

ДЕЙСТВИЕ НЕОНАТАЛЬНЫХ ВВЕДЕНИЙ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОТОКСИНА НА ПОВЕДЕНИЕ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ИОНОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА В ГИППОКАМПЕ ВЗРОСЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ ПСИХОГЕННОЙ ТРАВМЫ

© 2021 В.А. Никитина¹, М.В. Захарова², А.Н. Трофимов¹, А.П. Шварц²,
Г.В. Безнин¹, С.Г. Цикунов¹, О.Е. Зубарева^{2*}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376 Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
194223 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: zubarevae@mail.ru

Поступила в редакцию 06.12.2020

После доработки 26.04.2021

Принята к публикации 28.04.2021

Согласно «двухударной» гипотезе формирования психонейропатологии, инфекционные заболевания, перенесённые в критические периоды раннего онтогенеза, нарушают нормальное развитие мозга, повышая чувствительность к стрессам в последующей жизни. Эти нарушения могут быть связаны с изменениями функциональной активности глутаматергической системы гиппокампа. В данной работе изучены особенности экспрессии генов ионотропных глутаматных NMDA (GluN1, GluN2a, GluN2b) и AMPA (GluA1, GluA2) рецепторов, а также транспортера глутамата EAAT2 в вентральном и дорзальном отделах гиппокампа крыс, получавших бактериальный липополисахарид (ЛПС) в течение третьей недели жизни и переживших витальный стресс (контакт с хищником – питоном) во взрослом возрасте. Тестирование производили через 25 дней после стресса. Нарушения были обнаружены в вентральном, но не дорзальном отделе гиппокампа. Нестрессированные крысы, которым неонатально вводили ЛПС, имели более низкий уровень белка GluN2b по сравнению с нестрессированным контролем, однако после стресса у них (но не у контрольных животных) уровень GluN2b значительно увеличивался. Различные реакции на стресс у экспериментальных и контрольных крыс выявлены также по показателям исследовательского поведения: в первую минуту после помещения в «Открытое поле» у стрессированных контрольных крыс активность увеличивалась, а у стрессированных экспериментальных – снижалась. Кроме того, стрессированные и нестрессированные крысы, которым в раннем возрасте вводили ЛПС, отличались большим временем, проведённым в открытых рукавах «Приподнятого крестообразного лабиринта» и пониженным уровнем кортикостерона в крови. Таким образом, воздействие бактериальным ЛПС в раннем постнатальном онтогенезе влияет на характер стресс-индуцированных изменений поведения и на особенности экспрессии генов субъединиц ионотропных рецепторов глутамата в гиппокампе после психогенной травмы, перенесённой во взрослом возрасте.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: липополисахарид, раннее развитие, гиппокамп, стресс-реактивность, NMDA-рецептор, AMPA-рецептор, кортикостерон, поведение.

DOI: 10.31857/S0320972521060129

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы активно обсуждается роль раннего опыта в развитии повышенной уязвимости к стресс-индуцированным психопатологическим состояниям [1, 2]. Эта проблема рас-

сматривается, в частности, в рамках «двухударной» гипотезы, согласно которой стрессы, инфекционные заболевания и другие патологические состояния, имевшие место в критические периоды раннего онтогенеза, нарушают нормальное развитие мозга, повышая чувствительность к стрессам, перенесённым в подростковом и взрослом возрасте [3–5]. В качестве одного из повреждающих факторов могут выступать бактериальные инфекции, экспериментальной моделью которых является введение элемента клеточной стенки грамотрицательных бактерий – липополисахарида (ЛПС, эндотоксин). Ранее было показано, что введение ЛПС в раннем онтогенезе может оказывать долговременное повреждающее действие на функции ЦНС,

Принятые сокращения: ЛПС – липополисахарид, эндотоксин; ОП – тест «Открытое поле»; ПКЛ – тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»; ПТСР – посттравматическое стрессовое расстройство; AMPA – α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота); EAAT2 – excitatory amino acid transporter 2 (возбуждающий аминокислотный транспортер 2); NMDA – N-methyl-D-aspartate (N-метил-D-аспартат).

* Адресат для корреспонденции.

вызывая нарушение когнитивных функций и эмоционального поведения [6–11]. Ряд данных указывает на изменение стресс-реактивности животных, которым вводили ЛПС в раннем возрасте [12, 13].

Механизмы ЛПС-индуцированных нарушений поведения и стресс-реактивности остаются малоизученными. В качестве одного из возможных механизмов рассматривается нарушение функциональной активности глутаматергической системы мозга, связанное, в частности, с нарушением формирования ионотропных NMDA- и AMPA-глутаматных рецепторов [14]. Эти рецепторы имеют сложную субъединичную структуру. NMDA-рецепторный комплекс представляет собой гетеротетрамер, состоящий из облигатной GluN1-субъединицы и вариантных субъединиц GluN2 (a–d) либо GluN3 (a, b), благодаря которым обеспечивается функциональная и региональная вариативность NMDA-рецепторов [15]. AMPA-рецепторы состоят из 4 субъединиц GluA (1–4). AMPA-рецепторы, содержащие субъединицу GluA2, непроницаемы для ионов кальция [16]. Формирование характерного для взрослых особей субъединичного состава NMDA- и AMPA-рецепторов в мозге крыс происходит в первые недели жизни [17–21]. Введение ЛПС в эти сроки приводит к краткосрочным и долговременным изменениям экспрессии генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов в гиппокампе и коре мозга [10, 11, 14].

Хорошо известно, что NMDA- и AMPA-рецепторы принимают участие в реализации когнитивных функций [22–25] и психоэмоциональных реакций [26]. Экспрессия генов этих рецепторов в гиппокампе изменяется при стрессе [27, 28]. Предполагается, что ионотропные глутаматные рецепторы опосредуют угасание страха; нарушение этой реакции играет ключевую роль в патофизиологии посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) [29, 30]. Использование антагонистов NMDA-рецепторов позволяет предотвратить стресс-индуцированные гормональные и поведенческие нарушения [31, 32], что доказывает их вовлеченность в регуляцию этих реакций.

Ещё одним белком, влияющим на активность глутаматергической системы, является транспортёр глутамата EAAT2 (GLT-1). Он продуцируется в основном астроцитами и обеспечивает обратный захват этими клетками до 90% глутамата из синаптической щели, являясь, таким образом, основным регулятором уровня внеклеточного глутамата [33]. Изменение продукции EAAT2 в гиппокампе отмечается при выученной беспомощности, являющейся мо-

делью депрессии [34], и у взрослых крыс, переживших социальный стресс (разлучение с матерью) в неонатальном периоде [35]. Особенности экспрессии гена, кодирующего EAAT2, в мозге взрослых стрессированных животных, которым в раннем возрасте вводили ЛПС, ранее не изучались.

Целью данной работы явилось исследование сочетанных влияний неонатальных введений ЛПС и витального стресса, перенесённого во взрослом возрасте, на поведение, уровень кортикостерона, а также продукцию EAAT2 и субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов в дорзальной и вентральной областях гиппокампа крыс. Модель стресса (контакт крыс с хищником — питоном) и сроки тестирования были выбраны на основе исследований, проведённых нами ранее, так как было показано, что данный вид стресса влияет на экспрессию изучаемых генов [36]. Необходимость дифференциального анализа вентрального и дорзального отделов гиппокампа была обусловлена функциональными различиями этих областей, а также тем, что стресс по-разному регулирует экспрессию генов рецепторов глутамата и EAAT2 в его дорзальном и вентральном отделах [27, 37].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Общий план экспериментов. Исследование выполнено на самцах крыс Вистар с соблюдением принципов гуманности (Директивы Европейского Сообщества № 86/609 ЕС), одобренных Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ». Схема эксперимента представлена на рис. 1. Крысят содержали с матерями, по одному помёту в клетке (всего 14 помётов). Количество крысят в помёте выравнивали (в помёте оставляли не более 7–8 крысят), часть самок при необходимости оставляли, но в экспериментах не использовали. Бактериальный липополисахарид (серотип 055:B5 *Escherichia coli*, 50 мкг/кг; «Sigma-Aldrich», США) либо апиrogenный физиологический раствор вводили внутривентрально 1 раз в сутки, на 15, 18 и 21 дни жизни. Крысят разлучали с матерями не более чем на одну минуту. В каждом помёте были и контрольные, и экспериментальные животные. В возрасте 1 мес. крысят отсаживали от самки. Дозировка ЛПС была выбрана на основе ранее проведённых исследований как умеренно пирогенная и влияющая на экспрессию генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов [10].

Стрессирование. В возрасте 3 мес. половину экспериментальных ($n = 16$) и контрольных

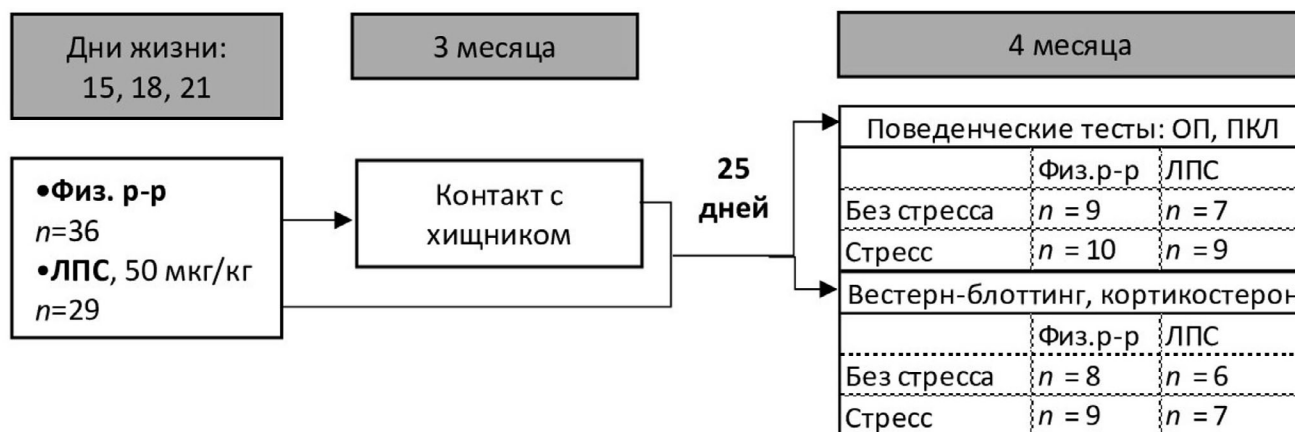


Рис. 1. Схема эксперимента

($n = 19$) животных подвергали стрессу, заключающемуся в переживании обстоятельств гибели сородича и угрозы собственной жизни от действий хищника — питона [38]. Для этого группу, состоящую из опытных и контрольных крыс (в общей сложности 17–20 животных), помещали в террариум к голодному питону, одна из них становилась жертвой пищевых потребностей хищника. Остальные крысы, находившиеся в террариуме, подвергались переживанию стрессовой ситуации: они находились в установке ещё в течение 20–25 мин. Затем крыс изымали из террариума и возвращали в домашние клетки, в которых они содержались до проведения поведенческого тестирования или забора биологического материала для дальнейшего анализа. Для сравнения использовали нестрессированных экспериментальных и контрольных животных.

Поскольку нас интересовали долговременные стресс-индуцированные изменения, эксперименты проводили через 25 суток после стресса и в аналогичном возрасте у нестрессированных животных. Разные группы контрольных и экспериментальных крыс были использованы для проведения биохимических (физ. р-р, $n = 17$; ЛПС, $n = 13$) и поведенческих (физ. р-р, $n = 19$; ЛПС, $n = 16$) исследований.

Определение уровня белка методом вестерн-блоттинга. Исследование уровня белков субъединиц NMDA (GluN2a, GluN2b) и AMPA (GluA1, GluA2) рецепторов проводили методом вестерн-блоттинга. Животных декапитировали, мозг выделяли целиком, немедленно замораживали и хранили при температуре -70°C . Вентральный и дорзальный гиппокамп выделяли на срезах, производимых на микротоме-криостате Thermo Scientific MICROM HM («Thermo Scientific», США), при -20°C , согласно атласу [39]. Схема выделения структур представлена

на рис. S1 в Приложении. Выделенные структуры мозга гомогенизировали на льду в оптимизированном лизирующем буфере, предложенном Корес et al. [40], с добавлением $1\times$ коктейля ингибиторов протеаз (Pierce Protease Inhibitor Tablets, «Thermo Fisher Scientific», США), инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре, нерастворённые остатки удаляли центрифугированием (15 мин, 14 000 g, 20°C , «Thermo Scientific»). Концентрацию белка в пробе определяли с помощью модифицированного метода Лоури [41]. Белковый супернатант был разбавлен в соотношении 1/1 $2\times$ буфером для нанесения (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 40% (v/v) глицерин; 4% додецилсульфат натрия; 2,5% β -меркаптоэтанол; 0,02% бромфеноловый синий) и инкубировался в термостате («BioSan», Латвия) в течение 15 мин при 70°C . Электрофоретическое разделение проводили в восстанавливающих и денатурирующих условиях [42] в 7%-ном полиакриламидном геле вместе со стандартом молекулярного веса (Thermo Scientific PAGE Ruler Prestained Protein Ladder 10–170 кДа; «Thermo Fisher Scientific», США) при 125 В. В одинаковом объёме на дорожки наносили по 6 мкг белка, т.к. это количество позволяло попасть в линейную область денситометрического анализа для всех используемых антител в наших условиях. Вместе с анализируемыми образцами на каждый гель наносили образец-калибратор, полученный при смешивании нескольких образцов от животных из разных групп.

Белок переносили на нитроцеллюлозную мембрану (диаметр пор 45 мкм) полусухим переносом с $1\times$ буфером для переноса Invitrogen Power Blotter 1-Step Transfer Buffer («Thermo Fisher Scientific»), согласно инструкции производителя. После переноса мембрану окрашива-

ли 0,1%-ным раствором красителя Ponceau S в 5%-ной уксусной кислоте («Merck KGaA», ФРГ), результаты документировали с помощью системы гель-визуализации ChemiDoc MP («Bio-Rad», США). В качестве блокирующего агента использовали обезжиренное сухое молоко («Sigmaaldrich», Швейцария) (5%-ный раствор, 1,5 ч при комнатной температуре). Затем мембрану трижды промывали буфером PBS-T (0,01 М фосфатный буфер, pH 7,4; 137 мМ NaCl; 2,7 мМ KCl, содержащий 0,1% (v/v) Tween 20) и инкубировали в течение ночи при +4 °C в растворе первичных антител против GluN2a (ab169873, кроличьи поликлональные); GluN2b (ab65783, кроличьи поликлональные), GluA1 (ab109450, кроличьи моноклональные); GluA2 (ab106515, мышинные моноклональные); EAAT2 (ab205248, кроличьи моноклональные). В работе использовали первичные антитела фирмы «Abcam», Великобритания в разведении 1/1000. Для детекции первичных антител (для GluN2a/2b, GluA1 и EAAT2) к мембране добавляли антитела против кроличьих иммуноглобулинов G (31460, 1/60 000, Pierce Goat anti-rabbit IgG-HRP, «Thermo Fisher Scientific»), в остальных случаях к мембране добавляли антитела против мышинных иммуноглобулинов G (ab6808, 1/40 000, Sheep Anti-Mouse IgG H&L (HRP), («Abcam»)). Все растворы антител и блокирующего агента были приготовлены в фосфатно-солевом буферном растворе PBS-T; в этом же буфере проводили 3–6-кратную промывку между шагами. Хемилюминесцентный сигнал получали с хемилюминесцентного субстрата Super-Signal™ West Pico PLUS («Thermo Fisher Scientific») и документировали с помощью системы ChemiDoc MP («Bio-Rad», США). Денситометрический анализ проводили с помощью программы Image Lab 6.0.1 software (Bio-Rad): оптическую плотность сигнала нормировали по отношению к образцу-калибратору по сигналу Ponceau S (тотальный белок) соответствующей дорожки.

Определение содержания кортикостерона в крови. Уровень кортикостерона определяли в сыворотке периферической крови, взятой при декапитации животных, методом конкурентного иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов для количественного определения кортикостерона (Corticosterone (Human, Rat, Mouse) ELISA (RE52211), «TECAN Trading», Швейцария), согласно рекомендациям производителя. Спектрофотометрический анализ производили на Microplate Reader Immunochem-2100 («HTI Diagnostics», США). Расчёт значений концентраций кортикостерона производили методом линейной рег-

рессии. Все эксперименты проводились в двух независимых повторах.

Поведенческое тестирование. Ориентировочно-исследовательское поведение и уровень тревожности крыс оценивали в тестах «Открытое поле» (ОП) и «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ). Использовали круглое открытое поле диаметром 1 м, освещённость 10 лк. Крысу помещали в центр поля, длительность теста составляла 3 мин. Анализировали общую длину пройденного пути (как показатель двигательной и исследовательской активности), дистанцию, пройденную за первую минуту (как показатель ориентировочно-исследовательского поведения), время нахождения в центральной и периферической областях (показатель тревожности), а также проводили анализ общей стратегии поведения (характер трека, подробно описано в результатах).

Тест ПКЛ использовали для оценки уровня тревожности. Установка состояла из центральной платформы (10 × 10 см) с двумя открытыми и двумя закрытыми «рукавами» (50 × 10 см), приподнятыми на 40 см над полом. Закрытые «рукава» имели 30-сантиметровые стены и освещённость 5 лк. На открытых «рукавах» освещённость составляла 10 лк. Тест длился 5 мин. Крысу помещали в один из закрытых «рукавов» лабиринта. Измеряли время нахождения в закрытом и открытом рукавах, время выглядывания из закрытых рукавов, число заходов в открытые и закрытые рукава, процент времени, проведённого в открытых рукавах, и время груминга в закрытых «рукавах». Все поведенческие эксперименты регистрировали с помощью веб-камер, размещённых над установками. Анализ видеозаписей производился с использованием пользовательского программного обеспечения (Field-4W, Pole-7, Pole_Krest), разработанного в Физиологическом отделе им. И.П. Павлова ФГБНУ «ИЭМ».

Статистическую обработку производили в программе SPSS Statistics 22 («IBM Corp.», США) с использованием критерия Колмогорова–Смирнова для оценки нормальности распределения, критерия Ливиня (проверка равенства дисперсий), двухфакторного дисперсионного анализа, *t*-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони в качестве апостериорного теста. Критерий χ^2 Пирсона был использован для анализа межгрупповых различий в частотах встречаемости разных типов треков в тесте ОП. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Данные на графиках представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка. Диаграммы построены с применением программы GraphPad Prism 8 («GraphPad Software, Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Использованная доза ЛПС 50 мкг/кг не влияла значимо на развитие животных — динамику веса тела (количественные данные представлены на рис. S2 и в табл. S1 в Приложении).

Экспрессия генов субъединиц инотропных глутаматных рецепторов была исследована на уровне белка. На рис. S3 в Приложении представлены все проанализированные изображения мембран. Более выраженные межгрупповые различия выявлены в вентральном (по сравнению с дорзальным) отделе гиппокампа. В группе нестрессированных крыс более низкий уровень GluN2b-субъединицы NMDA-рецепторов обнаружен у животных, которым в раннем возрасте вводили ЛПС ($n = 4$) по сравнению с конт-

ролем ($n = 6$) (рис. 2, $t = 4,75$; $p = 0,002$, достоверно с учётом поправки Бонферрони).

Выявлено также влияние введений ЛПС на соотношение содержания субъединиц GluN2a/GluN2b: оно было выше у крыс с введением эндотоксина ($F_{(1,17)} = 6,97$; $p = 0,02$). Особенно это проявлялось в обычных (без стресса) условиях (рис. 2).

Различные реакции на стресс у экспериментальных и контрольных крыс выявлены по показателям экспрессии GluN2b-субъединицы NMDA-рецепторов и GluA1-субъединицы AMPA-рецепторов (рис. 2 и 3; взаимодействие факторов группы и стресса, соответственно, $F_{(1,20)} = 4,71$; $p = 0,04$ и $F_{(1,19)} = 4,87$; $p = 0,04$). Уровень белка GluN2b-субъединицы у экспериментальных крыс увеличивался после стресса

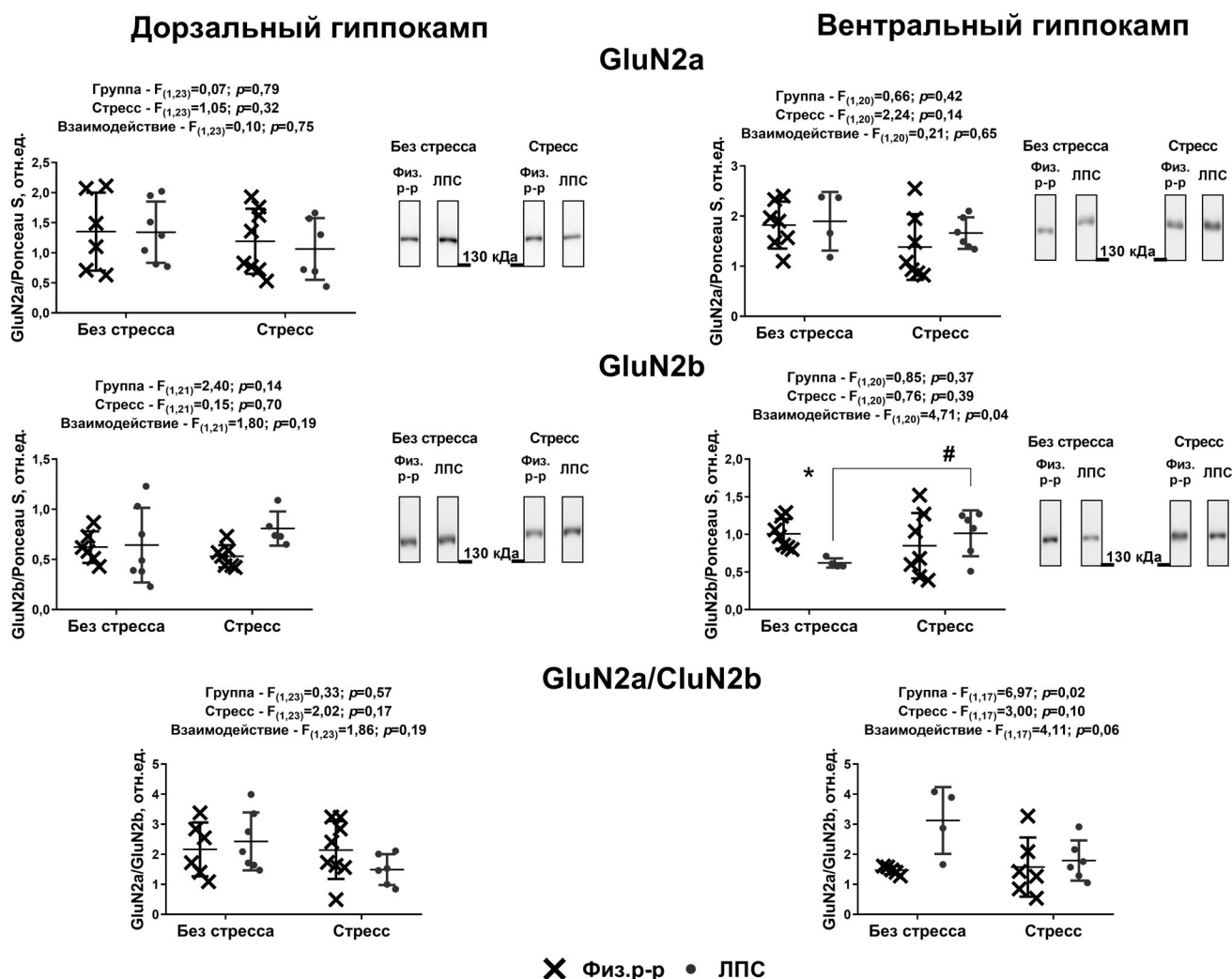


Рис. 2. Экспрессия генов субъединиц NMDA-рецепторов в гиппокампе экспериментальных и контрольных крыс. Количество животных в группах $n = 4-8$. Каждая точка означает одно животное. F — Критерий Фишера, двухфакторный ANOVA; * — достоверные отличия от контрольной группы, # достоверные отличия от группы без стресса; $p < 0,05$, t -критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони. Приведены примеры репрезентативных бендов для животных из всех групп

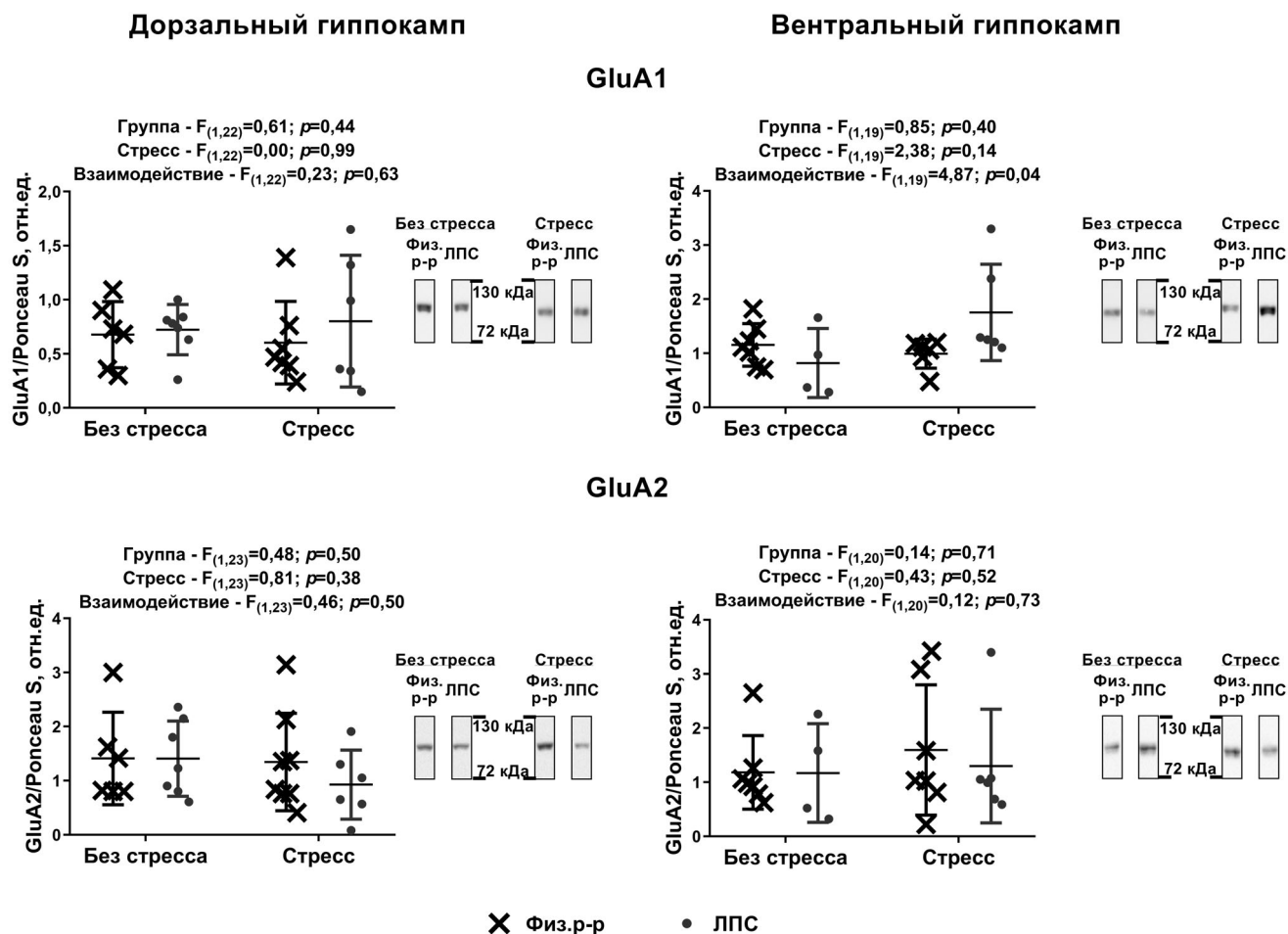


Рис. 3. Экспрессия генов субъединиц AMPA-рецепторов в гиппокампе экспериментальных и контрольных крыс. Количество животных в группах $n = 4-8$. Каждая точка означает одно животное. F – Критерий Фишера, двухфакторный ANOVA. Приведены примеры репрезентативных бендов для животных из всех групп

($t = 3,04$; $p = 0,025$), у контрольных – имел тенденцию к снижению в сравнении с соответствующей нестрессированной группой.

Никаких достоверных изменений не показано в отношении продукции EAAT2 как в вентральном, так и дорзальном отделе гиппокампа (рис. 4).

Таким образом, эффекты неонатального введения ЛПС на экспрессию генов субъединиц ионотропных рецепторов глутамата выявлены в вентральном, но не дорзальном отделе гиппокампа. Наиболее выраженные нарушения в обычных условиях и стресс-индуцированные изменения обнаружены в отношении GluN2b-субъединицы NMDA-рецепторов. Для того чтобы проверить, могут ли эти изменения влиять на поведение после психогенной травмы, нами в той же экспериментальной парадигме было проведено тестирование крыс в «Открытом поле» и «Приподнятом крестообразном лабиринте», поскольку поведение в этих тестах зависит

от активности GluN2b-содержащих NMDA-рецепторов [43, 44].

Результаты тестирования поведения показали, что в тесте ОП (рис. 5) общая длина пройденной дистанции достоверно не отличалась в группах, однако активность в течение первой минуты (показатель ориентировочно-исследовательского поведения) была различной: у контрольных крыс, перенёвших стресс, она увеличивалась, у экспериментальных – снижалась (взаимодействие факторов стресса и группы: $F_{(1,31)} = 6,32$; $p = 0,017$). Достоверных различий по времени нахождения в центральной и периферической зоне поля не выявлено, однако характер треков в группах различался. Было выделено три типа трека. Первый, с преимущественным нахождением на периферии (обследование всего поля), отмечался у большинства нестрессированных контрольных и экспериментальных животных (соответственно 66,7% и 70%), а также у 100% контрольных стрессированных крыс.

Дорзальный гиппокамп

Вентральный гиппокамп

ЕААТ2

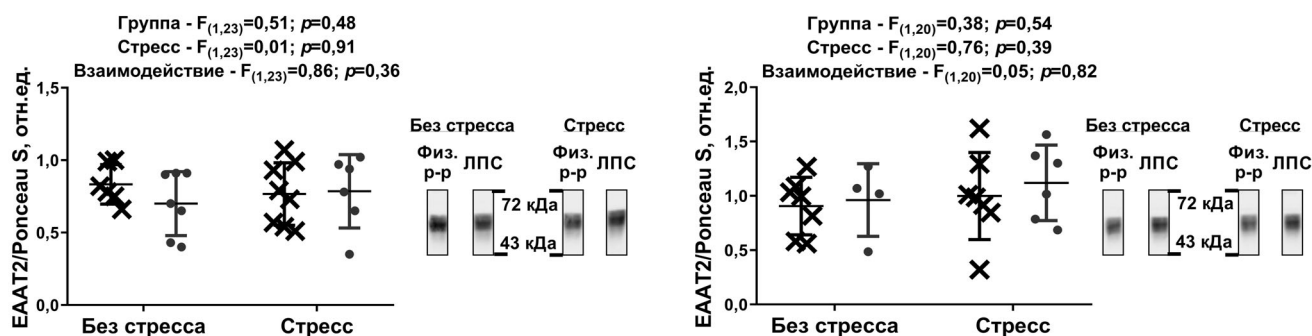


Рис. 4. Экспрессия генов, кодирующих ЕААТ2, в гиппокампе экспериментальных и контрольных крыс. Количество животных в группах $n = 4-8$. Каждая точка означает одно животное. F – Критерий Фишера, двухфакторный ANOVA. Приведены примеры репрезентативных бендов для животных из всех групп

Второй, с частыми заходами в центральную область поля, был характерен для трети контрольных и экспериментальных крыс без стресса. Третий тип трека – обследование только части поля – был описан только у 44,4% экспериментальных крыс, переживших стресс. Очевидно, он свидетельствует о пониженной исследовательской активности, а также, возможно, повышенной тревожности. Частота встречаемости разных типов треков достоверно различается в четырёх группах ($\chi^2 = 16,4$; $p = 0,012$).

В тесте ПКЛ длительность нахождения на открытых «рукавах» была выше у стрессированных и нестрессированных экспериментальных крыс (рис. 6, а; фактор группы: $F_{(1,27)} = 4,70$; $p = 0,04$), аналогичные результаты получены для процента времени, которое животные проводят в открытых рукавах (фактор группы: $F_{(1,27)} = 4,56$; $p = 0,04$; рис. S4 и табл. S2 в Приложении), этот результат соответствовал тенденции меньшего времени, проведённого экспериментальными крысами на периферии «Открытого поля» ($F_{(1,31)} = 2,98$; $p = 0,09$). Однако эти результаты, по-видимому, нельзя однозначно трактовать как пониженную тревожность, так как у стрессированных экспериментальных крыс при этом выявляется усиление груминга в закрытых «рукавах» (рис. 6, б; взаимодействие факторов стресса и группы: $F_{(1,28)} = 4,29$; $p = 0,048$). По длительности нахождения в закрытых «рукавах», длительности актов выглядывания из них, а также числу заходов в открытые и закрытые «рукава» различий не было выявлено (данные представлены на рис. 5 и в табл. S2 в Приложении).

Таким образом, поведенческие реакции на стресс были различными у крыс с неонатальным введением ЛПС и физиологического раствора.

Для проверки предположения о том, что эти особенности могут быть связаны с изменением уровня кортикостерона, мы проанализировали его содержание в крови контрольных и экспериментальных крыс, имевших и не имевших психогенную травму. Было показано, что введение эндотоксина в раннем возрасте влияет на уровень кортикостерона в крови. Он был ниже у экспериментальных крыс, как подвергавшихся, так и не подвергнутых стрессу (рис. 7, фактор введения ЛПС: $F_{(1,23)} = 6,22$; $p = 0,02$).

Таким образом, проведённое исследование показало, что введение бактериального ЛПС в критический для формирования ионотропных глутаматных рецепторов период раннего постнатального онтогенеза (фактор группы) влияет на соотношение экспрессии генов, кодирующих субъединицы GluN2a/GluN2b в клетках вентрального гиппокампа, на поведение в тесте ПКЛ и на уровень кортикостерона в крови. Различные реакции на стресс у экспериментальных и контрольных крыс (сочетанное влияние факторов группы и стресса) выявлены в отношении экспрессии генов GluN2b-субъединицы NMDA-рецепторов и GluA1-субъединицы AMPA-рецепторов, а также для показателей исследовательского и эмоционального поведения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе впервые исследованы особенности экспрессии генов субъединиц ионотропных рецепторов глутамата в гиппокампе крыс после сочетанного воздействия неонатальных введений ЛПС и психогенной травмы, перенесённой во взрослом возрасте.

Значимое влияние фактора группы (введение ЛПС) показано для поведения в тесте ПКЛ и для соотношения GluN2a/GluN2b в вентральном гиппокампе. Нами выявлено также, что нестрессированные экспериментальные крысы отличаются пониженным уровнем белка GluN2b

в вентральном отделе гиппокампа. Увеличение соотношения GluN2a/GluN2b ранее было показано у взрослых крыс, перенёсших вирусную инфекцию пренатально (после введения беременным самкам синтетической молекулы polyI:C), однако в этом случае соотношение увеличива-

Открытое поле

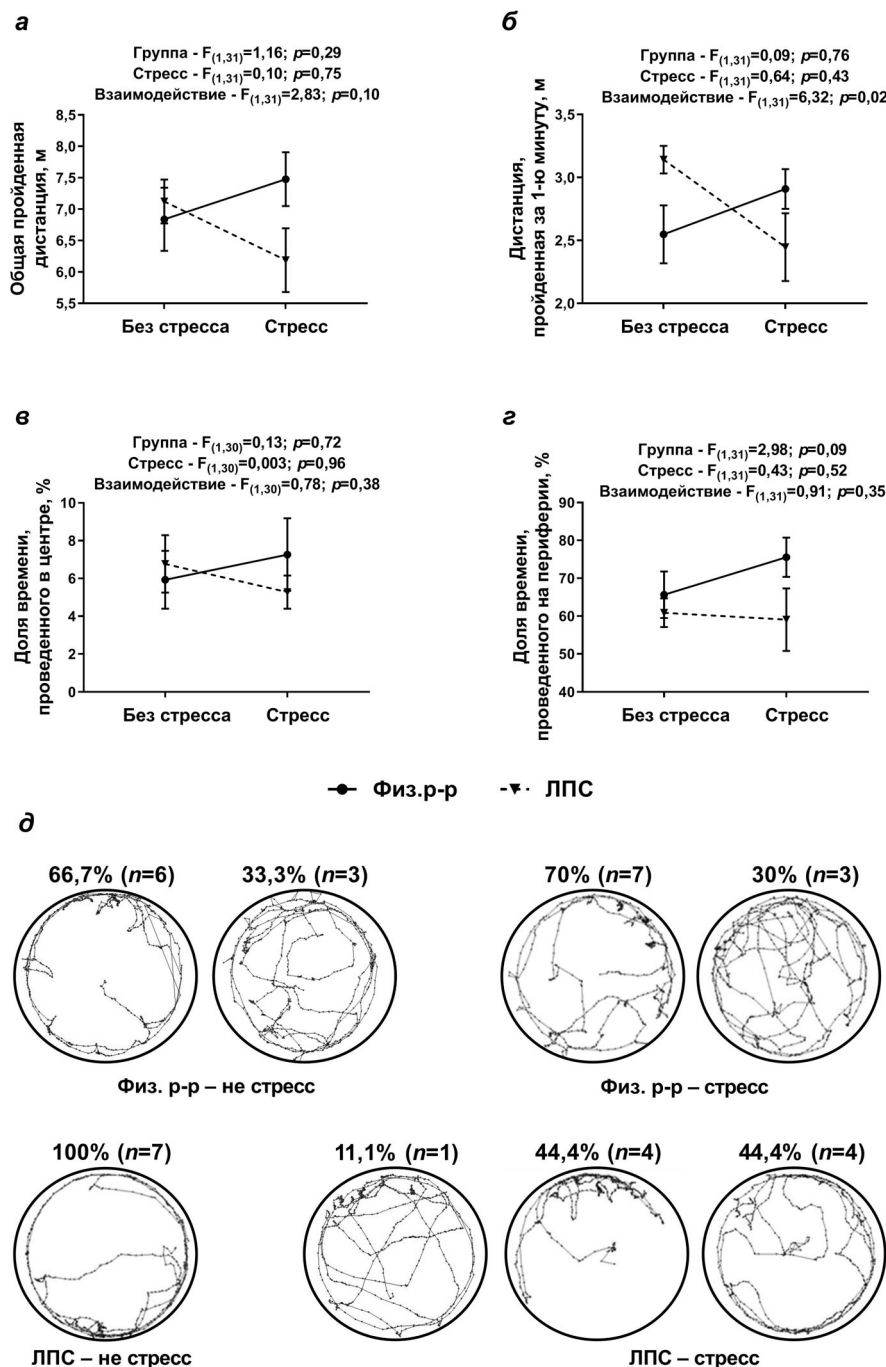


Рис. 5. Поведение в тесте «Открытое поле»: *а* – общая дистанция, *б* – дистанция, пройденная в течение первой минуты, *в* – время в центральной области, *г* – время на периферии, *д* – типы треков. F – Критерий Фишера, двухфакторный ANOVA; *n* – количество животных

Приподнятый крестообразный лабиринт

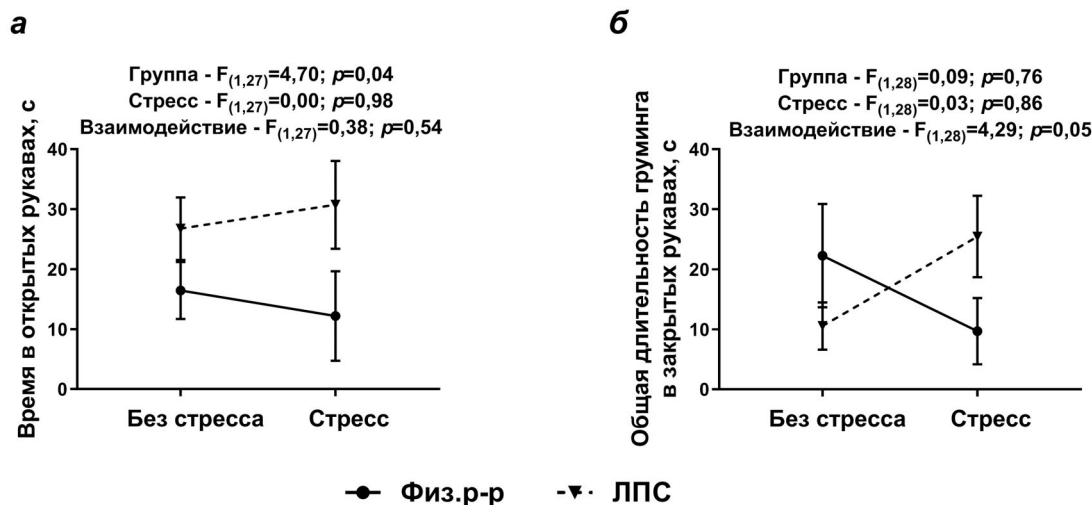


Рис. 6. Поведение в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»: а — время в открытых руках, б — время груминга в закрытых руках. F — Критерий Фишера, двухфакторный ANOVA

лось за счёт усиления продукции GluN2a-субъединицы [45]. Аналогично повышение продукции мРНК субъединицы GluN2a отмечено у взрослых крыс, которым на 14 день жизни однократно вводили достаточно высокую дозу ЛПС (100 мкг/кг) [14]. Соотношение GluN2a/GluN2b в этом случае не оценивали. В исследованиях, проведённых нами ранее на подростках крыс, которым вводили ЛПС в течение третьей недели жизни, выявлено снижение уровня белка GluN2b-субъединицы и увеличение соотношения GluN2a/GluN2b в дорзальном и вентраль-

ном отделах гиппокампа [11], однако у взрослых животных после аналогичных введений ЛПС, напротив, нами было обнаружено увеличение уровня мРНК GluN2b [10]. Активность NMDA- и AMPA-рецепторов напрямую связана с долговременной потенцией нейронов гиппокампа; неонатальные введения ЛПС приводят к её нарушению у неполовозрелых животных [11, 46–48]. Нужно отметить, что более выраженные изменения обнаружены нами в вентральном отделе гиппокампа. Ранее Onufriev et al. [49] было показано, что введение ЛПС взрослым крысам вызывает различную динамику изменений активности клеток вентрального и дорзального отделов гиппокампа (по показателям долговременной потенции и экспрессии генов провоспалительных цитокинов): максимальная реакция в дорзальном отделе гиппокампа отмечалась раньше, в вентральном — позднее.

ЛПС-индуцированные перестройки, происходящие в субъединичном составе ионотропных рецепторов глутамата, могут влиять на поведение [43, 44]. Нарушение исследовательского поведения и изменение уровня тревожности после неонатальных введений ЛПС у взрослых животных ранее были показаны во многих исследованиях [46, 50–52]. В частности, введение ЛПС на третьей неделе жизни приводило у взрослых крыс к нарушению обследования новых объектов [53] и снижению количества стоек с упором в тесте ОП [10]. Признаки тревожно-депрессивного состояния отмечают у взрослых крыс и мышей, которым вводили ЛПС на 1 либо на 3 и

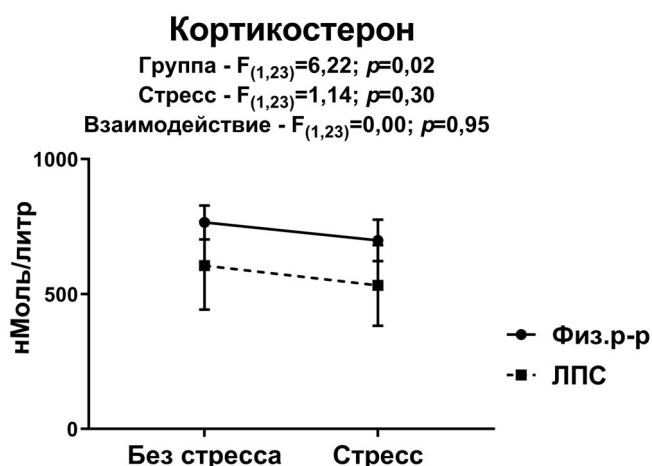


Рис. 7. Уровень кортикостерона в сыворотке крови контрольных (сплошная линия) и экспериментальных (пунктирная линия) крыс в обычных условиях и после стресса. F — Критерий Фишера, двухфакторный ANOVA. Количество животных в группах $n = 6-8$

5 дни жизни [46, 50, 54]. Однако другие авторы [55] отмечают пониженную тревожность (по времени пребывания на открытых рукавах ПКЛ) у подростков крыс, которым вводили 100 мкг/кг ЛПС на 5 сутки жизни. Снижение времени нахождения в открытых рукавах ПКЛ отмечалось нами ранее у взрослых крыс, которым вводили ЛПС в течение третьей недели жизни [10].

Основная идея настоящего исследования заключалась в изучении особенностей реакции на психогенную травму у взрослых крыс, которым вводили ЛПС в раннем возрасте. Экспериментальные ситуации угрозы жизни, в частности контакта лабораторных грызунов с хищником (или его запахом), часто используются для моделирования ПТСР [56]. Для данного расстройства характерно отсроченное развитие психоневрологических нарушений [57]. Ранее модель, использованная нами в данном исследовании, была применена для анализа динамики постстрессовых изменений экспрессии генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов в гиппокампе, медиальной префронтальной коре и миндалевидном теле крыс. Наиболее выраженные изменения были выявлены в гиппокампе через 25 суток после стресса [36]. Поэтому этот срок был использован в данной работе для оценки особенностей животных, которым неонатально вводили ЛПС. В данной работе, в отличие от ранее проведённых исследований, мы не обнаружили статистически значимого влияния фактора стресса на изучаемые показатели. Возможно, это связано с индивидуальными особенностями животных. Данный феномен описан в клинических и экспериментальных работах: ПТСР развивается только у части стрессированных людей и животных [56, 58]. Тем не менее в данной работе крысы, которым вводили ЛПС, показали большую стресс-реактивность по изменению уровня белка GluN2b. Нами не выявлено изменений продукции белка EAAT2 в гиппокампе крыс через 25 дней после психогенной травмы. Ранее было показано снижение экспрессии данного белка в гиппокампе хронически стрессированных мышей [59]. Очевидно, использованный нами стресс был недостаточно сильным для изменения этого показателя.

Основной результат проведённого нами исследования заключается в выявлении сочетанных влияний неонатальных введений ЛПС и психогенной травмы на экспрессию генов GluN2b-субъединицы NMDA-рецепторов и GluA1-субъединицы AMPA-рецепторов, а также на показатели исследовательского и эмоционального поведения. В отношении экспрессии генов субъединиц ионотропных рецепторов глутамата

подобное исследование проведено впервые. При этом исследования особенностей стресс-реактивности у животных, которым неонатально вводили ЛПС, по поведенческим и гормональным показателям проводились и ранее. Так, Shanks et al. [60] обнаружили повышенный выброс адренокортикотропного гормона (АКТГ) и кортикостерона в ответ на ограничение движений у взрослых крыс, которым вводили эндотоксин на 3 и 5 сутки жизни. Кроме того, у экспериментальных животных отмечалось снижение чувствительности к глюкокортикоидам, то есть нарушались механизмы отрицательной обратной связи регуляции стресс-реакции. Аналогичные результаты — более сильная или пролонгированная реакция на стресс (по уровню кортикостерона) при введении ЛПС в раннем возрасте — получены и в других работах [13, 46]. При этом Walker et al. [12], вводившие ЛПС в те же сроки, отмечают у взрослых экспериментальных крыс ослабление гормонального ответа на трёхдневный комбинированный стресс, хотя на поведенческом уровне стресс-реактивность экспериментальных животных была выше, чем в контроле. В настоящем исследовании крысы, которым вводили эндотоксин в течение третьей недели жизни, имели более низкий уровень кортикостерона как в обычных условиях, так и через 25 дней после психогенной травмы. Самые низкие концентрации кортикостерона отмечены у крыс с введением ЛПС, перенёсших стресс. В ещё одном независимом исследовании, проведённом нами ранее [9], также был выявлен низкий уровень кортикостерона у нестрессированных крыс, которым в течение третьей недели жизни трижды вводили ЛПС в дозировках 25 либо 50 мкг/кг. Возможно, различия в полученных результатах связаны с различными дозировками эндотоксина и различными сроками его введения. Нужно также отметить, что снижение уровня глюкокортикоидов в крови и нарушение механизмов отрицательной обратной связи характерно для посттравматических стрессовых расстройств [61, 62], моделью которых предположительно является использованное нами стрессорное воздействие.

В целом, проведённое нами исследование показывает, что воздействие бактериальным ЛПС в раннем постнатальном онтогенезе влияет на характер стресс-индуцированных изменений поведения и на особенности экспрессии генов субъединиц ионотропных рецепторов глутамата в гиппокампе после психогенной травмы, перенесённой во взрослом возрасте. На возможную взаимосвязь этих нарушений указывают, в частности, результаты Lei et al. [43], показавшие изменение

активности животных в «Открытом поле» после введения антагониста GluN2b-содержащих рецепторов рисленемдаза. Окончательный вывод о связи выявленных нами нейрoхимических и поведенческих изменений может быть сделан только после проведения дополнительных нейрофармакологических исследований.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-04-02116).

Благодарности. Спектрофотометрические исследования и визуализация мембран выполнены на базе Центра коллективного пользования научного оборудования для физиологичес-

ких, биохимических и молекулярно-биологических исследований ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 86, вып. 6, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee, R. S., Oswald, L. M., and Wand, G. S. (2018) Early life stress as a predictor of co-occurring alcohol use disorder and post-traumatic stress disorder, *Alcohol. Res.*, **39**, 147-159.
2. Fisher, P. A., Beauchamp, K. G., Roos, L. E., Noll, L. K., Flannery, J., and Delker, B. C. (2016) The neurobiology of intervention and prevention in early adversity, *Annu. Rev. Clin. Psychol.*, **12**, 331-357, doi: 10.1146/annurev-clinpsy-032814-112855.
3. Van Camp, G., Cigalotti, J., Bouwalerh, H., Mairesse, J., Gatta, E., et al. (2018) Consequences of a double hit of stress during the perinatal period and midlife in female rats: mismatch or cumulative effect? *Psychoneuroendocrinology*, **93**, 45-55, doi: 10.1016/j.psyneuen.2018.04.004.
4. Jaric I., Rocks, D., Cham, H., Herchek, A., and Kundakovic, M. (2019) Sex and estrous cycle effects on anxiety- and depression-related phenotypes in a two-hit developmental stress model, *Front. Mol. Neurosci.*, **12**, 74, doi: 10.3389/fnmol.2019.00074.
5. Koss, K. J., and Gunnar, M. R. (2018) Annual research review: early adversity, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and child psychopathology, *J. Child Psychol. Psychiatry*, **59**, 327-346, doi: 10.1111/jcpp.12784.
6. Diné, A.-L., Joffe, C., Trifileff, P., Aubert, A., Foury, A., Le Ruyet, P., and Layé, S. (2014) Inflammation early in life is a vulnerability factor for emotional behavior at adolescence and for lipopolysaccharide-induced spatial memory and neurogenesis alteration at adulthood, *J. Neuroinflammation*, **11**, 155, doi: 10.1186/s12974-014-0155-x.
7. Doenni, V. M., Song, C. M., Hill, M. N., and Pittman, Q. J. (2017) Early-life inflammation with LPS delays fear extinction in adult rodents, *Brain. Behav. Immun.*, **63**, 176-185, doi: 10.1016/j.bbi.2016.11.022.
8. Lei, Y., Chen, C.-J., Yan, X.-X., Li, Z., and Deng, X.-H. (2017) Early-life lipopolysaccharide exposure potentiates forebrain expression of NLRP3 inflammasome proteins and anxiety-like behavior in adolescent rats, *Brain Res.*, **1671**, 43-54, doi: 10.1016/j.brainres.2017.06.014.
9. Trofimov, A., Strekalova, T., Mortimer, N., Zubareva, O., Schwarz, A., et al. (2017) Postnatal LPS challenge impacts escape learning and expression of plasticity factors Mmp9 and Timp1 in rats: effects of repeated training, *Neurotox. Res.*, **32**, 175-186, doi: 10.1007/s12640-017-9720-2.
10. Trofimov, A. N., Rotov, A. Y., Veniaminova, E. A., Fomalont, K., Schwarz, A. P., and Zubareva, O. E. (2020) Changes in behavior and the expression of ionotropic glutamate receptor genes in the brains of adult rats after neonatal administration of bacterial lipopolysaccharide, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **50**, 1239-1248, doi: 10.1007/s11055-020-01025-7.
11. Zubareva, O. E., Postnikova, T. Y., Grifluk, A. V., Schwarz, A. P., Smolensky, I. V., et al. (2020) Exposure to bacterial lipopolysaccharide in early life affects the expression of ionotropic glutamate receptor genes and is accompanied by disturbances in long-term potentiation and cognitive functions in young rats, *Brain. Behav. Immun.*, **90**, 3-15, doi: 10.1016/j.bbi.2020.07.034.
12. Walker, A. K., Nakamura, T., Byrne, R. J., Naicker, S., Tynan, R. J., et al. (2009) Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: implications for the double-hit hypothesis, *Psychoneuroendocrinology*, **34**, 1515-1525, doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.05.010.
13. Walker, A. K., Nakamura, T., and Hodgson, D. M. (2010) Neonatal lipopolysaccharide exposure alters central cytokine responses to stress in adulthood in Wistar rats, *Stress*, **13**, 506-515, doi: 10.3109/10253890.2010.489977.
14. Harré, E.-M., Galic, M. A., Mouihate, A., Noorbakhsh, F., and Pittman, Q. J. (2008) Neonatal inflammation produces selective behavioural deficits and alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA in the adult rat brain, *Eur. J. Neurosci.*, **27**, 644-653, doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06031.x.
15. Hansen, K. B., Yi, F., Perszyk, R. E., Furukawa, H., Wollmuth, L. P., et al. (2018) Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors, *J. Gen. Physiol.*, **150**, 1081-1105, doi: 10.1085/jgp.201812032.
16. Liu, S., Lau, L., Wei, J., Zhu, D., Zou, S., et al. (2004) Expression of Ca²⁺-permeable AMPA receptor channels primes cell death in transient forebrain ischemia, *Neuron*, **43**, 43-55, doi: 10.1016/j.neuron.2004.06.017.
17. Wenzel, A., Fritschy, J. M., Mohler, H., and Benke, D. (1997) NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins, *J. Neurochem.*, **68**, 469-478, doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.68020469.x.
18. Babb, T. L., Mikuni, N., Najm, I., Wylie, C., Olive, M., et al. (2005) Pre- and postnatal expressions of NMDA receptors 1 and 2B subunit proteins in the normal rat cortex, *Epilepsy Res.*, **64**, 23-30, doi: 10.1016/j.eplepsyres.2005.02.008.
19. Du Bois, T. M., and Huang, X.-F. (2007) Early brain development disruption from NMDA receptor hypofunction:

- relevance to schizophrenia, *Brain Res. Rev.*, **53**, 260-270, doi: 10.1016/j.brainresrev.2006.09.001.
20. Lippman-Bell, J. J., Zhou, C., Sun, H., Feske, J. S., and Jensen, F. E. (2016) Early-life seizures alter synaptic calcium-permeable AMPA receptor function and plasticity, *Mol. Cell. Neurosci.*, **76**, 11-20, doi: 10.1016/j.mcn.2016.08.002.
 21. Yuan, T., and Bellone, C. (2013) Glutamatergic receptors at developing synapses: the role of GluN3A-containing NMDA receptors and GluA2-lacking AMPA receptors, *Eur. J. Pharmacol.*, **719**, 107-111, doi: 10.1016/j.ejphar.2013.04.056.
 22. Sweatt, J. D. (2016) Neural plasticity and behavior – sixty years of conceptual advances, *J. Neurochem.*, **139 Suppl**, 179-199, doi: 10.1111/jnc.13580.
 23. Diering, G. H., and Huganir, R. L. (2018) The AMPA receptor code of synaptic plasticity, *Neuron*, **100**, 314-329, doi: 10.1016/j.neuron.2018.10.018.
 24. Lisman, J. (2017) Glutamatergic synapses are structurally and biochemically complex because of multiple plasticity processes: long-term potentiation, long-term depression, short-term potentiation and scaling, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **372**, doi: 10.1098/rstb.2016.0260.
 25. Sarantis, K., Antoniou, K., Matsokis, N., and Angelatos, F. (2012) Exposure to novel environment is characterized by an interaction of D1/NMDA receptors underlined by phosphorylation of the NMDA and AMPA receptor subunits and activation of ERK1/2 signaling, leading to epigenetic changes and gene expression in rat hippocampus, *Neurochem. Int.*, **60**, 55-67, doi: 10.1016/j.neuint.2011.10.018.
 26. Barkus, C., McHugh, S. B., Sprengel, R., Seeburg, P. H., Rawlins, J. N. P., and Bannerman, D. M. (2010) Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion, *Eur. J. Pharmacol.*, **626**, 49-56, doi: 10.1016/j.ejphar.2009.10.014.
 27. Pacheco, A., Aguayo, F. I., Aliaga, E., Muñoz, M., García-Rojo, G., et al. (2017) Chronic stress triggers expression of immediate early genes and differentially affects the expression of AMPA and NMDA subunits in dorsal and ventral hippocampus of rats, *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, 244, doi: 10.3389/fnmol.2017.00244.
 28. Costa-Nunes, J., Zubareva, O., Araújo-Correia, M., Valença, A., Schroeter, C. A., et al. (2014) Altered emotionality, hippocampus-dependent performance and expression of NMDA receptor subunit mRNAs in chronically stressed mice, *Stress*, **17**, 108-116, doi: 10.3109/10253890.2013.872619.
 29. Furini, C., Myskiw, J., and Izquierdo, I. (2014) The learning of fear extinction, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **47**, 670-683, doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.10.016.
 30. Matsumoto, Y., Morinobu, S., Yamamoto, S., Matsumoto, T., Takei, S., et al. (2013) Vorinostat ameliorates impaired fear extinction possibly via the hippocampal NMDA-CaMKII pathway in an animal model of posttraumatic stress disorder, *Psychopharmacology (Berlin)*, **229**, 51-62, doi: 10.1007/s00213-013-3078-9.
 31. Réus, G. Z., Abelaira, H. M., Stringari, R. B., Fries, G. R., Kapczinski, F., and Quevedo, J. (2012) Memantine treatment reverses anhedonia, normalizes corticosterone levels and increases BDNF levels in the prefrontal cortex induced by chronic mild stress in rats, *Metab. Brain Dis.*, **27**, 175-182, doi: 10.1007/s11011-012-9281-2.
 32. Padovan, C. M., and Guimarães, F. S. (2004) Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **77**, 15-19, doi: 10.1016/j.pbb.2003.09.015.
 33. Blacker, C. J., Millischer, V., Webb, L. M., Ho, A. M. C., Schalling, M., et al. (2020) EAAT2 as a research target in bipolar disorder and unipolar depression: a systematic review, *Mol. Neuropsychiatry*, **5**, 44-59, doi: 10.1159/000501885.
 34. Zink, M., Vollmayr, B., Gebicke-Haerter, P. J., and Henn, F. A. (2010) Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression, *Neuropharmacology*, **58**, 465-473, doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.09.005.
 35. Zhang, X. H., Jia, N., Zhao, X. Y., Tang, G. K., Guan, L. X., et al. (2013) Involvement of pGluR1, EAAT2 and EAAT3 in offspring depression induced by prenatal stress, *Neuroscience*, **250**, 333-341, doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.04.031.
 36. Kovalenko, A. A., Zakharova, M. V., Nikitina, V. A., Schwarz, A. P., Karyakin, V. B., et al. (2018) Alterations in the expression of genes that encode subunits of ionotropic glutamate receptors and the glutamate transporter in brain structures of rats after psychogenic stress, *Neurochem. J.*, **12**, 135-141, doi: 10.1134/S181971241802006X.
 37. Nasca, C., Bigio, B., Zelli, D., de Angelis, P., Lau, T., et al. (2017) Role of the Astroglial glutamate exchanger xCT in ventral hippocampus in resilience to stress, *Neuron*, **96**, 402-413.e5, doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.020.
 38. Beznin, G. V., Pshenichnaya, A. G., Kusov, A. G., and Tsikunov, S. G. (2012) Morphological and functional bases of behavioral deviations in the model of acute vital stress in rats, *Med. Akadem. Zhurn.*, **12**, 37-39.
 39. Paxinos, G., and Watson, C. (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th Edition, Academic Press.
 40. Kopec, A. M., Rivera, P. D., Lacagnina, M. J., Hanamsagar, R., and Bilbo, S. D. (2017) Optimized solubilization of TRIZOL-precipitated protein permits Western blotting analysis to maximize data available from brain tissue, *J. Neurosci. Methods*, **280**, 64-76, doi: 10.1016/j.jneumeth.2017.02.002.
 41. Harrington, C. R. (1990) Lowry protein assay containing sodium dodecyl sulfate in microtiter plates for protein determinations on fractions from brain tissue, *Anal. Biochem.*, **186**, 285-7, doi: 10.1016/0003-2697(90)90081-j.
 42. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
 43. Lei, T., Dong, D., Song, M., Sun, Y., Liu, X., and Zhao, H. (2020) Risperidone treatment in the lateral habenula improves despair-like behavior in mice, *Neuropsychopharmacology*, **45**, 1717-1724, doi: 10.1038/s41386-020-0652-9.
 44. Delawary, M., Tezuka, T., Kiyama, Y., Yokoyama, K., Inoue, T., et al. (2010) NMDAR2B tyrosine phosphorylation regulates anxiety-like behavior and CRF expression in the amygdala, *Mol. Brain*, **3**, 37, doi: 10.1186/1756-6606-3-37.
 45. Rahman, T., Zavitsanou, K., Purves-Tyson, T., Harms, L. R., Meehan, C., et al. (2017) Effects of immune activation during early or late gestation on N-methyl-D-aspartate receptor measures in adult rat offspring, *Front. Psychiatry*, **8**, 77, doi: 10.3389/fpsy.2017.00077.
 46. Tishkina, A., Stepanichev, M., Kudryashova, I., Freiman, S., Onufriev, M., et al. (2016) Neonatal proinflammatory challenge in male Wistar rats: effects on behavior, synaptic plasticity, and adrenocortical stress response, *Behav. Brain Res.*, **304**, 1-10, doi: 10.1016/j.bbr.2016.02.001.
 47. Onufriev, M. V., Freiman, S. V., Peregud, D. I., Kudryashova, I. V., Tishkina, A. O., et al. (2017) Neonatal proinflammatory stress induces accumulation of corticosterone and interleukin-6 in the hippocampus of juvenile rats: potential mechanism of synaptic plasticity impairments, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 275-281, doi: 10.1134/S0006297917030051.
 48. Postnikova, T. Y., Griflyuk, A. V., Ergina, J. L., Zubareva, O. E., and Zaitsev, A. V. (2020) Administration of bacterial lipopolysaccharide during early postnatal ontogenesis induces transient impairment of long-term synaptic plasticity associated with behavioral abnormalities in young rats, *Pharmaceuticals (Basel)*, **13**, doi: 10.3390/ph13030048.

49. Onufriev, M. V., Uzakov, S. S., Freiman, S. V., Stepanichev, M. Y., Moiseeva, Y. V., et al. (2018) The Dorsal and ventral hippocampus have different reactivities to proinflammatory stress: corticosterone levels, cytokine expression, and synaptic plasticity, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **48**, 1024-1031, doi: 10.1007/s11055-018-0665-6.
50. Benmhammed, H., El Hayek, S., Nassiri, A., Bousalham, R., Mesfioui, A., et al. (2019) Effects of lipopolysaccharide administration and maternal deprivation on anxiety and depressive symptoms in male and female Wistar rats: Neurobehavioral and biochemical assessments, *Behav. Brain Res.*, **362**, 46-55, doi: 10.1016/j.bbr.2019.01.005.
51. Sulakhiya, K., Keshav Lal, G. P., Bezbaruah, B. B., Dwivedi, S., Gurjar, S. S., et al. (2016) Lipopolysaccharide induced anxiety- and depressive-like behaviour in mice are prevented by chronic pre-treatment of esculetin, *Neurosci. Lett.*, **611**, 106-111, doi: 10.1016/j.neulet.2015.11.031.
52. Walker, F. R., March, J., and Hodgson, D. M. (2004) Endotoxin exposure in early life alters the development of anxiety-like behaviour in the Fischer 344 rat, *Behav. Brain Res.*, **154**, 63-69, doi: 10.1016/j.bbr.2004.01.019.
53. Spencer, S. J., Heida, J. G., and Pittman, Q. J. (2005) Early life immune challenge – effects on behavioural indices of adult rat fear and anxiety, *Behav. Brain Res.*, **164**, 231-238, doi: 10.1016/j.bbr.2005.06.032.
54. Custódio, C. S., Mello, B. S. F., Filho, A. J. M. C., de Carvalho Lima, C. N., Cordeiro, R. C., et al. (2018) Neonatal immune challenge with lipopolysaccharide triggers long-lasting sex- and age-related behavioral and immune/neurotrophic alterations in mice: relevance to autism spectrum disorders, *Mol. Neurobiol.*, **55**, 3775-3788, doi: 10.1007/s12035-017-0616-1.
55. Fan, L.-W., Tien, L.-T., Mitchell, H. J., Rhodes, P. G., and Cai, Z. (2008) Alpha-phenyl-n-tert-butyl-nitron ameliorates hippocampal injury and improves learning and memory in juvenile rats following neonatal exposure to lipopolysaccharide, *Eur. J. Neurosci.*, **27**, 1475-1484, doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06121.x.
56. Zoladz, P. R., and Diamond, D. M. (2016) Predator-based psychosocial stress animal model of PTSD: preclinical assessment of traumatic stress at cognitive, hormonal, pharmacological, cardiovascular and epigenetic levels of analysis, *Exp. Neurol.*, **284**, 211-219, doi: 10.1016/j.expneurol.2016.06.003.
57. Zoladz, P. R., Park, C. R., Fleshner, M., and Diamond, D. M. (2015) Psychosocial predator-based animal model of PTSD produces physiological and behavioral sequelae and a traumatic memory four months following stress onset, *Physiol. Behav.*, **147**, 183-192, doi: 10.1016/j.physbeh.2015.04.032.
58. Auxéméry, Y. (2012) Posttraumatic stress disorder (PTSD) as a consequence of the interaction between an individual genetic susceptibility, a traumatogenic event and a social context, *Encephale*, **38**, 373-380, doi: 10.1016/j.encep.2011.12.003.
59. Ding, X.-F., Li, Y.-H., Chen, J.-X., Sun, L.-J., Jiao, H.-Y., et al. (2017) Involvement of the glutamate/glutamine cycle and glutamate transporter GLT-1 in antidepressant-like effects of Xiao Yao san on chronically stressed mice, *BMC Complement. Altern. Med.*, **17**, 326, doi: 10.1186/s12906-017-1830-0.
60. Shanks, N., Larocque, S., and Meaney, M. J. (1995) Neonatal endotoxin exposure alters the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: early illness and later responsiveness to stress, *J. Neurosci.*, **15**, 376-384.
61. Zoladz, P. R., Fleshner, M., and Diamond, D. M. (2012) Psychosocial animal model of PTSD produces a long-lasting traumatic memory, an increase in general anxiety and PTSD-like glucocorticoid abnormalities, *Psychoneuroendocrinology*, **37**, 1531-1545, doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.02.007.
62. Olff, M., Güzelcan, Y., de Vries, G.-J., Assies, J., and Gersons, B. P. R. (2006) HPA- and HPT-axis alterations in chronic posttraumatic stress disorder, *Psychoneuroendocrinology*, **31**, 1220-1230, doi: 10.1016/j.psyneuen.2006.09.003.

NEONATAL EXPOSURE TO BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE ALTERS BEHAVIOR AND HIPPOCAMPAL IONOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR EXPRESSION IN THE ADULT RATS AFTER PSYCHOGENIC TRAUMA

V. A. Nikitina¹, M. V. Zakharova², A. N. Trofimov¹, A. P. Schwarz²,
G. V. Beznin¹, S. G. Tsikunov¹, and O. E. Zubareva^{2*}

¹ Institute of Experimental Medicine, 197376 Saint Petersburg, Russia

² Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
194223 Saint Petersburg, Russia; E-mail: zubarevae@mail.ru

According to the “two-hit hypothesis” of formation of psychoneuropathology, infectious diseases and other pathological conditions during critical periods of early ontogenesis disrupt the normal development of the brain, increasing its vulnerability to stresses experienced in the adolescence and adulthood. It is assumed that these disorders may be associated with changes in the functional activity of the hippocampal glutamatergic system. In the present work, we studied the protein level of gene expression of NMDA (GluN1, GluN2a, GluN2b) and AMPA (GluA1, GluA2) glutamate receptor subunits, as well as glutamate transporter EAAT2 in the ventral and dorsal hippocampus of rats which were injected with LPS during the 3rd week of the life and experienced a vital stress (a contact with a predator, a python) in the adulthood. The testing was performed 25 days after the stress. Abnormalities were found in the ventral, but not in the dorsal hippocampus. Non-stressed LPS-treated rats had a lower level of GluN2b protein in the ventral hippocampus as compared to the control animals, while after the stress the level of GluN2b was significantly increased in the LPS-treated, but not in the control animals. Different responses to stress in the experimental and control rats were also revealed in terms of the exploratory behavior: when compared with non-stressed animals, the stressed control rats demonstrated a higher locomotor activity in the 1st min of the “Open Field” test, while this parameter was lower in the stressed experimental rats. In addition, the stressed and non-stressed rats which were injected with LPS in the early age spent a longer time in the open arms when tested in the “Elevated Plus Maze” and had a reduced blood level of corticosterone. To summarize, our study shows that exposure to bacterial LPS in the early postnatal ontogenesis affects the pattern of stress-induced changes in the behavior and expression of genes encoding subunits of ionotropic glutamate receptors in the hippocampus after a psychogenic trauma suffered in the adulthood.

Keywords: lipopolysaccharide, early development, brain, stress reactivity, NMDA receptor, AMPA receptor, behavior