

**ИНГИБИТОР ГИСТОНДЕАЦИТИЛАЗ УСИЛИВАЕТ
ДОЛГОВРЕМЕННУЮ СИНАПТИЧЕСКУЮ ПОТЕНЦИАЦИЮ
В НЕЙРОНАХ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ**

© 2021 г. Д. Е. Колотова¹, А. Ю. Мальшев¹, П. М. Балабан¹, *

¹*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия*

**E-mail: pmbalaban@gmail.com*

Поступила в редакцию 17.01.2021 г.

После доработки 09.02.2021 г.

Принята к публикации 09.02.2021 г.

В последнее время в литературе накапливается все больше данных о важной роли эпигенетических перестроек при формировании долговременной синаптической пластичности — основному клеточному механизму обучения и памяти. В данной работе мы изучили влияние ингибирования гистондеацетилаз, одного из видов эпигенетических модификаций, на формирование долговременной потенциации синаптических ответов в премоторных (командных) нейронах оборонительного поведения виноградной улитки. Потенциация синаптических входов премоторных нейронов лежит в основе аверзивной памяти этого животного. Мы показали, что применение ингибитора гистондеацетилаз бутирата натрия увеличивает амплитуду долговременной потенциации, вызванной пятикратной тетанизацией сенсорного нерва, совмещенной с аппликацией серотонина. Мы также обнаружили, что аппликация бутирата сама по себе вызывает увеличение амплитуды ВПСП через 4 ч после применения блокатора. Однако данное увеличение не может лежать в основе обнаруженного эффекта облегчения долговременной потенциации, который наблюдался на всем протяжении эксперимента. Таким образом, в нашей работе продемонстрирована роль модификации гистонов в механизмах синаптической пластичности.

Ключевые слова: эпигенетика, долговременная потенциация, ацетилирование гистонов, гистондеацетилаза, бутират натрия

DOI: 10.31857/S0869813921040105

ВВЕДЕНИЕ

Ацетилирование гистонов играет важную роль в эпигенетической регуляции синаптической пластичности и памяти у беспозвоночных и позвоночных животных [1, 2]. На ацетилирование гистонов оказывают влияние две группы ферментов — гистонацетильтрансферазы и гистондеацетилазы. В литературе последних лет накопилось много данных о важной роли баланса гистонацетильтрансфераз и гистондеацетилаз, изменения которого могут как нарушать, так и улучшать синаптическую пластичность, память и процессы обучения у взрослых животных [3]. Для изучения роли ацетилирования гистонов в регуляции синаптической пластичности эффективно применение ингибиторов гистондеацетилаз [4, 5], приводящих к усилению ацетилирования гистонов. В ряде работ, посвященных влиянию различных ингибиторов гистондеацетилаз на формирование долговременной синаптической пластичности показано, что ингибитор гистондеацетилаз класса I бутират натрия вли-

яет на долговременные изменения эффективности синаптической передачи на клеточных и поведенческих моделях [6–10]. Было показано, что ингибирование деацетилирования гистонов может приводить к усилению формирования долговременных синаптических изменений и улучшению памяти у беспозвоночных животных [7, 8, 11]. Также получены данные о том, что аппликация бутирата натрия приводит к усилению долговременной потенциации на срезах гиппокампа крыс [6]. Однако влияние ингибирования гистондеацетилаз на формирование долговременной потенциации у виноградной улитки – важного модельного объекта в нейробиологических исследованиях, ранее не было изучено в электрофизиологических экспериментах. В данной работе с помощью ингибитора гистондеацетилаз бутирата натрия исследовалось влияние ацетилирования гистонов на формирование долговременной потенциации у виноградной улитки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были проведены на улитках *Helix lucorum taurica* L. массой 20–30 г. За 1–2 нед. до эксперимента улиток помещали во влажную среду, где они находились в активном состоянии. Протокол экспериментов утвержден Этической комиссией Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Электрофизиологические эксперименты проводили на изолированной ЦНС улиток. Препарирование и идентификацию нейронов осуществляли по стандартной методике [12]. Перед началом препарирования производили инъекцию холодного изотонического раствора $MgCl_2$ для обездвиживания и обезболивания животного. Изолированную ЦНС помещали в физиологический раствор Рингера (мМ): 100 NaCl, 4 KCl, 7 CaCl₂, 5 MgCl₂, 10 Trizma, pH 7.6.

Внутриклеточную регистрацию активности премоторных (командных) интернейронов париетальных ганглиев (Pa3 и Pa2) проводили при помощи острых стеклянных микроэлектродов, заполненных ацетатом калия (2 М), сопротивлением 20–30 МОм. Регистрировали возбуждающие постсинаптические потенциалы (ВПСП), вызванные электрической стимуляцией интестинального нерва, не содержащего отростков регистрируемых нейронов. В каждом эксперименте амплитуду стимула подбирали таким образом, чтобы стимуляция вызывала не потенциалы действия, а ВПСП амплитудой 5–15 мВ.

В начале записи проводили 5 тестовых стимуляций с интервалом между стимулами 10 мин, затем осуществляли тетанизацию интестинального нерва (пачка стимулов частотой 10 Гц, длительность пачки 10 с, 10-кратное увеличение амплитуды тестового стимула). Всего тетанизацию осуществляли 5 раз с интервалом 5 мин. Перед каждой тетанизацией в экспериментальную ванночку добавляли серотонин (10^{-5} М), который отмывали через 2 мин после тетанизации. После пятой тетанизации продолжали тестирующую стимуляцию интестинального нерва с исходной амплитудой стимула каждые 10 мин в течение нескольких часов.

Первые 50 мин записи перфузионная система находилась в замкнутом режиме вплоть до момента первой тетанизации. В двух сериях экспериментов с ингибитором гистондеацетилаз в этот временной период в экспериментальной ванночке находился бутират натрия в концентрации 60 мкМ. После первой тетанизации (и первой аппликации серотонина) производился интенсивный “отмыв” препарата, который полностью удалял бутират из ванночки. После последней тетанизации система перфузии переводилась в разомкнутое состояние (отмыв), при этом скорость протока составляла 0.2 мл/мин при объеме ванночки 3 мл.

Достоверность изменений амплитуды синаптических потенциалов оценивали по статистическому критерию Манна–Уитни.

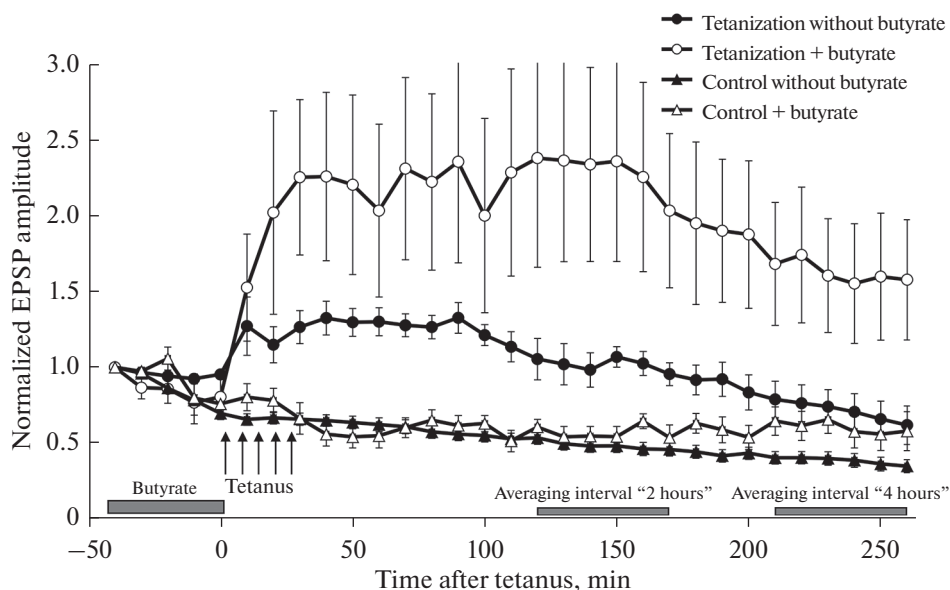


Рис. 1. Влияние бутирата натрия на формирование долговременной потенциации амплитуды комплексного ВПСП в премоторных (командных) гигантских нейронах париетальных ганглиев виноградной улитки, вызванной тетанизацией синаптического входа. Амплитуда ВПСП при первой тестовой стимуляции была принята за единицу. Серыми прямоугольниками обозначено время, когда бутират натрия присутствовал в экспериментальной ванночке и эпохи усреднения ВПСП, использованные для статистического анализа, и обозначаемые в тексте как “2 ч после тетанизации” и “4 ч после тетанизации”. На графике представлены средние значения \pm SEM.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ритмическая тестирующая стимуляция интестинального нерва с частотой 1 стимул в 10 мин приводила в течение нескольких часов к постепенному уменьшению амплитуд ВПСП в командных нейронах – феномен, хорошо описанный для данного препарата [12] и вызванный, скорее всего, гомосинаптической депрессией (привыканием) (рис. 1, заполненные треугольники). Для статистического анализа изменений амплитуд ответов мы выделили два временных окна в записи: 120–170 мин после первой тетанизации (это временное окно далее в тексте называется “2 ч после тетанизации”) и 210–260 мин после тетанизации (этот период в тексте будет обозначаться как “4 ч после тетанизации”). Пятикратная тетанизирующая стимуляция, совмещенная с аппликацией серотонина, вызывала выраженный рост амплитуд ВПСП (рис. 1, заполненные кружки). Так, через 2 ч после тетанизации усредненная амплитуда ВПСП составляла $101.8 \pm 8.8\%$ от исходной ($n = 12$), в то время как в контрольных экспериментах эффект ослабления ответа приводил к тому, что в той же временной точке амплитуда ВПСП составляла в среднем $48.1 \pm 4.1\%$, $n = 21$ ($p < 0.001$). Через 4 ч после тетанизации амплитуда ВПСП тетанизированных входов также превышала средние амплитуды ответов в контрольной группе ($71.7 \pm 11.8\%$, $n = 12$ и $38.3 \pm 4.1\%$, $n = 21$, $p < 0.05$). Ингибирование гистондеацетилаз путем добавления бутирата в экспериментальную ванночку за 1 ч до тетанизации приводило к достоверному увеличению амплитуды синаптической потенциации, вызванной сочетанным применением тетанизации нерва и аппликации серотонина (рис. 1, пустые кружки). Через 2 ч после тетанизации средняя амплитуда

ВПСР в группе с бутиратом составляла $220.8 \pm 59.4\%$ ($n = 14$) и была достоверно выше средних амплитуд ВПСР в группе тетанизации без бутирата ($101.8 \pm 8.8\%$, $n = 12$, $p < 0.01$). Через 4 ч после тетанизации амплитуда ответов в группе с бутиратом была также выше, чем в группе тетанизации без бутирата натрия (151 ± 38.7 , $n = 14$ и $71.7 \pm 11.8\%$, $n = 12$, $p < 0.05$), что говорит о долговременности эффекта.

Для выяснения возможного влияния бутирата натрия на амплитуду ВПСР в командных нейронах была поставлена специальная контрольная серия экспериментов, в которых бутират также присутствовал в экспериментальной ванночке первые 50 мин записи, после которых препарат интенсивно отмывался и система перфузии переводилась в открытый режим, как и в остальных сериях экспериментов, но тетанизации при этом не проводилось. Выяснилось, что само по себе добавление бутирата не вызывало изменения амплитуды ВПСР во временном окне “4 ч после тетанизации”. Средняя амплитуда ответов в этот временной период составляла $48.1 \pm 4.1\%$, $n = 21$ в контроле и 56.8 ± 6.1 , $n = 1$, для группы “контроль с бутиратом”. Однако через 4 ч в группе “контроль с бутиратом” начинался небольшой, но достоверный рост амплитуды ВПСР. Так, в группе “контроль без бутирата” средняя амплитуда ВПСР в эпоху анализа “4 ч после тетанизации” составляла $38.3 \pm 4.1\%$, $n = 21$, в то время как в группе “контроль с бутиратом” усредненная амплитуда синаптических ответов была достоверно выше и равнялась $60.4 \pm 9.5\%$, $n = 14$, $p < 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Прежде всего необходимо отметить, что исследованные в настоящей работе синаптические входы и идентифицированные нейроны прямо относятся к сети оборонительного поведения виноградной улитки. Роль гигантских FMRFamid-содержащих нейронов парietальных ганглиев хорошо описана [13], поэтому изменение эффективности синаптических входов к данным нейронам имеет прямое функциональное значение для регуляции оборонительного поведения животного.

На поведенческом уровне на этом животном проделана большая работа по выяснению возможности влияния двух различных ингибиторов гистондеацетилаз (бутирата натрия и трихостатина А) на оборонительное поведение и показаны достоверные эффекты увеличения величины оборонительных реакций улитки не только во время реконсолидации обстановочной памяти, но и восстановление памяти при ее нарушении двумя разными способами [2]. Существенным является тот факт, что введение ингибиторов гистондеацетилаз в этой работе без тестирования (реактивации) памяти не приводило к выраженным поведенческим эффектам при тестировании в течение нескольких дней, что предполагает регулирующее влияние ингибиторов гистондеацетилаз именно на молекулярную систему формирования и поддержания памяти. В настоящей работе эффекты ингибитора гистондеацетилаз без потенциации наблюдались только через несколько часов и были сравнительно слабо выраженными.

Полученные данные можно интерпретировать как нейросетевое объяснение поведенческих результатов на этих животных. С точки зрения возможной роли эпигенетических процессов в регуляции пластичности и памяти, можно сказать, что не только ингибиторы гистондеацетилаз, но и другие регулирующие факторы координированно влияют на уровень экспрессии генов. По-видимому, влияние этих факторов без сильных внешних стимулов (потенциация, подкрепление при обучении и т.д.) заторможено специальными системами “молекулярных тормозов” и только в условиях сильных внешних воздействий эпигенетическими регуляторами открывается “окно возможностей” для долговременных изменений [3]. Существенно отметить, что деацетилирование гистонов приводит к изменениям плотности упаковки хроматина, которые большей частью обратимы, и по сути только

открывают возможность (“окно”) для долговременных изменений экспрессии генов, которые в основном осуществляются путем метилирования ДНК [3, 14]. Полученные в настоящей работе данные позволяют считать, что обратимые посттрансляционные модификации гистонов служат основой для пластических изменений в функциональных сетях нейронов. В то же время именно метилирование ДНК и метил-зависимые способы регуляции трехмерной организации хроматина могут служить стабильной молекулярной основой для долговременного хранения пластических изменений и памяти [3, 14].

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-75-10067).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (К.Д.Е., М.А.Ю., Б.П.М.), сбор данных (К.Д.Е.), обработка данных (К.Д.Е., М.А.Ю.), написание и редактирование манускрипта (К.Д.Е., М.А.Ю., Б.П.М.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Campbell R.R., Wood M.A.* (2019) How the epigenome integrates information and reshapes the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 20: 133–147.
2. *Zuzina A.B., Vinarskaya A.K., Balaban P.M.* (2020) Histone deacetylase inhibitors rescue the impaired memory in terrestrial snails. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav Physiol.* 206: 639–649.
<https://doi.org/10.1007/s00359-020-01422-w>
3. *Borodinova A.A., Balaban P.M.* (2020) Epigenetic Regulation as a Basis for Long-Term Changes in the Nervous System: In Search of Specificity Mechanisms. *Biochemistry (Mosc.)*. 85: 994–1010.
4. *Penney J., Tsai L.H.* (2014) Histone deacetylases in memory and cognition. *Sci. Signal* 7: re12.
5. *Peixoto L., Abel T.* (2013) The role of histone acetylation in memory formation and cognitive impairments. *Neuropsychopharmacology*. 38: 62–76.
6. *Levenson J.M., O’Riordan K.J., Brown K.D., Trinh M.A., Molfese D.L., Sweatt J.D.* (2004) Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J. Biol. Chem.* 279: 40545–40559.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M402229200>
7. *Federman N., Fustiñana M.S., Romano A.* (2012) Reconsolidation involves histone acetylation depending on the strength of the memory. *Neuroscience*. 219: 145–156.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.05.057>
8. *Federman N., Fustiñana M.S., Romano A.* (2009) Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories. *Learn Mem.* 16: 600–606.
<https://doi.org/10.1101/lm.1537009>
9. *Lattal K.M., Barrett R.M., Wood M.A.* (2007) Systemic or Intrahippocampal Delivery of Histone Deacetylase Inhibitors Facilitates Fear Extinction. *Behav. Neurosci.* 121: 1125–1131.
<https://doi.org/10.1037/0735-7044.121.5.1125>
10. *Stefanko D.P., Barrett R.M., Ly A.R., Reolon G.K., Wood M.A.* (2009) Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 9447–9452.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0903964106>
11. *Chen S., Cai D., Pearce K., Sun P.Y.W., Roberts A.C., Glanzman D.L.* (2014) Reinstatement of long-term memory following erasure of its behavioral and synaptic expression in *Aplysia*. *Elife.* 3: 1–21.
<https://doi.org/10.7554/eLife.03896>

12. *Malyshev A.Y., Balaban P.M.* (2002) Identification of mechanoafferent neurons in terrestrial snail: Response properties and synaptic connections. *J. Neurophysiol.* 87: 2364–2371. <https://doi.org/10.1152/jn.00185.2001>
13. *Balaban P.M.* (2002) Cellular mechanisms of behavioral plasticity in terrestrial snail. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26: 597–630.
14. *Miller C.A., Sweatt J.D.* (2007) Covalent Modification of DNA Regulates Memory Formation. *Neuron.* 53: 857–869. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.02.022>

Histone Deacetylase Inhibitor Enhances Long-Term Synaptic Potentiation in the Neurons of a Grape Snail

D. E. Kolotova^a, A. Yu. Malyshev^a, and P. M. Balaban^{a, *}

^a*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia*

**e-mail: pmbalaban@gmail.com*

Recently, substantial amount of data was accumulated in the literature suggesting an important role of epigenetics in formation of long-term synaptic plasticity – the main cellular mechanism of learning and memory. In this work, we studied the effect of inhibition of histone deacetylases, one of the types of epigenetic modifications, on the formation of long-term potentiation of synaptic responses in premotor (command) neurons of the avoidance behavior of the grape snail. Potentiation of synaptic inputs in these neurons underlies aversive memory in this animal. We showed that histone deacetylase inhibitor sodium butyrate increases the amplitude of long-term potentiation caused by five tetanizations of the sensory nerve, combined with application of serotonin. We also found that application of sodium butyrate by itself caused an increase in EPSP amplitude 4 hours after application. However, this increase cannot underlie the observed effect of long-term potentiation, which was observed throughout the experiment. Thus, in our work, we have demonstrated the role of histone modifications in long-term changes in synaptic plasticity.

Keywords: epigenetics, long-term potentiation, histone acetylation, histone deacetylase, sodium butyrate