

С.А. Строев<sup>1,2</sup>, Е.И. Тюлькова<sup>1</sup>, М.О. Самойлов<sup>1</sup> и М.Т. Пельто-Хьюкко<sup>2</sup>

## ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ Мп-СУПЕРОКСИДИДИСМУТАЗЫ В ГИППОКАМПЕ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ОДНО- И ТРЁХКРАТНОЙ УМЕРЕННОЙ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

<sup>1</sup> Лаборатория регуляции функций нейронов мозга (зав. — проф. М.О. Самойлов), Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург; <sup>2</sup> Отдел биологии развития (зав. — проф. М. Пельто-Хьюкко), Медицинская школа Университета г. Тампере, Финляндия, e-mail: samoilov@pavlov.infran.ru

Целью работы было исследование динамики экспрессии митохондриальной Мп-зависимой супероксиддисмутазы (Мп-СОД) через 3 и 24 ч после одно- и трёхкратной умеренной гипоксии. Исследование проведено на 18 крысах-самцах линии Вистар иммуноцитохимическим методом. Показано, что в различных областях гиппокампа влияние одно- и трёхкратной гипоксии на экспрессию Мп-СОД может как различаться, так и быть принципиально сходными. При этом динамика экспрессии по четырём точкам (3 и 24 ч после первого, 3 и 24 ч после третьего сеанса) имеет волновой характер, что может иметь важное значение для развития индуцируемой умеренной гипоксией толерантности к последующим более тяжёлым воздействиям.

**Ключевые слова:** гиппокамп, Мп-супероксиддисмутаза, иммуногистохимия, умеренная гипоксия, прекондиционирование

Трёхкратная подготовка (прекондиционирование) сеансами умеренной гипобарической гипоксии повышает выживаемость животных в ходе последующей тяжёлой гипоксии с 50 до 85% [12, 16]. При этом у выживших животных существенно снижается уровень вызываемых тяжёлой гипоксией структурных [12–14] и функциональных [1–3, 13, 14, 16] нарушений нервной системы. Эта нейропротекция связана, по-видимому, с повышением экспрессии эндогенных антиоксидантов — супероксиддисмутаз и тиоредоксинов — в ранние сроки после тяжёлого воздействия у пре-кондиционированных животных по сравнению с непрекондиционированными [5–7, 17–19].

В частности, прекондиционирование усиливало индукцию митохондриальной Мп-зависимой супероксиддисмутазы (Мп-СОД) в областях гиппокампа СА2 и СА3 (но не в СА1 и зубчатой извилине) к 3 ч вслед за последующей острой тяжёлой гипобарической гипоксией по сравнению с таковой у непрекондиционированных животных [6]. В то же время через 24 ч после трёхкратного прекондиционирования (т.е. к моменту, который соответствует началу тяжёлого гипоксического воздействия) экспрессия Мп-СОД, напротив, усиливалась в СА1 и зубчатой извилине, но не в СА2 и СА3 [9].

Таким образом, проведённые ранее исследования показали, что повышение содержания Мп-СОД у прекондиционированных животных после тяжёлой гипоксии в областях СА2 и СА3 связано не с её накоплением в ходе прекондицио-

нирующих воздействий, а с модификацией ответа на самую тяжёлую гипоксию. Более того, накопление Мп-СОД в ходе прекондиционирования в СА1 и зубчатой извилине, по-видимому, напротив, предотвращает развитие положительного влияния прекондиционирования на экспрессию этого белка вслед за тяжёлой гипоксией.

Оставалась, однако, неясной динамика экспрессии Мп-СОД в ходе прекондиционирования. Цель настоящей работы — исследовать экспрессию Мп-СОД через 3 и 24 ч после одно- и трёхкратной умеренной гипоксии.

**Материал и методы.** Исследования проводили на трёх группах (по 6 животных в каждой) взрослых крыс-самцов линии Вистар массой 200–250 г. Животных 1-й и 2-й групп подвергали соответственно одно- и трёхкратному (1 раз в сутки) воздействию умеренной гипобарической гипоксии по 2 ч в барокамере проточного типа при давлении 360 мм рт. ст. 3-ю группу составляли контрольные животные, которых также помещали в барокамеру трёхкратно, по 2 ч в сутки, но при нормальном давлении. Уровень экспрессии Мп-СОД определяли иммуноцитохимическим методом в структурах гиппокампа через 3 и 24 ч после окончания гипоксических воздействий. Все процедуры работы с животными, включая эвтаназию, были утверждены Комиссией по контролю за содержанием и использованием позвоночных лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова и соответствуют «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных». Для проведения иммуноцитохимического анализа анестезированных животных перфузировали транскардиально сначала 100 мл изотонического раствора хлорида натрия, затем в течение 4–5 мин — 4% раствором параформальдегида в 0,1 М фосфатно-солевом

буфере (PBS; pH 7,3). После окончания перфузии животных декапитировали, мозг извлекали и в течение 60 мин фиксировали тем же фиксатором. До начала анализа образцы мозга хранили в 15% растворе сахарозы в PBS при температуре 4° С. Методика проведения иммуноцитохимического анализа и последующей обработки изображений подробно описана ранее [6, 9]. Полученные с помощью криоката замороженные срезы мозга преинкубировали в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA, Boehringer Mannheim GmbH, Германия). Затем в течение 19 ч инкубировали с первичными поликлональными аффинно-очищенными кроличьими антителами к Mn-СОД человека (StressGen Biotechnologies Corp, США) и, после трёхкратной промывки в PBS — с биотинилированными козьими вторичными антителами (Vector Labs, США). После повторной трёхкратной промывки в PBS, срезы в течение 30 мин инкубировали с авидин-биотиновым комплексом (Vectastain ABC kit, Vector Labs, США). Для визуализации иммунной реакции использовали диаминобензидин (DAB Substrate kit, Vector Labs, США).

Количественный анализ иммунореактивности нейронов проводили с использованием системы, состоящей из микроскопа (Nikon Microphot-FXA, Япония), камеры (Sensi Cam, PCO CCD Imaging, Германия) и компьютера с программами Image-Pro Plus (Media Cybernetics, США) и Morphix [10].

Уровень экспрессии Mn-СОД определяли в нейронах аммонного рога (области CA1, CA2 и CA3) и зубчатой извилины гиппокампа. Анализ изображений проводили на участке длиной 500 мкм. Уровень иммунореактивности нейронов исследуемых образований оценивали на 6 срезах каждого мозга. Интенсивность окрашивания на цифровых изображениях выражали в условных единицах (усл. ед.) оптической плотности от 0 (абсолютно белого) до 100 (абсолютно черного). Иммунореактивные клетки подразделяли на 2 условных класса: слабо окрашенные (окраска на 1–10 усл. ед. интенсивнее фона) и интенсивно окрашенные (более чем на 10 усл. ед. интенсивнее фона). Уровень иммунореактивности оценивали по двум критериям: 1) отношению общего числа иммунореактивных клеток у подопытных животных к общему числу иммунореактивных клеток в контроле, выраженному в процентах ( $N_+$ ), и 2) отношению числа интенсивно окрашенных клеток у подопытных животных к таковому в контроле, также выраженному в процентах (Ni). Статистическую обработку данных проводили посредством однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Статистически значимыми считали различия при  $P < 0,05$ .

**Результаты исследования.** Иммуноцитохимический анализ показал, что одно- и трёхкратная умеренная гипобарическая гипоксия в различных областях гиппокампа у крыс может оказывать как сходное, так и различное действие на экспрессию Mn-СОД.

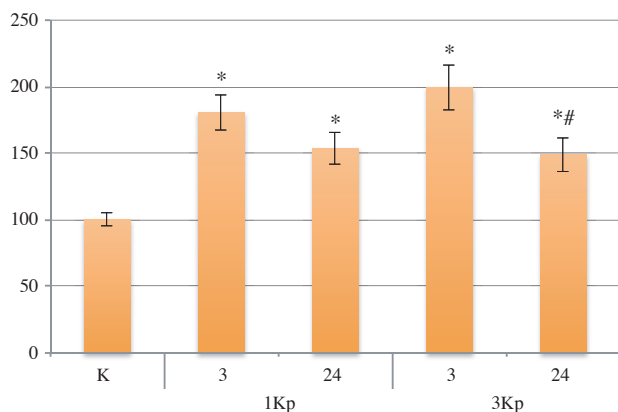
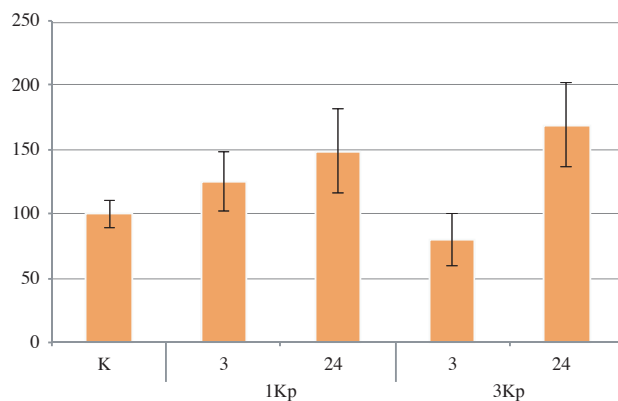
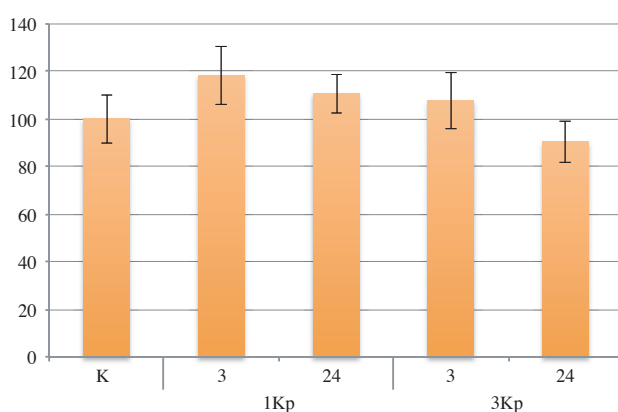
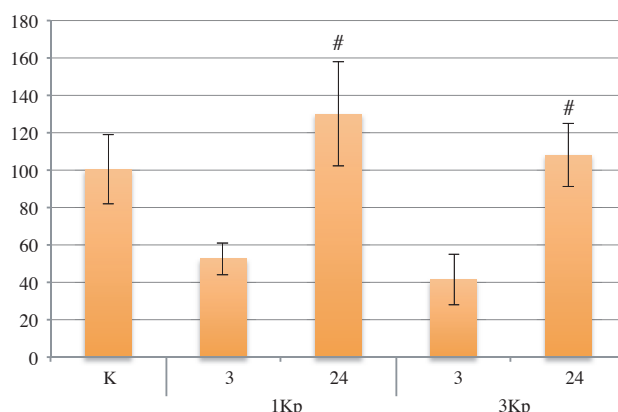
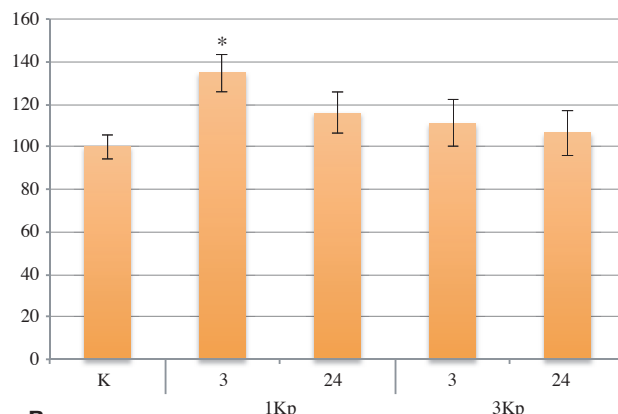
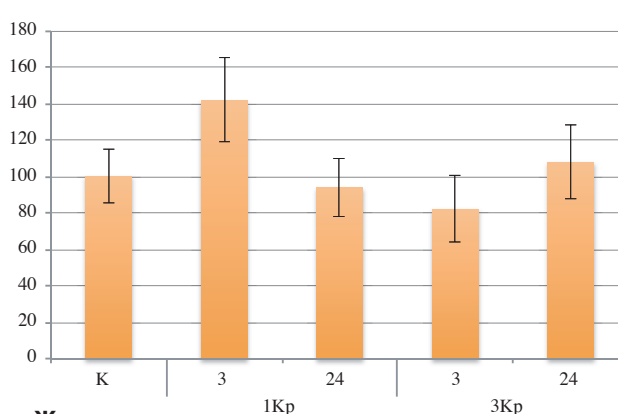
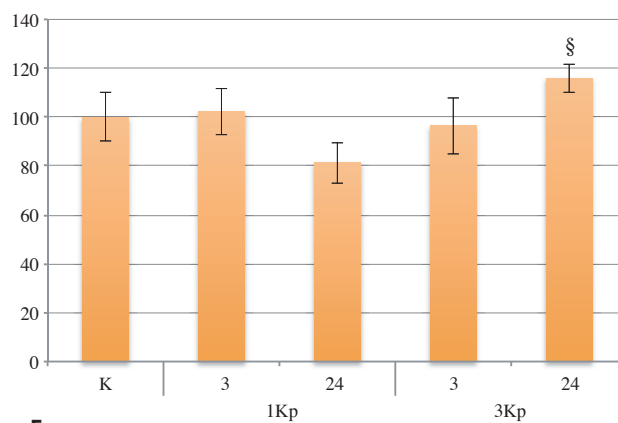
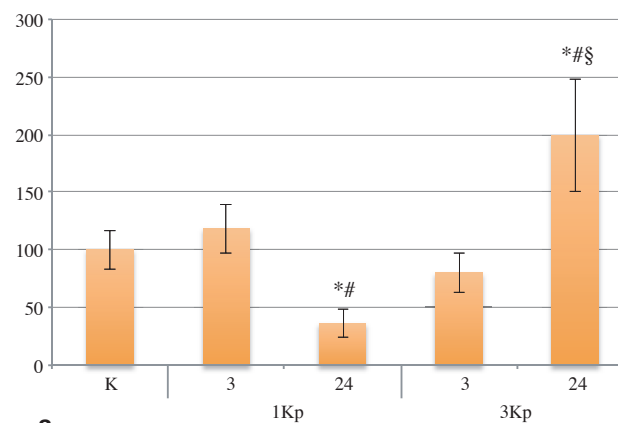
В области CA1 к 3 ч после воздействия общее число экспрессирующих Mn-СОД клеток значительно повышалось как после первого (однократного), так и после трёхкратного воздействия (рисунок, а). Различий между  $N_+$  после одно- и трёхкратного воздействия не отмечено. При этом отличия числа интенсивно экспрессирующих Mn-СОД клеток (Ni) после обоих воздействий как от контроля, так и друг от друга, были статистически незначимы, несмотря на противоположную направленность изменений (после однократного — тенденция к повышению, после трёхкратного — к снижению (см. рисунок, д).

К 24 ч  $N_+$  в CA1 несколько снижалось по сравнению с таковым через 3 ч после воздействия (после однократного — статистически незначимо, после трёхкратного — значимо), но в обоих случаях по-прежнему оставалось значимо выше контрольного уровня (см. рисунок, а). Статистически заметных различий между ними не отмечалось. После однократного воздействия повышение Ni, как по сравнению с таковым через 3 ч после окончания гипоксии, так и по сравнению с контролем было статистически незначимым, а после трёхкратного — значимым, однако между самими этими двумя значениями статистически значимых различий выявлено не было (см. рисунок, д).

Иммунореактивность к Mn-СОД в CA2 в оба срока значимо не отличалась от контроля как в отношении  $N_+$ , так и в отношении Ni (см. рисунок, б, е). Общее число иммунопозитивных клеток повышалось незначимо в оба срока после однократного воздействия и к 3 ч — после трёхкратного и также незначимо снижалось к 24 ч после трёхкратного воздействия. При этом различия показателей  $N_+$  при одно- и трёхкратном воздействии и при 3- и 24-часовом сроках после гипоксии были также незначимы, как и по сравнению с контролем (см. рисунок, б). В отношении числа интенсивно экспрессирующих Mn-СОД клеток в CA2 отмечалась тенденция ( $0,05 < P < 0,1$ ) к снижению Ni к 3 ч и его восстановление до контрольного уровня и даже некоторое повышение к 24 ч (см. рисунок, е) как после однократного, так и после трёхкратного воздействия. По отношению к контролю эти колебания были незначимы, но повышение экспрессии через 24 ч после гипок-

Общее число Mn-СОД-иммунореактивных ( $N_+$ ) (а–г) и интенсивно экспрессирующих Mn-СОД (Ni) (д–з) клеток по отношению к контролю принятому за 100 в различных образованиях гиппокампа крыс через 3 и 24 ч после одно- и трёхкратной умеренной гипобарической гипоксии.

а, д — CA1; б, е — CA2; в, ж — CA3; г, з — зубчатая извилина. По осям абсцисс — К — контроль; время после окончания гипоксического воздействия (ч); 1Кр — однократное воздействие; 3Кр — трёхкратное воздействие; по осям ординат — исследованный показатель (%). Различия значимы при  $P < 0,05$ : \* — по сравнению с контролем; # — через 24 ч по сравнению с 3-часовым сроком после воздействия; § — после трёхкратной гипоксии по сравнению с однократной того же срока. Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

**а****д****б****е****в****ж****г****з**

сии было статистически значимо по сравнению с таковым через 3 ч после окончания воздействия. Различий в отношении  $N_i$  между одно- и трёхкратным воздействием в области СА2 выявлено не было (см. рисунок, е).

В СА3 общее число экспрессирующих Mn-СОД клеток значимо повышалось по сравнению с контролем к 3 ч после однократного воздействия, но к 24 ч почти возвращалось к контрольному уровню, а в ответ на трёхкратное воздействие не повышалось ни к 3, ни к 24 ч (см. рисунок, в). При этом статистически значимых отличий  $N_+$  между одно- и трёхкратным воздействием и между 3- и 24-часовым сроками после воздействия выявлено не было. Изменения числа интенсивно экспрессирующих Mn-СОД клеток имели сходную тенденцию, но не были статистически значимы ни по сравнению с контролем, ни в различные сроки после воздействия, ни после одно- и трёхкратного воздействия (см. рисунок, ж).

В зубчатой извилине гиппокампа к 24 ч обнаруживалось значимое повышение числа интенсивно экспрессирующих Mn-СОД клеток после трёхкратного и его значимое снижение — после однократного воздействия по сравнению с таковыми в контроле и через 3 ч после гипоксии. Через 3 ч  $N_i$  значимо не отличалось от контрольного уровня, а также не различалось при одно- и трёхкратном воздействиях (см. рисунок, з). Изменения общего числа экспрессирующих Mn-СОД клеток ( $N_+$ ) по отношению к контролю были незначимы в оба срока как после одно-, так и после трёхкратного воздействия, однако через 24 ч  $N_+$  после трёхкратной гипоксии было значимо выше, чем после однократной (см. рисунок, г).

Таким образом, статистически значимые различия в экспрессии Mn-СОД (как  $N_i$ , так и  $N_+$ ) между одно- и трёхкратным умеренным гипоксическим воздействием были выявлены в зубчатой извилине через 24 ч после окончания воздействия. Кроме того, в области СА3 через 3 ч однократное прекондиционирование приводило к значимому повышению  $N_+$  по сравнению с контролем, а трёхкратное — нет. В остальных случаях различий между влиянием однократного и трёхкратного умеренного гипоксического воздействия на экспрессию Mn-СОД выявлено не было.

Обсуждение полученных данных. Известно, что устойчивость различных областей гиппокампа к гипобарической гипоксии неодинакова [21]. Ранее было показано, что прекондиционирование усиливает индукцию Mn-СОД в областях гиппокампа СА2 и СА3 (но не в СА1 и зубчатой извилине) после последующей острой

тяжёлой гипобарической гипоксии по сравнению с таковой у непрекондиционированных животных [6]. Однако через 24 ч после трёхкратного прекондиционирования (т.е. к моменту, который соответствует началу тяжёлого гипоксического воздействия) экспрессия Mn-СОД, напротив, усиливалась в СА1 и зубчатой извилине, но не в СА2 и СА3 [9].

При сравнении данных об экспрессии митохондриальной Mn-СОД с ранее полученными сведениями о влиянии тех же гипоксических воздействий на экспрессию цитозольного антиоксидантного белка тиоредоксина-1 (Trx-1), обнаружено, что характер изменений экспрессии Trx-1 в ответ на прекондиционирующую гипоксию существенно отличался. Прекондиционирование значительно повышало его экспрессию вслед за тяжёлой гипоксией во всех исследованных областях гиппокампа [19], но к моменту окончания самого прекондиционирования и начала тяжёлой гипоксии (24 ч после трёхкратного прекондиционирования) уровень его экспрессии был значимо снижен по сравнению с таковым у нативных животных во всех исследованных областях гиппокампа в отношении как общего числа экспрессирующих его клеток, так и числа интенсивно экспрессирующих клеток [8].

Несмотря на принципиальные различия в характере ответа этих двух антиоксидантов на прекондиционирующую гипоксию, результаты ранее проведённых исследований приводят к одному и тому же выводу, что повышенная экспрессия антиоксидантных белков у прекондиционированных животных вслед за тяжёлой гипоксией, очевидно, связана не с их накоплением в ходе прекондиционирования, а с модификацией ответа на саму тяжёлую гипоксию. Молекулярный механизм этой модификации неизвестен. Он может быть связан как с накоплением мРНК исследуемых антиоксидантов, так и, что более вероятно, с регуляцией интенсивности трансляции белка с уже имеющейся мРНК. Однако, во всяком случае, индуцируемая прекондиционированием гипоксическая толерантность определяется, очевидно, не запасанием пула готовых антиоксидантов, а переходом клеток в состояние функциональной готовности оперативно и в необходимом количестве синтезировать их в случае необходимости.

Известно, что свободные радикалы и другие активные формы кислорода (АФК) выступают в роли не только факторов повреждения, но и важнейших внутриклеточных регуляторов, индуцирующих экспрессию ряда генов, в том числе и гена Mn-СОД [20]. Именно поэтому для реализации механизмов прекондиционирования, по-видимому,

необходимо, чтобы в ходе него повышение уровня свободных радикалов не было подавлено антиоксидантами, в противном случае эффект индуцируемой прекондиционированием гипоксической толерантности частично или полностью снимается [11]. Это объясняет, почему в тех областях гиппокампа (CA1 и зубчатая извилина), в которых прекондиционирующая умеренная гипоксия повышает уровень экспрессии Mn-SOD и, тем самым, снижает уровень супероксид-анион-радикала, нейропротективный эффект прекондиционирования, связанный с повышением экспрессии Mn-SOD после тяжёлой гипоксии по сравнению с таковым у непрекондиционированных животных, не развивается. Напротив, становится понятно, почему в тех областях гиппокампа (CA2 и CA3), в которых экспрессия Mn-SOD к моменту завершения прекондиционирования не была повышена по сравнению с контролем и, соответственно, опосредуемый супероксид-анион-радикалом сигнал не подавлен, в ответ на последующую тяжёлую гипоксию происходила повышенная экспрессия Mn-SOD. Очевидно, пониженный (как в случае Trx-1 во всех областях гиппокампа) или, по меньшей мере, не повышенный (как в случае Mn-SOD в CA2 и CA3) уровень антиоксидантов в ходе прекондиционирования является необходимым условием реализации АФК-опосредуемой регуляции генов антиоксидантов.

Результаты, представленные в настоящей работе, показывают, что влияние одно- и трёхкратного умеренного гипоксического воздействия на уровень экспрессии Mn-SOD может иметь как сходный и однонаправленный, так и различный характер в зависимости от конкретной области гиппокампа.

В используемой нами экспериментальной модели, как было показано ранее [4], трёхкратное прекондиционирование умеренной гипобарической гипоксией *in vivo* подавляет развитие патологической «кальциевой перегрузки» в срезах мозга в ответ на тестирующую 10-минутную аноксию *in vitro*, в то время как однократное прекондиционирование не даёт аналогичный нейропротективный эффект. Различие трёх- и однократного прекондиционирования отмечалось и в отношении способности повышать выживаемость животных в ходе последующей тяжёлой гипобарической гипоксии [15]. Результаты настоящей работы показывают, однако, что эти различия нейропротективных эффектов не имеют корреляции с влиянием на формируемый к началу последующей тяжёлой гипоксии уровень экспрессии Mn-SOD. Это хорошо согласуется с ранее сделанным выводом о том, что протективный эффект трёхкратного пре-

кондиционирования определяется не повышением уровня Mn-SOD к началу тяжёлой гипоксии, а модификацией реакции на неё [9].

В то же время, сопоставляя уровень экспрессии исследованных антиоксидантов в четырёх последовательных временных точках в ходе прекондиционирования (3 и 24 ч после одного, 3 и 24 ч после трёх сеансов), можно отметить, что динамика изменений имеет фазный характер. Она выглядит как колебательный процесс, характеризующийся в большинстве случаев чередованием повышения и снижения уровня экспрессии. Частота и амплитуда этих волн неодинаковы в разных областях гиппокампа. Наиболее регулярный и наглядный характер эти фазные колебания имеют в CA1 в отношении общего числа экспрессирующих Mn-SOD клеток (см. рисунок, а) и в CA2 в отношении числа интенсивно экспрессирующих Mn-SOD клеток (см. рисунок, е). В других областях эти колебания имеют менее регулярный характер, однако в подавляющем большинстве случаев чередование подъёмов и спадов экспрессии Mn-SOD имеет место. Можно сделать предположение, что в запуске молекулярных механизмов, обеспечивающих развитие индуцируемой прекондиционированием гипоксической толерантности клеток мозга, и, в частности, в модификации влияния тяжёлой гипоксии на экспрессию антиоксидантов, именно эти фазные колебания экспрессии Mn-SOD, а также других эндогенных антиоксидантов в ходе прекондиционирования играют важную роль.

*Работа поддержана грантами EVO Медицинского исследовательского фонда госпиталя Университета г. Тампере (9A044, 9A181, 9B064, 9C056, 9C183, 9D053, 9E051, 9E174, 9F056, 9F219, 9G056, 9H059, 9J088 и 9K090), грантами РФФИ (01-04-49575, 04-04-48242 и 07-04-00664-а), грантом Финского центра международной мобильности CIMO (L8261), грантом INTAS-2001-0245, грантами Санкт-Петербургского Конкурсного Центра Фундаментального Естествознания за 2003 и 2004 годы (кандидатский проект) (M03-2.6K-297 и M04-2.6K-303), грантом Регионального Общественного Фонда Содействия Отечественной Науке (Программа «Выдающиеся ученые. Кандидаты и доктора наук РАН», 2008–2009).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И. и Самойлов М.О. Влияние тяжёлой гипоксии на эмоциональное поведение крыс: корректирующий эффект прекондиционирования. Докл. РАН, 2004, т. 395, № 3, с. 109–111.
2. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И. и Самойлов М.О. Влияние предварительного воздействия умеренной гипоксии на нарушения выработки и воспроизведения условной реакции пассивного избегания, вызываемые тяжелой гипобарической гипоксией у крыс. Журн. высш. нервн. деят., 2004, т. 54, № 6, с. 795–801.

3. Рыбникова Е.А., Миронова В.И., Пивина С.Г. и др. Гипоксическое preconditioning предотвращает развитие постстрессорных депрессивных состояний у крыс. Докл. РАН, 2006, т. 411, № 1, с. 122–124.
4. Семёнов Д.Г., Миллер О.Л. и Самойлов М.О. Влияние гипоксического preconditioning крыс *in vivo* на динамику содержания внутриклеточного кальция, индуцируемую длительной аноксией в срезах мозга. Бюл. exper. биол., 2004, т. 138, №10, с. 382–385.
5. Строев С.А., Глуценко Т.С., Тюлькова Е.И. и др. Экспрессия и ферментативная активность Cu, Zn-супероксиддисмутазы после тяжелой гипоксии в мозге крыс, эффект preconditioning. Нейрохимия. 2003, т. 20, № 3, с. 190–195.
6. Строев С.А., Глуценко Т.С., Тюлькова Е.И. и др. Влияние тяжелой гипобарической гипоксии на экспрессию Mn-супероксиддисмутазы в гиппокампе preconditionированных и неpreconditionированных крыс. Нейрохимия, 2005, т. 22, № 4, с. 292–298.
7. Строев С.А. и Самойлов М.О. Эндогенные антиоксиданты и гипоксическая толерантность мозга. СПб., изд. Ин-та физиологии им. И.П. Павлова, 2006.
8. Строев С.А., Тюлькова Е.И., Глуценко Т.С. и др. Влияние умеренной гипобарической гипоксии на уровень экспрессии тиореоксина-1 в гиппокампе крыс. Морфология, 2008, т. 133, вып. 1, с. 20–24.
9. Строев С.А., Тюлькова Е.И., Тугой И.А. и др. Влияние preconditioning умеренной гипобарической гипоксией на экспрессию Mn-супероксиддисмутазы в гиппокампе крыс. Нейрохимия, 2007, т. 24, № 3, с. 229–234.
10. Тугой И.А. и Строев С.А. Программа Morphix для морфологического и денситометрического анализа цифровых изображений. Морфология, 2006, т. 129, вып. 2, с. 96.
11. Leak R.K., Liou A.K. and Zigmond M.J. Effect of sublethal 6-hydroxydopamine on the response to subsequent oxidative stress in dopaminergic cells: evidence for preconditioning. J. Neurochem., 2006, v. 99, № 4, p. 1151–1163.
12. Rybnikova E.A., Khozhai L.I., Tyul'kova E.I. et al. Expression of early gene proteins, structural changes in brain neurons in hypobaric hypoxia, and the correcting effects of preconditioning. Neurosci. Behav. Physiol., 2005, v. 35, № 4, p. 383–388.
13. Rybnikova E., Mironova V., Pivina S. et al. Involvement of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the antidepressant-like effects of mild hypoxic preconditioning in rats. Psychoneuroendocrinology, 2007, v. 32, № 7, p. 813–823.
14. Rybnikova E., Mironova V., Pivina S. et al. Antidepressant-like effects of mild hypoxia preconditioning in the learned helplessness model in rats. Neurosci. Lett., 2007, v. 417, № 3, p. 234–239.
15. Rybnikova E., Sitnik N., Gluschenko T. et al. The preconditioning modified neuronal expression of apoptosis-related proteins of Bcl-2 superfamily following severe hypobaric hypoxia in rats. Brain Res. 2006, v. 1089, № 1, p. 195–202.
16. Rybnikova E., Vataeva L., Tyulkova E. et al. Mild hypoxia preconditioning prevents impairment of passive avoidance learning and suppression of brain NGFI-A expression induced by severe hypoxia. Behav. Brain Res., 2005, v. 160, № 1, p. 107–114.
17. Stroeve S.A., Gluschenko T.S., Tjul'kova E.I. et al. Preconditioning enhances the expression of mitochondrial antioxidant thioredoxin-2 in the forebrain of rats exposed to severe hypobaric hypoxia. J. Neurosci. Res., 2004, v. 78, № 4, p. 563–569.
18. Stroeve S.A., Gluschenko T.S., Tjul'kova E.I. et al. The effect of preconditioning on the Cu, Zn superoxide dismutase expression and enzyme activity in rat brain at the early period after severe hypobaric hypoxia. Neurosci. Res., 2005, v. 53, № 1, p. 39–47.
19. Stroeve S.A., Tjul'kova E.I., Gluschenko T.S. et al. The augmentation of brain thioredoxin-1 expression after severe hypobaric hypoxia by the preconditioning in rats. Neurosci. Lett., 2004, v. 370, № 2–3, p. 224–229.
20. Warner B.B., Stuart L., Gebb S. and Wispe J.R. Redox regulation of manganese superoxide dismutase. Am. J. Physiol., 1996, v. 271, № 1, Pt 1, p. L150–158.
21. Yamaoka Y., Shimohama S., Kimura J. et al. Neuronal damage in the rat hippocampus induced by *in vivo* hypoxia. Exp. Toxicol. Pathol., 1993, v. 45, № 4, p. 205–209.

Поступила в редакцию 11.10.2010

Получена после доработки 07.02.2011

# CHANGES IN Mn-SUPEROXIDE DISMUTASE EXPRESSION IN RAT HIPPOCAMPUS INDUCED BY SINGLE AND TRIPLE EXPOSURE TO MODERATE HYPOBARIC HYPOXIA

S.A. Stroyev, Ye.I. Tiul'kova, M.O. Samoilov and M.T. Pelto-Huikko

The purpose of this work was to study the dynamics of expression of mitochondrial Mn-dependent superoxide dismutase (Mn-SOD) 3 and 24 hours after single and triple exposure to mild hypoxia. The investigation was conducted in 18 male Wistar rats using immunocytochemical method. It was shown that in various hippocampal areas the effects of single and triple hypoxia exposure on the Mn-SOD expression could be different or largely similar. The expression dynamics at four time points studied (3 and 24 hours after the first exposure, 3 and 24 hours after the third one) had a wave character which may be important for the development of moderate hypoxia-induced tolerance to subsequent more severe exposures.

**Key words:** *hippocampus, Mn-superoxide dismutase, immunocytochemistry, moderate hypoxia, preconditioning*

Laboratory of Brain Neuron Function Regulation, RAS I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg, Department of Developmental Biology, School of Medicine, Tampere University, Finland