

Стан системи антиоксидантного захисту в печінці та міокарді щурів за умов гострої гіпоксії-гіперкапнії

С.В. Хижняк¹, В.С. Морозова¹, С.В. Мідик¹, Т.В. Полтавченко², О.А. Капля¹

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ;

²Національний університет водного господарства та природокористування, Рівне;
e-mail: khs2014@ukr.net

Проведена оцінка антиоксидантного статусу тканин щура за умов гострої гіпоксії-гіперкапнії при зниженні температури тіла. Встановлене зниження вмісту активних продуктів 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) в печінці та міокарді на 48,2 та 51,0% відповідно свідчить про пригнічення окисних процесів у тканинах. При цьому в печінці активність супероксиддисмутази (СОД) знижувалася на 24,2%, переважно за рахунок молекулярної форми Cu,Zn-СОД, а каталази зростала на 29,4%. У міокарді активність СОД зростала на 62,7 %, переважно за рахунок молекулярної форми Mn-СОД, а каталази зменшувалася на 21,9%. Досліджувані показники відновлювалися до контрольних значень через 24 год після зняття впливу гіпоксії-гіперкапнії. Показано різноспрямовані зміни активності глутатіонпероксидази та вмісту відновленого глутатіону в тканинах щурів в умовах досліді. Зроблено висновок, що у разі гострої гіпоксії-гіперкапнії перебіг окисних процесів у організмі щурів знаходиться під контролем системи антиоксидантного захисту. Обговорюється можлива регуляторна роль гіперкапнії.

Ключові слова: гіперкапнія; гіпоксія; печінка; міокард; супероксиддисмутаза; каталаза; глутатіон.

ВСТУП

Дослідження механізмів штучних гіпометаболічних станів становить інтерес для практичної медицини та космічної біології. Введення гомойотермних тварин у стан гіпометаболізму (штучний гіпобіоз) можна здійснити в умовах гіпотермії з використанням гіпоксично-гіперкапнічного газового середовища [1]. Штучний гіпобіоз у тварин супроводжується зниженням обміну речовин з подальшим відновленням їх фізіологічних функцій після нормалізації температури [2]. В адаптації живих систем до екстремальних зовнішніх впливів, зокрема гіпоксії-гіперкапнії, значна роль належить ліпідам [3], що є основними субстратами ліпідної пероксидації у клітинах. Показано, що мембранні ліпіди – фосфоліпіди, жирні кислоти та холестерин – беруть участь у термічній адаптації переважно за рахунок модифікації мікров'язкості біомембран. Крім

© С.В. Хижняк, В.С. Морозова, С.В.Мідик, Т.В. Полтавченко, О.А. Капля

того, холестерин та жирні кислоти залучені до регуляції параметрів оцінення, експресії генів та активності ензимів ліпідного обміну за штучного гіпобіозу [3].

Значна кількість досліджень молекулярних механізмів гіпоксичних чи гіпотермічних впливів на клітини присвячена проблемам окисного гомеостазу. Участь вільних радикалів у фізіологічних, метаболічних чи патологічних процесах характеризує окисний процес як необхідний для організму [4], з іншого боку – як універсальний механізм адаптації до змінених умов існування.

Основним постачальником активних форм кисню (АФК) у клітинах є мітохондрії, оскільки містять численні редокс-переносники та редокс-центри і тому потенційно здатні до одноелектронного відновлення кисню до супероксид-аніона [5]. Регуляторна роль АФК під час адаптації організму до дії зовнішніх чинників, у тому числі до гі-

пероксії [6], проявляється через активацію каскадних сигнальних шляхів. Ключове значення при цьому надається захисними компонентам клітини, включаючи систему антиоксидантного захисту, зокрема супероксиддисмутази (СОД) та каталазу. Остаточного не з'ясовано значення окисних процесів за умов гіпоксії-гіперкапнії, дослідження яких дає змогу вирішити низку проблемних питань, що стосуються фізіології стресу та адаптаційної медицини.

Мета нашої роботи – дослідження активності антиоксидантної системи тканин щурів, а саме: супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази та вмісту відновленого глутатіону за гострої гіпоксії-гіперкапнії.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на безпородних щурах-самцях масою тіла 180–190 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Їх здійснювали відповідно до вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986).

Вплив гострої гіпоксії-гіперкапнії при зниженні температури тіла створювали за методикою Бахметьєва - Джайя - Анжуса, як детально описано в попередніх роботах [2, 7]. Тварин поміщали в герметично закриту камеру, об'єм якої становив 3 дм³, за температури довкілля 3–4°C. Через 3,5 год перебування тварин у камері вміст вуглекислого газу зростав до 18%, а кисню – знижувався до 4%. Тварини повністю втрачали рухомість, зникав рефлекс на положення, а температура тіла знижувалася до 16,5°C, що свідчило про досягнення гіпобіотичного стану.

Тварин було поділено на три групи (по 7 особин у кожній): 1-ша група - контрольна, використовували інтактних тварин; 2-га - вплив гострої гіпоксії-гіперкапнії (перебування в камері 3,5 год); 3-тя - через 24 год після закінчення впливу гіпоксії-гіперкапнії.

Слід відмітити, що тварини 3-ї групи повністю поверталися до активного способу життя, у них нормалізувалася температура тіла (до 37°C) та частота серцевих скорочень. Щурів декапітували у відповідні терміни.

Внутрішні органи (печінка та серце) вилучали, піддавали перфузії охолодженим фізіологічним розчином. Тканину подрібнювали, гомогенізували та центрифугували при 2500 об/хв упродовж 15 хв, а отриманий супернатант фільтрували. Сироватку крові отримували після центрифугування при 1500 об/хв цільної крові за загальноприйнятими методами. Вміст протеїну в препаратах визначали за методом Лоурі.

Визначали вміст активних продуктів 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) [8], активність супероксиддисмутази (СОД) [9] та каталази [10]. Електрофоретичний аналіз множинних форм СОД проводили в поліакриламідному гелі після розділення протеїнів за молекулярною масою в нативних умовах [11], при цьому зони гелю, що містять цей ензим, оцінювали як ахроматичні. Визначали активність глутатіонпероксидази (ГПО) [12] та вміст відновленого глутатіону (GSH) у реакції з 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБ) [13]. Пробі попередньо обробляли 20%-ю трихлороцтовою кислотою та відділяли денатуровані протеїни, додавали 0,3 М Na₂HPO₄ (рН 7,7), вносили розчин ДТНБ на фосфатному буфері (рН 7,7) у кінцевій концентрації 0,07 ммоль/л та через 5 хв реєстрували інтенсивність забарвлення при довжині хвилі 412 нм.

Статистичну обробку отриманих результатів виконували за допомогою програми «Microsoft Excel 2003» із застосуванням критерію t Стюдента. Різницю між середніми значеннями вважали статистично вірогідною при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Перебіг окисних процесів у разі гіпоксії-гіперкапнії оцінювали за вмістом ТБК-АП,

які утворюються на кінцевих етапах ПОЛ. Встановлено їх достовірне зменшення відносно контролю: в печінці $3,65 \pm 0,25$ щодо $7,04 \pm 0,51$, а міокарді – $5,10 \pm 0,41$ щодо $10,41 \pm 1,01$ нмоль/мг білка. За цих умов у сироватці крові спостерігається зростання накопичення ТБК-АП на 53,2% ($P < 0,05$), яке становило $1,70 \pm 0,11$ відносно $1,11 \pm 0,09$ мкмоль/л. Ці зміни носять тимчасовий характер, оскільки при припиненні дії досліджуваних чинників вміст ТБК-АП у тканинах наближається до контрольних значень.

Нині не викликає сумніву, що АФК відіграють регуляторну роль в адаптації організму до гіпоксії. Зокрема, у тканинах ссавців при низькій концентрації кисню запускаються транскрипційні і нетранскрипційні механізми, спрямовані, з одного боку, на збільшення концентрації кисню, а з іншого – на зменшення його використання [14]. Вважається, що гіперкапнія також є одним із адаптивних механізмів, що запобігає ушкодженню ліпідів у тканинах за умов штучного гіпобіозу [15]. Водночас зниження інтенсивності окисних процесів у тканинах може зумовлюватися спроможністю системи антиоксидантного захисту регулювати ці процеси на достатньому рівні.

Результати дослідження активності ключових скавенджерів АФК – СОД та її синергіста каталази представлено на рис. 1, а, б. Встановлено, що у разі гіпоксії-гіперкапнії активність СОД у печінці знижувалася в середньому на 24,2%, а натомість каталази зростала на 29,4 % порівняно з контролем. І навпаки, за цих умов активність СОД у міокарді підвищувалася в середньому на 62,7%, а каталази знижувалася на 21,9% щодо контролю. Після припинення дії досліджуваних чинників на організм активності ензимів у тканинах не відрізнялися від контрольних значень. Водночас в умовах досліду активність СОД та каталази у сироватці крові достовірно не змінювалася (рис. 2, а, б).

При гіпоксії-гіперкапнії ймовірні різні шляхи модифікації функціонування сис-

теми антиоксидантного захисту. Зокрема, встановлене зменшення активності СОД у печінці щурів можливе за рахунок виснаження пулу ензиму, що зумовлено посиленими витратами на нейтралізацію супероксид-аніона [4]. Разом з тим активація каталази за цих умов може зумовлюватися зростанням вмісту розчинених форм вуглекислоти в тканинах, які здійснюють активуючу дію, що підтверджується дослідженнями *in vitro* та *in vivo* [16]. Для міокарда зростання активності СОД можливе за рахунок активації латентних форм молекул ензиму внаслідок конформаційних змін, а також субстратного інгібування активності каталази.

Функціонування СОД у клітинах еукаріотів пов'язано з існуванням таких ізоформ: цитозольної Cu,Zn-СОД (у вигляді мономеру 29–32 кДа та димеру 61–64 кДа) та мітохондріальної Mn-СОД (тетрамер 76–81 кДа) [17]. Аналіз активності різних молекулярних форм СОД печінки та міокарда з використанням фотохімічної реакції (після розділення у поліакриламідному гелі) дає змогу встановити, що домінуючий внесок у загальну активність СОД належить тетрамеру Mn-СОД, димерній та мономерній формам Cu,Zn-СОД. Крім того, окремі субодиниці Cu,Zn-СОД також здатні проявляти активність (таблиця).

У разі гіпоксії-гіперкапнії для препаратів печінки активність, за значенням площі ахроматичних зон на ділянках гелю в діапазоні молекулярних мас 73–82 кДа, що може характеризувати тетрамер Mn-СОД, змінювалася недостовірно (на 12,1%). У діапазоні молекулярних мас 66–68 та 30–32 кДа площа ахроматичних зон, яка може відповідати активності димерної та мономерної формам Cu,Zn-СОД, знижувалася на 26,7 та 22,1% ($P < 0,05$) відносно відповідної зони в контролі. Крім того, на 46,9% ($P < 0,05$) знижувалася активність на ділянках гелю в діапазоні молекулярних мас 15–16 кДа. Таким чином, встановлене зниження сумарної активності СОД печінки, ймовірно,

зумовлене функціонуванням цитозольної Cu,Zn-СОД. Слід відмітити, що як в контролі так і при гіпоксії-гіперкапнії для печінки сумарна активність цитозольної Cu,Zn-СОД перевищувала таку мітохондріальної Mn-СОД (див. таблицю).

Проведені аналогічні дослідження за впливу гіпоксії-гіперкапнії для міокарда свідчать, що активність на ділянках гелю в діапазоні молекулярних мас 80–90 кДа (тетрамерна форма Mn-СОД) зростає на 24,6% ($P < 0,05$), а в діапазоні молекулярних мас 66–67 кДа (димерна форма Cu,Zn-СОД) зростає на 27,3% ($P < 0,05$) відносно відповідної зони в контролі. Водночас активність на ділянках гелю в діапазоні молекулярних

мас 29–31 (мономерна форма Cu,Zn-СОД) та 15–16 кДа знижується на 23,3 та 25,4% відповідно ($P < 0,05$; див. таблицю). Слід враховувати, що для міокарда, який порівняно з печінкою характеризується підвищеним вмістом мітохондрій [4], відмічається і вища активність Mn-СОД порівняно з Cu,Zn-СОД (див. таблицю). Тому виявлене за умов гіпоксії-гіперкапнії зростання загальної СОД-активності міокарда, ймовірно, зумовлено активністю мітохондріальної Mn-СОД.

Для оцінки ролі компонентів глутатионової системи антиоксидантного захисту у формуванні адаптаційних процесів клітин в умовах гострої гіпоксії-гіперкапнії досліджували активність ГПО та вміст відновле-

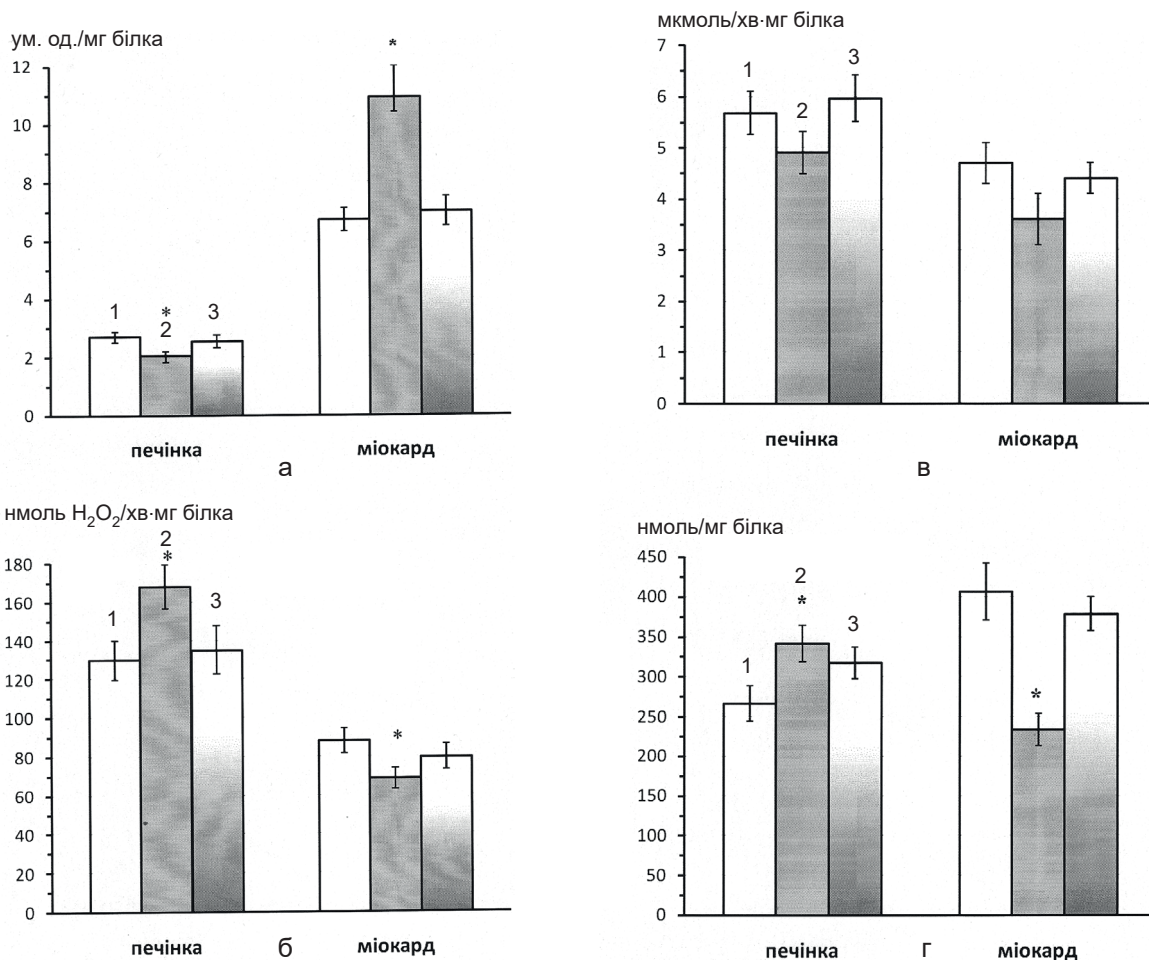


Рис. 1. Активність супероксиддисмутази (а), каталази (б), глутатіонпероксидази (в) та вміст відновленого глутатіону (г) у печінці та міокарді щурів у контролі (1), за впливу гострої гіпоксії-гіперкапнії (2) та через 24 год (3) після зняття впливу гіпоксії-гіперкапнії. * $P < 0,05$ відносно контролю

ного GSH. Значна концентрація в клітині та здатність підтримувати відновлений стан характеризують GSH як важливий внутрішньоклітинний редоксбуфер [4]. Відновлений GSH слугує акцептором АФК, знижуючи їх деструктивну і цитотоксичну дію. Крім того, він забезпечує антиоксидантний потенціал глутатіонзалежних ензимів, а також утворює дисульфіди з протеїнами, що може бути додатковим елементом регуляції біологічних процесів [4].

За умов гострої гіпоксії-гіперкапнії активність ГПО печінки щурів знижувалася недовірно на 13,6 %, а вміст GSH вірогідно зростав на 28,1%, можливо внаслідок зменшення його використання глутатіоною

системою. Активність ГПО міокарда щурів знижувалася у середньому на 23,1%, а вміст відновленого GSH – на 42,6% щодо контролю (див. рис. 1, в, г). Після припинення дії досліджуваних чинників значення цих показників для печінки та міокарда не відрізнялися від контрольних.

Інша ситуація спостерігалася для сироватки крові щурів у разі гіпоксії-гіперкапнії активність ГПО збільшувалася в середньому на 23,1%, а вміст відновленого GSH – на 48,7% порівняно з контролем (див. рис. 2, в, г). Після припинення дії досліджуваних чинників значення цих показників залишалися підвищеними. Висока активність різних ланок антиоксидантного захисту крові

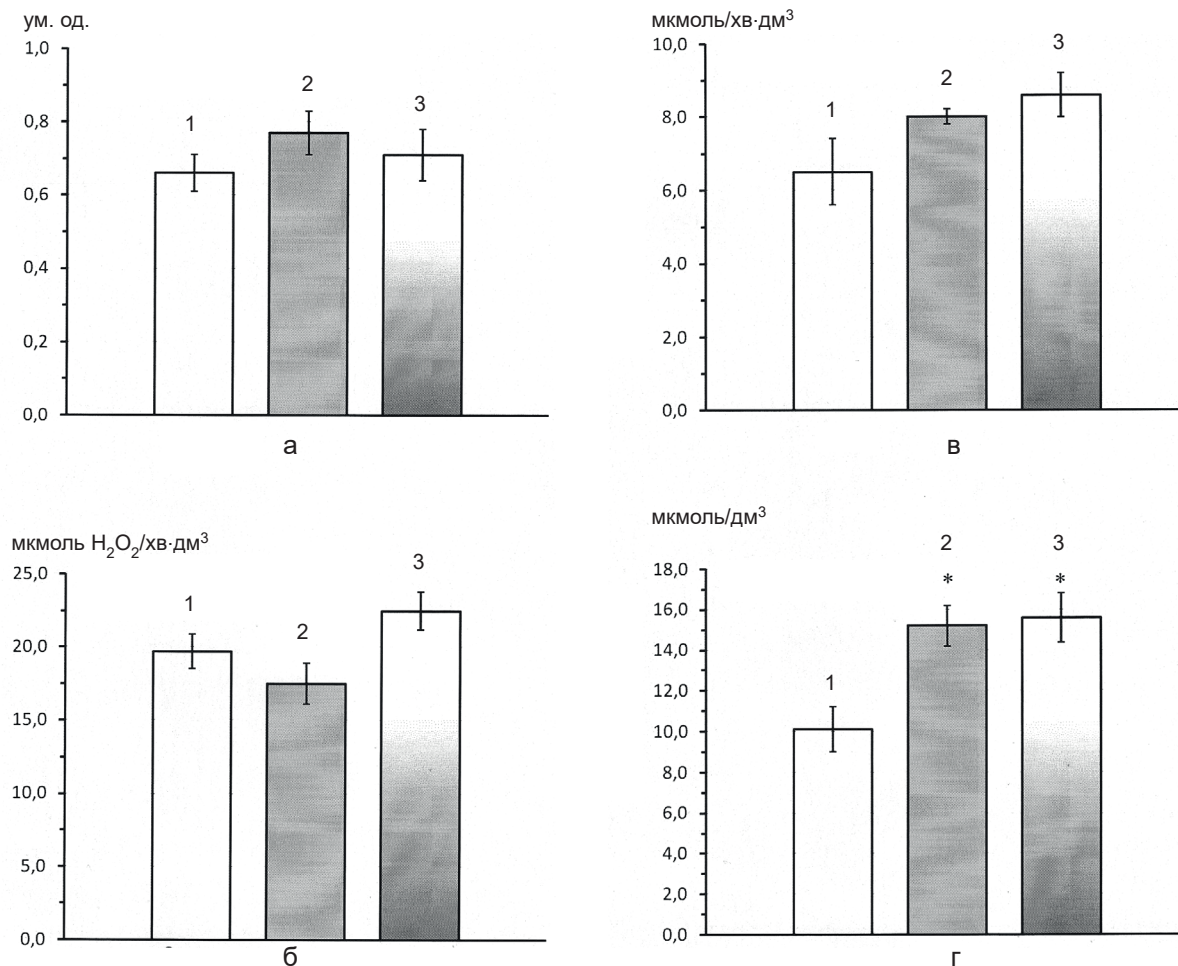


Рис. 2. Активності супероксиддисмутази (а), каталази (б), глутатіонпероксидази (в) та вміст відновленого глутатіону (г) у сироватці крові щурів у контролі (1), за впливу гострої гіпоксії-гіперкапнії (2) та через 24 год (3) після зняття впливу гіпоксії-гіперкапнії. *P < 0,05 відносно контролю

Активність окремих молекулярних форм (ум.од.) супероксиддисмутази (СОД) у печінці та міокарді щурів за умов гострої гіпоксії-гіперкапнії ($M \pm m$, $n = 7$)

Умови досліджу	Тетрамер Mn-СОД	Димер Cu,Zn-СОД	Мономер Cu,Zn-СОД	Окремі субодиниці Cu,Zn-СОД
Печінка				
Діапазон молекулярних мас, кДа	73–82	66–68	30–32	15–16
Контроль	168,4 \pm 14,0	190,1 \pm 20,1	237,1 \pm 13,1	87,8 \pm 7,1
Дослід (при гіпоксії-гіперкапнії)	148,0 \pm 12,1	139,4 \pm 12,1*	184,6 \pm 18,2*	46,6 \pm 4,2*
Міокард				
Діапазон молекулярних мас, кДа	80–90	66–67	29–31	15–16
Контроль	320,4 \pm 21,0	184,4 \pm 16,1	97,0 \pm 8,1	67,8 \pm 6,1
Дослід (при гіпоксії-гіперкапнії)	399,2 \pm 20,1*	234,8 \pm 23,1*	74,4 \pm 5,1*	50,6 \pm 4,2*

* $P < 0,05$ щодо контролю

може забезпечувати стійкість організму до окисного стресу, у тому числі і при виході тварин із стану гібернації [18].

Особливо слід акцентувати увагу на роль вуглекислоти при гіпоксії-гіперкапнії. Молекула CO_2 , яка реагує з вільними радикалами, залежно від умов реакції може активувати або інгібувати процеси вільнорадикального окиснення [19] внаслідок утворення карбонатного радикала. Він хоча і менш активний, порівняно з іншими, однак більш стабільний і здатний легко дифундувати з місця утворення, призводячи до окисного ушкодження. Водночас карбонатний радикал спроможний до димеризації, що призводить до його деактивації, цьому сприяє також взаємодія з відновленим глутатионом [20]. Стосовно молекулярних механізмів впливу вуглекислоти, варто відмітити здатність молекули CO_2 вступати без участі ензимів у реакції з непротонованими аміногрупами протеїнів та пептидів [2]. Такі модифікації молекул впливають на конформаційний стан протеїнів та їх функціонування, у тому числі це стосується ензимів антиоксидантного захисту.

Таким чином, за умов гострої гіпоксії-гіперкапнії знижується інтенсивність окисних процесів у тканинах щурів, про що

свідчить зменшення вмісту кінцевих продуктів ПОЛ у печінці та міокарді. При цьому показано різнобічні модифікації системи антиоксидантного захисту клітин, що пов'язано з функціональною активністю СОД (різних молекулярних форм), каталази та залученням глутатіонової системи. Зростання за цих умов у сироватці крові вмісту ТБК-АП, яке носить тимчасовий характер, супроводжується підвищенням активності глутатіонової системи, що може мати компенсаторне значення.

ВИСНОВКИ

1. Перебування щурів в умовах гострої гіпоксії-гіперкапнії (при зниженні температури тіла) призводить до пригнічення окисних процесів у печінці та міокарді, про що свідчить зниження вмісту ТБК-АП. Після зняття впливу досліджуваних чинників відновлюються фізіолого-біохімічні показники стану щурів.

2. Встановлені особливості реакції антиоксидантної системи захисту пов'язані з різнонаправленими змінами активності СОД та каталази в печінці та міокарді. Пригнічення активності СОД печінки, ймовірно, зумовлене функціонуванням цитозольної Cu,Zn-СОД, водночас зростання загальної

СОД-активності міокарда – активністю мітохондріальної Mn-СОД.

3. При гіпоксії-гіперкапнії показано залучення глутатіону у процеси антиоксидантного захисту організму щурів, враховуючи підтримання за цих умов високого вмісту відновленого глутатіону в крові, звідки він може надходити в інші органи і тканини.

4. Відмічається можлива регуляторна роль гіперкапнії щодо окисних процесів у тканинах щурів, оскільки молекула CO₂ виступає скавенджером АФК, а крім того здатна модулювати функціональну активність каталази і СОД.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

**С.В. Хижняк, В.С. Морозова, С.В. Мидык,
Т.В. Полтавченко, А.А. Капля**

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ПЕЧЕНИ И МИОКАРДЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ-ГИПЕРКАПНИИ

Проведена оцінка антиоксидантного статусу тканин крыс при острой гипоксии-гиперкапнии при снижении температуры тела. Показано снижение содержания активных продуктов 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК-АП) в печени и миокарде на 48,2 и 51,0% соответственно, что свидетельствует об угнетении в тканях окислительных процессов. Супероксиддисмутазная (СОД) активность печени снижалась на 24,2%, преимущественно за счет молекулярной формы Cu, Zn-СОД, а каталазы возрастала на 29,4%. В миокарде активность СОД возрастала на 62,7%, преимущественно за счет молекулярной формы Mn-СОД, а каталазы уменьшалась на 21,9%. Значения показателей восстанавливались к контрольным уровням через 24 ч после снятия влияния гипоксии-гиперкапнии. Показаны разносторонние изменения активности глутатионпероксидазы и содержания восстановленного глутатиона в тканях в условиях эксперимента. Сделан вывод, что при острой гипоксии-гиперкапнии окислительные процессы в организме крыс находятся под контролем системы антиоксидантной

защиты. Обсуждается возможная регуляторная роль гиперкапнии.

Ключевые слова: гиперкапния; гипоксия; печень; миокард; супероксиддисмутаза; каталаза; глутатион.

**S.V. Khyzhnyak¹, V.S. Morozova¹, S.V. Midyk¹,
T.V. Poltavchenko², A.A. Kaplia¹**

ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM STATE IN THE LIVER AND THE MYOCARDIUM OF RATS UNDER CONDITIONS OF ACUTE HYPOXIA-HYPERCAPNIA

The prooxidant-antioxidant state of rat tissues in the formation of adaptive processes in acute hypoxia-hypercapnia with lower body temperature was evaluated. The decrease of the content of 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in liver and myocardial tissues by 48.2 and 51.0%, respectively is shown, it indicates the oxidative processes inhibition in the tissues. The liver superoxide dismutase (SOD) activity decreased by 24.2% mainly due to its Cu, Zn-SOD molecular form and catalase activity increased by 29.4%. In the myocardium the activity of SOD increased by 62.7% mainly due to Mn-SOD molecular form and catalase activity decreased by 21.9%. The studied parameters return to the control values 24 h after withdrawal of the effect of the hypoxia-hypercapnia. It was shown that differently directed changes of the glutathione peroxidase activity and reduced glutathione content in tissues play a compensatory role in hypoxia-hypercapnia. It is concluded that during acute hypoxia-hypercapnia the course of oxidative processes in the rat's body is controlled by the antioxidant defense system. The possible regulatory role of hypercapnia in these conditions is discussed.

Key words: hypercapnia; hypoxia; liver; myocardium; superoxide dismutase; catalase; glutathione.

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv;

²National University of Water Management and Environmental Management, Rivne, Ukraine; e-mail: khs2014@ukr.net

REFERENCES

1. Timofeev NN. Hypobiosis and cryobiosis: The past, present and future. Moscow: Inform-Znanie; 2005. [Russian].
2. Melnychuk SD, Melnychuk DO. The animal hypobiosis state (molecular mechanisms and practical implications for the agriculture and medicine). Kyiv: NULES press; 2007. [Ukrainian].
3. Kolomiitseva IK. Lipids in mammalian hibernation and artificial hypobiosis of mammals. Biochemistry (Mosc). 2011;76 (12):1291-9
4. Baraboi VA. Bioantioxidants. Kyiv: Kniga Plus; 2006. [Ukrainian].

5. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*. 2012; 48(2): 158-67.
6. Gonchar OO, Mankovska IM. Mitochondrial thiol-disulfide system for acute hypoxia and hypoxic-hyperoxic adaptation. *Ukr Biochem J*. 2014;86(1):93-100. [Ukrainian].
7. Melnychuk SD, Khyzhnyak SV, Morozova VS, Stepanova LI, Umanskaya AA. The energy function of rat cardiac mitochondria under artificial hybobiosis. *Fiziol Zh*. 2015;61(2):15-22. [Ukrainian].
8. Stalnaya ID, Garishvili TG. Method for the determination of malonic dialdehyde using thiobarbituric acid. In: *Modern methods in biochemistry*. Moscow; 1977. [Russian].
9. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972; 247(10): 3170-5.
10. Koroliyuk MA, Ivanova LI, Maiorova IG, Tokarev VE. A method of determining catalase activity. *Lab Delo*. 1988; 1:16-9. [Russian].
11. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*. 1971; 44(1):276-87.
12. Vlasova SN, Shabunina EI, Pereslegina IA. The activity of the glutathione-dependent enzymes of erythrocytes in chronic liver diseases in children. *Lab Delo*. 1990;8:19-22.[Russian].
13. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulphide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*. 2007;1:3159-65.
14. Sanjuan-Pla A, Cervera AM, Apostolova N, Garcia-Bou R, Victor VM, Murphy MP, McCreath KJ. A targeted antioxidant reveals the importance of mitochondrial reactive oxygen species in the hypoxic signaling of HIF-1alpha. *FEBS Lett*. 2005;579(12):2669-74.
15. Mel'nychuk SD, Kuz'menko AI, Margitich VM, Govseeva NN, Gorid'ko TN, Hulaia NM. Effect of carbon dioxide on free-radical processes as affected by artificial hypobiosis in rats. *Ukr Biokhim Zh*. 1998;70(1):87-94. [Russian].
16. Gudkova OO, Latyshko NV, Gudkova LV, Mikhailovsky VO. Rat liver catalase under artificial hypobiosis conditions. *Biopolym Cell*. 2005;21(1):28-34. [Ukrainian].
17. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*. 1995; 64:97-112.
18. Astaeva MD, Klichkhanov NK. Oxidative modification of proteins and antioxidant activity of gopher blood during induced awakening from hibernation. *Izvestiya RAN. Seriy biologicheskay*. 2009. 6:662-8. [Russian].
19. Vesela A, Wilhelm J. The role of carbon dioxide in free radical reactions of the organism. *Physiol Res*. 2002;51(4):335-9.
20. Andrekopoulos C, Zhang H, Joseph J, Kalivendi S, Kalyanaraman B. Bicarbonate enhances α -synuclein oligomerization and nitration: intermediacy of carbonate radical anion and nitrogen dioxide radical. *Biochem J*. 2004; 378(Pt2):435-47.

*Матеріал надійшов
до редакції 11.02.2019*