогрессирующей потерей структуры или функции нейронов. Старение сопровождается множеством изменений в мозге и способствует прогрессирующему снижению когнитивных функций, что связано с анатомическими и функциональными нарушениями, которые могут привести к нейродегенеративным заболеваниям. Выяснение причин раннего старения мозга, поиск новых способов профилактики приобрели актуальность в связи с прогрессивным старением человечества развитых стран. Сочетание генов человека и окружающей среды способствует высокому риску развития нейродегенеративных заболеваний. А также неблагоприятные воздействия окружающей среды, стрессы, неполноценное питание, заболевания, активирующие свободно-радикальные процессы – способствуют раннему старению организма. Поэтому население стало в большей степени сталкиваться с различными нейродегенеративными заболеваниями (лобно-височная деменция, болезни Альцгеймера, Паркинсона и многими др.) [71, 102, 155, 188].

Нейродегенеративные заболевания поражают миллионы людей во всем мире. В 2023 году число посещений врача общей практики по поводу проблем с памятью и концентрацией среди взрослых (в возрасте 25 лет и старше) увеличилось на 24% по сравнению с тем же периодом 2020 года. На сегодняшний день 60% людей с данной патологией живут в странах с низким и средним уровнем дохода, но к 2050 году этот показатель возрастет до 71%. Число лиц с данной патологией будет почти удваиваться каждые 20 лет, достигнув 78 млн к 2030 году и 139 млн к 2050 году [155, 164, 188].

Обучение и память — тесно связанные понятия, имеющие фундаментальное значение для человечества, являются важнейшими приобретенными механизмами, которые повышают адаптацию организма к постоянно меняющимся условиям окружающей среды. И обучение, и память — это сложные функции мозга. Мозг представляет собой сложную сеть нейронов, в которой несколько областей мозга работают вместе во время сложных процессов обучения и формирования памяти. Обучение — это сложный процесс формирования нового поведения. Исследование процессов обучения животных является важным для понимания функционирования нервной системы [37, 85, 109, 110].

Выделяют следующие виды обучения: привыкание — это форма неассоциативного обучения, при которой неподкрепляемая реакция на стимул уменьшается после повторного или длительного предъявления этого стимула; сенситизация (сенсибилизация) – форма безусловного обучения, которая проявляется как усиление реакции на стимул, получивший непосредственную и чаще всего негативную, биологическую значимость. В экспериментах по привыканию обычно обнаруживается, что реакция сначала усиливается, а затем снижается. Это подразумевает то, что первоначальное предъявление стимула приводит к большей сенситизации, чем к привыканию, тогда как последующие предъявления вызывают скорее привыкание, чем сенситизацию. Вторым фактором, влияющим на относительную важность этих двух процессов, является интенсивность или значимость стимула. Слабый стимул или стимул, имеющий небольшое биологическое значение, вызывает относительно быстрое привыкание и незначительную начальную сенситизацию или ее полное отсутствие. Более сильный стимул, особенно такой, как еда или электрический ток, имеющий существенное значение для животного, может проявлять выраженную сенситизацию и относительно небольшое привыкание; классический условный рефлекс (по И.П. Павлову) – безусловная реакция сочетается с ранее нейтральным стимулом, когда он неоднократно предъявляется в тесной связи с безусловным раздражителем. Тем самым нейтральный раздражитель становится условным раздражителем, который, как и безусловный, способен вызвать ответную реакцию; оперантное обучение – связано с вознаграждением или наказанием, и благодаря чему

частота проявления такого поведения либо увеличивается, либо уменьшается; аверсивное обучение – это обучение, в результате которого животное избегает неприятных ощущений (например, ударов электрическим током), используя такие стимулы, как световые и/или звуковые. В поведенческой установке «Челночная камера» экспериментальное животное обучается избегать ударов электрическим током, переходя из одного отсека установки в другой. Также аверсивное обучение можно рассматривать как разновидность оперантного обучения [74]; импринтинг – это форма обучения, при которой формируется ассоциация между стимулом и поведенческой реакцией; пространственное обучение – при данном виде обучения животные должны научиться ориентироваться в окружающей среде и ассоциировать определенные места с определенными предметами или событиями, например, в Т-образном лабиринте животное ищет «призовую» камеру с едой. В водном лабиринте Морриса находит скрытую платформу под водой – это наиболее распространенный метод изучения механизмов пространственного обучения. Этот тип обучения представляет собой классическую систему обучения, в которой задействован гиппокамп [138, 140, 144, 181].

Самой уникальной характеристикой мозга является способность адаптироваться к постоянно меняющейся среде и улучшать свое функционирование путем обучения на основе опыта. Формирование обучения и памяти связано с чрезвычайно интересным явлением нейропластичности. Память и обучение — это важные когнитивные процессы, которые позволяют получать, сохранять и воспроизводить информацию [38, 46, 101, 110].

Различают память наследуемую (генетическую) и ненаследуемую (индивидуальную). Кроме того, выделяют и такие виды памяти, как образная (которая воспроизводит образ жизненно важного объекта, эмоциональную (когда аналогичная ситуация вызывает эмоции, характерные для происходивших ранее в этой ситуации событий), словесно-логическую (она обусловлена развитием речи и свойственна только человеку). По времени сохранения информации различают: рабочую, кратковременную и долговременную память. Специфической формой кратковременной памяти, которая получила значительный интерес, является рабочая память: способность удерживать в памяти информацию, необходимую для выполнения задачи, но не присутствующую в окружающей среде. Рабочая память рассматривается как оперативная составляющая кратковременной памяти. Повторение также является одним из важных механизмов, с помощью которого материал переносится в долговременную память, которая относится к способности удерживать информацию в течение периодов времени, длящихся от нескольких минут до всей жизни. Эта форма памяти, которая также имеет важное значение, не имеет явных ограничений по объему и, как полагают, зависит от более стойких изменений в структуре и связях нейронов,

что поднимает вопрос о том, где в мозге хранятся эти стойкие следы памяти, или «энграммы», как они кодируются для хранения и как они извлекаются из него [36, 37, 66, 71].

Согласно одному из наиболее современных представлений, биологическая память – это способность живых существ воспринимать, закреплять, сохранять и воспроизводить изменения функционального состояния и структуры, вызванные этим воздействием. Различают три формы биологической памяти – генетическая, иммунологическая и нейрологическая [138]. Генетическая память – это память, при которой определенные виды воспоминаний могут передаваться по наследству, присутствуя при рождении в отсутствие какого-либо связанного с ним сенсорного опыта, и такие воспоминания могут быть включены в геном в течение длительного периода времени. Нуклеиновые кислоты обеспечивают стабильность хранения информации и являются носителем генетической памяти. Иммунологическая память – это способность иммунной системы более быстро и эффективно реагировать на ранее встречавшиеся патогены, при которой иммунокомпетентные лимфоциты являются основными участниками иммунного ответа. Иммунологическая память является внутренним свойством иммунной системы. Механизм, управляющий возникновением и сохранением иммунологической памяти, был предметом многих исследований, но до сих пор не был выявлен какой-либо ясный и определенный механизм ее сохранения. Продолжительность иммунологической памяти будет одинаковой для всех антигенов, поскольку она должна поддерживаться посредством очень похожих или почти идентичных клеток памяти. Однако продолжительность иммунологической памяти различна для разных антигенов [90, 146].

Нейрологическая (нервная) память – это память, которая связана с функционированием центральной нервной системы. Нейрологическая память обусловлена различными формами поведения животного, а также она обеспечивает обработку и хранение информации о событиях внешнего мира, которые накапливаются организмом в процессе онтогенеза [120].

В результате исследования нейрологической памяти показано, что в процессе обучения, запоминания и адаптации к различным воздействиям, происходят изменения в клетках центральной нервной системы, которые способны сохраняться в течение некоторого времени, длительность которого может составлять от нескольких секунд и на протяжении всей жизни организма. В процессе обучения и выработки навыков происходят изменения в структуре нейронов и их синаптических окончаний [92, 102]. Некоторые из способов повышения саногенности организма и предотвращения ранней деградации функций, в том числе, психических, представляют собой получение саногенных

веществ природного происхождения, ориентированных на поддержание саногенности [54], в том числе, на основе продуктов метаболизма стрептомицетов.

По современным представлениям в нейробиологии и нейрофизиологии существует множество теорий, которые объясняют различные механизмы функционирования памяти.

Первые исследования физиологических основ памяти связаны с именем Дональда Хебба. Концепция Хебба описывает основной механизм синаптической пластичности, который основан на том, что увеличение синаптической эффективности между двумя нервными клетками происходит в результате их одновременной активации. Таким образом, при выделении медиатора пресинаптическим нейроном, стимулируемый постсинаптический нейрон оказывается уже предварительно активирован другим пресинаптическим нейроном. Данная теория объясняет синаптическую пластичность и адаптацию нейронов головного мозга в процессе обучения и памяти [111].

С тех пор как Хебб предложил свою концепцию синаптической пластичности, многочисленные исследования показали, что функции нейронов и нейронные сети постоянно изменяются в результате обучения и экспериментов. Д. Хебб ввел следующие понятия: кратковременная память – это процесс, обусловленный повторным возбуждением импульсной активности в замкнутых цепях нейронов, не сопровождающийся морфологическими изменениями. В то время как долговременная память основана на структурных изменениях – синапсах. Уникальная пластичность возбуждающих глутаматергических синапсов является важным механизмом формирования памяти. Глутаматергическая синаптическая пластичность и, следовательно, формирование памяти могут модулироваться за счет высвобождения ингибирующего медиатора гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и влияния ацетилхолина, биогенных аминов, высвобождаемых нейронами и глиальными клетками. Это и есть нейрональный механизм хранения и извлечения информации из памяти – как процесса взаимодействия многих нейронов на основе структурных изменений. Многие достижения в области нейропластичности и исследований ассоциативной памяти, а также изучение нейробиологических и физиологических механизмов памяти в значительной степени могут быть связаны с обучением Д. Хебба [111].

Основное внимание в синаптической теории уделяется роли синапса в фиксации следа памяти – при прохождении импульса через определенную группу нейронов возникают стойкие изменения синаптической проводимости. Синапс является важным и хорошо изученным компонентом процессов обучения и памяти, где эти биохимические изменения первоначально проявляются и изменяются в результате внутриклеточных изменений и, следовательно, являются неотъемлемой частью нейробиологии памяти. Память

представлена не изменениями в одном синапсе, а серией процессов, включающих изменения на молекулярном, биохимическом и клеточном уровнях. В частности, когда сильный стимул возникает во внешней среде, он запускает высокочастотные последовательности стимулов в нейронах, которые посредством своей одновременной синаптической активности представляют отдельные элементы внешнего стимула [46, 63].

Нейронные теории памяти связаны с развитием микроэлектродной техники, когда появилась возможность изучения электрофизиологических процессов, которые лежат в основе памяти на уровне нейрона. Метод внутриклеточного отведения электрической активности отдельного нейрона оказался в различных экспериментах более эффективным, с помощью которого возможно было изучать роль синаптических процессов в изменении активности нейрона. Так, например, были установлены нейронные механизмы такой формы обучения, как привыкание. Исследование различных нейронных теорий памяти сопровождается поиском структур, нейроны которых обнаруживают пластические изменения при обучении и памяти. В результате экспериментов такие нейроны находят у лабораторных животных в гиппокампе, ретикулярной формации и других зонах коры головного мозга [38, 118].

Биохимическую теорию о процессах обучения и памяти опубликовали в 1984 году Гэри Линч и Мишель Бодри, которая остается одной из наиболее широко принятых теорий в этой области. Данные исследования направлены на понимание молекулярных механизмов обучения и памяти, а также тех механизмов, которые участвуют в нейродегенеративных процессах, лежащих в основе многочисленных заболеваний мозга. Исследователи предположили, что кальций-зависимая протеаза играет решающую роль в регуляции синаптических свойств и распределении белковых рецепторов (глутамат-рецепторов), тем самым участвуя в процессе формирования памяти в гиппокампе. В результате данного механизма освобождаются ранее неактивные белковые рецепторы, за счет увеличения которых возникает состояние повышенной проводимости синапса. Эта гипотеза была опубликована авторами в журнале Science в 1984 году под названием «Биохимия памяти: новая и специфическая гипотеза». Данные механизмы тесно связаны с увеличением диаметра, усилением активности аксошипикового синапса, который является наиболее пластичным контактом между нейронами. В тоже время образуются новые шипики на дендритах, увеличиваются число и величина синапсов. В результате чего показаны морфологические изменения, которые сопровождают формирование следа памяти [68].

Математическое изучение механизмов памяти все еще остается актуальным. Нейрофизиология и нейронаука внесли большой вклад в понимание того, как функционирует память у животных с нейродегенеративными расстройствами памяти, так и

с точки зрения математического моделирования развития памяти. Существует множество способов математического моделирования памяти. Например, теория математического моделирования применяется при изучении памяти на уровне суммарной биоэлектрической активности мозга. Лебедев А.Н. предлагает следующую концепцию, которая, используя некоторые характеристики основного ритма электроэнцефалограммы, позволяет оценить объем таких видов памяти, как кратковременной и долговременной памяти [36, 37].

Реверберационная теория связана с гипотезой о двух нейронных системах, которые обеспечивают оперативную память. Первая нейронная система включает нейроны «памяти» – работает на реверберационном принципе передачи информации. При этом отдельные группы нейронов памяти вовлекаются друг за другом, представляют своеобразные «нейронные ловушки», возбуждение в которых длится в течение несколько секунд. Вторая нейронная система обеспечивает надежность переходных процессов таких, как переключение информации с «сенсорных» нейронов на «нейроны памяти», далее на нейроны «моторных программ». Такие механизмы памяти позволяют достаточно эффективно запоминать текущую информацию. Но на некоторые вопросы данная реверберационная теория не дает определенных ответов [4].

Нервная система наиболее развитых животных, представляет собой наиболее сложную ступень организации всего живого, которая состоит всего из двух различных типов клеток: нервных клеток (нейронов) и глиальных клеток (нейроглии). Нейроны выполняют специфическую, специализированную деятельность нервной ткани, т. е. прием, обработку и передачу информации от клетки к клетке и, что наиболее важно, хранение информации, служа тем самым хранилищем содержимого памяти. Функции нейроглии, в отличие от функций нейронов, определить столь легко не удается. Действительно, глиальные клетки изолируют, защищают и поддерживают нервные клетки от внешних механических воздействий, также нейроглия выполняет метаболические задачи в сочетании с нервными клетками [118].

Открытие долговременной потенциации (ДП) изменило научные исследования в нейробиологии и нейрофизиологии о процессах обучения и памяти. Связь между открытием ДП и исследованиями в нейробиологии процессов обучения и памяти была взаимной, исследования психологических, анатомических и нейрохимических основ памяти предоставили развивающийся и критический интеллектуальный контекст для физиологического открытия [37]. Долговременная потенциация — определяется как стойкое увеличение синаптической силы, может быть либо зависимым от NMDA-рецептора (N-метил-D-аспартат), либо независимым от NMDA-рецептора. В долговременной потенциации можно выделить, по крайней мере, две стадии хранения:

раннюю, независимую от синтеза белка, кратковременную стадию, продолжающуюся минуты, и более позднюю, долговременную стадию (длится гораздо дольше), которые обеспечиваются разными клеточными и молекулярными механизмами. Синаптическая пластичность обычно регулируется высвобождением различных нейромедиаторов из пресинаптической мембраны и/или изменением плотности, типов и свойств рецепторов нейромедиаторов на постсинаптической мембране. Считается, что NMDA-рецептор, при передаче сигнала в возбуждающих нейронах, таких как пирамидные нейроны гиппокампа, лежит в основе формирования нейрональных цепей во время обучения и памяти [80, 131].

NMDA-рецепторы, активированные одновременным пресинаптическим высвобождением глутамата и постсинаптической деполяризацией, позволяют кальцию проникать в клетку, запуская ряд внутриклеточных сигнальных каскадов, некоторые из которых приводят к транскрипции и трансляции генов, связанных с пластичностью. Быстрая возбуждающая нейротрансмиссия в головном мозге животных преимущественно опосредуется AMPA-рецепторами (α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты) на постсинаптической мембране [131]. Хорошо известно, что AMPA-рецептор в постсинаптических нейронах играет решающую роль в индукции ДП, тогда как доминирующий путь и механизм регуляции AMPA-рецептором остаются спорным вопросом. Также известно, что для экспрессии ДП необходимы высокий и низкий рост внутриклеточной концентрации ионов кальция, опосредованный активацией NMDA - рецептора. При поступлении внутрь пирамидной клетки ионы кальция вызывают изменения, приводящие к значительному увеличению проводимости синапса за счёт усиления активности существующих рецепторов, увеличения количества AMPA-рецепторов и увеличения площади самого синапса [80, 175, 178].

С нейрофизиологической точки зрения память рассматривается как многогранный когнитивный процесс, включающий различные этапы: кодирование, консолидацию, восстановление и реконсолидацию. Кодирование включает получение и обработку информации, которая преобразуется в нейронное представление, пригодное для хранения. Информация может быть получена через различные каналы, такие как визуальные, слуховые, обонятельные и др. Приобретенные сенсорные стимулы преобразуются в формат, который мозг может обработать и сохранить. Различные факторы, такие как внимание, эмоциональная значимость и повторение, могут влиять на процесс кодирования, а также определять значимость долговременной памяти [118, 147].

Исследования показали, что гиппокамп играет важную роль в консолидации памяти. Это было доказано экспериментами, в которых повреждения наносились на гиппокамп крысы в разное время после обучения [89, 95]. С молекулярной и клеточной точки зрения

два вовлеченных белка — это кальций-кальмодулин-зависимая протеинкиназа II и протеинфосфатаза 1. Во время формирования памяти происходит приток Ca^{2+}, после чего кальций-кальмодулин-зависимая протеинкиназа II проходит процесс аутофосфорилирования, превращающий его в активированную киназу. Поскольку протеинфосфатаза 1 оказывает тормозящее влияние на память, он возвращает кальций-кальмодулин-зависимую протеинкиназу II в состояние покоя. Эти противоположные механизмы с участием кальций-кальмодулин-зависимой протеинкиназы II и протеинфосфатазы 1 характеризуют двухуровневую систему, которая на самом деле играет важную роль в формировании памяти. Следовательно, поддерживается баланс между запоминанием и забыванием сохраненных воспоминаний. Однако консолидация кратковременных воспоминаний требует функциональных изменений, после которых должны произойти транскрипция генов и синтез белка [41, 68, 95].

Самой уникальной характеристикой головного мозга является способность адаптироваться к постоянно меняющейся среде и улучшать свое функционирование путем обучения на основе опыта. Формирование обучения и памяти связано с чрезвычайно интересным явлением нейропластичности. В процессе обучения в синапсе происходят структурные изменения, включающие изменение мощности старых синапсов и изменение количества синаптических связей. Синаптические ассоциации, которые используются реже, с течением времени становятся слабее и в конечном итоге погибают. Те, которые используются часто, становятся сильнее с каждым использованием и со временем увеличиваются в количестве. Исследования показывают, что долговременная память может сохраняться за счет метилирования ДНК или прионов [41, 79, 85].

При изучении различных механизмов памяти часто используют феномен пластичности нейронов. Один нейрон или нервная клетка имеют рад функций: может поддерживать потенциал покоя — напряжение на мембране; может запускать нервные импульсы или потенциалы действия; может осуществлять метаболические процессы, необходимые для выживания. Отдельные нейроны устанавливают связи с целевыми нейронами, стимулируют или подавляют их активность, образуя цепи, которые могут обрабатывать поступающую информацию и осуществлять ответ. Действие происходит в синапсе, точке связи между двумя нейронами или между нейроном и клеткой-мишенью. В синапсе срабатывает потенциал действия в одном нейроне — пресинаптическом или постсинаптическом нейроне, который более или менее склонен запустить свой собственный потенциал действия [156]. Благодаря таким изменениям может модифицироваться эффективность и направленность межнейрональных связей, что и будет в большей степени обусловливать процессы, связанные с запоминанием [89].

Модификация синтеза нуклеиновых кислот относится к процессам, которые способны опосредованно влиять на обучение [39, 118]. По литературным данным, среди различных ученых ведутся обсуждения того, что информация хранится в клетках мозга в виде последовательности нуклеотидов во вновь синтезированных нуклеиновых кислотах. В связи с этим ссылались на значительное количество данных различных исследований, которые говорили о том, что в процессе обучения происходит увеличение синтеза некоторых фракций РНК, в том числе таких, состав которых отличается от последовательности нуклеотидов, характерной для РНК необученных животных. Данные исследования объясняются включением, экспрессией участков генома, ответственных за описанный синтез нейроспецифических белков, связанных с процессом обучения [153, 191].

Динамические изменения, связанные с образованием новых синапсов, морфологическими изменениями дендритов, увеличением количества дендритных шипиков и перераспределением синаптических белков, создают удивительную пластичность нервной системы. Исследования интенсивности фосфорилирования ряда белков таких, как хроматина, РНК-полимеразы и рибосом может влиять на синтез некоторых нейроспецифических белков. Наиболее изучены два нейроспецифических белка, так называемый белок 14–3–2, обнаруженный преимущественно в нейронах, и белок S-100, который локализуется в глиальных клетках. Белок S-100, который обогащен глутаминовой кислотой, также присутствует в небольших количествах в ядрах нейронов, и его роль, хотя и не определена окончательно, связана с процессом обучением. Содержание данных белков в головном мозге значительно превышает их количество, которое обнаруживается в любом другом органе. Белок S-100 находится в клетках глии, а также обнаружен в синапсах, что предполагает его участие в формировании связей между нейронами. В то же время показано, что нейроспецифический белок 14-3-2 больше всего содержится в нейронах. Также исследовано, что количество нейроспецифического белка S-100 в нейронах гиппокампа увеличивается примерно через 1 час после обучения, достигает своего максимума через 3-6 ч, и уже через 1-2 дня приходит к исходному уровню. Белки S-100 влияют на когнитивные процессы в здоровом мозге и играют роль в развитии и поддержании нейронов [149].

Доказательством того, что данные нейроспецифические белки принимают активное участие в процессах обучения и памяти, служат экспериментальные данные, которые показывают, что введение антисыворотки к нейроспецифическому белку S-100 в желудочки мозга нарушает процесс обучения у белых крыс. При этом двигательная активность не изменялась в результате эксперимента. Также есть данные о том, что

подавление синтеза нейроспецифического белка в головном мозге ведет к нарушению фазы формирования и консолидации памяти. Поэтому в основе механизмов обучения и памяти лежит синтез определенных нейроспецифических белков, которые могут встраиваться в синаптические мембраны [149].

Большое внимание ряда ученых уделяется роли ганглиозидов в кальций-зависимых синаптических процессах. Ганглиозиды являются важными компонентами мембран нейрональных клеток и играют жизненно важную роль в развитии нейронов и мозга. Они участвуют в нейротрансмиссии и считаются структурной основой обучения и памяти. Ганглиозиды участвуют в нескольких важных физиологических процессах, таких как дифференцировка клеток, передача сигналов клеткам, нейропротекция, регенерация. Стабильность концентрации ионов в возбудимых клетках особенно важна для поддержания устойчивого состояния клеток и регуляции физиологических функций. Было обнаружено, что концентрация ионов связана с регуляцией ганглиозидов при многих неврологических заболеваниях, а некоторые исследования показали, что они могут стабилизировать внутриклеточную концентрацию ионов путем регулирования ионных каналов, что подчеркивает их важную регуляторную роль в возбудимости нейронов и синаптической передаче. Ганглиозиды могут влиять на некоторые формы транспорта ионов путем прямого связывания с переносчиками ионов или путем непрямого связывания и активации транспортных белков через соответствующие сигнальные пути. Таким образом, важная и особая роль ганглиозидов в гомеостазе концентрации ионов становится в этой области, а также теоретической основой использования ганглиозидов в качестве ключевых препаратов для лечения заболеваний нервной системы [61, 155].

В качестве нейростимулятора в различных механизмах нейропластичности, включая долговременную потенциацию (ДП), регуляцию плотности шипиков и синаптическую реорганизацию участвует глутамат. Известно, что глутамат исключительно важен для обучения и памяти, в которых нейропластичность важна для адаптации к стрессовым факторам окружающей среды. Используют при ДП в некоторых структурах ЦНС глутаматные рецепторы NMDA и AMPA для укрепления синаптических связей, необходимых для обучения и памяти. Глутамат – наиболее важный возбуждающий нейротрансмиттер в ЦНС, который играет существенную роль в развитии и функционировании мозга, включая повышение нейропластичности и энергоснабжения, регуляцию обучения и памяти, обеспечение нейронной долговременной потенциации [67].

Однако хронический стресс может привести к нарушению работы глутаматной системы и снижению нейропластичности. В гиппокампе хронический стресс приводит к повышенному высвобождению глутамата, нарушению ДП, атрофии апикальных

дендритов, нарушениям обучения и памяти. В префронтальной коре хронический стресс приводит к снижению выделения глутамата, нарушению ДП, уменьшению дендритных шипиков и нарушению внимания. В миндалевидном теле хронический стресс приводит к снижению высвобождения глутамата, нарушению или усилению ДП, гипертрофии дендритов, увеличению дендритных шипиков и тревожности [68, 106].

Исследования кратковременной памяти предполагает удержание информации в сознании в течение нескольких секунд, в отличие от долговременной памяти, в которой информация хранится от нескольких минут до десятков лет. Кратковременная память — это сохранение ограниченного количества актуальной в данный момент информации. Хотя кратковременная память качественно отличается от долговременной памяти, эти две системы взаимодействуют. Например, чтобы информация могла храниться в долговременной памяти, она сначала должна существовать в кратковременной памяти. Процесс долговременной памяти можно условно разделить на четыре отдельных этапа: обучение, консолидация, хранение и извлечение [130, 141]. За последнее столетие исследователи приложили большие усилия, чтобы понять молекулярные и клеточные механизмы, лежащие в основе формирования памяти. Исследования экспериментальных животных продемонстрировали важную роль гиппокампа в консолидации лабильной кратковременной памяти в более стабильную долговременную память. Считается, что после завершения консолидации, зависящей от гиппокампа, эти воспоминания передаются и сохраняются в коре головного мозга без значительного участия гиппокампа [114, 161].

По литературным данным об исследовании роли синтеза ДНК пришли К. Райнис и соавторы, которые изучили влияние различных ингибиторов на формирование и сохранность памяти у грызунов. Исследования показали, что метилирование ДНК может способствовать формированию и хранению памяти [41, 79, 85].

Изучено влияние синтеза ДНК на развитие пищевого и оборонительного условного рефлекса в мозге крыс. Было показано, что при развитии условного рефлекса происходит резкое увеличение интенсивности синтеза ДНК в неокортексе, а не в мозжечке. Индуцированный синтез ДНК воздействует на последовательности нуклеотидов, повторяющиеся в геноме 10-20 раз. Повторно синтезированная ДНК неокортекса после обучения существенно не отличается от тотальной ДНК по нуклеотидному составу и степени метилирования. Обучение сопровождается повышением активности ДНКаз в мозге крыс. Обсуждаются возможные механизмы и природа индуцированного синтеза, а также его функциональное значение [41, 85, 105].

Сущность концепции об иммунологическом механизме процесса долговременной памяти состоит в том, что она устанавливает связь нейрологической памяти с близкой к ней

системой иммунологической памяти. Также позволяет объяснить многие факты того, что клеткам глии принадлежат разнообразные функции, помимо трофических, защитных и изоляционных, обслуживающих метаболические процессы в нейронах, при этом отношение числа клеток глии к числу нейронов растет по мере филогенетического совершенствования мозга [146, 190].

Системы памяти мозга кодируют информацию, которая позволяет животным адаптировать свое поведение к постоянно изменяющейся окружающей среде. Обучение – это процесс, посредством которого полученный опыт преобразуется в устойчивые изменения в мозге, обеспечивающие поведенческую адаптацию. Энграмма представляет собой множество нейронов, которые активируются под воздействием опыта, подвергаются молекулярным и структурным модификациям для кодирования воспоминаний и необходимы для того, чтобы вызвать поведенческую реакцию при повторной активации. Разработка и применение технологии маркировки энграмм позволили определить функциональные и молекулярные характеристики клеток энграммы, которые способствуют хранению долговременной памяти. Изучение процессов формирования энграмм позволяет различать такие процессы памяти, как обучение, консолидацию (переход от кратковременной памяти к долговременной) и хранение (поддержание памяти в мозге). По современным представлениям, концепция о формировании энграммы говорит о том, что формируется структурный след памяти, совокупность нейронов, участвующих в воспроизведении условного рефлекса, многонейронная система, обеспечивающая сохранение какой-либо информации. Все это необходимо для исследования процессов обучения и памяти. Одним из фундаментальных свойств нервной системы является способность к длительному хранению следов памяти [94, 186, 187].

В настоящее время многие из механизмов формирования памяти считаются расшифрованными [66], на основании чего была предложена схема каскада молекулярных процессов, лежащих в основе консолидации памяти, то есть перехода ее из кратковременной в долговременную форму хранения. Существенность большинства этапов в этом каскаде была доказана с использованием поведенческих моделей с однократным непродолжительным обучением. Вместе с тем, имеются отдельные данные, свидетельствующие о существовании различий в каскаде формирования памяти между однократным и многократным обучениями, а также между разновидностями многократного обучения [187].

Гипотеза о синаптической пластичности и памяти утверждает, что зависимая от активности синаптическая пластичность индуцируется в соответствующих синапсах во время формирования памяти и является одновременно необходимой и достаточной для

кодирования и хранения следов того типа памяти, опосредованного областью мозга, в которой она наблюдается. Синаптическая пластичность обычно относится к любому изменению эффективности синапса. Это базовое описание охватывает ряд различных типов пластичности, каждый из которых имеет разную продолжительность и различные механизмы. Критерии установления необходимости и достаточности такой пластичности в обеспечении хранения следов памяти рассматриваются с использованием некоторых разнообразных методов современной нейробиологии и нейрофизиологии. Данные, полученные с использованием молекулярно-генетических и физиологических методов в сочетании с соответствующим поведенческим анализом, продолжают поддерживать идею о том, что изменение силы связей между нейронами является одним из основных механизмов, с помощью которых энграммы, сформированные в результате обучения сохраняются в головном мозге [101, 130, 182].

Различные виды памяти описываются по динамике развития процессов, которые приводят к формированию энграммы, по состоянию памяти, которое характеризует ее готовность к воспроизведению энграммы, а также описание памяти по виду информации. Данные описания в той или иной степени соответствуют основным гипотезам о механизмах памяти [79].

По современным представлениям различных исследователей, недавно закодированные воспоминания можно временно поддерживать за счет повышенной активности, которая вызвана процессом обучения [63, 79]. Однако эти воспоминания лабильны, очень восприимчивы к вмешательству и быстро разрушаются без дополнительного поддерживания. Преобразование кратковременной памяти в долговременную требует экспрессии генов и синтеза белка *de novo*. Кратковременная память относится к временному хранению (обычно от нескольких секунд до 1–2 минут), тогда как долговременная память относится к постоянному или более стабильному хранению воспоминаний. Эти процессы завершаются увеличением синаптической связи между активными нейронами, взаимодействующими во время обучения – явление, называемое консолидацией [160].

Консолидация памяти — это процесс, посредством которого временная, лабильная память преобразуется в более стабильную и долговременную форму памяти. Соответственно, манипуляции, которые нарушают молекулярные каскады предотвращают консолидацию памяти. Например, благодаря влиянию на синаптическую пластичность подавление активности цАМФ ингибирует консолидацию следов памяти. Аналогично, ингибиторы синтеза белка предотвращают консолидацию воспоминаний, если их вводить вскоре после обучения. По существу, синаптическая консолидация представляет собой

критическую точку расхождения, в которой консолидированные воспоминания выживают и имеют потенциал для восстановления в будущем, в то время как те, которые не предназначены для синаптической консолидации, могут быть потеряны. Наблюдение о важности консолидации заключалось в том, что недавние воспоминания более уязвимы для нейродегенеративных заболеваний, чем отдаленные воспоминания [104].

В результате проведенных исследований [67], показано, что долговременная фиксация следа памяти – энграмма, основана на двухэтапном механизме активации «ранних» и «поздних» генов и продемонстрировано, что этот более длительный чем предполагалось процесс позволяет регулировать память и через часы после ее начального образования.

Установлено, что даже после завершения этого процесса след старой давно сформированной памяти может быть вновь переведен в лабильную форму и сделан чувствительным к направленной фармакологической регуляции. Продемонстрировано, что таким образом можно как усиливать старую слабую память, так и подавлять старые травматические воспоминания. Выдвигается оригинальная гипотеза, что повреждение данного механизма реконсолидации лежит в основе разрушения старой памяти при деменциях, в том числе при болезни Альцгеймера. Поврежденные следы памяти не исчезают целиком, а существуют в латентной форме и могут быть восстановлены с помощью специальных приемов стимуляции нервной системы. На основании данных исследований выдвигается оригинальная концепция консолидации, реконсолидации и регенерации памятного следа, обеспечивающих его динамическую пластичность. Разработан и предлагается новый комплекс нейротехнологий, обеспечивающих генетический захват, мониторинг и направленную регуляцию следов памяти в мозге – энграммные технологии. Их применение открывает новые возможности для биомедицинских исследований и разработки новых терапевтических подходов к заболеваниям, связанным с механизмами пластичности нервной системы [104, 156, 160].

Функции липидов в организме очень разнообразны, однако не все они изучены детально и подробно. Особенно, это касается ткани мозга. Следует подчеркнуть, что мозг содержит почти четверть всего холестерина организма, при этом составляя всего лишь 2 % от всей массы тела [86, 116, 119]. Это подчеркивает исключительную важность холестерина и, очевидно, других мембранных компонентов мембран в работе нейронов. Ранее исследователями было показано, что при изменении метаболизма холестерина изменяется внутриклеточный транспорт синаптических везикул, активность Na К+ АТФазы, аденилатциклазы, ацетилхолиновых, никотиновых и родопсиновых рецепторов, кальциего гомеостаза.

Однако функциональная роль холестерина и фосфолипидов (двух важнейших липидных компонентов мембран) в процессах памяти изучена мало: выяснение роли липидов и их перекисного окисления в передаче нервных импульсов и синаптической пластичности, являющихся важными параметрами процессов памяти [71]. Изучение этого вопроса позволяет решать не только фундаментальные физиологические задачи, но и открывает перспективы для решения клинической проблемы участия нарушений обмена липидов в нейродегенеративных заболеваниях, в частности, в развитии болезни Альцгеймера. В литературе представлены экспериментальные доказательства незаменимой роли холестерина и фосфолипидов в синаптической пластичности нейронов [123]. Обнаружено, что нарушение динамики и снижение содержания холестерина и фосфолипидов в клетках вызывает нейродегенерацию в гиппокампе [74, 84].

Белок является важнейшей частью тканей организма. Белки состоят из аминокислот, которые крайне важны для нормального функционирования внутренних органов, в том числе головного мозга [166], в котором часть аминокислот является его строительным компонентом, другие аминокислоты выступают в роли нейромедиаторов, напрямую действуя на функции головного мозга: улучшают кратковременную и долговременную память, а также увеличивают способность к обучению [185].

Аминокислоты поддерживают работу ЦНС, контролируют настроение, эмоции. Достаточное количество этих элементов улучшает память, повышает умственные способности, восприимчивость к информации. Известно около 200 природных аминокислот, из них только 20 аминокислот входят в состав белков. Эти аминокислоты называют протеиногенными — строящими белки. В организме человека наряду с протеиногенными аминокислотами можно найти и другие, которые играют иную роль, например, орнитин, β-аланин, таурин и др. Многие из протеиногенных аминокислот в организме человека выполняют важные самостоятельные функции, например, глицин, глютаминовая и аспарагиновая кислоты являются биологически активными соединениями, фенилаланин, тирозин и триптофан служат источником образования биогенных аминов и других биорегуляторов, глицин и таурин входят в состав желчных кислот [167].

Помимо строительства белковых молекул, выполняют еще целый ряд важных функций: участвуют в образовании других аминокислот, входят в состав разных природных соединений — коферментов, желчных кислот, антибиотиков, участвуют в образовании гормонов, медиаторов и нейротрансмиттеров, являются источниками метаболитов, принимающих участие в обмене веществ [122, 176].

Так, например, гистамин — важнейший медиатор и нейромедиатор, образуется в основном в тучных клетках и нейтрофильных лейкоцитах. В ЦНС гистамин действует как

нейромедиатор. Глицин – аминокислота, которая является метаболитом широкого спектра действия, специфическим регулятором активности нервных клеток, тормозным медиатором. Глицин является строительным материалом для производства белков в организме, а также участвует в передаче химических сигналов в мозге, поэтому используется для улучшения памяти. Также данная аминокислота содержится в большом количестве в клетках головного и спинного мозга. Применяется как успокаивающее (седативное) средство, улучшает мозговую деятельность и повышает способность к обучению [70, 176].

Глутамин играет ключевую роль в регуляции синтеза глутатиона – трипептида, состоящего из глютаминовой кислоты, цистеина и глицина. Глутаминовая кислота является единственной аминокислотой, поддерживающей дыхание клеток головного мозга, применяют при лечении некоторых нервных и психических заболеваний, это важный нейромедиатор, оказывающий ноотропный эффект и необходимый для нормальной работы головного мозга. Глутаминовая кислота служит источником энергии для клеток мозга [172]. Аспарагин может быть синтезирован из аспартата с помощью аспарагинсинтетазы, а дефицит этого фермента, как сообщается, вызывает структурные аномалии мозга и когнитивные нарушения [137, 138]. Лизин уменьшает тревогу, вызванную стрессом, вероятно, за счет ингибирования связывания серотонина с рецепторами, обнаруженными в ЦНС и кишечнике. Одним из самых ранних обнаруженных нейромодулирующих эффектов лизина является его влияние на ГАМК-передачу [141, 142].

Теанин — аминокислота, которая улучшает работу головного мозга и когнитивных функций, благоприятно воздействует на ЦНС. Данная аминокислота обладает нейропротекторным действием, поддерживает оптимальную умственную работоспособность [189]. Таурин – условно незаменимая аминокислота, которая участвует в образовании новых клеток в гиппокампе (активизирует работу головного мозга, ускоряет когнитивные процессы, улучшает память) [40, 176].

Фенилаланин влияет на работу нервных клеток, улучшает память и повышает восприимчивость. Пролин удовлетворяет критериям, предъявляемым к нейромедиаторам. Подобно другим нейромедиаторам, он синтезируется в нервных окончаниях. В нервных окончаниях обнаружены малые синаптические везикулы, в мембрану которых встроен специфический транспортер пролина [40]. Аланин — это непротеиногенный аминокислотный нейромедиатор, обнаруженный в ЦНС, который является структурным промежуточным продуктом α-аминокислот (например, аланина) и γ-аминокислот (например, ГАМК) [179, 189]. Цистеин широко известен как предшественник глутатиона,

главного антиоксиданта организма, также способен запускать синаптическую активность [189].

Для исследования процессов обучения и памяти используются поведенческие методы, а также при тестировании различных фармакологических веществ, влияющих на когнитивные процессы. По различным литературным данным, для изучения памяти и обучения используют различные виды поведенческих методик, которые оценивают уровень влияния на организм какого-либо стрессирующего или повреждающего фактора. Суть всех методов состоит в том, что тестируемое животное сначала учат на протяжении какого-то времени, а затем проверяют его память [109].

На протяжении нескольких десятилетий были разработаны и использованы различные поведенческие методики, которые применяются в опытах на животных. При изучении процессов условно-рефлекторного обучения и памяти с аверсивным подкреплением исследуют выработку условной реакции активного избегания и определение латентного периода активного избегания. При изучении пространственной памяти у грызунов используют тесты с фиксированным или чередующимся местоположением спасательной платформы в водном лабиринте Морриса (то есть обнаружение платформы путем активного плавания либо пассивно), или исследуют движение в восьмирукавном радиальном лабиринте с пищевым подкреплением. При этом каждый тип лабиринта внес различный уникальный вклад к лучшему пониманию различных видов памяти [124, 163].

Условная реакция активного избегания является инструментальной реакцией, в результате животное учится избегать аверсивного стимула, переходя на другую сторону камеры после предъявления стимула (например, удар электрического тока). Классической экспериментальной поведенческой моделью условной реакции активного избегания является установка «Челночная камера» — это бокс, разделенный на две половины перегородкой с отверстием в середине. В результате данной методики, при многократном повторении у животного вырабатывается условный рефлекс избегания, который заключается в том, что лабораторное животное обучается переходить на противоположную половину установки до истечения 10 с после подачи звукового сигнала. На основе этих повторений вырабатывается определенное обучение в обозначенных условиях. При повреждении мозга изменяется способность к обучению, что можно статистически проанализировать [27].

Водный лабиринт Морриса (ВЛМ) — одна из наиболее широко используемых задач в поведении животных для изучения нейрофизиологических процессов и нейронных механизмов пространственного обучения и памяти. Он был разработан Ричардом

Моррисом из Сент-Эндрюсского университета в Шотландии и впервые описан в двух публикациях в начале 1980-х годов. В водном лабиринте Морриса в настоящее время часто используется в качестве общего анализа когнитивной функции, для проверки воздействия различных нарушений нервной системы (например, животных моделей инсульта, старения, нейродегенеративных заболеваний или потенциального воздействия новых терапевтических препаратов). Данный метод является надежным поведенческим тестом, который тесно коррелирует с синаптической пластичностью гиппокампа и функцией NMDA-рецептора [144, 145].

Восьмирукавный радиальный лабиринт (ВРЛ) широко использовался для изучения механизмов пространственного обучения и памяти у крыс. Этот метод достаточно чувствителен и надежен, он базируется на использовании лабораторными животными инстинкта по исследованию новых мест в сочетании с пищевым подкреплением [133]. Первоначальные поведенческие исследования были сосредоточены на основных физиологических процессах, ответственных за высокоточные уровни производительности, которые обычно наблюдаются. Последующие экспериментальные попытки с использованием этого подхода исследовали анатомические, фармакологические и генетические основы пространственного познания. Кроме того, работа в радиальном лабиринте была полезна для оценки гормонального и связанного с развитием вклада в пространственное познание. Первый радиальный лабиринт был создан в 1976 году его впервые использовали D.S. Olton и R.J. Samuelson для изучения пространственного обучения и памяти у крыс [151].

В оригинальном варианте использовался ВРЛ с равными по длине рукавами, расходившимися из круглого центра. В конце каждого рукава размещалась емкость с пищевым подкреплением (кусочек сахара), содержимое которой было невидимо из центра лабиринта. В ходе использования данного теста возникла необходимость в разработке оптимального по времени и трудозатратам протокола, позволяющего получать достоверные и воспроизводимые результаты [140].

Экспериментальное животное, которое первый раз попадает в неизвестную среду, показывает свой страх и беспокойство, которое обычно стихает после повторного входа в лабиринт. Процедура тестирования в ВРЛ предполагает первоначальную адаптацию животного к исследователю и к самому лабиринту. Поэтому опыт обычно проводится путем размещения животного на центральной платформе и предоставления ему возможности исследовать лабиринт. Для оценки способностей животного к пространственному обучению и памяти в ВРЛ предполагается проведение нескольких попыток перед началом самого тестирования с целью привыкания, в результате чего

происходит снятие эмоциональной напряженности в ответ на новую среду. Период привыкания может варьироваться от 1 до 5 или более дней [103].

Также на этапе обучения во всех рукавах лабиринта оставляют пищевую награду для того, чтобы поощрить процесс привыкания белой крысой новой для нее среды. После этого грызуна помещают в центр лабиринта для того, чтобы достаточно изучить экспериментальную установку, подкрепляя исследовательский интерес пищевой наградой (например, кусочек сахара, кусочек отварного яйца). Правильно и эффективно пройденное обучение позволяет грызуну лучше ориентироваться в пространстве на самом этапе тестирования. Результаты тестирования записывают как количество правильных или неправильных входов в радиальные рукава. ВРЛ — широко используемый и надежный метод оценки пространственного обучения и памяти у грызунов, а также он использовался в широком спектре нейрофизиологических исследований. Тест считается более сложным, чем Т-образный лабиринт, поскольку у животного больше возможностей выбора, из-за чего животному сложнее запомнить, на каком рукаве была награда. При этом оценку рабочей пространственной памяти оценивают по способности экспериментального животного запоминать рукав лабиринта, где он ранее уже получал пищевую награду, таким образом, повторно в него не входить, а изучать новые радиальные рукава [140].

1.2. Биологически активные вещества, синтезируемые стрептомицетами и их физиологические эффекты

В настоящее время актиномицеты рода *Streptomyces* представляют собой наиболее изученную группу микроорганизмов с непревзойденной способностью продуцировать биологически активные вещества различной химической природы и сферы применения [24, 69, 74, 85, 89]. Как известно, стрептомицеты являются грамположительными, нитчатыми и спорообразующими бактериями, обладающими сложной морфологической структурой, большой степенью изменчивости, высоким содержанием гуанин-цитозина (GC-content) в ДНК, что обеспечивает более высокую физико-химическую стабильность ее структуры.

Стрептомицеты широко распространены в наземных и водных экосистемах, особенно в почве, где могут составлять до 40 % от общего количества почвенных бактерий [13, 48, 89, 104, 122, 136]. Они обнаруживаются практически во всех видах почв, как правило, численно увеличиваясь в микробиоценозе по направлению с севера на юг, причем, в южных почвах возрастает и разнообразие различных представителей стрептомицетов [9].

По данным Списка названий прокариот с постоянной номенклатурой (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, LPSN) на 2019 год насчитывалось около 852 зарегистрированных видов и 38 подвидов стрептомицетов с официально

опубликованными названиями [10], а количество выявленных биологически активных соединений – первичных и вторичных метаболитов (антибиотиков, пигментов, ферментов, гормонов, алкалоидов, аминокислот, пептидов, липидов, иммуносупрессивных веществ, витаминов и др.), синтезируемых различными видами этих бактерий достигает 7600 [172].

Известно, что стрептомицеты (грамположительные мицелиальные бактерии Actinodacteria, порядок Actinomycetales, семейство Streptomycetaceae) могут существовать либо как колонии – многоклеточные структуры со сложной морфологической дифференциацией, либо в составе биопленок – также структурированных многоклеточных образований. Процессы роста и дифференциации колоний стрептомицетов, молекулярно-генетические механизмы их морфогенеза являются предметом изучения на протяжении нескольких десятилетий [24, 160].

Регуляторные механизмы, контролирующие клеточный рост стрептомицетов, а также механизмы, контролирующие процесс ветвления гиф во времени и пространстве, представлены в обзорах и статьях [172]. Считается, что характер роста стрептомицетов может быть одним из факторов, делающих эти мицелиальные бактерии столь экономически успешными в освоении мест обитания. Удлинение гиф верхушечной областью, сопровождаемое изветвлением, обеспечивает стрептомицетам возможность максимально захватывать и осваивать жизненное пространство по разным направлениям при поиске ресурсов питания [16, 129, 131].

Стрептомицеты как прокариоты представляют большой практический интерес, благодаря их уникальному жизненному циклу и способности продуцировать вторичные метаболиты: антибиотики, антиоксиданты, ферменты, гербициды, противораковые средства, витамины, иммуномодуляторы, липиды, факторы роста растений и др. [11, 21, 72].

Согласно литературным данным, стрептомицеты содержат в липидах значительное количество полинасыщенных жирных кислот, а также такие соединения, как дифосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноамин, фосфатидилинозитол и др. [78, 161].

Стрептомицеты – мицелиальные бактерии, повсеместно встречающиеся в природе, являются неотъемлемыми участниками жизни биосферы. Участвуя в разнообразных геохимических процессах, они способны модифицировать множество соединений – и природных, и ксенобиотиков, оказывая значительное воздействие на окружающую среду. В разных отраслях практической деятельности человека давно и с большим успехом используется уникальная способность стрептомицетов к синтезу огромного множества разнообразных биологически активных веществ. Общепризнано, что эти вещества имеют большое значение для клинической медицины, микробиологической промышленности, сельского хозяйства и других отраслей [160].

Среди различных метаболитов, синтезируемых стрептомицетами, самыми важными с точки зрения практического использования для медицины, сельского хозяйства и ветеринарии являются антибиотики. Со времен открытия антибиотиков предполагалось, что их экологическая роль состоит только в угнетении конкурентов в окружающей среде. Основное количество данных, освещающих роль антибиотиков в жизнедеятельности популяций почвенных микроорганизмов, относится к проявлению их антагонистической активности [161]. К настоящему времени установлено, что антибиотики имеют иные, более сложные функции.

При исследовании различных штаммов стрептомицетов выявлено, что они оказывают угнетающее действие на рост других микробов при помощи вырабатываемых ими антибиотиков. По современным представлениям известны тысячи различных антибиотиков, но в практическом использовании остается их небольшая часть, так как многие препараты имеют высокую химиотерапевтическую активность. Также известно значительное количество антибиотиков, которые широко применяются в различных отраслях (например, животноводстве и ветеринарии) [2, 18].

Например, свойства некоторых антибиотиков позволяют проводить профилактические мероприятия по отношению к различным заболеваниям у животных, а также стимулировать рост и развитие животных [161]. Стрептомицин — первый открытый антибиотик из группы аминогликозидов, первоначально выделенный из бактерий *Streptomyces griseus*. Он обладает широким спектром действия, подавляя рост грамположительных и грамотрицательных микробов (стафилококки, стрептококки), а главное – действует на *Mycobacterium tuberculosis*, которая является возбудителем такого хронического инфекционного бактериального заболевания, как туберкулез [165]. Канамицин выделяют из бактерии *Streptomyces kanamyceticus*, и его наиболее часто используемая форма — сульфат канамицина — антибиотик группы аминогликозидов, используемый для лечения различных инфекций, вызванных чувствительными к нему бактериями. Неомицин — это аминогликозидный антибиотик широкого спектра действия, который получают из продуктов метаболизма *Streptomyces fradiae* [130].

Среди веществ, входящих в состав биомассы различных штаммов стрептомицетов, особая роль принадлежит липидам. Известно, что липиды в организме выполняют ряд функций: транспортная (доставка лекарственных и питательных веществ в составе липосом или выведение ряда соединений из клетки), энергетическая (обеспечение энергетических процессов, происходящих в клетке), регуляция клеточной активности, иммунологическая, восстановительная (восстановление липидного состава мембран), эмульгирующая и пр. Накопление липидов стрептомицетами имеет огромное значение, т.к. это свойство можно

использовать для получения физиологически активных липидных фракций в промышленных масштабах [130].

Липиды участвуют в процессе активного переноса электронов и различных веществ внутри клетки, оказывают влияние на биосинтез нуклеиновых кислот и белков, входят в состав клеточных мембран, митохондрий, являются составной частью ферментов [48]. По литературным данным известно, что липиды обладают антибактериальной, радиозащитной, иммунологической, противоопухолевой биологической активностью и др. [79, 119, 129].

Ранее исследователями было показано, что при изменении метаболизма холестерина изменяется внутриклеточный транспорт синаптических везикул, активность Na K^+ АТФазы, аденилатциклазы, ацетилхолиновых, никотиновых и родопсиновых рецепторов, кальциего гомеостаза. Это подчеркивает исключительную важность холестерина и, очевидно, других компонентов мембран в работе нейронов. Однако функциональная роль липидов в процессах памяти изучена мало: выяснение роли липидов и их перекисного окисления в передаче нервных импульсов и синаптической пластичности, являющихся важными параметрами процессов памяти [68]. Изучение этого вопроса позволяет решать не только фундаментальные физиологические задачи, но и открывает перспективы для решения клинической проблемы участия нарушений обмена липидов в нейродегенеративных заболеваниях, в частности, в развитии болезни Альцгеймера [118].

Липидный состав стрептомицетов неоднороден. В него входят основные липидные фракции – триглицериды, стерины и фосфолипиды, а также вторичные липидные фракции – диглицериды, эфиры стеринов, моноглицериды и воска [29, 31, 32, 41].

В результате исследований по изучению анаболического действия стеринов стрептомицета *Streptomyces griseus* на цыплятах было показано, что стерины обладают стимуляцией роста в дозе 1 мкг на голову в сутки, увеличение которого в 2 раза снижает этот эффект, что говорит о высокой биологической активности данной фракции липидов [108].

Также и у стеринов из мицелия *Streptomyces canosus* обнаружен высокий ростостимулирующий эффект. В опытах на белых крысах введение 1-2 мг стеринов в растворе вазелинового масла вызывало увеличение привесов на 40-60%. В то же время было установлено достоверное эстрогенное действие стеринов стрептомицетов на половую систему крыс-самок при семикратном внутрибрюшинном введении в дозах от 7,2-17 мг на животного в сутки [169].

Основные липидные фракции биомассы различных штаммов стрептомицетов обладают антимикробными свойствами по отношению к ряду микроорганизмов

(грамположительные и грамотрицательные бактерии, дрожжи и дрожжеподобные грибы рода Candida). Также липидные фракции обладают антиоксидантной активностью, а при внутримышечном введении повышают естественную резистентность и интенсивность роста поросят на 15-20%, что снижает затраты корма на 15-23% [26]. В то же время различные липидные фракции, как основные, так и вторичные, разных видов стрептомицетов обладают неодинаковой антиокислительной активностью. В разной степени выраженными свойствами обладают фосфолипиды, стерины – основные липидные фракции, значительную антиокислительную активность проявляют моноглицериды – вторичные липидные фракции.

В литературе представлены экспериментальные доказательства незаменимой роли фосфолипидов в синаптической пластичности нейронов [118]. Обнаружено, что нарушение динамики и снижение содержания фосфолипидов в клетках вызывает нейродегенерацию в гиппокампе [71]. Поэтому значительное количество различных исследований было уделено основной липидной фракции – фосфолипидам. Они представляют большую группу соединений, которые содержат глицерин, остаток фосфорной кислоты, жирные кислоты и спирты. Фосфолипиды лабильны, легко превращаются и участвуют в метаболизме клеток. Мембранные липиды, в основном фосфолипиды (глицерофосфолипиды), состоят из липидного бислоя, который действует как барьер между клеткой и окружающей средой. Однако многочисленные исследования показывают, что липидный бислой не только функционирует как структурный барьер, но и играет решающую роль в регуляции множества клеточных процессов, а также обладают бактерицидным и бактериостатическим действием [60].

В настоящее время фосфолипиды изучаются различными исследователями в качестве биоантиоксидантов. Установлено, что в условиях изоляции животных от воздействия факторов внешней среды они могут оказаться в стрессовых ситуациях таких, как гипоксия, гиподинамия или несбалансированное питание. В данных экстремальных условиях в организме животных возникают реакции перекисного окисления липидов, что приводит к снижению продуктивности экспериментальных животных, увеличению рациона питания. Блокировать такие процессы свободно-радикального окисления могут только вещества, называемые антиоксидантами [45].

По литературным данным известно, что фосфолипиды стрептомицетов стабилизируют систему антиоксидантной защиты организма, что свидетельствует о целесообразности их применения как для профилактических мероприятий при отрицательных последствиях стресса, а также для нормализации роста животных [45].

В литературе последних лет XX века и начала XXI века все чаще можно встретить сообщения о разработке новых лечебно-профилактических продуктов, в состав которых в обязательном порядке входят фосфолипиды, обладающие гиполипидемическими, гипохолестеринемическими свойствами, а также свойствами антиоксидантов, радиопротекторов. Существует обобщенный значительный фактический материал по получению и применению стеринов микробного происхождения, кроме того, приводятся данные, указывающие на целесообразность использования стеринов микроорганизмов для химической или биологической трансформации их в витамины группы Д и андростановые гормоны [66].

Также важным является образование стрептомицетами аминокислот. В мицелии различных стрептомицетов накапливаются определенное количество аминокислот, микроэлементы, полисахариды и др. [1, 5]. Количественный и качественный состав аминокислот биомассы стрептомицетов различен: незаменимые аминокислоты (метионин, гистидин, лизин, треонин, лейцин, изолейцин, валин, фенилаланин), частично заменимые (глицин, аргинин, тирозин), заменимые (глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, пролин, аланин, серии).

По литературным данным известно, что при исследовании состава биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 было выявлено высокое содержание таких аминокислот, как глутаминовая, аспарагиновая, глицин, пролин, которые, выполняя функции нейромедиаторов и нейромодуляторов в различных отделах головного мозга, участвуют в механизмах нейропластичности при обучении, что могло бы в определенной степени объяснить обнаруженные эффекты биомассы в отношении поведения экспериментальных животных [5, 10, 12].

Streptomyces tyoideus, Streptomyces aviculastus и другие стрептомицеты используются для получения аминокислот, например, L-аланина. *Streptomyces aurantiaca,* культивируемые на отходах животноводческих ферм или гидролизате древесины, позволяют получать биомассу, содержащую каротин, витамины группы В и различные антибиотики [12, 13].

Литературные данные показывают, что практически все стрептомицеты могут продуцировать витамины группы В. Так, например, *Streptomyces olivaceus* образует антианемический витамин B_{12}. Культуры штаммов *Streptomyces griseus 15, Streptomyces aureoverticillatus 1306* и *Streptomyces aurigineus 2377* в ходе культивирования на тех или иных средах продуцируют тиамин, рибофлавин, пиродоксин, биотин, никотиновую кислоту и витамин B_{12} [2].

Большое количество видов *Streptomyces* красно-розовой или желтой окраски выделяют пигментные вещества, которые являются предшественниками витаминов – каротины и каротиноиды. Синтез каротиноидов описан у штаммов *Streptomyces griseus, Streptomyces setonii* и *Streptomyces coelicolor*. В работе [75] исследовали каротиноид-синтезирующую способность штамма *Streptomyces 37* AQBMM35, выделенного из морской губки *Mycale mytilorum* на юго-западном побережье Индии. В ходе исследования пришли к выводу, что данный стрептомицет синтезирует каротиноиды аналогично наземным стрептомицетам *Streptomyces griseus* и *Streptomyces coelicolor*, предложив исследуемый штамм в качестве альтернативы для производства данных пигментов в промышленных масштабах [1].

1.3. Влияние метаболитов стрептомицетов на нейрональные процессы, лежащие в основе памяти и обучения

Природные биоактивные метаболиты стрептомицетов широко используются в медицине, фармацевтическом производстве, ветеринарии в качестве антибиотиков, антиоксидантов, ингибиторов ферментов, противоопухолевых, противовоспалительных, противовирусных и противогрибковых средств [74, 80, 88, 127, 144].

В последние десятилетия было обнаружено, что вторичные метаболиты ряда штаммов стрептомицетов способны оказывать нейропротекторное действие при применении различных моделей нейродегенерации [112, 128, 135, 151, 152]. В ряде исследований было показано, что способность метаболитов стрептомицетов предотвращать нейродегенерацию обусловлена, прежде всего, их антиоксидантным действием. Из продуктов жизнедеятельности различных штаммов стрептомицетов выделены специфические ингибиторы перекисного окисления липидов мембран клеток, такие как бензастатины, пиразины, пирролизидиновые алкалоиды, антиостатины, карбазохиноцины, бентоцианины и показано их значение как мощных нейропротекторных веществ в условиях индукции липидной пероксидации [107, 128, 135, 169].

Хорошо известно, что окислительный стресс является одним из патогенетических факторов развития хронических нейродегеративных заболеваний [15, 57]. Увеличение количества свободных радикалов на фоне снижения механизмов антиоксидантной защиты вызывает повреждение макромолекул нервных клеток: белковых, липидных, ДНК, вследствие чего окислительный стресс вносит существенный вклад в потерю нейронов. Наряду с этим, известно, что увеличение потребления антиоксидантов снижает количество свободных радикалов в нейронах и глиальных сателитах, способствует предотвращению и уменьшению риска хронических нейродегенеративных заболеваний [100, 143, 165].

В связи с этим, одно из перспективных направлений исследования стрептомицетов направлено на поиск их штаммов, обладающих способностью синтезировать метаболиты, существенно ингибирующие процессы перекисного окисления липидов в клетках головного мозга и других органов. Известно, что в последние десятилетия распространенность нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, быстро прогрессирует, особенно в развитых странах [150, 180], и одними из наиболее важных причин увеличения распространённости когнитивных нейропсихических нарушений, является хронический психогенный стресс, стрессогенный образ жизни, резкие изменения условий жизнедеятельности современного человека [51, 54].

В настоящее время известен ряд вторичных метаболитов, обладающих значительными антиоксидантными свойствами, синтезируемых штаммами таких видов стрептомицетов как *Streptomyces antioxidans, Streptomyces chrestomyceticus, Streptomyces exfoliates, Streptomyces gilvigriseus, Streptomyces glaucescen, Streptomyces griseoflavus, Streptomyces halstedii, Streptomyces mangrovisoli, Streptomyces nitrosporeus, Streptomyces pluripotens, Streptomyces purpeofuscus, Streptomyces qinglanensis, Streptomyces sanyensis, Streptomyces xiamenensis*, выделенных из почв Бразилии, Египта, Индии, Республики Корея, Малайзии, Монголии, России, США, Японии и других стран. К ним относятся бензастатины A, B, C и D (алкалоиды различных групп), пиразины, родственные фенолу соединения, пирролизидиновые алкалоиды, антиостатины, карбазохиноцины A - F, бентоцианины A, B и C, меланины, хальксазон, микигазон, 4-деметоксимиказон, пирролостатин, пигмент андецил-продигиозин, ангидроэкфолиамицин [71, 77, 93, 108, 112, 126]. Биологически активные вещества стрептомицетов с антиоксидантной способностью демонстрируют мощную антиоксидантную и нейропротекторную активность, разлагая перекись водорода, нейтрализуя супероксидный анион, 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил, 3-этилбензотиазолин-6-сульфоновую кислоту и другие свободные радикалы, ингибируя перекисное окисление липидов, повышая уровень антиоксидантных ферментов [128, 132, 133, 143]. Помимо метаболитов с антиоксидантной активностью, в состав биомассы стрептомицетов входят первичные метаболиты (фосфолипиды, жирные кислоты, аминокислоты, витамины).

Как известно, L-глутамат – наиболее важный возбуждающий нейротрансмиттер в центральной нервной системе, который играет существенную роль в развитии и функционировании мозга, включая повышение нейропластичности и энергоснабжения, регуляцию обучения и памяти, обеспечение нейронной долговременной потенциации [67, 68, 106], в больших количествах высвобождается во время ишемии головного мозга и индуцирует через посредство активации внеклеточных N-метил-D-аспартатных

рецепторов (NMDA) последующую деградацию нейронов. Во время неонатального развития ЦНС L-глутамат действует как нейротрофический фактор.

Действие L-глутамата связано с тремя отдельными отделами мозга: пресинаптические нейроны, постсинаптические нейроны и глиальные клетки. Примечательно, что цикл глутамат-глутамин представляет собой жизненно важный процесс, в котором синаптические окончания и глиальные клетки взаимодействуют для поддержания адекватного уровня L-глутамат (гомеостаз глутамата). Как правило, L-глутамат необходим для поддержания здоровой и нормальной функции мозга. Однако его накопление связано с нейротоксичностью и нейродегенерацией. Несколько доказательств позволяют предположить, что нарушение гомеостаза L-глутамата связано с патологией нейронов и смертью при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, болезнь Паркинсона и другие [100, 142, 191, 192].

Показано, что воздействие L-глутамата *in vitro* или *in vivo* имеет несколько патогенных механизмов, влияющих на жизнеспособность нейронов. Эти механизмы включают окислительный стресс, снижение антиоксидантной защиты, нейровоспаление, изменение уровня нейротрансмиттеров, накопление белка, эксайтотоксичность, митохондриальную дисфункцию, изменение содержания внутриклеточного кальция, влияние на гистологию нейронов, когнитивную функцию и поведение животных. В ряде исследований обнаружено, что такие вторичные метаболиты стрептомицетов как эстивофоенины A и B, бензастатины C, D, H и I, феназостатины, месценгрицин, каркуиностатин B, феназины [125-128], а также понтемазины A и B, выделенные из штамма *Streptomyces sp.* UT1123, изолированного из вулканических почв корейского острова Уллын, реализуют свое нейропротекторное действие как ингибиторы токсичности глутамата. В исследованиях на модельных животных показано, что эти метаболиты стрептомицетов представляют собой достаточно мощные нейрозащитные вещества, которое препятствуют деградации нервных клеток гиппокампа от токсичности L-глутамата, в частности, за счет ингибирования активации фактора транскрипции NF-kB, а также за счет снижения концентрации свободных радикалов.

При исследовании штамма *Streptomyces sp.* RM-5−8, выделенного из почв угольных шахт в штате Кентукки (США), обнаружено, что его вторичные метаболиты терфестатины B и C (новые п-терфенилы) обладают мощным нейропротекторным действием. В условиях повреждения нейронов гиппокампа крыс этанолом, они показали существенный защитный эффект [188].

Более того, некоторые из вторичных метаболитов стрептомицетов (лактацистин, ангидроэкфолиамицин, акридиновые алкалоиды инубозины A, B и C и др.), оказывающих

нейропротекторное действие при применении различных моделей нейродегенерации, обладают способностью стимулировать нейритогенез, оказывая влияние на ультраструктурную организацию различных нейрональных образований головного мозга, и дифференцировку нейральных стволовых клеток [164].

Показано, что механизм действия инубозинов А и В, продуцируемых штаммом *Streptomyces sp.* IFM 11440, выделенным из почв префектуры Киба (Япония), и ускоряющих дифференцировку нейральных стволовых клеток, связан с увеличением экспрессии мРНК пронейральных факторов транскрипции нейрогенинов 1 и 2 (Ngn1 и Ngn2), фактора нейрогенной дифференцировки 2 (NeuroD2) и пронейрального нейротрофического фактора роста нейротрофина 3 (NT-3). В отличие от инубозина А, инубозин В способен существенно активировать нейрогенин 2 (Ngn2) [164], который представляет собой пронейральный фактор транскрипции bHLH, участвующий как в нейрогенезе, так и в спецификации нейронов [113]. Этот белок связывается с регуляторными элементами энхансерного бокса на промоторах многих генов, связанных с нейрогенезом и спецификацией нейронов. Следовательно, активаторы промотора Ngn2, каковым является инубозин В, могут ускорять дифференцировку нервных стволовых клеток. Поскольку инубозин А не проявляет активности промотора Ngn2, механизм его воздействия на дифференцировку нейральных стволовых клеток реализуется другими путями. Актинобактерии естественным образом производят ингибиторы протеасом, такие как лактацистин, синтезируемый штаммом стрептомицетов вида *Streptomyces lactacystinaeus,* выделенным из почв Японии, является индуктором нейритогенеза в клетках нейробластомы [151]. Лактацистин изначально был идентифицирован по его способности ингибировать развитие клеточного цикла и вызывать рост нейритов в линиях нейрональных клеток. Авторами было продемонстрировано, что мишенью для лактацистина является протеасома – многобелковый комплекс, осуществляющий метаболический энергоемкий избирательный и поэтапный гидролиз, а также процессинг внутриклеточных белков при помощи протеолиза до коротких пептидов. Лактацистин был первым обнаруженным непептидным ингибитором протеасом благодаря его сродству к определенным каталитическим субъединицам протеасомы [9, 117, 148].

Несмотря на увеличивающееся число сообщений о воздействии продуктов жизнедеятельности стрептомицетов на нейрональные процессы, их влияние на поведение животных очень мало исследовано. Данные подобных исследований, без сомнения, представляют огромный интерес для разработки пищевых добавок и фармакологических препаратов с нейропротекторными и ноотропными свойствами на основе вторичных метаболитов стрептомицетов. При изучении воздействия вторичных метаболитов

Streptomyces avermectilis и *Streptomyces lincolniensis* авермектинов дорамектина и ивермектина на поведенческие реакции белых крыс был выявлен, в частности, их анксиолитический эффект. С использованием методик «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт», а также «Конфликтное поведение» было обнаружено, что в терапевтических дозах эти вторичные метаболиты стрептомицетов снижают уровень тревожности и стресса, защищают крыс от судорожных эффектов пентилентетразола и пикротоксина [173, 174].

В исследованиях, проведенных ранее в Институте физиологии и санокреатологии, Молдавского государственного университета в сотрудничестве с коллегами из Института микробиологии и биотехнологии, Технического университета Молдовы и Приднестровского государственного университета им. Т.Г. Шевченко было обнаружено, что длительное (60-90 сут) потребление белыми крысами обоих полов культуральной жидкости и, особенно, биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выделенных из почв центральной части Республики Молдова, облегчает выработку оборонительных условных рефлексов и способствует увеличению скорости целенаправленных двигательных реакций [59, 60]. Позднее в опытах на крысах различного возраста было выявлено, что биомасса вышеуказанных штаммов стрептомицетов стимулирует выработку условной реакции активного избегания (УРАИ) в большей степени у старых животных с признаками нейродегенерации по сравнению с молодыми, способствуя тем самым существенному облегчению процесса условно-рефлекторного научения, а также заметно понижает латентный период реакции избегания на различных сроках после выработки УРАИ, способствуя тем самым замедлению угасания следов условно-рефлекторной памяти (также в большей степени у старых животных) [59].

Исследования состава биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 показали высокое содержание таких аминокислот, как глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, глицин, пролин [17], которые, как известно, выполняя функции нейромедиаторов и нейромодуляторов в различных отделах головного мозга, участвуют в механизмах нейропластичности при обучении, фосфолипидов и стеринов [33], оказывающих влияние на процессы синаптической пластичности нейронов, что могло бы в определенной степени объяснить обнаруженные эффекты биомассы в отношении поведения экспериментальных животных. Кроме этого, исходя из данных других авторов, можно обоснованно предположить наличие в биомассе вышеуказанных штаммов стрептомицетов метаболитов, способных стимулировать и поддерживать нейрональные процессы, лежащие в основе обучения и памяти (витаминов группы В, ненасыщенных жирных кислот, флавоноидов, антоцианов и др.). Так, например,

Streptomyces olivaceus в большом количестве продуцирует витамин B_{12}. Культуры *Streptomyces griseus* 15, *Streptomyces aureoverticillatus* 1306 и *Streptomyces aurigineus* 2377 в процессе выращивания на разных средах синтезируют тиамин, рибофлавин, пиродоксин, биотин, никотиновую кислоту и витамин B_{12} [157, 168].

Однако, анализ изложенных в настоящем обзоре данных о предполагаемом наличии в биомассе ряда штаммов стрептомицетов специфических вторичных метаболитов с выраженными нейропротекторными свойствами в сопоставлении с полученными воспроизводимыми данными о высокой эффективности продуктов жизнедеятельности штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 в отношении условно-рефлекторного обучения и памяти, позволяет предположить наличие в биомассе этих штаммов подобных по эффективности биологически активных веществ [168].

Как уже было упомянуто выше, способность вторичных метаболитов стрептомицетов предотвращать нейродегенерацию обусловлена, прежде всего, их антиоксидантным действием; из различных штаммов стрептомицетов выделен ряд «новых» ингибиторов перекисного окисления липидов и показано их значение как мощных нейропротекторных веществ в условиях индукции липидной пероксидации. Анализ полученных результатов свидетельствует в пользу антиоксидантного механизма нейропротекторного действия метаболитов, входящих в состав биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11. Хорошо известно, что болевой электрокожный раздражитель, примененный при выработке оборонительных условных рефлексов в качестве условного стимула в челночной камере, является достаточно сильным стрессовым фактором для подопытных животных на начальном периоде обучения. В состоянии острого стресса происходит резкое повышение интенсивности перекисного окисления липидов в нервных клетках на фоне угнетения антиоксидантной защиты, что, в конечном счете, негативно сказывается на процессе обучения [12, 189].

В различных опытах потребление животными биомассы стрептомицетов способствует достижению более высокого уровня выработки условных рефлексов, в первую очередь, за счет существенного увеличения числа УРАИ в динамике условно-рефлекторной деятельности на начальном периоде обучения. Исходя из этого, можно предположить, что зафиксированный эффект облегчения выработки условных рефлексов под влиянием биомассы стрептомицетов, обусловлен нейропротекторным действием входящих в ее состав антиоксидантов по отношению к индуцируемой в условиях болевого стрессирования активации свободно-радикального окисления.

Это предположение в определенной мере находит подтверждение в результатах экспериментов на старых животных. Низкий уровень выработки условных рефлексов у старых крыс контрольных групп по сравнению с молодыми животными опосредован развитием у них процессов нейродегенерации [7]. Тот факт, что эффективность применения биомассы стрептомицетов, особенно, *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 у старых животных существенно выше, чем у молодых, учитывая роль окислительного стресса в развитии возрастных нейродегенеративных изменений на фоне снижения активности многоуровневой антиоксидантной системы нервных клеток [8], может свидетельствовать в пользу предположения об антиоксидантном механизме нейропротекторного эффекта биомассы стрептомицетов в отношении процессов условно-рефлекторной деятельности и памяти.

В результате исследований состава биомассы стрептомицетов и влиянии ее на процесс обучения и памяти у белых крыс в совокупности с анализом данных специальной литературы, можно обоснованно предположить наличие в биомассе стрептомицетов вторичных метаболитов с выраженными нейропротекторными, ноотропными и антиоксидантными свойствами, что и демонстрирует перспективность и целесообразность проведения комплексных исследований по их влиянию на процессы обучения и памяти.

1.4. Выводы к главе 1

1. Обучение и нейрологическая память – одни из наиболее фундаментальных психических процессов адекватного отражения реальности, в основе которых лежат сложные молекулярные механизмы и изменения структуры мозга на клеточном уровне, имеющие решающее значение во взаимодействии человека с окружающей средой.

2. Стрептомицеты представляют собой группу весьма распространненых в природе микроорганизмов с непревзойденной способностью продуцировать биологически активные вещества различной химической природы, в том числе антибиотики, ферменты, гормоны, алкалоиды, аминокислоты, пептиды, липиды, витамины и др., вторичные метаболиты, обладающие противовоспалительными, противовирусными, антибактериальными, антиоксидантными, ферментативными, иммунологическими и др. свойствами, и поэтому находящие широкое применение в медицине, фармакологии, ветеренарии, животноводстве.

3. В последние десятилетия было установлено, что штаммы стрептомицетов, изолированных из почв различных регионов мира, синтезируют ряд метаболитов с выраженными нейропротекторными свойствами, обусловленными, прежде всего, их антиоксидантной активностью, а также способностью ингибировать токсичность L-глутамата и стимулировать нейритогенез и этапы нейрогенеза, начаты исследования влияния метаболитов стрептомицетов на поведенческие реакции животных, которые показали их эффективность в отношении облегчения процессов условно-рефлекторного научения у молодых, и, особенно, старых животных с признаками нейродегенерации. Штаммы *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 являются перспективными для проведения комплексных исследований с целью выделения и идентификации вторичных метаболитов выраженными нейропротекторными и антиоксидантными свойствами.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Результаты исследований, представленные в работе, были получены в течение 2018–2023 гг. в Институте Физиологии и Санокреатологии Молдавского Государственного Университета, Институте Микробиологии и Биотехнологии Технического Университета Молдовы, кафедре физиологии и санокреатологии Приднестровского Государственного Университета им. Т.Г. Шевченко.

2.1. Объект исследования

Объектом исследования служили 246 белых крыс линии *Wistar* (144 самца и 102 самки) в возрасте от 2-х до 6,5 месяцев (молодые) и возрасте от 12-ти до 16,5 месяцев (старые), содержавшихся в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, 12/12-часовом режиме освещения и темноты с учетом рекомендаций Европейской конвенции о гуманном обращении с лабораторными животными [20].

Животные в каждом эксперименте были разбиты на подгруппы: контрольную и опытные. Животные опытных подгрупп в течение 90 суток в качестве пищевой добавки к стандартному рациону питания получали высушенную биомассу двух местных штаммов стрептомицетов – *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, ежедневно в дозе 250 мг/кг массы тела. Штаммы *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 выделены из почв центральной части Республики Молдовы и находятся на хранении в Национальной коллекции непатогенных микроорганизмов Республики Молдова. Молодые животные получали биомассу, начиная с возраста 2 месяцев, а старые – начиная с возраста 12 месяцев. Спустя 90 суток после начала потребления животными биомассы стрептомицетов и при достижении ими возраста – 5 месяцев (молодые) и 15 месяцев (старые), соответственно, приступали к исследованиям.

Дизайн исследования показан на рисунке 2.1.

Обучение и память крыс при потреблении биомассы стрептомицетов

Дизайн исследования

Объектом исследования служили 246 белых крыс линии *Wistar* (144 самца, 102 самки), взятых в возрасте от 2-х месяцев до 7 месяцев (молодые) и в возрасте от 12-ти месяцев до 17 месяцев (старые). Животные опытных подгрупп в течение 90 суток в качестве пищевой добавки к стандартному рациону питания получали высушенную биомассу двух местных штаммов стрептомицетов – *S. massasporeus* CNMN-06 *и S. fradiae* CNMN-Ac-11, ежедневно в дозе 250 мг/кг массы веса. Животные контрольных групп получали стандартный рацион питания.
Штаммы *S. massasporeus* CNMN-06 *и S. fradiae* CNMN-Ac-11 выделены из почвы центральной части Республики Молдовы и находятся на хранении в Национальной коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии и биотехнологии.

I этап

Получение биомассы штаммов стрептомицетов, изучение ее биосинтетических свойств при культивировании на средах разного состава с целью получения биомассы, предположительно оказывающей наибольшее влияние на обучение и память

Получение биомассы штаммов—*Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированных на комплексных питательных средах разного состава (M-I, SP-I, SP-III, SP-I+ПАБК) с помощью посевов и определение ее количества

Определение количественного и качественного липидного состава биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированных на средах разного состава методом Фолча, тонкослойной хроматографии на пластинках “Sorbfil” и денситометрическим методом

Определение количественного и качественного аминокислотного состава биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на средах разного состава методом ионообменной хроматографии на аминокислотном анализаторе AAA-339 M „Microtehna”

II этап

Исследование токсикологических свойств биомассы штаммов стрептомицетов и ее влияние на динамику массы тела, плодовитость белых крыс и развитие крысят

Определение влияния биомассы штаммов Streptomyces massasporeus CNMN-Ac-06 и Streptomyces fradiae CNMN-Ac-11 на прирост массы тела экспериментальных животных

1. в условиях потребления биомассы штаммов стрептомицетов, культивированных на питательной среде SP-I;
2. в условиях потребления биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты.

Определение влияния биомассы штамма Streptomyces massasporeus CNMN-Ac-06 Streptomyces fradiae CNMN-Ac-11 на плодовитость белых крыс и развитие крысят

1. в условиях потребления биомассы штаммов стрептомицетов, культивированных на питательной среде SP-I;
2. в условиях потребления биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты.

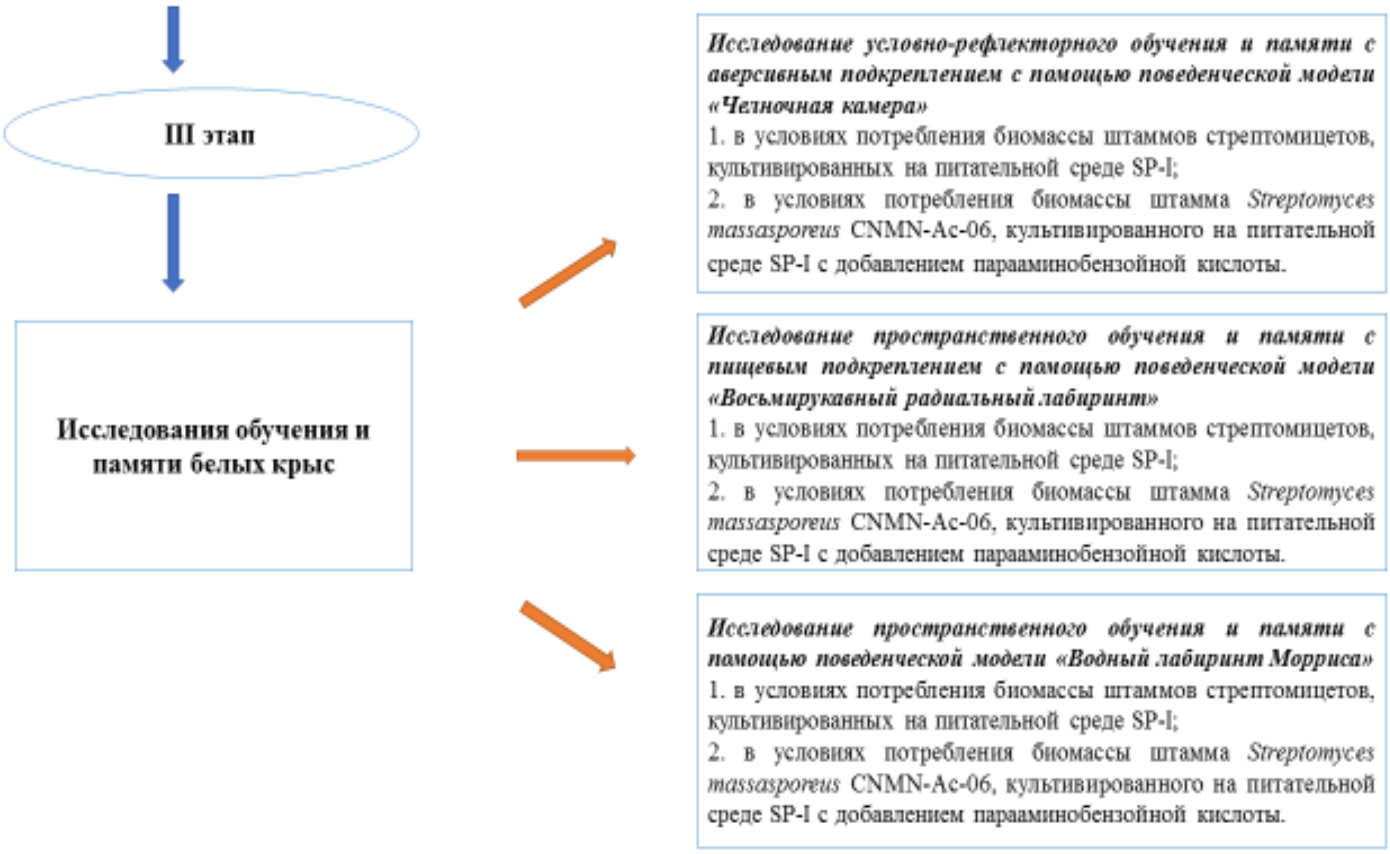


Рис. 2.1. Дизайн исследования

2.2. Методы получения биомассы штаммов стрептомицетов, определение ее липидного и аминокислотного состава

Для кормления животных использовалась биомасса двух штаммов стрептомицетов из Национальной коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии и биотехнологии, выделенных из почв центральной части Республики Молдова: *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11. Культуры хранили методом периодических пересевов, используя агаризованные среды – среду Гаузе и Чапека, в холодильнике при температуре +4°С. Инкубирование посевов проводили в течение 2–3-х недель при температуре +27+28°С. Далее производили описание колоний стрептомицетов, обращая внимание на наличие и цвет воздушного и субстратного мицелия, растворимого пигмента, выделяемого в среду; консистенцию колоний; складчатость колоний (концентрическая или радиальная); консистенцию воздушного мицелия (мучнистая, бархатистая, порошковидная, пушистая).

Для исследования колоний штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 предварительно производили посев на агаризованные среды в чашки Петри: овсяный агар, среду Гаузе, среду Чапека. Для этого в стерильные чашки Петри разливали расплавленную агаризованную среду по 20,0-30,0 мл в каждую,

затем с помощью стерильной пипетки вносили на поверхность среды суспензию спор, далее растирали стерильным шпателем. Чашки с засеянными средами помещали в термостат при температуре +27+28°С. Измерение диаметра колоний производили на 7, 14, 21 дни роста в десятикратной повторности. Культуральные признаки штамма изучали по характеру роста изолированных колоний 14-суточного возраста. Описание колоний, выросших на плотных питательных средах, производили, обращая внимание на следующие признаки: форма, размеры, цвет, поверхность, профиль, край, консистенция, структура колоний, а также на цвет воздушного и субстратного мицелия.

Поскольку продуктивность штаммов стрептомицетов зависит от состава питательной среды, с этой целью культивировали штаммы *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на трех питательных средах M-I, SP-I, SP-III – для определения наиболее продуктивного штамма по отношению к биомассе, необходимой для кормления животных, к общим липидам и физиологически важным липидным фракциям, с целью получения биомассы, содержащей биологически активные вещества, способные воздействовать на процессы обучения и памяти.

Для получения инокулума суспензию спор засевали в конические колбы объемом 250 мл на среду Дюлоне (%): NaCl – 0,5, K_2HPO_4 – 0,2, $CaCl_2$ – 0,04, $ZnSO_4$ x7H_2O – 0,001, $FeSO_4$ x7H_2O – 0,001, $MgSO_4$ – 0,1, $(NH_4)_2HPO_4$ – 0,7, глюкоза – 2,0, pH 7,0-7,2. Выращивали инокулят в течение 72 ч при температуре +27°С на вибростоле (180-200 об/мин). Готовый инокулят засевали в колбы Эрленмейера на комплексные питательные среды следующего состава (г/л):

1 - среда M-I: кукурузная мука – 20,0, дрожжи – 0,5, $CaCO_3$ – 0,15, pH 7,0-7,2 [11];

2 - среда SP-I: кукурузная мука – 20,0, соевая мука – 10,0, NaCl – 0,5, $CaCO_3$ – 1,0, pH 7,0-7,2 [48];

3 - среда SP-III: кукурузная мука – 20,0, соевая мука – 10,0, NaCl – 0,5, $CaCO_3$ – 1,0, K_2HPO_4 - 3,0, pH 7,0-7,2 [11].

Биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием. Количество биомассы определяли на 5-е сутки роста культуры. Экстракцию внутриклеточных липидов из биомассы проводили методом Фолча [48] в модификации, описанной в работе [11].

По результатам анализа, представленного в Главе 3, п. 3.1., была выбрана для дальнейших исследований комплексная питательная среда SP-I, которая способствовала наибольшей продуктивности биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11.

Для проверки изменения активности многоуровневой антиоксидантной системы нервных клеток, нейропротекторного эффекта биомассы стрептомицетов в питательную

среду для культивирования штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 мы добавляли парааминобензойную кислоту (ПАБК), являющуюся исходным материалом для синтеза бензастатинов [29, 30, 72, 130] – алкалоидов различных групп, некоторые из которых являются одними из наиболее распространенных и мощных антиоксидантов с нейропротекторными свойствами, синтезируемых штаммами стрептомицетов [64]. Следует отметить, что добавление ПАБК в среду для культивирования выделенного из почв Японии штамма *Streptomyces nitrosporeus* 30643, продуцирующего бензастатины, вызывало заметное увеличение синтеза бензастатинов А и В, нейропротекторное действие которых связывают непосредственно с их антиоксидантными свойствами, и производных последнего, практически не оказывая влияния на синтез некоторых других бензастатинов [27, 125, 126, 129]. Были произведены расчёты концентрации ПАБК при культивировании штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (плотность парааминобензойной кислоты составляет 1,374 г/см^2, соответственно на 100 мл дистиллированной воды необходимо 137 мг): концентрация №1 – 0,685 г/л, концентрация №2 – 1,37 г/л, концентрация №3 – 2,74 г/л (CHEMICALS REACTIVES LABORANJRY EQUIPMENT «MIC-TAN», Germany).

С целью получения наибольшего количества биомассы, общих липидов, липидных фракций, аминокислот, проводили культивирование штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 на четырех комплексных питательных средах (г/л):

1 – среда SP-I (контроль): кукурузная мука – 20,0, соевая мука – 10,0, NaCl – 5,0, $CaCO_3$ – 1,0, глюкоза – 10,0, pH 7,0-7,2;

2 – среда SP-I: кукурузная мука – 20,0, соевая мука – 10,0, NaCl – 5,0, $CaCO_3$ – 1,0, 4-аминобензойная кислота – 0,685, глюкоза – 10,0, pH 7,0-7,2;

3 – среда SP-I: кукурузная мука – 20,0, соевая мука – 10,0, NaCl – 5,0, $CaCO_3$ – 1,0, 4-аминобензойная кислота – 1,37, глюкоза – 10,0, pH 7,0-7,2;

4 – среда SP-I: кукурузная мука – 20,0, соевая мука – 10,0, NaCl – 5,0, $CaCO_3$ – 1,0, 4-аминобензойная кислота – 2,74, глюкоза – 10,0, pH 7,0-7,2.

По данным, полученным при культивировании штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 на разных комплексных питательных средах, по определению количества биомассы, ее количественного и качественного липидного и аминокислотного состава, для дальнейших исследований были выбраны питательные среды №3 и №4.

Определение липидного состава биомассы штаммов Streptomyces massasporeus CNMN-Ac-06 и Streptomyces fradiae CNMN-Ac-11

Экстракцию внутриклеточных липидов из биомассы проводили методом Фолча [47] в модификации, описанной в работе [11]. В колбу Эрленмейера помещали 3,0 г сырой биомассы, далее смешивали с раствором хлороформа и спирта в соотношении 1:5. Колбу с

содержимым фиксировали на вибрационном столе (180 обор/мин) на 20 минут, после доливали 27,0 мл хлороформа, далее колбу опять устанавливали на вибрационный стол (180 обор/мин) на 20 минут. Затем фильтровали содержимое колбы через фильтровальную бумагу, следующим шагом содержимое заливали в делительную воронку, добавляли воду в соотношении 1:5 и производили медленные колебательные движения для отделения этанола, затем сливали хлороформ с липидами в колбу. Так повторяли 5 раз. После раствор липидов в хлороформе фильтровали через безводный сульфат натрия. На роторном испарителе отгоняли хлороформ для получения суммарных липидов.

Качественный и количественный состав липидов определяли методом тонкослойной хроматографии на пластинках “Sorbfil” и денситометрическим методом [41].

Определение аминокислотного состава биомассы штамма Streptomyces massasporeus CNMN-Ac-06

Этот метод позволяет исследовать качественный и количественный состав аминокислот, часть которых являются строительным компонентом мозга и центральной нервной системы, другая часть аминокислот выступает в роли нейромедиаторов и напрямую воздействует на функции мозга, что повышает способность к обучению, улучшает кратковременную и долговременную память.

Для определения аминокислотного состава биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 при росте на комплексной питательной среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты в различных концентрациях.

В комплексных биологических материалах определяются и связанные, и свободные аминокислоты. Для подготовки проб биомассы изучаемого штамма использовали метод гидролиза 6N-соляной кислотой [11]. Пробу взвешивали и количественно переносили в пробирки из пирекса или сиала, куда добавляли 6N-соляную кислоту в двукратном избытке. Пробирки запаивали, а затем комплексные пробы выдерживали в воздушном термостате при 110±10°C в течение 24 часов. После гидролиза пробирки охлаждали, содержимое пробирок количественно переносили и фильтровали. Кислоту в полученной жидкости испаряли в вакуумном роторном испарителе при 400°C до pH=2,2. Аминокислотный состав полученной биомассы определяли методом ионообменной хроматографии на аминокислотном анализаторе AAA-339 M „Microtehna” (Чехия).

2.3. Методы исследования влияния биомассы штаммов стрептомицетов на динамику массы тела, плодовитость и развитие крысят

Влияние биомассы штаммов Streptomyces massasporeus CNMN-Ac-06 и Streptomyces fradiae CNMN-Ac-11 на прирост массы тела экспериментальных животных

В течение 3-х месяцев животным опытных групп в стандартный рацион питания добавляли высушенную биомассу штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированных на среде SP-I, а также биомассу штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, полученную на комплексной среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты в двух концентрациях (1,37 и 2,74 г/л) в дозе (250 мг/кг массы тела), кроме того, животные употребляли их на всем протяжении эксперимента. Контрольные животные получали обычный рацион питания [7]. Изменение массы тела животных регистрировали каждые 7 дней на электронных лабораторных весах A-2500 фирмы “Axis” (Польша).

Исследования по измерению массы тела проводили как в обычных физиологических условиях на 54 белых крысах (30 самцов, 24 самки), так и при тепловом стрессе (30 самцов).

Для исследования животные были разбиты на следующие группы: 5 групп самцов по 6 крыс в каждой группе в обычных физиологических условиях и при тепловом стрессе: контрольная и 4 опытные: 1 группа – стандартный рацион питания (контроль); 2 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (здесь и далее – 250 мг/кг массы тела в сутки), культивированного на питательной среде SP-I (BM1); 3 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 1,37 г/л ПАБК (BM1PABA1); 4 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 2,74 г/л ПАБК (BM1PABA2); 5 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на питательной среде SP-I (BM2); 4 группы самок по 6 крыс в каждой группе: контрольная и 3 опытные: 1 группа – стандартный рацион питания (контроль), 2 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (здесь и далее – 250 мг/кг массы тела в сутки), культивированного на питательной среде SP-I (BM1); 3 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 1,37 г/л ПАБК (BM1PABA1); 4 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на питательной среде SP-I (BM2).

Исследования по измерению массы тела проводили как в обычных физиологических условиях, так и при тепловом стрессе, так как многочисленные исследования адаптивных возможностей организма сельскохозяйственных животных свидетельствуют о том, что под воздействием острого чрезмерного, а также хронического стресса животные заметно

теряют в весе, при этом существенно снижается резистентность их организма к различным заболеваниям [55, 56]. По мере индустриализации сельского хозяйства проблема стресса всё больше обостряется, что обусловлено разнообразными причинами и факторами. Одним из важнейших факторов, изменение которого может повлечь за собой серьезные сдвиги в адаптационных механизмах животных, является температура воздуха [34]. Этот фактор имеет очень важное значение для теплокровных животных, у которых существует температурный гомеостаз, поддерживающий относительно постоянную температуру тела. Животные, которые не подвергались тепловому стрессу, в течение всего эксперимента находились в помещении с системой кондиционирования (температура воздуха в помещении составляла +22+24°С. Другая часть животных на 3-й и 4-й неделях ежедневно подвергались тепловому стрессу путем пребывания в жаркий период года в помещении без вентиляции воздуха. Температура воздуха в дневное время суток (на протяжении 4-х часов) составляла +34+36°С.

Оценка влияния биомассы штамма Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 *и Streptomyces fradiae CNMN-Ac-11 на плодовитость подопытных животных

Исследования проводили на 32 белых лабораторных крысах обоих полов (8 самцов, 24 самки). Для проведения эксперимента животные были разбиты на 4 группы (2 самца и 6 самок в каждой группе): контрольная и 3 опытные: 1 группа – стандартный рацион питания (контроль); 2 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (здесь и далее – 250 мг/кг массы тела в сутки), культивированного на питательной среде SP-I (BM1); 3 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 1,37 г/л ПАБК (BM1PABA1); 4 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 культивированного на питательной среде SP-I (BM2).

Животные получали указанный рацион питания в течение 10 недель при раздельном содержании самцов и самок. Спустя 10 недель производили подсадку самцов каждой группы к самкам этой же группы с целью изучения показателей их репродуктивной функции и последующего постнатального развития крысят. После наступления беременности, самок отсаживали в отдельные клетки.

Изучение фертильности проводили следующим образом: к самкам контрольной и опытной групп подсаживали самцов соответствующей группы опыта (в соотношении 2:1) на 2-е недели. В течение времени спаривания и беременности животные опытных групп получали к основному рациону питания биомассу исследуемого штамма. Фиксировали дату родов, количество крысят в помете и массу тела новорожденных крысят в опытных и

контрольной группах. Вычисляли 3 основных показателя, дающих количественную характеристику гонадотропных эффектов токсиканта: индекс фертильности = (число беременных самок/общее число самок) *100; индекс гестации = (число родивших самок/число беременных самок) *100; индекс плодовитости = число родившихся крысят/число родивших самок. Отмечали влияние биомассы на эмбриональное развитие и генеративную функцию животных путем обнаружения аномалий и уродств после их рождения [34].

2.4. Методы исследования обучения и памяти белых крыс

Метод исследования условно-рефлекторного обучения и памяти с аверсивным подкреплением – «Челночная камера»

Этот метод позволяет исследовать процессы условно-рефлекторного обучения и памяти животных с аверсивным подкреплением, а также сохранность следов памяти экспериментальных белых крыс путем определения динамики латентного периода реакции избегания на протяжении 45 суток после выработки условной реакции активного избегания [23].

Для исследования процесса ассоциативного научения использовался метод выработки условной реакции активного избегания (УРАИ) электрокожного болевого стимула. Обучение крыс проводили по методике двустороннего активного избегания в челночной камере после 10-ти минутного привыкания к экспериментальной обстановке (Рис. 2.2).

Выработка условных рефлексов проводилась по классической методике в камере 80 на 40 на 40 см. Камера разделена на две секции перегородкой, в которой имелся лаз для перехода крысы из одной секции в другую. Стенки камеры сделаны из фанеры, пол сделан из натянутых проводов, на которые подавался электрический ток. Сверху камера закрывается крышками из органического стекла. Над прозрачной крышкой камеры установлено зеркало, которое позволяет следить за крысами, находящимися внутри камеры, и исключить возможность выработки у крыс условных рефлексов на какие-либо манипуляции экспериментатора. В лазе оборудован барьер, на который проведен электрический ток, что исключает возможность случайного перехода крыс из секции в секцию и не позволяет крысам избегать перехода сидя на барьере. В каждой секции камеры имелся источник света-лампа 60 ватт. Такая конструкция установки даёт возможность экспериментатору посредством пульта управления попеременно подавать свет либо в одну, либо в другую секцию камеры. А на пол не освещенной секции подавать электрический ток. Причём имеется возможность менять напряжение в пределах 0-150 вольт, а силу в пределах 1- 4 микроампера.

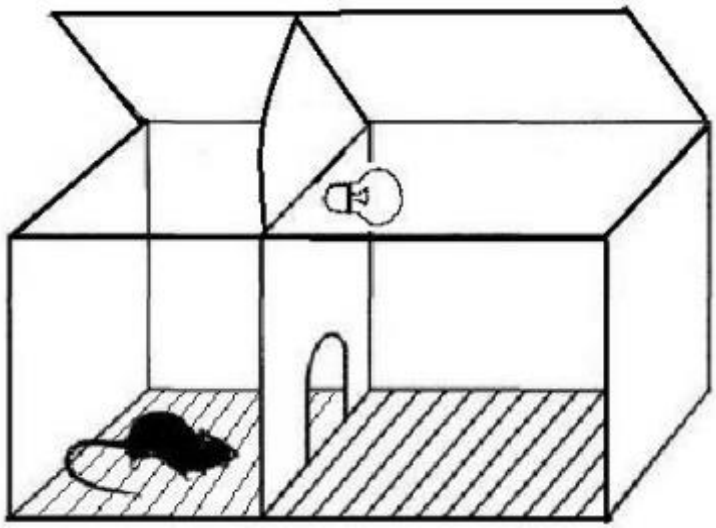


Рис.2.2. Камера для исследования условно-рефлекторного обучения и памяти с аверсивным подкреплением (челночная камера)

Электрокожное раздражение наносили животным по окончании светового сигнала (через 5 сек) через металлическую решетку, вмонтированную в пол камеры, соединенную с электростимулятором. Ежедневно предъявлялось по 10 сочетаний с интервалом 40±10 сек между сочетаниями. Условным рефлексом считалось перемещение крысы в безопасный отсек без подкрепления отрицательным стимулом. Производили подсчет доли условно-рефлекторных реакций в общем количестве побежек каждого животного (как подкрепленных, так и не подкрепленным электрокожным раздражением). Кроме этого регистрировали время перехода животного в безопасный отсек, как в случае условно-рефлекторной побежки, так и после нанесения электрокожного стимула. Животных, у которых условный рефлекс долгое время не вырабатывается, исключали из эксперимента.

С целью изучения процессов условно-рефлекторной памяти и угасания условного рефлекса определяли динамику латентного периода реакции избегания (ЛПРИ). Для этого на следующий день после выработки условного рефлекса избегания (критерием чего было проявление защитного рефлекса на включение света без подкрепления) у всех крыс измеряли фоновый ЛПРИ. Динамику ЛПРИ исследовали у крыс контрольных и опытных групп на 5-е, 10-е, 15-е, 20-е, 30-е и 45-е сутки после проведения эксперимента по выработке условных рефлексов активного избегания.

В первой серии опытов исследования были выполнены на белых лабораторных крысах-самцах породы *Wistar* в количестве n=48 разного возраста (молодые и старые). Животные каждой из возрастных групп были разбиты на три подгруппы: контрольную и 2 опытные. Животные опытных подгрупп в течение 90 дней в качестве пищевой добавки к стандартному рациону питания получали ежедневно в дозе 250 мг/кг живого веса высушенную биомассу двух местных штаммов стрептомицетов – *Streptomyces massasporeus*

CNMN-Ac-06 (BM1) или *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2), выращенных на комплексной питательной среде, с определенным ранее аминокислотным и липидным составом. Молодые животные получали биомассу, начиная с возраста 2 месяца, а старые - начиная с возраста 12 месяцев из расчета 250 мг/кг массы тела. Спустя 90 суток после начала потребления животными биомассы стрептомицетов и при достижении ими возраста – 5 месяцев (молодые) и 15 месяцев (старые), соответственно, приступали к выработке условных рефлексов. На протяжении эксперимента по выработке условных рефлексов (14 дней), а затем, при исследовании угасания реакций избегания (45 дней), опытные животные продолжали получать с кормом биомассу. В качестве контроля служили крысы соответствующих возрастных групп, содержавшиеся в тот же промежуток времени на стандартном рационе питания.

Во второй серии опытов, с целью проверки эффективности влияния ПАБК на процессы обучения и памяти, были проведены исследования на 42 белых лабораторных крысах линии *Wistar* (24 самца, 18 самок*)*. Для проведения эксперимента животные были разбиты на следующие группы: 4 группы самцов по 6 крыс в каждой группе: контрольная и 3 опытные: 1 группа – стандартный рацион питания (контроль); 2 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (здесь и далее – 250 мг/кг массы тела в сутки), культивированного на питательной среде SP-I (кукурузная мука – 2,0 г/л, соевая мука – 1,0 г/л, NaCl – 0,5 г/л, $CaCO_3$ – 0,1 г/л, pH 7,0-7,2) (BM1); 3 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I (кукурузная мука – 2,0 г/л, соевая мука – 1,0 г/л, NaCl – 0,5 г/л, $CaCO_3$ – 0,1 г/л, pH 7,0-7,2, 1,37 г/л ПАБК) (BM1PABA1); 4 группа - стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I (кукурузная мука – 2,0 г/л, соевая мука – 1,0 г/л, NaCl – 0,5 г/л, $CaCO_3$ – 0,1 г/л, pH 7,0-7,2, 2,74 г/л ПАБК) (BM1PABA2). 3 группы самок по 6 крыс в каждой группе: контрольная и 2 опытные: 1 группа – стандартный рацион питания (контроль); 2 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1); 3 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I (кукурузная мука – 2,0 г/л, соевая мука – 1,0 г/л, NaCl – 0,5 г/л, $CaCO_3$ – 0,1 г/л, pH 7,0-7,2, 1,37 г/л ПАБК) (BM1PABA1).

Метод исследования пространственного обучения и памяти с пищевым подкреплением – «Восьмирукавный радиальный лабиринт»

Этот метод позволяет исследовать пространственное обучение и память (рабочую и долговременную), который базируется на использовании инстинкта грызунов по исследованию новых мест в сочетании с пищевым подкреплением. Рабочая память рассматривается как оперативная составляющая кратковременной памяти, предназначенная для временного хранения информации во время её активной переработки мозгом, в которую собираются, сохраняются и обрабатываются сведения, необходимые для решения текущей задачи [103, 124]. В настоящее время в лабораториях разных стран данный метод вносит весомый вклад в неинвазивную оценку когнитивных нарушений, связанных с развитием различных заболеваний, в частности нейродегенерации. ВРЛ является чувствительным, надежным и гибким для тестирования лабораторных животных [140].

Для проведения эксперимента использовалась поведенческая установка, в которой радиальные рукава длиной 85 см, шириной 12,5 см, диаметром центральной части 34 см, высотой стенок 20 см, высотой над полом 70 см, выполненное из желтого ПВХ (Рис. 2.3). Каждый радиальный рукав лабиринта отделён от центральной площадки съёмной гильотинной дверкой. На конце каждого рукава располагалась картонная кормушка для пищевого подкрепления. Эксперимент состоял из следующих этапов: привыкание (в течении 5 дней), обучение и тестирование (в течении 10 дней). На этапе привыкания в течении 5 дней для знакомства с устройством животное помещали в центре лабиринта. Через 1 минуту одновременно открывали все восемь дверей с предварительным размещением на конце каждого рукава пищевой награды (кусочек отварного яйца). Лабораторное животное должно было исследовать всю установку в течении 10 мин. Фаза привыкания завершалась, когда, либо были извлечены все восемь пищевых наград, либо проходило 10 минут. С помощью цифровой видеокамеры с переносным штативом регистрировали количество посещенных рукавов лабиринта и количество съеденных кусочков яйца (максимум 8) [140].



Рис. 2.3. Установка для исследования пространственного обучения и памяти с пищевым подкреплением (восьмирукавный радиальный лабиринт)

Животных тестировали один раз в день в течение 10 дней. Каждое испытание состояло из трех фаз: фазы обучения, фазы задержки и фазы тестирования, которые всегда проводились одинаково (Рис. 2.4). В течении эксперимента на 8 и 9 дни делали перерыв, чтобы на 10-й день оценить активацию долговременной памяти. Оценка пространственной долговременной памяти осуществлялась на 30-й день эксперимента.

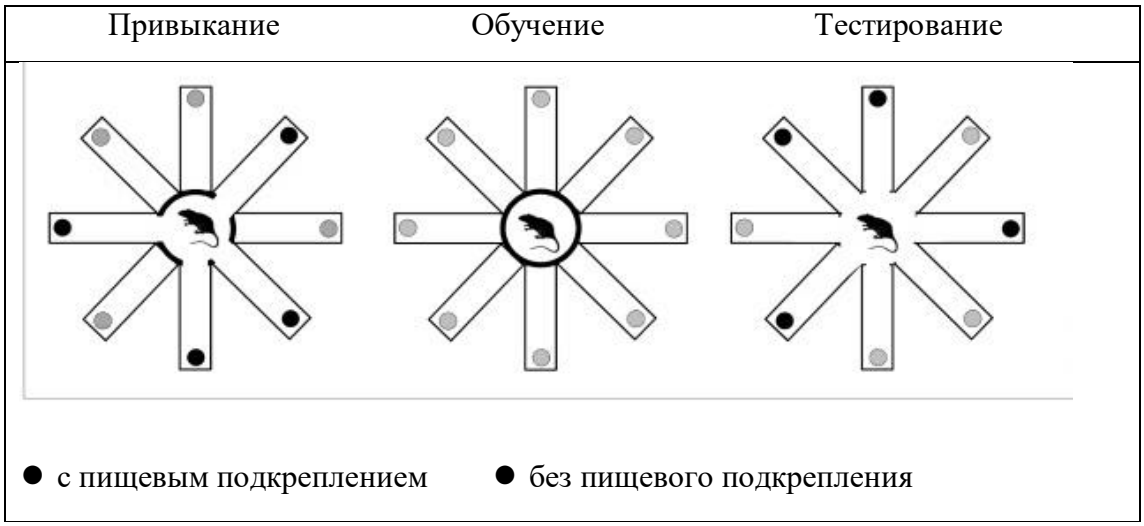


Рис. 2.4. Процедура тестирования в восьмирукавном радиальном лабиринте: фазы обучения и тестирования, разделенных «задержкой» продолжительностью 30 секунд или 10 минут

На этапе обучения четыре случайно выбранных рукава были открыты, а остальные четыре рукава лабиринта были заблокированы гильотинными дверцами. Крысам разрешали войти в четыре открытых рукава и извлечь пищевую награду в течение 5 минут. После получения всех четырех наград животное оставляли в центре лабиринта с длительностью фазы задержки (ДФЗ) 30 секунд или 10 минут. После удержания все восемь дверей были открыты одновременно, и животное приступало к фазе тестирования. На этом этапе пищевая награда была помещена в те рукава, которые были заблокированы на этапе обучения. Таким образом, ожидалось, что крыса попадет в те рукава, которые не были посещены на этапе обучения. Фаза тестирования начиналась с открытия дверей, позволяя крысе войти в рукава, и заканчивалась тем, что крыса извлекала последнюю пищевую награду.

В ходе эксперимента фиксировались количество правильных (корректных) входов в рукава (с извлечением пищевой награды) и число ошибок (любой неправильный (некорректный) вход в рукав) с последующей оценкой пространственной памяти (в баллах) по формуле: (количество правильных входов) – (количество неправильных входов) / (количество правильных входов) + (количество неправильных входов). Способ подсчета описывает индивидуальную производительность памяти: показатель 1, отражает безошибочное выполнение испытания, а показатель -1, указывает на противоположный результат (ни одного правильного входа) [159].

В первой серии опытов, с целью исследования влияния биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированных на комплексной питательной среде, были взяты животные, в количестве 72 белых лабораторных крыс линии *Wistar* (36 самцов и 36 самок). Группы были разбиты с ДФЗ 30 с (18 самцов и 18 самок) и ДФЗ 10 мин (18 самцов и 18 самок), в каждой из которых по три подгруппы: по 6 крыс – контрольную и две опытные:

1 группа – стандартный рацион питания (контроль);

2 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (здесь и далее – 250 мг/кг массы тела в сутки), культивированного на питательной среде SP-I (кукурузная мука – 2,0 г/л, соевая мука – 1,0 г/л, NaCl – 0,5 г/л, $CaCO_3$ – 0,1 г/л, pH 7,0-7,2) (BM1);

3 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на питательной среде SP-I (кукурузная мука – 2,0 г/л, соевая мука – 1,0 г/л, NaCl – 0,5 г/л, $CaCO_3$ – 0,1 г/л, pH 7,0-7,2) (BM2).

Вторая серия опытов, с целью проверки эффективности влияния ПАБК на процессы обучения и памяти в восьмирукавном радиальном лабиринте, была проведена на 96 белых

лабораторных крысах линии *Wistar* (48 самцов, 48 самок*)*. Для проведения эксперимента животные были разбиты на следующие группы с ДФЗ 30 с (24 самца и 24 самки) и ДФЗ 10 мин (24 самца и 24 самки), в каждой из которых: 4 группы самцов по 6 крыс в каждой группе: контрольная и 3 опытные:

1 группа – стандартный рацион питания (контроль);

2 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (здесь и далее – 250 мг/кг массы тела в сутки), культивированного на питательной среде SP-I (кукурузная мука – 2,0 г/л, соевая мука – 1,0 г/л, NaCl – 0,5 г/л, $CaCO_3$ – 0,1 г/л, pH 7,0-7,2) (BM1);

3 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I (кукурузная мука – 2,0 г/л, соевая мука – 1,0 г/л, NaCl – 0,5 г/л, $CaCO_3$ – 0,1 г/л, pH 7,0-7,2, 1,37 г/л ПАБК) (BM1PABA1);

4 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I (кукурузная мука – 2,0 г/л, соевая мука – 1,0 г/л, NaCl – 0,5 г/л, $CaCO_3$ – 0,1 г/л, pH 7,0-7,2, 2,74 г/л ПАБК) (BM1PABA2).

4 группы самок по 6 крыс в каждой группе: контрольная и 3 опытные:

1 группа – стандартный рацион питания (контроль);

2 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1);

3 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I (кукурузная мука – 2,0 г/л, соевая мука – 1,0 г/л, NaCl – 0,5 г/л, $CaCO_3$ – 0,1 г/л, pH 7,0-7,2, 1,37 г/л ПАБК) (BM1PABA1).

4 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I (кукурузная мука – 2,0 г/л, соевая мука – 1,0 г/л, NaCl – 0,5 г/л, $CaCO_3$ – 0,1 г/л, pH 7,0-7,2, 2,74 г/л ПАБК) (BM1PABA2).

Метод исследования пространственного обучения и памяти без подкрепления – «Водный лабиринт Морриса»

Этот метод позволяет исследовать процессы пространственного обучения и памяти (рабочая и долговременная), где рабочая память рассматривается как оперативная составляющая кратковременной памяти [57, 181]. Данная установка предназначена для оценки пространственного обучения, где, в отличие от ассоциативного обучения,

пространственное обучение не требует присутствия локальных ориентиров, например, обонятельных. Важным моментом при анализе результатов исследования в установке «Водный лабиринт Морриса» является тот факт, что измерение времени, требуемого для прохождения теста, сложно назвать объективным критерием для изучения пространственного обучения и памяти, поскольку его значение сильно зависит от скорости движения животного в бассейне (Рис. 2.4). По этой причине, в процессе тестирования измерялись дополнительные параметры, а именно, измерение времени, проводимого животным в области «целевого сектора» (области, находящейся в непосредственной близости от скрытой платформы), траектории животного в бассейне и ее длины. Поэтому особенность данной методики в том, что для прохождения данной установки экспериментальным животным необходимо использовать пространственную память, так как никаких локальных сигналов нет – грызунам необходимо определить по памяти местоположение объекта, который они никогда не видели и не могли услышать [57].

Данная методика основана на том, что животное ищет наименьшую дистанцию до скрытой под водой платформы на основании предыдущей памяти об её местонахождении. Водный лабиринт Морриса представляет собой бассейн, заполненный непрозрачной, окрашенной порошковым обезжиренным молоком, водопроводной водой, температура которой должна быть около 26°С (Рис. 2.5). Поверхность бассейна была условно разделена на четыре сектора (I – целевой; II, III, IV – не целевые). В центр нижнего правого сектора (первый, или целевой, сектор) опускали платформу диаметром 6 см, верхняя поверхность которой была скрыта на 0,5 см под водой и невидима для крысы. Движения животного внутри бассейна регистрировали с помощью цифровой видеокамеры [57]. Опыт состоял из фазы обучения и фазы тестирования. Животное в течение 4 дней проходило фазу обучения, а именно – находить платформу. Ежедневное обучение включало 3 попытки с интервалом 30 с. В ходе данных попыток животное последовательно помещали в различные секторы II, III или IV (по часовой стрелке от целевого сектора). В случаи, если крыса не могла найти платформу, ее принудительно помещали на нее.

Данный эксперимент в водном лабиринте Морриса давал возможность исследовать: 1) латентное время освобождения (с), в течение которого крыса находила платформу, забиралась на нее; 2) путь (см), который животное проходило от места помещения в воду до самой платформы. Если животное не находило скрытую платформы, то значение латентного времени принимали равным 60 с. Латентное время и пройденный путь для каждого дня вычисляли как среднее значение. Эффективность обучения оценивали по уменьшению значений латентного времени и пройденного пути. Проверку пространственной памяти исследовали 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 и вычисляли средние значения для 3 попыток (%). 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 активацию пространственной долговременной памяти и длительность удержания следов памяти.

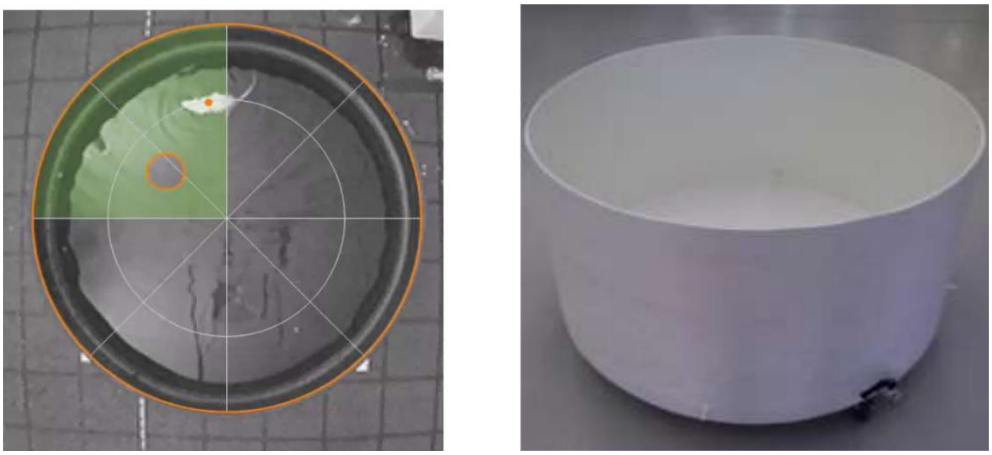


Рис. 2.5. Установка для исследования пространственного обучения и памяти без подкрепления (водный лабиринт Морриса)

В первой серии опытов, с целью исследования влияния биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированных на комплексной питательной среде SP-I, взяты животные в количестве 18 белых крыс-самцов линии *Wistar,* которые были разбиты на три подгруппы в каждой по 6 крыс – контрольную и две опытные:

1 группа – стандартный рацион питания (контроль);

2 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (здесь и далее – 250 мг/кг массы тела в сутки), культивированного на питательной среде SP-I (кукурузная мука – 2,0 г/л, соевая мука – 1,0 г/л, NaCl – 0,5 г/л, $CaCO_3$ – 0,1 г/л, pH 7,0-7,2) (BM1);

3 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на питательной среде SP-I (кукурузная мука – 2,0 г/л, соевая мука – 1,0 г/л, NaCl – 0,5 г/л, $CaCO_3$ – 0,1 г/л, pH 7,0-7,2) (BM2);

Вторая серия опытов, с целью проверки эффективности влияния ПАБК на процессы обучения и памяти в водном лабиринте Морриса, была проведена на 24 белых крысах-

самцах линии *Wistar*. Для проведения эксперимента животные были разбиты на следующие группы: 4 группы самцов по 6 крыс в каждой группе: контрольная и 3 опытные:

1 группа – стандартный рацион питания (контроль);

2 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (здесь и далее – 250 мг/кг массы тела в сутки), культивированного на питательной среде SP-I (кукурузная мука – 2,0 г/л, соевая мука – 1,0 г/л, NaCl – 0,5 г/л, $CaCO_3$ – 0,1 г/л, pH 7,0-7,2) (BM1);

3 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I (кукурузная мука – 2,0 г/л, соевая мука – 1,0 г/л, NaCl – 0,5 г/л, $CaCO_3$ – 0,1 г/л, pH 7,0-7,2, 1,37 г/л ПАБК) (BM1PABA1);

4 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I (кукурузная мука – 2,0 г/л, соевая мука – 1,0 г/л, NaCl – 0,5 г/л, $CaCO_3$ – 0,1 г/л, pH 7,0-7,2, 2,74 г/л ПАБК) (BM1PABA2).

Статистический анализ данных. Математический анализ данных был выполнен при помощи программы Microsoft Excel 2016. Все экспериментальные данные были обработаны с помощью статистического анализа, при этом были использованы следующие методы: определение средней величины и среднего квадратичного отклонения, определение достоверности различия по критерию Стьюдента, определение средней ошибки. Впоследствии вычисленный критерий Стьюдента сопоставляли с табличным и находили вероятность P (P = 1-g, g – вероятность, с которой различие верно), с которой различие может быть ошибочно, т.е. уровень значимости (0,05 или 0,01) [19].

2.5. Выводы к главе 2

1. В работе были использованы современные общепринятые микробиологические методы посевов стрептомицетов на комплексные питательные среды, в том числе, содержащие ПАБК, биохимические методы определения концентрации липидов, их фракций, аминокислот и их групп, которые позволили получить биомассу в достаточном количестве для кормления белых крыс, обладающую предположительно наилучшим липидным и аминокислотным составом в отношении процессов обучения и памяти.

2. С целью изучения условно-рефлекторного обучения и памяти с аверсивным подкреплением использовали метод исследования динамики условного рефлекса активного избегания и латентного периода реакции избегания с использованием аппарата «Челночная

камера», который является один из самых эффективных способов оценки когнитивных способностей грызунов.

3. С целью исследования пространственного обучения и памяти использовали аппараты «Восьмирукавный радиальный лабиринт» с пищевым подкреплением и «Водный лабиринт Морриса», которые в настоящее время широко используются в научных лабораториях разных стран для исследования когнитивных функций в различных условиях и являются чувствительными, надежными и гибкими при тестировании поведения лабораторных животных.

3. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ БИОМАССЫ ШТАММОВ *STREPTOMYCES MASSASPOREUS* CNMN-AC-06 И *STREPTOMYCES FRADIAE* CNMN-AC-11, ИСПОЛЬЗУЕМОЙ В ОПЫТАХ ПО ИЗУЧЕНИЮ ПРОЦЕССОВ ОБУЧЕНИЯ И ПАМЯТИ

3.1. Образование биомассы, качественный и количественный состав липидов у штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 *и Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 при культивировании на комплексных средах M-I, SP-I, SP-III

Для изучения продуктивности штаммов *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 и *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, находящихся на хранении Национальной коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии и биотехнологии, с целью выбора среды для культивирования, способствующей образованию биомассы в количестве необходимом для кормления животных и предположительно обладающей более сильным влиянием на исследуемые процессы, были проведены эксперименты при культивировании на комплексных средах M-I, SP-I, SP-III (Табл. 3.1).

Исследуемые штаммы культивировали на трех комплексных жидких средах. Результаты проведенных исследований показали, что при культивировании штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 на среде M-I выход биомассы составил 10,56±1,29 г/л, а штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 соответственно 5,95±1,26 г/л (Табл. 3.1). На среде SP-I с добавлением 3,0 г K_2HPO_4, происходило увеличение выхода биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 6,09±2,60 г/л, *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 – 11,53±0,83 г/л, соответственно (Табл. 3.1). Процент общих липидов в биомассе штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на среде SP-I – 15,85±0,49%, а на среде M-I и SP-III меньший результат (8,76±1,02 и 12,76±0,26%, соответственно) по сравнению со штаммом *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (Табл. 3.1).

Таблица 3.1. Образование биомассы и общих липидов у штаммов *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 и *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 после хранения периодическими пересевами при культивировании на комплексных средах

Питательная среда	*АСБ, г/л*		*Общие липиды, % в АСБ*	
Штамм	*Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11	*Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06	*Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11	*Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06
M-I	5,95±1,26	10,56±1,29	8,76±1,02	11,96±0,29
SP-I	6,09±2,60	11,53±0,83**	15,85±0,49*,**	19,52±0,45*,**
SP-III	9,61±0,28*,**	9,86±0,49*	12,76±0,26*	13,52±0,67*

Примечание. * – достоверные различия SP-I и/или SP-III по сравнению с M-I (P<0,05), ** – достоверные различия между SP-I и SP-III (P<0,01-0,05)

Анализируя данные исследований прошлых лет, выявлено, что длительное хранение влияет на образование биомассы и общих липидов при культивировании штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на комплексной среде M-I [8]. Так, по результатам 2015 года выход биомассы составил 14,15 г/л, что значительно выше, чем в 2019 году – 5,95 г/л соответственно. Количество общих липидов в биомассе при культивировании штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 в процентном соотношении выше: в 2015 году – 12,11%, а в 2019 году – 8,76%. Результаты проведенных нами исследований (2019 год) при культивировании штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 на среде SP-I после длительного хранения выход биомассы составил 10,53 г/л в сравнении с 2006 годом (12,26 г/л), процент общих липидов после 13 лет хранения больше на среде SP-I (19,52%), чем после 6 лет хранения – 12,81г/л [10].

Методом тонкослойной хроматографии было установлено, что в состав липидов изучаемого штамма стрептомицетов входят: фосфолипиды, стерины, моно-, ди- и триглицериды, эфиры стеринов, воска и неиндифицированные фракции. Опыты показали, что при постоянстве качественного состава липидов стрептомицетов, культивируемых на средах M-I, SP-I, SP-III, происходят количественные изменения основных липидных фракций.

Анализ количества основных липидных фракций биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 после культивирования на трех комплексных средах показал, что наибольшее количество фосфолипидов при культивировании штамма на среде SP-I и SP-III, то есть, количество такой важной физиологически активной липидной фракции как

фосфолипиды можно увеличить, культивируя этот штамм на комплексных средах (Рис. 3.1). Следует также отметить, что количество другой физиологически активной липидной фракции – стеринов, можно повысить, если культивирование штамма проводится на средах M-I и SP-III: на среде M-I в биомассе исследуемого штамма количество стеринов составило 12,97%, на среде SP-III – 12,72%. Максимальное количество триглицеридов при культивировании штамма отмечено на среде SP-I – 14,47%, а минимальный результат – на среде SP-III (12,47%) (Рис.3.1).

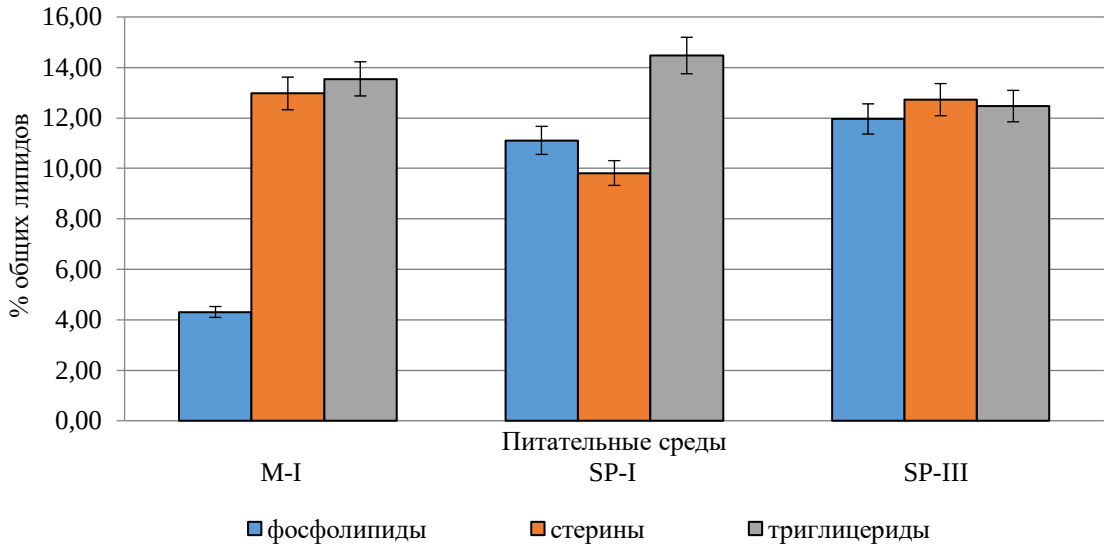


Рис. 3.1. Количество основных липидных фракций биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 при культивировании на комплексных средах

Анализируя изменения количества вторичных липидных фракций у штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 можно сказать, что в зависимости от состава питательной среды культивирования, изменяется процент моно- и диглицеридов, эфиров стеринов и восков (Рис. 3.2). Видно, что наименьшее количество моно- и диглицеридов, восков в общих липидах биомассы этого штамма содержится при культивировании его на среде SP-III, эфиров стеринов – на среде SP-I. Наилучший результат для моно- и диглицеридов получен при культивировании штамма на среде SP-I, а эфиров стеринов и восков – на комплексной питательной среде M-I.

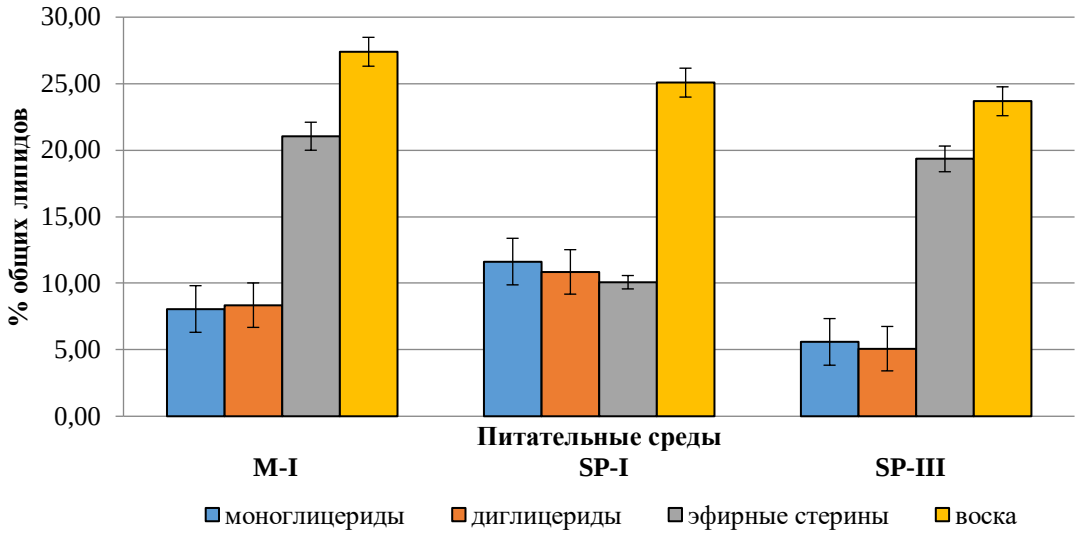


Рис. 3.2. Количество вторичных липидных фракций биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 при культивировании на комплексных средах

Анализ количества основных липидных фракций в биомассе штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 после культивирования на трех питательных средах показал, что максимальный процент фосфолипидов составил 12,15% при культивировании на среде SP-I, то есть количество таких важных физиологических липидных фракций как фосфолипиды можно увеличить, культивируя этот штамм на комплексных средах (Рис. 3.3). Следует также отметить, что количество другой физиологической липидной фракции – стеринов, можно повысить, культивируя штамм на средах SP-I и SP-III.

Так, если на среде M-I, в биомассе штамма количество стеринов составило 8,96%, то на средах с добавлением соевой муки количество этих липидных фракций увеличилось до 12,15% на SP-I и до 14,17% на SP-III. Количество триглицеридов при культивировании штамма составило соответственно 13,02%, 10,45% и 12,12% (среды M-1, SP-I и SP-III).

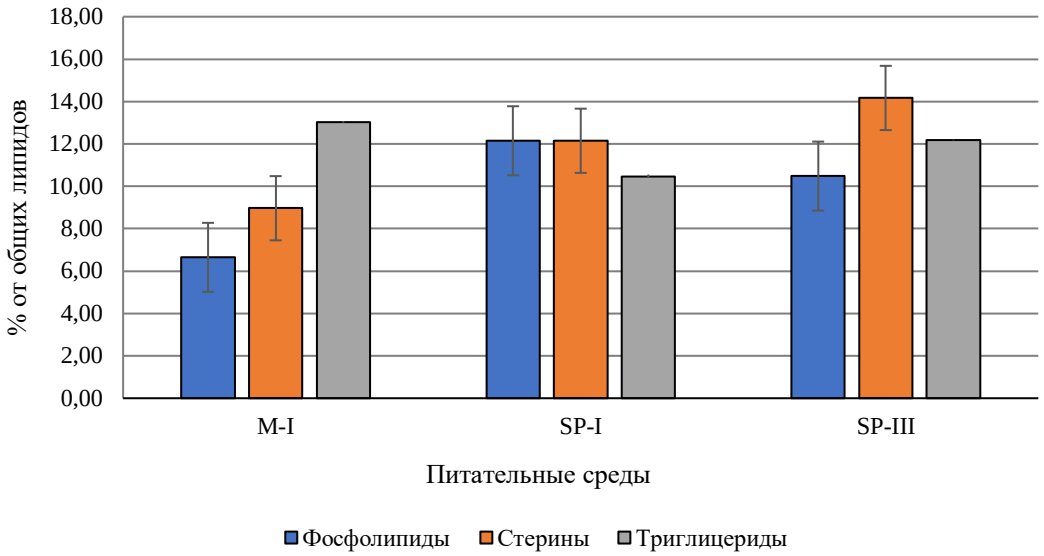


Рис. 3.3. Количество основных липидных фракций биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 при культивировании на разных средах

Анализируя изменения количества вторичных липидных фракций у штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 можно сказать, что в зависимости от состава питательной среды культивирования, изменяется процент моно- и диглицеридов, эфиров стеринов и восков (Рис. 3.4). Видно, что наименьшее количество моно- и диглицеридов в общих липидах биомассы этого штамма содержится при культивировании его на среде SP-III, эфиров стеринов – на среде SP-I, а восков на среде M-I. Количественные изменения образуемой биомассы в процессе длительного хранения периодическими пересевами и изменениями соединения в ней липидов объяснимо высокой гетерогенностью стрептомицетов: длительное хранение вызывает изменения в соотношении естественных вариантов штамма, возникающих в результате воздействия на штамм разного рода факторов окружающей среды.

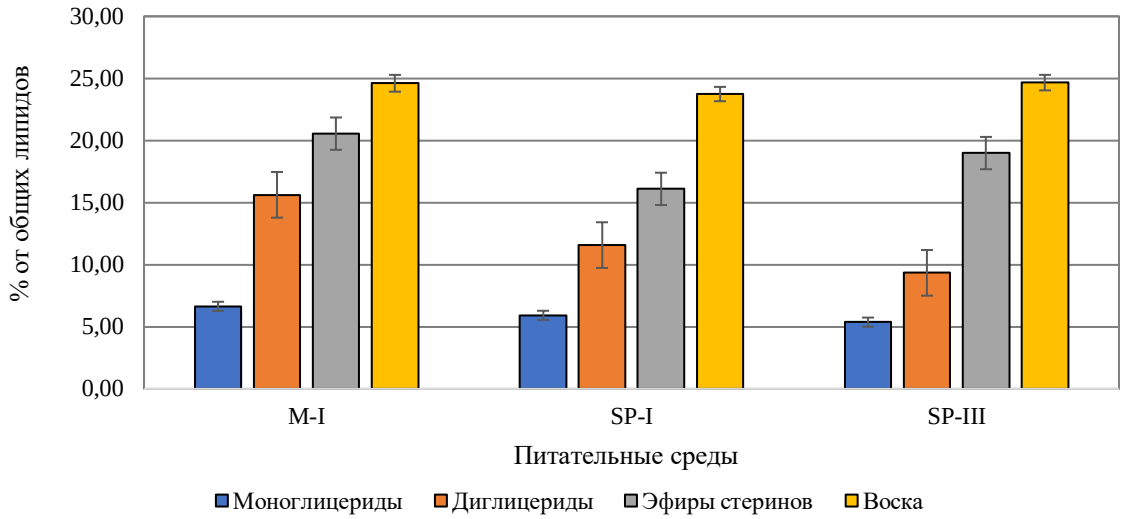


Рис. 3.4. Количество вторичных липидных фракций биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 при культивировании на комплексных средах

Таким образом, анализируя способность стрептомицетов синтезировать физиологически активные липидные фракции после культивирования их на различных средах, следует отметить, что состав питательных сред имеет важное значение. Проведенные исследования показали, что наибольшее количество биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 отмечено после культивирования на питательной среде SP-I (11,53 г/л) и максимальный процент общих липидов после культивирования на среде SP-I (19,52%).

При сравнении коллекционных штаммов, выделенных из почв России, Германии, Аргентины и Японии, по способности синтезировать также основные липидные фракции как фосфолипиды, стерины и триглицериды, установлено, что после культивирования на сложной среде M-I, штамма *Streptomyces griseus* 15 доля фосфолипидов в липидах – 4,2%, стеринов 4,1% и триглицеридов – 72,8%, у *Streptomyces griseofavillus* 31 – фосфолипидов 3,8%, стеринов 9,1% и триглицеридов 43,0%, тогда как у *Streptomyces galbus*1616-Z-3 – фосфолипидов 4,4%, стеринов 5,0% и триглицеридов 40,7% , *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 – фосфолипидов 13,78%, стеринов 11,27% [1, 8]. Следовательно, продуктивность штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, полученных из почв центральной части Республики Молдова, достаточно высока по сравнению с вышеупомянутого штамма стрептомицетов.

В литературе представлены экспериментальные доказательства незаменимой роли липидов в синаптической пластичности нейронов [31]. Доказано, что изменение внутриклеточной динамики обмена липидов (в особенности фосфолипидов) в ткани гиппокампа изменяет синаптическую пластичность нейронов, составляющую основу

механизмов памяти. Снижение уровня фосфолипидов в клетках срезов гиппокампа приводило к нарушениям долгосрочной потенциации и пресинаптического компонента проводимости нервных импульсов. Обнаружено, что нарушение динамики и снижение содержания фосфолипидов в клетках вызывает нейродегенерацию в гиппокампе [31].

Проведенные опыты показали, что для увеличения количества биомассы штаммы *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 лучше всего культивировать на комплексной среде SP-I, так как она способствует также и увеличению содержания в биомассе липидов, и, что особенно важно – увеличению количества таких физиологически важных липидных фракций как фосфолипиды и стерины, которые играют важную роль в передаче нервных импульсов и синаптической пластичности, являющихся важными параметрами процессов памяти.

3.2. Качественный и количественный состав липидов биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 при культивировании на комплексной среде с добавлением парааминобензойной кислоты

По данным литературы, добавление в питательную среду парааминобензойной кислоты (витамин B_{10}) – способствовало увеличению продукции стрептомицетами различных бензастатинов, которые являются мощными нейропротекторными веществами. ПАБК, а также ее производные обладают широким спектром биологического действия, участвуют в обменных процессах, являются важным фактором роста для многих способных к синтезу витаминов облигатных микроорганизмов, которые населяют кишечник животных и принимают участие в поддержании баланса кишечной микрофлоры. С таким непрямым действием, возможно, и связано обнаруженное в некоторых исследованиях стимулирующее влияние парааминобензойной кислоты на рост и развитие молодых животных, ее позитивные эффекты в отношении устойчивости и физиологического состояния организма животных в неблагоприятных условиях окружающей среды [25, 65, 129].

На основе представленных результатов ранее, нами был выбран штамм *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 для дальнейших исследований при культивировании на комплексной питательной среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты. С целью улучшения качественного и количественного состава биомассы для процессов обучения и памяти у экспериментальных животных были проведены исследования по определению количества биомассы и содержания в ней липидов при росте на комплексной среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты в трех концентрациях: 0,685, 1,37 и 2,74 г/л, так как по литературным данным было показано, что плотность парааминобензойной кислоты

составляет 1,374 г/см^2, соответственно на 100 мл дистиллированной воды было необходимо 137 мг [29].

В лабораторных условиях для получения биомассы проводили культивирование штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 на следующих питательных средах (г/л): 1 – среда SP-I (контроль): кукурузная мука – 20,0, соевая мука – 10,0, NaCl – 5,0, $CaCO_3$ – 1,0, глюкоза – 10,0, pH 7,0-7,2; 2 – среда SP-I: кукурузная мука – 20,0, соевая мука – 1,.0, NaCl – 5,0, $CaCO_3$ – 1,0, 4-аминобензойная кислота – 0,685, глюкоза – 10,0, pH 7,0-7,2; 3 – среда SP-I: кукурузная мука – 20,0, соевая мука – 10,0, NaCl – 5,0, $CaCO_3$ – 1,0, 4-аминобензойная кислота – 1,37, глюкоза – 10,0, pH 7,0-7,2; 4 – среда SP-I: кукурузная мука – 2,0, соевая мука – 10,0, NaCl – 5,0, $CaCO_3$ – 1,0, 4-аминобензойная кислота – 2,74, глюкоза – 10,0, pH 7,0-7,2.

В результате проведенных исследований установлено, что при культивировании на комплексной среде SP-I штамма *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 выход биомассы составил 7,99±1,12 г/л и содержание общих липидов в ней – 1,48±0,19 г/л. При культивировании на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты в концентрации 0,685 г/л выход биомассы составил – 10,91±1,07 г/л, а количество общих липидов – 1,49±0,14 г/л. Наибольший выход биомассы получен при культивировании штамма на среде с добавлением 1,37 г/л ПАБК – 24,99±1,1 г/л, а количество общих липидов в ней – 1,96±0,08 г/л, что составило 132,28% к контролю (Табл. 3.2).

Таблица 3.2. Накопление биомассы и липидов штаммом *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 при культивировании на комплексной среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты

Среда культивирования	***Биомасса***		***Общие липиды***	
	АСБ, г/л	***% к контролю***	***Липиды, г/л***	***% к контролю***
1) SP-I – (контроль)	7,99±1,12	-	1,48±0,19	-
2) SP-I + ПАБК 0,685 г/л	10,91±1,07*	136,54*	1,49±0,14	100,84
3) SP-I+ ПАБК 1,37 г/л	24,99±1,1*	312,76*	1,96±0,08*	132,28*
4) SP-I+ПАБК 2,74 г/л	15,41±0,78*	192,86*	1,85±0,12*	124,94*

Примечание. * – достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05).

Сравнивая способность образовывать основные и вторичные липидные фракции у исследуемого штамма при культивировании на комплексной среде SP-I с добавлением ПАБК в различных концентрациях, можно отметить, что количество физиологически важных липидных фракций (фосфолипиды, стерины и триглицериды) значительно изменилось.

Как видно на рисунке 3.5, добавление в комплексную среду SP-I ПАБК в концентрациях 0,685 – 2,74 г/л вызывало изменения количества фосфолипидной фракции. Так, например, при добавлении в среду ПАБК 0,685 г/л количество фосфолипидов составляло 21,48%, а при добавлении в среду ПАБК в количестве 2,74 – 24,39% при 20,70% фосфолипидов в контроле.

Культивирование исследуемого штамма стрептомицетов на комплексной среде с добавлением ПАБК способствовало заметному увеличению количества стеринов в липидах, что составляло 10,67; 13,38 и 20,54% при 6,80% в контроле.

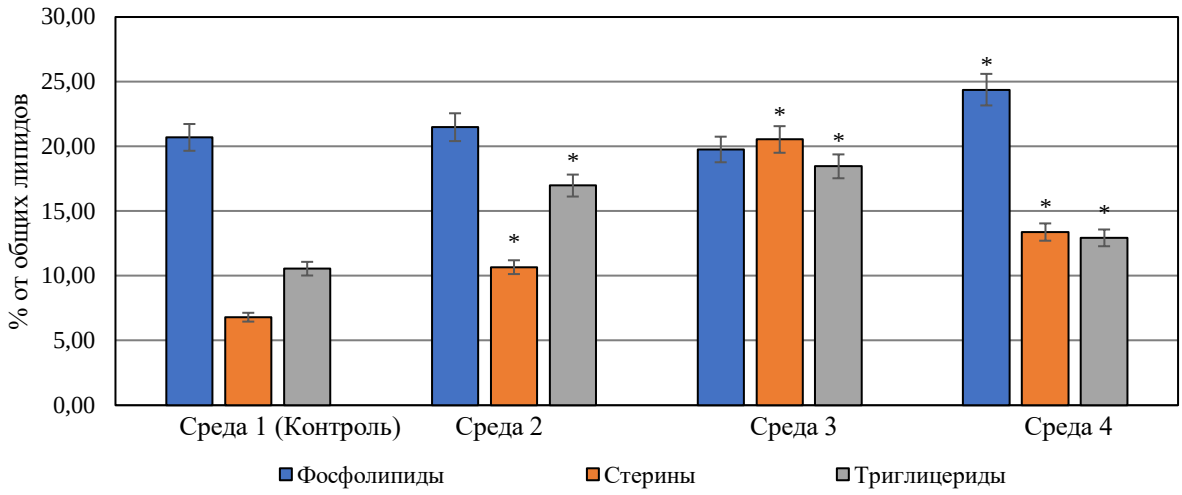


Рис. 3.5. Количество основных липидных фракций биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 после культивирования на комплексной среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты, *– достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,01-0,05).

У такой липидной фракции, как триглицериды, также замечены изменения в количестве по сравнению с контролем. Так, например, рост штамма на среде SP-1 с добавлением 0,685 г/л ПАБК увеличил количество триглицеридов до 16,97% в сравнении с контролем 10,55%. Присутствие ПАБК в комплексной среде в количестве 2,74 г/л изменило количество триглицеридной фракции в липидах биомассы изучаемого штамма до 12,93%. Лучшие результаты отмечены при культивировании штамма на комплексной среде с

добавлением 1,37 г/л ПАБК: количество фракции триглицеридов в липидах биомассы штамма составило 18,46% при 10,55 % в контроле. Анализ содержания основных липидных фракций показал, что при культивировании исследуемого штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 максимальное количество фосфолипидов на среде №4 (24,39%), триглицеридов – на среде №3 (18,46%), а стериновой фракции – 20,54% – при росте исследуемого штамма на среде №3 (Рис. 3.5).

Изменение содержания вторичных липидных фракций в биомассе у изучаемого штамма стрептомицетов после культивирования на комплексной среде с добавлением разного количества ПАБК представлено на рисунке 3.6. Анализируя характер разделения липидов на фракции на тонкослойной хроматограмме следует отметить наличие четких пятен каждой фракции. Однако было замечено, что фракции моно- и диглицеридов были одним пятном, которое по величине на пластинках было меньшего размера, чем в контроле (после пересчета – в опытных образцах липидов – 13,55; 6,34 и 12,18% при 16,74 % в контроле). На рисунке 3.6 четко видно, что при наличии в комплексной среде парааминобензойной кислоты в 3-х различных количествах доля фракции эфиров стеринов незначительно увеличилась в сравнении с контролем, тогда как фракция восков существенно уменьшилась – 16,41–18,44% при 25,08% в контроле.

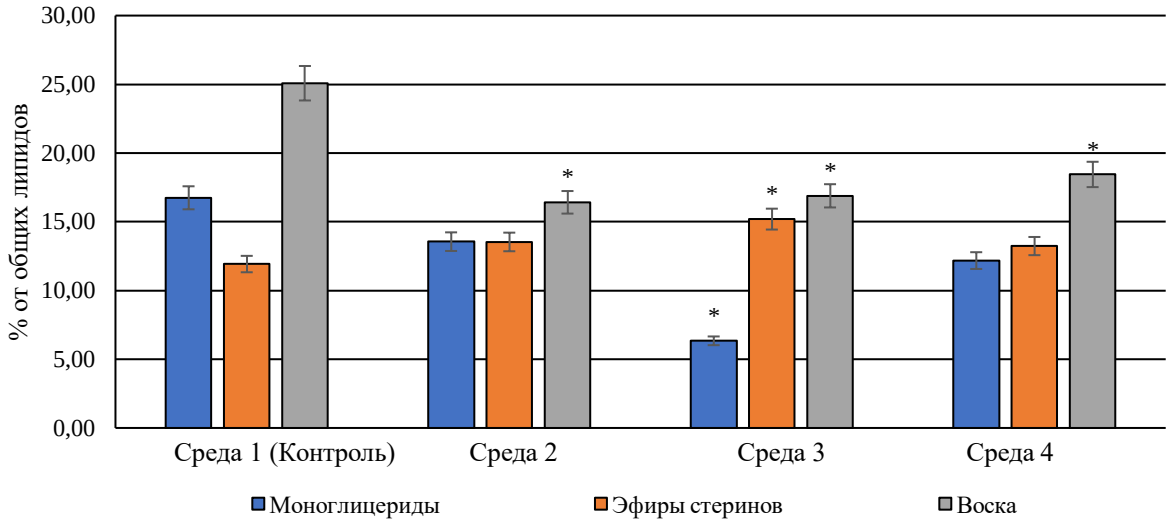


Рис. 3.6. Количество вторичных липидных фракций биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 после культивирования на комплексной среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты, *– достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,01-0,05).

Ранее проведенные нами исследования показали, что наибольшее количество биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 было получено после культивирования на комплексной питательной среде SP-I, содержащей соевую и

кукурузную муку (10,56±1,29 г/л), а процент общих липидов составил 19,52%. Опыты показали, что рост и липогенез исследуемого штамма изменяются и зависят от состава питательных сред.

Проведенные исследования показали, что максимальное количество биомассы по сравнению с контролем было получено при культивировании на питательной среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты в концентрации 1,37 г/л – 24,99±1,12 г/л, а количество общих липидов в ней – 1,96±0,08 г/л, что составило 132,28% к контролю.

Анализируя данные о способности стрептомицетов синтезировать физиологически активные липидные фракции после культивирования на комплексных питательных средах, следует отметить, что при добавлении парааминобензойной кислоты в разных концентрациях в питательную среду SP-I максимальное количество фосфолипидов составило на среде № 3 – 24,39%, триглицеридов на среде № 2 – 18,46%, стериновой фракции – 20,54% на среде № 2. При исследовании вторичных липидных фракций биомассы штамма *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 высокий процент показали моноглицериды при росте на среде № 1 – 13,55%, эфиры стеринов – 15,19% на среде № 2 и воска – на среде № 3 (18,44%).

Полученные результаты показывают перспективы использования ПАБК для стимуляции накопления биомассы и увеличения количества физиологически важных липидных фракций при культивировании стрептомицетов на различных комплексных питательных средах.

Таким образом, проведенные исследования показали, что состав среды играет существенную роль в продуктивности биомассы и липидов у изучаемого штамма, а также для стимуляции синтеза метаболитов, обладающих нейропротекторным и нейротропным действием. Количество физиологически важных липидных фракций можно увеличить, культивируя штамм *S. massasporeus* CNMN-Ac-06, выделенный из почвы центральной части Республики Молдова, на комплексной среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты в различных концентрациях.

3.3. Аминокислотный состав биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, выращенного на комплексной среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты

Важнейшим показателем биосинтетической активности стрептомицетов следует считать образование аминокислот, так как среди микроорганизмов по количеству активных штаммов, синтезирующие аминокислоты, стрептомицеты занимают одно из первых мест [36]. Известно, что аминокислоты являются одним из наиболее естественных 74

универсальных регуляторов обмена веществ организма и используются для синтеза белков. Известно около 200 природных аминокислот, из них только 20 входят в состав белков. Эти аминокислоты называют протеиногенными — строящими белки. В организме человека наряду с протеиногенными аминокислотами можно найти и другие, которые играют иную роль, например, орнитин, β-аланин, таурин и др. Многие из протеиногенных аминокислот в организме человека выполняют важные самостоятельные функции, например, глицин, глютаминовая и аспарагиновая кислоты являются биологически активными соединениями, фенилаланин, тирозин и триптофан служат источником образования биогенных аминов и других биорегуляторов, глицин и таурин входят в состав желчных кислот. Также выделяют медиаторные аминокислоты. В основе сложной функциональной организации центральной нервной системы лежит тонкое взаимодействие между двумя основными процессами нервной деятельности – торможением и возбуждением, которые обеспечиваются химическими медиаторами. Среди них важное место занимает несколько медиаторных аминокислот – тормозных и возбуждающих. К тормозным аминокислотам относят гамма-аминомасляную килоту, глицин, таурин, проявляющие антигипоксическое, седативное, миорелаксирующее, ноотропное, анальгетическое и некоторые другие виды действия, тормозят активность нейронов продолговатого мозга. К возбуждающим аминокислотам относят глутамат и аспартат. Структурная и метаболическая близость этих аминокислот проявляется в идентичности их физиологических эффектов на нейрональном уровне. Данные аминокислоты действуют как возбуждающие нейромедиаторы во многих структурах мозга, так как участвуют в проведении сенсорного афферентного потока. Известны данные о вовлечении возбуждающих аминокислот в происхождении эпилепсии, нейродегенеративных расстройств [17, 40, 49].

Ранее проведенные исследования состава биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 показали высокое содержание таких аминокислот, как глутаминовая, аспарагиновая, глицин, пролин, которые, выполняя функции нейромедиаторов и нейромодуляторов в различных отделах головного мозга, участвуют в механизмах нейропластичности при обучении, фосфолипидов и стеринов, оказывающих влияние на процессы синаптической пластичности нейронов, что могло бы в определенной степени объяснить обнаруженные эффекты биомассы в отношении поведения экспериментальных животных. Кроме этого, исходя из данных других авторов, можно обоснованно предположить наличие в биомассе вышеуказанных штаммов стрептомицетов метаболитов, способных стимулировать и поддерживать нейрональные процессы, лежащие в основе обучения и памяти (витаминов группы В, ненасыщенных жирных кислот, флавоноидов, антоцианов и др.) [5, 10, 12]. Так,

например, *Streptomyces olivaceus* в большом количестве продуцирует витамин B_{12}. Культуры *Streptomyces griseus* 15, *Streptomyces aureoverticillatus* 1306 и *Streptomyces aurigineus* 2377 в процессе выращивания на разных средах синтезируют тиамин, рибофлавин, пиродоксин, биотин, никотиновую кислоту и витамин B_{12}. Анализируя полученные данные о предполагаемом наличии в биомассе ряда штаммов стрептомицетов специфических вторичных метаболитов с выраженными нейропротекторными свойствами в сопоставлении с полученными воспроизводимыми данными о высокой эффективности продуктов жизнедеятельности штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 в отношении условно-рефлекторного обучения и памяти, можно предположить о наличии в биомассе этих штаммов подобных по эффективности биологически активных веществ.

Исследователями была показана способность штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 к накоплению в биомассе 19 аминокислот, в том числе и 8 незаменимых, в разном количестве [8]. Важность этих аминокислот трудно переоценить. Так, треонин участвует в синтезе иммуноглобулинов, валин поддерживает в организме уровень серотонина, фенилаланин принимает участие в синтезе меланина и инсулина, влияет на работу нервных клеток, улучшает память и повышает восприимчивость, лизин способствует накоплению кальция в организме, гистидин является исходным сырьем для синтеза гистамина, а также в больших количествах содержится в гемоглобине, метионин выступает донором метильных групп для синтеза других БАВ. Условно заменимая аминокислота аргинин своим наличием стабилизирует вторичную и третичную структуры белка. Серин входит в состав активного центра некоторых ферментов, сложных липидов, цистеин является серосодержащей аминокислотой, участвует в синтезе коэнзима А. Глицин – аминокислота, которая нормализует, активирует процессы защитного торможения в ЦНС, снижает психоэмоциональное напряжение, повышает умственную работоспособность. Также является регулятором, который улучшает обменные процессы в головном мозге.

Нами были проведены исследования по определению содержания аминокислот в биомассе штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, при культивировании на комплексной питательной среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты в трех концентрациях (0,685, 1,37 и 2,74 г/л) по сравнению с биомассой штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на комплексной питательной среде SP-I (контроль). До настоящего времени аминокислотный состав биомассы стрептомицетов при добавлении в питательную среду ПАБК не был исследован.

Как видно из данных, представленных в таблице 3.3, в биомассе исследуемого штамма выявлено 16 аминокислот, как при культивировании на комплексной питательной среде SP-

I, так и при культивировании на питательной среде, содержащей ПАБК, в том числе следующие заменимые аминокислоты (аланин, цистеин, глутаминовую и аспарагиновую аминокислоты, тирозин, пролин, серин и глицин) и незаменимые аминокислоты (валин, лейцин, треонин, метионин, фениалаланин, триптофан, лизин, гистидин и аргинин).

Проведенный анализ содержания аминокислот в биомассе штамма *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 показал, что количество аминокислот, особенно необходимых по современным представлениям для процессов обучения и памяти по сравнению с контролем увеличилось при добавлении ПАБК в трех концентрациях (0,685, 1,37 и 2,74 г/л): аспарагиновая кислота (на 32,48, 63,69 и 64,09%, соответственно), треонин (на 48,54, 57,28 и 28,15%), глутаминовая кислота (только при концентрации ПАБК 1,37 г/л – на 9,67%), пролин (на 15,38, 46,39 и 39,17%), цистеин (только при концентрации ПАБК 0,685г/л – на 7,2% и при концентрации ПАБК 2,74г/л – на 36,03%), фенилаланин (на 30,30, 31,06 и 11,36%), аргинин (на 3,7, 31,48 и 42,59%), глицин (на 5,59% только при концентрации ПАБК 1,37г/л). В результате можно сделать вывод, что питательная среда SP-I с добавлением ПАБК 1,37 г/л – лучшая для получения биомассы с оптимальным аминокислотным составом при исследовании процессов обучения и памяти (Табл. 3.3).

Анализ содержания аминокислот в биомассе штамма *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 показал, что присутствие парааминобензойной кислоты в среде в различных концентрациях по отношению к контролю в основном вызывало их увеличение. Причем, увеличивалось количество как отдельных аминокислот в биомассе штамма *S. massasporeus* CNMN-Ac-06, так и их групп по отношению к контролю, а именно: заменимые (на 18,39-24,32%), незаменимые (на 5,16-8,43%), иммуноактивные (на 8,33-14,02%), протеиногенные (на 11,11-15,59%), гликогенные (на 11,75-17,88 %), кетогенные (на 9,75-18,98%) и серосодержащие (на 7,55-40,34%) (Табл. 3.4). Для исследования процессов обучения и памяти необходимы как заменимые аминокислоты (аспарагиновая и глутаминовая кислоты, пролин, глицин, цистеин), так и незаменимые аминокислоты (треонин, фенилаланин, аргинин) (Табл. 3.4).

Таблица 3.3. Содержание аминокислот при культивировании биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 на питательной среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты

Аминокислота	SP-I контроль	SP-I + *ПАБК 0,685 г/л*		SP-I + *ПАБК 1,37 г/л*		SP-I + *ПАБК 2,74 г/л*	
	Кол-во, мг/г	Кол-во, мг/г	% к К	Кол-во, мг/г	% к К	Кол-во, мг/г	% к К
Аспарагиновая кислота	1,57±0,90	2,08±1,02*	132,48	2,57±1,23*	163,69	2,59±1,56*	164,09
Треонин	1,03±1,12	1,53±1,06*	148,54	1,62±1,32*	157,28	1,32±1,05*	128,15
Глутаминовая кислота	5,97±2,32	5,80±0,09	97,15	6,01±0,68	109,67	5,55±0,12	92,96
Пролин	0,91±2,11	1,05±1,06	115,38	1,42±2,21*	146,39	1,35±0,98*	139,17
Глицин	1,61±1,01	1,46±2,07	90,68	1,70±1,50	105,59	1,28±1,36	79,50
Аланин	2,18±1,23	1,95±1,23	89,44	1,85±1,47	84,86	1,83±1,03	83,94
Валин	0,94±2,34	0,70±2,56	74,46	0,77±2,09	110,0	1,03±1,04*	147,14
Цистеин	1,11±2,05	1,19±1,54	107,20	1,05±1,04	94,59	1,51±0,98*	136,03
Метионин	0,21±2,06	0,23±2,78	109,52	0,26±2,06*	123,80	0,34±2,07*	161,90
Изолейцин	1,51±1,09	1,81±1,32*	119,86	2,17±0,98*	143,70	1,94±0,79*	128,47
Лейцин	3,24±1,07	3,70±1,41	114,19	4,23±0,79*	130,55	3,43±0,39	105,86
Тирозин	1,14±1,15	1,16±1,09	101,75	1,27±1,03	111,40	1,02±1,07	89,47
Фенилаланин	1,32±2,04	1,72±1,46*	130,30	1,73±1,24*	131,06	1,47±1,06	111,36
Лизин	2,60±1,03	3,30±0,68*	126,92	1,37±0,99	52,69	3,45±0,12*	132,69
Гистидин	1,21±2,03	1,40±0,98	115,70	0,73±2,70	60,33	1,92±0,89*	158,67
Аргинин	0,54±3,01	0,56±2,02	103,70	0,71±2,13*	131,48	0,77±2,09*	142,59

Примечание. * – достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05)

Таблица 3.4. Суммарное содержание аминокислот в биомассе штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивируемого на питательной среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты

Группа аминокислот	**SP-I контроль**	**SP-I + *ПАБК 0,685 г/л***		**SP-I + *ПАБК 1,37 г/л***		**SP-I + *ПАБК 2,74 г/л***	
	Кол-во, мг/г	**Кол-во, мг/г**	**% к К**	**Кол-во, мг/г**	**% к К**	**Кол-во, мг/г**	**% к К**
Σ заменимых	12,64±0,12	14,97±1,09*	118,39	13,61±1,98	107,70	15,72±2,64*	124,32
Σ незаменимых	15,50±1,36	16,30±2,24	105,16	16,77±2,04	108,23	16,80±2,35	108,43
Σ иммуноактивных	13,72±3,10	14,86±3,10	108,33	15,64±2,47	114,02	15,16±2,07	110,50
Σ гликогенных	8,34±2,58	9,32±2,47	111,75	9,83±2,61*	117,88	9,70±1,54*	116,38
Σ кетогенных	9,83±1,36	11,69±3,24*	118,98	10,78±1,68	109,75	11,34±2,78	115,41
Σ протеиногенных	28,14±4,21	31,27±1,98	111,11	30,39±2,40	107,99	32,52±3,31	115,59
Σ серосодержащих	1,32±2,38	1,42±2,37	107,55	1,31±2,07	99,37	1,86±2,08*	140,34

Примечание. * – достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05)

Результаты исследования показали, что количество аминокислот, особенно необходимых для процессов обучения и памяти, по отношению к контролю увеличилось при добавлении ПАБК в трех концентрациях 0,685, 1,37 и 2,74 г/л, особенно с добавлением в питательную среду концентрации 1,37 г/л.

В результате можно сказать, что питательная среда SP-I с добавлением ПАБК 1,37 г/л лучшая для аминокислотного состава при исследовании процессов обучения и памяти.

3.4. Выводы к главе 3

Анализ результатов исследований, направленных на изучение особенностей биосинтетической активности (образование биомассы и липидов) штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, при культивировании на среде SP-I, а также аминокислотного состава биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, при культивировании на среде, содержащей ПАБК позволил сделать следующие выводы:

1. Наибольшее количество биомассы, общих липидов, а также основных физиологически важных липидных фракций (фосфолипиды и стерины) в составе биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 было обнаружено при культивировании на комплексной среде SP-I, фосфолипидов и стеринов в равной степени на средах SP-I и SP-III. У штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 наибольшее количество биомассы получено после культивирования на комплексной среде SP-III, максимальное содержание общих липидов – после культивирования на среде SP-I, фосфолипидов при культивировании на питательных средах SP-I и SP-III, стеринов – на среде SP-III.

2. Оптимизация комплексной питательной среды SP-I добавлением парааминобензойной кислоты в различных концентрациях способствует увеличению биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, содержание в ней общих липидов, а также стеринов и фосфолипидов. Наибольшую эффективность в отношении образования биомассы и общих липидов демонстрирует добавление ПАБК в концентрации 1,37 г/л.

3. Оптимизация комплексной питательной среды добавлением ПАБК в различных концентрациях приводит, в основном, к увеличению содержания в биомассе как различных групп аминокислот, так и отдельных аминокислот, в том числе, особенно необходимых для процессов обучения и памяти.

4. ВЛИЯНИЕ БИОМАССЫ СТРЕПТОМИЦЕТОВ НА ПРИРОСТ МАССЫ ТЕЛА, ПЛОДОВИТОСТЬ БЕЛЫХ КРЫС И РАЗВИТИЕ КРЫСЯТ

В настоящее время большое количество биологически активных веществ микробного происхождения становится лекарственными препаратами либо пищевыми добавками. При этом основу таких препаратов могут составлять как живые культуры микроорганизмов, так и отдельные продукты их метаболизма [108]. Среди микроорганизмов одной из наиболее продуктивных и перспективных групп в отношении получения биологически активных веществ являются стрептомицеты [11, 14, 16].

Преимущество микробных метаболитов стрептомицетов состоит в многообразии их химической структуры, высокой биологической активности и эффективности в отношении ряда физиологических функций [108, 126].

4.1. Токсикологические свойства биомассы штаммов *Streptomyces massasporeu*s CNMN-Ac-06 *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11

Прежде чем проводить исследования по изучению влияния биомассы исследуемых штаммов *Streptomyces massasporeu*s CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на обучение и память определяли токсические свойства. Ранее токсикологические свойства штаммов *Streptomyces massasporeu*s CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированных на различных питательных средах, в отношении белых крыс были определены при изучении влияния биомассы данных штаммов на некоторые показатели организма [8, 10]. Однако, как показано выше (глава 3, пункт 3.1), при длительном хранении состав биомассы существенно меняется. Кроме того, ранее не проводились токсикологические свойства биомассы штамма *Streptomyces massasporeu*s CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде с добавлением ПАБК.

Определение субхронической токсичности биомассы штаммов стрептомицетов изучали на 84 белых лабораторных крысах породы *Wistar* обоих полов в течение 90 суток. Биомассу давали в смеси с кормом в терапевтической дозе (250 мг/кг массы тела) и дозе, трехкратно превышающей терапевтическую, в течение 90 дней. Контрольным животным давали стандартный рацион питания.

Характер токсического действия регистрировали по количеству погибших животных. При ежедневных наблюдениях учитывали общее состояние и поведение животных (аппетит, возбуждение или угнетение), динамику прироста массы тела. За всеми животными в течение периода добавления в корм биомассы штаммов стрептомицетов ежедневно вели наблюдения, учитывая общее состояние, аппетит, заболеваемость и

сохранность. Показателем продуктивности служил прирост массы тела животных. Взвешивание проводили индивидуально до назначения препарата, во время применения и по окончании опыта. На основании полученных данных высчитывали средний прирост массы тела животного. Изменение массы тела животных регистрировали на электронных лабораторных весах модели А-2500 фирмы “Axis” (Польша).

Изучение субхронической токсичности биомассы штаммов *Streptomyces massasporeu*s CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, показало, что она не оказывала отрицательного влияния на клиническое состояние белых крыс. Визуальное наблюдение не выявило каких-либо изменений в поведении опытных животных в сравнении с контролем, получавших стандартный рацион питания. Гибели животных на протяжении всего срока эксперимента отмечено не было.

Добавление биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на комплексной питательной среде с парааминобензойной кислотой, в корм животным не вызывало отрицательного влияния на их состояния, способствовало увеличению еженедельных абсолютных средних приростов массы тела белых крыс и плодовитости, по отношению к контролю (эти данные представлены в главе 4). При этом обнаружено, что максимальный эффект в отношении привесов наблюдается у белых крыс, получавших с кормом биомассу штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, выращенного с добавлением 1,37 г/л ПАБК в комплексную питательную среду SP-I.

При патоморфологическом исследовании органов экспериментальных животных отклонений и каких-либо особенностей в строении выявлено не было. Коэффициенты массы внутренних органов белых крыс существенно не отличались от показателей контроля, что свидетельствует об отсутствии токсического влияния биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на организм животных и их хорошей переносимости.

Таким образом, полученные результаты послужили основой для дальнейших исследований влияния на организм животных биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, полученного при культивировании на комплексной питательной среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты на организм животных.

4.2. Изменение привесов массы тела лабораторных животных под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11

При исследовании влияния препаратов, полученных путем микробиологического синтеза, на организм лабораторных животных важное практическое значение для

животноводста имеет исследование влияния этих препартов на показатели массы тела и плодовистости.

В настоящее время в животноводстве находят широкое применение кормовые препараты, получаемые путем микробиологического синтеза. В состав этих препаратов входят витамины, аминокислоты, ферменты, липидные фракции, макро- и микроэлементы. Они могут применяться как лекарственные средства или пищевые добавки, так как обладают антиоксидантными, антибактериальными, антистрессовыми, противовоспалительными свойствами. В целом, эти вещества положительно влияют на процессы метаболизма в организме животных, что особенно важно для молодняка, а также ослабленных животных [1, 3, 22, 43, 61].

Нами была поставлена задача исследовать влияние биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, полученной при культивировании на питательной среде SP-I, а также влияние биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты в различных концентрациях, на привесы массы тела белых крыс.

Применение парааминобензойной кислоты с кормом молодых животных оказывало стимулирующее влияние на их рост и развитие молодых животных, вызывало позитивные эффекты в отношении устойчивости организма животных в неблагоприятных условиях окружающей среды. Известно, что ПАБК, а также ее производные обладают широким спектром биологического действия, участвуют в обменных процессах. ПАБК является важным фактором роста для многих способных к синтезу витаминов облигатных микроорганизмов, которые населяют кишечник животных, то есть принимает участие в поддержании баланса кишечной микрофлоры [27, 72].

В первой части опытов было исследовано влияние биомассы двух штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированных на комплексной питательной среде SP-I, и биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на среде SP-I с парааминобензойной кислотой в двух концетрациях, на привесы самцов белых крыс в обычных физиологических условиях.

Исследование проводили на 54 белых лабораторных крысах линии *Wistar*, взятых в 2-месячном возрасте и содержащихся в условиях вивария. Для исследования животные обоих полов были разбиты на следующие группы (5 групп по 6 крыс в каждой): контрольная и 4 опытные: 1 группа – стандартный рацион питания (контроль); 2 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (здесь и

далее – 250 мг/кг массы тела в сутки), культивированного на питательной среде SP-I (BM1); 3 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 1,37 г/л ПАБК (BM1PABA1); 4 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 2,74 г/л ПАБК (BM1PABA2); 5 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на питательной среде SP-I (BM2); 4 группы самок по 6 крыс в каждой группе: контрольная и 3 опытные: 1 группа – стандартный рацион питания (контроль), 2 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I (BM1); 3 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 1,37 г/л ПАБК (BM1PABA1); 4 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на питательной среде SP-I (BM2).

Исследования массы тела животных позволили выявить ее динамику на протяжении 10-ти недель эксперимента. Как видно на рисунке 4.1, привесы самцов контрольной группы постепенно уменьшаются с возрастом, что обусловлено особенностями роста белых крыс на данном периоде развития в постнатальном онтогенезе. Если на 1-й и 2-й неделях они составляли 23,71 и 21,27 г за неделю, то на 9-й и 10-й неделях – 6,04 и 3,12 г за неделю.

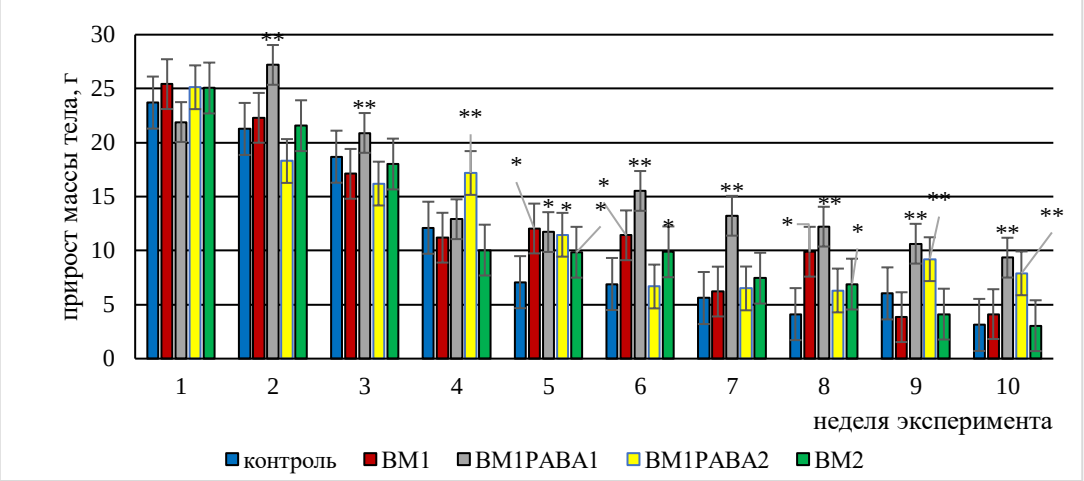


Рис. 4.1. Динамика привесов самцов белых крыс при потреблении биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей парааминобензойную кислоту, и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 в обычных физиологических условиях

Примечание. Контроль – стандартный рацион питания; BM1 – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06,

культивированного на питательной среде SP-I; BM1PABA1 – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 1,37 г/л ПАБК; BM1PABA2 – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 2,74 г/л ПАБК; BM2 – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на питательной среде SP-I, * – достоверные различия по сравнению с контролем ($P<0,05$), ** – достоверные различия по сравнению с BM1 ($P<0,05$).

У животных опытных групп наблюдается несколько другая картина. Привесы крыс, потреблявших BM1 и BM2, выше по сравнению с животными контрольной группы на 1-й и на 5-8-й неделях эксперимента. На 10-й неделе постнатального развития животных их привесы практически одинаковы. У животных, потреблявших BM1PABA1, привесы достоверно выше по сравнению с животными как контрольной группы, начиная со 2-й и 3-й недели и с 6 по 10 неделю экспериментов в большей степени, так и групп BM1, BM2 и BM1PABA2 (Рис. 4.1). Таким образом, согласно полученным данным, биомасса штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на комплексной питательной среде SP-I, с добавлением ПАБК 1,37 г/л (BM1PABA1), способствует существенному увеличению прироста массы тела белых крыс, начиная уже со второй недели кормления.

Поскольку в опытах на крысах-самцах наибольшую эффективность в отношении привесов массы тела продемонстрировал стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 1,37 г/л ПАБК (BM1PABA1), в экспериментах на крысах-самках мы решили использовать биомассу, культивированную на питательной среде, содержащую именно данную дозу парааминобензойной кислоты.

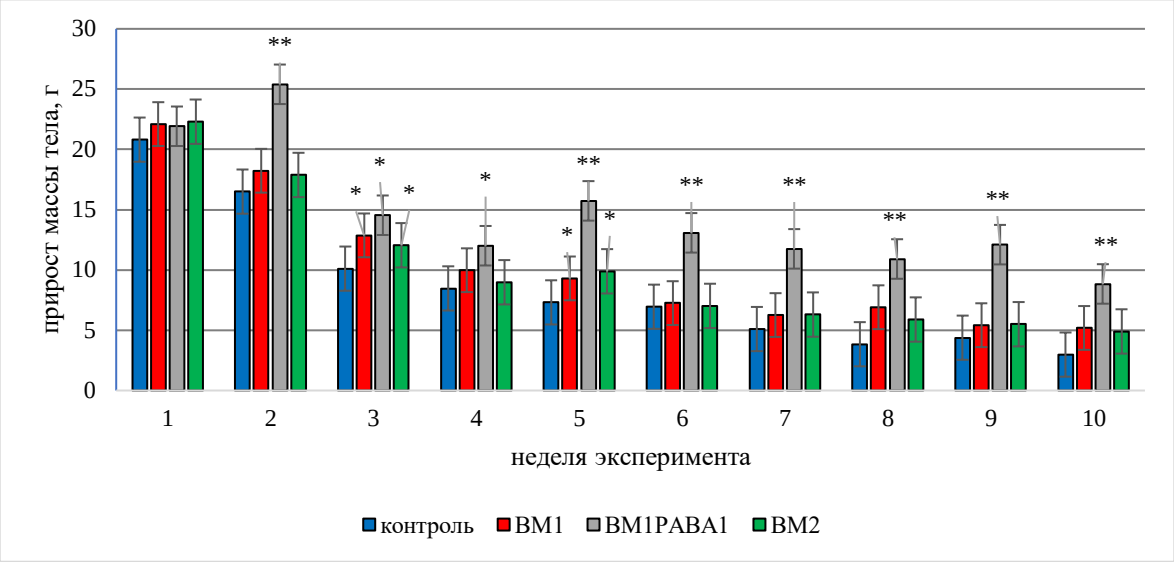


Рис. 4.2. Динамика привесов самок белых крыс при потреблении биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей парааминобензойную кислоту, и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 в обычных физиологических условиях

Примечание. Контроль – стандартный рацион питания, BM1 – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I; BM1PABA1 – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 1,37 г/л ПАБК, BM2 – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на питательной среде SP-I, * – достоверные различия по сравнению с контролем, ** – достоверные различия по сравнению с BM1 ($P<0,05$).

Анализ прироста массы тела самок белых крыс показал, что в группе животных BM1PABA1, потреблявших биомассу штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 1,37 г/л ПАБК, прирост массы тела, начиная уже со второй недели эксперимента достоверно выше, чем у контрольной группы и групп BM1 и BM2. Особенно существенные увеличения прибавок массы тела группы BM1PABA1 зарегистрированы, начиная с 5-й недели после начала эксперимента – в 1,5-2 раза больше, чем у животных контрольной группы (Рис. 4.2.).

Таким образом, кормление белых крыс стандартным рационом с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 1,37 г/л ПАБК, способствует существенному приросту массы тела экспериментальных животных, особенно на 6-10 неделях кормления, особенно у крыс-самцов.

В следующей серии опытов исследования проводили на 30 самцах белых крыс породы *Wistar*, взятых в 2-месячном возрасте и содержащихся в условиях вивария при тепловом стрессе. Животные были разбиты на 5 групп самцов по 6 крыс в каждой группе: контрольная и 4 опытные: 1 группа – стандартный рацион питания (контроль); 2 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I (здесь и далее – 250 мг/кг массы тела в сутки) (BM1); 3 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 1,37 г/л ПАБК (BM1PABA1); 4 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 2,74 г/л ПАБК (BM1PABA2); 5 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на питательной среде SP-I (BM2). Животные на 3-й и 4-й неделе ежедневно подвергались тепловому стрессу путем пребывания в жаркий период года в помещении без вентиляции воздуха. Температура воздуха в дневное время суток (на протяжении 4-х часов) составляла +34+36°C.

Обнаружено, что в условиях теплового стрессирования привесы массы тела крыс-самцов контрольной группы становились отрицательными (Рис. 4.3). В постстрессовый период привесы контрольной группы постепенно нормализовались, но были меньше, чем в обычных физиологических условиях (Рис. 4.1 и 4.3). У животных, потреблявших с кормом препараты BM1, BM2 привесы в условиях стрессирования снижались в меньшей степени, чем у контроля, а у животных, потреблявших с кормом биомассу штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированной на питательной среде, содержащей ПАБК, привесы в условиях стресса достоверно выше групп, потреблявших биомассу штаммов *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 и *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 без ПАБК.

В постстрессовый период привесы у животных, потреблявших с кормом биомассу штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на комплексной питательной среде, содержащей ПАБК 1,37 г/л (BM1PABA1) и 2,74 г/л (BM1PABA2), были примерно в равной степени выше, чем у животных контрольной группы, BM1 и BM2. Таким образом, потребление белыми крысами-самцами биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированной на питательной среде, содержащей ПАБК, способствует повышению привесов в условиях теплового стрессирования.

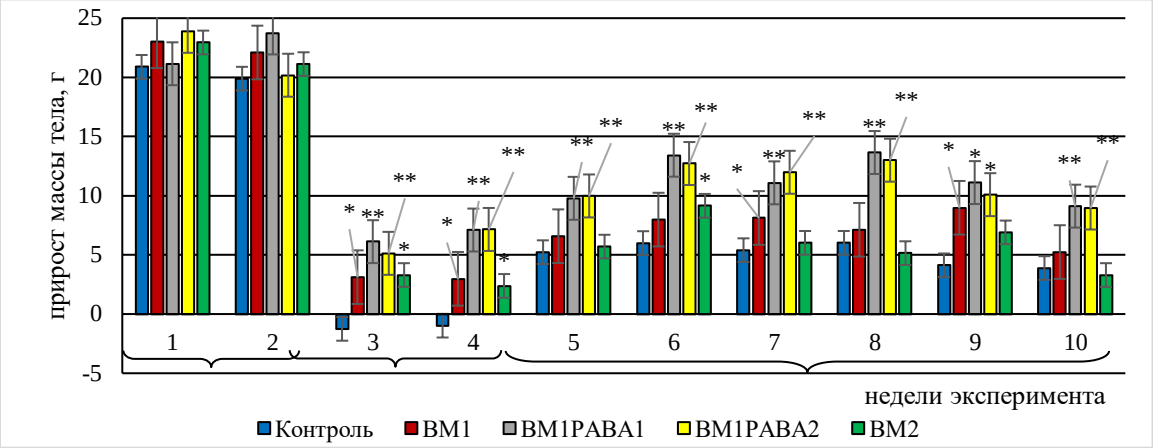


Рис. 4.3. Динамика привесов самцов белых крыс при потреблении биомассы штаммов *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 и *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей парааминобензойную кислоту, в условиях теплового стресса

Примечание. Контроль – стандартный рацион питания; BM1 – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I; BM1PABA1 – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 1,37 г/л ПАБК; BM1PABA2 – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 2,74 г/л ПАБК; BM2 – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на питательной среде SP-I, * – достоверные различия по сравнению с контролем, ** – достоверные различия по сравнению с BM1 ($P<0,05$).

Таким образом, кормление самцов белых крыс стандартным рационом с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей ПАБК в различных концентрациях, способствует увеличению прироста массы тела экспериментальных животных как в обычных физиологических условиях, так и при стрессе, особенно в постстрессовый период, что свидетельствует о повышении резистентности их организма к действию теплового стресса под влиянием используемых пищевых добавок, а также более интенсивному восстановлению физиологических возможностей после воздействия неблагоприятных экологических условий.

4.3. Действие биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на плодовитость самок белых крыс

В литературе имеют место сообщения о том, что применение комплексных препаратов микробного происхождения, в частности, на основе представителей рода *Streptomyces* способствует повышению продуктивности животных [43, 115]. Нами было исследовано влияние биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I, содержащей 1,37 г/л парааминобензойной кислоты и биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 при культивировании на среде SP-I на плодовитость опытных животных.

Исследования проводили на 32 белых лабораторных крысах обоих полов (8 самцов и 24 самок). Для проведения эксперимента животные были разбиты на 4 группы (2 самца и 6 самок в каждой группе): контрольная и 3 опытные: 1 группа – стандартный рацион питания (контроль); 2 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (здесь и далее – 250 мг/кг массы тела в сутки), культивированного на питательной среде SP-I (BM1); 3 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 1,37 г/л ПАБК (BM1PABA1).); 4 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 , культивированного на питательной среде SP-I (BM2).

Животные получали указанный рацион питания в течении 10 недель при раздельном содержании самцов и самок. Спустя 10 недель производили подсадку самцов каждой группы к самкам этой же группы с целью изучения показателей их репродуктивной функции и последующего постнатального развития крысят. После наступления беременности, самок отсаживали в отдельные клетки.

Результаты проведенных исследований показали, что добавление к основному рациону белых крыс биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированных на комплексной питательной среде SP-I, способствуют практически в равной степени увеличению количества родившихся крысят на 1 самку, индекса плодовитости самок (число родившихся крысят/число родивших самок) по сравнению с показателями контрольной группы. В то время, как при добавлении биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I, содержащей парааминобензойную кислоту в концентрации 1,37 г/л (BM1PABA1), способствует более существенному увеличению количества родившихся крысят на 1 самку, индекса плодовитости самок (число родившихся крысят/число родивших самок) (на 31,52 %) по сравнению как с показателями контрольной

группы, так и по сравнению с группами ВМ1 и ВМ2. Следует отметить, что постнатальная смертность крысят, родившихся у самок в опытной группе ВМ1РАВА1, была значительно ниже по сравнению с контролем, а также и по сравнению с опытными группами ВМ1 и ВМ2 (Табл. 4.1). Также следует отметить, что физическое развитие крысят в течение 1-го месяца постнатального развития (покрытие шерстью, открытие глаз, отлипание ушных раковин) не отличалось от сроков, характерных для нормального физиологического развития животных этого вида во всех экспериментальных группах.

При исследовании динамики массы тела крысят в течении 6 недель после их рождения, было обнаружено из группы ВМ1 и ВМ2 на 1, 2, 3, 6 недели роста достоверно выше контрольной группы. В тоже время масса тела крысят, потомков группы ВМ1РАВА1, на всем протяжении исследовании (1-6 неделя после их рождения) существенно выше как контрольной группы, так и групп ВМ1 и ВМ2.

Таблица 4.1. Показатели репродуктивной функции белых крыс и развития крысят при потреблении биомассы штаммов *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей парааминобензойную кислоту

Исследуемые показатели	Группы животных			
	Контроль	***ВМ1***	***ВМ1РАВА1***	***ВМ2***
Количество новорожденных крысят на одну самку, абс.	10,50±1,2	12,23±0,75 *	13,81±0,41 *	11,84±0,67 *
Индекс плодовитости, % к контролю	-	116,47±1,12*	131,52±0,68*	107,33±0,98*
Постнатальная смертность крысят через 3 недели, абс.	9	5*	2*	6*
Масса тела новорожденных крысят, г	4,85±1,18	5,71±0,75 *	6,90±0,62 *	5,98±0,54*
Динамика массы тела крысят, г				
1 неделя	7,12±0,78	9,44±0,60 *	11,80±1,2 *	8,58±0,64 *
2 недели	11,20± 1,02	15,71±0,98*	18,49±0,96 *	14,81±0,76*
3 недели	18,51±0,93	26,31±1,09 *	32,14±1,02*	24,78±0,98 *
4 недели	30,53±1,53	35,40±2,30	53,43±1,77 *	37,13±1,90*
5 недель	54,90±2,02	65,13±3,02	78,01±3,24 *	64,21±3,13
6 недель	74,08±3,78	88,57±4,54 *	99,10±6,18 *	86,71±3,98 *

Примечание. * – достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что добавление к основному рациону белых крыс биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей парааминобензойную кислоту в концентрации 1,37 г/л, в течение длительного времени (10 недель) способствует существенному повышению их плодовитости, снижению постнатальной смертности крысят через 3 недели после рождения и увеличению массы тела крысят непосредственно после рождения и на протяжении первых 6 недель их развития.

4.3. Выводы к главе 4

1. Потребление биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и, в меньшей степени, *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированных на питательной среде SP-I, способствует увеличению привесов массы тела белых крыс обоих полов и плодовитости самок белых крыс.

2. Длительное потребление биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I с добавлением ПАБК в дозе 1,37г/л и, в меньшей степени, 2,74 г/л, способствует существенному увеличению прироста массы тела белых крыс по сравнению с контролем и по сравнению с биомассой, полученной при культивировании штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 на питательной среде SP-I.

3. Биомасса штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде с добавлением ПАБК в концентрациях 1,37 г/л и 2,74 г/л, способствует увеличению прироста массы тела белых крыс в условиях теплового стресса и в постстрессовый период.

4. Добавление к основному рациону белых крыс биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей парааминобензойную кислоту в концентрации 1,37 г/л, в течение 10 недель способствует существенному повышению их плодовитости, снижению постнатальной смертности крысят и увеличению массы тела крысят после рождения и на протяжении первых 6 недель их постнатального развития.

5. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ НА ОБУЧЕНИЕ И СОХРАНЕНИЕ СЛЕДА ПАМЯТИ БИОМАССЫ ШТАММОВ *STREPTOMYCES MASSASPOREUS* CNMN-AC-06 И *STREPTOMYCES FRADIAE* CNMN-AC-11, ВЫРАЩЕННЫХ НА КОМПЛЕКСНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ SP-I

5.1. Влияние длительного потребления биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 на условно-рефлекторное обучение и память белых крыс разного возраста в челночной камере

Несмотря на увеличивающееся число сообщений о воздействии продуктов жизнедеятельности стрептомицетов на нейрональные процессы, их влияние на поведение животных очень мало исследовано. При изучении воздействия метаболитов *Streptomyces avermectilis* и *Streptomyces lincolniensis* на поведенческие реакции белых крыс был выявлен, в частности, их анксиолитический эффект. Ранее в Институте Физиологии и Санокреатологии Молдавского Государственного Университета в сотрудничестве с коллегами из Института Микробиологии и Биотехнологии Технического Университета Молдовы и Приднестровского Университета им. Т.Г. Шевченко было обнаружено, что длительное потребление белыми крысами обоих полов биомассы местных штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, облегчает процесс обучения навыку активного избегания и способствует увеличению скорости целенаправленных двигательных реакций [59, 60]. Однако до настоящего времени не исследовано влияние биомассы этих штаммов на хранение следов условно-рефлекторной памяти, а также влияние биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 на условно-рефлекторную деятельность старых животных.

Исследования выполнены на белых лабораторных крысах-самцах породы Вистар (n=48) разного возраста (молодые и старые), содержавшихся в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище.

Животные каждой из возрастных групп были разбиты на три подгруппы: контрольную и 2 опытные. Животные опытных подгрупп в течение 90 дней в качестве пищевой добавки к стандартному рациону питания получали ежедневно в дозе 250 мг/кг живого веса высушенную биомассу двух местных штаммов стрептомицетов – *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) либо *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2), выращенных на комплексной питательной среде, с определенным ранее аминокислотным и липидным составом. Штаммы *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 выделены из почв центральной части Республики Молдовы и находятся на хранении в Национальной коллекции непатогенных микроорганизмов

Республики Молдова. Молодые животные получали биомассу, начиная с возраста 2 месяцев, а старые – начиная с возраста 12 месяцев из расчета 250 мг/кг массы тела. Спустя 90 суток после начала потребления животными биомассы стрептомицетов и при достижении ими возраста – 5 месяцев (молодые) и 15 месяцев (старые), соответственно, приступали к выработке условных рефлексов. На протяжении эксперимента по выработке условных рефлексов (14 дней), а затем, при исследовании угасания реакций избегания (45 дней), опытные животные продолжали получать с кормом биомассу. В качестве контроля служили крысы соответствующих возрастных групп, содержавшиеся в тот же промежуток времени на стандартном рационе питания.

Для исследования процесса ассоциативного научения использовался метод выработки УРАИ болевого стимула. Обучение крыс проводили по методике двустороннего активного избегания в челночной камере после 10-ти минутного привыкания к экспериментальной обстановке. Электрокожное раздражение (4 мА, 5 кГц) наносили животным по окончании светового сигнала (через 5 сек) через металлическую решетку, вмонтированную в пол камеры, соединенную с электростимулятором. Ежедневно предъявлялось по 10 сочетаний с интервалом 40±10 сек между сочетаниями. Условным рефлексом считалось перемещение крысы в безопасный отсек без подкрепления отрицательным стимулом. Производили подсчет доли условно-рефлекторных реакций в общем количестве побежек каждого животного (как подкрепленных, так и не подкрепленным электрокожным раздражением). Кроме этого регистрировали время перехода животного в безопасный отсек, как в случае условно-рефлекторной побежки, так и после нанесения электрокожного стимула. Животных, у которых условный рефлекс долгое время не вырабатывается, исключали из эксперимента.

С целью изучения процессов условно-рефлекторной памяти и угасания оборонительного условного рефлекса определяли динамику латентного периода реакции избегания. Для этого на следующий день после выработки условного рефлекса избегания (критерием чего было проявление защитного рефлекса на включение света без подкрепления) у всех крыс измеряли фоновый ЛПРИ. Динамику ЛПРИ исследовали у крыс контрольных и опытных групп на 5-е, 10-е, 15-е, 20-е, 30-е и 45-е сутки после проведения эксперимента по выработке условных рефлексов активного избегания.

Анализ результатов исследования процессов условно-рефлекторного обучения с аверсивным подкреплением (выработки условных реакций активного избегания) у молодых экспериментальных животных показывает, что при использовании данного методического подхода первые единичные условные реакции наблюдаются уже после 10-20-ти предъявлений условного сигнала, однако существенное увеличение числа условно-

рефлекторных побежек наблюдается на 4-5-й дни эксперимента, при этом доля УРАИ не превышает 40 % (Рис. 5.1). На протяжении последующих 5-ти дней наблюдается поступательное увеличение числа реакций избегания и, соответственно, снижение количества реакций избавления, кроме этого мы наблюдали существенное снижение латентного периода условного рефлекса, а также увеличение скорости двигательных реакций избавления при предъявлении электрокожного раздражения, возрастает число короткоотставленых реакций избавления (длительностью 1-2 с после начала действия безусловного раздражителя). Стабильный уровень воспроизведения реакций избегания на условный стимул достигается, начиная с 11-го дня эксперимента, и составляет, в среднем, около 90 % воспроизведений, что является весьма высоким показателем и может свидетельствовать об адекватном уровне интегративной деятельности нейронных популяций коры больших полушарий, обеспечивающих системные процессы формирования целенаправленного поведения животных, используемых в данном исследовании.

Данные опытов по исследованию влияния биомассы стрептомицетов на выработку УРАИ, свидетельствуют, что у молодых животных с хорошим функциональным состоянием нейрональных структур, обеспечивающих процесс ассоциативного научения, сохраняется существенный резерв для активизации условно-рефлекторной деятельности. У молодых животных обеих подопытных групп, потреблявших в течение длительного времени биомассу штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 либо *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, наблюдается стимуляция условно-рефлекторной деятельности, что в целом подтверждает данные о положительном влиянии метаболитов стрептомицетов на процесс обучения белых крыс условным реакциям активного избегания, полученные ранее с использованием данной экспериментальной модели [59, 60]. Установлено, что число условно-рефлекторных реакций у животных, потреблявших биомассу обоих штаммов стрептомицетов намного выше, чем у животных контрольной группы (Рис. 5.1.). Наряду с этим, обнаружено, что биомасса штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 вызывает более значимый эффект в отношении ассоциативного научения по сравнению с *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06. Применение ВМ1 приводит к увеличению числа УРАИ у белых крыс на 4-6-й и 8-10-й дни эксперимента, в то время как при потреблении экспериментальными животными ВМ2 в динамике условно-рефлекторной деятельности доля условных рефлексов достоверно выше с 3-го по 12-й дни эксперимента, кроме того, в большинстве случаев ВМ2 демонстрирует и более высокую эффективность. Особенно существенные различия между животными второй опытной и контрольной подгрупп молодых животных зафиксированы на 3-й - 7-й дни эксперимента по выработке условных

рефлексов, когда количество условно-рефлекторных побежек у крыс, потреблявших ВМ2, выше уровня контроля в 1,5 – 5 раз. Следует также особо отметить тот факт, что применение биомассы *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 в качестве пищевой добавки способствует достижению 100 %-го уровня выработки условных рефлексов (Рис. 5.1.). На основании анализа количества времени, затрачиваемого на переход в безопасный отсек после подачи электрокожного раздражения в случае отсутствия условно-рефлекторной реакции, было установлено, что животные, потреблявшие ВМ1 и ВМ2, демонстрируют более высокую скорость реакции избавления по сравнению с контролем (на 16-68%, P<0,05).

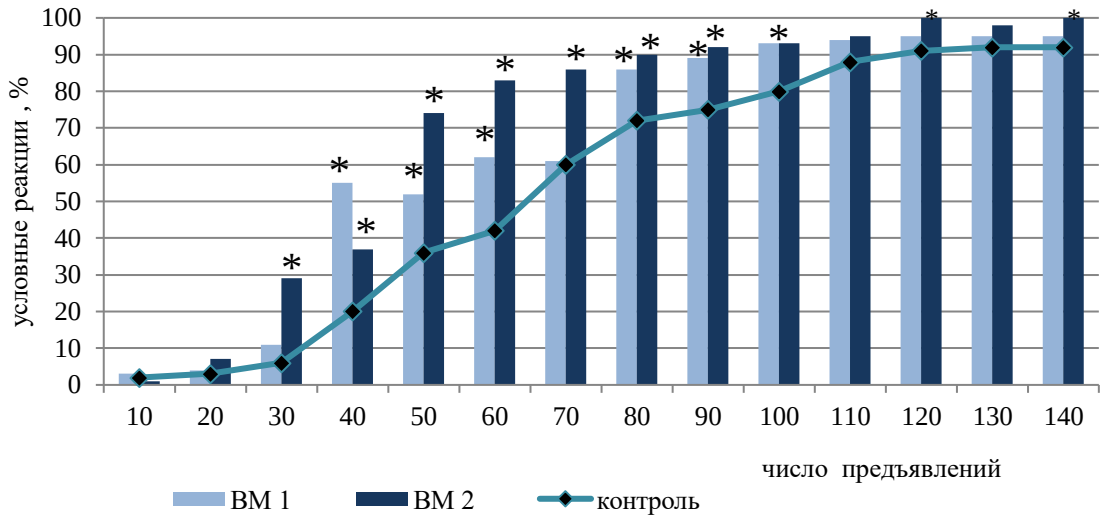


Рис. 5.1. Динамика условно-рефлекторного обучения с аверсивным подкреплением у молодых крыс при длительном потреблении биомассы *Streptomyces massasporeus* CNMN-06 (ВМ1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (ВМ2),

* – достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05)

Следовательно, длительное потребление биопрепаратов на основе местных штаммов стрептомицетов оказывает заметное позитивное влияние на процесс формирования условно-рефлекторных связей, способствуя существенной интенсификации процесса обучения навыку активного избегания у самцов белых крыс. Полученные данные свидетельствуют о том, что биомасса штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 оказывает более выраженный эффект на процесс выработки условных рефлексов по сравнению с биомассой штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06.

Согласно полученным результатам, у старых животных, достигших 15-ти месячного возраста, условные реакции активного избегания болевого стимула вырабатываются гораздо медленнее, чем у молодых (Рис. 5.2). Так, например, на 5-й день эксперимента по выработке условных рефлексов доля условно-рефлекторных побежек в их общем

количестве составила у молодых животных более 72 %, в то время, как у старых – 5 %, на 10-й день молодыми животными был достигнут 95 %-й уровень выработки условных рефлексов, у старых животных доля условно-рефлекторных побежек составила немногим более 32 % (Рис. 5.1 и 5.2).

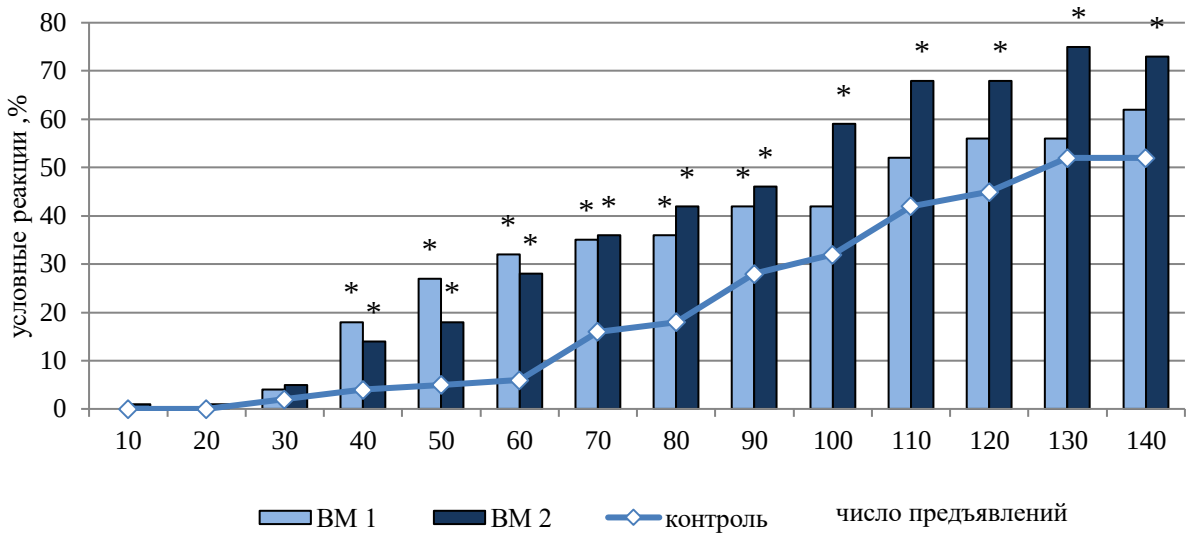


Рис. 5.2. Динамика условно-рефлекторного обучения с аверсивным подкреплением у старых крыс при длительном потреблении биомассы *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (ВМ1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (ВМ2),

* – достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05)

Потребление животными, начиная с 12-ти месячного возраста, в течение 90 дней биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 способствует существенному увеличению у них числа условно-рефлекторных реакций практически на всем протяжении эксперимента. В отличие от старых животных контрольной группы, у которых максимальный уровень выработки условных рефлексов не превысил 61%, у крыс, получавших в качестве пищевой добавки ВМ2, этот показатель составил более 82%. При сравнении результатов эффективности биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, полученных на молодых и старых животных, видно, что у старых крыс действие ВМ2 в отношении процесса научения заметно более выражено. Так, например, на 5-й день эксперимента по выработке условных рефлексов препарат ВМ2 увеличивает долю условно-рефлекторных реакций в общем количестве побежек у молодых крыс менее чем в 2 раза, а у старых – более чем в 5 раз, на 10-й день – у молодых животных – на 15,6 %, а у старых – почти в 3 раза (Рис. 5.1 и 5.2). Добавление в корм старых животных биомассы другого местного штамма стрептомицетов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 также приводит к более выраженному эффекту в отношении процесса условно-рефлекторного научения у

старых по сравнению с молодыми животными (выработка УРАИ увеличивается в 4-9-й дни эксперимента более, чем в 2 раза), однако, ВМ1 оказывает влияние на процесс обучения только на первой стадии эксперимента, в то время как эффект ВМ2 сохраняется в течении всего опыта по исследованию условно-рефлекторной деятельности старых животных (Рис. 5.2). Исходя из результатов опытов по влиянию биомассы стрептомицетов на условно-рефлекторную деятельность молодых и старых экспериментальных животных, штаммы *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 и *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, по-видимому, являются перспективными для дальнейших исследований с целью выделения и идентификации веществ с нейротропными свойствами и последующим их использованием для предупреждения развития нарушений, приводящих к преждевременной диминуации когнитивных процессов.

Следует отметить, что исследование влияния метаболитов биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 на условно-рефлекторную память с аверсивным подкреплением лабораторных животных проведены впервые. Полученные данные могут косвенно демонстрировать возможность влияния биомассы исследуемых штаммов на различные механизмы формирования памяти у лабораторных животных, что определяется неодинаковым составом метаболитов стрептомицетов, входящих в состав их биомассы. Сохранность следов в памяти экспериментальных животных исследовали путем определения динамики ЛПРИ на протяжении 45 суток после выработки УРАИ. Фоновые значения ЛПРИ у молодых крыс всех групп не имели статистически достоверных отличий. Величина ЛПРИ составляла в среднем 1,8±0,2 с у крыс контрольной группы, 1,2±0,2 с у крыс, потреблявших биомассу штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и 2,4±0,6 с у крыс, потреблявших биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11. Как видно на рисунке 5.3, латентный период реакции перехода в безопасную камеру прогрессивно увеличивался, начиная с 15-х суток после выработки условных рефлексов, что полностью соответствует динамике угасания условного рефлекса у интактных крыс.

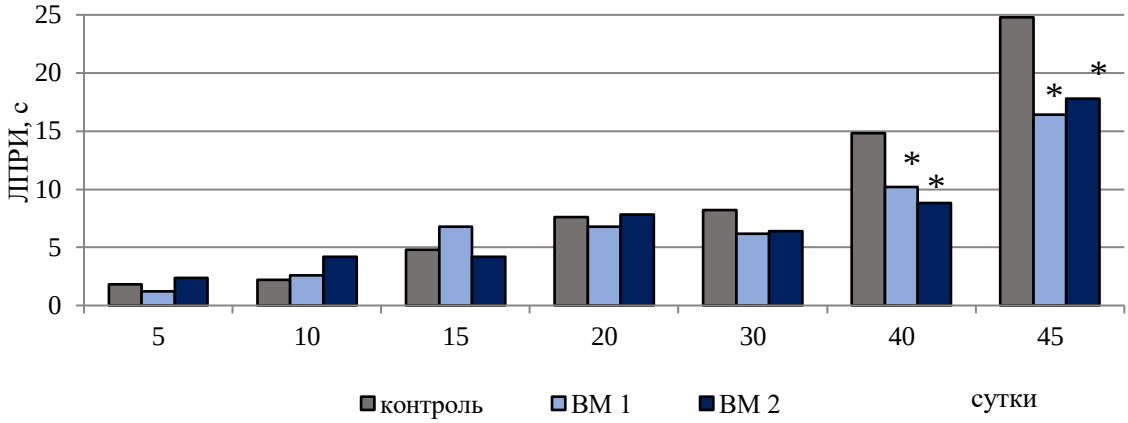


Рис. 5.3. Динамика латентного периода активного избегания у молодых крыс в течение 45 суток после выработки условных реакций активного избегания при длительном потреблении биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-06 (ВМ1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (ВМ2),

* – достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05)

Добавление в корм молодых животных биомассы обоих штаммов стрептомицетов примерно в равной степени способствует снижению величины ЛПРИ на 30 и 45-е сутки исследования. Следовательно, метаболиты, содержащиеся в биомассе стрептомицетов, способствуют предупреждению процессов забывания и улучшению процессов запоминания и хранения следа памяти.

Фоновые значения ЛПРИ у старых крыс всех групп не имели статистически достоверных отличий. Величина ЛПРИ составляла в среднем 2,7±0,2 с у крыс контрольной группы, 4,1±0,4 с у крыс, потреблявших биомассу штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и 2,8±0,2 с у крыс, потреблявших биомассу штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11. Как видно на рисунке 5.4, латентный период реакции перехода в безопасную камеру прогрессивно увеличивался, начиная с 15-х суток после выработки условных рефлексов, намного интенсивнее, чем у молодых животных, что свидетельствует о более выраженном процессе угасания следов памяти у старых животных (Рис. 5.4).

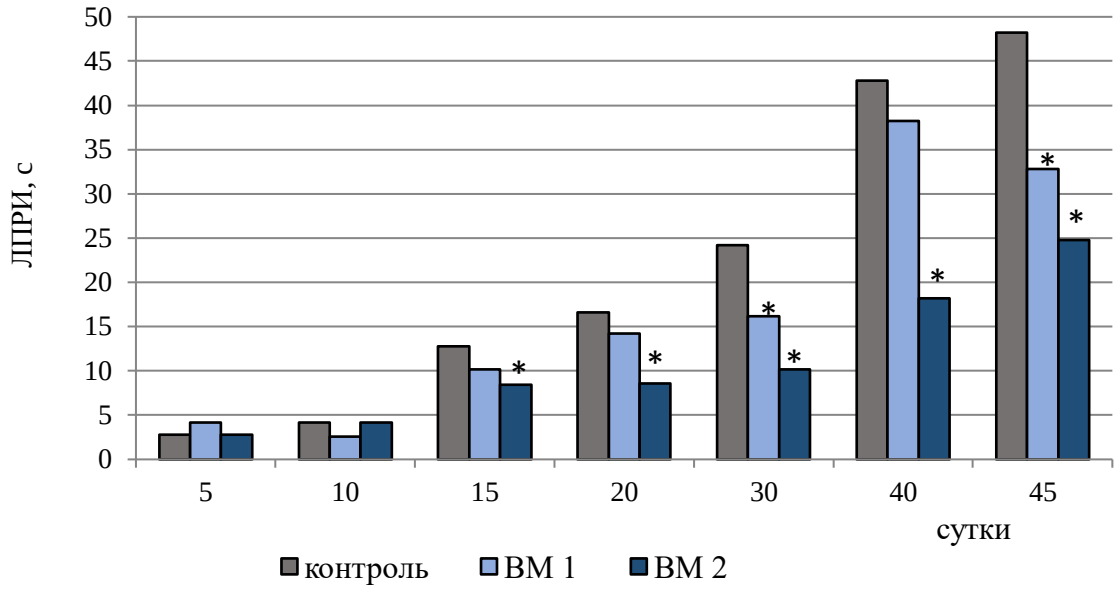


Рис. 5.4. Динамика латентного периода реакции избегания у старых крыс в течение 45 суток после выработки условных реакций активного избегания при длительном потреблении биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-06 (ВМ1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (ВМ2),

* – достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05)

У старых крыс, содержавшихся на диете с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, наблюдается снижение величины ЛПРИ на 15 и 45-е сутки исследования. У животных, потреблявших корм с добавлением биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, происходит снижение величины ЛПРИ на протяжение всего эксперимента, начиная с 16-х суток, когда выработанные условные рефлексы начинают угасать. На основании этих данных можно предположить, что метаболиты, входящие в состав местных штаммов стрептомицетов способствуют предупреждению преждевременного угасания памяти у старых животных и способствуют поддержанию процессов памяти в саногенных лимитах.

Таким образом, длительное потребление биомассы штаммов стрептомицетов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 приводит к заметному облегчению процесса обучения навыку активного избегания и улучшению условно-рефлекторной памяти молодых и, особенно, старых животных. Столь высокую эффективность длительного потребления биомассы стрептомицетов в отношении условно-рефлекторной деятельности экспериментальных животных можно объяснить высоким содержанием в них таких аминокислот, как глутаминовая, аспарагиновая, глицин, пролин, которые, как известно, выполняя функции нейромедиаторов и нейромодуляторов в различных отделах головного мозга, участвуют в механизмах нейропластичности при

обучении, фосфолипидов и стеринов, оказывающих влияние на процессы синаптической пластичности нейронов, а также, предположительно, метаболитов, способных стимулировать и поддерживать нейрональные процессы, лежащие в основе обучения и памяти (витаминов группы В, ненасыщенных жирных кислот, флавоноидов, антоцианов и др.).

Как уже было упомянуто выше, из различных штаммов стрептомицетов выделен ряд «новых» ингибиторов перекисного окисления липидов и показано их значение как мощных нейропротекторных веществ в условиях индукции липидной пероксидации. Исходя из этого, можно предположить, что зафиксированный в работе эффект облегчения выработки оборонительных условных рефлексов под влиянием биомассы стрептомицетов, обусловлен нейропротекторным действием входящих в ее состав антиоксидантов по отношению к индуцируемой в условиях болевого стрессирования активации свободно-радикального окисления. Это предположение в определенной мере находит подтверждение в результатах экспериментов на старых животных. Низкий уровень выработки условных рефлексов у старых крыс по сравнению с молодыми животными, очевидно, опосредован развитием у них в этот период процессов нейродегенерации. Тот факт, что эффективность применения биомассы стрептомицетов у старых животных существенно выше, чем у молодых, учитывая роль окислительного стресса в развитии возрастных нейродегенеративных изменений на фоне снижения активности многоуровневой антиоксидантной системы нервных клеток, свидетельствует в пользу предположения о нейропротекторном механизме эффектов метаболитов биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 в отношении процессов условно-рефлекторной деятельности и памяти.

5.2. Пространственное обучение и память белых крыс в восьмирукавном радиальном лабиринте под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11

Изучение влияния длительного потребления биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выделенных из почв центральной части Республики Молдова, на оценку пространственного обучения и памяти белых крыс линии *Wistar* обоих полов проводили в восьмирукавном радиальном лабиринте. Анализ результатов данной методики, которая базируется на использовании инстинкта крыс по исследованию новых мест в сочетании с пищевым подкреплением, позволяет исследовать рабочую и долговременную пространственную память.

Исследования выполнены на белых лабораторных крысах обоих полов породы *Wistar* (36 самцов, 36 самок) в возрасте 5-ти месяцев. Начиная с возраста 2-х месяцев, животные опытных подгрупп в течение 90 дней в качестве пищевой добавки к стандартному рациону питания получали высушенную биомассу штаммов стрептомицетов – *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) или *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2) ежедневно в дозе 250 мг/кг массы тела. Животные контрольной группы содержались на стандартном рационе питания (контроль). Спустя 90 суток после начала потребления животными биомассы стрептомицетов и при достижении ими возраста 5 месяцев приступали к изучению пространственного обучения и памяти с помощью нейроповеденческой установки восьмирукавный радиальный лабиринт.

Животные обоих половых групп (как самцы, так и самки) были разбиты на 6 подгрупп: контрольная и две опытные группы с длительность фазы задержки, согласно выше описанной методики (глава 2, пункт 2.4.), в центре лабиринта 30 секунд; контрольная и две опытные группы с ДФЗ 10 минут.

Анализ динамики среднего балла пространственной памяти у крыс контрольных групп показывает, что ДФЗ при тестировании животных в восьмирукавном радиальном лабиринте оказывает существенное влияние на процесс обучения, особенно, на начальном этапе опыта (Рис. 5.5-5.8). Так, у крыс-самцов контрольных групп в условиях ДФЗ 30 с на первый день обучения СБПП составил (-0,68±0,12 баллов), на второй – (-0,61±0,09 балла), на третий – (-0,56±0,14 балла), на четвертый – (-0,49±0,07 баллов), на пятый – (-0,38±0,18 баллов), в то время как в условиях ДФЗ 10 мин на первый день (-0,36±0,12 баллов), на второй – (-0,31±0,11 балла), на третий – (-0,25±0,14 баллов), на четвертый – (-0,17±0,16 баллов), на пятый – (-0,09±0,13 баллов). Различия между СБПП у крыс-самцов контрольных групп с различной ДФЗ на 1-5 днях обучения составили от 0,29±0,11 до 0,32±0,21 баллов (Рис. 5.5 и 5.6). На последующем этапе обучения (6 – 10 дни) различия между СБПП у крыс-самцов контрольных групп с различной ДФЗ составили от 0,20±0,09 до 0,22±0,12 баллов. Следует отметить, что эти данные противоречат более ранним результатам, где с увеличением продолжительности задержки выявляются нарушения в процессе обучения [184], но совпадают с данными, полученными позднее, которые показывают позитивное влияние увеличения длительности задержки на процесс обучения в определённых пределах и на определенном этапе опытов [107].

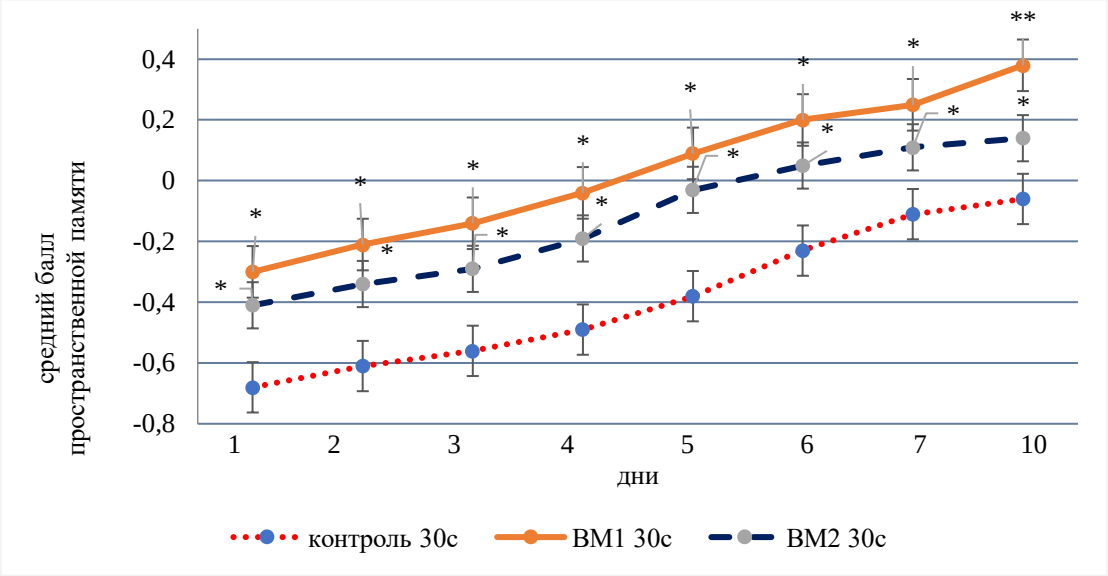


Рис. 5.5. Динамика среднего балла пространственной памяти крыс-самцов в восьмирукавном радиальном лабиринте с задержкой на 30 с под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (ВМ1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (ВМ2),

*- достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05), **- достоверные различия ВМ1 по сравнению с ВМ2 (P<0,05)

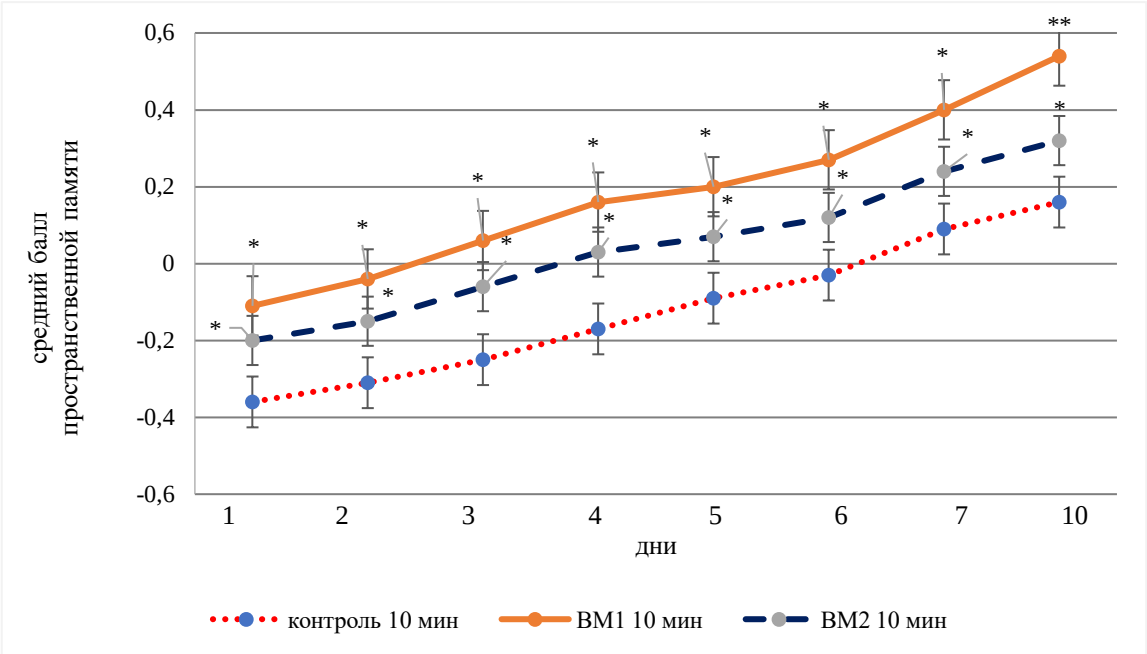


Рис. 5.6. Динамика среднего балла пространственной памяти крыс-самцов в восьмирукавном радиальном лабиринте с задержкой на 10 мин под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (ВМ1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (ВМ2),

*- достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,01-0,05). **- достоверные различия ВМ1 по сравнению с ВМ2 (P<0,01-0,05)

В результате наблюдений о влиянии задержки на поведение животных можно предположить, что крысам в условиях ДФЗ 30 с требовалось больше времени для завершения фазы тестирования, и у этих крыс запоминание было явно хуже. Использование гильотинных дверей вызывает у животных кратковременную реакцию замирания – поведение, которое обычно демонстрируют крысы в стрессовых ситуациях. Таким образом, процедура открытия и закрытия дверей ВРЛ в начале фазы тестирования могла представлять собой неконтролируемый стрессор, нарушающий внимание животных. В течение 10 минут эти стрессоры были рассредоточены во времени, что позволяло животным восстанавливаться после стрессовых раздражителей во время тестирования. Напротив, потенциально стрессовые стимулы действовали в течение короткого периода времени в условиях ДФЗ 30 с, и крысы, возможно, не смогли полностью восстановиться от первого стрессора до того, как возник последующий стрессор. В результате внимание нарушалось только у животных из групп с короткой задержкой, и обучение ухудшалось в условиях ДФЗ 30 с, но не 10 мин.

Также, как и у крыс-самцов, у самок ДФЗ оказывала влияние на СБПП, и при более продолжительной ДФЗ СБПП увеличивается (Рис. 5.7 и 5.8). Интересно, что у крыс-самок СБПП ниже чем у самцов, как в условиях ДФЗ 30 с, так и 10 мин. Так, у крыс-самок контрольных групп в условиях ДФЗ 30 с на первый день обучения СБПП составил (-0,82±0,11 балла), на второй – (-0,73±0,09 баллов), на третий – (-0,62±0,21 балла), на четвертый – (-0,53±0,17 балла), на пятый – (-0,43±0,12 балла), в то время как в условиях ДФЗ 10 мин первый день обучения СБПП составил (-0,48±0,13 баллов), на второй – (-0,41±0,11 балла), на третий – (-0,34±0,21 балла), на четвертый – (-0,22±0,18 балла), на пятый – (-0,10±0,12 балла). Различия между СБПП у крыс-самок контрольных групп с различной ДФЗ на 1-5 днях обучения составили от 0,28±0,09 до 0,34±0,13 баллов. На последующем этапе обучения (6 – 10 дни) различия между СБПП у крыс-самок контрольных групп с различной ДФЗ составили от 0,30±0,18 до 0,32±0,21 баллов. Таким образом, у крыс-самок пространственные условные рефлексы вырабатываются хуже, чем у самцов на начальном этапе обучения. Следует отметить, что в отличии от этого, ранее в исследованиях, проведенных в Институте Физиологии и Санокреатологии, было показано, что у крыс-самок оборонительные условные рефлексы в челночной камере при использовании в качестве безусловного подкрепления электрокожного раздражителя, вырабатываются с такой же скоростью, а, иногда и легче, чем у самцов [59, 60].

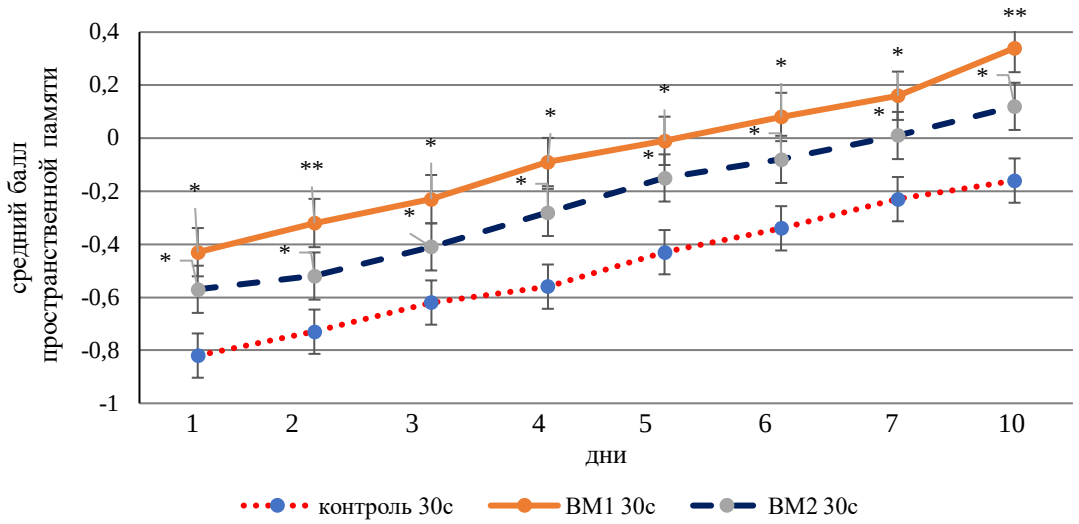


Рис. 5.7. Динамика среднего балла пространственной памяти крыс-самок в восьмирукавном радиальном лабиринте с задержкой 30с под влиянием под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (ВМ1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (ВМ2)

*- достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05). **- достоверные различия ВМ1 по сравнению с ВМ2 (P<0,01-0,05)

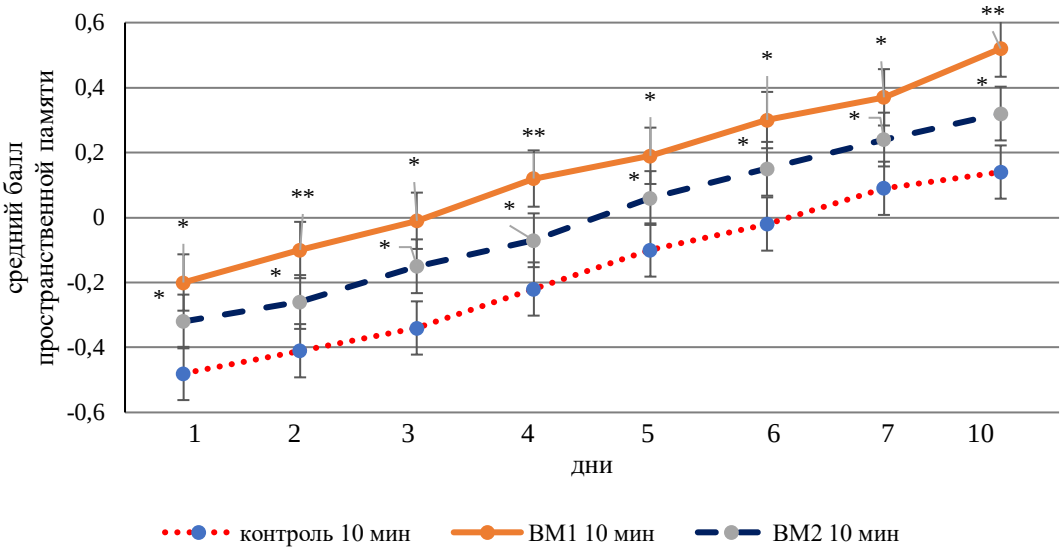


Рис. 5.8. Динамика среднего балла пространственной памяти крыс-самок в восьмирукавном радиальном лабиринте с задержкой 10 мин под влиянием под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (ВМ1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (ВМ2)

*- достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,01). **- достоверные различия ВМ1 по сравнению с ВМ2 (P<0,01-0,05)

По литературным данным известно, что рабочая память и определенные области мозга имеют половой диморфизм [33], а большое надежное преимущество самцов крыс было замечено в радиальном лабиринте. Префронтальные функции дифференцированы по половому признаку, а эмоционально-индуцированная память, по-видимому, дифференцирована по полу в миндалевидном теле. Но что еще более важно, супрахиазматическое ядро (форма, количество клеток), а также гиппокамп (плотность шипов, связность), тесно связанные с обучением и памятью, представляют собой структуры с половым диморфизмом. На самом деле мужской и женский гиппокамп значительно различаются по своему анатомическому строению, своей нейрохимии и своей реакции на стрессовые ситуации. Также в литературе отмечено, что цикл эструса влияет на стратегию обучения лабиринту у самок крыс [47]. Половые гормоны, такие как эстрогены, могут изменять возбудимость активности гиппокампа, влиять на связывание рецепторов NMDA и пластичность нейронов и долгосрочную потенциацию. Это предполагает, что мужской и женский гиппокамп значительно различаются по своей реакции на стрессовые ситуации.

Результаты исследования пространственного обучения и памяти под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (BM2) с помощью восьмирукавного радиального лабиринта показали, что длительное потребление белыми крысами обоих полов биомассы стрептомицетов способствует заметному увеличению числа корректных входов в рукава с извлечением пищевой награды и сокращению числа ошибок, т.е. любых некорректных входов в рукава, что приводит к заметному увеличению значения СБПП, другими словами, способствует облегчению процесса обучения, активизации и сохранения следа пространственной памяти (Рис. 5.5-5.8).

Как было упомянуто выше в обзоре литературы при использовании другой модели в Институте Физиологии и Санокретологии было обнаружено, что длительное потребление белыми крысами обоих полов культуральной жидкости и, особенно, биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 облегчает выработку оборонительных условных рефлексов и способствует увеличению скорости целенаправленных двигательных реакций [59, 60]. В наших опытах было показано (глава 5, пункт 5.1), что биомасса данных штаммов стрептомицетов стимулирует выработку условной реакции активного избегании в большей степени у старых животных с признаками нейродегенерации по сравнению с молодыми, а также заметно понижает латентный период реакции избегания на различных сроках после выработки УРАИ, способствуя замедлению угасания следов условно-рефлекторной памяти (также в большей степени у старых животных).

Продолжая описывать полученные нами данные, следует отметить, что биомасса штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 в разной степени способствует облегчению выработки пространственной памяти. Как видно на рис. 5.5-5.8, длительное потребление белыми крысами препарата ВМ1 в большей степени увеличивает СБПП по сравнению с препаратом ВМ2. В некоторых случаях эффекты ВМ1 и ВМ2 в отношении процесса обучения достоверно различаются, особенно на втором этапе тестирования, после перерыва на 8 и 9 дни. Следует также отметить, что эффективность биомассы стрептомицетов выше при ДФЗ 30 с по сравнению с 10 мин и, особенно, на начальном этапе опытов (1-4 дни). Так, например, у крыс-самцов в условиях ДФЗ 30 с препарат ВМ1 способствует увеличению СБПП на 1 день – на 0,38±0,11 баллов, на 2 день – на 0,40±0,25 баллов, на 3 день – на 0,42±0,19 баллов, на 4 день – на 0,42±0,17 баллов, а в условиях ДФЗ 10 мин на 1 день – на 0,25±0,13 баллов, на 2 день – на 0,27±0,14 баллов, на 3 день – на 0,31±0,18 баллов, на 4 день – на 0,33±0,22 баллов. У крыс-самок препарат ВМ1 способствует увеличению СБПП на 1 день – на 0,34±0,16 баллов, на 2 день – на 0,39±0,18 баллов, на 3 день – на 0,41±0,20 баллов, на 4 день – на 0,45±0,23 баллов, а в условиях ДФЗ 10 мин на 1 день – на 0,28±0,09 баллов, на 2 день – на 0,31±0,12 баллов, на 3 день – на 0,33±0,19 баллов, на 4 день – на 0,34±0,27 баллов.

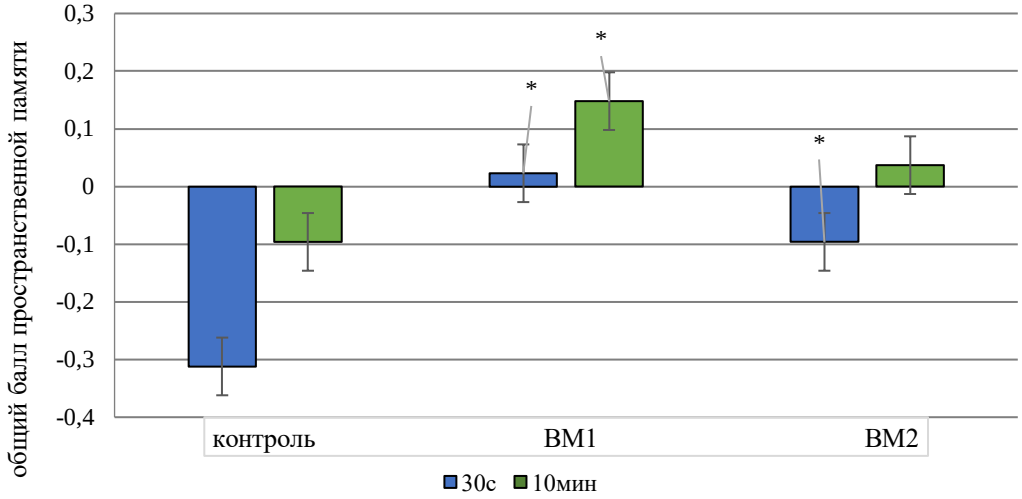


Рис. 5.9. Общий балл пространственной памяти крыс-самцов в восьмирукавном радиальном лабиринте под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (ВМ1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (ВМ2),

*- достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05)

Это приводит к тому, что общий бал пространственной памяти, рассчитанный как среднее суммы СБПП при ДФЗ 30 с за 10 дней опытов, увеличивается под влиянием

препаратов ВМ1 и ВМ2, соответственно, на 0,335 и 0,216 баллов у крыс-самцов, и на 0,339 и 0,192 баллов у крыс-самок. ОБПП при ДФЗ 10 мин за 10 дней опытов также увеличивается у групп ВМ1 и ВМ2, соответственно, на 0,244 и 0,133 баллов у крыс-самцов, и на 0,253 и 0,131 баллов у крыс-самок. Следует отметить, что при ДФЗ 30 с, как и следовало ожидать ОБПП увеличивается в большей степени, чем при ДФЗ 10 мин (Рис. 5.9 и 5.10).

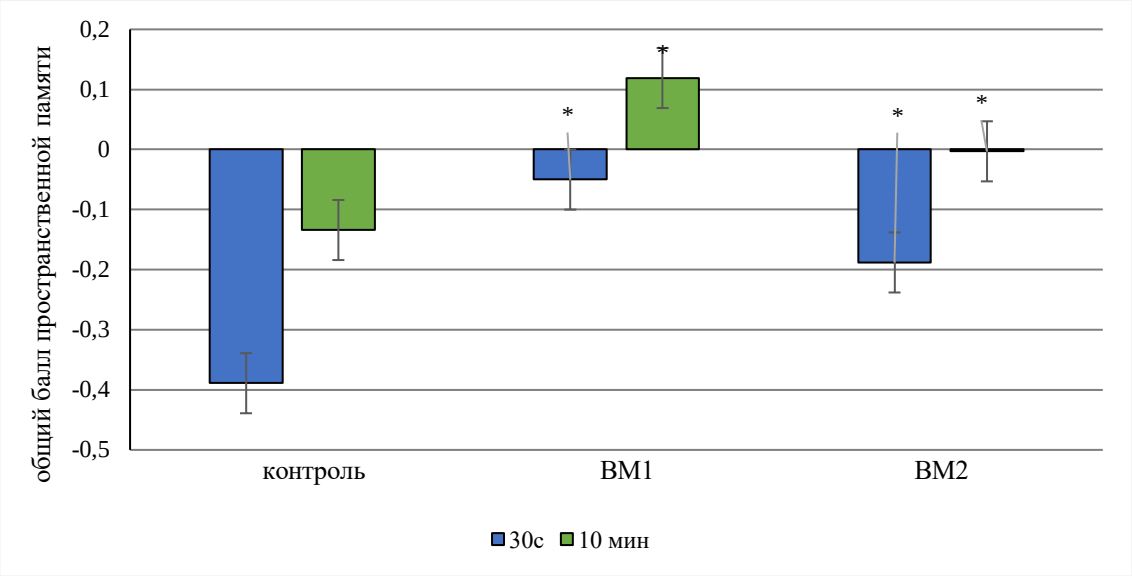


Рис. 5.10. Общий балл пространственной памяти крыс-самок в восьмирукавном радиальном лабиринте под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (ВМ1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (ВМ2), *- достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05)

На этапе изучения сохранности следов пространственной долговременной памяти спустя 20 дней после завершения тестирования, т.е. на 30-й день эксперимента после первого дня тестирования, согласно полученным данным, средний балл памяти снизился у крыс-самцов контрольной группы по сравнению с 10 днем тестирования в условиях ДФЗ 30 с и 10 мин на 0,31 балла, а у крыс-самок в условиях ДФЗ 30 с – на 0,20 балла, а в условиях ДФЗ 10 мин – на 0,42 балла (Рис. 5.11 и 5.12). Под влиянием биомассы стрептомицетов, СБПП на 30 день опытов у крыс обоих полов СБПП заметно выше, чем у контроля. При этом, у контрольных и опытных животных, потреблявших препараты ВМ1 и ВМ2, средний бал пространственной памяти снизился приблизительно одинаково. Так, у крыс-самцов, получавших препарат ВМ1, средний балл памяти снизился на 0,22 балла и 0,30 баллов (при ДФЗ 30 с и 10 мин, соответственно) по сравнению с 10-м днем эксперимента, а у крыс-самок – на 0,26 балла и 0,36 балла (при ДФЗ 30 с и 10 мин, соответственно).

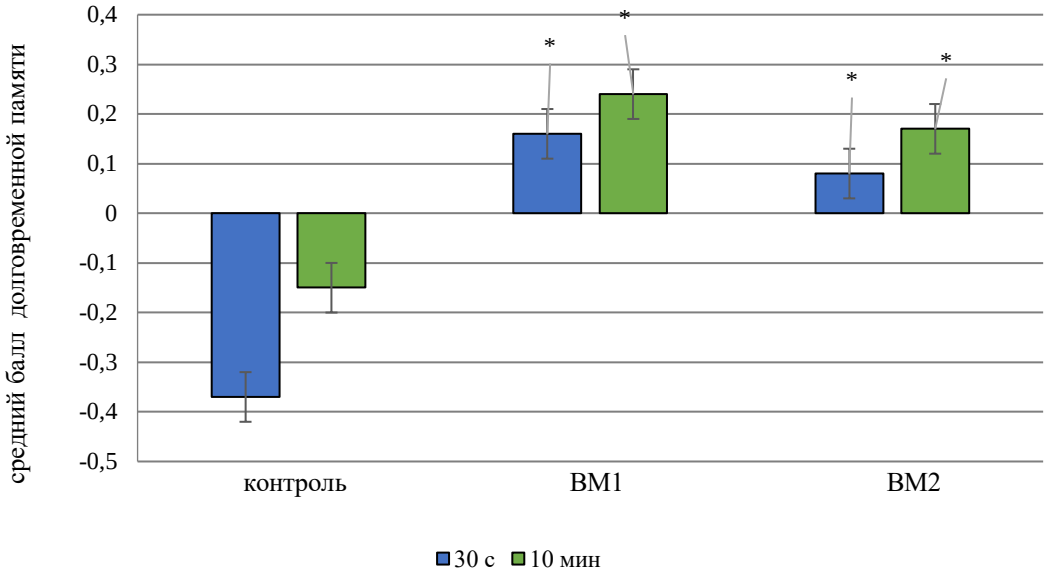


Рис. 5.11. Динамика среднего балла долговременной памяти в восьмирукавном радиальном лабиринте у белых крыс-самцов под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (ВМ1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (ВМ2) на 30 день эксперимента,

* – достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05)

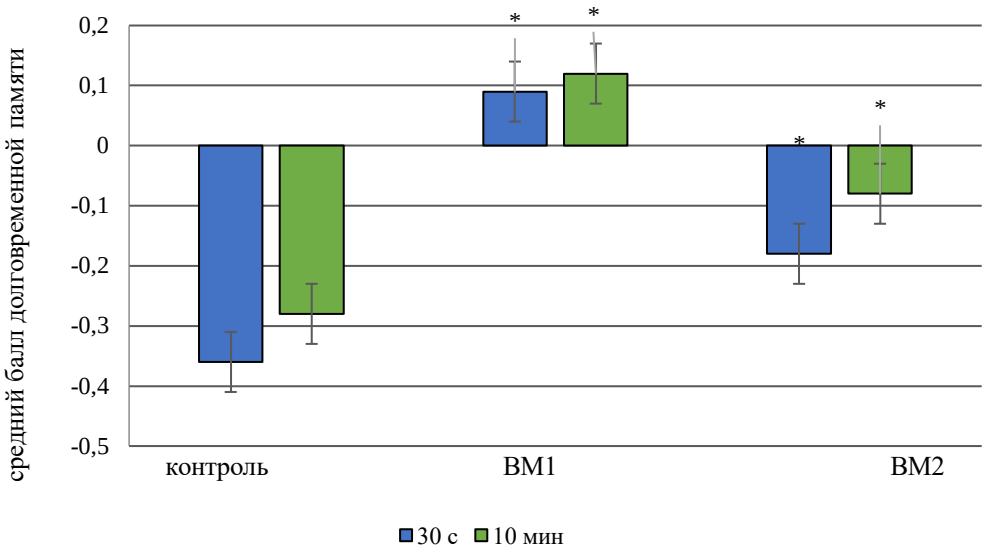


Рис. 5.12. Динамика среднего балла долговременной памяти в восьмирукавном радиальном лабиринте у белых крыс-самок под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (ВМ1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (ВМ2) на 30 день эксперимента,

* – достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05)

Можно предположить, что более существенная эффективность биомассы стрептомицетов при ДФЗ 30 с по сравнению с 10 мин связана с их антиоксидантным действием, что способствовало снижению отрицательных последствий стресса в

отношении нервных клеток. Однако, эффективность биомассы стрептомицетов остается существенной и при ДФЗ 10 мин, а также на втором этапе обучения, после привыкания животных и снижения уровня стресса. Это позволяет предположить о наличии в составе биомассы стрептомицетов наряду с метаболитами с антиоксидантным действием, оказывающим нейропротекторное действие, метаболитов, обладающих способностью стимулировать нейрогенез и синаптогенез.

Показано, что механизм действия инубозинов А и В, продуцируемых штаммом *Streptomyces sp.* IFM 11440, выделенным из почв префектуры Киба (Япония), и ускоряющих дифференцировку нейральных стволовых клеток, связан с увеличением экспрессии мРНК пронейральных факторов транскрипции нейрогенинов 1 и 2 (Ngn1 и Ngn2), фактора нейрогенной дифференцировки 2 (NeuroD2) и пронейрального нейротрофического фактора роста нейротрофина 3 (NT-3) [45]. В отличие от инубозина А, инубозин В способен существенно активировать нейрогенин 2 (Ngn2) [71], который представляет собой пронейральный фактор транскрипции bHLH, участвующий как в нейрогенезе, так и в спецификации нейронов. Этот белок связывается с регуляторными элементами энхансерного бокса на промоторах многих генов, связанных с нейрогенезом и спецификацией нейронов. Следовательно, активаторы промотора Ngn2, каковым является инубозин В, могут ускорять дифференцировку нервных стволовых клеток. Поскольку инубозин А не проявляет активности промотора Ngn2, механизм его воздействия на дифференцировку нейральных стволовых клеток реализуется другими путями. Лактацистин, синтезируемый штаммом стрептомицетов вида *Streptomyces lactacystinaeus,* выделенным из почв Японии, является индуктором нейритогенеза в клетках нейробластомы [113]. Авторами было продемонстрировано, что мишенью для лактацистина является протеасома – многобелковый комплекс, осуществляющий метаболический энергоемкий избирательный и поэтапный гидролиз, а также процессинг внутриклеточных белков при помощи протеолиза до коротких пептидов. Лактацистин был первым обнаруженным непептидным ингибитором протеасом благодаря его сродству к определенным каталитическим субъединицам протеасомы [117].

5.3. Пространственное обучение и память белых крыс в водном лабиринте Морриса под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11

С целью изучения пространственного обучения и памяти у белых крыс под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 была использована поведенческая установка «Водный лабиринт Морриса».

Исследования были выполнены на 18 белых лабораторных крысах-самцах линии *Wistar* в возрасте 5-ти месяцев, содержавшихся в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. Начиная с возраста 2-х месяцев, животные опытных подгрупп в течение 90 дней в качестве пищевой добавки к стандартному рациону питания получали высушенную биомассу штаммов стрептомицетов – *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (опытная группа ВМ1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (опытная группа ВМ2). Животные контрольной группы содержались на стандартном рационе питания.

Методика ВЛМ, основана на том, что животное ищет кратчайшую дистанцию до спрятанной под водой платформы на основании предыдущей памяти об её местонахождении [144, 150, 154]. С помощью данного теста исследовали латентный период (ЛП), в течение которого крыса находила платформу и забиралась на нее, и пройденный путь (ПП), который животное проходило от места помещения в воду до платформы. Данная методика подробно описана в главе 2, пункт 2.4.

Анализ полученной нами динамики ЛП и ПП при исследовании поведения крыс-самцов в водном лабиринте Морриса показывает существенные изменения в процессе пространственного обучения и памяти. Как видно из рисунка 5.13, у крыс-самцов контрольной группы в первый день обучения ЛП нахождения платформы составил 52,3±2,3 с, во второй – 55,1±3,1 с, в третий – 45,3±4,6 с, в четвертый – 41,2±3,7 с. В то же время некоторые крысы контрольной группы ни разу не смогли найти платформу. Следует отметить, что ПП у крыс-самцов контрольной группы в первый день обучения составил 790,3±4,1 см, во второй – 750,6±2,3 см, в третий – 549,7±2,8 см, в четвертый – 504,3±4,6 см (Рис. 5.14). ЛП нахождения платформы укорачивался с 52,3±2,3 с в первый день обучения до 41,2±3,7 с к 4 дню обучения, а проплытое расстояние ПП с 790,3±4,1 см до 504,3±4,6 см соответственно.

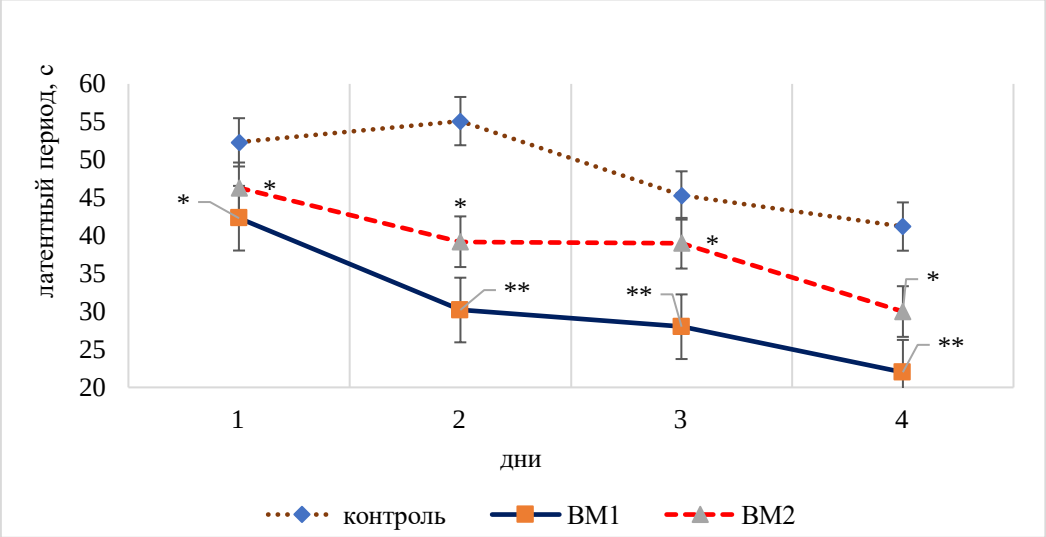


Рис. 5.13. Динамика продолжительности латентного периода в процессе обучения крыс-самцов в водном лабиринте Морриса под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (ВМ1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (ВМ2),

* – достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,01-0,05)

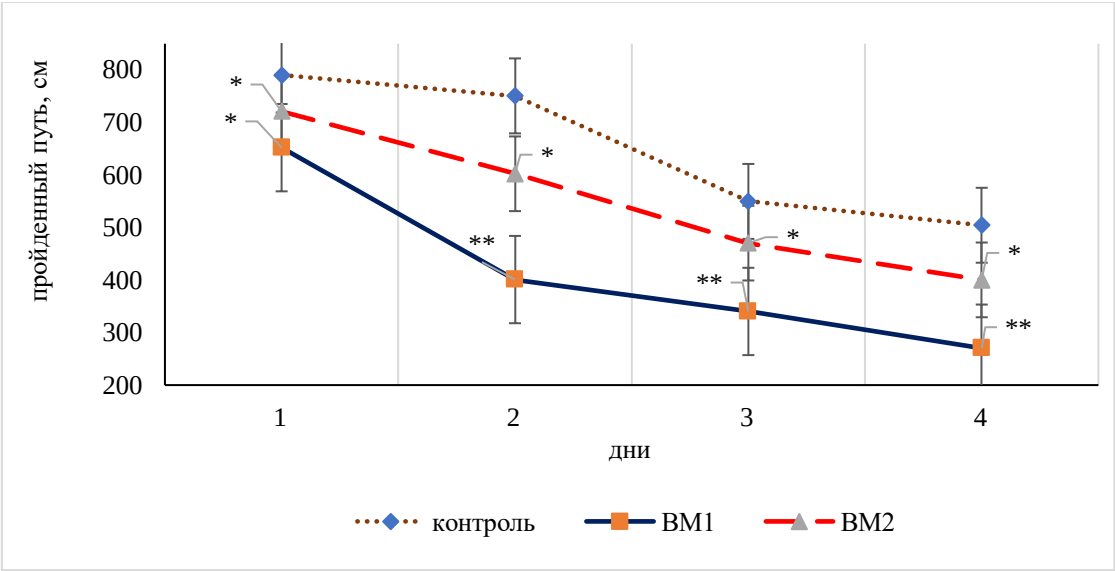


Рис. 5.14. Динамика пройденного пути до платформы в процессе обучения крыс-самцов в водном лабиринте Морриса под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (ВМ1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (ВМ2),

* – достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05)

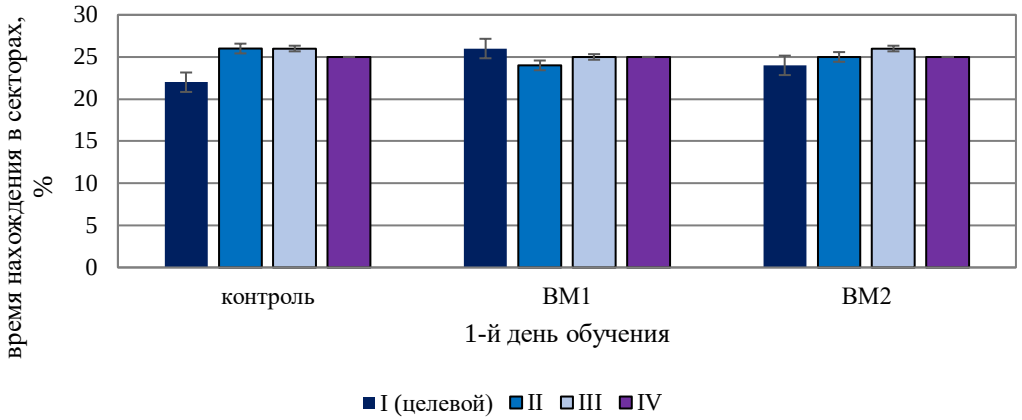
Продолжая описывать полученные нами данные, следует отметить, что биомасса штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 в разной степени способствует облегчению выработки пространственной памяти при исследовании в ВЛМ. Исходя из этого, длительное потребление крысами-самцами

препарата ВМ1 в большей степени снижает ЛП по сравнению с препаратом ВМ2 (Рис. 5.13.). У крыс-самцов, получавших препарат ВМ1, ЛП нахождения платформы составил в первый день обучения 42,3±2,9 с, во второй – 30,2±3,1 с, в третий – 28,0±3,7 с, в четвертый – 22,0±2,8 с. ЛП нахождения платформы укорачивался с 42,3±2,9 с в первый день обучения до 22,0±2,8 с к 4 дню обучения, активные снижения ЛП заметны со второго дня обучения, в отличие от группы контроля. Результаты исследования ПП до платформы в процессе обучения у крыс-самцов, получавших препарат ВМ1, показали, что в первый день - 652±3,8 см, во второй – 400,9±2,9 см, в третий – 340,2±2,1 см, в четвертый – 270,2±1,7 см (Рис. 5.14.). ПП до нахождения платформы укорачивался с 652±3,8 см в первый день обучения до 270,2±1,7 см к четвертому дню обучения. В некоторых случаях эффекты ВМ1 и ВМ2 в отношении процесса обучения достоверно различаются, особенно на второй день обучения.

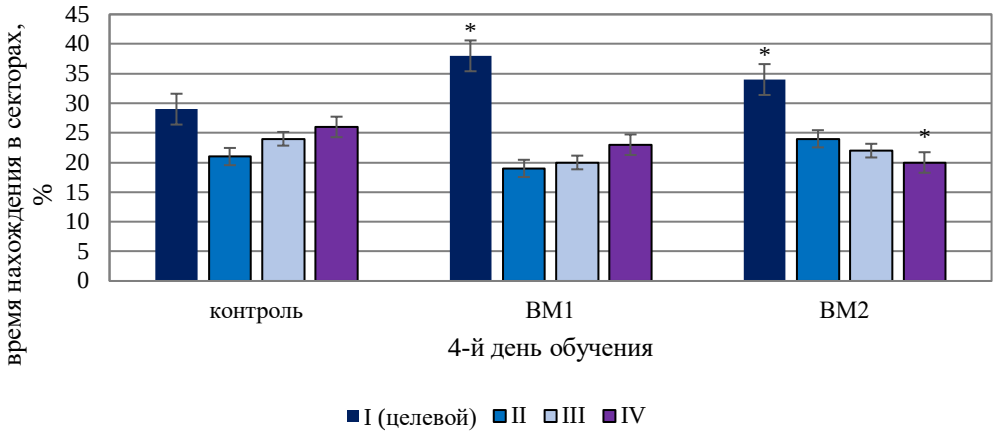
Наблюдения за крысами-самцами в водном лабиринте Морриса как в опытных, так и в контрольной группах, показали, что они используют разные стратегии поведения. Среди них есть как продуктивные стратегии, такие как целенаправленный поиск по внешним ориентирам, когда животное ищет платформу в непосредственной близости от нее, или же случайный поиск, когда животное использует разнообразные траектории, охватывающие всю площадь бассейна, так и непродуктивные, когда животное не ищет платформу, а просто дрейфует в воде или пытается выбраться из бассейна и плавает непосредственно вдоль стенок, касаясь их лапами.

Согласно представленной методике, для исследования пространственной памяти находили классический критерий запоминания – время нахождения крыс-самцов в целевом секторе. Как видно на рис. 5.15, длительное потребление белыми крысами препарата ВМ1 в большей степени улучшает запоминание нахождения платформы по сравнению с препаратом ВМ2.

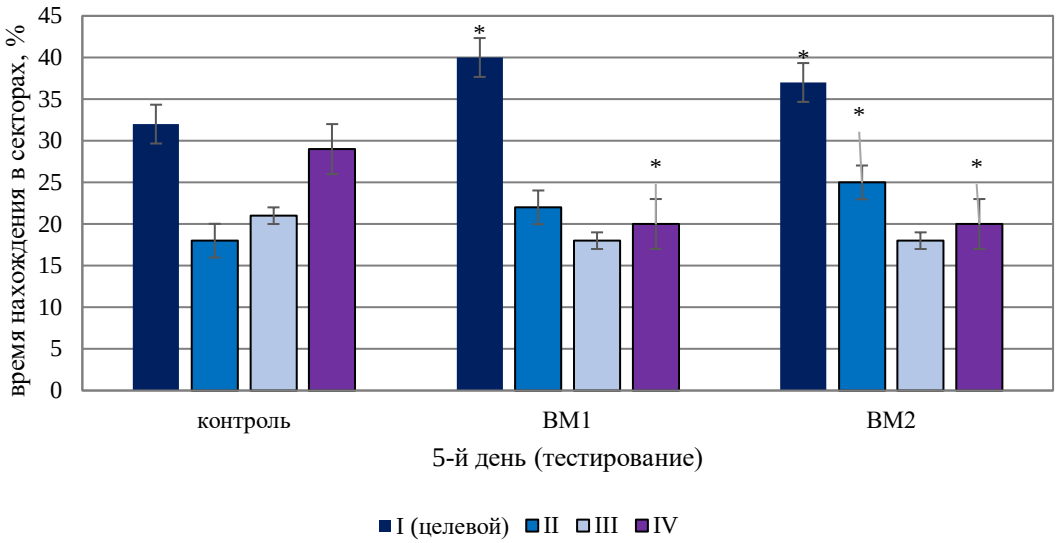
Крысы-самцы, получавшие препарат ВМ1, находились в целевом секторе больше времени уже на 4-й день обучения, что составляет 38±1,7%. Таким образом, животные группы, потреблявшие препарат ВМ1, быстрее находили платформу в процессе обучения (меньший латентный период), а также больше времени проводили в целевом секторе во время тестирования пространственной памяти на 5-й день (40,1±3,2%), когда убирали платформу из бассейна. Животные, получавшие препарат ВМ2, на первый день обучения находились в целевом секторе 24,0±4,1%, на четвертый день – 34±2,9%, на пятый день тестирования – 37±2,5%.



А)



Б)



С)

Рис. 5.15. Продолжительность пребывания крыс-самцов в секторах водного лабиринта Морриса на 1-й день обучения (А), на 4-й день (Б) и после обучения на 5-й день тестирования (С) под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (ВМ1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (ВМ2),

* – достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,01-0,05)

Наряду с этим, для оценки активации пространственной долговременной памяти тестирование повторили на 9-й день опыта, то есть через четыре дня после 5-го дня тестирования (Рис. 5.16.). Полученные результаты показали, что даже после длительного перерыва (4 дня) крысы-самцы, получавшие препараты ВМ1 и ВМ2, длительно находятся в целевом секторе по сравнению с контролем (45±2,3%, 40,1±1,8% и 34±3,6% соответственно), и несколько выше даже по сравнению с 5-м днем тестирования, что свидетельствует о сохранности следов памяти и эффективном влиянии вторичных метаболитов стрептомицетов на процесс активации пространственной долговременной памяти.

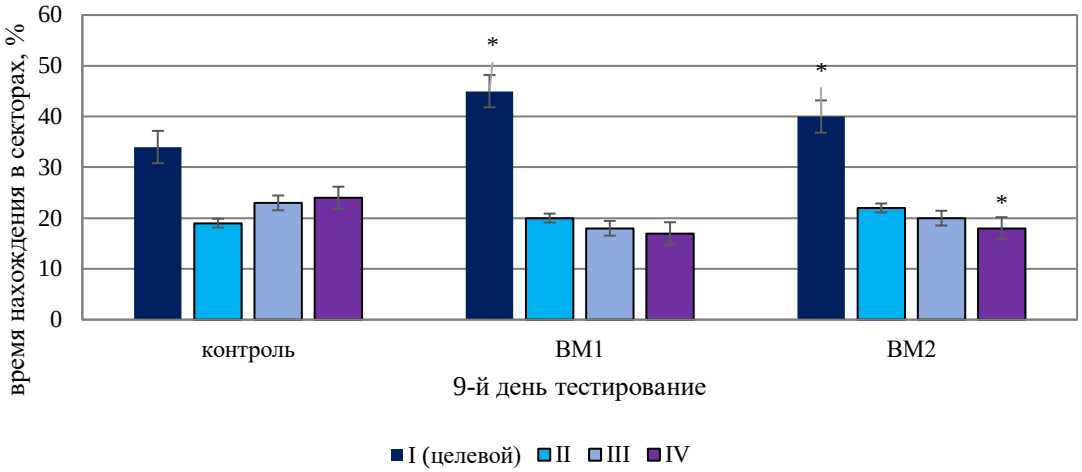


Рис. 5.16. Продолжительность пребывания крыс-самцов в секторах водного лабиринта Морриса на 9-й день тестирования под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (ВМ1) *и Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (ВМ2), * – достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05).

В результате проведенного тестирования на 30-й день видно, что даже после длительного перерыва (21 день от последнего дня тестирования) у крыс-самцов, получавших препараты ВМ1 и ВМ2, сохраняются следы памяти, животные длительно находятся в целевом секторе по сравнению с контролем (ВМ1 - 38±3,8%, ВМ2 - 32±3,1%, контроль - 28±2,7%) (Рис. 5.17.). Потребление животными опытных групп препаратов ВМ1 и ВМ2 оказывает положительное действие на процесс пространственного обучения и сохранения долговременной памяти.

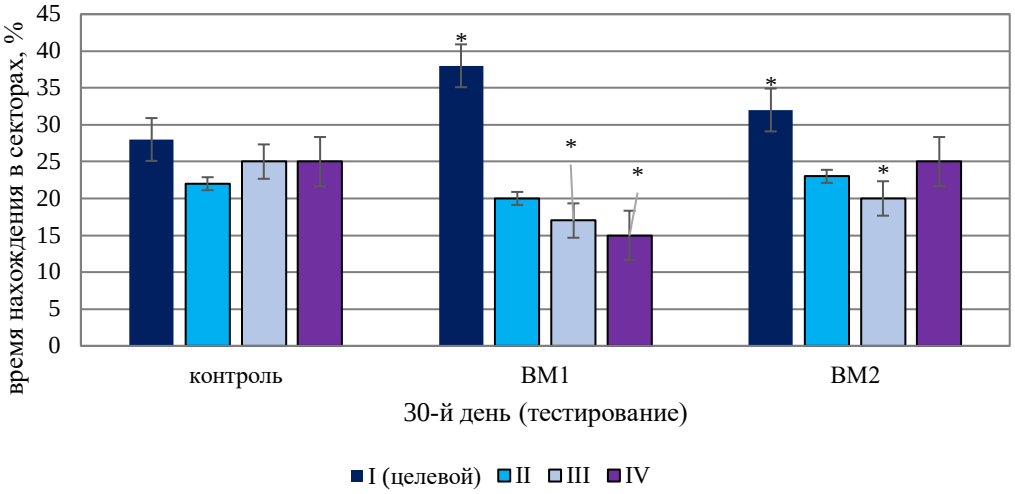


Рис. 5.17. Продолжительность пребывания в секторах водного лабиринта Морриса крыс-самцов на 30-й день под влиянием биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (ВМ1) и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 (ВМ2),

* – достоверные различия по сравнению с контролем (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-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 были проведены впервые. Полученные данные могут косвенно демонстрировать возможность влияния вторичных метаболитов биомассы исследуемых штаммов на различные механизмы обучения, рабочей и долговременной памяти у лабораторных животных, что определяется неодинаковым составом биомассы стрептомицетов.

Таким образом, полученные результаты показывают, что биомасса штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 способствует процессу пространственного обучения, улучшению рабочей памяти и процессу сохранения пространственной долговременной памяти у белых крыс, перспективны для дальнейших исследований с целью выделения и идентификации веществ, обладающих нейропротекторными и ноотропными свойствами.

Исследования состава биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 показали высокое содержание таких аминокислот, как глутаминовая, аспарагиновая, глицин, пролин [5, 6, 76, 77], которые, как известно, выполняя функции нейромедиаторов и нейромодуляторов в различных отделах головного мозга, участвуют в механизмах нейропластичности при обучении, а также фосфолипидов и стеринов [9, 14, 42, 96-99], оказывающих влияние на процессы синаптической пластичности нейронов. Подобные данные получены и в нашей работе (глава 3, пункт 3.3). Это могло бы в определенной степени объяснить обнаруженные нами эффекты биомассы в отношении

поведения экспериментальных животных. Кроме этого, исходя из данных других авторов, можно обоснованно предположить наличие в биомассе вышеуказанных штаммов стрептомицетов метаболитов, способных стимулировать и поддерживать нейрональные процессы, лежащие в основе обучения и памяти (витаминов группы В, ненасыщенных жирных кислот, флавоноидов, антоцианов и др.) [157, 170]. Однако, анализ данных о выделении из биомассы ряда штаммов стрептомицетов специфических вторичных метаболитов с выраженными нейропротекторными свойствами, в сопоставлении с полученными нами воспроизводимыми данными о высокой эффективности продуктов жизнедеятельности штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 в отношении обучения и памяти, позволяет предположить наличие в биомассе этих штаммов подобных по эффективности биологически активных веществ.

Как уже было упомянуто выше, способность метаболитов стрептомицетов предотвращать нейродегенерацию обусловлена, прежде всего, их антиоксидантным действием; из различных штаммов стрептомицетов выделен ряд «новых» ингибиторов перекисного окисления липидов и показано их значение как мощных нейропротекторных веществ в условиях индукции липидной пероксидации. Анализ полученных нами результатов свидетельствует в пользу антиоксидантного механизма нейропротекторного действия метаболитов, входящих в состав биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11. Хорошо известно, что болевой электрокожный раздражитель, примененный при выработке оборонительных условных рефлексов в качестве условного стимула в челночной камере, а также закрывание и открывание гильотинных дверей в методике Восьмирукавный радиальный лабиринт и плавание в воде в модели Водный лабиринт Морриса, являются достаточно сильными стрессовыми факторами для подопытных животных на начальном периоде обучения [23]. В состоянии острого стресса происходит резкое повышение интенсивности перекисного окисления липидов в нервных клетках на фоне угнетения антиоксидантной защиты, что, в конечном счете, негативно сказывается на процессе обучения [99]. В наших опытах потребление животными биомассы стрептомицетов способствует достижению более высокого уровня выработки условных рефлексов, в первую очередь, за счет существенного увеличения числа УРАИ в динамике условно-рефлекторной деятельности на начальном периоде обучения [59, 60]. Исходя из этого, можно предположить, что зафиксированный эффект облегчения выработки условных рефлексов под влиянием биомассы стрептомицетов, обусловлен нейропротекторным действием входящих в ее состав антиоксидантов по отношению к индуцируемой в условиях болевого стрессирования активации свободно-радикального окисления.

Это предположение в определенной мере находит подтверждение в результатах экспериментов на старых животных. Низкий уровень выработки условных рефлексов у старых крыс контрольных групп по сравнению с молодыми животными опосредован развитием у них процессов нейродегенерации. Тот факт, что эффективность применения биомассы стрептомицетов, особенно, *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 у старых животных существенно выше, чем у молодых, учитывая роль окислительного стресса в развитии возрастных нейродегенеративных изменений на фоне снижения активности многоуровневой антиоксидантной системы нервных клеток [15], может свидетельствовать в пользу предположения об антиоксидантном механизме нейропротекторного эффекта биомассы стрептомицетов в отношении процессов условно-рефлекторной деятельности и памяти.

С целью проверки этого предположения в питательную среду для культивирования штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 мы добавляли парааминобензойную кислоту, являющуюся исходным материалом для синтеза бензастатинов [32] – алкалоидов различных групп, ряд которых являются одними из наиболее распространенных и мощных антиоксидантов с нейропротекторными свойствами, синтезируемых штаммами стрептомицетов [75]. Следует отметить, что добавление ПАБК в среду для культивирования выделенного из почв Японии штамма *Streptomyces nitrosporeus* 30643, продуцирующего бензастатины, вызывало заметное увеличение синтеза бензастатинов А и В, нейропротекторное действие которых связывают непосредственно с их антиоксидантными свойствами, и производных последнего, практически не оказывая влияния на синтез некоторых других бензастатинов [128]. Результаты исследования влияния биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, выращенного на среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты на обучение и память белых крыс описаны в следующей главе.

5.5. Выводы к главе 5

1. Потребление белыми крысами биомассы местных штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и, в большей степени, *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выделенных из почв центральной части Республики Молдова, существенно стимулирует выработку условной реакции активного избегания у молодых и, особенно, старых животных, способствуя тем самым облегчению процесса условно-рефлекторного научения в челночной камере, а также заметно понижает латентный период реакции избегания на различных сроках после выработки условной реакции активного избегания у молодых и,

особенно, старых животных, способствуя тем самым замедлению угасания следов условно-рефлекторной памяти.

2. Биомасса стрептомицетов штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и, в меньшей степени, *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, существенно стимулирует процесс обучения белых крыс обоих полов в восьмирукавном радиальном лабиринте и способствует облегчению выработки у них рабочей, активизации долговременной пространственной памяти и снижению скорости угасания следа памяти.

3. Биомасса местных штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и, в меньшей степени, *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, существенно стимулирует процесс обучения белых крыс-самцов в водном лабиринте Морриса, способствует облегчению выработки рабочей, активизации и сохранности следов долговременной пространственной памяти.

6. ОСОБЕННОСТИ ОБУЧЕНИЯ И ПАМЯТИ БЕЛЫХ КРЫС ПОД ДЕЙСТВИЕМ БИОМАССЫ ШТАММА *STREPTOMYCES MASSASPOREUS* CNMN-AC-06, ВЫРАЩЕННОГО НА СРЕДЕ SP-I С ДОБАВЛЕНИЕМ ПАРААМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ

6.1. Влияние длительного потребления биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты, на условно-рефлекторное обучение и память белых крыс в челночной камере

Согласно результатам наших исследований, длительное потребление экспериментальными животными биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 приводит к интенсификации выработки условного рефлекса активного избегания практически на всем протяжении эксперимента по исследованию их условно рефлекторной деятельности (глава 5, пункт 5.1).

Для исследования были взяты 42 белые крысы (24 самца, 18 самок), которые были разбиты на следующие экспериментальные группы: 4 группы самцов по 6 крыс в каждой группе: контрольная и 3 опытные: 1 группа – стандартный рацион питания (контроль); 2 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (здесь и далее – 250 мг/кг массы тела в сутки), культивированного на питательной среде SP-I (BM1); 3 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде

SP-I, содержащей 1,37 г/л ПАБК (ВМ1РАВА1), 4 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I, содержащей 2,74 г/л ПАБК (ВМ1РАВА2); 3 группы самок по 6 крыс в каждой группе: контрольная и 2 опытные: 1 группа – стандартный рацион питания (контроль), 2 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I (ВМ1), 3 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I, содержащей 1,37 г/л ПАБК (ВМ1РАВА1).

В наших опытах ранее в главе 5 показано, что потребление животными биомассы стрептомицетов, культивированных на комплексной питательной среде SP-I, приводит к увеличению доли условно рефлекторных побежек уже начиная с 7-8 дня опыта. Эти результаты подтверждают данные, полученные ранее на той же экспериментальной модели [10, 59, 60].

Для изучения процессов условно-рефлекторного обучения и памяти с аверсивным подкреплением были взяты животные, получавшие вместе со стандартным рационом питания, высушенную биомассу штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на комплексной питательной среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты в различных концентрациях [75, 125].

Обнаружено, что биомасса штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I, содержащей 1,37 г/л ПАБК, вызывает заметное увеличение доли условно-рефлекторных побежек как по сравнению с контролем, так и по сравнению с группой ВМ 1 (Рис. 6.1.).

Обнаружено, что увеличение содержания ПАБК в питательной среде до 2,74 г/л (ВМ1РАВА2) не вызывает увеличение эффекта в отношении выработки условных рефлексов по сравнению с препаратом ВМ1, а в ряде случаев даже его снижает, как видно на 11-12 день опытов по выработке условных рефлексов.

На основании этих данных можно предположить, что доза ПАБК 1,37 г/л является оптимальной для стимуляции процесса обучения. Поэтому на опытах с самками белых крыс мы решили использовать эту дозу в составе питательной среды для культивирования биомассы стрептомицетов.

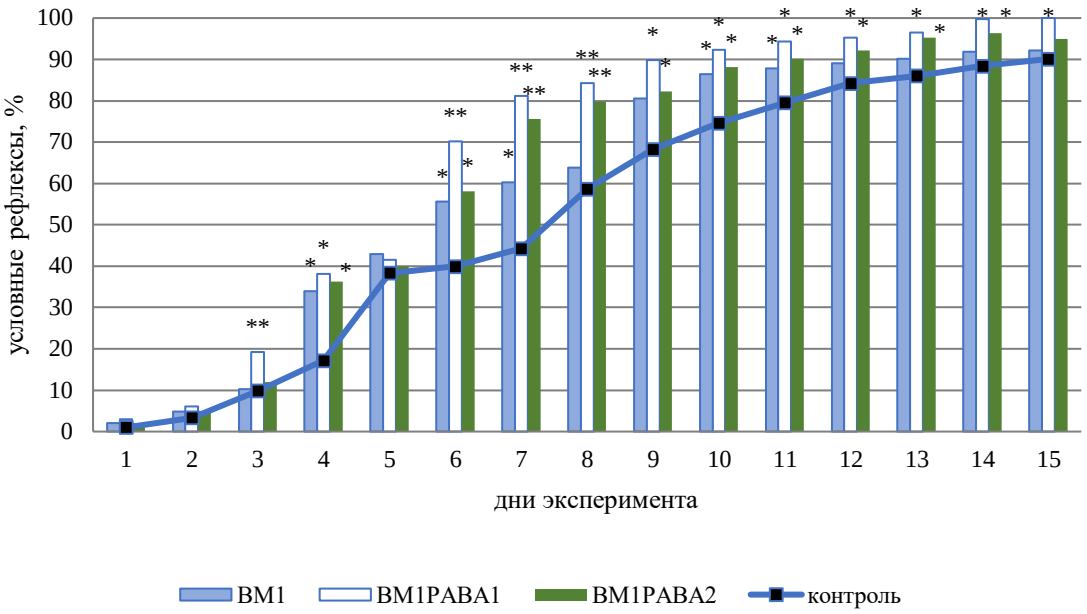


Рис. 6.1. Динамика условно-рефлекторного обучения с аверсивным подкреплением у самцов при длительном потреблении биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, выращенного на среде SP-I с добавление 4-аминобензойной кислоты, * – достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05), ** – достоверные различия по сравнению с ВМ1 (P<0,05)

На рисунке 6.2. видно, что у самок белых крыс биомасса ВМ1РАВА1 так же приводит к более выраженному эффекту в отношении процесса условно-рефлекторного обучения, чем биомасса ВМ1, полученная при культивировании на стандартной питательной среде.

Таким образом, добавление в питательную среду для культивирования *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 ПАБК в определенных дозах, вызывает заметную интенсификацию выработки оборонительных условных рефлексов активного избегания у белых крыс обоих полов.

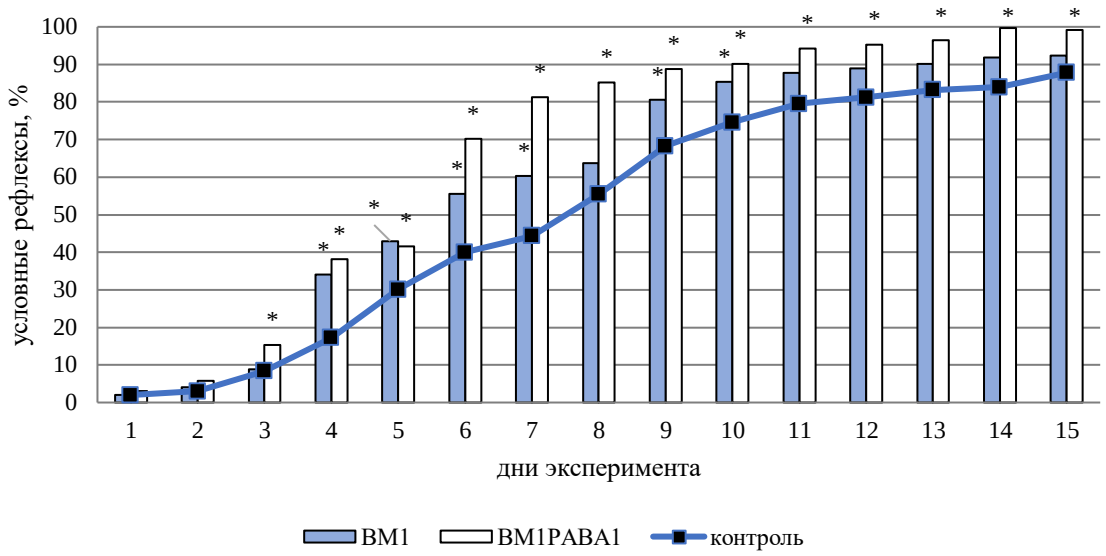


Рис. 6.2. Динамика условно-рефлекторного обучения с аверсивным подкреплением у самок при длительном потреблении биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, выращенного на среде SP-I с добавление 4-аминобензойной кислоты,

* – достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05)

Полученные данные могут косвенно демонстрировать возможность влияния биомассы исследуемого штамма на различные механизмы формирования памяти у лабораторных животных, что определяется их неодинаковым составом метаболитов стрептомицетов.

Также были проведены исследования сохранности следов памяти у экспериментальных животных путем определения динамики ЛПРИ на протяжении 45 суток после выработки УРАИ (Рис. 6.3). Величина ЛПРИ составляла на 10 сутки 1,6±0,3 с у крыс контрольной группы, 2,8±0,1 с у крыс, потреблявших биомассу ВМ1, 2,1±0,6 с у крыс, потреблявших биомассу ВМ1РАВА1 и 4,1±0,2 с у животных, потреблявших ВМ1РАВА2. Анализируя данные, представленные на рисунке 6.3., можно сказать, что латентный период реакции перехода в безопасную камеру прогрессивно увеличивался, начиная с 15-х суток после выработки условных рефлексов, что полностью соответствует динамике угасания условного рефлекса у белых крыс-самцов контрольной группы. Добавление в корм молодых животных биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I, с добавлением 1,37 г/л 4-аминобензойной кислоты, примерно в равной степени способствует снижению величины ЛПРИ на 35 и 45-е сутки исследования, при этом показывая наилучший результат по отношению ко всем экспериментальным группам. Следовательно, возможно именно метаболиты данной

биомассы стрептомицетов, способствуют предупреждению процессов забывания и улучшению процессов запоминания и хранения следа памяти.

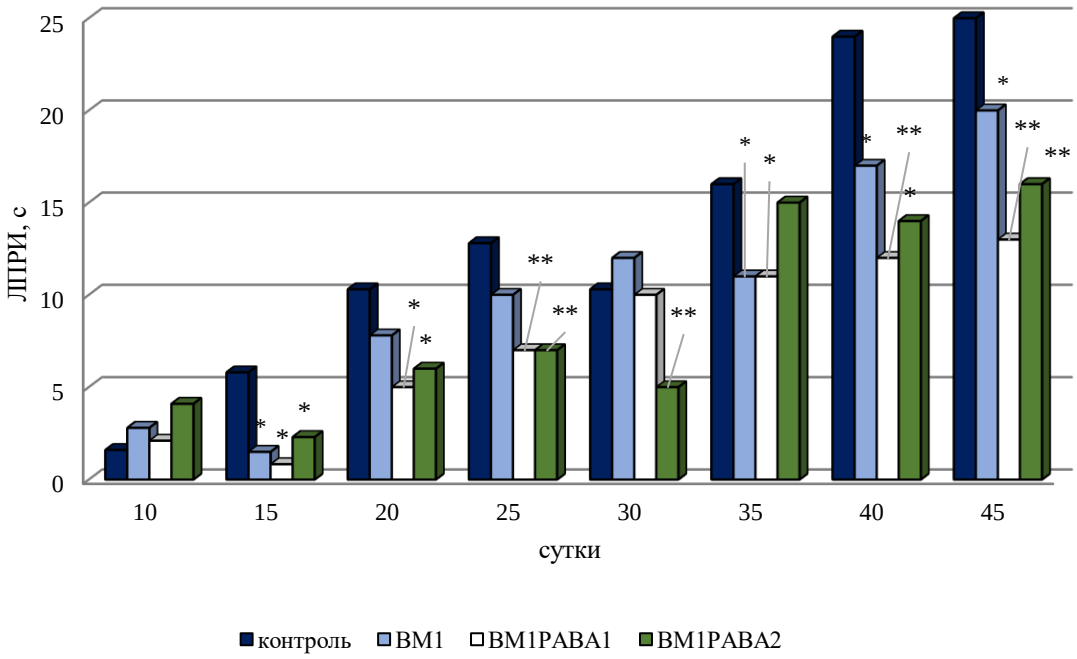


Рис. 6.3. Динамика латентного периода активного избегания у крыс-самцов в течение 45 суток после выработки условных реакций активного избегания при длительном потреблении биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, выращенного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты,

* – достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05), ** – достоверные различия по сравнению с ВМ1 (P<0,05)

Значения ЛПРИ у крыс-самок не имели статистически достоверных отличий от данных, полученных у крыс-самцов (Рис. 6.4). Анализ результатов ЛПРИ составил на 10 сутки эксперимента: у контрольной группы – 4,1±0,2 с; у группы ВМ1, потреблявших вместе со стандартным рационом питания, биомассу штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I – 3,0±0,4 с; у группы ВМ1РАВА1, потреблявших вместе со стандартным рационом питания, биомассу штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I с добавлением 1,37 г/л ПАБК – 0,33±0,21 с. Латентный период реакции перехода в безопасную камеру прогрессивно увеличивался, начиная с 20-х суток после выработки условных рефлексов, немного медленнее, чем у крыс-самцов (начиная с 10-х суток), что также свидетельствует о процессе угасания следов памяти у крыс-самок. У группы ВМ1, наблюдается интенсивное увеличение данных ЛПРИ, начиная с 30-х суток исследования. У животных, потреблявших корм с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus*

CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I с добавлением 1,37 г/л ПАБК (BM1PABA1), происходит интенсивное снижение величины ЛПРИ с 35-суток эксперимента, когда выработанные условные рефлексы начинают угасать.

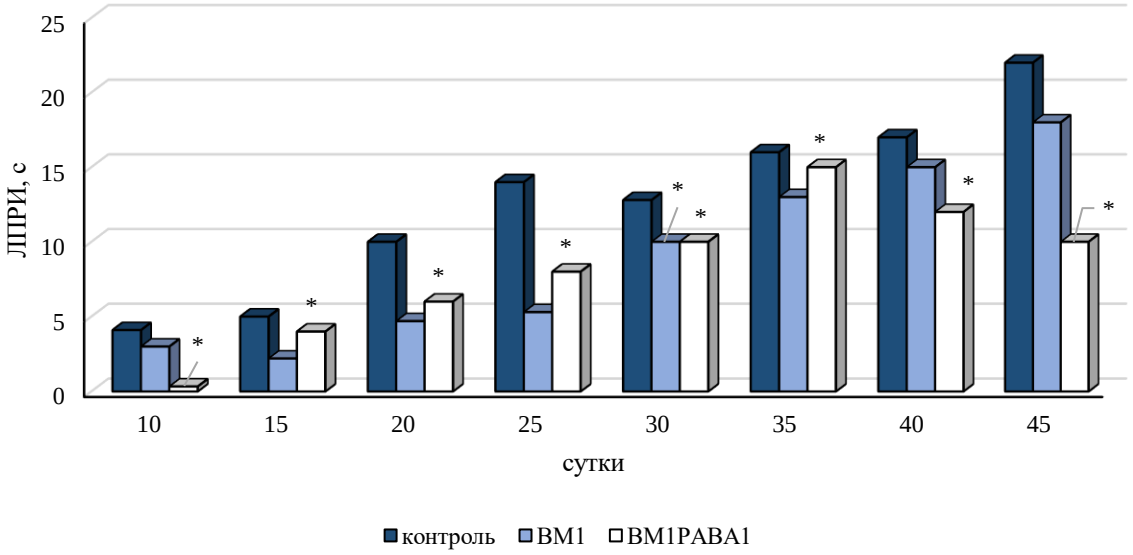


Рис. 6.4. Динамика латентного периода активного избегания у крыс-самок в течение 45 суток после выработки условных реакций активного избегания при длительном потреблении биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, выращенного на среде SP-I *с* добавлением 4-аминобензойной кислоты,

* – достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05)

Таким образом, добавление в питательную среду для культивирования штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 ПАБК в концентрации 1,37 г/л способствуют увеличению эффективности биомассы данного штамма в отношении процессов условно-рефлекторной памяти и сохранности следов долговременной памяти белых крыс.

6.2. Пространственное обучение и память белых крыс в восьмирукавном радиальном лабиринте под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, выращенного на среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты

Ранее нами было обнаружено, что культивирование биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 на питательной среде, содержащей ПАБК, вызывает существенное увеличение доли условно-рефлекторных побежек. Это говорит о том, что ПАБК, по-видимому, стимулирует синтез биологически активных соединений, которые вызывают нейрональные перестройки в головном мозге, приводящие к интенсификации

процесса обучения лабораторных животных, влияет на пространственную память прежде всего за счет их антиоксидантного действия, а также стимуляции нейритогенеза.

Результаты исследований по изучению выработки пространственной памяти у экспериментальных животных, представленные нами в главе 5, пункте 5.3, показали, что при использовании восьмирукавного радиального лабиринта в большей степени положительный результат наблюдается у животных группы со стандартным рационом с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06.

Поэтому выбран данный штамм для дальнейших опытов на 96 белых крысах (48 самцов, 48 самок), которые были разбиты на 8 групп с ДФЗ 30 секунд (4 группы самцов и 4 группы самок) и на 8 групп с ДФЗ 10 минут (4 группы самцов и 4 группы самок), в каждой из которых по 6 крыс: контрольная и 3 опытные: 1 группа – стандартный рацион питания (контроль); 2 группа - стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (здесь и далее - 250 мг/кг массы тела в сутки), культивированного на питательной среде SP-I (BM1); 3 группа – стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 1,37 г/л ПАБК (BM1PABA1), 4 группа - стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 2,74 г/л ПАБК (BM1PABA2).

Следует отметить, что биомасса штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 с добавлением в питательную среду различных концентраций ПАБК в разной степени способствует облегчению выработки пространственной памяти. Длительное потребление белыми крысами препарата BM1PABA1 в большей степени увеличивает СБПП по сравнению с препаратом BM1PABA2. В некоторых случаях эффекты BM1PABA1 и BM1PABA2 в отношении процесса обучения достоверно различаются, особенно после перерыва на 8 и 9 дни, то есть на втором этапе тестирования.

Эффективность биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 1,37 г/л ПАБК (BM1PABA1), выше при ДФЗ 30 с по сравнению с задержкой в центре лабиринта на 10 мин и, особенно, на начальном этапе опытов в первые четыре дня эксперимента (Рис. 6.5. – 6.8.). У крыс-самцов в условиях ДФЗ 30 с препарат BM1PABA1 способствует увеличению СБПП на 1 день – на 0,60±0,98 баллов, на 2 день – на 0,59±1,21 баллов, на 3 день – на 0,63±1,28 баллов, на 4 день – на 0,65±2,31 баллов по отношению к контролю, а в условиях ДФЗ 10 мин на 1 день – на 0,36±1,24 баллов, на 2 день – на 0,38±1,78 баллов, на 3 день – на 0,42±2,04 баллов, на 4 день – на 0,44±2,75 баллов.

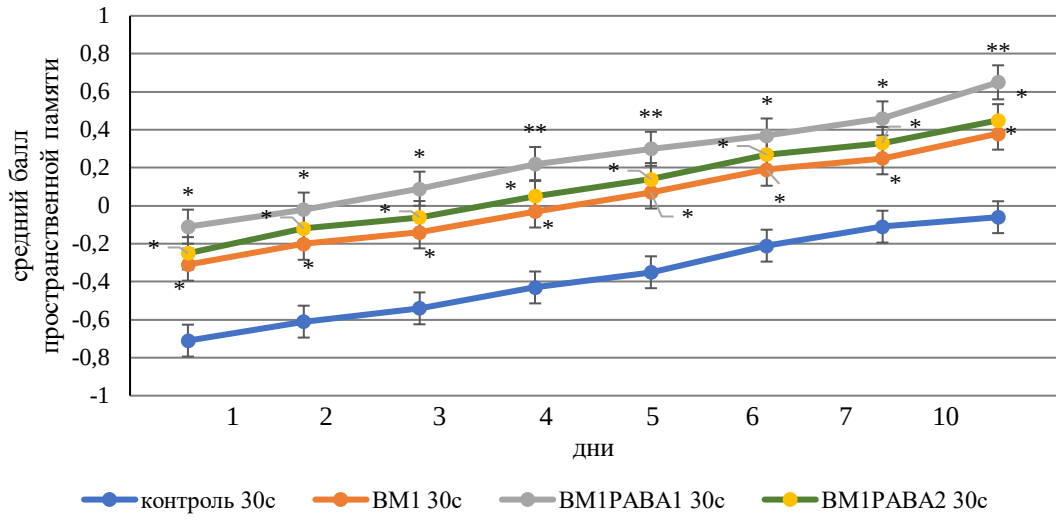


Рис. 6.5. Динамика среднего балла пространственной памяти крыс-самцов в восьмирукавном радиальном лабиринте с задержкой на 30с под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-06 (BM1), полученного при культивировании на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1 и BM1PABA2),

*- достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05), **- достоверные различия по сравнению с BM1 (P<0,01-0,05)

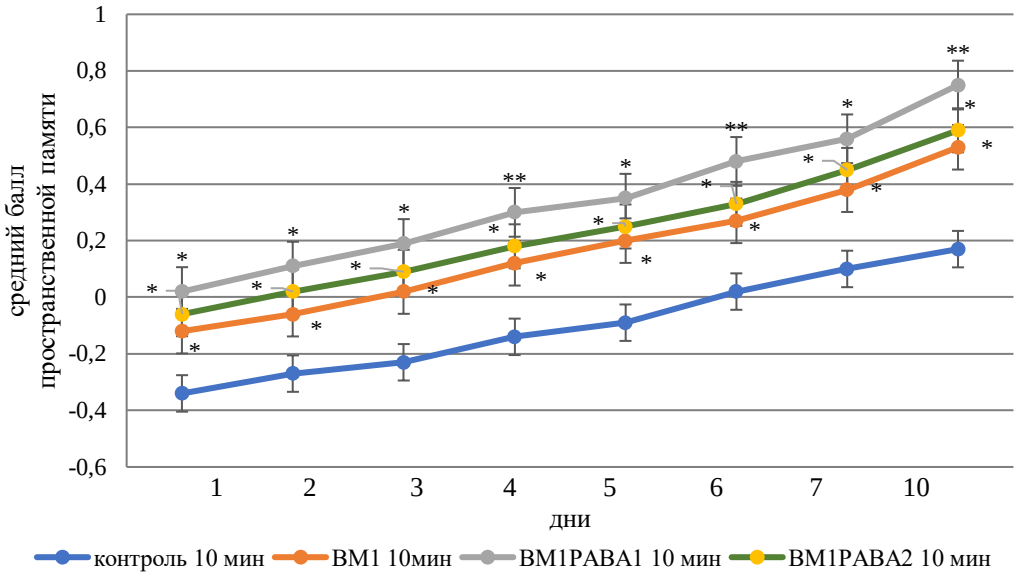


Рис. 6.6. Динамика среднего балла пространственной памяти крыс-самцов в восьмирукавном радиальном лабиринте с задержкой на 10 мин под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-06 (BM1), культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1 и BM1PABA2),

*- достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05), **- достоверные различия по сравнению с BM1 (P<0,05)

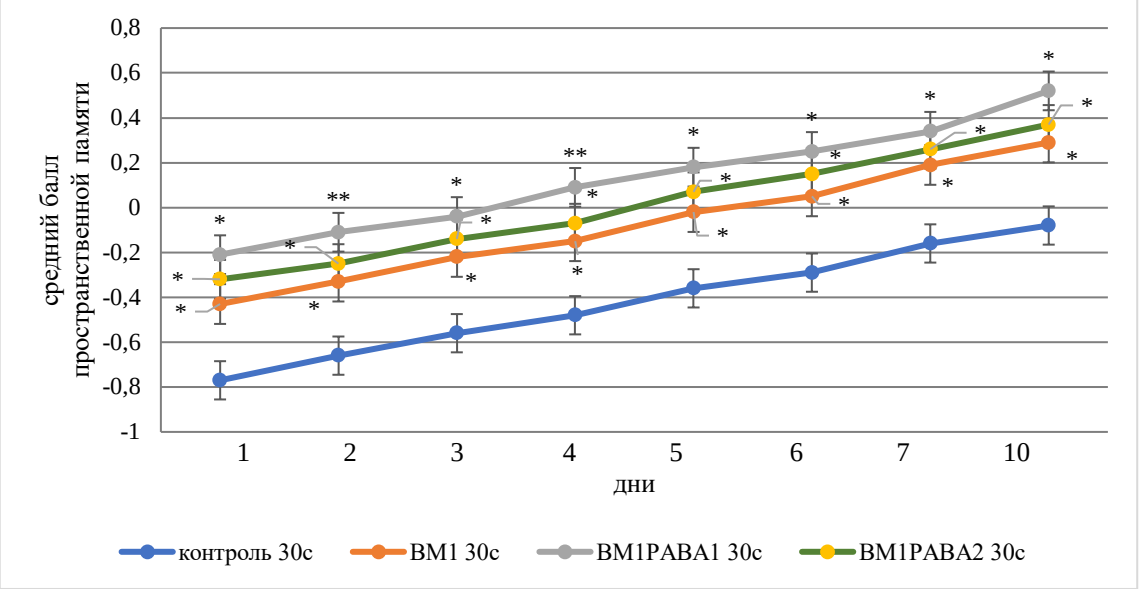


Рис. 6.7. Динамика среднего балла пространственной памяти крыс-самок в восьмирукавном радиальном лабиринте с задержкой на 30с под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-06 (BM1), культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1 и BM1PABA2),

*- достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05), **- достоверные различия по сравнению с BM1 (P<0,01-0,05)

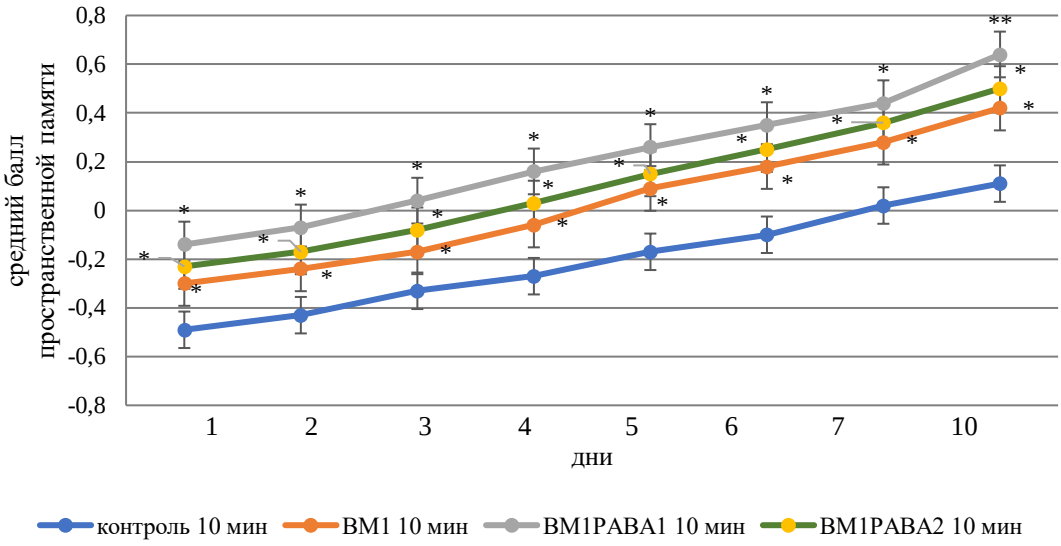


Рис. 6.8. Динамика среднего балла пространственной памяти крыс-самок в восьмирукавном радиальном лабиринте с задержкой на 10 мин под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-06 (BM1), культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1 и BM1PABA2),

*- достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05), **- достоверные различия по сравнению с BM1 (P<0,05)

У крыс-самок препарат BM1PABA1 также способствует увеличению СБПП и составляет на 1 день – на 0,56±2,11 баллов, на 2 день – на 0,55±2,42 баллов, на 3 день – на 0,52±3,10 баллов, на 4 день – на 0,57±2,78 баллов, а в условиях ДФЗ 10 мин на 1 день – на 0,35±2,35 баллов, на 2 день – на 0,36±2,74 баллов, на 3 день – на 0,37±3,01 баллов, на 4 день – на 0,43±3,42 баллов (Рис. 6.7. и 6.8.).

Также, как и в предыдущих проведенных нами опытах, мы наблюдали влияние длительности фазы задержки в центре лабиринта на средний балл пространственной памяти как у самцов, так и у самок. В условиях ДФЗ 30 с требовалось больше времени для завершения фазы тестирования, чем ДФЗ 10 мин.

Следует отметить, что ОБПП, рассчитанный как среднее суммы СБПП при ДФЗ 30 с за 10 дней опытов, увеличивается под влиянием препарата BM1PABA1 в большей степени, соответственно, на 0,498±1,23 баллов у крыс-самцов, и на 0,438±2,01 баллов у крыс-самок. ОБПП при ДФЗ 10 мин за 10 дней опытов под влиянием также BM1PABA1, соответственно, на 0,354±2,12 баллов у крыс-самцов, и на 0,334±2,45 баллов у крыс-самок. При ДФЗ 30 с, как и следовало ожидать ОБПП увеличивается в большей степени, чем при ДФЗ 10 мин (Рис. 6.9. и .6.10).

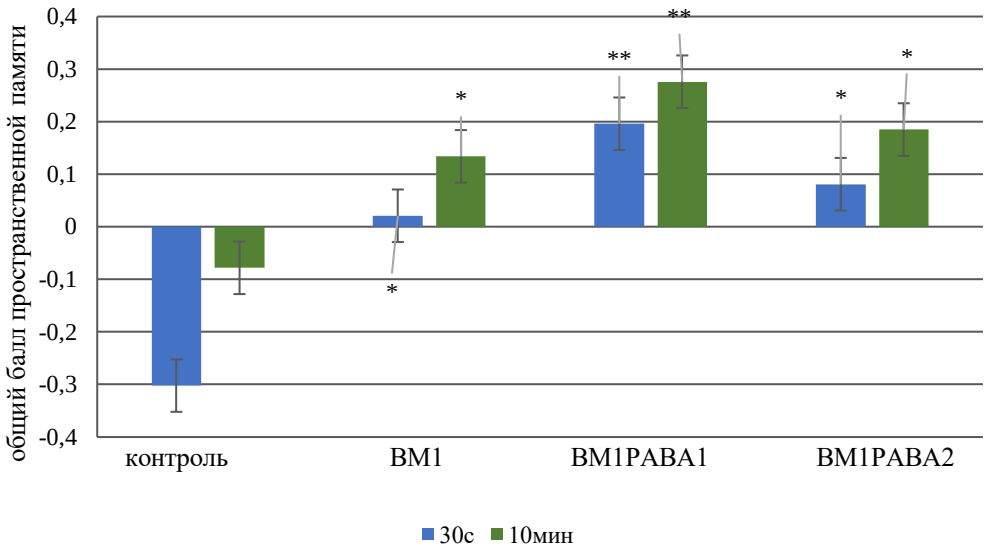


Рис. 6.9. Общий балл пространственной памяти крыс-самцов в восьмирукавном радиальном лабиринте под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1), культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1 и BM1PABA2),

*- достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05), **- достоверные различия по сравнению с BM1 (P<0,01-0,05)

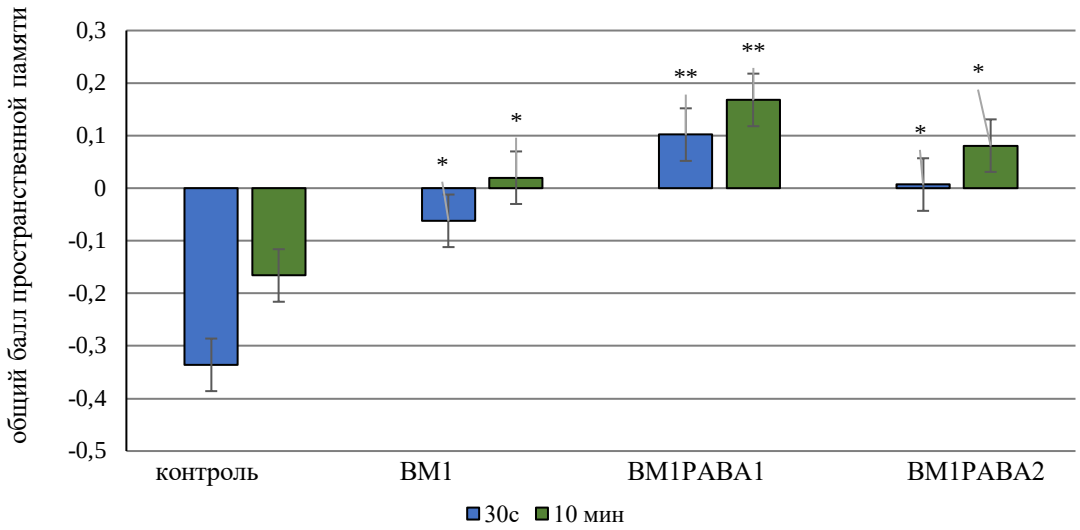


Рис. 6.10. Общий балл пространственной памяти крыс-самок в восьмирукавном радиальном лабиринте под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1), полученного при культивировании на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1 и BM1PABA2),

*- достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05), **- достоверные различия по сравнению с BM1 (P<0,05)

Результаты проведенных исследований в ВРЛ на процессы пространственного обучения и памяти под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 1,37 г/л ПАБК (BM1PABA1), показали, что длительное потребление белыми крысами обоих полов биомассы стрептомицетов приводит к заметному увеличению значения среднего балла пространственной памяти, также способствует облегчению процесса обучения, активации и сохранения следа пространственной долговременной памяти.

Результаты исследования на 30-й день после первого дня тестирования, то есть спустя 20 дней после завершения тестирования, на этапе изучения сохранности следов пространственной долговременной памяти показали, что средний балл памяти снизился по сравнению с 10 днем тестирования у крыс обоих полов как опытных, так и группы контроля (Рис.6.11. и 6.12.). Так, например, у групп крыс-самцов, получавших препарат BM1PABA1, средний балл памяти снизился при ДФЗ 30 с на 0,38±1,24 балла и при ДФЗ 10 мин на 0,29±2,01 баллов по сравнению с 10-м днем эксперимента. В то время, как у самок, потреблявших препарат, содержащий биомассу штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1PABA1), сохранность следов памяти не отличается в зависимости от задержки: ДФЗ 30 с (на 0,37±1,07 баллов), чем ДФЗ 10 мин (на 0,40±1,18 баллов).

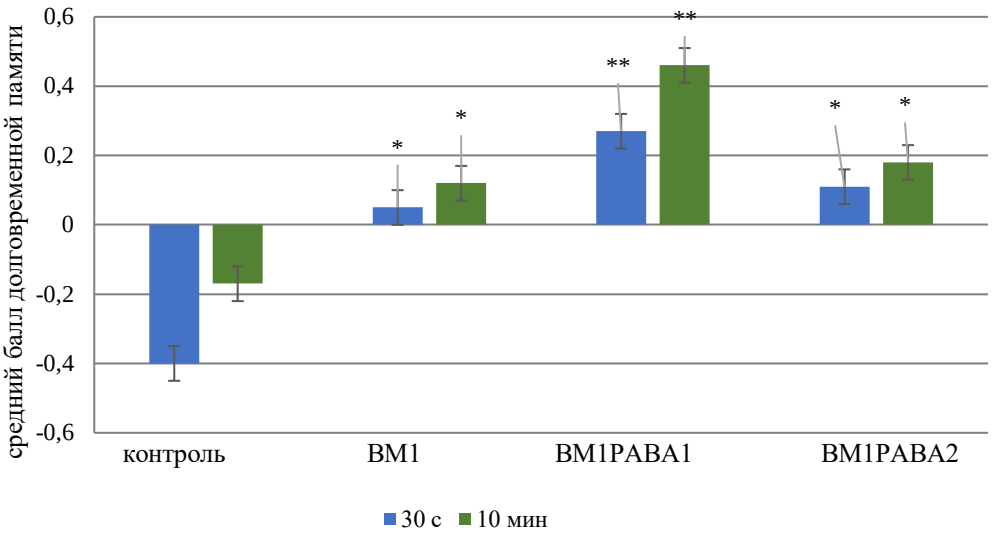


Рис. 6.11. Средний балл долговременной памяти в восьмирукавном радиальном лабиринте у белых крыс-самцов под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1), культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1 и BM1PABA2) на 30 день эксперимента,

*- достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05), **- достоверные различия по сравнению с BM1 (P<0,05)

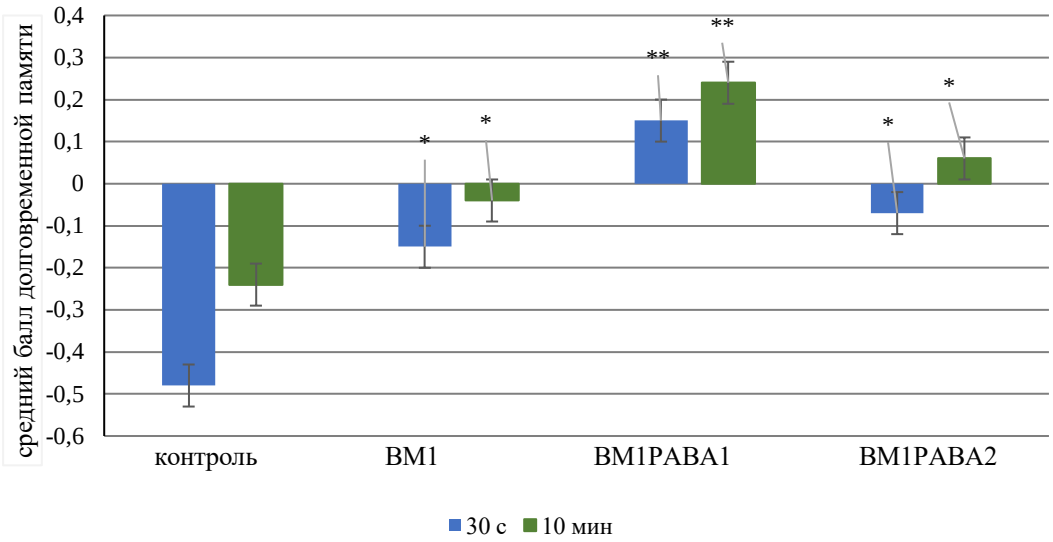


Рис. 6.12. Средний балл долговременной памяти в восьмирукавном радиальном лабиринте у белых крыс-самок под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1), культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1 и BM1PABA2) на 30 день эксперимента,

*- достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05), **- достоверные различия по сравнению с BM1 (P<0,01-0,05)

В нашей работе (глава 6, пункт 6.1) было обнаружено, что добавление ПАБК в питательную среду достоверно и, в ряде случаев, дозозависимо усиливает эффект биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 в отношении выработки условных рефлексов и скорости угасания следов условно-рефлекторной памяти в различных экспериментальных поведенческих моделях. Следует отметить, что эффективность биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде с добавлением ПАБК, в отношении условно-рефлекторной деятельности и сохранности следов памяти выше, чем биомассы штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивированного на обычной питательной среде. В отсутствии ПАБК в составе питательной среды биомасса штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 оказывает более выраженный эффект в отношении процессов обучения и памяти по сравнению с биомассой *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 [59, 60].

По результатам полученных данных можно предположить, что влияние биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-06, полученного при добавлении в питательную среду ПАБК, на различные механизмы формирования памяти у лабораторных животных определяется ее неодинаковым составом метаболитов стрептомицетов.

Таким образом, результаты нашего исследования в ВРЛ показали, что крысы обоих полов, получавшие в пищу стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 1,37 г/л ПАБК (BM1PABA1), продемонстрировали значительно лучшее воспроизведение пространственной памяти по сравнению с крысами, получавшими стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 2,74 г/л ПАБК (BM1PABA2), а также с контрольной группой. Так же группа BM1PABA1 экспериментальных животных, получавшие в пищу стандартный рацион с добавлением биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде, содержащей 1,37 г/л ПАБК, показали значительно меньше ошибок рабочей памяти, уже начиная с первого дня тестирования, в отличие от контрольной группы и двух других опытных групп.

6.3. Пространственное обучение и память белых крыс в водном лабиринте Морриса под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, выращенного на среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты

Продолжая ранее проведенные нами исследования процессов пространственного обучения и памяти под влиянием биомассы штаммов стрептомицетов, с помощью экспериментальной установки «Водный лабиринт Морриса», мы выбрали для дальнейших

опытов биомассу штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на среде SP-I с добавлением ПАБК в разных концентрациях.

Обучение и тестирование были выполнены на белых лабораторных крысах линии *Wistar* (24 самца) в возрасте 5-ти месяцев, содержавшихся в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище.

В соответствии с поставленными задачами, проводили культивирование биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 на комплексной питательной среде SP-I с добавлением парааминобензойной кислоты.

Животные были разбиты на четыре группы – контрольную и три опытных (BM, BM1, BM2). Животные контрольной группы содержались на стандартном рационе питания, животные опытных групп получали в качестве пищевых добавок высушенную биомассу штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на комплексной питательной среде (BM1), либо на питательной среде, содержащей ПАБК в концентрации 1,37 г/л (BM1PABA1), либо на питательной среде, содержащей парааминобензойную кислоту в концентрации 2,74 г/л (BM1PABA2). Спустя 90 суток после начала потребления крысами-самцами биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и при достижении ими возраста – 5 месяцев приступали к изучению процесса пространственного обучения и памяти.

Анализ продолжительности латентного периода и пройденного пути, полученные нами при исследовании крыс-самцов в водном лабиринте Морриса, показывает существенные изменения в процессе пространственного обучения и памяти.

Биомасса штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I с добавлением ПАБК, более эффективна по сравнению с биомасой штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на комплексной питательной среде без добавления ПАБК, способствует облегчению выработки пространственной памяти.

Как видно из рисунков 6.13 и 6.14, длительное потребление белыми крысами-самцами биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I, содержащей ПАБК в концентрации 1,37 г/л (BM1PABA1) в большей степени снижает ЛП по сравнению с контрольной группой, а также по сравнению с группами препаратом BM1 и BM1PABA2 и с контрольной группой. Так, например, у крыс-самцов, получавших препарат BM1PABA1, ЛП нахождения платформы составил в первый день обучения 40,2±1,2 с, во второй – 29,0±1,4 с, в третий – 25,1±2,3 с, в четвертый – 17,2±2,1 с. ЛП нахождения платформы укорачивался с

40,2±2,1 с в первый день обучения до 17,2±1,1 с к 4 дню обучения, активные снижения ЛП заметны со второго дня обучения, в отличие от группы контроля.

Анализ динамики ПП, полученные при исследовании поведения крыс-самцов группы BM1PABA1 на первый день обучения составил 500,5±3,2 см, на второй день – 350,0±2,4 см, на третий день – 290,2±2,2 см, на четвертый день – 200,2±1,8 см. ПП до нахождения платформы укорачивался с 500,5±3,2 см в первый день обучения до 200,2±1,8 см к четвертому дню обучения. В некоторых случаях эффекты препаратов BM1PABA1 и BM1PABA2 в отношении процесса обучения достоверно различаются, особенно на второй день обучения. При сравнении групп, получавших препараты BM1 и BM1PABA1, достоверные различия на протяжении всего периода обучения с первого по четвертый день.

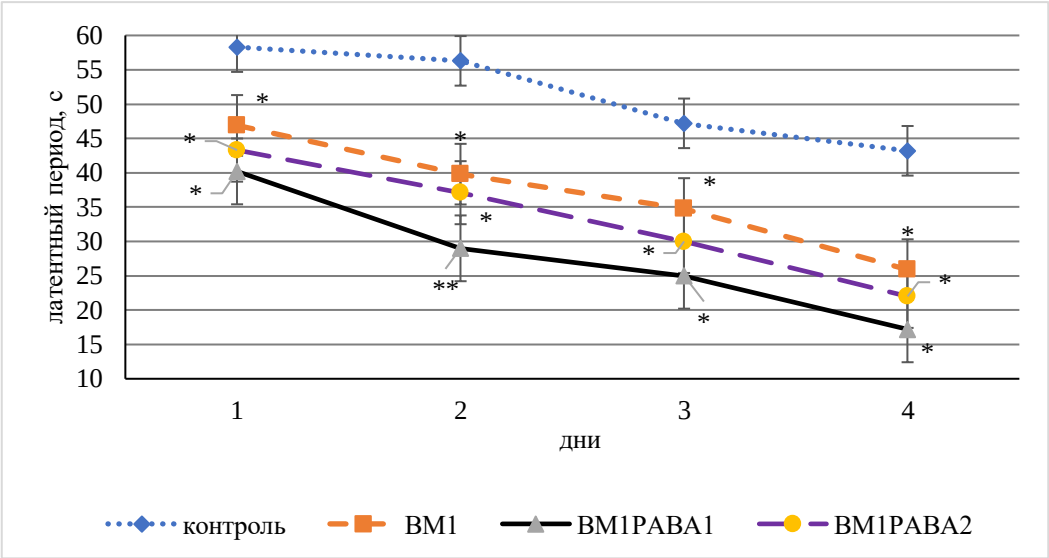


Рис. 6.13. Динамика продолжительности латентного периода у крыс-самцов в водном лабиринте Морриса под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1), культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1 и BM1PABA2),

*- достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05), **- достоверные различия по сравнению с BM1 (P<0,05)

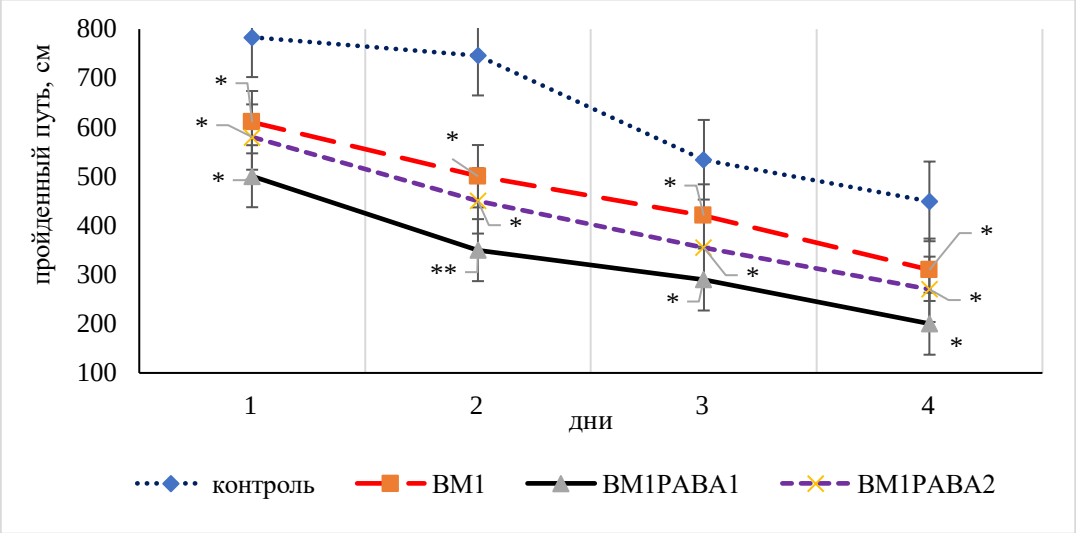
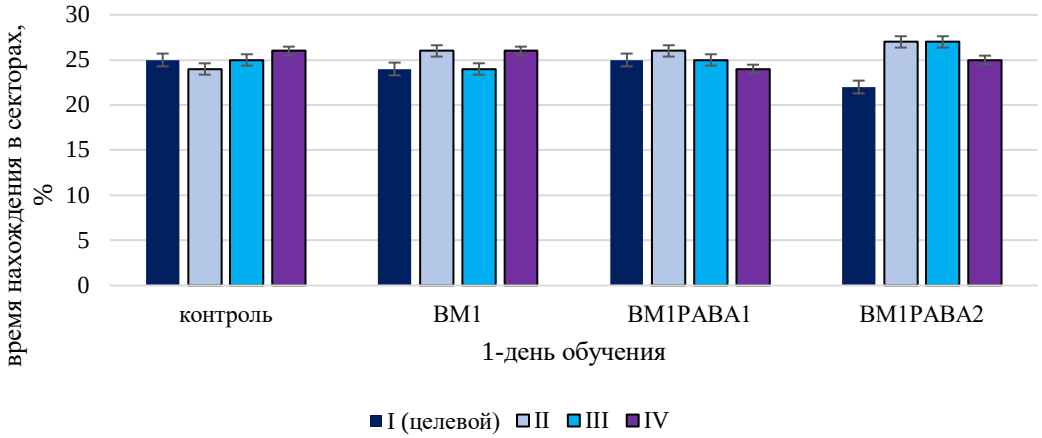


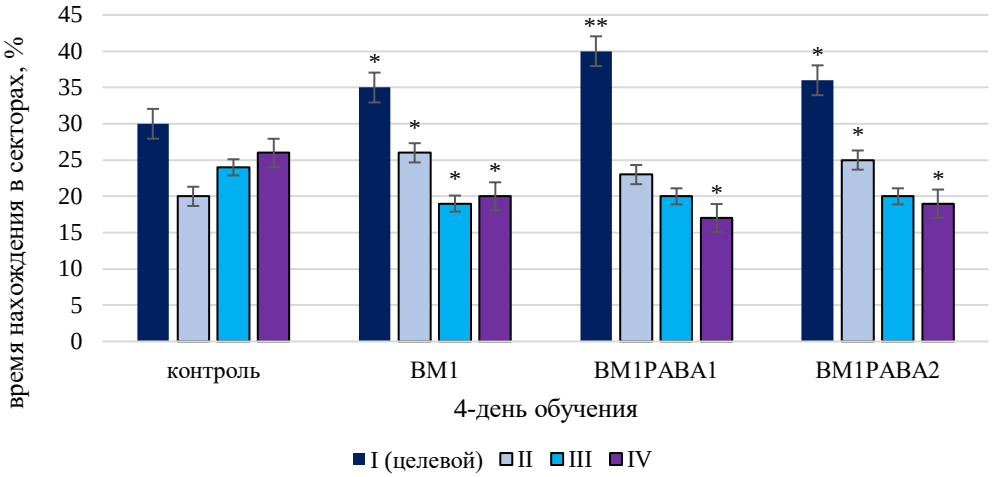
Рис. 6.14. Динамика пройденного пути до платформы крыс-самцов в водном лабиринте Морриса под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 (BM1), культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты (BM1PABA1 и BM1PABA2),

*- достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05), **- достоверные различия по сравнению с BM1 (P<0,01-0,05)

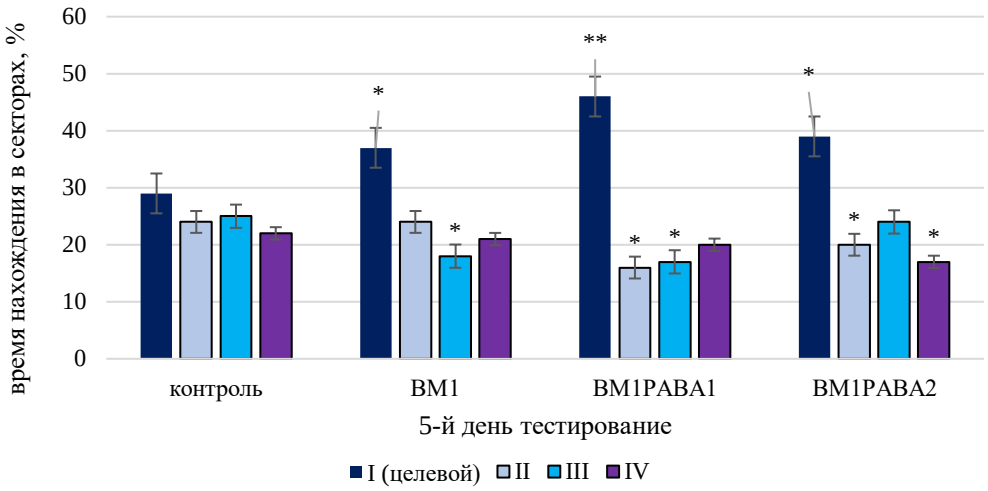
Продолжая исследования процесса пространственной памяти, определяли время нахождения крыс-самцов в целевом секторе. Как видно на рис. 6.15, длительное потребление белыми крысами препарата BM1PABA1 в большей степени улучшает запоминание нахождения платформы по сравнению с препаратом BM1 и BM1PABA2. Крысы-самцы, получавшие препарат BM1PABA1, уже на 4-й день обучения находились в целевом секторе больше времени, по отношению к контролю (40,1%±1,2 и 30,2±2,5%, соответственно). Достоверные различия данной группы по отношению к контролю уже заметны на четвертый день обучения. Таким образом, животные группы, потреблявшие препарат BM1PABA1, быстрее находили платформу в процессе обучения. Также проведя опыт на пятый день после четырех дней обучения больше времени проводили в целевом секторе во время проверки пространственной памяти крысы-самцы, получавшие биомассу штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I, содержащей 4-аминобензойную кислоту в концентрации 1,37 г/л (BM1PABA1) по сравнению с группами BM1PABA2 и BM1 (46,1±2,2%, 39,0±2,4% и 37,3±1,9%, соответственно).



А)



Б)



С)

Рис. 6.15. Продолжительность пребывания в секторах водного лабиринта Морриса крыс-самцов на 1-й день обучения (А), на 4-й день (Б) и после обучения на 5-й день тестирования (С) под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты, *- достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05), **- достоверные различия по сравнению с BM1 (P<0,01-0,05)

Для оценки активации пространственной долговременной памяти опыт повторили на 9-й день, с перерывом 4 дня после 5-го дня тестирования (Рис. 6.16). Полученные результаты показали, что даже после перерыва крысы-самцы, получавшие препараты BM1, BM1PABA1 и BM1PABA2, наиболее длительно находятся в целевом секторе по сравнению с контролем (39,2±1,8%, 49,1±1,1%, 42,0±1,5% и 30,3±2,2%, соответственно), что свидетельствует о сохранности следов памяти и эффективном влиянии вторичных метаболитов биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, а также действии на данный штамм ПАБК, на процесс активации пространственной долговременной памяти.

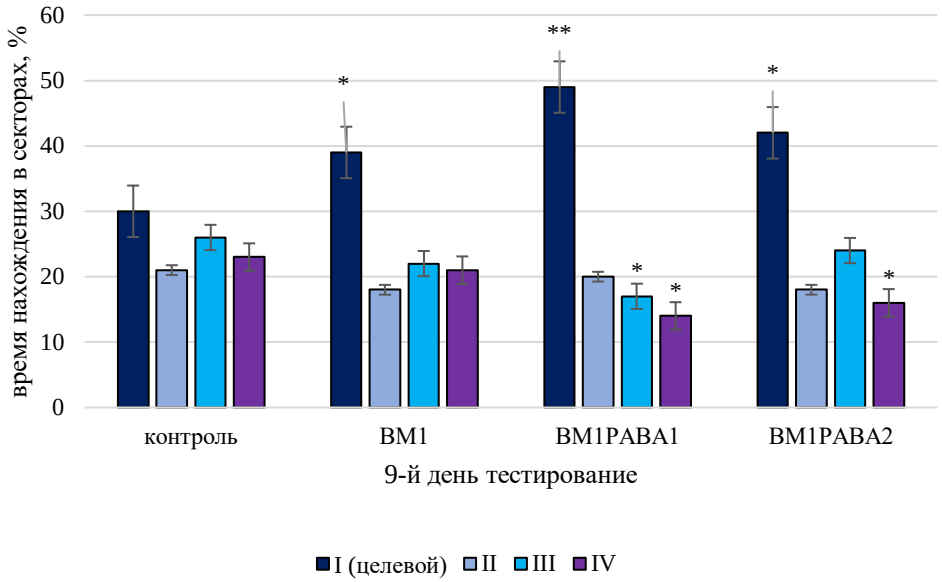


Рис. 6.16. Продолжительность пребывания в секторах водного лабиринта Морриса крыс-самцов на 9-й день тестирования под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты,

*- достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05), **- достоверные различия по сравнению с BM1 (P<0,05)

Продолжая опыт на 30-й день эксперимента после длительного перерыва, можно сказать, что у крыс-самцов, получавших препарат BM1PABA1, в большей степени сохраняются следы памяти, так как животные длительно находятся в целевом секторе (BM1PABA1 – 41,01±1,65%) (Рис. 6.17). Потребление крысами-самцами препарата BM1PABA1 в большей степени оказывает положительное действие на процесс длительности удержания следов пространственной долговременной памяти.

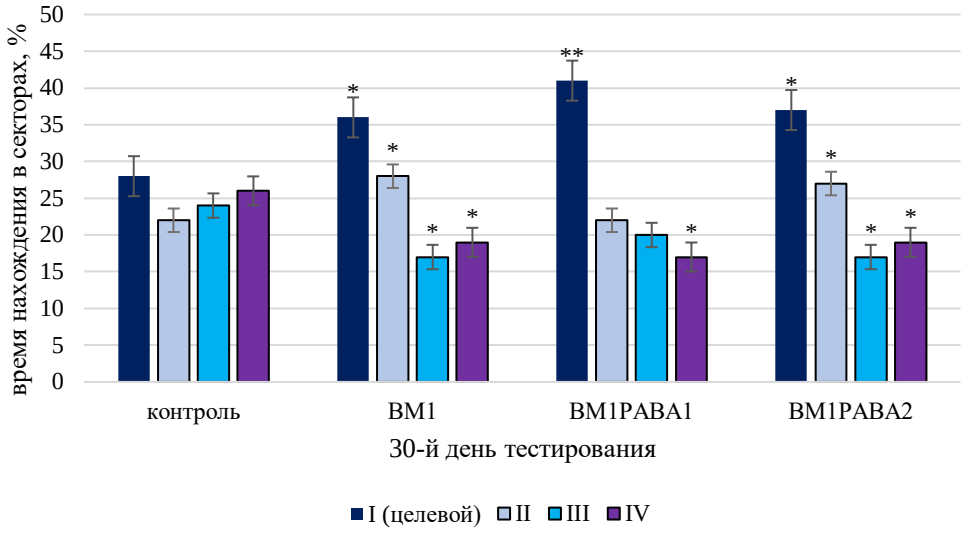


Рис. 6.17. Продолжительность пребывания в секторах водного лабиринта Морриса крыс-самцов на 30-й день тестирования под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на среде SP-I с добавлением 4-аминобензойной кислоты,

*- достоверные различия по сравнению с контролем (P<0,05), **- достоверные различия по сравнению с BM1 (P<0,05)

Ранее было показано, что вторичные метаболиты ряда штаммов стрептомицетов способны оказывать нейропротекторное действие при применении различных моделей нейродегенерации, обладая антиоксидантым действием.

С целью проверки этого предположения, как и ВРЛ, при исследовании в ВЛМ, в питательную среду для культивирования штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 нами была добавлена парааминобензойная кислота.

Полученные данные показывают, что добавление в питательную среду для культивирования штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 парааминобензойной кислоты способствует получению биомассы, которая существенно усиливает стимулирующий эффект биомассы в отношении процессов пространственного обучения и памяти белых крыс.

6.4. Выводы к главе 6

1. Потребление биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I с добавлением ПАБК способствует существенному облегчению процесса условно-рефлекторного научения и увеличению длительности хранения следов условно-рефлекторной памяти у белых крыс обоих полов как по сравнению с контролем, так и по сравнению с биомассой, полученной при культивировании на стандартной питательной среде SP-I.

2. Биомасса штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I с добавлением ПАБК, существенно стимулирует процесс обучения белых крыс обоих полов в восьмирукавном радиальном лабиринте и способствует облегчению выработки рабочей памяти, активации и сохранности долговременной пространственной памяти потребление, как по сравнению с контролем, так и с биомассой штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на стандартной питательной среде SP-I.

3. Биомасса штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде SP-I с добавлением ПАБК, способствует существенному облегчению выработки рабочей пространственной памяти, активации и сохранности долговременной пространственной памяти у белых крыс в водном лабиринте Морриса как по сравнении с контролем, так и с биомассой штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на стандартной питательной среде SP-I.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

Проведенные исследования и анализ полученных результатов привели к следующим выводам:

1. Биомасса стрептомицетов штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выращенных на определенных питательных средах, характеризуется высоким уровнем содержания биологически активных веществ (заменимые и незаменимые аминокислоты, различные липидные фракции), непосредственно участвующих в регулировании пластического обмена веществ и психогенной активности организма.

2. Под влиянием биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивируемого на питательной среде, содержащей парааминобензойную кислоту в концентрации 1,37 г/л, происходит существенное повышение прироста массы тела, резистентности к действию теплового стресса, плодовитости, а также улучшение процессов развития потомства белых крыс в большей степени, чем под влиянием биомассы штаммов стрептомицетов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивируемых на стандартной комплексной среде SP-I.

3. Сравнительное изучение нейрофизиологических эффектов биомассы штаммов стрептомицетов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, культивируемых на комплексной среде SP-I, показало, что они в различной степени оказывают влияние на процессы обучения, активизацию кратковременной памяти и сохранение следа памяти; более выраженный эффект на условно-рефлекторное обучение и память оказывает биомасса штамма *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, а на пространственное обучение и память – *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06.

4. Продолжительное потребление биомассы стрептомицетов оказывает более выраженное влияние в отношении процессов формирования нового поведения, стимуляции условно-рефлекторного обучения и продолжительности хранения следа долговременной памяти у старых животных по сравнению с молодыми.

5. Интенсификация процессов условно-рефлекторного и пространственного обучения, активизация рабочей памяти, пролонгирование сохранности следов долговременной памяти более выражены в условиях потребления белыми крысами биомассы штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, культивированного на питательной среде с добавлением парааминобензойной кислоты в концентрации 1,37 г/л, по сравнению с биомассой, полученной при его культивировании на стандартной питательной среде.

6. Биомасса стрептомицетов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, оказывает полифункциональное влияние на деятельность организма: улучшает не только процессы обучения и памяти, но и способствует увеличению прироста массы тела, плодовитости белых крыс, роста и развития потомства, что предполагает проведение дальнейших исследований по идентификации биологически активных веществ биомассы для их использования в практике.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Биомасса штаммов стрептомицетов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, выделенных из почв центральной части Республики Молдова, может быть рекомендована для получения на ее основе новых эффективных препаратов с выраженными нейропротекторными и ноотропными свойствами.

2. Препараты на основе биомассы штаммов *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 и *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 могут быть использованы в животноводстве для увеличения прироста массы тела и плодовитости сельскохозяйственных животных.

3. Для увеличения эффективности биомассы стрептомицетов в отношении процессов обучения и памяти, а также увеличения прироста массы тела и плодовитости животных рекомендуется в состав питательных сред для культивирования стрептомицетов включать парааминобензойную кислоту в концентрации 1,37 г/л.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. АРТЕМОВ, Б.Т. и др. Влияние микробных метаболитов Streptomyces griseus 15 на иммунологическую реактивность свиней при комплексной вакцинации. В: *Сборник работ «Микробные препараты и их применение в сельском хозяйстве».* Кишинев, 1981, с. 30-39.

2. БАБЕНКО, Л.П., СОКОЛОВА, И.Э., ВИННИКОВ, А.И. Перспектива использования биосинтетической активности стрептомицетов для получения биологически активных веществ. В: *Научный прогресс на рубеже тысячелетий*, 2008, 23 с.

3. БАЖОВ, Г.М., БАКИРЕВА, Л.А. Практическое свиноводство. Краснодар, 2002, 155 с.

4. БАТУЕВ, А.С. Высшая нервная деятельность. М., 1991, 256 с.

5. БЕРЕЗЮК, Ю.Н. Аминокислотный состав биомассы штамма Streptomyces fradiae 19 из черноземов Молдовы. Актуальні питання розвитку біології та екології. В: *Матеріали міжнародної науково-практичної конференції,* Вінниця, 2016, с. 203-206.

6. БЕРЕЗЮК, Ю.Н., ШЕПТИЦКИЙ, В.А., БРАТУХИНА, А.А., ГАНКЕВИЧ, А.Б. Влияние метаболитов стрептомицетов, выделенных из почв Молдовы, на теплокровных животных. Теория, практика и перспективы применения биологически активных соединений в сельском хозяйстве. В: *Материалы XI Международной практической конференции.* Сыктывкар, 2015, с. 25-26.

7. БЕРЕЗЮК, Ю.Н. Влияние препаратов из стрептомицетов почв Молдовы на привесы теплокровных животных в обычных и стрессорных условиях. В: Биотехнология для сельского хозяйства и окружающей среды. В: *Материалы XII Международной научно-практической конференции.* Одесса, 2016, с. 37-38.

8. БЕРЕЗЮК, Ю.Н. *Биосинтетические свойства Streptomyces fradiae CNMN-AC-11 и физиологические эффекты биомассы на организм теплокровных животных (крыс).* Автореферат диссертации на соискание учёной степени доктора биологических наук, Кишинев, 2019, 30 с.

9. БРАТУХИНА, А.А. Влияние лиофилизации на биосинтетическую активность Streptomyces massasporeus CNMN-36. In: *Buletinul AŞM. Ştiinţele vieţii.* 2007, nr. 3 (303), p. 117-121.

10. БРАТУХИНА, А.Н. *Естественная изменчивость и биосинтетическая активность актиномицетов Streptomyces massasporeus.* Автореферат диссертации на соискание учёной степени доктора биологических наук, Кишинев, 2012, 32 с.

11. БУРЦЕВА, С.А. *Биологически активные вещества стрептомицетов (биосинтез, свойства, перспективы применения).* Автореф. диссер. док. хаб. биологии. Кишинев, 2002, 35 с.

12. БУРЦЕВА, С.А. и др. Влияние электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на содержание белка и аминокислотный состав биомассы стрептомицетов. В: *Электронная обработка материалов*. 2012, nr. 48 (4), с. 76–82.

13. БУРЦЕВА, С.А., БЫРСА, М.Н., БЕРЕЗЮК, Ю.Н., ВАСИЛЬЧУК, А.В. Способность задерживать рост фитопатогенных грибов у стрептомицетов почв Молдовы. В: *Материалы съезда Микологов России «Современная микология в России*», Москва, 2017, т.7, с. 20-23.

14. БЫРСА, М., БЕРЕЗЮК, Ю., **ГАРБУЗНЯК, А.** и др. Липидный состав биомассы стрептомицетов при культивировании на средах сложного состава. Conferinţa ştiinţifico-practică cu participare internaţională „Instruire prin cercetare pentru o societate prosperă”, Universitatea de stat din Tiraspol, Ediția VIII, Chişinău. 2021, vol. I, p. 284-290.

15. ВАСЕНИНА, Е.Е, ЛЕВИН, О.С. Окислительный стресс в патогенезе нейродегенеративных заболеваний: возможности терапии. В: *Нейропротективная терапия.* 2013, № 3-4, с. 39-46.

16. ВИНОГРАДОВА, К.А., БУЛГАКОВА, В.Г., ПОЛИН, А.Н. Стрептомицеты в свете концепции «многоклеточности» бактерий. В: *Материалы конференции*, 2016, с. 33-47.

17. ГАРАЕВА, С.Н. и др. Актиномицеты почв Молдовы как перспективный источник 122 иммуноактивных аминокислот для повышения адаптационных свойств молодняка сельскохозяйственных животных. В: *Tehnologii moderne în agricultură şi protecţia mediului înconjurător. Sesiunea ştiinţifică.* Chişinău, 2003, p. 25-31.

18. ГОЛЬДИН, Е.Б. Биологическая активность микроводорослей и значение в межвидовых взаимоотношениях. В: *Экосистемы, их оптимизация и охрана.* 2013, № 9, с. 49–76.

19. ДЕДЮХИНА, Э.Г., ЕРОШИН, В.К. Незаменимые химические элементы в регуляции метаболизма микроорганизмов. В: *Успехи микробиологии*. 1992, вып. 25, с. 126-141.

20. ДРОЖЖИНА, Н.А., МАКСИМЕНКО, Л.В., КИЧА, Д.И. Особенности пищевого поведения студентов Российского университета дружбы народов. В: *Вопросы питания.* 2012, № 1, с. 57–62.

21. ЕГОРОВ, Н.С. Основы учения об антибиотиках. Определение антибиотической активности микроорганизмов. В: *Москва: Наука.* 2004, 155 с.

22. ЕРМОЛЕНКО, Е.И., ДОНЕЦ, В.Н., ДМИТРИЕВА, Ю.В. и др. Влияние пробиотических энтерококков на функциональные характеристики кишечника крыс при дисбиозе, индуцированном антибиотиками. В: *Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина.* 2009, №. 1, с. 157 -167.

23. ЗАРАЙСКАЯ, И.Ю. Системный анализ оборонительного поведения крыс Вистар при обучении двустороннему активному избеганию. В: *Журнал высшей нервной деятельности.* 1995, т. 45, вып. 3, с. 472-478.

24. ЗЕНОВА, Г.М. Почвенные актиномицеты. В: *Москва: Изд-во МГУ*, 1992, 87 с.

25. ЗОБОВА, Н.С., ШИЛОВ, А.В. Эффективность использования парааминобензойной кислоты в рационах кормления молодняка крупного рогатого скота. В: *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии, ВАК,* 2013, с.101-104.

26. ИУТИНСКАЯ, Г.А. Стратегия создания полифункциональных биопрепаратов нового поколения на основе метаболитов почвенных стрептомицетов. В: *Биотехнология для сельского хозяйства и окружающей среды.* Одесса, 2016, с. 103-104.

27. КАСЕНОВ, Б.Ж., БАЛАБЕКОВА, М.К., АХМЕДШИНА, Д.А., ТРУБАЧЕВ, В.В. Способность к обучению у крыс при отравлении свинцом и кадмием. В*: Современные проблемы науки и образования.* 2016, №2, 18 с.

28. КИСЕЛЕВ, А.Л., ВОРОБЬЕВ, Г.М. Парааминобензойная кислота как стимулятор роста и развития живых организмов. В: *Научный журнал №1. Вестник Российского аграрного университета,* 2006, с. 42-44.

29. КОВАЛЬЧУК, Л.П., ДОНЕЦ, А.Т., БУРЦЕВА, С.А. Липиды актиномицетов. В: *Кишинев: Штиинца,* 1979, 104 с.

30. КОЖЕВНИКОВА, Н.А. Парааминобензойная кислота как фактор воздействия на ферментативные процессы. Химический мутагенез и задачи сельскохозяйственного производства. В: *Наука.* 1993, 160 с.

31. КОНОВА, И.В. Характеристика липидов актиномицетов. Содержание и состав липидных фракций. В: *Биологические наукиэ.* 1983, № 8, с. 5-17.

32. КОНОВА, И.В., КАСЫМБЕКОВА, С.К. Обеспеченность среды фосфатом как фактор физиологической регуляции процессов липогенеза. В: *Известия АН СССР, сер. биол.* 1981, № 4, с. 594-600.

33. КОРОЛЬ, Д.Л., МАЛИН, Э.Л., БОРДЕН, К.А., БАСБИ, Р.А., КУПЕР-ЛЕО, ДЖ. Сдвиги в предпочтительной стратегии обучения в течение эстрального цикла у самок крыс. В: *Гормоны и поведение.* 2004, т. 1, с. 330-338.

34. КУРБАНОВА, М.Г., ТЮНИНА, Н.А. Производство аминокислот – передовая отрасль биотехнологии. В: *Ресурсосберегающие технологии в сельском хозяйстве Западной Сибири. Материалы Междунар. науч.-практ. конф.* Кемерово. 2009, с. 196-199.

35. КУЦЕНКО, А.С. Основы токсикологии. В: *Санкт-Петербург: Фолиант,* 2004, 720 с.

36. ЛЕБЕДЕВ, А.Н. Нейрофизиологические параметры памяти человека. В: *Журнал Высшей Нервной Деятельности.* 1993, т. 43, №2, с. 277 – 285.

37. ЛЕБЕДЕВ, А.Н. Психофизиология памяти. В: *Основы психофизиологии. "Инфра – М",* 1997, с. 129 – 142.

38. ЛИВАНОВ, М.Н.: Нейронные механизмы в памяти. В: *Успехи физиол. наук.* 1975, № 6, с. 66.

39. МАРКЕЛОВА, Е.В., ЗЕНИНА, А.А., КАДЫРОВ, Р.В. Нейропептиды как маркеры повреждения головного мозга. В: *Современные проблемы науки и образования.* 2018, № 5, с. 125-131.

40. МИНЯЕВА, О.А. Аминокислоты, как биологические объекты, в водных растворах. В: *Научное обозрение. Биологические науки.* 2016, № 6, с. 43-47.

41. ОГУРЦОВА, О.С., МАНЖУЛО, И.В., ЛАТЫШЕВ, Н.А. и др. Нейропротекторное действие докозагексаеновой кислоты при моделировании компрессионной спинальной травмы. В: *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2014, №2, вып.56, с. 64-69.

42. ПОСТОЛАКИЙ, О.М., БРАТУХИНА, А.А., БУРЦЕВА, С.А. Липидный состав биомассы стрептомицетов после воздействия электромагнитного излучения миллиметрового диапазона низкой интенсивности. В: *Электронная обработка материалов.* 2015, №51, вып.4, с. 84–89.

43. ПРАСОЛОВ, А.И. и др. О механизме стимулирующего действия кормогризина на воспроизводительную систему животных. В: *Диагностика и терапия незаразных болезней сельскохозяйственных животных.* Воронеж. 1986, с. 94-101.

44. ПРОНЬ, О.И. и др. Стимуляторы роста при откорме свиней. В: *Ветеринария.* 2008, с. 42-45.

45. РАКОВА, Т.Н. Применение микробных метаболитов в животноводстве. В: *Кишинев: Штиинца.* 1985, 80 с.

46. РОУЗ, С. Устройство памяти. От молекул к сознанию. В: *Мир.* 1995, с. 183-234.

47. САТКЛИФФ, ДЖ., МАРШАЛЛ, К. М., НИЛ, ДЖ. К. Влияние пола на рабочую и пространственную память в новой задаче распознавания объектов у крыс. In: *Behavioral Brain Research,* 2007, vol. 177, nr. 1, p. 117-125.

48. СЕМЕНОВ, С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. В: *Москва: Агропромиздат,* 1990, 240 с.

49. СОКОЛОВА, Л.Ф. *Эффективность использования обменной энергии у молодняка свиней при скармливании кормогризина.* Автореф. диссер. канд. сельскохоз. наук. Брянск. 1996, 25 с.

50. СОРОКИНА, Е.Г., СТОРОЖЕВЫХ, Т.П., СЕНИЛОВА, Я.Е. и др. Действие антител к AMPA (GluR1) рецепторам глутамата на нейроны мозга в первичных культурах мозжечка и гиппокампа. В: *Бюл эксп биол*. 2006, с. 59—62.

51. ФУРДУЙ, Ф.И., КРАСОЧКО, П.А., ШЕЙКО, И.П., и др. *Физиологические основы проявления стрессов и пути их коррекции в промышленном животноводстве.* Горки: БГСХА, Ч.1, 2013, 492 с.

52. ФУРДУЙ, Ф.И, ЧОКИНЭ, В.К., ВУДУ, Л.Ф Новое видение о психическом здоровье. В: *Fiziologia şi sănătatea*, 2012, с.11-18.

53. ФУРДУЙ, Ф.И., ЧОКИНЭ, В.К., ФУРДУЙ В.Ф., ГЛИЖИН, А.Г., ВРАБИЕ, В.Г., ШЕПТИЦКИЙ, В.А. *Трактат о научных и практических основах санокреатологии. Том 1. Проблема здоровья. Санокреатология. Потребность общества в ее развитии.* Chișinău: Tipografia AȘM, 2016, 228 p.

54. ФУРДУЙ, Ф.И., ЧОКИНЭ, В.К., ФУРДУЙ, В.Ф., ГЛИЖИН, А.Г., ВРАБИЕ, 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.

55. ФУРДУЙ, Ф.И., ХАЙДАРЛИУ, С.Х., ШТИРБУ, Е.И. и др. Стресс и животноводство. В: *Кишинев: Штиинца,* 1982, 200 с.

56. ФУРДУЙ, Ф.И., ШТИРБУ, Е.И., СТРУТИНСКИЙ, Ф.А. и др. Стресс и адаптация сельскохозяйственных животных в условиях индустриальных технологий. В: *Кишинев: Штиинца.* 1992, 224 с.

57. ХОЦКИН, Н.В., КУЛИКОВ, В.А., ЗАВЬЯЛОВ, Е.Л., ФУРСЕНКО, Д.В., КУЛИКОВ, А.В. Проведение и автоматизация теста «водный лабиринт Морриса» в условиях SPF-вивария. В: *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2015, № 19, вып.4, с. 388-393.

58. ЧОКИНЭ, В.К., ВРАБИЕ, В.Г., ГЛИЖИН, А.Г., БУЛАТ, О.В., ДИДИЛИКЭ, И.М., ШАВДАРЬ, Л.В., ДУБ, В.М., ТАКУ, Н.Н. Саногенная память и ее определение. In: *Neuroscience for medicine and psychology: XII International interdisciplinary congress.* Судак, Крым, Россия, 2016, с.448.

59. ШЕПТИЦКИЙ, В.А., БЕРЕЗЮК, Ю.Н., БУРЦЕВА, С.А. Условно-рефлекторная деятельность белых крыс при длительном потреблении биомассы штамма Streptomyces fradiae CNMN-Ac-11. In: *Buletinul AŞM, Ştiinţele vieţii.* 2017, nr.1 (331), p. 16-24.

60. 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.

61. ШКОЛЬНИКОВ, Е.Э. и др. Экобиотехнологические препараты для агропромышленного комплекса России. В: *Вестник КТУ*. 2014, т. 17, № 13, с. 255-263.

62. ABIRAMAN, K., TZINGOUNIS, A.V., LYKOTRAFITIS, G. KCa2 channel localization and regulation in the axon initial segment. In: FASEB J. 2018, vol. 32, nr. 4, p. 1794–1800.

63. ABDOU, K., SHEHATA, M., CHOKO, K., NISHIZONO, H., MATSUO, M. et al. Synapse-specific representation of the identity of overlapping memory engrams. In: *Science*. 2018, vol. 360, p.1227-1231.

64. ADEWALE, O.F., BASIRU, O.A., IFANIKIN, A. ET AL. Significance of Antioxidants in the Treatment and Prevention of Neurodegenerative Diseases. In: *The Journal of Phytopharmacology.* 2019, vol. 8, nr. 2, p.75-83.

65. AKBEROVA, S.I., STROEVA, O.G., MAGOMEDOV, N.M. Comparative evaluation of the antioxidant activity of para-aminobenzoic acid and emoxipine in the cornea and lens (experimental studies). In: *Vestn. oftal'mologii.* 2001, p. 25–29.

66. ALDERSON, R.M., KASPER, L.J., PATROS, C.H., HUDEC, K.L., TARLE, S.J., LEA, S.E. Working memory deficits in boys with attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): An examination of orthographic coding and episodic buffer processes. In: *Child Neuropsychol.* 2014, vol. 15, p. 1–22.

67. AL-NASSER, M.N., MELLOR, I.R., CARTER, W.G. Is L-Glutamate Toxic to Neurons and Thereby Contributes to Neuronal Loss and Neurodegeneration? A Systematic Review. In: *Brain Sci.* 2022, vol. 12, p. 577.

68. ANDERSEN, J., MARKUSSEN, K., JAKOBSEN, E., SCHOUSBOE, A., WAAGEPETERSEN, H. et al. Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. In: *Neuropharmacology.* 2021, p. 108.

69. ALLENBYN, E., LAING, E., BUCCA, G. et al. Diverse control of metabolism and other cellular processes in Streptomyces coelicolor by the PhoP transcription factor: genome-wide identification of in vivo targets. In: *Nucleic Acids Res.* 2012, nr. 40, p. 9543–9556.

70. AMIN, F.U., SHAH, S.A., KIM, M.O. Glycine inhibits ethanol-induced oxidative stress, neuroinflammation and apoptotic neurodegeneration in postnatal rat brain. In: *Neurochem Int*. 2016, p. 1–12.

71. 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 Ngn2 promoter activity. In: *J. Nat. Prod.* 2015, vol. 78, nr. 2, p. 311-314.

72. BABIN, N.A. The influence of vitamin para-aminobenzoic acid on the productivity and morphological blood composition of rabbits in summer period of year. In: *Вестник КрасГАУ*. 2018, № 6, с.12-35.

73. BALABAN, P.M., ROSHCHIN, M., TIMOSHENKO, A.K., GAINUTDINOV, K.L., BOGODVID, T.K., MURANOVA, L.N., ZUZINA, A.B., KORSHUNOVA, T.A. Nitric oxide is necessary for labilization of a consolidated context memory during reconsolidation in terrestrial snails. In: *Eur. J. Neurosci.* 2014, p. 2963–2970.

74. BALABAN, P.M., ROSHCHIN, M., TIMOSHENKO, A.K., ZUZINA, A.B., LEMAK, M., IERUSALIMSKY, V.N., ASEYEV, N.A., MALYSHEV, A.Y. Homolog of protein kinase Mζ maintains context aversive memory and underlying long-term facilitation in terrestrial snail Helix. In: *Front. Cell. Neurosci*. 2015, p. 222.

75. BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. In: *J. Antibiotics*. 2005, vol. 58, p. 1-26.

76. BEREZIUK, Y., BOORTSEVA, S., GARAEVA, S. et al. The amino acid composition of the biomass of the strain Streptomyces fradiae CNMN-Ac-11, cultivated on a complex medium with bio products of a cyanobacterial nature. In: *Analele Universităţii din Oradea, Fascicula Biologie, tom XXIV*. 2017, nr. 2, p.60-65.

77. BEREZIUK, Y. Influence of the medium of cultivation on antimicrobial characteristics of strain Streptomyces fradiae. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology, 3rd edition*. Chisinau, 2016, p. 123.

78. BÎRSA, M. *Viability and variability of Streptomyces canosus CNMN-Ac-02 strain after lyophilization in the presence of compounds of cyanobacterial and plant origin.* PhD thesis in biological sciences, Chisinau, 2019, 35 p.

79. BORODINOVA, A.A., ZUZINA, A.B., BALABAN, P.M. Role of atypical protein kinases in maintenance of long-term memory and synaptic plasticity. In: *Biochemistry (Moscow)*. 2017, vol. 82, nr. 3, c. 243–256.

80. BOCK, T., STUART, G.J. Impact of calcium-activated potassium channels on NMDA spikes in cortical layer 5 pyramidal neurons. In: *J Neurophysiol*. 2016, vol. 115, nr. 3, p.8.

81. BONDA, D.J., WANG, X., PERRY, G. et al. Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention. In: *Neuropharmacology*. 2010, p. 290–294.

82. BOORTSEVA, S., BEREZIUK, Y. et al. Qualitative and quantitative composition of lipids of biomass of streptomycetes after cultivation on media with different composition. In: *Analele Universităţii din Oradea, Fascicula Biologie.* 2015, vol. 2, p. 57-62.

83. BRATUHINA, A. *Natural variability and biosynthetic activity of actynomycetes Streptomyces massasporeus. (in Russian*). Manuscript of thesis of Ph. D., Chisinau. 2012, 29 p.

84. BRAVO, F.V., J. DA SILVA, CHAN, R.B., G. DI PAOLO, TEIXEIRA-CASTRO, A., OLIVEIRA, T.G. Phospholipase D functional ablation has a protective effect in an Alzheimer's disease Caenorhabditis elegans model. In: *Sci. Rep.* 2018, vol. 8, p. 3540.

85. BREM, A., RAN, K., PASCUAL-LEONE, A. Learning and memory. In: *Handbook of clinical neurology. Elsevier. Brain stimulation*. 2013, vol. 116, p. 693–737.

86. CHIURCHIU, V., TIBERI, M., MATTEOCCI, A. et al. Lipidomics of Bioactive Lipids in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Where Are We? In: *J. Mol. Sci.* 2022. p. 23.

87. CHEN, X., GUO, C., KONG, J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. In: *Neural Regen Res*. 2012, vol. 7, p. 76–85.

88. CHEN, Y., ZHOU, D., QI, D. et al. Growth Promotion and Disease Suppression Ability of a Streptomyces sp. CB-75 from Banana Rhizosphere Soil. In: *Frontiers in Microbiology*. 2018, vol. 8, 18 p.

89. CHOQUET, D., TRILLER, A. The dynamic synapse. In: *Neuron*. 2013, vol. 80, p. 691–703.

90. CORBELLINI, G. Immunological Memory from Thucydides to Burnet and beyond. Dipartimento di Medicina Molecolare Sapienza Università di Roma, Italy, In: *Journal of History of Medicine and Medical Humanities.* 2022, vol. 34, nr.2, p. 39-56.

91. CROWTHER, L.M., MATHIS, D., POMS, M., PLECKO, B. New insights into human lysine degradation pathways with relevance to pyridoxine-dependent epilepsy due to antiquitin deficiency. In*: J. Inherit. Metab. Dis.* 2019, p. 620–628.

92. DAS, S., HYUNGSEOK, C. MOON, H., SINGER, R. H., HYE, PARK, Y. A transgenic mouse for imaging activity-dependent dynamics of endogenous Arc mRNA in live neurons. In*: Sci. Adv.* 2018, p.14-22.

93. DONALD, L., PIPITE, A., SUBRAMANI, R. et al. Streptomyces: Still the Biggest Producer of New Natural Secondary Metabolites, a Current Perspective. In: *Microbiol. Res*. 2022, vol.13, p. 418–465.

94. FENG, Z., CHEN, X., ZENG, M., ZHANG, M. Phase separation as a mechanism for assembling dynamic postsynaptic density signalling complexes. In: *Curr. Opin. Neurobiol.* 2019, vol.57, p. 1-8.

95. FIORITI, L. The persistence of hippocampal-based memory requires protein synthesis mediated by the prion-like protein CPEB3. In: *Neuron 86*. 2015, p.1433–1448.

96. **GARBUZNEAC, A.** Compoziția lipidică a biomasei tulpinilor de streptomicete în urma cultivării pe medii complexe după păstrare îndelungată. In: *Materialele Conferinței Științifice a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”*, Ediția IX-a, 2020, vol. I, p. 194-199.

97. **GARBUZNEAC, A.,** BIRSA, M., BURTSEVA, S. et al. Changes in lipid composition of Streptomyces massasporeus CNMN-Ac-06 biomass after long-term storage. В: *Микробиологический журнал,* Украина, г. Киев, 2020, т. 80, № 5, с. 41-47.

98. **GARBUZNEAC, A.,** BIRSA, M., BURTSEVA, S. Streptomyces fradiae CNMN-Ac-11 after storage by subculturing and cultivation on complex media. In*: 5 th international conference on microbial biotechnology*, Chisinau, 2022, p. 131.

99. **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: *National conference with international participation: Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community.* Chisinau, 2022, p. 131.

100. GRADUS, J. L., HORVÁTH-PUHÓ, E., LASH, T.L. et al. Stress Disorders and Dementia in the Danish Population American. In: *Journal of Epidemiology*. 2019, vol. 188, p. 493-499.

101. GILBOA, A., MOSCOVITCH, M. No consolidation without representation: correspondence between neural and psychological representations in recent and remote memory. In: *Neuron.* 2021, vol. 109, p. 2239-2255.

102. GHAZALA, I., TOUQEER, A. Co-exposure of metals and high fat diet causes aging like neuropathological changes in non-aged mice brain. In: *Brain Research Bulletin.* 2019, vol. 147, p. 148-158.

103. GORINA, Y.V., LOPATINA O.L., KOMLEVA. Y.K., IPTYSHEV, A.M., POLNIKOV, A.M., SALMINA, A.B. Radial arm maze as a tool for assess the spatial learning and memory in mice. In: *Siberian Medical Review.* 2016, vol. 5, p. 46-52.

104. GOTO, A., BOTA, A., MIYA, K., WANG, J., TSUKAMOTO, S. et al. Synaptic plasticity events drive the early phase of memory consolidation. In: *Science.* 2021, vol. 374, p. 857-863.

105. EADYA, T., KHOUTOROVAA, L., OBENAUS, A. Docosahexaenoic acid complexed to albumin provides neuroprotection after experimental stroke in aged rats. In: *Neurobiology of Disease*. 2014, vol. 62, p. 1-7.

106. EGBENYA, D., AIDOO, E., KYEI, G. Glutamate receptors in brain development. In: *Childs Nerv. Syst*. 2021, p. 2753–2758.

107. 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.

108. HAMID, M.E., REITZ, T., JOSEPH, M.R.P. et al. Diversity and geographic distribution of soil streptomycetes with antagonistic potential against actinomycetoma-causing Streptomyces sudanensis in Sudan and South Sudan. In: *BMC Microbiology*. 2020, vol. 20, nr. 33, p. 1-13.

109. HASHIMOTO, M., NAKAI, T., MASUTANI, T., UNNO, K., AKAO, Y. Improvement of Learning and Memory in Senescence-Accelerated Mice by S-Allylcysteine in Mature Garlic Extract. In: *Nutrients.* 2020, p. 1834.

110. HAYASHI, Y. Molecular mechanism of hippocampal long-term potentiation - towards multiscale understanding of learning and memory. In: *Neurosci. Res.* 2022, vol. 175, p. 3-15.

111. HEBB, D.O. The Organization of Behavior. In: *New York: Wiley & Sons*. 1949, 124 p.

112. HONG, K., GAO, A.H., XIE, Q.Y. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. In: *Mar. Drugs.* 2009, nr. 7, p. 24–44.

113. HULME, A.J., MAKSOUR, S., ST-CLAIR GLOVER, M. et al. Making neurons, made easy: The use of Neurogenin-2 in neuronal differentiation. In: *Stem. Cell. Reports.* 2022, vol. 17, nr. 1, p. 14-34.

114. HYLIN, M.J., ZHAO, J., TANGAVELOU, K., ROZAS, N.S., HOOD, K.N. et al .A role for autophagy in long-term spatial memory formation in male rodents. In: *J Neurosci Res.* 2018, vol. 96, p. 416-426.

115. IZUCHUKWU, A. O.R, UCHENNA, S. N., NNAKA, J. The fertility assessment of normal cyclic Wistar rats following the administration of methanolic extract of Portulaca oleracea: an experimental stud. In: *Middle East Fertility Society Journal*. 2021, vol. 26, nr. 5, p. 123-135.

116. JAROME, T.J., HELMSTETTER, F.J. Protein degradation and protein synthesis in long-term memory formation. In: *Front. Mol. Neurosci,* 2014, p. 59-62.

117. JESPERSEN, N., EHRENBOLGER, K., WINIGER, R.R. et al. Structure of the reduced microsporidian proteasome bound by PI31-like peptides in dormant spores. In: *Nat. Commun.* 2022, p. 6962.

118. JOHNSON, R.W., GODBOUT, J.P. Aging, neuroinflammation and behavior. In: *Psychoneuroimmunology*. 2006, vol. 1, p. 379-391.

119. JOHNSON, A, STOLZING, A. The role of lipid metabolism in aging, lifespan regulation, and age-related disease. In: *Aging Cell*. 2019, vol. 18, p. 13048.

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

121. JUGE, N., OMOTE, H., MORIYAMA, Y. Vesicular GABA transporter (VGAT) transports β-alanine. In: *J. Neurochem.* 2013, p.482–486.

122. KHAN, M.S., ALI, T., KIM, M.W., JO, M.H., CHUNG, J.I., KIM, M.O. Anthocyanins improve hippocampus-dependent memory function and prevent neurodegeneration via JNK/Akt/GSK3beta signaling in LPS-treated adult mice. In: *Mol Neurobiol*. 2019, vol. 56, p. 71–87.

123. KIM, T.D., HONG, G., KIM, J., YOON, S. Cognitive enhancement in neurological and psychiatric disorders using transcranial magnetic stimulation (TMS): a review of modalities, potential mechanisms and future implications. In: *Exp Neurobiol*. 2019, vol. 28, nr. 1, p. 1–16.

124. KIM, J., YOUNG P., KWANGUK, (KENNY). Spatial Learning and Memory Using a Radial Arm Maze with a Head-Mounted Display. 2018, vol. 15, nr. 10, p. 935–944.

125. KIM, W.G., ICK-DONG, Y. Benzastatin J, a New Demethylated Derivative of Benzastatin B Produced by Controlled Fermentation of Streptomyces nitrosporeus. In: *J. Microbiol. Biotechnol*, 2002, vol.12, nr. 5, p. 838–840.

126. KIM, W.G., KIM, J.P., KIM, C.J. et al. Benzastatins A, B, C, and D: new free radical scavengers from Streptomyces nitrosporeus 30643. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. In: *J Antibiot, Tokyo*. 1996, vol. 49, nr. 1, p. 20-25.

127. KIM, W.G., KIM, J.P., KOSHINO, H. et al. Benzastatins E, F, and G: new indoline alkaloids with neuronal cell protecting activity from Streptomyces nitrosporeus. In: *Tetrahedron*, 1997, vol.52, p. 4309-4316.

128. KIM, W.G., RYOO, I.J., PARK, J.S., YOO, I.D. Benzastatins H and I, new benzastatin derivatives with neuronal cell protecting activity from Streptomyces nitrosporeus. In: *J Antibiot, Tokyo.* 2001, vol. 54, nr. 6, p. 513-516.

129. KISELEV, A.L., VOROBYOV, G.M. Para-aminobenzoic acid as a stimulator of growth and development of living organisms. (in Russian). In: *Bulletin of the Russian Agrarian University*. 2006, vol. 1, nr. 6, p. 129-132.

130. KNUDSON, K., FERNANDES, J., HOLBERT, R., AVERBUCH, R., SURYADEVARA, U. Short-Term/Long-Term Memory. In: *Gu, D., Dupre, M.E. (eds) Encyclopedia of Gerontology and Population Aging. Springer, Cham*. 2021, p.23-27.

131. KOHLER C. A., WEBER, BENETTI, C. DA S., BONINI, F.JULIANA S. Histaminergic Mechanisms for Modulation of Memory Systems. In: *Neural Plasticity*. 2011, p. 1-16.

132. LASKARIS, P., KARAGOUNI, A. Streptomyces, Greek Habitats and Novel Pharmaceuticals: A Promising Challenge. In: *Microbiol. Res.* 2021, nr.12, p. 840–846.

133. LI, D., YANG, R., WU, J., ZHONG, B., LI, Y. Comprehensive review of α-carboline alkaloids: Natural products, updated synthesis, and biological activities. In: *Front Chem*. 2022, vol. 10, p. 988327.

134. LI, Y., SUN, H., CHEN, Z., XU, H., BU, G., ZHENG, H. Implications of GABAergic neurotransmission in Alzheimer's disease. In: *Front. Aging Neurosci.* 2016, 31p.

135. LEIRÓS, M., ALONSO, E., SANCHEZ, J.A. et al. Mitigation of ROS insults by Streptomyces secondary metabolites in primary cortical neurons. In: *Chem. Neurosci.* 2014, vol. 5, nr.1, p. 71-80.

136. LEE, J.Y., STENZEL, W., EBEL, H. et al. Mitomycin C in preventing spinal epidural fibrosis in a laminectomy model in rats. In: *J. Neurosurg.* 2004, vol. 100, nr. 1, p. 52-55.

137. LUIS, A. G., KYRIA, L. B-M., J. BRUCE, G. Accumulation of High-Value Lipids in Single-Cell Microorganisms a mechanistic Approach and Future Perspectives. In: *J. of agricultural and food chemistry.* 2014, p. 2709-2727.

138. MASLAND, R. We Know It When We See It: What the Neurobiology of Vision Tells Us About How We Think. In: *M.: A.П.* 2021, 304 p.

139. MAYFORD, M., SIEGELBAUM, S.A., KANDEL, E. R. Synapses and memory storage. Cold Spring Harb. In: *Perspect. Biol* 4, 2012, p. 751.

140. MEI, J., KOHLER, J., WINTER, Y., SPIES, C., ENDRES, M., BANNEKE, S. et al. Automated radial 8-arm maze: A voluntary and stress-free behavior test to assess spatial learning and memory in mice. In: *Behav Brain Res*. 2020, vol. 381, p. 112-352.

141. MCGAUGH, J. L. The perseveration-consolidation hypothesis: Mueller and Pilzecker, 1900. In: *Brain Res Bull.* 1999, vol. 50, nr. 5-6, p. 445-446.

142. MOLDOVAN, O.-L., RUSU, A., TANASE, C., VARI, C.-E. Glutamate—A multifaceted molecule: Endogenous neurotransmitter, controversial food additive, design compound for anti-cancer drugs. A critical appraisal. In: *Food Chem. Toxicol.* 2021, vol. 153, p. 112-290.

143. MORÉN, C., DE SOUZA, R.M., GIRALDO, D.M., UFF, C. Antioxidant Therapeutic Strategies in Neurodegenerative Diseases. In: *J. Mol. Sci.* 2022, vol. 23, p. 9328.

144. 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.

145. MORRIS, R.G.M. Morris water maze. In: *Scholarpedia*. 2008, p. 6315.

146. MURPHY, K.M., WEAVER, C., BERG, L.J. Janeway's Immunobiology. In: *New York: Norton.* 2021, p. 473-484.

147. NABAVI, S., FOX, R., CHRISTOPHE, D. PROULX, LIN, J.Y. et al. Engineering a memory with LTD and LTP. In: *Nature.* 2014, vol. 511, p. 348–352.

148. NAVID, O., MOHSEN, M., SEYYED, M. et al. Trends in Natural Nutrients for Oxidative Stress and Cell Senescence. In: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 7 p.

149. NETTO, C.B., CONTE, S., LEITE, M.C. et al. Serum S100B protein is increased in fasting rats. In: *Arch Med Res.* 2006, vol. 37, p. 683-686.

150. NOURA, E.-A., EL-NAGGAR, C. Streptomyces-based cell factories for production of biomolecules and bioactive metabolites. In: *Microbial Cell Factories Engineering for Production of Biomolecules.* 2021, p.183-234.

151. 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.

152. PALMER, E.E., HAYNER, J., SACHDEV, R., CARDAMONE, M., KANDULA, T., MORRIS, P., DIAS, K.-R., TAO, J., MILLER, D., ZHU, Y. Asparagine synthetase deficiency causes reduced proliferation of cells under conditions of limited asparagine. In: *Mol. Genet. Metab*. 2015, p. 178–186.

153. PATTERSON, E., WALL, R., FITZGERALD, G.F. Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. In: *Journal of Nutrition and Metabolism*. 2012, p. 1-16.

154. 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.

155. PRIYANKA, T., SANJAY, T. Detection and modulation of neurodegenerative processes using graphene-based nanomaterials: Nanoarchitectonics and applications. In: *Advances in Colloid and Interface Science*. 2023, vol. 311, p. 102824.

156. RAO-RUIZ, P., COUEY, J.J., MARCELO, I.M., BOUWKAMP, C.G., SLUMP, D.E. et al. Engram-specific transcriptome profiling of contextual memory consolidation. In: *Nature Communications.* 2019, vol. 10, nr. 1, p. 223.

157. RATEB, M.E., HOUSSEN, W.E., HARRISON, W.T. et al. Diverse metabolic profiles of a Streptomyces strain isolated from a hyper-arid environment. In: *J. Nat. Prod*. 2011, vol. 74, p. 1965–1971.

158. REHMAN, S.U., AHMAD, A., YOON, G.H., KHAN, M., ABID, M.N., KIM, M.O. Inhibition of c-Jun N-Terminal Kinase Protects Against Brain Damage and Improves Learning and Memory After Traumatic Brain Injury in Adult Mice. In: *Cereb Cortex*. 2018, vol. 28, p. 2854–2872.

159. RICHTER, S.H., ZEUCH, B., LANKISCH, K., GASS, P., DURSTEWITZ, D., VOLLMAYR, B. Where have I been? Where should I go? Spatial working memory on a radial arm maze in a rat model of depression. In*: PLoS One*. 2013, vol. 8, p. e62458.

160. ROY, D.S., PARK, Y.G., KIM, M.E., ZHANG, Y., OGAWA, S.K. et al. Brain-wide mapping reveals that engrams for a single memory are distributed across multiple brain regions. In*: Nat. Commun*., 2022, vol. 13, p. 1799.

161. ROZAS, N.S., REDELL, J.B., PITA-ALMENARA, J., MCKENNA, J., MOORE, A.N. et al. Intrahippocampal glutamine administration inhibits mTORC1 signaling and impairs long-term memory. In: *Learning and Memory*, 2015, vol. 22, p. 239-246.

162. RUZZO, E.K., CAPO-CHICHI, J.-M., BEN-ZEEV, B., CHITAYAT, D., MAO, H., PAPPAS, A.L., HITOMI, Y., LU, Y.-F., YAO, X., HAMDAN, F.F., et al. Deficiency of

asparagine synthetase causes congenital microcephaly and a progressive form of encephalopathy. In: *Neuron.* 2013, p. 429–441.

163. SARÉ, R. M., LEMONS, A., SMITH, C. B. Behavior testing in rodents: Highlighting potential confounds affecting variability and reproducibility. In: *Brain Sci.* 2020, vol. 11, p. 522.

164. SAIDOV, KH. M., ANOKHIN, K.V. New Approaches in Cognitive Neurobiology: Methods of Molecular Marking and Ex Vivo Imaging of Cognitively Active Neurons. In: *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 2018, vol. 48, nr. 7, p. 804–812.

165. 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. 641080.

166. SATO, H., TSUKAMOTO-YASUI, M., TAKADO, Y., KAWASAKI, N., MATSUNAGA, K., UENO, S., et al. Protein deficiency-induced behavioral abnormalities and neurotransmitter loss in aged mice are ameliorated by essential amino acids. In: *Front Nutr*. 2020, vol. 7, p. 23.

167. SEYEDABADI, M. et al. The role of serotonin in memory: interactions with neurotransmitters and downstream signaling. In: *Exp Brain Res.* 2014, vol. 232, p. 723–738.

168. ȘEPTIȚCHI, V., VASILCIUC, A., **GARBUZNEAC, A**. et al. Influența consumului pe termen lung al biomasei tulpinilor Streptomyces massasporeus CNMN-36 și Streptomyces fradiae CNMN-Ac-11 asupra învățării și memoriei reflector-condiționate a șobolanilor albi de diferite vârste. In: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*, 2021, nr. 2, p. 72-82.

169. 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.

170. SUNAZUKA, T., HIROSE, T., OMURA, S. Efficient total synthesis of novel bioactive microbial metabolites. In: *Acc. Chem. Res.* 2008, vol. 41, p. 302–314.

171. SPASIC, J., MANDIC, M., DJOKIC, L., NIKODINOVIC-RUNIC, J. Streptomyces spp. în caseta de instrumente pentru biocataliză. În: *Microbiologie aplicată și biotehnologie*. 2018, nr. 102, p. 3513-3536.

172. SUZUKI, H., YAMASHIRO, D., OGAWA, S., KOBAYASHI, M., CHO, D. et al. Intake of seven essential amino acids improves cognitive function and psychological and social function in middle-aged and older adults: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. In: *Front Nutr*, 2020, p. 586166.

173. SPINOSA, H.S., GERENUTTI, M., BERNARDI, M.M. Anxiolytic and anticonvulsant properties of doramectin in rats: behavioral and neurochemistric evaluations // Comp. Biochem. In: *Physiol. & Toxicol. Pharmacol*., 2000, vol. 127, nr. 3, p. 359-366.

174. 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.

175. TADTONG, S., MEKSURIYEN, D., TANASUPAWAT, S. et al. Geldanamycin derivatives and neuroprotective effect on cultured P19-derived neurons. In: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, vol. 17, p. 2939–2943.

176. TAYLOR, P.M. Role of amino acid transporters in amino acid sensing. In: *Am. J. Clin. Nutr*. 2014, vol. 99, p. 223S–230S.

177. TAN, L.T., CHAN, K.-G., TAHIR, M. K. et al. Streptomyces sp. MUM212 as source of antioxidants with radical scavenging and metal chelating properties. In: *Frontiers in Pharmacology*. 2017, vol. 8, 18 p.

178. TATSUKI, F., SUNAGAWA, G.A., SHI, S., SUSAKI, E.A., YUKINAGA, H. et al. Involvement of Ca (2+) Dependent Hyperpolarization in Sleep Duration in Mammals. In: *Neuron*. 2016, vol. 90, nr. 1, p. 70–85.

179. TIEDJE, K.E., STEVENS, K., BARNES, S., WEAVER, D.F. β-Alanine as a small molecule neurotransmitter. In: *Neurochem. Int.* 2010, p. 177–188.

180. TODERAŞ, A. *Particularităţile fiziologo-biochimice şi biotehnologice ale tulpinii Streptomyces massasporeus 36 ca producător al substanţelor biologic active.* Autoref. tezei de dr. şt. biologice. Chişinău, 2000, 21 p.

181. TOMAS PEREIRA, I., BURWELL, R.D. Using the spatial learning index to evaluate performance on the water maze. In: *Behav Neurosci.* 2015, vol. 129, nr. 4, p. 533–539.

182. TONEGAWA, S., MORRISSEY, M.D., KITAMURA, T. The role of engram cells in the systems consolidation of memory. In: *Nat. Rev. Neurosci.* 2018, vol. 19, p. 485–498.

183. VAN DISSEL, D., CLAESSEN, D., VAN WEZEL, G.P. Morphogenesis of Streptomyces in submerged cultures. In: *Adv Appl Microbiol.* 2014, p. 1-45.

184. VARESI, A., CHIRUMBOLO, S., CAMPAGNOLI, L.I.M. et al. The Role of Antioxidants in the Interplay between Oxidative Stress and Senescence. . In: *Antioxidants*. 2022, vol. 11, p. 1224.

185. WALKER, A.K., WING, E.E., BANKS, W.A., DANTZER, R. Leucine competes with kynurenine for blood-to-brain transport and prevents lipopolysaccharide-induced depression-like behavior in mice. . In: *Mol Psychiatry.* 2019, vol. 24, p. 1523–1532.

186. WIXTED, J. T., SQUIRE, L. R., JANG, Y., PAPESH, M.H., GOLDINGER, S. D. et. al.. Sparse and distributed coding of episodic memory in neurons of the human hippocampus. In: *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014, p. 9621-9626.

187. XIONG, Y., MAHMOOD, A., CHOPP, M. Animal models of traumatic brain injury. In: *Nat Rev Neurosci*. 2013, vol. 14, nr. 2, p.128-142.

188. XINCUI F., JING Z., JIANPING Z., LITAO W. 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.

189. YOSHIDA, T., 219YANG, L., SU, Y., GENG, Y., ZHANG, Y., REN, X., HE, L., SONG, X. A Triple-Emission Fluorescent Probe for Discriminatory Detection of Cysteine/Homocysteine, Glutathione/Hydrogen Sulfide, and Thiophenol in Living Cells. In: *ACS Sens.* 2018, p. 1863–1869.

190. ZIV, Y. Long-term dynamics of CA1 hippocampal place codes. In: *Nat. Neurosci*. 2013, vol. 16, p. 264– 266.

191. ZHANG, JIANFEN, et al. The Effects of Hydration Status on Cognitive Performances among Young Adults in Hebei. In: *China: A Randomized Controlled Trial (RCT*), 2024, p. 241-247.

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

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1 Акт о внедрении результатов

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ПРИДНЕСТРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Т.Г. ШЕВЧЕНКО»

Естественно-географический факультет
MD-3300, Приднестровье, г. Тирасполь, ул. 25 Октября, 128, корпус №3
Тел. 79-5-44, e-mail: egfdekan@spsu.ru, http://egf.spsu.ru

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

результатов исследований Анастасии Гарбузняк, включенных в материалы диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук на тему: **«Обучение и память крыс при потреблении биомассы стрептомицетов» («Învăţare şi memoria şobolanilor în consumul biomasei de streptomicete»).**

Настоящим подтверждается, что результаты исследований Гарбузняк Анастасии внедрены в курсы лекций «Физиология человека и животных», «Высшая нервная деятельность», которые читаются на кафедре физиологии и санокреатологии Естественно-географического факультета Приднестровского государственного университета им. Т.Г. Шевченко.

Декан,
д.б.н., профессор С.И. Филипенко

MD 1672 Y 2023.02.28

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenţia de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 1672 (13) Y
(51) Int.Cl: *C12N 1/20* (2006.01)
C12N 1/30 (2006.01)
C07C 229/60 (2006.01)
C12R 1/465 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENŢIE DE SCURTĂ DURATĂ

În termen de 6 luni de la data publicării menţiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenţie de scurtă durată, orice persoană poate face opoziţie la acordarea brevetului

(21) Nr. depozit: s 2022 0059
(22) Data depozit: 2022.09.08

(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
2023.02.28, BOPI nr. 2/2023

(71) Solicitant: IP INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ŞI BIOTEHNOLOGIE, MD
(72) Inventatori: BÎRSA Maxim, MD; BURŢEVA Svetlana, MD; SÎRBU Tamara, MD; GARBUZNEAC Anastasia, MD; ŞEPTIŢCHI Vladimir, MD
(73) Titular: IP INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ŞI BIOTEHNOLOGIE, MD

MD 1672 Y 2023.02.28

(54) Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06

(57) Rezumat:

1

Invenţia se referă la biotehnologie, în special la mediile de cultivare a streptomicetelor.

Mediul nutritiv pentru cultivarea submersă a tulpinii *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, conform invenţiei, conţine, g/L: făină de porumb 20,0,

2

făină de soia 10,0, glucoză 10,0, NaCl 5,0, $CaCO_3$ 1,0, acid 4-aminobenzoic 1,37 şi apă distilată restul, pH iniţial 7,0-7,2.

Rezultatul invenţiei constă în sporirea sintezei lipidelor cu 32,28 %, fosfolipidelor cu 111,5 % şi steridelor cu 366,66 %.

Revendicări: 1



REPUBLICA MOLDOVA

Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

BREVET
DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ

Nr. **1672**

eliberat în temeiul Legii nr. 50/2008 privind protecția invențiilor

Titlul: **Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06**

Titular: **INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA TEHNICĂ A MOLDOVEI, MD**

Data depozit: **2022.09.08**

Durata brevetului : **6 ani**

Descrierea invenției, revendicările și desenele constituie parte integrantă a prezentului brevet de invenție de scurtă durată

AGENȚIA DE STAT PENTRU PROPRIETATEA INTELECTUALĂ • REPUBLICA MOLDOVA •

Director general

CHIȘINĂU

MD 1682 Y 2023.04.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenţia de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 1682 (13) Y
(51) Int.Cl: *A23K 10/16* (2016.01)
A61K 35/66 (2015.01)
A61K 35/74 (2015.01)
C07C 229/60 (2006.01)
C12R 1/465 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENŢIE DE SCURTĂ DURATĂ

În termen de 6 luni de la data publicării menţiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenţie de scurtă durată, orice persoană poate face opoziţie la acordarea brevetului

(21) Nr. depozit: s 2022 0058
(22) Data depozit: 2022.09.08

(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
2023.04.30, BOPI nr. 4/2023

(71) Solicitant: IP INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ŞI BIOTEHNOLOGIE, MD
(72) Inventatori: BÎRSA Maxim, MD; GARBUZNEAC Anastasia, MD; ŞEPTIŢCHI Vladimir, MD; BURŢEVA Svetlana, MD; SÎRBU Tamara, MD
(73) Titular: IP INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ŞI BIOTEHNOLOGIE, MD

MD 1682 Y 2023.04.30

(54) Procedeu de hrănire a animalelor cu sânge cald

(57) Rezumat:

1

Invenţia se referă la biotehnologie şi fiziologie experimentală, şi anume la procedee de hrănire a animalelor cu sânge cald, în particular şobolani, pentru sporirea masei corporale.

Procedeul de hrănire a animalelor cu sânge cald include adăugarea la raţia alimentară a biomasei tulpinii *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 în doză de 250 mg/kg de masă corporală pe zi, timp de 10 săptămâni, totodată biomasa se obţine prin

2

cultivarea tulpinii pe un mediu nutritiv, care conţine, g/L: făină de porumb 20,0, făină de soia 10,0, glucoză 10,0, NaCl 5,0, $CaCO_3$ 1,0, acid 4-aminobenzoic 1,37, apă restul, timp de 5 zile, separarea biomasei şi uscarea.

Rezultatul tehnic constă în sporirea greutăţii corporale a masculilor de şobolani cu 73,34-488,14% şi a femelelor cu 52,71-108,86%, din săptămâna a 5-a până în săptămâna a 10-a de hrănire.

Revendicări: 1

S 2022 0058 2337 14

Revendicări
la cererea de brevet de invenţie cu titlul:
PROCEDEU DE STIMULARE A MASEI CORPORALE A ANIMALELOR CU SÂNGE CALD

Se propune un procedeu de stimulare a masei corporale a animalelor cu sânge cald (şobolani), care include administrarea de aditiv alimentar a biomasei tulpinii *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 cultivate pe un mediu nutritiv care conţine 1,37 g/l acid 4-aminobenzoic, în doză de 250 mg/kg masă corporală pe zi, timp de 10 săptămâni contribuie la o creştere semnificativă a greutăţii corporale a animalelor experimentale, în special la 5-10 săptămână de hrănire, constituind la masculi de şobolani *Wistar* cu 73,34 - 488,14%, iar la femele de şobolani *Wistar* cu 52,71% - 108,86%, respectiv mai mult faţă de prototip.

Director adjunct pe probleme de ştiinţă
al IP IMB, dr. şt. biol., conf. cercetător Chiseliţa Oleg

8



SALONUL INTERNAȚIONAL AL CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE, INOVĂRII ȘI INVENTICII

PRO INVENT

EDIȚIA XXI, 25-27 OCTOMBRIE 2023
CLUJ-NAPOCA

UNIVERSITATEA TEHNICĂ

DIPLOMA DE EXCELENȚĂ
ȘI MEDALIA PRO INVENT

Se acordă **BÎRSA Maxim, BURȚEVA Svetlana, SÎRBU Tamara, GARBUZNEAC Anastasia, ȘEPTIȚCHI Vladimir**

De la **UNIVERSITATEA TEHNICĂ A MOLDOVEI**

Pentru **STREPTOMYCES MASSASPOREUS CNMN-AC-06 – SURSĂ DE SUBSTANȚE BIOLOGIC ACTIVE PENTRU AGRICULTURĂ**

PREȘEDINTELE SALONULUI,
Prof. dr. ing. VASILE ȚOPA
Rector al Universității Tehnice din Cluj-Napoca

PREȘEDINTELE JURIULUI,
Prof. dr. ing. RADU MUNTEANU


UGAL INVENT
Medalia de aur
se acordă
Maxim Bîrsa, Svetlana Burțeva, Tamara Sîrbu,
Anastasia Garbuzneac, Vladimir Șeptițchi
Universitatea Tehnică a Moldovei
pentru
Streptomyces massasporeus CNMN – Ac – 06 – source of biologically active substances for agriculture
UGAL INVENT
SALONUL INOVĂRII și CERCETĂRII
9-10 Noiembrie 2023
Galați - România
Rector,
Prof. dr. ing. Puiu Lucian Georgescu
Președinte Salon UGAL INVENT,
Prof. dr. ing. Cătălin Fetecău
IDEI UGAL
OSIM
REFORM
research forms better


PRO INVENT


European Exhibition of Creativity and Innovation
EUROINVENT
EURO INVENT



EUROINVENT

EUROPEAN EXHIBITION OF CREATIVITY AND INNOVATION

2023

IASI - ROMÂNIA

15 EDITION

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

under the patronage of

MINISTERUL CERCETĂRII, INOVĂRII ŞI DIGITALIZĂRII

***Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 – source of biologically active substances for agriculture**

BÎRSA Maxim, BURȚEVA Svetlana, SÎRBU Tamara,
GARBUZNEAC Anastasia, ȘEPTIȚCHII Vladimir

Coordinator of EUROINVENT
Assoc,Prof.Dr.Eng. Andrei Victor SANDU

May 13, 2023

EUROPE DIRECT Iași

IFIA INTERNATIONAL FEDERATION OF INVENTORS' ASSOCIATIONS

WIIPA

EURO INVENT



EUROINVENT

EUROPEAN EXHIBITION OF CREATIVITY AND INNOVATION

IASI - ROMÂNIA

15 EDITION

under the patronage of

MINISTERUL CERCETĂRII, INOVĂRII ȘI DIGITALIZĂRII

DIPLOMA

2023

is awarded to:

SILVER MEDAL

***Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 – source of biologically active substances for agriculture**

BÎRSA Maxim, BURȚEVA Svetlana, SÎRBU Tamara,
GARBUZNEAC Anastasia, ȘEPTIȚCHII Vladimir

President of International Jury
Prof.Dr.Eng. Mohd Mustafa Al Bakri ABDULLAH

President of Scientific Committee
Prof.Dr. Ion SANDU

May 13, 2023

EUROPE DIRECT Iași

FIR IASI ROMANIA

IFIA INTERNATIONAL FEDERATION OF INVENTORS' ASSOCIATIONS

WIIPA

European Exhibition of Creativity and Innovation • Iași - România • EURO INVENT

AGEPI AGENȚIA DE STAT PENTRU PROPRIETATEA INTELECTUALĂ A REPUBLICII MOLDOVA

Expoziţia Internaţională Specializată

„INFOINVENT"

Ediția a XVIII-a

DIPLOMĂ

MEDALIA DE BRONZ

se acordă
autorilor: Maxim Bîrsa, Svetlana Burţeva, Tamara Sîrbu,
Anastasia Garbuzneac, Vladimir Șeptițchi

pentru
Influenţa biomasei de streptomicete asupra indicilor
fiziologici la animalele homeoterme

Eugeniu RUSU,
Preşedintele
Comitetului organizatoric

Svetlana COJOCARU,
Preşedintele Juriului

22-24 noiembrie 2023,
Chişinău, Republica Moldova

Приложение 5 Сертификаты участия в научных мероприятиях





CERTIFICAT

№ CIC-VIII 295
Se atestă că

ГАРБУЗНЯК А.

a participat la a VIII-a ediție a
Conferinței științifico-practice cu participare internațională **INSTRUIRE PRIN CERCETARE PENTRU O SOCIETATE PROSPERĂ**,
cu lucrarea „Липидный состав биомассы стрептомицетов при культивировании на средах сложного состава”

se certifică cu 4 credite

Rector al UST,
Eduard COROPCEANU

20 – 21 martie 2021
DATA

The National Conference with international participation

„NATURAL SCIENCES IN THE DIALOGUE OF GENERATIONS”

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

presented to

Garbuzneac Anastasia

for an oral presentation during this conference.

MOLDOVA STATE UNIVERSITY

SCIENTIFIC ASSOCIATION OF GENETICISTS AND BREEDERS OF THE REPUBLIC OF MOLDOVA

Academician Maria DUCA

Chair of the Organizing Committee

September 14-15, 2023, Chisinau, Republic of Moldova

Декларация об ответственности

Нижеподписавшаяся, заявляю под личную ответственность, что материалы, представленные в докторской диссертации, являются результатом личных научных исследований и разработок. Осознаю, что в противном случае, буду нести ответственность в соответствии с действующим законодательством.

Гарбузняк Анастасия

Подпись 

Число 7.05.2024

CV-ul AUTORULUI

Curriculum vitae Europass



Informaţii personale	
Nume / Prenume	**GARBUZNEAC ANASTASIA**
Adresa	Str. Mira, 7, ap. 7, Tiraspol, MD-3300, Republica Moldova
Număr de telefon	+373 533 91516, +373 77704353
E-mail	11_lav_11@mail.ru
Naţionalitate(-tăţi)	RM
Data naşterii	11/05/1990
Sex	Feminin
Experiența de muncă	
Date	2014 - prezent
Ocupația sau funcția deținută	Asistent, Catedra Sănătatea Publică şi Organizarea Ocrotiri sănătăţii cu ciclul bolilor infecţioase, Cercetător științific
Numele și adresa angajatorului	Universitatea de Stat Nistreană, MD-3300, or. Tiraspol, str. Mira, 33; Institutul de Fiziologie şi Sanocreatologie, strada Academiei 1, Chișinău, RM
Educaţie şi antrenament	
Date	2018-2022
Titlul calificării acordate	Școala Doctorală de Științe Biologice și Geonomice
Denumirea și tipul organizației	Universitatea de Stat Nistreană, Facultatea de Medicină
Date	2008-2014
Titlul calificării acordate	Medic la specialitatea “Medicina”,
Subiecte principale / calificări ocupaționale acoperite	Medic infecţionist, Ordinatura clinică
Denumirea și tipul organizație	Universitatea de Stat Nistreană, Facultatea de Medicina
Limba maternă	Limba rusă

Alte limbi	**Înţelegere**		**Vorbire**		**Scriere**
Autoevaluare Nivel European (*)	Ascultare	Citire	Participare la conversaţie	Discurs oral	Exprimare scrisă
l. română	A1	A1	A1	A1	A1
l.franceză	A1	A1	A1	A1	A1
l. engleză	B1	B 1	B1	B1	B1

Abilități și competențe sociale	Bune abilități sociale și capacitatea de a lucra on echipă.
Abilități și competențe organizatorice	Perseverență, capacitate de a lucra eficient sub presiune, proactivitate, adaptabilitate și flexibilitate, responsabilitate.
Abilități și competențe tehnice	Abilități de lucru la computer, microscop; de utilizare a echipamentului de laborator. Bune abilități în utilizarea Microsoft Office Word, Microsoft Office Power Point, Microsoft Office Excel. Metode studii fiziologice și microbiologice, prelucrare ulterioară în condiții de laborator, interpretarea datelor primite etc.
Alte abilități și competențe	Cânt la chitară și la pian.
Informaţie suplimentară	2019 - Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători (Chişinău, 2019); 2020 - Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători (Chişinău, 2020); 2021 - Metodologii contemporane de cercetare şi evaluare: Ştiinţe biologice şi chimice. Ştiinţe fizice şi matematice. Ştiinţe economice (Chişinău, 2021); 2022 - Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community (Chişinău, 2022); 2023 - Natural sciences in the dialogue of generations (Chişinău, 2023); Conferinţa Ştiinţifică Naţională, consacrată jubileului de 95 ani din ziua naşterii academicianului Boris Melnic (Chişinău, 2023). Brevete: 1. «Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii Streptomyces massasporeus CNMN-Ac-06». Cerere de brevet Nr. Intrare AGEPI 2337.08.09.2022; 2. “Procedeu de hrănire a animalelor cu sânge cald. Cerere de brevet Nr. Intrare AGEPI 2338.08.09.2022.