



# Влияние раннего провоспалительного стресса на экспрессию различных транскриптов *BDNF* в отделах мозга самцов крыс препубертатного возраста

Д.И. Перегуд<sup>1,2</sup>✉, С.В. Фрейман<sup>2,3</sup>, А.О. Тишкина<sup>2</sup>, Л.С. Сохраняева<sup>2</sup>, Н.А. Лазарева<sup>2</sup>, М.В. Онуфриев<sup>2,3</sup>, М.Ю. Степаничев<sup>2</sup>, Н.В. Гуляева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт наркологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>3</sup> Научно-практический центр психоневрологии департамента здравоохранения Москвы, Москва, Россия

Провоспалительный стресс, перенесенный в раннем постнатальном периоде, способен провоцировать нарушение различных типов поведения у взрослых половозрелых особей, при этом механизмы, лежащие в основе данных нарушений, изучены недостаточно. Мозговой нейротрофический фактор (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF) играет ключевую роль в реализации нейропластических процессов как в норме, так и при патологии. Ген *BDNF* транскрибируется в виде экзон-специфических мРНК, которые могут обладать различной реактивностью в зависимости от стимула. Мы предположили, что нарушения экспрессии специфических мРНК *BDNF* в отделах центральной нервной системы после стресса, вызванного провоспалительными стимулами на ранних этапах онтогенеза, могут составлять один из механизмов последующих расстройств поведения. Целью работы явилось исследование влияния провоспалительного стресса в раннем неонатальном периоде на содержание BDNF на уровне полипептида и паттерн экспрессии экзон-специфических мРНК *BDNF* в неокортексе и гиппокампе самцов крыс препубертатного возраста. Провоспалительный стресс вызывали путем подкожного введения бактериального липополисахарида детенышам крыс на третий и пятый постнатальные дни, а анализ BDNF проводили в возрасте 36 дней. Концентрацию полипептида BDNF в отделах головного мозга оценивали посредством твердофазного иммуноферментного анализа, экспрессию экзон-специфических мРНК *BDNF* исследовали с помощью количественной полимеразной цепной реакции после этапа обратной транскрипции. Содержание полипептида BDNF и уровень транскриптов, содержащих общий экзон IX, не менялись в результате провоспалительного стресса. В неокортексе (но не в гиппокампе) крыс, которым вводили липополисахарид, снижался уровень мРНК *BDNF*, содержащей экзон IV. Изменений в уровне других транскриптов, содержащих экзоны I и VI, не наблюдалось ни в одном из исследованных отделов мозга. Учитывая, что, согласно данным литературы, у животных, перенесших ранний провоспалительный стресс, развиваются нарушения поведения, мы предполагаем, что специфические изменения паттерна экспрессии *BDNF* могут быть вовлечены в патогенез этих нарушений.

Ключевые слова: мозговой нейротрофический фактор; транскрипция *BDNF*; ранний провоспалительный стресс; липополисахарид; неокортекс; гиппокамп.

## Effects of early neonatal proinflammatory stress on the expression of *BDNF* transcripts in the brain regions of prepubertal male rats

D.I. Peregud<sup>1,2</sup>✉, S.V. Freiman<sup>2,3</sup>, A.O. Tishkina<sup>2</sup>, L.S. Sokhranyaeva<sup>2</sup>, N.A. Lazareva<sup>2</sup>, M.V. Onufriev<sup>2,3</sup>, M.Y. Stepanichev<sup>2</sup>, N.V. Gulyaeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution "V. Serbsky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Drug Addiction", of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Research and Practice Psychoneurology Centre, Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

Early postnatal proinflammatory stress provokes behavioral impairments in adulthood; however, underlying mechanisms are still elusive. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plays a crucial role in neuroplastic changes in health as well as at pathology. The *BDNF* gene is transcribed to exon-specific mRNAs and the pattern of their expression depends on stimulus. We suggest that disturbances of exon-specific *BDNF* mRNA expression in the brain regions after stress induced by proinflammatory stimuli in early postnatal period could be one of the underlying mechanisms of consequent behavioral impairments. Thus, the aim of the study was to investigate the effects of proinflammatory stress in early postnatal ontogeny on the expression of BDNF and the patterns of expression of the *BDNF* gene in the neocortex and hippocampus of prepubertal male rats. The proinflammatory stress was induced by subcutaneous administration of bacterial lipopolysaccharide (LPS) to rat pups on postnatal days 3 and 5, while BDNF expression was analyzed in 36-day-old rats. BDNF polypeptide concentration was estimated by means of an enzyme-linked immunosorbent assay, while quantitative polymerase chain reaction followed by reverse transcription was used to detect exon-specific *BDNF* mRNA expression. The levels of *BDNF* and transcripts, containing common exon IX were similar

in the control and LPS-treated rats. In the rats treated with LPS, the level of *BDNF* mRNA, containing exon IV, was lower in the neocortex, but not in the hippocampus. No changes in the expression of the transcripts containing exons I and VI were observed in any brain structure studied. We suggest that specific alterations in *BDNF* expression may be involved in the susceptibility to the development of behavioral impairments of animals subjected to early proinflammatory stress.

Key words: brain-derived neurotrophic factor; *BDNF* transcription; early proinflammatory stress; lipopolysaccharide; neocortex; hippocampus.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Перегуд Д.И., Фрейман С.В., Тишкина А.О., Сохраняева Л.С., Лазарева Н.А., Онуфриев М.В., Степанчиков М.Ю., Гуляева Н.В. Влияние раннего провоспалительного стресса на экспрессию различных транскриптов *BDNF* в отделах мозга самцов крыс препубертатного возраста. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):191-197. DOI 10.18699/VJ16.149

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Peregud D.I., Freiman S.V., Tishkina A.O., Sokhranyaeva L.S., Lazareva N.A., Onufriev M.V., Stepanichev M.Y., Gulyaeva N.V. Effects of early neonatal proinflammatory stress on the expression of *BDNF* transcripts in the brain regions of prepubertal male rats. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):191-197. DOI 10.18699/VJ16.149

Изменения транскрипционного профиля в различных отделах ЦНС лежат в основе долговременных модификаций нейропластичности (Tabuchi, 2008; Lyons, West, 2011). С помощью экспрессионного анализа на полногеномном уровне установлено, что различные виды стресса (Erburu et al., 2015), включая индуцированный провоспалительными стимулами (Oskvig et al., 2012), могут сопровождаться значимыми изменениями уровня тысяч мРНК в ЦНС. Нарушения нейропластичности, вызванные стрессом, в значительной степени обусловлены изменениями нейротрофического обеспечения клеток мозга. В частности, стресс подавляет экспрессию и содержание в ЦНС мозгового нейротрофического фактора (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF), который играет центральную роль в процессах нейропластичности (Сахарнова и др., 2012; Иванов, 2014; Calabrese et al., 2014). Введение бактериального липополисахарида (ЛПС) грызунам сопровождается снижением экспрессии BDNF в гиппокампе и неокортексе на уровне как полипептида (Guan, Fang, 2006), так и мРНК (Kranjac et al., 2012). По всей видимости, снижение экспрессии BDNF в отделах мозга является одним из ключевых звеньев в реализации поведенческих нарушений, отмечаемых при введении ЛПС. Так, в работе Zhang с коллегами (2014) приведены данные о том, что введение ЛПС приводит к снижению экспрессии BDNF, уровня фосфорилирования его рецептора TrkB, плотности шипиков в гиппокампе и неокортексе, а также к развитию депрессивно-подобного состояния, а стимуляция сигналинга BDNF посредством миметика TrkB 7,8-гидроксифлавона предотвращает указанные нарушения (Zhang et al., 2014). Таким образом, ЛПС модулирует экспрессию BDNF, что, очевидно, имеет функциональное значение, однако происходят ли подобные изменения при воздействии ЛПС в раннем постнатальном онтогенезе, а также меняются ли транскрипционные механизмы, лежащие в основе данного феномена, остается неизученным.

Транскрипция *BDNF* представляет собой сложно организованный процесс, который определяют структурные особенности гена *BDNF* и комплекс факторов, модулиру-

ющих его транскрипционную регуляцию. К настоящему моменту известно, что мРНК *BDNF* грызунов может быть представлена 18 различными вариантами (Aid et al., 2007). Все они кодируют одинаковую аминокислотную последовательность препробелка BDNF. Большое число вариантов мРНК обусловлено тем, что ген *BDNF* содержит по меньшей мере 9 экзонов (некодирующие экзоны I–VIII, и кодирующий экзон IX, общий для всех транскриптов) (Aid et al., 2007). В 5'-области каждого некодирующего экзона расположены индивидуальные промоторы, с которых иницируется транскрипция. В ЦНС грызунов транскрипты *BDNF*, содержащие экзоны I, IV и VI, наиболее реактивны в отношении разнообразных стимулов. В частности, изменение транскрипционного профиля *BDNF* было отмечено в результате социального стресса (Duclot, Kabbaj, 2013) или обучения в условиях выраженного стрессорного воздействия, например при выработке контекст-зависимой условной реакции страха (Lubin et al., 2008). Известно также, что стресс в форме экспозиции детенышей стрессированной матери в раннем постнатальном онтогенезе приводит к снижению экспрессии *BDNF* в мозге, которое происходит вследствие метилирования промоторного участка экзона IV (Roth et al., 2009).

Следует отметить, что ранний постнатальный онтогенез характеризуется высокой чувствительностью мозга к влиянию средовых факторов. Хорошо известно, что различные воздействия в этот период онтогенеза могут иметь длительные последствия, которые проявляются у взрослых особей в виде предрасположенности к развитию психических нарушений (O'Connor et al., 2005; Loman, Gunnar, 2010). Принято считать, что стрессорные воздействия на организм в критические периоды имеют «программирующее» действие, приводя к необратимым долговременным последствиям (Lucassen et al., 2013). К стрессорным воздействиям подобного рода можно отнести нарушения родительской заботы о потомстве, включая материнскую депрессию (O'Connor et al., 2005), изменения структуры питания (Laus et al., 2011), эмоциональные потрясения (Yehuda et al., 2005). Причиной возникновения

подобных длительных изменений могут быть структурно-функциональные нарушения в ряде отделов мозга, в частности в гиппокампе, созревание которого продолжается в течение длительного времени после рождения (Altman, Bayer, 1990; Arnold, Trojanowski, 1996).

Эффекты «программирующего» воздействия на развитие мозга имеет и стрессорная реакция, возникающая в ответ на проникновение в организм различных патогенов. В частности, парентеральное введение детенышам крыс бактериального ЛПС в раннем постнатальном периоде вызывает развитие выраженной стресс-реакции, которая приводит к значительным перестройкам в ЦНС. Следствием подобного стрессорного воздействия в раннем постнатальном периоде является возникновение существенных нарушений поведения у взрослых половозрелых особей (Walker et al., 2009, 2011, 2012). К наиболее характерным последствиям такого воздействия у грызунов можно отнести нарушения устойчивости к стрессу, проявления тревожности и депрессивно-подобного поведения, снижение исследовательской активности, нарушения процессов нейропластичности, которые лежат в основе обучения и формирования памяти (Walker et al., 2009; Rico et al., 2010; Sominsky et al., 2012a, b; Doosti et al., 2013). Учитывая, что развитие постстрессорной депрессии в значительной степени обусловлено нарушениями в системе нейротрофинов (Григорьян и др., 2014; Stepanichev et al., 2014), в частности *BDNF*, необходимо изучить, как «программирующее» воздействие стресса в раннем постнатальном онтогенезе изменяет процессы, вовлеченные в продукцию этого нейротрофина в мозге.

Целью работы явилось исследование влияния раннего неонатального введения ЛПС на содержание *BDNF* и экспрессию экзон-специфических мРНК *BDNF* (I, IV, VI и IX) в гиппокампе и неокортексе крыс.

## Методы

Эксперименты с животными выполнены в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. и приказа № 267 МЗ РФ от 19 июня 2003 г. в области защиты и использования животных в экспериментальных исследованиях. Протокол эксперимента утвержден Этической комиссией ИВНД и НФ РАН.

Беременные самки крыс линии Вистар были получены из Филиала «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (Московская область, Россия) и размещены индивидуально в клетках вивария. Животные имели неограниченный доступ к пище и воде, световая фаза суточного цикла продолжалась с 8:00 до 20:00. День рождения детенышей крыс считали днем 0 постнатального периода (ПНД0). После родов число детенышей в помете снижали до девяти. До возраста ПНД21 крысят содержали в клетках вместе с матерями. В возрасте 21 день самцов и самок рассаживали по отдельным клеткам таким образом, чтобы крысята, рожденные в одном помете, находились вместе.

На третий и пятый дни после рождения крысятам подожно вводили бактериальный ЛПС из *Escherichia coli*,

серотип O26:B6 (Sigma, США) в дозе 50 мкг/кг в объеме 200 мкл/кг. ЛПС растворяли непосредственно перед введением в изотоническом (0,9 %) водном растворе NaCl. Контрольные животные получали соответствующий объем изотонического раствора. Такая схема введения и доза ЛПС не приводят к гибели животных и вызывают стресс-ответ, который детектируется в течение 48 ч (Shanks et al., 1995).

Животных декапитировали в возрасте ПНД36 (препубертатный период) под хлоралгидратной анестезией (350 мг/кг). Мозг вынимали, промывали в ледяном 0,9 %-м растворе NaCl и на льду вынимали гиппокамп и неокортекс. Структуры левого полушария использовали для оценки содержания *BDNF*, а правого – для анализа профиля экспрессии мРНК *BDNF*. Возможную асимметрию при этом не учитывали, поскольку для *BDNF* она была отмечена лишь в редких работах, и эти данные являются весьма противоречивыми (Lehmann et al., 2007; Farhang et al., 2014). Выбор указанных регионов мозга был обусловлен тем, что в них отмечают структурно-функциональные перестройки, которые, по-видимому, определяют поведенческие расстройства при стрессе. Кроме того, как обсуждалось выше, эффекты введения ЛПС на нейротрофины в мозге взрослых животных проявляются наиболее ярко в этих отделах.

Содержание *BDNF* в ткани мозга крыс оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа. Для этого использовали наборы ChemiKine Brain-Derived Neurotrophic Factor Sandwich ELISA kit (#CYT306; Millipore, США). Ткань мозга гомогенизировали в ледяном буфере согласно инструкции производителя. Полученные в результате центрифугирования супернатанты апплицировали в лунки планшета с предварительно адсорбированными первичными антителами к *BDNF* и далее анализ проводили согласно инструкции производителя. Содержание *BDNF* выражали в пг/мг массы ткани.

Экспрессию экзон-специфичных вариантов мРНК *BDNF* оценивали посредством проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с регистрацией продуктов амплификации в режиме реального времени после этапа обратной транскрипции. Тотальную РНК из образцов экстрагировали с помощью набора реактивов *miRvana* (#AM1560; Ambion, США). Чистоту и концентрацию тотальной РНК исследовали посредством измерения оптической плотности при 260 нм и 280 нм. Образцы, для которых отношение оптической плотности 260/280 не входило в диапазон между 1,8 и 2,1, исключали из исследования. Целостность тотальной РНК оценивали посредством электрофореза в 1,5 %-м агарозном геле. Для удаления примесей геномной ДНК изолированная тотальная РНК была обработана DNase I (#M0303; NEB, США). Обратную транскрипцию проводили с помощью набора реактивов для синтеза комплементарной ДНК Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1642; Thermo Fisher Scientific, США). ПЦР проводили в двух параллельных образцах в присутствии 5 пмоль синтетических олигонуклеотидов в качестве праймеров с помощью набора реактивов, содержащего Taq ДНК-полимеразу с ингибирующей активностью фермента антителами, и интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR GREEN

Synthetic oligonucleotides

Template	Nucleotide sequence (5'→3')		Amplicon size, bp
	Forward	Reverse	
<i>BDNF</i> exon I (NM_012513.4)	GCGTTGAGAAAGCTGCTTCAG	GAATGAGCGAGGTTACCAATGA	77
<i>BDNF</i> exon IV (NM_001270633.1)	TTCCACTATCAATAATTAACTTCTTTC	CTCTTACTATATATTTCCCTTCTCTTCAGT	114
<i>BDNF</i> exon VI (NM_001270630.1)	TTTGGGGCAGACGAGAAAGC	GGCAGTGGAGTCACATTGTTGTC	81
<i>BDNF</i> exon IX	CCATAAGGACGCGACTTGATC	AGACATGTTTGCGGCATCCAGG	121
rpS18 (NM_213557.1)	TTTTGGGGCCTTCGTGTCCG	CAGCAAAGGCCCAAAGACTCAT	102

(#PK147S; Евроген, Россия). Последовательности праймеров, специфичных для мРНК rpS18 (рибосомальный белок S18 – ген сравнения), были подобраны с помощью сервиса <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Последовательности праймеров для экзон-специфичных мРНК *BDNF* (транскрипты, содержащие экзон I, IV или VI) были взяты из работы Schmidt с коллегами (Schmidt et al., 2012). Для оценки общей транскрипции *BDNF* оценивали уровень мРНК, содержащих экзон IX (этот экзон является общим и его содержат все варианты *BDNF*) с помощью праймеров, описанных ранее (Tsankova et al., 2004). Последовательности синтетических олигонуклеотидов, использованных в работе, представлены в таблице. Олигонуклеотиды были синтезированы компанией Евроген (Россия). ПЦР проводили посредством термоциклера АНК-32 (ИАНП РАН и МГТУ им. Н.Э. Баумана, Россия) по следующей программе: 1) 10 с при 95 °С; 2) 10 с при 65 °С; 3) 40 с при 72 °С. При исследовании количества мРНК rpS18 было проведено 40 циклов амплификации, при исследовании количества экзон-специфичных мРНК *BDNF* – 50 циклов амплификации. Количество специфической мРНК было оценено посредством регистрации порогового цикла (C<sub>t</sub>) с помощью программы ANK32 для Windows версия 1.1 (ИАНП РАН, Россия) и последующего сравнительного анализа с использованием содержания мРНК rpS18 в качестве гена сравнения по методу 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> (Livak, Schmittgen, 2001).

Для сравнения данных в экспериментальных группах применяли непараметрический критерий Манна–Уитни, поскольку в большинстве случаев распределение переменных в выборках не соответствовало нормальному. Различия между группами считали достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты**

Содержание *BDNF* в неокортексе и гиппокампе крыс препубертатного возраста исследовали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа. Не удалось выявить существенного изменения в содержании *BDNF* ни в неокортексе, ни в гиппокампе у крыс, перенесших раннее провоспалительное воздействие, по сравнению с контрольными животными (рис. 1).

Общий уровень содержания продуктов транскрипции оценивали по количеству мРНК, включающей экзон IX, который является общим для всех вариантов *BDNF*. Как видно из данных, представленных на рис. 2 и 3, ни в неокортексе, ни в гиппокампе крыс препубертатного возраста

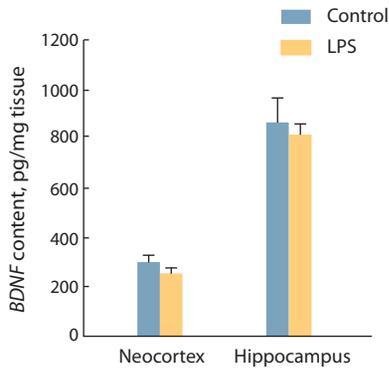
ни в гиппокампе крыс препубертатного возраста общий уровень экспрессии мРНК *BDNF* не различался в подопытной группе по сравнению с контрольной. Эти данные хорошо соотносятся с результатами, полученными с помощью иммуноферментного анализа. Однако в неокортексе (см. рис. 2) наблюдались достоверные изменения в паттерне экспрессии экзон-специфичных вариантов мРНК. В частности, было обнаружено снижение уровня транскриптов, содержащих экзон IV. Содержание других исследованных транскриптов было сходным с таковым у контрольных животных того же возраста. Вопреки ожиданиям, нам не удалось выявить существенных изменений в паттерне экспрессии экзон-специфичных транскриптов мРНК в гиппокампе (рис. 3).

Корреляционный анализ показал, что содержание мРНК экзонов I, IV и VI достоверно положительно коррелирует с уровнем экзона IX в неокортексе (рис. 3, а) независимо от введения ЛПС (рис. 3, б). Тогда как в гиппокампе введение ЛПС нарушало положительные корреляционные отношения экзонов I, VI и, в меньшей степени, IV с эксоном IX (рис. 3, в), которые отмечались у животных контрольной группы (рис. 3, в).

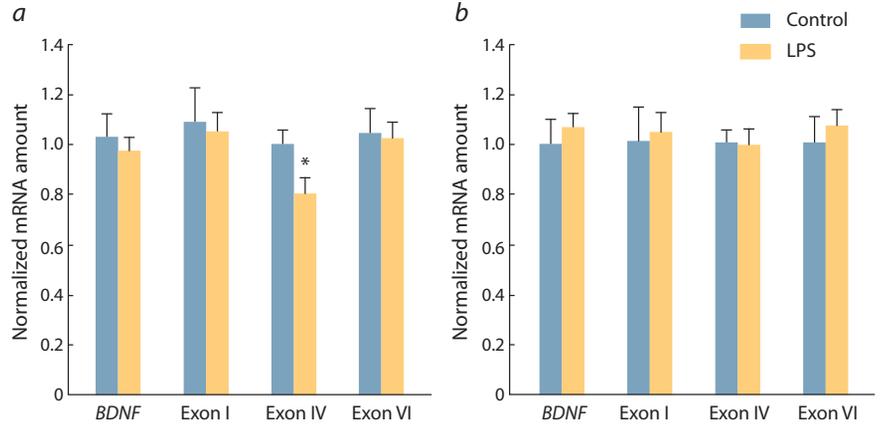
Таким образом, показано, что провоспалительное воздействие бактериальным ЛПС в раннем постнатальном онтогенезе не вызывает существенного изменения содержания полипептида и мРНК *BDNF* в неокортексе и гиппокампе крыс препубертатного возраста. При этом в неокортексе происходит достоверное снижение уровня транскрипта *BDNF*, содержащего экзон IV, а в гиппокампе наблюдаются нарушения взаимосвязи между экспрессией специфических мРНК.

**Обсуждение**

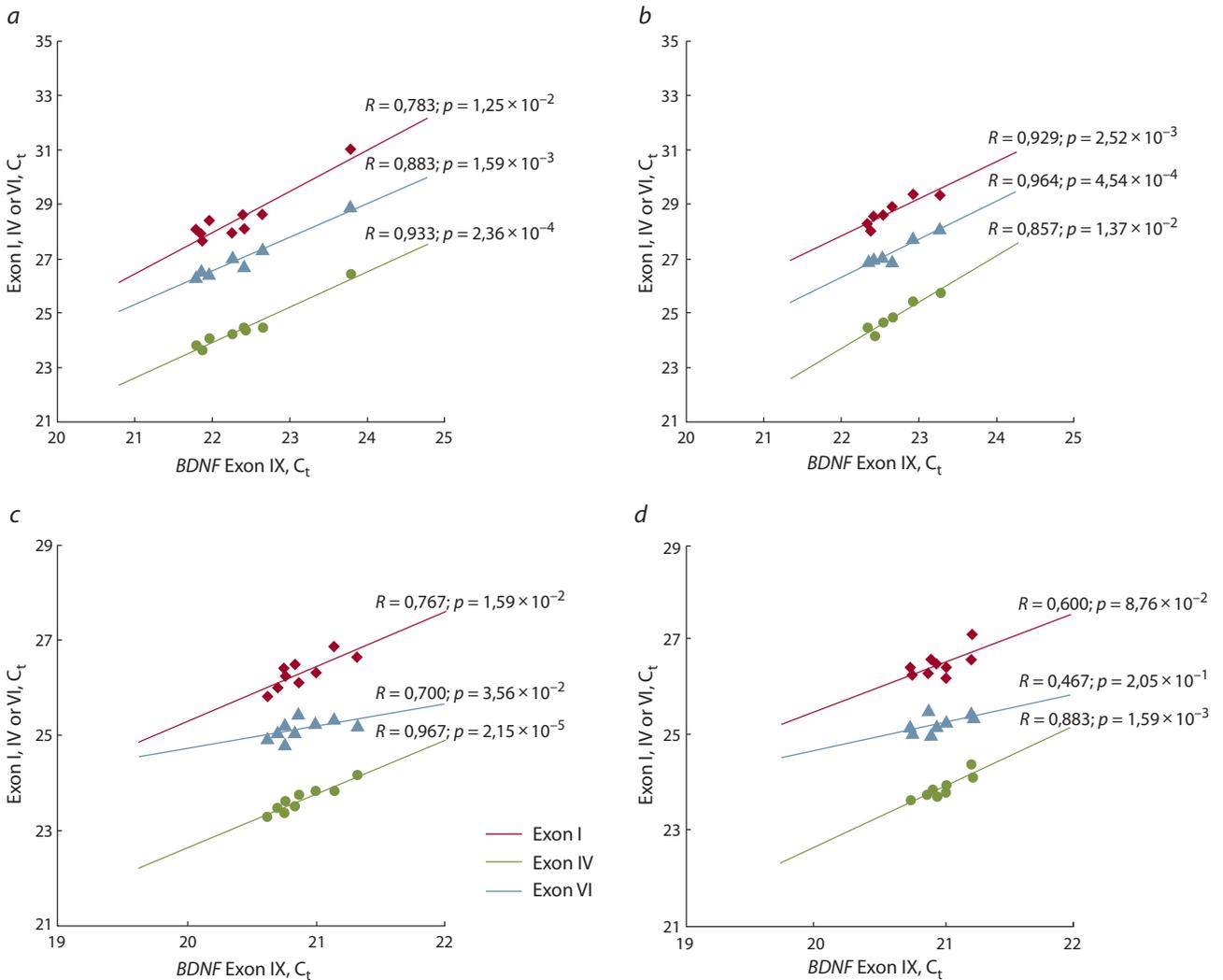
Данные литературы указывают на то, что провоспалительные стимулы способны существенно изменять метаболизм *BDNF* в мозге. При этом в гиппокампе и неокортексе наблюдаются изменения на уровне как полипептида (Guan, Fang, 2006; Zhang et al., 2014), так и мРНК (Kranjac et al., 2012). Авторы этих работ отмечали, как правило, снижение уровня как полипептида *BDNF*, так и мРНК *BDNF*. В отличие от этих исследований, в представленной работе изучали **отдаленные** эффекты введения ЛПС в **неонатальный** период развития. У крыс препубертатного возраста нам не удалось обнаружить существенных изменений экспрессии полипептида и общей транскрипционной активности гена *BDNF* ни в неокортексе, ни



**Fig. 1.** *BDNF* contents in brain regions of prepubertal male rats after early neonatal proinflammatory stress. The data are presented as  $M \pm SEM$ . Number of animals per group  $N = 10$ .



**Fig. 2.** Expression patterns of *BDNF* exon-specific transcripts in brain divisions of prepubertal male rats after early neonatal proinflammatory stress: (a) neocortex, (b) hippocampus. The data are presented as  $M \pm SEM$ . Number of animals per group  $N = 10$ . \* Differences from the control group significant at  $p < 0.05$  (Mann-Whitney *U* test).



**Fig. 3.** Co-expression of *BDNF* transcripts containing exons I, IV, VI and the *BDNF* transcript containing the common exon IX. (a) Neocortex, Control group; (b) Neocortex, LPS group; (c) Hippocampus, Control group; (d) Hippocampus, LPS group. Spearman's rank correlation, *R*, correlation coefficient.

в гиппокампе, и единственным достоверным эффектом экспериментального воздействия стало снижение содержания мРНК *BDNF*, включающей экзон IV, в неокортексе. Учитывая результаты предыдущих работ (Kranjac et al., 2012), в которых было показано снижение уровня мРНК *BDNF* в гиппокампе и неокортексе, можно было ожидать, что наряду со снижением экспрессии транскриптов, содержащих специфические экзоны, будет отмечаться снижение транскриптов, имеющих общий экзон IX. Однако подобного эффекта не наблюдалось. Возможно, дизайн представленного эксперимента (меньшая доза ЛПС и намного более поздний забор ткани) не позволил детектировать выраженные изменения.

Тем не менее результаты настоящего исследования согласуются с проведенными ранее экспериментами, в которых было обнаружено снижение уровня мРНК *BDNF*, содержащей экзон IV, в префронтальной коре после экспозиции крыс с первого по седьмой день после рождения стрессированным самкам (Roth et al., 2009). Авторы указывают, что этот «программирующий» эффект раннего стрессорного воздействия был связан с эпигенетическим влиянием на промотор IV экзона. Сходство этих результатов с нашими может свидетельствовать о том, что природа стрессорного фактора менее важна для регуляции экспрессии *BDNF*, чем факт наличия значимой стресс-реакции, в данном случае возникающей в результате воздействия ЛПС на организм в раннем неонатальном периоде. Несмотря на то, что в нашей работе эффект раннего провоспалительного воздействия не отражался непосредственно в достоверном снижении или увеличении уровней мРНК разных экзонов гена *BDNF* в гиппокампе животных препубертатного возраста, тем не менее, наблюдалось рассогласование коэкспрессии мРНК I, VI и, в меньшей степени, IV экзона с эксоном IX, что может быть следствием нарушения регуляции процесса транскрипции у этих крыс.

Промотор экзона IV гена *BDNF* среди прочих содержит консенсусные сайты связывания транскрипционного фактора NF-κB, которые оказывают положительное влияние на активность промотора (Pruunsild et al., 2011) и экспрессию соответствующей мРНК (Lipsky et al., 2001; Saha et al., 2006). NF-κB является хорошо охарактеризованной нижележащей мишенью рецептора ЛПС TLR4: ЛПС, связываясь со своим рецептором, инициирует цепь внутриклеточных молекулярных событий, приводящих к транслокации NF-κB в ядро и стимуляции транскрипции генов (Kawai, Akira, 2007). Можно предположить, что отдаленным эффектом раннего неонатального введения ЛПС является снижение активности NF-κB и, как следствие, снижение экспрессии мРНК *BDNF*, содержащих экзон IV, который наблюдали в настоящей работе. С другой стороны, мы не можем исключить и упомянутого выше эффекта метилирования этого промотора.

Функциональная значимость сложной транскрипционной организации гена *BDNF* до конца не понятна, но предполагается, что транскрипты, содержащие разные экзоны, могут различаться локализацией внутри нейронов. После деполаризации мРНК *BDNF*, содержащая экзоны II и VI, локализуется преимущественно в дистальных дендритах, а транскрипты, содержащие экзоны I и IV, локализованы

в теле нейронов (Chiaruttini et al., 2008). Более того, снижение уровня мРНК, содержащей определенные экзоны, посредством интерферирующих РНК специфически нарушает архитектуру дендритов в культуре нейронов: экзоны I и IV селективно влияют на проксимальные дендриты, а экзоны II и VI – на дистальные (Baj et al., 2011). По-видимому, особенности локализации мРНК *BDNF* взаимосвязаны с локальным белковым синтезом и лежат в основе пластических изменений.

Таким образом, можно предположить, что специфическое снижение экспрессии мРНК *BDNF*, содержащей экзон IV, в неокортексе может быть вовлечено в патогенез структурно-функциональных нарушений ЦНС при неонатальном введении ЛПС и, соответственно, в формирование предрасположенности животных, перенесших ранний провоспалительный стресс, к развитию нарушений поведения.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Natalia Stepanicheva for excellent technical assistance in handling animals.

The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 13-04-40013-N.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Aid T., Kazantseva A., Piirsoo M., Palm K., Timmusk T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J. Neurosci. Res.* 2007;85:525-535.
- Altman J., Bayer S.A. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.* 1990;301:365-381.
- Arnold S.E., Trojanowski J.Q. Human fetal hippocampal development: I. Cytoarchitecture, myeloarchitecture, and neuronal morphologic features. *J. Comp. Neurol.* 1996;367:274-292.
- Baj G., Leone E., Chao M.V., Tongiorgi E. Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108:16813-16818.
- Calabrese F., Rossetti A.C., Racagni G., Gass P., Riva M.A., Molteni R. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. *Front. Cell Neurosci.* 2014;8:430. DOI 10.3389/fncel.2014.00430.eCollection 2014
- Chiaruttini C., Sonogo M., Baj G., Simonato M., Tongiorgi E. BDNF mRNA splice variants display activity-dependent targeting to distinct hippocampal laminae. *Mol. Cell. Neurosci.* 2008;37:11-19.
- Doosti M.-H., Bakhtiari A., Zare P., Amani M., Majidi-Zolbanin N., Babri S., Salari A.A. Impacts of early intervention with fluoxetine following early neonatal immune activation on depression-like behaviors and body weight in mice. *Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 2013;43:55-65.
- Duclot F., Kabbaj M. Individual differences in novelty seeking predict subsequent vulnerability to social defeat through a differential epigenetic regulation of brain-derived neurotrophic factor expression. *J. Neurosci.* 2013;33:11048-11060.
- Erburu M., Cajaleon L., Guruceaga E., Venzala E., Muñoz-Cobo I., Beltrán E., Puerta E., Tordera R.M. Chronic mild stress and imipramine treatment elicit opposite changes in behavior and in gene expression in the mouse prefrontal cortex. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2015;135:227-236.
- Farhang S., Barar J., Fakhari A., Mesgariabbasi M., Khani S., Omid Y., Farnam A. Asymmetrical expression of BDNF and NTRK3 genes

- in frontoparietal cortex of stress-resilient rats in an animal model of depression. *Synapse*. 2014;68:387-393.
- Grigoryan G.A., Dygalo N.N., Gekht A.B., Stepanichev M.Iu., Gulyaeva N.V. Molecular and cellular mechanisms of depression. Role of glucocorticoids, cytokines, neuro-transmitters, and trophic factors in genesis of depressive disorders. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk=Advance in Physiological Sciences (Moscow)*. 2014;45(2):3-19.
- Guan Z., Fang J. Peripheral immune activation by lipopolysaccharide decreases neurotrophins in the cortex and hippocampus in rats. *Brain Behav. Immun*. 2006;20:64-71.
- Ivanov A.D. The role of NGF and BDNF in mature brain activity regulation. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatelnosti im. I.P. Pavlova=I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 2014;64:137-146.
- Kawai T., Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med*. 2007;13:460-469.
- Kranjac D., McLinden K.A., Deodati L.E., Papini M.R., Chumley M.J., Boehm G.W. Peripheral bacterial endotoxin administration triggers both memory consolidation and reconsolidation deficits in mice. *Brain Behav. Immun*. 2012;26:109-121.
- Laus M.F., Vales L.D., Costa T.M., Almeida S.S. Early postnatal protein-calorie malnutrition and cognition: A review of human and animal studies. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2011;8:590-612.
- Lehmann K., Rodriguez E.G., Kratz O., Moll G.H., Dawirs R.R., Teuchert-Noodt G. Early preweaning methamphetamine and postweaning rearing conditions interfere with the development of peripheral stress parameters and neural growth factors in gerbils. *Int. J. Neurosci*. 2007;117:1621-1638.
- Lipsky R.H., Xu K., Zhu D., Kelly C., Terhakopian A., Novelli A., Marini A.M. Nuclear factor kappaB is a critical determinant in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection. *J. Neurochem*. 2001;78:254-264.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCt method. *Methods*. 2001;25:402-408.
- Loman M.M., Gunnar M.R. Early experience and the development of stress reactivity and regulation in children. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 2010;34:867-876.
- Lubin F.D., Roth T.L., Sweatt J.D. Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J. Neurosci*. 2008;28:10576-10586.
- Lucassen P.J., Naninck E.F., van Goudoever J.B., Fitzsimons C., Joels M., Korosi A. Perinatal programming of adult hippocampal structure and function; emerging roles of stress, nutrition and epigenetics. *Trends Neurosci*. 2013;36:621-631.
- Lyons M.R., West A.E. Mechanisms of specificity in neuronal activity-regulated gene transcription. *Prog. Neurobiol*. 2011;94:259-295.
- O'Connor T.G., Ben-Shlomo Y., Heron J., Golding J., Adams D., Glover V. Prenatal anxiety predicts individual differences in cortisol in pre-adolescent children. *Biol. Psychiat*. 2005;58:211-217.
- Oskvig D.B., Elkahloum A.G., Johnson K.R., Phillips T.M., Herkenham M. Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain Behav. Immun*. 2012;26:623-634.
- Pruunsild P., Sepp M., Orav E., Koppel I., Timmusk T. Identification of cis-elements and transcription factors regulating neuronal activity-dependent transcription of human BDNF gene. *J. Neurosci*. 2011;31:3295-3308.
- Rico J.L.R., Ferraz D.B., Ramalho-Pinto F.J., Morato S. Neonatal exposure to LPS leads to heightened exploratory activity in adolescent rats. *Behav. Brain Res*. 2010;215:102-109.
- Roth T.L., Lubin F.D., Funk A.J., Sweatt J.D. Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF. *Biol. Psychiat*. 2009;65:760-769.
- Saha R.N., Liu X., Pahan K. Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine. *J. Neuro-immune Pharmacol*. 2006;3:212-222.
- Sakharnova T.A., Vedunova M.V., Mukhina I.V. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its role in the functioning of the central nervous system. *Neyrokimiya=Neurochemistry (Moscow)*. 2012;29:269-277.
- Schmidt H.D., Sangrey G.R., Darnell S.B., Schassburger R.L., Cha J.H., Pierce R.C., Sadri-Vakili G. Increased brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the ventral tegmental area during cocaine abstinence is associated with increased histone acetylation at BDNF exon I-containing promoters. *J. Neurochem*. 2012;120:202-209.
- Shanks N., Larocque S., Meaney M.J. Neonatal endotoxin exposure alters the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: early illness and later responsivity to stress. *Neurosci*. 1995;15:376-384.
- Sominsky L., Meehan C.L., Walker A.K., Bobrovskaya L., McLaughlin E.A., Hodgson D.M. Neonatal immune challenge alters reproductive development in the female rat. *Hormones Behav*. 2012a;62:345-355.
- Sominsky L., Walker A.K., Ong L.K., Tynan R.J., Walker F.R., Hodgson D.M. Increased microglial activation in the rat brain following neonatal exposure to a bacterial mimetic. *Behav. Brain Res*. 2012b;226:351-356.
- Stepanichev M., Dygalo N.N., Grigoryan G., Shishkina G.T., Gulyaeva N. Rodent models of depression: neurotrophic and neuroinflammatory biomarkers. *Biomed. Res. Int*. 2014;2014:932757. DOI 10.1155/2014/932757
- Tabuchi A. Synaptic plasticity-regulated gene expression: a key event in the long-lasting changes of neuronal function. *Biol. Pharm. Bull*. 2008;31:327-335.
- Tsankova N.M., Kumar A., Nestler E.J. Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *J. Neurosci*. 2004;24:5603-5610.
- Walker A.K., Hawkins G., Sominsky L., Hodgson D.M. Transgenerational transmission of anxiety induced by neonatal exposure to lipopolysaccharide: implications for male and female germ lines. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37:1320-1335.
- Walker A.K., Hiles S.A., Sominsky L., McLaughlin E.A., Hodgson D.M. Neonatal lipopolysaccharide exposure impairs sexual development and reproductive success in the Wistar rat. *Brain Behav. Immun*. 2011;25:674-684.
- Walker A.K., Nakamura T., Byrne R.J., Naicker S., Tynan R.J., Hunter M., Hodgson D.M. Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: implications for the double-hit hypothesis. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34:1515-1525.
- Yehuda R., Engel S.M., Brand S.R., Seckl J., Marcus S.M., Berkowitz G.S. Transgenerational effects of posttraumatic stress disorder in babies of mothers exposed to the World Trade Center attacks during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2005;90:4115-4118.
- Zhang J.C., Wu J., Fujita Y., Yao W., Ren Q., Yang C., Li S.X., Shirayama Y., Hashimoto K. Antidepressant effects of TrkB ligands on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. *Int. J. Neuropsychopharmacol*. 2014;18. DOI 10.1093/ijnp/yyu077