

Буренкова О.В., Александрова Е.А., Зарайская И.Ю.

Эффект блокатора гистоновых деацетилаз вальпроата натрия на постнатальное развитие мышечной линии 129SV

Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Вальпроат натрия в высоких дозировках применяется в качестве противосудорожного препарата, однако его пренатальный и ранний постнатальный прием связан с рядом побочных эффектов, в числе которых повышенный риск возникновения врожденных пороков развития плода и возникновения аутизма у детей. Эти обстоятельства лежат в основе его использования в экспериментальной модели аутизма у грызунов. Одной из мишеней действия вальпроата натрия являются гистоновые деацетилазы, блокатором которых он является, что позволяет использовать его в качестве инструмента для модуляции эпигенетических модификаций генома. Известно, что введение вальпроата натрия в дозировке 50 мг/кг массы неонатальным мышатам вызывает повышение ацетилирования гистона H3 в их мозге. Целью данной работы было изучение влияния введения вальпроата натрия в этой дозировке в первую неделю жизни мышат линии 129Sv на их физическое и соматосенсорное развитие в гнездовом периоде, для чего был использован стандартный прием оценки постнатального развития — батарея развитийных тестов. Результаты введения вальпроата натрия в дозировке 50 мг/кг в первую неделю жизни показали, что данная схема не приводит к нарушению физического, соматосенсорного развития и социального поведения мышат линии 129Sv в гнездовом периоде. Полученные результаты говорят о возможности использования вальпроата натрия в указанной дозировке для дальнейшей экспериментальной модуляции уровня ацетилирования гистонов в развивающемся мозге.

Ключевые слова: эпигенетика; ацетилирование гистона H3; блокада гистоновых деацетилаз; вальпроат натрия; модификация поведения; сенсомоторное развитие

Burenkova O.V., Aleksandrova E.A., Zarayskaya I.Yu.

Effects of histone deacetylase inhibitor sodium valproate on the physical and behavioral development of 129SV mice

P.K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology, Russian Federation, 125315, Moscow, Baltiyskaya st., 8

Sodium valproate is a widely used antiepileptic drug at high dosage levels, but it has been shown to produce a variety of toxic side-effects when used during perinatal period. These effects include increased risk of congenital anomalies and autism. For this reason, valproate is commonly employed in animal model of autism. Sodium valproate has multiple molecular targets including histone deacetylases. Therefore valproate can be utilized as a tool for the modulation of epigenetic modifications of the genome via inhibition of histone deacetylases. It is known that administration of sodium valproate at a dose of 50 mg/kg during early postnatal period leads to increase of the histone H3 acetylation level in the brain. The aim of the present study was to evaluate the effects of multiple valproate injections from 3rd to 6th postnatal day (50 mg/kg s.c.) on physical and sensorimotor development of 129Sv mice. The standard battery of tests was used. Our results show that valproate have no negative effect on physical development, sensorimotor function, and social behavior. The obtained results support the applicability of sodium valproate in our dosing schedule for further experimental modulation of histone acetylation level in the developing brain.

Key words: epigenetics; acetylation of histone H3; histone deacetylase blockade; sodium valproate; behavior modification; sensorimotor development

Вальпроевая кислота и ее натриевая соль (вальпроат натрия) известны, прежде всего, как противосудорожные препараты, действие которых обусловлено активацией тормозной ГАМКергической системы, подавлением возбуждающей глутаматергической сис-

темы, а также общим снижением метаболизма в мозге при использовании его в лечебных дозах [1]. Однако пренатальный и ранний постнатальный прием вальпроата является причиной 10-кратного возрастания риска развития аутизма у детей [2]. Использование вальпроата в дозировках, вызывающих нарушения развития нервной системы, лежит в основе экспериментальной модели аутизма у грызунов. Нарушения

Для корреспонденции: Буренкова Ольга Владимировна, к.б.н., м.н.с. лаб. системогенеза поведения ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина», e-mail: o.burenkova@nphys.ru

обусловлены тератогенным действием и манифестируются в нарушении социального поведения, двигательного и когнитивного развития, а также внимания. Используемые с этой целью дозировки достаточно высоки. Беременным самкам мышей и крыс вальпроат вводят в дозировках 200—600 мг/кг, а при постнатальном — от 150 мг/кг [3—5].

Еще один механизм действия вальпроата — блокада гистоновых деацетилаз, приводящая к увеличению уровня ацетилирования гистонов — используется как инструмент для модуляции эпигенетических модификаций генома. Ацетилирование гистонов — ключевой фактор, влияющий на структуру хроматина и транскрипцию генов [6]. Высокий уровень ацетилирования гистонов в мозге потомства крыс определяется высоким уровнем материнского поведения самок [7], содержанием животных в обогащенной среде [8]. Напротив, депривация от матери снижает уровень ацетилирования в мозге мышей [9]. Введение блокаторов гистоновых деацетилаз половозрелым крысам приводит к увеличению уровня ацетилирования гистонов в их мозге [10] и улучшает память в моделях слабого обучения [11, 12].

Введение вальпроата натрия в дозировке 50 мг/кг неонатальным мышатам вызывает повышение ацетилирования гистона H3 в мозге [13] и улучшает результаты раннего обонятельного обучения у самцов мышей [14]. Однако вопрос о том, как вальпроат натрия, вводимый мышам в раннем онтогенезе в дозировках, вызывающих повышение ацетилирования

в мозге, влияет на соматосенсорное развитие в гнездовом периоде, остается открытым.

Цель работы — изучение влияния введения вальпроата натрия в дозировке 50 мг/кг в первую неделю жизни мышат линии 129Sv на их физическое и соматосенсорное развитие в гнездовом периоде. Для этого мы использовали стандартный прием оценки постнатального развития — батарею развития тестов.

Методика

Эксперименты проводили в соответствии с требованиями приказа №267 МЗ РФ (19.06.2003 г.), и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина РАМН, протокол №1 от 3.09.2005 г.).

Самок мышей линии 129Sv с видимыми признаками беременности отсаживали от самцов. День обнаружения потомства принимали за 1-е постнатальные сутки (ПС). Перед началом всех манипуляций с потомством самку отсаживали от помета в отдельную клетку-переноску с водой и кормом. На 2ПС потомство взвешивали, определяли пол, наносили и затем поддерживали индивидуальные метки. Животным из группы «физраствор» на 3-и, 4-е, 5-е и 6-е ПС подкожно вводили по 25 мкл физраствора. Животным из группы «вальпроат» — по 25 мкл раствора вальпроата натрия («Sigma», дозировка — 50 мг/кг массы

Таблица

Число использованных животных и сроки проведения тестов

Тест / сроки проведения теста, постнатальные сутки	Группа	Число использованных животных в каждый из дней проведения теста
		Пол: М/Ж
Прозревание / 12 — 20	"Интактные"	14/13, 14/15, 13/15, 12/15, 11/15, 11/15, 10/15, 10/14, 10/12
	"Физраствор"	15/11, 16/14, 15/12, 15/9, 15/9, 15/9, 15/8, 12/8, 11/6
	"Вальпроат"	16/13, 15/12, 14/10, 14/5, 14/6, 14/6, 13/5, 9/5, 9/4
Достижение гнезда / 10 — 15	"Интактные"	4/5, 5/5, 4/5, 4/5, 4/4, 3/4
	"Физраствор"	5/6, 6/5, 5/5, 6/4, 4/4, 5/4
	"Вальпроат"	5/4, 6/5, 6/5, 5/5, 5/3, 5/4
Достижение опоры перекладины / 17 — 20	"Интактные"	13/15, 13/15, 12/14, 12/12
	"Физраствор"	15/12, 15/11, 12/10, 12/8
	"Вальпроат"	14/11, 14/8, 10/6, 11/6
Спуск в чистую клетку / 17 — 20	"Интактные"	13/15, 13/15, 12/14, 12/12
	"Физраствор"	15/12, 14/11, 12/10, 12/8
	"Вальпроат"	14/11, 14/8, 10/6, 11/6
Спуск в домашнюю клетку / 17 — 20	"Интактные"	13/15, 13/15, 11/14, 12/12
	"Физраствор"	15/12, 15/11, 9/10, 12/8
	"Вальпроат"	14/11, 14/8, 9/6, 11/6

тела животного, растворитель — физраствор). Мышатам из группы «интактные» инъекций не делали. Через 30 мин после процедуры мышат и матерей возвращали в домашние клетки. Данные по самцам и самкам анализировали отдельно, так как уровень ацетилирования гистонов в мозге самцов и самок в раннем онтогенезе различается [15, 16].

Для оценки физического развития мышат ежедневно взвешивали, а с 12ПС отслеживали их созревание. С помощью теста достижения гнезда оценивали способность мышат распознавать запах гнезда, который является для них социально-значимым фактором, а поиск гнезда требует развития локомоции [17]. Перед началом тестирования мышат отсаживали в индивидуальные боксы для получасовой депривации. Затем их возвращали в домашнюю клетку, помещая в противоположный от гнезда конец клетки

не более трех мышат, а остальных высаживая непосредственно в гнездо. Регистрировали время достижения детенышами гнезда. Длительность теста — 300 с. Тест достижения опоры горизонтальной перекладины использовали для оценки уровня развития моторной координации [18]. Каждого детеныша помещали передними лапами на середину деревянной цилиндрической перекладины диаметром 0,3 см и длиной 15,5 см, горизонтально закрепленной на двух вертикальных опорах на высоте 15,5 см от поверхности стола. Регистрировали время достижения опоры. Тест спуска в чистую клетку использовали для оценки уровня тревожности. Мышат по одному высаживали на платформу размером 9 x 9 см и высотой 9,5 см, помещенную в чистую пустую клетку для содержания мышей. Регистрировали время спуска с платформы. Длительность теста — 120 с. Тест спу-

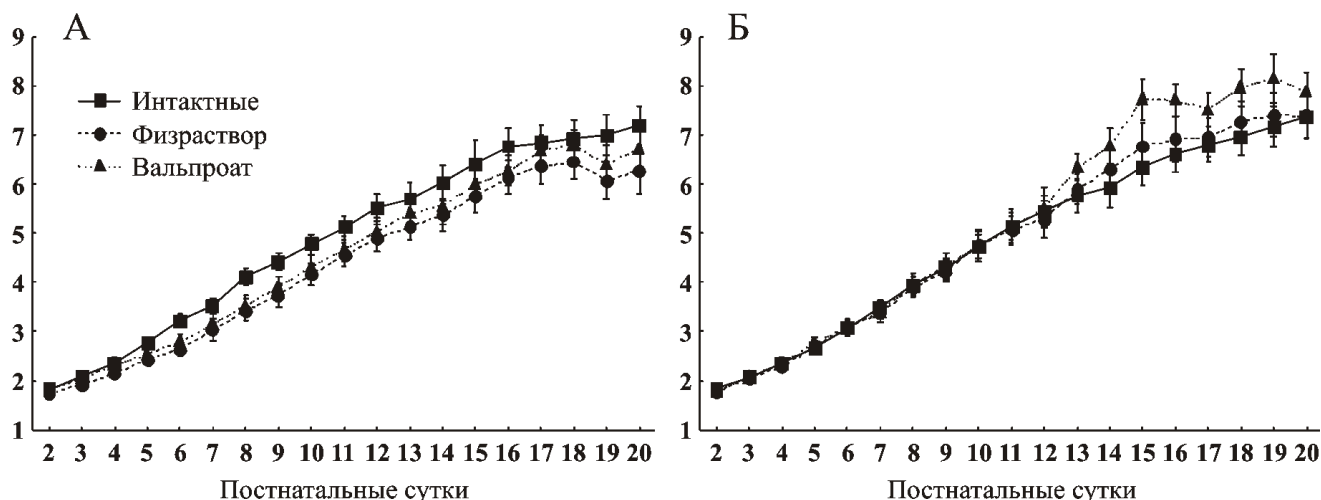


Рис. 1. Масса тела мышат в возрасте 2-20ПС: А — самцов, Б — самок (г) (среднее значение ± стандартная ошибка).

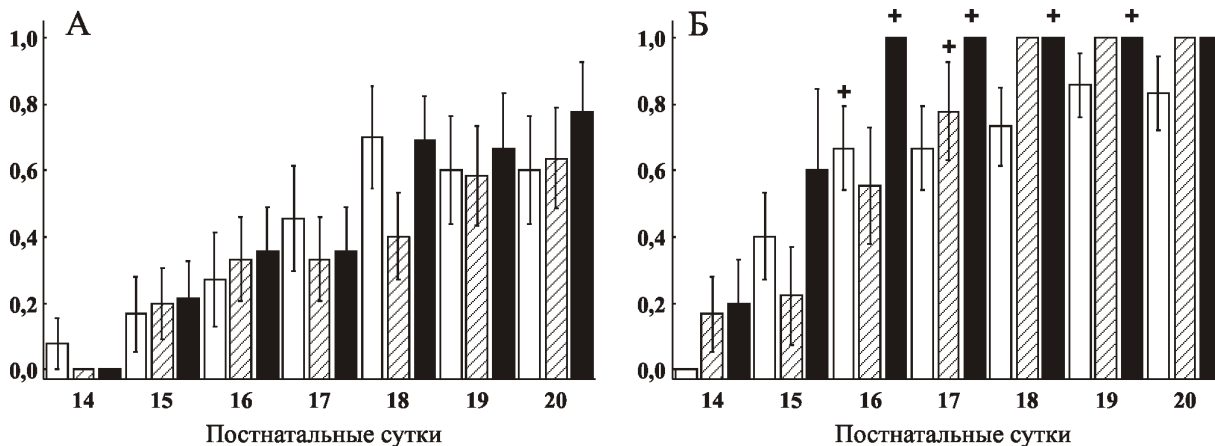


Рис. 2. Степень открывания глаз (балл «1» = оба глаза были полностью открыты, балл «0» = остальные случаи) (среднее значение ± стандартная ошибка), усреднено по обоим глазам (с): А — самцов, Б — самок. Белые столбики — «интактные», заштрихованные — «физраствор», черные — «вальпроат». Крестом обозначены межполовые различия ($p < 0,05$) (непараметрический критерий χ^2).

ска в домашнюю клетку был аналогичен тесту спуска в чистую клетку, за исключением того, что платформа располагалась в домашней клетке каждого помета. Информация о числе использованных животных и сроках проведения тестов представлены в таблице.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Statistica 6.0». Использовали непараметрический U-критерий Манна—Уитни. Результаты прозревания оценивали с помощью непараметрического критерия χ^2 .

Результаты и обсуждение

Введение вальпроата натрия не сказалось на массе тела мышат со 2ПС по 20ПС (рис. 1).

Анализ сроков прозревания мышат выявил только межполовые различия во всех исследованных группах (рис. 2). Межгрупповые различия у животных обоих полов отсутствовали.

Таким образом, физическое развитие мышат 129Sv после четырехразового введения вальпроата натрия с 3ПС по 6ПС в дозировке 50 мг/кг массы тела не отличалось от показателей интактных. Известно, что использование более высоких дозировок (от 75 до 150 мг/кг — постнатально, 200—600 мг/кг — пренатально) приводит к замедлению физического развития крысят [19, 20].

Не сказалось введение вальпроата натрия и на результатах теста достижения опоры перекладины, в котором межгрупповые отличия не были выявлены ни в один из проанализированных дней (17-20ПС) (данные не приводятся). Это свидетельствует о том, что его использование в качестве блокатора гистоновых деацетилаз не влияет на формирование координационно-моторных навыков в отличие от эффектов высоких дозировок, при которых нарушения моторных функций обнаружены [4, 5].

В тесте достижения гнезда (рис. 3), проводившемся с 10ПС по 15ПС, на 13ПС самцы из группы «вальпроат» достигали гнездо быстрее, чем из группы «интактные» ($U = 2,0$; $Z = 2,0$; $p = 0,050$). На 15ПС самки из группы «вальпроат» опережали по этому показателю самок из группы «физраствор» ($U = 0,0$; $Z = 2,3$; $p = 0,021$) и «интактные» ($U = 0,0$; $Z = 2,3$; $p = 0,021$). Тест достижения гнезда мышатами, помимо оценки формирования координационно-моторных навыков, использовался нами также для оценки способности к распознаванию запаха. Результаты теста свидетельствуют об отсутствии отрицательного влияния вальпроата в используемой дозировке на социальное поведение, к которому относится поиск гнезда, в отличие от эффектов высоких дозировок в моделях экспериментального аутизма [3, 19].

Результаты согласуются с ранее полученными данными об улучшении процесса раннего обонятельного обучения с материнским подкреплением у самцов на 8ПС после введения аналогичных низких дозировок вальпроата натрия [14].

Оценка способности к спуску в домашнюю клетку с 17ПС по 20ПС не выявила межгрупповых различий у самцов (данные не приводятся). Однако самки из группы «вальпроат» на 20ПС замедляли спуск в домашнюю клетку по сравнению с самками из группы «физраствор» ($U = 7,5$; $Z = 2,1$; $p = 0,033$) (рис. 4). Причиной этому могла бы служить компонента уровня тревожности самок. Однако анализ времени спуска в чистую клетку не выявил межгрупповых различий ни у самцов, ни у самок (данные не приводятся).

Таким образом, результаты введения вальпроата натрия в дозировке 50 мг/кг массы в первую неделю жизни показали, что данная схема не приводит к нарушению физического и соматосенсорного развития мышат линии 129Sv в гнездовом периоде, что позволяет избежать отрицательных последствий для ЦНС,

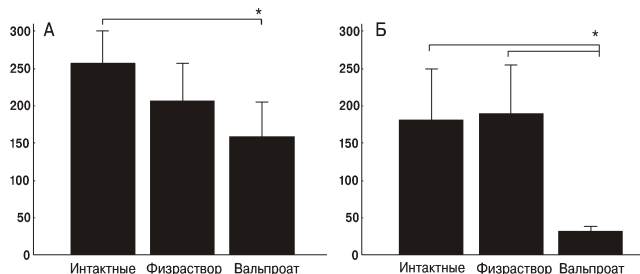


Рис. 3. Время достижения гнезда на 13ПС самцами (А) и 15ПС самками (Б) (среднее значение \pm стандартная ошибка) (с); * — $p < 0,05$ (U-критерий Манна—Уитни).

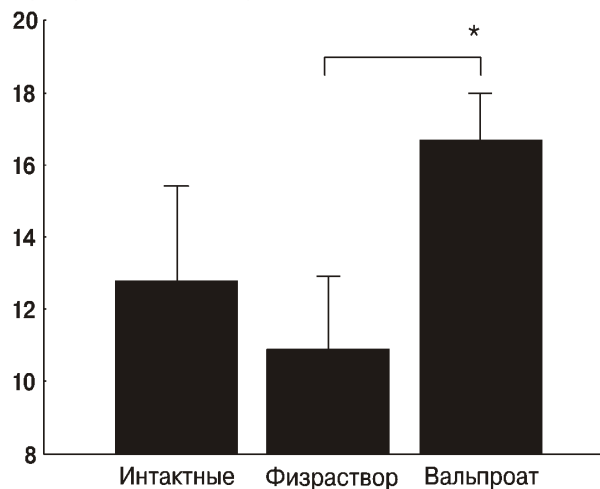


Рис. 4. Время спуска в домашнюю клетку на 20ПС у самок (среднее значение \pm стандартная ошибка) (с). * — $p < 0,05$ (U-критерий Манна—Уитни).

наблюдаемых при больших дозировках в модели аутизма. Полученные результаты указывают на возможность использования механизма блокады гистоновых деацетилаз с помощью вальпроата натрия в указанной дозировке для дальнейшей экспериментальной модуляции уровня ацетилирования гистонов в развивающемся мозге.

Работа поддержана грантом РФФИ
№14-04-01768.

Список литературы

- Johannessen C.U., Johannessen S.I. Valproate: past, present, and future. *CNS Drug Rev.* 2003; 9(2): 199-216.
- Rasalam A., Hailey H., Williams J., Moore S., Turnpenny P., Lloyd D. et al. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Dev. Med. Child Neurol.* 2005; 47(8): 551-5.
- Мальшев А.В., Разумкина Е.В., Дубынин В.А., Мясоедов Н.Ф. Семакс ослабляет проявления мозговой дисфункции, вызванной пренатальным введением вальпроевой кислоты. *Доклады Академии наук.* 2013; 450(3): 361-5.
- Reynolds S., Millette A., Devine D.P. Sensory and motor characterization in the postnatal valproate rat model of autism. *Dev. Neurosci.* 2012; 34(2-3): 258-67.
- Wagner G.C., Reuhl K.R., Cheh M., McRae P., Halladay A. A new neurobehavioral model of autism in mice: pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *J. Autism Dev. Disord.* 2006; 36(6): 779-93.
- Strahl B.D., Allis C.D. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000; 403(6765): 41-5.
- Weaver I.C.G., Cervoni N., Champagne F.A., D'Alessio A., Sharma S., Seckl J. et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience.* 2004; 7(8) 847-54.
- Fischer A., Sananbenesi F., Wang X., Dobbin M., Tsai L.H. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature.* 2007; 447(7141): 178-82.
- Tesone-Coelho C., Morel L.J., Bhatt J., Estevez L., Naudon L., Giros B. et al. Vulnerability to opiate intake in maternally deprived rats: implication of MeCP2 and of histone acetylation. *Addict. Biol.* 2013.
- Roth T.L., Sweatt J.D. Regulation of chromatin structure in memory formation. *Current opinion in neurobiology.* 2009; 19(3): 336-42.
- Day J.J., Sweatt J.D. Cognitive neuroepigenetics: a role for epigenetic mechanisms in learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2011; 96(1): 2-12.
- Levenson J.M., O'Riordan K.J., Brown K.D., Trinh M., Molfese D., Sweatt J.D. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *The Journal of biological chemistry.* 2004; 279(39): 40545-59.
- Murray E.K., Hien A., de Vries G.J., Forger N.G. Epigenetic control of sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Endocrinology.* 2009; 150(9): 4241-7.
- Буренкова О.В., Александрова Е.А., Зарайская И.Ю. Гендер-зависимое действие блокатора гистоновых деацетилаз вальпроата натрия на раннее обоня-

тельное обучение мышей линии 129Sv. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 2013; 99(2): 212-20.

15. Matsuda K.I., Mori H., Kawata M. Epigenetic mechanisms are involved in sexual differentiation of the brain. *Reviews in endocrine & metabolic disorders.* 2012; 13(3): 163-71.

16. Tsai H., Grant P.A., Rissman E.F. Sex differences in histone modifications in the neonatal mouse brain. *Epigenetics.* 2009; 4(1): 47-53.

17. Altman J., Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.* 1975; 23(4): 896-920.

18. Fox W.M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim. Behav.* 1965; 13(2): 234-41.

19. Chomiak T., Karnik V., Block E., Hu B. Altering the trajectory of early postnatal cortical development can lead to structural and behavioural features of autism. *BMC Neurosci.* 2010; 11(102): 1-10.

20. Diaz J., Shields W.D. Effects of dipropylacetate on brain development. *Ann. Neurol.* 1981; 10(5): 465-8.

Поступила 22.12.14

References

- Johannessen C.U., Johannessen S.I. Valproate: past, present, and future. *CNS Drug Rev.* 2003; 9(2): 199-216.
- Rasalam A., Hailey H., Williams J., Moore S., Turnpenny P., Lloyd D. et al. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Dev. Med. Child Neurol.* 2005; 47(8): 551-5.
- Malyshev A.V., Razumkina E.V., Dubynin V.A., Myasoedov N.F. Semax corrects brain dysfunction caused by prenatal introduction of valproic acid. *Dokl Biol Sci.* 2013; 450(3): 126-9. (in Russian)
- Reynolds S., Millette A., Devine D.P. Sensory and motor characterization in the postnatal valproate rat model of autism. *Dev. Neurosci.* 2012; 34(2-3): 258-67.
- Wagner G.C., Reuhl K.R., Cheh M., McRae P., Halladay A. A new neurobehavioral model of autism in mice: pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *J. Autism Dev. Disord.* 2006; 36(6): 779-93.
- Strahl B.D., Allis C.D. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000; 403(6765): 41-5.
- Weaver I.C.G., Cervoni N., Champagne F.A., D'Alessio A., Sharma S., Seckl J. et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience.* 2004; 7(8) 847-54.
- Fischer A., Sananbenesi F., Wang X., Dobbin M., Tsai L.H. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature.* 2007; 447(7141): 178-82.
- Tesone-Coelho C., Morel L.J., Bhatt J., Estevez L., Naudon L., Giros B. et al. Vulnerability to opiate intake in maternally deprived rats: implication of MeCP2 and of histone acetylation. *Addict. Biol.* 2013.
- Roth T.L., Sweatt J.D. Regulation of chromatin structure in memory formation. *Current opinion in neurobiology.* 2009; 19(3): 336-42.
- Day J.J., Sweatt J.D. Cognitive neuroepigenetics: a role for epigenetic mechanisms in learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2011; 96(1): 2-12.
- Levenson J.M., O'Riordan K.J., Brown K.D., Trinh M., Molfese D., Sweatt J.D. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *The Journal of biological chemistry.* 2004; 279(39): 40545-59.
- Murray E.K., Hien A., de Vries G.J., Forger N.G. Epigenetic control of sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Endocrinology.* 2009; 150(9): 4241-7.
- Буренкова О.В., Александрова Е.А., Зарайская И.Ю. Гендер-зависимое действие блокатора гистоновых деацетилаз вальпроата натрия на раннее обоня-

acetylation during memory formation in the hippocampus. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279(39): 40545-59.

13. Murray E.K., Hien A., de Vries G.J., Forger N.G. Epigenetic control of sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Endocrinology*. 2009; 150(9):4241-7.

14. Burenkova O.V., Aleksandrova E.A., Zарайская I.Iu. Gender-dependent effects of histone deacetylase inhibitor sodium valproate on early olfactory learning in 129Sv mice. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 2013; 99(2): 212-20. (in Russian)

15. Matsuda K.I., Mori H., Kawata M. Epigenetic mechanisms are involved in sexual differentiation of the brain. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2012; 13(3): 163-71.

16. Tsai H., Grant P.A., Rissman E.F. Sex differences in histone modifications in the neonatal mouse brain. *Epigenetics*. 2009; 4(1): 47-53.

17. Altman J., Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.* 1975; 23(4): 896-920.

18. Fox W.M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim. Behav.* 1965; 13(2): 234-41.

19. Chomiak T., Karnik V., Block E., Hu B. Altering the trajectory of early postnatal cortical development can lead to structural and behavioural features of autism. *BMC Neurosci*. 2010; 11(102): 1-10.

20. Diaz J., Shields W.D. Effects of dipropylacetate on brain development. *Ann. Neurol.* 1981; 10(5): 465-8.

Received 22.12.14

Сведения об авторах:

Александрова Елена Андреевна, к.м.н., с.н.с. лаб. системогенеза поведения ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина», e-mail: e.alexandrova@nphys.ru

Зарайская Ирина Юрьевна, к.б.н., зав. лаб. системогенеза поведения ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина», e-mail: i.zarayskaya@nphys.ru