

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

УДК 612.821.6

**ВКЛАД ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ В ФОРМИРОВАНИЕ,
ПОДДЕРЖАНИЕ И РЕКОНСОЛИДАЦИЮ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ
ПИЩЕВОЙ АВЕРСИВНОЙ ПАМЯТИ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ**

© 2023 г. А. Б. Зюзина¹, *, П. М. Балабан¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

*e-mail: lucky-a89@mail.ru

Поступила в редакцию 25.05.2023 г.

После доработки 26.06.2023 г.

Принята к публикации 03.07.2023 г.

Настоящая работа направлена на анализ роли эпигенетических механизмов (ацетилирование гистонов, метилирование ДНК, серотонилирование гистонов) в формировании, хранении и реконсолидации долговременной пищевой аверсивной памяти виноградной улитки. В первой части работы мы исследовали влияние системного введения ингибитора гистондеацетилаз бутирата натрия в модели условно-рефлекторной пищевой аверсии виноградной улитки. Мы показали, что введение бутирата натрия животным со слабой памятью приводило к усилению памяти. Далее в экспериментах с применением блокатора ДНК метилтрансфераз RG108 было обнаружено, что нарушение метилирования ДНК ухудшает долговременную пищевую аверсивную память у виноградной улитки. Однако, реактивация памяти нивелирует эффект ингибирования активности ДНК метилтрансфераз. В заключительном разделе работы была проведена проверка гипотезы о вовлечении транслугтаминаза-опосредованного серотонилирования в процессы реконсолидации пищевой аверсивной памяти виноградной улитки. Поведенческий анализ показал, что введение блокатора транслугтаминазы монодансилкадаверина (следовательно, блокада серотонилирования) после напоминания нарушало процесс реконсолидации и приводило к подавлению/стиранию памяти.

Ключевые слова: ацетилирование гистонов, метилирование ДНК, серотонилирование гистонов, транслугтаминаза, долговременная память, моллюски

DOI: 10.31857/S0044467723050118, EDN: EUAPVX

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что формирование долговременных пластических перестроек и долговременной памяти обеспечивается изменением экспрессии генов (Анохин, 1997; Abel, Latal., 2001; Guzowski et al., 2001), что неотделимо от изменения синаптических связей между нейронами (McGaugh, 2000; Moorman et al., 2011). В последние годы накопились свидетельства, что эпигенетические механизмы, помимо участия в регуляции экспрессии генов, играют важную роль в регуляции долговременной синаптической пластичности и памяти (Levenson, Sweatt, 2006; Jiang et al., 2008; Federman et al., 2009; Sultan and Day, 2011).

Особое внимание привлекают процессы ацетилирования/деацетилирования ядерных

белков гистонов (Maity et al., 2021; Rossin et al., 2023). Ферменты, обеспечивающие динамический баланс между ацетилированием (гистонацетилтрансферазы) и деацетилированием (гистондеацетилазы, ГДАЦ) получили наибольшее внимание из-за их роли в обучении и памяти (Graff et al., 2014; Mahgoub, Monteggia, 2014). Неоднократно было продемонстрировано, что связывание ацетильной группы с N-концевыми аминокислотными остатками гистонов (лизиновыми остатками) означает увеличение активности транскрипции генов, активирующихся при обучении (Тиунова и др., 2012; Торопова и др., 2014; Penney, Tsai, 2014; Xu et al., 2014), и таким образом усиление обучения (Zovkic et al., 2013; Stilling et al., 2014; Xu et al., 2014; Hao et al.,

2019). И наоборот, снижение количества ацетильных групп снижает транскрипцию генов, связанных с памятью, и ухудшает долговременную память (Mews et al., 2017). Широкое изучение в рамках влияния ацетилирования гистонов на память и обучение получили ингибиторы ГДАЦ (бутират натрия (БН), вальпроевая кислота, трихостатин А и др.). Ингибиторы ГДАЦ блокируют активность ГДАЦ и, таким образом, усиливают ацетилирование гистонов (Kelly, Marks, 2005; Marks, Dokmanovic, 2005), что может улучшать долговременную память (Guan et al., 2002; Vecsey et al., 2007) и даже восстанавливать дефицит памяти (Hu et al., 2018; Zuzina et al., 2020, 2021; Vinarskaya et al., 2021; Zuzina, Vinarskaya, 2022).

Другим важным способом эпигенетической регуляции, связанной с синаптической пластичностью, обучением и памятью, является метилирование ДНК — ферментативное добавление метильных групп к цитозиновым основаниям ДНК с помощью фермента ДНК метилтрансферазы (ДНМТ). Так же как и ацетилирование гистонов, метилирование ДНК определяет структуру хроматина и регулирует экспрессию генов, считаясь при этом как репрессивной модификацией, индуцируя снижение транскрипционной активности генов (Drewell et al., 2002; Fuks et al., 2003), так и активирующей модификацией, увеличивающей транскрипцию (Chahrour et al., 2008; Cohen et al., 2008). Изменения в метилировании ДНК, также как и ацетилировании гистонов, лежат в основе формирования и сохранения памяти не только у позвоночных (Oliveira, 2016; Campbell, Wood, 2019), но и у моллюсков. Следует, однако, отметить, что, в отличие от исследований на позвоночных, роль метилирования ДНК у моллюсков изучалась лишь в немногих исследованиях. Это было продемонстрировано на таких примерах, как долговременная фасилитация (Rajaseethupathy et al., 2012), обучение (Yang et al., 2018) и долговременная память у аплии (Pearce et al., 2017) и оперантно обусловленное респираторное поведение у *Lymnaea* (Lukowiak et al., 2014; Sunada et al., 2016; Rothwell, Lukowiak, 2017).

В последнее время в литературе накапливается все больше данных о важной роли другого вида эпигенетической модификации гистонов — серотонилировании (Muta, Mi, 2015). Неоднократно было показано, что серотонин посредством ковалентного присоединения с помощью фермента транслута-

миназы (ТГ) формирует комплексы со своими белками-мишенями (Muta, Mi, 2015; Ivashkin et al., 2019). Недавно как мишени серотонилирования были описаны ядерные белки гистоны, при этом данный феномен был обнаружен как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных (Ivashkin et al., 2019; Vockaert et al., 2021; Patra, 2021). Примерно в то же время была продемонстрирована возможность транскрипционного контроля для этой посттрансляционной модификации гистонов: метка — серотонин, ковалентно присоединенный к глутамину 5 гистоновых хвостов (H3K4me3Q5ser) — коррелирует с потенциацией экспрессии генов во время дифференцировки нейронов (Anastas, Shi, 2019; Farrelly et al., 2019; Fu, Zhang, 2019; Zhao et al., 2019; Zlotorynski, 2019). В недавнем исследовании на препарате изолированной центральной нервной системы виноградной улитки в экспериментах *in vitro* впервые была показана роль серотонилирования как регуляторного механизма в серотонин-зависимой долговременной пластичности: для поддержания поздней фазы долговременной потенциации амплитуды синаптического ответа требовалась активность фермента транслутаминазы, опосредующего серотонилирование (Зюзина, Балабан, 2022).

На сегодняшний день не сообщалось об исследованиях, направленных на выяснение роли вышеописанных эпигенетических регуляторов в механизмах долговременной пищевой аверсивной памяти у виноградных улиток. Таким образом, в текущем исследовании мы впервые изучили влияние данных эпигенетических регуляторов на долговременную пищевую аверсивную память виноградной улитки. Мы показали, что увеличение уровня ацетилирования гистонов, вероятно, служит основой долговременных пластических изменений у виноградной улитки. Определенный уровень метилирования ДНК необходим для поддержания и сохранения пищевой аверсивной памяти у виноградной улитки. Наконец, феномен серотонилирования является необходимым условием для реконсолидации долговременной пищевой аверсивной памяти у виноградной улитки.

МЕТОДИКА

Объект исследования

Работа выполнена на взрослых особях *Helix lucorum* L., собранных в Крыму и содержа-

щихся в террариумах в лабораторных условиях. В террариумах поддерживалась влажность, достаточное количество пищи, воды, невысокая концентрация животных, способствовавшие нормальному активному существованию животных. Во всех экспериментах использовали половозрелых особей, однородных по весу и размеру. До экспериментов улитки не менее двух-трех недель находились в активном состоянии. В экспериментах соблюдали принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского Сообщества (2010/63/EU), и положения ИВНД и НФ РАН о работе с экспериментальными животными.

Введение веществ

Бутират натрия (БН) (Sigma, Сент-Луис, США), 1.2 мг/г массы тела растворяли в стерильном физиологическом растворе (ФР) (в мМ: 100 NaCl, 4 KCl, 7 CaCl₂, 5 MgCl₂ и 10 Трис-НCl-буфер (pH 7.8). Расчетная конечная концентрация БН в гемолимфе свободно ведущих себя животных составила 10⁻² М; введенный объем БН составлял 0.1 мл. Контрольным животным вводили такой же объем стерильного ФР.

Ингибитор ДНМТ RG108 (N-Phthalyl-L-tryptophan) (Sigma, Сент-Луис, Миссури) растворяли в ДМСО (диметилсульфоксид) до концентрации 25 мМ для получения исходного раствора. Для ингибирования ДНМТ животных вводили RG108 в объеме 100 мкл на 100 г массы тела (средний вес животных составлял 20 г, введенный объем RG108 20 мкл в 280 мкл ФР, конечная концентрация RG108 — 25 × 10⁻⁶ М). Содержание ДМСО в физиологическом растворе составило 6.7%. Общий вводимый объем на 1 контрольное животное (группа “ФР”) составил 300 мкл (280 мкл ФР + 20 мкл ДМСО).

Ингибитор ТГ монодансилкадаверин (МДК) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) растворяли в ДМСО до конечной концентрации в гемолимфе свободно ведущих себя животных 25 мкМ. Введенный объем МДК на 1 животное составил 0.1 мл. Контрольным животным вводили ДМСО в объеме 0.1 мл.

Растворы веществ вводили в полость тела с помощью шприца через нечувствительную часть кожи средней части ноги. Конкретное время, в которое были сделаны интрацеломические инъекции, указано в протоколах (см. вставки на рис. 1–3). Введение препара-

тов проводили в нейтральной для улиток обстановке на плоском стекле.

Выработка и тестирование условного пищевого аверсивного рефлекса

Работа была выполнена по стандартной методике обучения условному пищевому аверсивному рефлексу. Такой метод обучения давно и успешно применяется в нашей лаборатории при исследовании действия различных веществ на разные этапы формирования и хранения памяти (Balaban et al., 2016). Условный рефлекс вырабатывался у 109 улиток. До обучения улитки подвергались пищевой депривации в течение трех-восьми дней. На протяжении всего эксперимента животные также не получали пищи. Во всех тестовых сессиях (Т0, Т1 и Т2) оценивали латентный период (ЛП, с) взятия пищевого стимула в секундах (от момента предъявления стимула до момента начала поедания пищи) и процент пищевых реакций. Для всех тестирований использовали условный стимул — морковный сок (сочетанный с током при обучении) и нейтральный стимул — капустный сок (не сочетанный с током пищевой стимул); сами тестирования проводили в условном контексте, где проходило обучение — на шаре. При тестировании пищевые стимулы (условный, нейтральный) были представлены животному 3 раза на 120 с с интервалом между предъявлениями 5 минут. Во время тестирования животное не получало удар тока. Через 24 ч после предварительного тестирования (тестовая сессия Т0) животных начинали обучать. Для обучения улиток фиксировали за раковину так, чтобы они могли свободно ползать по шару, покрытому алюминиевой фольгой, плавающему в воде. Условный стимул (морковный сок, в который обмакивали ватную палочку) располагали на расстоянии 5 мм от нижних щупалец животного. Электрическая стимуляция (1–10 мА, 0.5 с), использовавшаяся в качестве подкрепления, производилась с помощью макроэлектрода, прикладываемого к поверхности ноги животного, тогда как второй угольный электрод помещался в воду, в которой плавал шар. Подкрепление наносилось в момент начала поедания пищи. Подкрепление, выбранное нами, было средней интенсивности, и вызывало генерализованную оборонительную реакцию: улитка втягивала щупальца, переднюю часть тела и выделяла слизь. Условный стимул

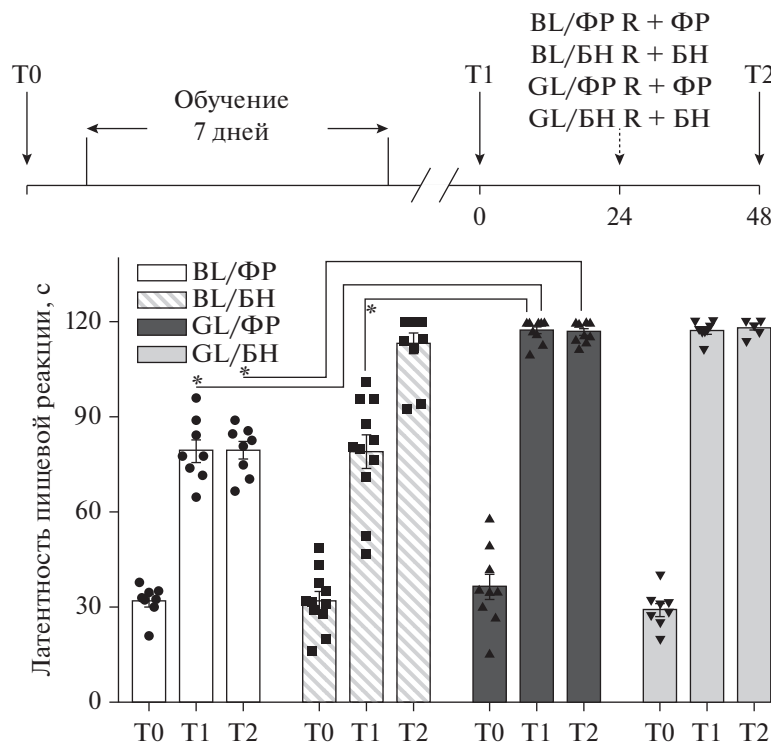


Рис. 1. Влияние однократной инъекции бутирата натрия на ЛП животных со слабой и хорошей памятью. Верхняя вставка: временное представление эксперимента, где T0, T1 и T2 – тестовые сессии, БН – бутират натрия, ФР – физиологический раствор Рингера, R – напоминание. На основании тестовой сессии T1 все животные были разделены на четыре группы, в две из которых (“BL/ФР” и “BL/БН”) были выделены все животные со слабой памятью (плохо обучившиеся), а в две другие (“ГЛ/ФР” и “ГЛ/БН”) – все животные с хорошей памятью. Введение бутирата натрия привело к значительному увеличению ЛП у плохо обучившихся животных, получавших бутират натрия (“BL/БН”, T2), по сравнению с группой с инъекцией физиологического раствора (“BL/ФР”, T2), при этом никаких существенных изменений у хорошо обучившихся животных не было. * – $p < 0.0001$.

Fig. 1. The effect of a single sodium butyrate (SB) injection on the latency of animals with poor and good memory. Upper insert: temporal representation of the experiment, where T0, T1 and T2 are test sessions, SB – sodium butyrate, FR – physiological Ringer’s solution, R – reminder. Based on the test session T1, all animals were divided into four groups, two of which (“BL/saline” and “BL/SB”) included all animals with poor memory (poorly trained), and the other two (“GL/saline” and “GL/SB”) – all animals with a good memory. The administration of sodium butyrate resulted in a significant increase of the latency in poorly trained animals treated with sodium butyrate (“BL/SB”, T2) compared with the saline-injected group (“BL/saline”, T2). No significant changes of the latency of well-trained animals were observed. * – $p < 0.0001$.

был представлен животному на 120 с, если улитка не демонстрировала пищевую реакцию в течение этого периода, считали это предьявление отказом, но по истечению 120 с электрошоки все равно применяли. Сочетанные предьявления условного стимула и электрического тока проводились каждые 5–10 минут. Одна сессия включала 5 сочетаний. Обучение проводилось последовательно в течение 7 дней. Через 24 ч после обучения проводилось тестирование выработанного рефлекса пищевой аверсии (тестовая сессия T1).

В зависимости от задач экспериментов (определение роли ацетилирования гистонов,

серотонилирования или метилирования ДНК в механизмах памяти) после тестовой сессии T1 животные были разделены на три группы. Животные из первой группы (36 моллюсков) были использованы для выяснения того, способен ли БН улучшать обучение животных со слабой памятью. По результатам T1 эти животные были разделены на 4 группы, в две из которых (“BL/ФР”, $n = 8$ и “BL/БН”, $n = 11$) были выделены все животные со слабой памятью (BL, bad learners – “плохие ученики”), а в две другие (“ГЛ/ФР”, $n = 9$ и “ГЛ/БН”, $n = 8$) – все животные с хорошей памятью (GL, good learners – “хорошие ученики”). Пороговым значением для выделения животных в группу

“BL” (критерием необученности) было 100% пищевых реакций в ответ на предъявление моркови после обучения, несмотря на увеличенный латентный период пищевой реакции. При этом критерием обученности следует считать как минимум один отказ от пищевого стимула при тестировании (процент пищевых реакций не более 67%) и близкий к 120 с латентный период пищевой реакции. Через 24 ч после T1 животным сразу после напоминания (R, 20 минут на шаре в обстановке обучения с тремя предъявлениями ватной палочки, смоченной в морковном соке без тока) вводили БН (“BL/БН”, “GL/БН”) или ФР (“BL/ФР”, “GL/ФР”). Через 24 ч после введения веществ животных снова помещали в условный контекст для тестирования (тестовая сессия T2).

Вторая группа экспериментов (24 моллюска) была направлена на выяснение роли метилирования ДНК в поддержании и реконсолидации пищевой аверсивной памяти виноградной улитки. После обучения на основании теста T1 животных, достигших критерия обученности, разделили на три группы: “Конт”, $n = 8$; “RG108 + R”, $n = 8$; “RG108”, $n = 8$. Через 24 ч после T1 этим животным вводили ФР с ДМСО (группа “Конт”) за 1 ч до напоминания, RG108 за 1 час до напоминания (группа “RG108 + R”) и RG108 без напоминания (группа “RG108”). Через 24 ч после введения веществ животных снова помещали в условный контекст для тестирования (тестовая сессия T2).

Третья группа экспериментов (17 моллюсков) была направлена на выяснение роли транскламиназа-опосредованного серотонилирования гистонов в реконсолидации пищевой аверсивной памяти виноградной улитки. После обучения на основании теста T1 животных, достигших критерия обученности, разделили на две группы: “Конт”, $n = 8$; “МДК + R”, $n = 9$. Через 24 ч после T1 этим животным вводили ДМСО (группа “Конт”) или МДК сразу после напоминания (группа “МДК + R”). Через 24 ч после введения веществ животных снова помещали в условный контекст для тестирования (тестовая сессия T2).

Заключительная группа экспериментов была направлена на изучение неспецифического влияния исследуемых блокаторов (БН, RG108, МДК) на латентность пищевой реакции. Обучение животных в данном случае не проводилось. Для всех тестирований исполь-

зовали морковный сок в обстановке на шаре. Через 24 ч после первой тестовой сессии (T0) животным вводили БН (группа “БНн”, $n = 8$), RG108 (группа “RG108н”, $n = 8$) или МДК (группа “МДКн”, $n = 8$). Через 24 ч после введения препаратов животных всех групп вновь тестировали (T1).

Статистическая обработка данных

Для статистической оценки учитывались только животные, которые пережили все этапы исследования и находились в хорошем состоянии в течение недели после завершения экспериментов. Ни одно животное в хорошем состоянии не было исключено из наших расчетов. Как правило, смертность составляла не более 5% от всех животных на протяжении всего эксперимента.

Данные были проанализированы с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с одним повторным измерением (тестом) two-way ANOVA, за которым следовали сравнения с использованием критерия Бонферрони (при сравнении более двух групп животных, для анализа эффектов БН и RG108 при обучении). Критерий Вилкоксона использовали для сравнения одной и той же группы в разных условиях (для анализа неспецифических эффектов БН, МДК и RG108 без обучения). Непараметрический критерий Манна-Уитни был применен для анализа эффектов МДК. Для обработки результатов использовали программу STATISTICA 10.0. Все данные представлены как среднее значение $\pm$ S.E.M. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние блокатора гистондеацетилаз бутирата натрия на слабую пищевую аверсивную память виноградной улитки

В качестве первого шага мы проверили возможное неспецифическое влияние ингибитора ГДАЦ БН на ЛП пищевой реакции на наивных животных без обучения. Никаких существенных изменений в поведении животных, протестированных до инъекций (T0, “БНн”, ЛП, 27.6 ± 5.6) и через 24 ч после введения БН (T1, “БНн”, ЛП, 33.7 ± 4.9) выявлено не было ($p > 0.05$), что свидетельствует об отсутствии неспецифического влияния БН на пищевое поведение улиток.

Следующим шагом было выяснить, способен ли БН улучшать обучение животных со

Таблица 1. Латентный период пищевой реакции на предъявление нейтрального стимула (капустный сок) в условной обстановке в разных экспериментальных группах при введении бутирата натрия. Показаны средние значения ЛП $\pm$ ошибка среднего

Table 1. Latent period of the food reaction to the presentation of a neutral stimulus (cabbage juice) in a conditional context in different experimental groups under sodium butyrate administration. Mean LP values are shown $\pm$ SEM

Показатель	Тестирование	Экспериментальные группы			
		BL/ФР	BL/БН	GL/ФР	GL/ БН
ЛП (с)	T0	22.0 $\pm$ 4.8	29.0 $\pm$ 1.8	30.2 $\pm$ 3.6	27.9 $\pm$ 4.1
	T1	31.0 $\pm$ 0.8	20.9 $\pm$ 5.8	28.8 $\pm$ 2.2	32.0 $\pm$ 1.8
	T2	26.0 $\pm$ 4,3	32.3 $\pm$ 3.8	30.4 $\pm$ 1.9	25.0 $\pm$ 3.3

слабой памятью. Как правило, в поведенческих экспериментах часть животных, несмотря на прохождение полноценной процедуры обучения, не демонстрируют наличие хорошей памяти (Zuzina et al., 2020; Vinarskaya et al., 2021). В соответствии с критериями необученности/обученности животных поделили на “BL” и “GL”. Как показано на рис. 1, все группы животных демонстрировали схожие низкие значения ЛП реакции на условный стимул и различий между группами до обучения не было (T0, “BL/ФР”, 22.0 $\pm$ 4.8, “BL/БН”, 29.0 $\pm$ 1.8, “GL/ФР”, 30.2 $\pm$ 3.6 и “GL/БН”, 27.9 $\pm$ 4.1). После обучения во всех группах наблюдалось достоверное увеличение ЛП реакции на условный стимул (T1, “BL/ФР”, 31.0 $\pm$ 0.8, “BL/БН”, 20.9 $\pm$ 5.8, “GL/ФР”, 28.8 $\pm$ 2.2 и “GL/БН”, 32.0 $\pm$ 1.8). После обучения во всех группах наблюдалось достоверное увеличение ЛП реакции на условный стимул (T2, “BL/ФР”, 26.0 $\pm$ 4,3, “BL/БН”, 32.3 $\pm$ 3.8, “GL/ФР”, 30.4 $\pm$ 1.9 и “GL/БН”, 25.0 $\pm$ 3.3). При этом post-hoc сравнения показали, что группы “BL” показали достоверно меньший ЛП по сравнению с контрольной группой “GL/ФР” (“BL/ФР” vs. “GL/ФР” $p < 0.0001$; “BL/БН” vs. “GL/ФР” $p < 0.0001$); ЛП хорошо обученных животных “GL/ФР” и “GL/БН” не различались. На следующий день после T1 группам “BL/БН” и “GL/БН” вводили БН сразу после напоминания, группам “BL/ФР” и “GL/ФР” вводили ФР. Тестирование на следующий день (T2) выявило достоверное увеличение ЛП у животных со слабой памятью, получавших БН (“BL/БН”, 113.3 $\pm$ 3.1) (T2, эффект группы, $F_{3,32} = 44.294$, $p < 0.0001$). В то же время, у животных с хорошей памятью эффект БН не обнаружили (“GL/БН”, 118.3 $\pm$ 0.8). Post-hoc анализ показал, что ЛП в группе “BL/БН”, получавшей БН (слабая память), не отличался от такового в группе “GL/БН”, получавшей БН (сильная память), и в группе,

получавшей ФР, “GL/ФР” (сильная память). Животные со слабой памятью, получавшие ФР, по-прежнему демонстрировали достоверно более низкие ЛП (“BL/ФР”, 79.4 $\pm$ 2.8), чем контрольные животные (“GL/ФР”, 116.8 $\pm$ 1.1) ($p < 0.0001$).

Кроме ЛП пищевой реакции мы анализировали процент пищевых реакций животных (рис. 2). До обучения (тестовая сессия T0) все улитки брали пищу в 100% случаев, что характерно для наивного животного. После обучения при тестировании T1 животные со слабой памятью (группы “BL/ФР” и “BL/БН”) по-прежнему демонстрировали пищевые реакции на условный стимул в 100 процентов предъявлений, в то время как у хорошо обучившихся животных пищевые реакции наблюдались лишь в 14.8 $\pm$ 5.9% у “GL/ФР” и 25.0 $\pm$ 5.5% у “GL/ БН”. Через 24 ч после введения БН при тестировании T2 у группы “BL/БН” лишь в 18% случаев наблюдалась пищевая реакция: большинство животных отказывались прикасаться к пищевому стимулу, в некоторых случаях после предъявления пищи наблюдалась оборонительная реакция, что характерно для обученных животных.

Увеличение ЛП пищевой реакции и снижение процента пищевых реакций оказалось специфично только для условного стимула, сочетавшегося с отрицательным подкреплением электрошоком. При тестировании животных всех исследуемых групп в той же обстановке, но с применением нейтрального стимула (капустный сок) животные демонстрировали низкие показатели ЛП (табл. 1) и 100% пищевых реакций.

Таким образом, ингибирование ГДАЦ достаточно для улучшения слабой пищевой аверсивной памяти виноградной улитки.

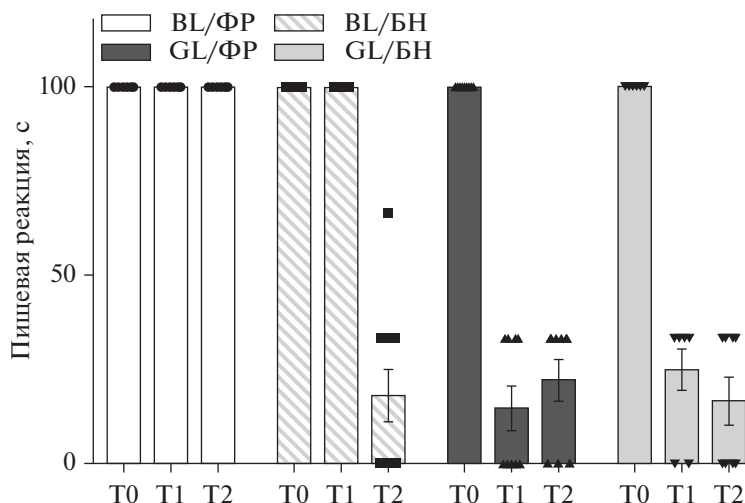


Рис. 2. Влияние однократной инъекции бутирата натрия на процент пищевых реакций животных со слабой и хорошей памятью.

Fig. 2. The effect of a single sodium butyrate (SB) injection on the percentage of food reactions of animals with poor and good memory.

Влияние блокатора ДНК метилтрансфераз RG108 на поддержание и реконсолидацию долговременной пищевой аверсивной памяти виноградной улитки

В данном разделе работы мы изучали эффекты ингибитора ДНМТ RG108 на память о пищевой аверсии у виноградной улитки. Как и в случае с ингибитором ГДАЦ в начале исследования, мы проверили возможное неспецифическое влияние ингибитора ДНМТ RG108 на ЛП пищевой реакции на наивных животных без обучения. Никаких существенных изменений в поведении животных, протестированных до инъекций (T0, “RG108н”, ЛП, 37.6 ± 3.6) и через 24 ч после введения RG108 (T1, “RG108н”, ЛП, 29.7 ± 7.9) выявлено не было ($p > 0.05$), что свидетельствует об отсутствии неспецифического влияния RG108 на пищевое поведение улиток.

Следующим этапом работы стало исследование влияния блокатора ДНМТ RG108 на поддержание и реконсолидацию пищевой аверсивной памяти виноградной улитки. Для данной серии экспериментов использовали только животных, достигших критерия обученности, которых разделили на три группы: группа “Конт” — контрольная группа, группа “RG108 + R” и группа “RG108”. Как показано на рис. 3, все группы животных демонстрировали схожие низкие значения ЛП реакции на условный стимул и различий между группами до обучения не было (T0, “Конт”,

30.9 ± 0.9 , “RG108 + R”, 29.7 ± 0.9 , “RG108”, 32.8 ± 1.1). Сочетанное предъявление условного стимула с отрицательным подкреплением привело к достоверному увеличению ЛП во всех группах (T1, “Конт”, 118.3 ± 0.6 , “RG108 + R”, 117.6 ± 0.9 , “RG108”, 117.5 ± 0.8 , $F_{1,21} = 12292$, $p < 0.0001$ для эффекта тестового испытания). Через 24 ч после T1 животным вводили ФР + ДМСО (группа “Конт”), RG108 перед напоминанием (группа “RG108 + R”) и RG108 без напоминания (группа “RG108”). Тест через 24 ч после введения препаратов выявили основной эффект группы (ANOVA, T2, $F_{2,21} = 507.36$, $p < 0.001$). Post-hoc сравнения показали, что группа “RG108” показала достоверно меньший ЛП (74.4 ± 1.3) по сравнению с контрольной группой “Конт” (118.3 ± 0.6 ; $p < 0.0001$) и с группой “RG108 + R” (117.6 ± 0.8 ; $p < 0.0001$). ЛП групп “Конт” и “RG108 + R” не различался в тестовой сессии T2. Следует отметить, что значения ЛП группы “RG108” при тестировании T2 оставались достоверно выше, чем при тестировании T0.

Особого внимания при исследовании влияния RG108 заслуживает другой измеряемый нами показатель — процент пищевых реакций (рис. 4). До обучения (тестовая сессия T0) все улитки брали пищу в 100% случаев. После обучения при тестировании T1 процент пищевых реакций у всех групп существенно сократился: группа “Конт” демонстрировала пищевые реакции в $37.5 \pm 9.8\%$, “RG108 + R” в $29.2 \pm$

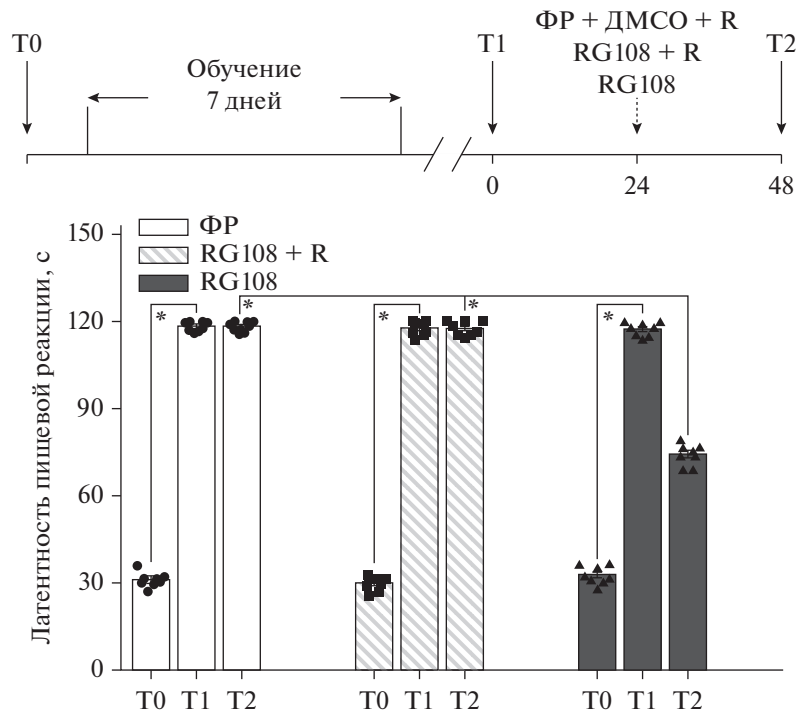


Рис. 3. Влияние ингибитора ДНМТ RG108 на поддержание и реконсолидацию пищевой авersiveивной памяти виноградной улитки. Верхняя вставка: временное представление эксперимента, где T0, T1 и T2 – тестовые сессии, RG108 – ингибитор ДНК метилтрансфераз, ФР – физиологический раствор Рингера, ДМСО – диметилсульфоксид, R – напоминание. Все группы обучались в течение 7 дней и показали достоверную разницу в ЛП между тестами T0/T1. Животные, получившие RG108 без напоминания, продемонстрировали ухудшение памяти при тестировании T2 (снижение ЛП пищевой реакции). Группы “RG108 + R” и “Конт” демонстрировали одинаково высокие значения ЛП во время теста T2. * – $p < 0.0001$.

Fig. 3. The effect of the DNMT inhibitor RG108 on the maintenance and reconsolidation of food aversive memory in the snail. Upper insert: temporal representation of the experiment, where T0, T1 and T2 are test sessions, RG108 – a DNMT inhibitor, FR – physiological Ringer’s solution, DMSO – dimethyl sulfoxide, R – reminder. All groups trained for 7 days and showed a significant difference in the latency between the T0/T1 tests. Animals given RG108 without reminding showed memory impairment when tested in T2 (decreased latency of food response). Groups “RG108 + R” and “Cont” showed equally high latency values during the T2 test. * – $p < 0.0001$.

7.5% “RG108” в $33.3 \pm 8.9\%$. Через 24 ч после введения препаратов при тестировании T2 животные группы “RG108” демонстрировали пищевые реакции в 100% предъявлений условного стимула, что характерно для необученных животных. Животные групп “RG108 + R” и “Конт” по-прежнему “отказывались” от пищевого стимула в большинстве предъявлений (“RG108 + R”, $33.3 \pm 10.9\%$, “ФР”, $33.3 \pm 10.9\%$).

При тестировании животных всех исследуемых групп в той же обстановке, но с применением нейтрального стимула (капустный сок) животные демонстрировали низкие показатели ЛП (табл. 2) и 100% пищевых реакций.

Таким образом, нами обнаружено, что реконсолидация памяти условной пищевой аверсии не зависит от активности ДНМТ. Однако для поддержания и сохранения памя-

ти условной пищевой аверсии активность ДНМТ является необходимым условием. Можно предположить, что одним из ключевых механизмов наблюдаемой нами амнезии вследствие блокады активности ДНМТ является изменение экспрессии генов за счет изменения статуса метилирования/деметилирования определенных участков ДНК.

Влияние блокатора транsgлутаминазы II на реконсолидацию долговременной пищевой авersiveивной памяти виноградной улитки

В заключительном разделе работы была проведена проверка гипотезы о вовлечении транsgлутаминаз-опосредованного серотонилирования в процессы реконсолидации пищевой авersiveивной памяти виноградной улитки. На первом этапе работы мы исследо-

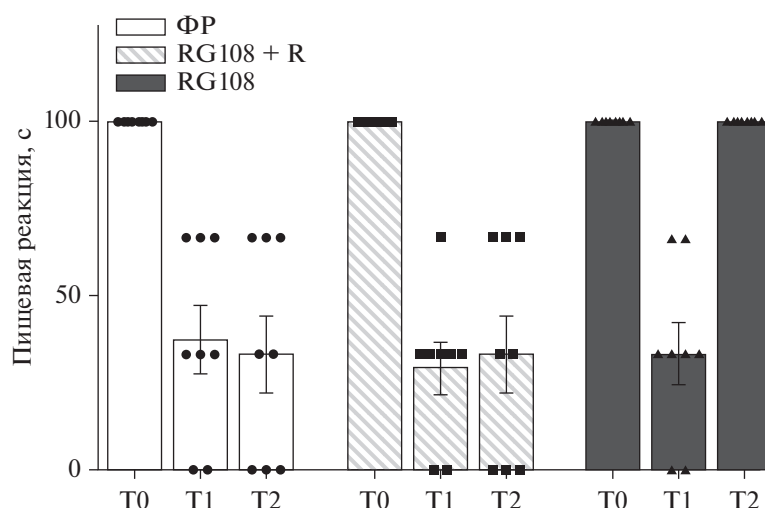


Рис. 4. Влияние ингибитора ДНМТ RG108 на процент пищевых реакций животных.
Fig. 4. The effect of the DNMT inhibitor RG108 on the percentage of food reactions in snails.

вали возможное неспецифическое влияние ингибитора ТГ МДК на ЛП пищевой реакции на наивных животных без обучения. Никаких существенных изменений в поведении животных, протестированных до инъекций (T0, “МДКн”, ЛП, 26.6 ± 6.6) и через 24 ч после введения МДК (T1, “МДКн”, ЛП, 29.9 ± 6.4), выявлено не было ($p > 0.05$), что свидетельствует об отсутствии неспецифического влияния МДК на пищевое поведение улиток.

Следующим этапом работы стало исследование влияния блокатора МДК на реконсолидацию пищевой аверсивной памяти виноградной улитки. Для данной серии экспериментов использовали только животных, достигших критерия обученности, которых разделили на две группы: группа “Конт” — контрольная группа и группа “МДК + R”. Как показано на рис. 5, обе группы животных демонстрирова-

ли схожие низкие значения ЛП реакции на условный стимул и различий между группами до обучения не было (T0, “Конт”, 34.0 ± 4.8 , “МДК + R”, 34.6 ± 4.6). Обучение привело к достоверному увеличению ЛП в обеих группах (T1, “Конт”, 117.0 ± 1.1 , “МДК + R”, $117.3 \pm 0.9\%$, $p < 0.001$) по сравнению с тестовой сессией T0. Через 24 ч после T1 животным вводили ДМСО (группа “Конт”) или МДК сразу после напоминания (группа “МДК + R”). Тест через 24 ч после введения препаратов T2 показал достоверное ухудшение памяти в группе “МДК + R” (ЛП, 35.8 ± 4.2) ($p < 0.001$), в то время как контрольная группа “ФР” (ЛП, 118.2 ± 0.7) прекрасно помнила, что запах моркови ранее сочетался с электрошоком.

Анализ процента пищевых реакций также свидетельствует об ухудшении памяти под действием МДК (рис. 6). До обучения (тесто-

Таблица 2. Латентный период пищевой реакции на предъявление нейтрального стимула (капустный сок) в условной обстановке в разных экспериментальных группах при введении RG108. Показаны средние значения ЛП $\pm$ ошибка среднего

Table 2. Latent period of the food reaction to the presentation of a neutral stimulus (cabbage juice) in a conditional context in different experimental groups under RG108 administration. Mean LP values are shown $\pm$ SEM

Показатель	Тестирование	Экспериментальные группы		
		Конт	RG108 + R	RG108
ЛП (с)	T0	28.0 ± 5.1	27.0 ± 1.5	27.2 ± 1.6
	T1	30.4 ± 1.9	20.9 ± 5.8	21.6 ± 5.2
	T2	29.0 ± 1.3	27.5 ± 4.2	25.4 ± 3.9

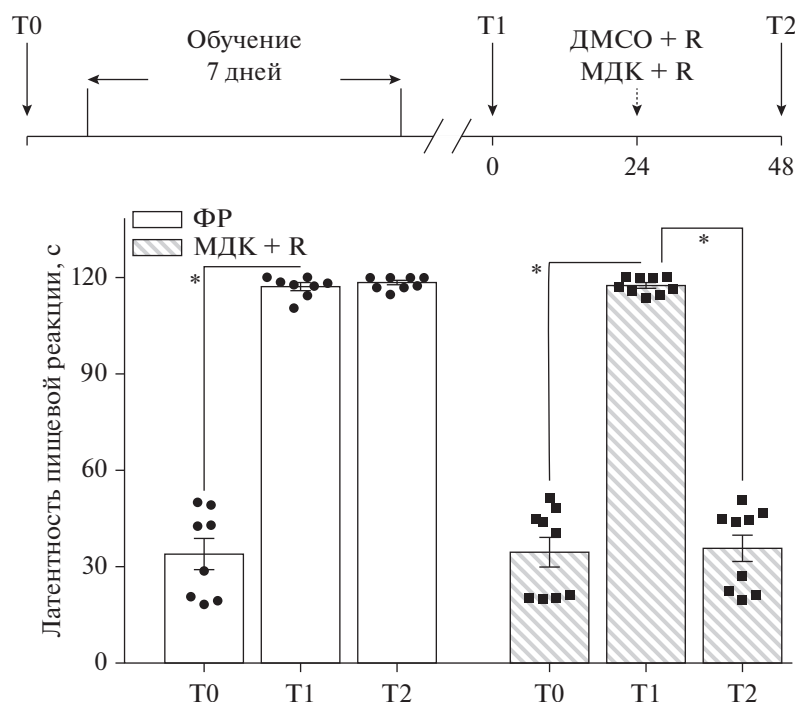


Рис. 5. Влияние ингибитора ТГ МДК на реконсолидацию пищевой аверсивной памяти виноградной улитки. Верхняя вставка: временное представление эксперимента, где T0, T1 и T2 – тестовые сессии, МДК – ингибитор ТГ монодансилкадаверин, ДМСО – диметилсульфоксид, R – напоминание. Обе группы обучались в течение 7 дней и показали достоверную разницу в ЛП между тестами T0/T1. Животные, получившие МДК, продемонстрировали достоверное ухудшение памяти при тестировании T2. Группа “Конт” демонстрировала одинаково высокие значения ЛП как во время теста T1, так и T2. * – $p < 0.001$.

Fig. 5. The effect of the TG inhibitor MDC on the reconsolidation of food aversive memory in the snail. Upper insert: temporal representation of the experiment, where T0, T1 and T2 are test sessions, MDC – monodansylcadaverine, DMSO – dimethyl sulfoxide, R – reminder. Both groups trained for 7 days and showed a significant difference in the latency between the T0/T1 tests. Animals treated with MDC showed significant memory impairment when tested in T2. The “Cont” group showed equally high latency values both during the T1 and T2 tests. * – $p < 0.001$.

вая сессия T0) все улитки брали пищу в 100% случаев. После обучения при тестировании T1 процент пищевых реакций у обеих групп существенно сократился: группа “Конт” де-

Таблица 3. Латентный период пищевой реакции на предъявление нейтрального стимула (капустный сок) в условной обстановке в разных экспериментальных группах при введении МДК. Показаны средние значения ЛП $\pm$ ошибка среднего

Table 3. Latent period of the food reaction to the presentation of a neutral stimulus (cabbage juice) in a conditional context in different experimental groups under MDC administration. Mean LP values are shown $\pm$ SEM

Показатель	Тестирование	Экспериментальные группы	
		конт	МДК + R
ЛП (с)	T0	35.0 $\pm$ 6.3	28.9 $\pm$ 3.5
	T1	24.4 $\pm$ 5.9	23.6 $\pm$ 3.2
	T2	27.0 $\pm$ 5.3	25.5 $\pm$ 4.4

монстрировала пищевые реакции в $37.5 \pm 9.8\%$ и “МДК + R” в $37.0 \pm 10.3\%$. Через 24 ч после введения препаратов при тестировании T2 животные группы “МДК + R” демонстрировали пищевые реакции в 100% предъявлений условного стимула, что характерно для необученных животных. Животные контрольной группы “ФР” по-прежнему “отказывались” от пищевого стимула в большинстве предъявлений ($29.2 \pm 11.7\%$).

При тестировании животных обеих исследуемых групп в той же обстановке, но с применением нейтрального стимула (капустный сок) животные демонстрировали низкие показатели ЛП (табл. 3) и 100% пищевых реакций.

Таким образом, блокада транsgлутаминазы при напоминании вызывает нарушения долговременной пищевой аверсивной памяти виноградной улитки, что позволяет считать активность транsgлутаминазы, а следовательно, и серотонилирование, необходимым условием

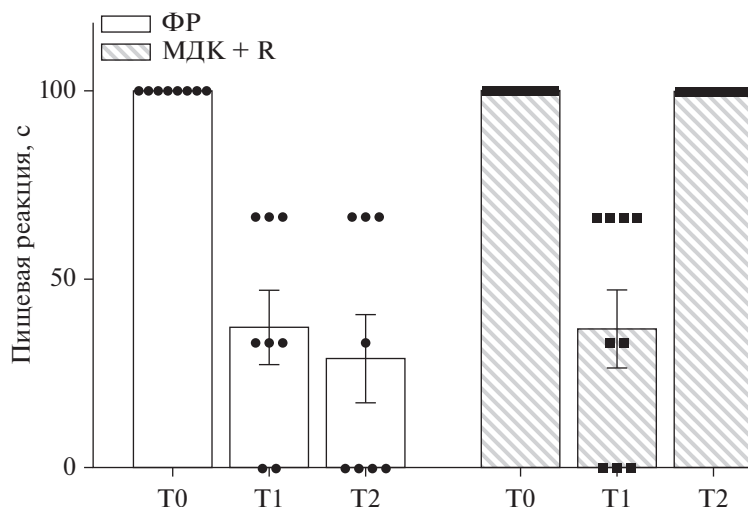


Рис. 6. Влияние ингибитора транслугтаминазы монодансилкадаверина на процент пищевых реакций животных.

Fig. 6. The effect of the TG inhibitor MDC on the percentage of food reactions in snails.

для реконсолидации долговременной пищевой аверсивной памяти у виноградной улитки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В первой части нашей работы было исследовано влияние ингибирования ГДАЦ с помощью блокатора БН на формирование долговременной пищевой аверсивной памяти виноградной улитки. Мы показали, что реактивация слабой пищевой аверсивной памяти с последующим введением ингибитора ГДАЦ БН вызывает значительное усиление слабого следа памяти (рис. 1, 2, группа “BL/БН”), что согласуется с литературными данными о том, что БН может выступать в качестве усилителя когнитивных процессов при формировании памяти и обучении (Hu et al., 2018; Zuzina et al., 2020, 2021; Vinarskaya et al., 2021). Необходимо подчеркнуть, что инъекции БН достоверно улучшали долговременную память у животных со слабой памятью, но никакого эффекта БН на память не наблюдалось у животных с хорошей памятью (рис. 1, группа “GL/БН”). Таким образом, наши результаты показывают, что ингибитор ГДАЦ БН избирательно влияет на дефицит памяти, действуя как “когнитивный усилитель”.

В следующем разделе работы мы исследовали влияние ингибитора ДНМТ RG108 на поддержание и реконсолидацию пищевой аверсивной памяти виноградной улитки. Согласно полученным результатам, долговременная пищевая аверсивная память у улиток

нарушалась при ингибировании активности ДНМТ (рис. 3, 4, группа “RG108”). Наши результаты согласуются с некоторыми предыдущими исследованиями, однако есть некоторые расхождения. Наблюдаются параллели как с исследованиями на млекопитающих (Miller et al., 2010; Mizuno et al., 2012; Halder et al., 2016), так и на беспозвоночных (Lukowiak et al., 2014; Pearce et al., 2017). Однако, согласно ряду исследований, ингибирование ДНМТ не влияет на поддержание памяти (Maddox, Schafe, 2011; Maddox et al., 2014; Liu et al., 2016). Следует отметить, что в текущей работе реактивация памяти оказывала “спасительное” действие на память во время ингибирования ДНМТ: ингибирование активности ДНМТ, применяемое в сочетании с напоминанием, не влияло на долговременную пищевую аверсивную память (рис. 3, 4, группа “RG108 + R”). Что касается процесса реконсолидации и роли в нем ДНМТ, то в большинстве исследований было показано, что ингибирование активности ДНМТ после реактивации памяти приводило к нарушению реконсолидации памяти (Maddox, Schafe, 2011; Maddox et al., 2014; Liu et al., 2016; Pearce et al., 2017; Qian et al., 2022). Наши результаты не согласуются с этим фактом. Не исключено, что обнаруженные различия связаны с разными модельными организмами, а также моделями обучения.

Таким образом, настоящее исследование демонстрирует, что постоянное метилирова-

ние ДНК играет решающую роль в поддержании памяти у *Helix*. Тот факт, что инъекция RG108 блокировала проявление нормальной памяти или стирала память, позволяет предположить, что поддержание памяти было связано с активностью ДНМТ. Согласно литературным данным, активность ДНМТ приводит к “молчанию” гена-супрессора памяти CREB2 при индуцированной серотонином пластичности у морского моллюска *Aplysia* (Rajaseethupathy et al., 2012). Мы можем предположить, что по крайней мере частично наши результаты также могут быть связаны с “молчанием” генов: метилирование ДНК может ингибировать гены-супрессоры памяти, чтобы предотвратить память от стирания.

Интересная идея о роли метилирования ДНК в процессах памяти была выдвинута совсем недавно (Gulmez Karaca et al., 2020). По мнению данной группы ученых, метилирование ДНК регулирует стабильность активности подгруппы функционально связанных нейронов, или энграммы (примерно соответствующей “следу памяти”) (Josselyn et al., 2015; Matsuo, 2015; Tonegawa et al., 2015), и метилирование ДНК, вероятно, необходимо для сохранения этих энграмм. На основании полученных результатов мы можем предположить, что после введения ингибитора ДНМТ мы наблюдаем нарушение “следа памяти” и полный распад энграммы памяти: полностью нарушается статус метилирования ДНК, теряется взаимосвязь клеток энграммы и, как следствие, невозможна реактивация ансамблей нейронов энграммы и эффективное воспроизведение памяти.

В заключительном разделе работы мы показали, что реконсолидация долговременной пищевой аверсивной памяти у улиток нарушалась при ингибировании активности ТГ (рис. 5, 6, группа “МДК + R”). На данный момент в литературе есть только одно упоминание о роли серотонилирования в долговременных пластических перестройках (Зюзина, Балабан, 2022), поэтому провести прямое сравнение с литературными данными не представляется возможным. Однако совсем недавно было показано, что дофамин, нейромедиатор, участвующий в контроле многочисленных поведенческих и физиологических функций, способен присоединяться к гистонам (путем дофаминилирования), влияя на структуру хроматина, регулируя паттерны экспрессии генов и, как следствие, память у млекопитающих (Lepack et al., 2020; Fulton et al.,

2022). Поэтому, если провести параллели между серотонилированием и дофаминилированием (Lepack et al., 2020; Fulton et al., 2022), а также другими пострепликационными модификациями гистонов (например, метилированием (Gupta et al., 2010; Greer, Shi, 2012; Collins et al., 2019) или описанным выше ацетилированием), можно предположить, что обнаруженная нами способность ТГ-опосредованного серотонилирования влиять на память у моллюсков объясняется по крайней мере частично способностью серотонилирования влиять на ядерные белки гистоны, но не стоит исключать и другие мишени ТГ (например, ГТФазы или белки экстраклеточного матрикса).

О том, что серотонин играет роль в механизмах, контролирующих долговременную синаптическую пластичность и долговременную память у моллюсков, сообщалось с начала 80-х годов (Kandel, Schwartz, 1982; Balaban, Bravarenko, 1993; Balaban, 2002; Balaban et al., 2016; Deryabina et al., 2018). Сначала большинство исследований было сосредоточено на роли серотонергической системы в приобретении памяти (Balaban, Bravarenko, 1993; Balaban, 2002). Позднее появились работы, показывающие, что серотонин вовлечен в механизмы, лежащие в основе процесса реконсолидации (Balaban et al., 2016; Deryabina et al., 2018). Однако во всех вышеперечисленных исследованиях серотонин рассматривали только как агент, действующий через синаптические рецепторы. В текущем исследовании удалось показать, что серотонин способен влиять на механизмы памяти не только через рецепторы клеточной мембраны, но и посредством ковалентного присоединения к гистонам путем серотонилирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных в работе результатов можно сделать несколько выводов. Во-первых, увеличение уровня ацетилирования гистонов, вероятно, служит основой долговременных пластических изменений у виноградной улитки. Во-вторых, определенный уровень метилирования ДНК необходим для поддержания и сохранения пищевой аверсивной памяти у виноградной улитки. Наконец, феномен серотонилирования является необходимым условием для реконсолидации долговременной пищевой аверсивной памяти у виноградной улитки. Таким образом, полученные в работе результаты позволяют со-

ставить более полное представление о роли эпигенетических регуляторов в процессах обучения и памяти. Будущие исследования, безусловно, необходимы для выявления внутриклеточных сигнальных путей, опосредующих данные поведенческие проявления.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки РФ, соглашение № 075-15-2020-801 (продолжение).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Анохин К.В. Молекулярные сценарии консолидации долговременной памяти. Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 1997. 47 (2): 261–279.
- Тиунова А., Торопова К., Коновалова Е.В., Анохин К.В. Эффекты системного введения ингибиторов гистондеацетилаз на формирование памяти и экспрессию ранних генов в мозге цыплят. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012. 153 (5): 703–706.
- Торопова К., Анохин К., Тиунова А. Блокада деацетилирования гистонов в мозге модулирует экспрессию транскрипционных факторов c-Fos и Zenk и потенцирует образование долговременной памяти у новорожденных цыплят. Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2014. 64 (5): 551–561.
- Зюзина А.Б., Балабан П.М. Вклад транслутамины в индукцию и поддержание долговременной синаптической потенциации в нейронах виноградной улитки. Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2022. 72 (6): 851–861.
- Abel T., Lattal K.M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. Curr. Opin. Neurobiol. 2001. 11 (2): 180–187.
- Anastas J.N., Shi Y. Histone Serotonylation: can the brain have “Happy”. Chromatin. Mol. Cell. 2019. 74 (3): 418–420.
- Balaban P.M. Cellular mechanisms of behavioral plasticity in terrestrial snail. Neurosci. Biobehav. Rev. 2002. 26 (5): 597–630.
- Balaban P., Bravarenko N. Long-term sensitization and environmental conditioning in terrestrial snails. Exp. Brain Research. 1993. 96 (3): 487–493.
- Balaban P.M., Vinarskaya A.K., Zuzina A.B., Ierusalimsky V.N., Malyshev A.Y. Impairment of the serotonergic neurons underlying reinforcement elicits extinction of the repeatedly reactivated context memory. Sci. Rep. 2016. 6: 36933.
- Bockaert J., B'ecamel C., Chaumont-Dubel S., Claeysen S., Vandermoere F., Marin P. Novel and atypical pathways for serotonin signaling. Fac. Rev. 2021. 10: 52.
- Campbell R.R., Wood M.A. How the epigenome integrates information and reshapes the synapse. Nat. Rev. Neurosci. 2019. 20 (3): 133–147.
- Chahrour M., Jung S., Shaw C., Zhou X., Wong S.T., Qin J., Zoghbi H.Y. MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. Science. 2008. 320 (5880): 1224–1229.
- Cohen S., Zhou Z., Greenberg M. Medicine. Activating a repressor. Science. 2008. 320 (5880): 1172–1173.
- Collins B.E., Greer C.B., Coleman B.C., Sweatt J.D. Histone H3 lysine K4 methylation and its role in learning and memory. Epigenetics Chromatin. 2019. 12 (1): 7.
- Deryabina I.B., Muranova L.N., Andrianov V.V., Gainutdinov K.L. Impairing of serotonin synthesis by p-chlorophenylalanine prevents the forgetting of contextual memory after reminder and the protein synthesis inhibition. Front. Pharmacol. 2018. 9: 607.
- Drewell R., Goddard C., Thomas J.O., Surani M.A. Methylation-dependent silencing at the H19 imprinting control region by MeCP2. Nucleic Acids Res. 2002. 30 (5): 1139–1144.
- Farrelly L.A., Thompson R.E., Zhao S., Lepack A.E., Lyu Y., Bhanu N.V., Zhang B., Loh Y.-H.E., Ramakrishnan A., Vadodaria K.C., Heard K.J., Erikson G., Nakadai T., Bastle R.M., Lukasak B.J., Zebroski H. 3rd, Alenina N., Bader M., Berton O., Roeder R.G., Molina H., Gage F.H., Shen L., Garcia B.A., Li H., Muir T.W., Maze I. Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me. Nature. 2019. 567 (7749): 535–539.
- Federman N., Fustiñana M., Romano A. Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories. Learn. Mem. 2009. 16 (10): 600–606.
- Fu L., Zhang L. Serotonylation: a novel histone H3 marker. Signal Trans. Target Ther. 2019. 4: 15.
- Fuks F., Hurd P., Wolf D., Nan X., Bird A.P., Kouzarides T. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. J. Biol. Chem. 2003. 278 (6): 4035–4040.
- Fulton S., Mitra S., Lepack A.E., Martin J.A., Stewart A.F., Converse J., Hochstetler M., Dietz D.M., Maze I. Histone H3 dopaminylation in ventral tegmental area underlies heroin-induced transcriptional and behavioral plasticity in male rats. Neuropsychopharmacology. 2022. 47 (10): 1776–1783.

- Greer E.L., Shi Y. Histone methylation: A dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat. Rev. Genet.* 2012. 13 (5): 343–357.
- Guan Z., Giustetto M., Lomvardas S., Kim J.H., Miniaci M.C., Schwartz J.H., Thanos D., Kandel E.R. Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell.* 2002. 111 (4): 483–493.
- Gulmez Karaca K., Kupke J., Brito D.V.C., Zeuch B., Thome C., Weichenhan D., Lutsik P., Plass C., Oliveira A.M.M. Neuronal ensemble-specific DNA methylation strengthens engram stability. *Nat. Commun.* 2020. 11 (1): 639.
- Gupta S., Kim S.Y., Artis S., Molfese D.L., Schumacher A., Sweatt J.D., Paylor R.E., Lubin F.D. Histone methylation regulates memory formation. *J. Neurosci.* 2010. 30 (10): 3589–3599.
- Guzowski J.F., Setlow B., Wagner E.K., McGaugh J.L. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes *Arc*, *c-fos*, and *zif268*. *J. Neurosci.* 2001. 21 (14): 5089–5098.
- Halder R., Hennion M., Vidal R.O., Shomroni O., Rahman R.U., Rajput A., Centeno T.P., van Bebbler F., Capece V., Garcia Vizcaino J.C., Schuetz A.L., Burkhardt S., Benito E., Navarro Sala M., Javan S.B., Haass C., Schmid B., Fischer A., Bonn S. DNA methylation changes in plasticity genes accompany the formation and maintenance of memory // *Nat. Neurosci.* 2016. 19 (1): 102–110.
- Hao J., Li Y. Effect of BDNF expression in cerebral cortex and hippocampus on ability of learning and memory in APP/PS1 transgenic mice. *Chinese J. Pathophysiology.* 2019. 35: 858–864.
- Hu Y.T., Tang C.K., Wu C.P., Wu P.C., Yang E.C., Tai C.C., Wu Y.L. Histone deacetylase inhibitor treatment restores memory-related gene expression and learning ability in neonicotinoid-treated *Apis Mellifera*. *Insect. Mol. Bio.* 2018. 27 (4): 512–521.
- Ivashkin E., Melnikova V., Kurtova A., Brun N.R., Obukhova A., Khabarova M.Y. Transglutaminase activity determines nuclear localization of serotonin immunoreactivity in the early embryos of invertebrates and vertebrates. *ACS Chem. Neurosci.* 2019. 10 (8): 3888–3899.
- Jiang Y., Langley B., Lubin F.D., Renthal W., Wood M.A., Yasui D.H., Kumar A., Nestler E.J., Akbarian S., Beckel-Mitchener A.C. Epigenetics in the nervous system. *J. Neurosci.* 2008. 28 (46): 11753–11759.
- Josselyn S., K'öhler S., Frankland P. Finding the engram. *Nat. Rev. Neurosci.* 2015. 16 (9): 521–534.
- Kandel E.R., Schwartz J.H. Molecular biology of an elementary form of learning: modulation of transmitter release by cyclic AMP. *Science.* 1982. 218 (4571): 433–443.
- Lepack A., Werner C., Stewart A.F., Fulton S.L., Zhong P., Farrelly L.A., Smith A.C.W., Ramakrishnan A., Lyu Y., Bastle R.M., Martin J.A., Mitra S., O'Connor R.M., Wang Z.J., Molina H., Turecki G., Shen L., Yan Z., Calipari E.S., Dietz D.M., Kenny P.J., Maze I. Dopaminylation of histone H3 in ventral tegmental area regulates cocaine seeking. *Science.* 2020. 368 (6487): 197–201.
- Levenson J., Sweatt J. Epigenetic mechanisms: A common theme in vertebrate and invertebrate memory formation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006. 63 (9): 1009–1016.
- Liu P., Zhang J., Li M., Sui N. Distinctive Roles of 5-aza-2'-deoxycytidine in anterior agranular insular and basolateral amygdala in reconsolidation of aversive memory associated with morphine in rats. *Front. Behav. Neurosci.* 2016. 10: 50.
- Lukowiak K., Heckler B., Bennett T.E., Schriener E.K., Wyrick K., Jewett C., Todd R.P., Sorg B.A. Enhanced memory persistence is blocked by a DNA methyltransferase inhibitor in the snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Exp. Biol.* 2014. 217 (Pt16): 2920–2929.
- Maddox S., Schafe G. Epigenetic alterations in the lateral amygdala are required for reconsolidation of a Pavlovian fear memory. *Learn. Mem.* 2011. 18 (9): 579–593.
- Maddox S., Watts C., Schafe G. DNA methyltransferase activity is required for memory-related neural plasticity in the lateral amygdala. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2014. 107: 93–100.
- Maity S., Farrell K., Navabpour S., Narayanan S.N., Jarome T.J. Epigenetic mechanisms in memory and cognitive decline associated with aging and Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. 22 (22): 12280.
- Marks P.A., Dokmanovic M. Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 2005. 14 (12): 1497–1511.
- Matsuo N. Irreplaceability of neuronal ensembles after memory allocation. *Cell. Rep.* 2015. 11 (3): 351–357.
- McGaugh J.L. Memory—a century of consolidation. *Science.* 2000. 287 (5451): 248–251.
- Mews P., Donahue G., Drake A.M., Luczak V., Abel T., Berger S.L. Acetyl-CoA synthetase regulates histone acetylation and hippocampal memory. *Nature.* 2017. 546 (7658): 381–386.
- Miller C., Gavin C., White J.A., Parrish R.R., Honsage A., Yancey C.R., Rivera I.M., Rubio M.D., Rumbaugh G., Sweatt J.D. Cortical DNA methyl-

- ation maintains remote memory. *Nat. Neurosci.* 2010. 13 (6): 664–666.
- Mizuno K., Dempster E., Mill J., Giese K.P. Long-lasting regulation of hippocampal Bdnf gene transcription after contextual fear conditioning. *Genes Brain Behav.* 2012. 11 (6): 651–659.
- Moorman S., Mello C.V., Bolhuis J.J. From songs to synapses – Molecular mechanisms of birdsong memory. *Bioessays.* 2011. 33(5): 377–385.
- Muma N.A., Mi Z. Serotonylation and transamidation of other monoamines. *ACS Chem. Neurosci.* 2015. 6 (7): 961–969.
- Oliveira A. DNA methylation: a permissive mark in memory formation and maintenance. *Learn. Mem.* 2016. 23 (10): 587–593.
- Patra S. Emerging histone glutamine modifications mediated gene expression in cell differentiation and the VTA reward pathway. *Gene.* 2021. 768: 145323.
- Pearce K., Cai D., Roberts A.C., Glanzman D.L. Role of protein synthesis and DNA methylation in the consolidation and maintenance of long-term memory in Aplysia. *Elife.* 2017. 6: e18299.
- Penney J., Tsai L.H. Histone deacetylases in memory and cognition. *Sci. Signal.* 2014. 7 (355): re12.
- Qian S., Shi C., Huang S., Yang C., Luo Y. DNA methyltransferase activity in the basolateral amygdala is critical for reconsolidation of a heroin reward memory. *Front. Mol. Neurosci.* 2022. 15: 1002139.
- Rajasethupathy P., Antonov I., Sheridan R., Frey S., Sander C., Tuschl T., Kandel E.R. A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity. *Cell.* 2012. 149 (3): 693–707.
- Rossin F., Ciccocanti F., D'Eletto M., Occhigrossi L., Fimia G.M., Piacentini M. Type 2 transglutaminase in the nucleus: the new epigenetic face of a cytoplasmic enzyme. *Cell. Mol. Life Sci.* 2023. 80 (2): 52.
- Rothwell C., Lukowiak K. Impairing DNA methylation obstructs memory enhancement for at least 24 hours in Lymnaea. *Commun. Integr. Biol.* 2017. 10 (3): e1306616.
- Stilling R., Röncke R., Benito E., Urbanke H., Capece V., Burkhardt S., Bahari-Javan S., Barth J., Sananbenesi F., Schütz A.L., Dyczkowski J., Martinez-Hernandez A., Kerimoglu C., Dent S.Y., Bonn S., Reymann K.G., Fischer A. K-Lysine acetyltransferase 2a regulates a hippocampal gene expression network linked to memory formation. *EMBO J.* 2014. 33 (17): 1912–1927.
- Sultan F., Day J. Epigenetic mechanisms in memory and synaptic function. *Epigenomics.* 2011. 3 (2): 157–181.
- Sunada H., Riaz H., de Freitas E., Lukowiak K., Swinton C., Swinton E., Protheroe A., Shymansky T., Komatsuzaki Y., Lukowiak K. Heat stress enhances LTM formation in Lymnaea: role of HSPs and DNA methylation. *J. Exp. Biol.* 2016. 219 (Pt9): 1337–1345.
- Tonegawa S., Pignatelli M., Roy D.S., Ryan T.J. Memory engram storage and retrieval. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2015. 35: 101–109.
- Vecsey C.G., Hawk J.D., Lattal K.M., Stein J.M., Fabian S.A., Attner M.A., Cabrera S.M., McDonough C.B., Brindle P.K., Abel T., Wood M.A. Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *J. Neurosci.* 2007. 27 (23): 6128–6140.
- Vinarskaya A.K., Balaban P.M., Roshchin M.V., Zuzina A.B. Sodium butyrate as a selective cognitive enhancer for weak or impaired memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2021. 180: 107414.
- Xu S., Wilf R., Menon T., Panikker P., Sarthi J., Elephant F. Epigenetic control of learning and memory in Drosophila by Tip60 HAT action. *Genetics.* 2014. 198 (4): 1571–1586.
- Yang Q., Antonov I., Castillejos D., Nagaraj A., Bostwick C., Kohn A., Moroz L.L., Hawkins R.D. Intermediate-term memory in Aplysia involves neurotrophin signaling, transcription, and DNA methylation. *Learn. Mem.* 2018. 25 (12): 620–628.
- Zhao S., Yue Y., Li Y., Li H. Identification and characterization of ‘readers’ for novel histone modifications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2019. 51: 57–65.
- Zlotorynski E. Histone serotonylation boosts neuronal transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019. 20 (6): 323.
- Zovkic I., Guzman-Karlsson M., Sweatt J. Epigenetic regulation of memory formation and maintenance. *Learn. Mem.* 2013. 20 (2): 61–74.
- Zuzina A.B., Vinarskaya A.Kh., Balaban P.M. Histone deacetylase inhibitors rescue the impaired memory in terrestrial snails. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 2020. 206 (4): 639–649.
- Zuzina A.B., Vinarskaya A.Kh., Balaban P.M., Roshchin M.V. Histone deacetylase inhibitor prevents memory impairment by methiothepin. In: *Advances in cognitive research, artificial intelligence and neuroinformatics.* Frankfurt: Springer, 2021. 619–631 pp.
- Zuzina A., Vinarskaya A. Increased histone acetylation levels or a serotonin precursor reinstate the context memory impaired by the serotonin receptor blocker methiothepin. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2022.

THE CONTRIBUTION OF EPIGENETIC MECHANISMS TO THE FORMATION, MAINTENANCE AND RECONSOLIDATION OF THE LONG-TERM FOOD AVERSIVE MEMORY IN TERRESTRIAL SNAIL

A. B. Zuzina^{a, #} and P. M. Balaban^a

^a*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Science, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: lucky-a89@mail.ru*

This work was devoted to the analysis of the role of epigenetic mechanisms (histone acetylation, DNA methylation, histone serotonylation) in the formation, storage, and reconsolidation of long-term food aversive memory in the snail. In the first part of the work, we investigated the effect of systemic administration of sodium butyrate, an inhibitor of histone deacetylase, in a model of conditioned food aversion reflex of the snail. We have shown that the administration of sodium butyrate to animals with poor memory resulted in memory enhancement. Further, in experiments using the DNA methyltransferase blocker RG108, it was found that impaired DNA methylation impairs long-term food aversive memory in the snail. However, memory reactivation neutralizes the effect of inhibiting the activity of DNA methyltransferases. In the final section of the work, the hypothesis of the involvement of transglutaminase-mediated serotonylation in the processes of reconsolidation of food aversive memory in the snail was tested. Behavioral analysis showed that administration of the transglutaminase blocker monodansylcadaverine (hence, blockade of serotonylation) after a reminder disrupted the reconsolidation process and led to memory suppression/erasure.

Keywords: histone acetylation, DNA methylation, histone serotonylation, transglutaminase, long-term memory, mollusk