

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВЕДЕНИЯ ЖИВОТНЫХ:
ВОСПРИЯТИЕ ВНЕШНИХ СТИМУЛОВ, ДВИГАТЕЛЬНАЯ
АКТИВНОСТЬ, ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ**

УДК 159.953

**ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ МЕМАНТИНА НА ОБУЧЕНИЕ КРЫС
В ВОДНОМ ТЕСТЕ МОРРИСА**

© 2020 г. В. О. Муровец^{1,*}, А. А. Александров²

¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Кафедра высшей нервной деятельности и психофизиологии, биологический факультет,
Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

* e-mail: murovetsvo@infran.ru

Поступила в редакцию 09.01.2019 г.

После доработки 22.07.2019 г.

Принята к публикации 16.09.2019 г.

С целью выявления компонентов обучения, зависимых от системы NMDA-рецепторов, исследовали влияние мемантина на пространственное обучение крыс в стандартной версии водного теста Морриса. Мемантин при внутрибрюшинном введении в дозе 20 мг/кг полностью блокировал обучение. При этом нарушалось угашение неэффективных стратегий поиска, что следует из повышенной частоты тигмотаксиса и оставлений платформы. В то же время у животных, прошедших непространственный претренинг, при котором они познакомились с процедурными аспектами теста без введения препарата, пространственное обучение происходило несмотря на введение мемантина, хотя и с несколько меньшей скоростью, а частота тигмотаксиса и оставлений платформы была снижена. Результаты свидетельствуют, что пространственное обучение в водном тесте Морриса относительно независимо от системы гиппокампальных NMDA-рецепторов. При этом NMDA-антагонисты негативно влияют на выработку новых поведенческих навыков и/или угашение неэффективной стратегии поведения.

Ключевые слова: водный тест Морриса, мемантин, NMDA-рецепторы, пространственное обучение и память, когнитивные нарушения

DOI: 10.31857/S0044467720010104

ВВЕДЕНИЕ

Водный тест Морриса [далее – водный тест; Morris et al., 1982] широко используется для исследования механизмов обучения и памяти у животных, а также когнитивных нарушений, вызванных разнообразными воздействиями и патологическими процессами, включая модели инсульта, шизофрении, старения, болезни Альцгеймера и проч. [Vorhees and Williams, 2014; Sah et al., 2017]. Задача обучения в тесте комплексная и объединяет разные аспекты, включая процедурное и пространственное обучение [Saucier et al., 1996; Vorhees and Williams, 2014]. Пространственная версия теста особенно чувствительна к нарушениям гиппокампа [Morris et al., 1982] – структуры, являющейся центральным звеном системы пространственного референтного

обучения и памяти [Eichenbaum et al., 1990; Hesselink et al., 1999; Hunsaker, Kesner, 2018].

Антагонисты NMDA-рецепторов глутамата оказывают в целом негативное влияние на обучение в тесте. Впервые это было показано для конкурентного NMDA-антагониста D-2-амино-5-фосфонопентаноата (AP5), интра-церебровентрикулярная инфузия (и.ц.в.) 30–40 мМ раствора которого полностью блокировала обучение [Morris et al., 1986; Davis et al., 1992; Morris, 2013b], далее подобный эффект был выявлен и для других, конкурентных и неконкурентных NMDA-антагонистов [Saucier and Cain, 1995; Ylinen et al., 1995; Cain et al., 1996; Saucier et al., 1996]. Поскольку антагонисты нарушали пространственное обучение в тесте при концентрациях, сопоставимых с теми, что вызывали блокаду предполагаемого механизма долговременной памяти

ти — долговременной потенциации (далее — ДВП) [о механизме см. Nicoll et al., 2017] в гиппокампе *in vivo*, но не влияли на использование уже приобретенной пространственной памяти, а также гиппокамп-независимое обучение зрительной дискриминации, было высказано предположение, что ДВП и NMDA-рецепторы опосредуют пространственные аспекты обучения в водном тесте [Morris, 1989; Davis et al., 1992; Morris, 2013a,b].

Однако дальнейшие исследования поставили под сомнение как первоочередную роль NMDA-рецепторов в пространственном обучении, так и пригодность “классического” водного теста для исследования потенциальных NMDA-антагонистов [Keith and Rudy, 1990; Bannerman et al., 2006]. Было обнаружено, что хотя и.ц.в. инфузия 10–30 мМ AP5 полностью блокирует обучение у крыс, не знакомых с задачей теста, его действие не обнаруживается, если животные уже проходили обучение в другом пространственном окружении. При этом AP5 по-прежнему блокировал ДВП в гиппокампе *in vivo*, а обучение оставалось гиппокамп-зависимым. Непространственный претренинг, заключающийся в тренировке с изменяющимся положением платформы при маскировке внешних пространственных стимулов, не влиял на эффект препарата [Bannerman et al., 1995; Inglis et al., 2013]. В то же время исследования других авторов показали эффективность предварительного непространственного обучения, которое снимало влияние конкурентного NMDA-антагониста NPS17742 [Saucier and Cain, 1995; Cain et al., 1996; Saucier et al., 1996]. Дискуссия, порожденная опытами с разными методическими подходами, продолжается по настоящее время, и если участие NMDA-рецепторов в механизмах обучения и памяти по-прежнему не вызывает сомнений, конкретный тип опосредуемого ими обучения и даже вовлеченные в процесс мозговые структуры (неокортекс или гиппокамп) все еще нуждается в прояснении [Bannerman et al., 2006, 2012; Inglis et al., 2013; Morris et al., 2013a].

NMDA-антагонисты апробируются для лечения широкого спектра заболеваний, связанных с когнитивными нарушениями. Неконкурентный NMDA-антагонист потенциал-зависимый каналоблокатор мемантин (1-амино-3,5-диметиламиноадамantan) считается весьма перспективным для лечения и

профилактики медленных нейродегенеративных заболеваний и последствий ишемии головного мозга. По сравнению с более ранними неконкурентными антагонистами — малеатом дизоцильпина (МК-801) и кетамин, мемантин обладает существенно меньшими побочными эффектами, включая психотомиметическое действие [Parsons et al., 2007, 2013; Johnson et al., 2015; Amidfar et al., 2018]. Особенностью действия мемантина является то, что он обратимо блокирует катионный канал, ассоциированный с NMDA-рецептором, только когда канал открыт, что наблюдается при естественной тонической глутаматергической стимуляции, обучении или в патологических условиях переактивации глутаматергической передачи (“эксайто-токсичность”), наблюдающейся при ишемии или болезни Альцгеймера. Кроме того, в силу особенностей неконкурентного антагониста-каналоблокатора, мемантин в отличие от конкурентных антагонистов в своем действии относительно независим от субъединичного состава гетеротетрамержного NMDA рецептора, который варьирует для разных регионов мозга [Johnson et al., 2015]. С 2000 г. мемантин одобрен для терапии болезни Альцгеймера, и по настоящее время остается единственным NMDA-антагонистом, разрешенным американским (FDA) и европейским (EMA) регуляторами для лечения данного заболевания [Matsunaga et al., 2015; Kandimalla and Reddy, 2017]. С недавнего времени он также применяется для лечения депрессивных расстройств [Amidfar et al., 2018]. В экспериментах показано, что мемантин улучшает пространственное обучение в модели болезни Альцгеймера у трансгенных мышей SAMP8 и APP/PS1 [Dong et al., 2012; Liu et al., 2014], крыс с ювенильным диабетом и крыс со стрептозотоциновой моделью диабета [Sakai et al., 2014; Bahramian et al., 2016], а также PTZ-киндлингом — моделью эпилептических судорог [Jia et al., 2011]. Необходимо отметить, что позитивный эффект препарата здесь является результатом его нейропротекторных свойств [Morris et al., 2013a], а воздействие препарата на обучение, как правило, оценивается уже после прекращения его применения. В то же время данные литературы о влиянии мемантина на пространственное обучение у интактных животных ограничены и противоречивы. Так, Попик и Даниж [Popik, Danysz, 1997] показали замедление

обучения в пространственном водном тесте у животных, получавших повторные введения мемантина, а Чен и соавт. [Chen et al., 1998] сообщали об отсутствии выраженного эффекта. Более современные данные говорят о наличии влияния [Creeley et al., 2006; Duda et al., 2016].

Целью настоящей работы было выяснение действия мемантина, вводимого в концентрации, сопоставимой с клинически эффективной, на пространственное обучение крыс в стандартной и модифицированной версии водного теста, а также выявление NMDA-зависимых компонентов обучения. Для того, чтобы идентифицировать NMDA-чувствительный компонент обучения в тесте, мы разделили обучение на два этапа, предварительную тренировку, где животные проходили процедурное обучение находить и вскарабкиваться на скрытую платформу, что является правильной стратегией избавления, и стадию обучения ориентации в пространстве.

МЕТОДИКА

Исследования проводили на самцах крыс линии Вистар (48 животных массой 120–290 г. из вивария ИФ РАН). Исследование было одобрено Комиссией по биоэтике ИФ РАН. Животных содержали в виварии в стандартных условиях в клетках по 4–5 животных. В соответствии с двумя процедурами тестирования (подробнее – см. ниже) животных разделяли на 4 группы: “эксперимент без претренинга” ($n = 15$), “эксперимент с претренингом” ($n = 9$), “контроль без претренинга” ($n = 11$) и “контроль с претренингом” ($n = 13$).

Предварительное непространственное обучение (претренинг) начиналось за три дня до начала обучения в водном тесте. Целью данного этапа было обучение правильной стратегии “избавления” – с использованием платформы. Ежедневно в течение трех дней, три раза в день с интервалом в одну минуту животное погружали в прямоугольный сосуд (аквариум размерности $50 \times 25 \times 30$ см, t воды = $18 \pm 1^\circ\text{C}$), в котором размещалась заглубленная на 1 см платформа 12 см в диаметре (та же, что и в водном тесте) [Александров, Ульянова, 2001]. В связи с малым размером сосуда животное натыкалось на платформу практически сразу и вскарабкивалось на нее; через 1–2 с после вскарабкивания животное сни-

мали с платформы. Положение платформы варьировали между попытками, что вместе с предельно малым размером установки должно было исключить возможность пространственного обучения [Bannerman et al., 1995].

Далее животные проходили пространственное обучение нахождению невидимой платформы в бассейне водного теста. Использовался круглый окрашенный серым металлический бассейн, 130 см в диаметре и с высотой стенок 50 см. Экспериментальное помещение площадью 20 м^2 освещалось системой искусственного освещения (4 потолочных светильника) и содержало разные предметы обстановки, положение которых оставалось стабильным в течение всего срока исследования, что формировало достаточный набор визуальных ключей для пространственного ориентирования. Бассейн заполнялся водой до уровня 22 см так, что верхний срез платформы находился на глубине 1 см от поверхности. Дополнительно в воду добавлена нетоксичная краска – мел, t воды = $18 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Платформа оставалась в неизменном положении на протяжении всего срока обучения в центре Ю-В квадранта. Точки старта располагались в остальных трех квадрантах, порядок варьировали в псевдослучайной последовательности. Продолжительность поиска ограничивалась 120 с. Если животное за время одной попытки (120 с) не находило платформу, экспериментатор “доводил” животное до платформы, используя естественную реакцию следования за рукой, или, в случае отсутствия такой реакции, изымал животное из воды и переносил на платформу, где оставлял на 10 с, в таких случаях время поиска принималось за равное 120 с. Время пребывания на платформе животного ограничивалось 10 с, по истечении которых животное снимали с платформы и возвращали в свою домашнюю клетку, расположенную в соседнем помещении, где оно ожидало следующей попытки. В первый день давали одну попытку на поиск платформы, в последующие дни обучения – по две попытки, с интервалом 1 мин. Поскольку претренинг существенно ускорял освоение теста [Александров, Ульянова, 2001], для групп с претренингом давалось 5, а без претренинга – 9 попыток. На этапе обучения в водном тесте животным ежедневно за 45 мин до начала обучения проводили внутрибрюшинную инъекцию физиологического раствора (группы контроля)

или раствора мемантина (группы эксперимента). Мемантин (Sigma-Aldrich by Merck KGaA, Darmstadt, Germany) предварительно разводился водой для инъекций до концентрации 4 мг/мл и вводился из расчета 20 мг/кг в первый день обучения, а в последующие дни по 15 мг/кг. Используемая схема введения определялась тем, что введение мемантина в дозе 20 мг/кг создает 1.5 мМ внутримозговую экстраклеточную концентрацию, сопоставимую с клинически эффективным диапазоном (1–10 мМ) [Danysz, et al., 2000], и максимальная концентрация мемантина в мозге достигается через 30–60 мин после системного введения [Hesselink et al., 1997, Wesemann et al., 1982, 1983]. Так как период полувыведения мемантина 12 ч [Cain et al., 1996], для избегания аккумуляции препарата и поддержания его постоянной внутримозговой концентрации при последующих введениях использовалась сниженная доза. Через 7 дней проводили вторую контрольную сессию обучения в водном тесте без введения мемантина – 2 дня по 2 попытки (положение платформы и все остальные параметры – как в первой сессии).

Фиксировалось время, затраченное животным на поиск платформы, делались зарисовки траектории плавания животных, отмечались все случаи оставления животным платформы до истечения срока пребывания на ней. Из анализа траекторий поиска определялся процент особей, демонстрировавших плавание вдоль стенок бассейна (тигмотаксис) [Morris et al., 1982]. Животное, которое хотя бы один раз проплывало вдоль стенок бассейна, описав полностью замкнутый круг, считалось продемонстрировавшим тигмотаксис в данную попытку. Кроме того, для каждой попытки подсчитывался процент особей, преждевременно оставлявших платформу [Cain et al., 1996; Saucier et al., 1996]. Как проявление такого поведения расценивались все случаи, когда животное оставляло платформу, не пробыв на ней 10 с, и не стремилось вернуться.

Данные по времени поиска в водном тесте представлялись в виде средней \pm ошибка средней. Для статистической оценки значимости меж-/внутригрупповых различий по времени поиска при обучении в водном тесте использовался двух- и трехфакторный дисперсионный анализ ANOVA, где факторами были воздействия – претренинг и/или ме-

мантин, а также время (попытка обучения). Предварительный тест Колмогорова-Смирнова показал нормальный характер распределения переменной “латентность” в ежедневных попытках в каждой из групп. Трехфакторный ANOVA проводился для первых 5 попыток первой сессии обучения всех четырех групп и для четырех попыток второй сессии обучения; двухфакторный для всей первой сессии обучения групп без претренинга (по всем 9 попыткам обучения). Для апостериорного анализа выявленных различий использовали тест Тьюки и t-тест для связанных переменных. Для сравнения ранговых величин – тигмотаксиса и оставлений платформы – использовали тест Краскел-Уоллиса. Во всех случаях использовался пакет программ STATISTICA 7.0. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Статистический анализ данных по времени поиска платформы в первые пять попыток первой сессии обучения в тесте показал, что обучение происходило во всех группах ($F(4, 176) = 32.44, p < 0.0001$), однако на него оказывало влияние предварительное обучение ($F(1, 44) = 9.47, p < 0.005$) и введение мемантина ($F(1, 44) = 47.72, p < 0.0001$), а эффекты попытки и мемантина взаимодействовали ($F(4, 176) = 2.50, p < 0.05$). Анализ данных по второй сессии обучения выявил значимый эффект мемантина ($F(1, 44) = 12.04, p < 0.002$; ANOVA) при отсутствии других значимых факторов и взаимодействий (рис. 1).

Животные контрольных групп (рис. 1) освоили задачу теста в течение первых трех попыток – для обеих групп третья попытка значимо отличается от первой и второй и не отличается от четвертой и пятой ($p < 0.005$ и $p > 0.05$, соответственно; ANOVA). Вместе с тем процедура претренинга облегчила освоение водного теста – крысам группы без претренинга потребовалось несколько дополнительных попыток для достижения устойчивого результата, который у крыс с претренингом был достигнут за первые пять попыток.

Сравнение между двумя сессиями обучения показало, что у контрольных групп в первую попытку сессии 2 время поиска было значимо выше, чем в последнюю попытку (5 или 9) первой сессии, но не отличалось от времени в первую попытку последнего дня

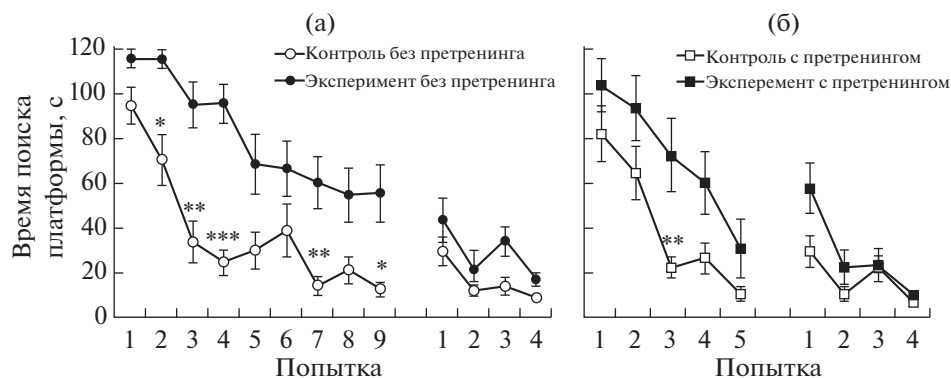


Рис. 1. Латентность поиска скрытой платформы в водном тесте Морриса для двух сессий обучения у крыс групп: а) “контроль без претренинга” ($n = 11$) и “эксперимент без претренинга” ($n = 11$); б) “контроль с претренингом” ($n = 13$) и “эксперимент с претренингом” ($n = 9$). Мемантин или вещество контроля вводились в первую сессию. Между сессиями временной промежуток 7 дней. Значимость отличий времени поиска в попытке между группами:

* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

По оси абсцисс – порядковый № попытки в каждой из двух экспериментальных сессий; по оси ординат – среднее время поиска платформы, в секундах (указана ошибка среднего). Обозначения групп без претренинга – кружки, с претренингом – квадратики; контроли – незачерненные, экспериментальные группы – зачерненные.

Fig. 1. Mean latency to find the hidden platform during two sessions of acquisition of the Morris water task in rat groups: а) “control without pretraining” (open circles; $n = 11$) and “experiment without pretraining” (filled circles; $n = 11$); б) “control with pretraining” (open blocks; $n = 13$) and “experiment with pretraining” (filled blocks; $n = 9$). Memantin or vehicle were injected during first session. Between session interval was 7 days. Statistical significance of differences between groups:

* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

The x-axis scale is trial number in each of two sessions; Data points represent mean latencies during each trial in seconds, and error bars represent SEM. Groups without pretraining are marked with circles, groups with pretraining are marked with blocks; control groups with open marks, experimental – filled marks.

обучения (4 или 8) и было значимо меньше, чем в начале обучения (попытки 1 и 2 первой сессии; при $p < 0.001 \sim 0.05$; t -тест). По ходу обучения во второй сессии группы не различались (рис. 1). Таким образом, после недельного перерыва контрольные группы продемонстрировали сохранение выработанной реакции и минимальное забывание.

В первую сессию обучения крысы группы “эксперимент без претренинга” тратили значимо больше времени на поиск платформы по сравнению с соответствующим контролем ($p < 0.0001$, тест Тьюки; рис. 1а). При этом снижение времени поиска наблюдалось только к пятой попытке (попытка 5 отличается от попыток 1 и 2 при $p < 0.01$, тест Тьюки) и дальнейшего снижения не происходило (попытки 6–9 не различаются между собой, и от попытки 5 при $p > 0.5$, тест Тьюки и t -тест, соответственно). После отмены препарата, во вторую сессию, крысы экспериментальной группы по сравнению с контролем также тратили значимо больше времени на поиск платформы ($p < 0.05$, тест Тьюки), но демон-

стрировали обучение (попытка 1 отличается от 4 при $p < 0.05$, тест Тьюки; рис. 1а). Таким образом, введение мемантина существенно нарушало ход обучения в стандартном водном тесте и блокировало его освоение.

По сравнению с соответствующим контролем, крысы группы “эксперимент с претренингом”, тратили значимо больше времени на поиск платформы в первую, но не во вторую сессию обучения ($p < 0.005$ и $p > 0.14$, соответственно, тест Тьюки; рис. 1б). При условии, что на пятую попытку между показателями групп нет значимой разницы, а для “контроля с претренингом” время поиска максимально сократилось, можно предположить, что к пятой попытке обучение экспериментальной группы также практически завершилось. Таким образом, животные группы “эксперимент с претренингом” демонстрировали устойчивое к мемантину обучение в водном тесте.

Сравнение экспериментальных групп между собой также хорошо показывает раз-

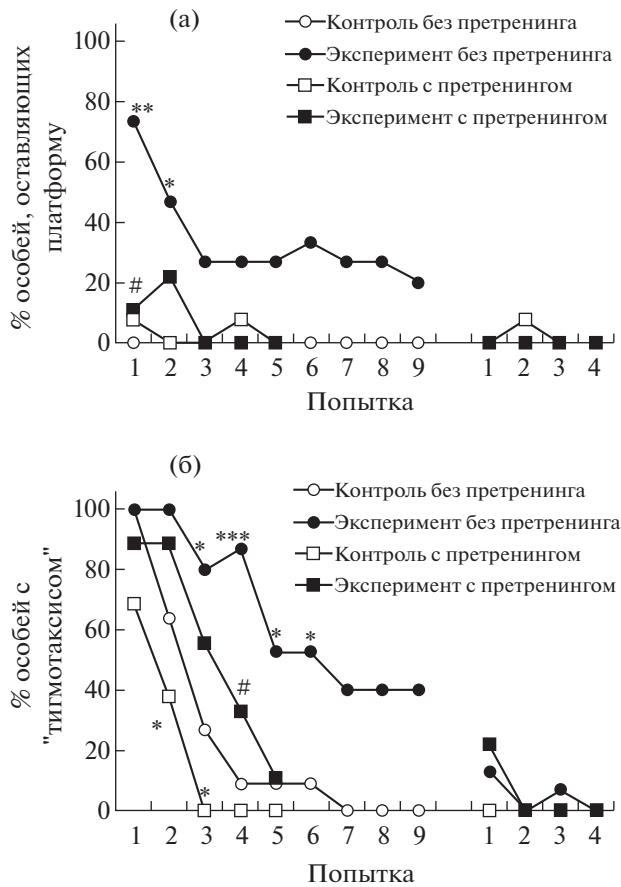


Рис. 2. Относительная частота оставления платформы (а) и тигмотаксиса (б) у крыс каждой из четырех групп для двух сессий обучения. Значимость отличий времени поиска в попытке между каждой экспериментальной группой и ее соответствующим контролем:

* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$; между двумя экспериментальными группами: # – $p < 0.05$.

По оси абсцисс – порядковый № попытки в каждой из двух экспериментальных сессий; по оси ординат – процент животных, демонстрирующих оставления платформы (а) и тигмотаксис (б).

Fig. 2. Relative occurrence of leavings of a platform (a) and thigmotaxis (б) in four tested groups of rats during two sessions of the Morris water task acquisition. Statistical significances of differences between each experiment and appropriate control group:

* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$; between two experimental groups (with or without pretraining): # – $p < 0.05$.

Trial number in each of two sessions is on the x-axis. Data points represent relative number of animals with leavings of a platform (a) and thigmotaxis (б) in percent.

ную степень влияния мемантина на освоение водного теста в зависимости от наличия претренинга (рис. 1). В первую сессию обучения

группа “эксперимент без претренинга” тратила значительно больше времени на поиск платформы по сравнению с крысами группы “эксперимент с претренингом” ($p < 0.015$, тест Тьюки). Во вторую сессию после исключения препарата экспериментальные группы не различались ($p > 0.99$, тест Тьюки). При этом с первой попытки они демонстрировали уровень освоения теста, соответствующий последнему дню обучения первой сессии. Таким образом, после недельного перерыва у данных групп, как и у контрольных, наблюдалось сохранение памяти о выработанной реакции и минимальное забывание.

Во всех группах при обучении с ростом числа тренировочных попыток наблюдается снижение числа особей, демонстрирующих оставления платформы и тигмотаксис (рис. 2а, 2б); при этом наблюдаемые межгрупповые отличия в целом соответствуют приведенным выше результатам анализа времени поиска.

Оставления платформы (рис. 2а) наблюдались в основном в группе “эксперимент без претренинга”, где они встречались у наибольшего числа особей, и которая в первый и второй дни обучения значительно отличалась от своего контроля и группы “эксперимент с претренингом”. После начального снижения встречаемости оставлений платформы к третьей попытке дальнейшего снижения не происходило – к концу обучения более 20% особей данной группы продолжало оставлять платформу.

Мемантин значительно увеличил частоту проявления тигмотаксиса (рис. 2б) – обе экспериментальные группы значительно отличались от контролей, при этом претренинг существенно снизил процент особей с данным поведением. Так, в группе контроля, прошедшего претренинг, уже начиная со второй попытки второго дня (попытка № 3; рис. 2б), нет животных, демонстрирующих тигмотаксис; у крыс группы “контроль без претренинга” данное поведение угасает медленнее, и только с седьмой попытки не наблюдается ни у одного животного. В экспериментальных группах тигмотаксис угасал значительно медленнее. В группе “эксперимент без претренинга” даже на пятый день обучения 40% особей демонстрировали тигмотаксис – с четвертого дня не происходило никакого снижения, в то же время у животных группы с претренингом к пятой попытке тигмотаксис наблюдался у единичных животных. По-

сле недельного перерыва при повторном обучении без введения мемантина в самую первую попытку у части животных экспериментальных групп наблюдался тигмотаксис; в последующие попытки животные всех групп практически не проявляли тигмотаксиса и не оставляли платформу.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами было показано, что введение мемантина оказывает существенное влияние на обучение крыс в пространственной версии водного теста Морриса по стандартной схеме, т.е. без предварительного обучения. В то время как группа контроля завершила обучение к третьей попытке на второй день обучения, у крыс группы с введением мемантина некоторое снижение времени поиска наблюдалось лишь к пятой попытке (третий день обучения), причем дальнейшего снижения уже не происходило (рис. 1а). Полученные нами данные по влиянию мемантина на обучение в тесте без предварительного процедурного обучения отличаются от известных результатов опытов Попика и Данижа [Popik, Danysz, 1997] и Чена и соавт. [Chen et al., 1998]. В эксперименте первых мемантин в дозе 7.5 мг/кг замедлял, но не полностью блокировал освоение стандартной версии теста — к концу третьего дня обучения экспериментальная группа уже не отличалась от контрольной. Вторая группа авторов использовала предложенную ранее [Whishaw, Auer, 1989, цит. по Chen et al., 1998] модификацию теста, где положение платформы ежедневно меняли, что по представлению авторов, повышало его чувствительность. Мемантин, который начинали вводить в/б в дозе 20 мг/кг за 48 ч до начала обучения в тесте, а затем в дозе всего 1 мг/кг каждые 12 ч, не влиял на освоение теста. Однако из цитируемых авторами данных о 12-часовом периоде полувыведения препарата следует факт, что обучение в тесте происходило на фоне введения препарата в дозе до 10 раз ниже первоначальной, заявленной как “клинически эффективная”. Можно предположить, что дозы препарата, использованные авторами, были недостаточны для блокирования обучения в тесте. Данные недавних экспериментальных работ клинической направленности показывают разнообразие эффектов препарата в зависимости от дозы. Так, в случае, когда оценка обучения в

водном тесте проводилась вскоре после завершения мемантиновой терапии, последняя инъекция в дозе 10 мг/кг за 24 ч до начала обучения оказывала выраженный негативный эффект на скорость обучения крыс в первые два дня освоения теста и на долговременную память, выявляемую в пробную попытку [Jia et al., 2011]. В то же время обучение APP^{sw}/PS1 трансгенных мышей (модель болезни Альцгеймера) на фоне введения мемантина 3 раза в неделю в дозе 10 мг/кг не выявило значимых эффектов препарата [Filali et al., 2011]. В другом опыте APP/PS1 трансгенные мыши на фоне ежедневного интрагастрального введения 5 мг/кг мемантина значительно ускоряли освоение водного теста, приближаясь к интактному контролю [Liu et al., 2014]. Такое положительное влияние мемантина на обучение можно объяснить особенностями модели патологии, которая создает излишнюю активацию NMDA системы, устранению чего и способствует препарат [Parsons et al., 2013; Amidfar et al., 2018].

Применение предварительного непространственного претренинга радикально снизило негативный эффект введения мемантина, сняв блокирующее действие на обучение в водном тесте. Полученные нами данные о влиянии процедуры претренинга на эффект мемантина при обучении в тесте Морриса в целом хорошо согласуются с данными, полученными ранее для конкурентных NMDA-антагонистов — NPC17742 и AP5 [Bannerman et al., 1995; Cain et al., 1996; Saucier et al., 1996; Inglis et al., 2013], а также мемантина [Duda et al., 2016]. В этих работах было показано, что животные, уже имевшие опыт решения задачи пространственного ориентирования в водном тесте, либо уже обучавшиеся в другой комнате в условиях другого пространственного окружения, либо решавшие навигационную задачу в условиях отсутствия внешних ключевых стимулов, становятся устойчивыми к воздействию антагонистов и демонстрируют способность к обучению. Вместе с тем вопрос того, какой тип предварительного обучения, — пространственный, полностью знакомящий с задачей теста, или чисто процедурный, — является достаточным для устранения эффектов NMDA-антагонистов, остается дискуссионным. Баннерман и соавт. [Bannerman et al., 2006] отстаивает необходимость полного ознакомления с задачей, но в то же время отмечает, что возможен и эффект

перетренировки, поскольку в тех исследованиях, где продолжительность непространственного претренинга была меньше, чем в его эксперименте (22 попытки за 10 дней) — 3 попытки за 4 дня [Saucier, Cain, 1995] или 12 попыток за 1 день [Hoh et al., 1999], эффект был. Поскольку NMDA-антагонисты нарушают усвоение контекста опыта при условно-рефлекторном обучении, автор предполагает, что предварительная тренировка способствует усвоению правильного пространственного и временного контекста событий [Bannerman et al., 2006]. В недавней работе [Duda et al., 2016] исследовались эффекты мемантина (5 и 20 мг/кг, в/б) на пространственное обучение в версии водного теста на рабочую память после предварительного процедурного обучения (8 попыток с интервалом 30 мин, положение платформы меняется от попытки к попытке). Авторы рассматривают предварительную тренировку как этап формирования необходимого долговременного компонента рабочей памяти для ориентирования в пространстве («чтения карты» в авторской терминологии). При последующем трехдневном тестировании на фоне действия мемантина с двумя ежедневными попытками (обучающая и выявляющая через 5 или 15 мин; положение платформы меняется ежедневно), высокая доза мемантина нарушала рабочую (кратковременную) память, существенно замедляя, но не блокируя обучение. Таким образом, как и в наших опытах, использование относительно высокой дозы препарата позволило выявить негативный эффект мемантина на пространственное обучение в тесте даже после предварительного процедурного обучения. Результаты, полученные этими авторами, согласуются с данными исследований мышей с мутацией генов субъединиц NMDA-рецепторов, которые указывают на необходимость NMDA-рецепторов для пространственной рабочей памяти, но не референтной [Bannerman et al., 2006, 2008]. Предполагается, что NMDA-рецепторы могут оказывать специфическое влияние на пространственное обучение за счет участия в иных формах обучения, нежели пространственном, в частности, усвоении контекста при ассоциативном обучении и поведенческом ингибировании конфликтных стратегий [Bannerman et al., 2012; Taylor et al., 2013]. В то же время надо отметить, что использованная [Duda et al., 2016] парадигма

процедурного обучения все-таки предоставляла животным информацию о местах будущего расположения платформы и потому не может считаться непространственной.

Важным наблюдением в ходе обучения в водном тесте были феномен несвоевременного оставления платформы и неспособность животных к отказу от неэффективной стратегии поиска на периферии бассейна (тигмотаксис), проявившиеся у животных, получивших инъекции препарата, в особенности у групп без претренинга (рис. 2). Из литературы известно, что повышенная частота оставления платформы отмечается у животных, которым хронически вводились конкурентные NMDA-антагонисты AP5, NPS17742, CGP 37849 и CGP 39551 [Morris, 1989; Ylinen et al., 1995; Cain et al., 1996; Saucier et al., 1996], а также неконкурентный антагонист МК801 [Ylinen et al., 1995]. Детальный анализ эффектов AP5 и NPS17742 на обучение крыс в тесте показал, что животные часто несвоевременно оставляют или игнорируют платформу, а частота проявления и продолжительность плавания вдоль стенок бассейна (тигмотаксис) увеличены. Такое поведение отсутствует у крыс, имевших опыт решения задачи на поиск платформы, приобретенный в ходе предварительной тренировки [Cain et al., 1996; Saucier et al., 1996]. Эффект NMDA-антагонистов на оставление платформы обычно связывают с нарушениями сенсомоторной координации: животное, находясь на платформе, при выполнении «отряхивания по типу мокрой собаки», не может удержаться на ней и падает обратно в воду [Morris, 1989, Cain et al., 1996, Saucier et al., 1996]. Падения при отряхивании наблюдаются и у интактных животных, однако, значительно реже, и, самое главное, практически всегда животное сразу же вскарабкивается обратно на платформу. Действительно, довольно давно было установлено, что высокие дозы NMDA-антагонистов (в особенности неконкурентного МК-801) способны вызывать значительные сенсомоторные нарушения, что даже рассматривалось как основной механизм их воздействия на обучение в тесте [Keith, Rudy, 1990; Cain et al., 1996, Saucier et al., 1996], однако последующие исследования все-таки отмечают эту возможность [Morris, 2013a]. Прежде всего, тот факт, что предварительная тренировка (неважно, пространственная или нет) в большинстве исследований существен-

но снижала влияние антагонистов, показывает, что сенсомоторные нарушения не могут быть основным механизмом влияния антагонистов на обучение в тесте. Недавний повтор ранних опытов Баннермана и соавт. [Bannerman et al., 1995] не только подтвердил полученные ранее данные, но дополнительно выявил дозозависимое снижение “сохраняющего” (rescue) эффекта предварительного обучения для AP5 при увеличении дозы с 10 до 20 и 30 мМ, при которых эффект уже не проявлялся, но проявлялись сенсомоторные нарушения [Inglis et al., 2013]. Имеются ограниченные данные [Creeley et al., 2006], показывающие, что хотя мемантин в дозе 10–20 мг/кг вызывает сенсомоторные нарушения, выявляемые в батарее неврологических тестов, это не затрагивает саму способность отыскивать пищу в пространственном тесте с дырками (hole-board test), но нарушает обучение задаче теста.

В отличие от вышеупомянутых авторов, в нашей работе впервые удалось четко показать, что предохраняющий эффект процедурного обучения заключается не в предварительной тренировке навыков пространственной ориентации, а в обучении правильной стратегии “избегания”, когда животное получает навык избегания неприятной ситуации путем вскарабкивания на платформу. Таким образом, введение предварительной процедуры обучения использованию платформы действительно позволило разделить задачу обучения в водном тесте на отдельные составляющие. На этапе предварительного тренинга животные отказывались от попыток выбраться на стенки бассейна (тигмотаксис) — неэффективной стратегии поведения при пространственном обучении в водном тесте. Животные усваивали правильную стратегию избавления и взбирались на платформу, оставаясь на ней до момента снятия. Об этом свидетельствует то, что проявления тигмотаксиса и число случаев оставления платформы резко уменьшаются у всех групп, прошедших претренинг, как контрольных, так и экспериментальных (рис. 2). В результате при последующем обучении в водном тесте животные решали только “навигационную” задачу пространственного ориентирования при плавании и запоминании места платформы. Можно предположить, что именно таким образом претренинг защищал от блокирующего действия мемантина на обучение в водном тесте.

Если такой навык не был сформирован, то под влиянием мемантина наблюдаются значительные трудности смены стратегии поведения, животные упорно продолжают демонстрировать тигмотаксис, и даже наткнувшись и вскарабкавшись на платформу, покидают ее и продолжают попытки выбраться другими путями. По нашим наблюдениям, для животных экспериментальных групп, и особенно группы “эксперимент без претренинга”, часть оставлений не может быть объяснена случайным падением, а осуществлялась намеренно. Так, животные группы “эксперимент без претренинга” могли неоднократно оставлять платформу, при этом не делая попыток вернуться назад. Даже на пятый день обучения 20% животных этой группы так или иначе оставляли платформу. При этом и тигмотаксис, почти угасший у всех других групп к концу третьего дня обучения, в этой группе даже к концу первой сессии обучения наблюдался примерно у 40% особей. Можно предположить, что у животных этой группы нахождение на платформе достаточно слабо ассоциировалось с последующим избавлением и разрешением ситуации. Действительно, недавнее исследование, в котором особое внимание было уделено анализу предполагаемого вклада сенсомоторных нарушений в эффект антагониста AP-5 [Morris et al., 2013b], показало, что непространственные стратегии поиска платформы, в том числе тигмотаксис, развиваются как ответ на вызванное антагонистом нарушение обучения, а не наоборот, как высказывалось ранее [Keith, Rudy, 1990; Saucier et al., 1996].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные свидетельствуют, что мемантин при введении в дозе, сопоставимой с клинически эффективной, полностью блокирует обучение в стандартном водном тесте Морриса, но ограниченно действует на обучение животных, проходивших предварительное процедурное обучение. Тот факт, что введение стадии предварительного непространственного обучения — претренинга — снимало блокирующий эффект мемантина на обучение в тесте, предполагает, что мемантин не препятствует ни ориентации в пространстве при плавании, ни запоминанию места нахождения платформы, т.е. не влияет собственно на пространственное обуче-

ние. Результаты нашего исследования свидетельствуют в пользу относительной независимости пространственного обучения в водном тесте Морриса от системы гиппокампальных NMDA-рецепторов и предполагают, что NMDA-антагонисты негативно влияют на выработку новых поведенческих навыков и/или на отказ от неэффективной стратегии поведения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2014–2020 гг. (ГП-14, раздел 64).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александров А.А., Ульянова Е.Е.* Латентное обучение в тесте Морриса и пространственная ориентация. В сб. ст.: Мозг, психика, поведение. Под ред. Батуева А.С. Нервная система. Вып. 35. СПб.: Изд-во С.-Петербур. Ун-та, 2001. 216 с.
- Amidfar M., Reus G.Z., Quevedo J., Kim Y.-K.* The role of memantine in the treatment of major depressive disorder: Clinical efficacy and mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* 2018. 827: 103–111.
- Bahramian A., Rastegar K., Namavar M.R., Moosavi M.* Insulin potentiates the therapeutic effect of memantine against central STZ-induced spatial learning and memory deficit. *Behav. Brain Res.* 2016. 311: 247–254.
- Bannerman D.M., Good M.A., Butcher S.P., Ramsay M., Morris R.G.M.* Distinct components of spatial learning revealed by prior testing and NMDA receptor blockade. *Nature.* 1995. 378: 182–186.
- Bannerman D.M., Rawlins J.N.P., Good M.A.* The drugs don't work – or do they? Pharmacological and transgenic studies of the contribution of NMDA and GluR-A-containing AMPA receptors to hippocampal-dependent memory. *Psychopharmacology.* 2006. 188: 552–566.
- Bannerman D.M., Niewoehner B., Lyon L., Romberg C., Schmitt W.B., Taylor A., Sanderson D.J., Cottam J., Sprengel R., Seeburg P.H., Köhr G., Rawlins J.N.* NMDA receptor subunit NR2A is required for rapidly acquired spatial working memory but not incremental spatial reference memory. *J Neurosci.* 2008. 28 (14): 3623–3630.
- Bannerman D.M., Bus T., Taylor A., Sanderson D.J., Schwarz I., Jensen V., Hvalby Ø., Rawlins J.N., Seeburg P.H., Sprengel R.* Dissecting spatial knowledge from spatial choice by hippocampal NMDA receptor deletion. *Nature Neurosci.* 2012. 15 (8): 1153–1159.
- Cain D.P., Saucier D., Hall J., Hargreaves E.L., Boon F.* Detailed behavioural analysis of water maze acquisition under APV or CNQX: contribution of sensorimotor disturbances to drug-induced acquisition deficits. *Beh. Neurosci.* 1996. 110 (1): 86–102.
- Chen H.-S.V., Wang Y.F., Rayudu P.V., Edgecomb P., Neill J.C., Segal M.M., Lipton S.A., Jensen F.E.* Neuroprotective concentrations of the N-methyl-D-aspartate open-channel blocker memantine are effective without cytoplasmic vacuolation following post-ischemic administration and do not block maze learning or long-term potentiation. *Neurosci.* 1998. 86: 1121–1132.
- Creeley C., Wozniak D.F., Labruyere J., Taylor G.T., Olney J.W.* Low doses of memantine disrupt memory in adult rats. *J. Neurosci.* 2006. 26 (15): 3923–3932.
- Danysz W., Parsons C.G., Quack G.* NMDA channel blockers: memantine and amino-aklylcyclohexanes – In vivo characterization. *Amino Acids.* 2000. 19: 167–172.
- Davis S., Butcher S.P., Morris R.G.M.* The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP-5) impairs spatial learning and LTP *in vivo* at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP *in vitro*. *J. Neurosci.* 1992. 12 (1): 21–34.
- Dong J., Zhou M., Wu X., Du M., Wang X.* Memantine combined with environmental enrichment improves spatial memory and alleviates Alzheimer's disease-like pathology in senescence-accelerated prone-8 (SAMP8) mice. *J. Biomed. Res.* 2012. 26 (6): 439–447.
- Duda W., Wesierska M., Ostaszewski P., Vales K., Nekovarova T., Stuchlik A.* MK-801 and memantine act differently on short-term memory tested with different time-intervals in the Morris water maze test. *Behav. Brain Res.* 2016. 311: 15–23.
- Eichenbaum H., Stewart C., Morris R.G.M.* Hippocampal representation in place learning. 1990. *J. Neurosci.* 10 (11): 3531–3542.
- Filali M., Lalonde R., Rivest S.* Subchronic memantine administration on spatial learning, exploratory activity, and nest-building in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* 2011. 60: 930–936.
- Hesselink M.B., De Boer B.G., Breimer D.D., Danysz W.* Brain Penetration and *in vivo* recovery of NMDA receptor antagonists amantadine and memantine: a quantitative microdialysis study. *Pharmaceut. Res.* 1999. 16 (5): 637–642.
- Hoh T., Beiko J., Boon F., Weiss S., Cain D.P.* Complex behavioural strategy and reversal learning in the watermaze without NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *J. Neurosci.* 1999. 19 (RC2): 1–5.
- Hunsaker M.R., Kesner R.P.* Unfolding the cognitive map: The role of hippocampal and extrahippocampal substrates based on a systems analysis of

- spatial processing. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2018. 147: 90–119.
- Inglis J., Martin S.J., Morris R.G.M.* Upstairs/downstairs revisited: spatial pretraining-induced rescue of normal spatial learning during selective blockade of hippocampal N-methyl-D-aspartate receptors. *Eur. J. Neurosci.* 2013. 37 (5): 718–727.
- Jia L.J., Wang W.P., Li Z.P., Zhen J.L., An L.W., Duan R.S.* Memantine attenuates the impairment of spatial learning and memory of pentylenetetrazol-kindled rats. *Neurol Sci.* 2011. 32 (4): 609–613.
- Johnson J.W., Glasgow N.G., Povysheva N.V.* Recent insights into the mode of action of memantine and ketamine. *Curr Opin Pharmacol.* 2015. 20: 54–63.
- Kandimalla R., Reddy P.H.* Therapeutics of neurotransmitters in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2017. 57 (4): 1049–1069.
- Keith J.R., Rudy J.W.* Why NMDA-receptor-dependent long-term potentiation may not be a mechanism of learning and memory: Reappraisal of the NMDA-receptor blockade strategy. *Psychobiology.* 1990. 18 (3): 251–257.
- Liu M.Y., Wang S., Yao W.F., Zhang Z.J., Zhong X., Sha L., He M., Zheng Z.H., Wei M.J.* Memantine improves spatial learning and memory impairments by regulating NGF signaling in APP/PS1 transgenic mice. *Neuroscience.* 2014. 25 (273): 141–151.
- Matsunaga S., Kishi T., Iwata N.* Memantine monotherapy for alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2015. 10 (4): e0123289.
- Morris R.G.M.* Synaptic plasticity and learning: Selective impairment of learning in rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP-5. *J. Neurosci.* 1989. 9 (9): 3040–3057.
- Morris R.G.M., Anderson E., Lynch G.S., Baudry M.* Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP-5. *Nature.* 1986. 319: 774–776.
- Morris R.G.M., Garrud P., Rawlins J.N.P., O'Keefe J.* Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.* 1982. 297: 681–683.
- Morris R.G.M.* NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacol.* 2013a. 74: 32–40.
- Morris R.G.M., Steele R.J., Bell J.E., Martin S.J.* N-methyl-D-aspartate receptors, learning and memory: chronic intraventricular infusion of the NMDA receptor antagonist D-AP5 interacts directly with the neural mechanisms of spatial learning. *Eur. J. Neurosci.* 2013b. 37: 700–717.
- Nicoll R.A.* A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron.* 2017. 93 (2): 281–290.
- Parsons C.G., Stöffler A., Danysz W.* Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system—too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology.* 2007. 53 (6): 699–723.
- Parsons C.G., Danysz W., Dekundy A., Pulte I.* Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of alzheimer's disease. *Neurotox. Res.* 2013. 24: 358–369.
- Popik P., Danysz W.* Inhibition of reinforcing effects of morphine and motivational aspects of naloxone—precipitated opioid withdrawal by N-Methyl-D-aspartate receptor antagonist, memantine. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1997. 280 (2): 854–865.
- Sacai H., Sasaki-Hamada S., Sugiyama A., Saitoh A., Mori K., Yamada M., Oka J.* The impairment in spatial learning and hippocampal LTD induced through the PKA pathway in juvenile-onset diabetes rats are rescued by modulating NMDA receptor function. *Neurosci. Res.* 2014. 81–82: 55–63.
- Sah S.K., Lee C., Jang J.-H., Park G.H.* Effect of high-fat diet on cognitive impairment in triple-transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. 493: 731–736.
- Saucier D., Cain D.P.* Spatial learning without NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Nature.* 1995. 378: 186–189.
- Saucier D., Hargreaves E.L., Boon F., Vanderwolf C.H., Cain D.P.* Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under systemic NMDA or muscarinic antagonism: nonspatial pretraining eliminates spatial learning deficits. *Beh. Neurosci.* 1996. 110 (1): 103–116.
- Taylor A.M., Bus T., Sprengel R., Seeburg P.H., Rawlins J.N., Bannerman D.M.* Hippocampal NMDA receptors are important for behavioural inhibition but not for encoding associative spatial memories. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2013. 369 (1633): 20130149.
- Vorhees C.V., Williams M.T.* Value of water mazes for assessing spatial and egocentric learning and memory in rodent basic research and regulatory studies. *Neurotox. Teratol.* 2015. 52a.: 93–108.
- Wesemann W., Schollmeyer J.D., Sturm G.* Distribution of memantine in brain, liver, and blood of the rat. *Arzneimittelforschung.* 1982. 32 (10): 1243–1245.
- Wesemann W., Sontag K.-H., Maj J.* Zur pharmakodynamik und pharmakokinetik des memantine. *Arzneimittelforschung.* 1983. 33 (8): 1122–1134.
- Ylinen A., Pitkanen M., Sirvio, J., Hartikainen T., Sivenius J., Koivisto E., Reikkinen P.J. Sr.* The effects of NMDA receptor antagonists at anticonvulsive doses on the performance of rats in the water maze task. *Eur. J. Pharm.* 1995. 274: 159–165.

CHARACTERISTICS OF MEMANTINE INFLUENCES ON LEARNING IN THE MORRIS WATER MAZE

V. O. Murovets^{a,#} and A. A. Aleksandrov^b

^a Pavlov Institute of Physiology of the Russian academy of sciences, Saint-Petersburg, Russia

^b Department of the higher nervous activity, biological faculty, Saint-Petersburg state University, Saint-Petersburg, Russia

[#] e-mail: murovetsvo@infran.ru

Effects of memantine on the spatial learning of rats were investigated using standard Morris water maze to elucidate elements of learning depending on the NMDA receptor system. Intraperitoneally applied memantine (20 mg/kg) totally abolished task acquisition. In addition, a suppression of non-effective non-spatial search strategies was impaired, that could be concluded from increases of thigmotaxis and leavings of a platform. However, a drug-free non-spatial pretraining during which the animals acquired procedural elements of the task ameliorated the memantine-induced spatial learning impairment. In memantine group with pretraining, occurrences of thigmotaxis and leavings of a platform were reduced. The obtained data suggest that the spatial learning in the Morris water maze is relatively independent of hippocampal NMDA receptors and NMDA receptor antagonists have negative effects on the acquisition of new behavioral skills and/or the suppression of ineffective strategy of behavior.

Keywords: Morris water maze task, memantine, NMDA receptor, spatial learning and memory, cognitive disturbances