

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК

©Коллектив авторов

ПРОСТОЙ МЕТОД ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВНОСТИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ С ПОМОЩЬЮ ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Д.В. МАГИН⁺, Г. ЛЕВИН^{*}, И.Н. ПОПОВ^{*}

⁺Московский государственный университет, факультет фундаментальной медицины, кафедра физико-химических основ медицины, Малая Пироговская ул., д. 1а, Москва 119828; ^{*} НИИ Антиоксидантной терапии фирмы F.A.T., Берлин, Германия.

Для определения активности СОД чаще всего используют фотометрические методы, в которых генерация супероксидных радикалов осуществляется с помощью НАДФ-Н оксидазы, или в ходе аутоокисления ряда веществ, таких как, например, адреналин. К недостаткам этих методов относятся необходимость строгого соблюдения pH, температуры, относительно продолжительное время проведения эксперимента, сложность подготовки материала для измерения. Предложенный метод определения активности СОД свободен от указанных недостатков. Он основан на фотосенсибилизированной рибофлавином хемилюминесценции люцигенина (ФХЛ). При этом ультрафиолетовое облучение рибофлавина приводит к генерации супероксидных радикалов, реакция которых с люцигенином сопровождается угнетаемой СОД хемилюминесценцией. Измерения проводились на приборе Photochem[®] фирмы F.A.T. GmbH. Были подобраны минимальные концентрации компонентов системы при которых интенсивность ФХЛ уже мало зависела от концентрации и была достаточна для проведения измерений: рибофлавин - 25 мкМ, люцигенин - 3 мкМ, метионин - 250 мкМ. В этих условиях количество СОД, приводящее к 50% ингибированию сигнала ФХЛ было равно $10 \pm 0,3$ нг (Sigma, USA). Антиоксиданты, содержащиеся в крови, влияли на интенсивность ФХЛ, исходя из критерия 5% искажения результатов, в следующих концентрациях: аскорбиновая кислота > 3,6 мкМ, мочевиная кислота > 0,3 мкМ, глутатион > 4 мкМ. Принимая во внимание количество этих антиоксидантов в цельной крови и эритроцитах было рассчитано, что даже без отмывки эритроцитов их количество в пробе не оказывает влияния на результаты определения активности СОД. Было проведено сравнение предложенного метода с широко известным методом фирмы Calbiochem[®]. Количество СОД, приводящее к двукратному уменьшению ФХЛ в нашем методе и в методе Calbiochem[®] было равно 10 и 40 нг (Sigma, USA), а стандартное отклонение составляло 0,45% и 0,96% соответственно. Была измерена активность СОД у 107 здоровых доноров (76 мужчин и 31 женщина, 40 человек - курильщики, 67-некурящие). Среднее значение активности фермента было $15,1 \pm 0,4$ нг СОД/ 1×10^9 эритроцитов.

Ключевые слова: супероксиддисмутаза, СОД, фотохемилюминесценция, хемилюминесценция, определение активности.

ВВЕДЕНИЕ. К настоящему времени известно более 60 болезней связанных с окислительным стрессом или нарушением баланса между радикалообразованием и их

обезвреживанием. Найдено целый ряд механизмов, сдерживающих развитие окислительных процессов в организме. Совокупность этих механизмов принято называть антиоксидантной системой (АОС). СОД - одна из важнейших детоксицирующих компонент АОС [1].

Предложено много методов определения СОД, которые используются в клиническом анализе и в экспериментах (табл. 1).

Таблица 1. Методы определения СОД (курсив - индикаторы радикалов).

ГОД	МЕТОД	АВТОР	ВРЕМЯ (мин)	t, °C	Ед. активности СОД, нг
1969	КсО/ <i>Цитохром с</i>	McCord [2]	0,5	25	510
1971	Рибофлавин/ <i>НСТ</i>	Beauchamp [3]	-	-	50
1972	Аутоокисление адреналина	Misra [4]	3	25	46
1975	ФМС/ <i>НСТ</i>	Nishikimi [5]	0,5	25	730
1976	спектрофотометрия $O_2^{\bullet-}$	Marclund [6]	0,1	25	5,5
1980	спектрофотометрия $O_2^{\bullet-}$	Marclund [7]	0,1	25	8,3
1983	ДМСО/ <i>Цитохром с</i>	Hyland [8]	-	-	110
1984	КсО/ <i>Нитрит</i>	Oyanagui [9]	30	37	60
1985	Рибофлавин/ <i>Люминол</i>	Popov [10]	2	25	33
1985	Аутоокисление пирогаллола	Violi [11]	-	37	140
1986	КсО/ <i>Сукцинил/Цитохром с</i>	Kuthan [12]	-	-	20
1986	ДМСО/ <i>Люцигенин</i>	Falck [13]	4	37	6
1986	Меркаптоэтанол/ <i>NADPH</i>	Paoletti [14]	20	25	15
1986	Аутоокисление адреналина	Schaper [15]	-	37	16,8
1987	Фотоокисление люминола	Popov [16]	3	25	115
1987	КсО/ <i>Люцигенин</i>	Corbisier [17]	0,5	25	25
1988	спектрофотометрия $O_2^{\bullet-}$	Bolann [18]	0,1	25	2,5
1988	Аутоокисление пирогаллола	Sugawara [19]	3	25	75
1988	EIA	Porstmann [27]	40	25	-
1989	Рибофлавин/ <i>НСТ</i>	Haseloff [20]	-	25	330
1989	Рибофлавин/ <i>НСТ</i>	Grunow [21]	3	25	179
1990	EIA	Adachi [28]	-	-	-
1990	Аутоокисление кверцетина	Костюк [22]	20	24	1,5 мг/мл *
1991	Ядерно-магнитный резонанс	Scarpa [23]	-	-	-
1993	Аутоокисление тетрациклического катехола	Nebot [24]	1	37	200 мг/мл *
1993	КсО/ <i>Люцигенин</i>	Laihia [25]	10	35	0,74 мг/мл *
1994	Фотоокисление люминола	Lissi [26]	20	25	4

*В литературе, указана только концентрация фермента

Их можно разделить на методы измерения активности фермента [2-26] и определения количества белка [27,28]. Количество измеряют с помощью ферментного иммунологического теста. Основными его преимуществами является высокая чувствительность и селективность. В тоже время этот метод не отражает основной характеристики фермента - степени активности. Наибольшее распространение получили функциональные методы определения активности СОД. При их использовании необходимо, чтобы в системе присутствовали источник радикалов и их индикатор.

Всем методам определения активности СОД в той или иной мере свойственны преимущества и недостатки. Так, например, при применении фермента для генерации $O_2^{\bullet-}$ необходимо строго соблюдать pH, t°C, время реакции и т.д. Во

всех случаях, количество фермента, приводящее к 50% изменению измеряемого сигнала принимается по предложению McCord и Fridovich [2] за единицу его активности. По этому признаку средней чувствительности все методы значительно отличаются один от другого. Следует отметить, что чувствительность может меняться даже в пределах одного метода, в зависимости от степени очистки контрольной СОД, затрудняя и ограничивая возможности сравнения результатов разных авторов. Различные методы отличаются также по времени проведения измерения и по подверженности мешающему действию примесей. Поэтому, при решении конкретной задачи необходимо учитывать много факторов. Для проведения рутинных автоматизированных измерений удобен метод фотосенсибилизированной хемилюминесценции (ФХЛ) [10]: он прост, быстр, надёжен и экономичен, точен и хорошо описывается математически, однако требует специальной аппаратуры.

В работе была сделана попытка приспособить и применить его для экспрессного определения СОД в эритроцитах. Для этого было необходимо оптимизировать состав измерительной смеси, оценить влияние неферментативных антиоксидантов, присутствующих в крови на результаты измерений на результаты измерений, сравнить новый метод с широко известным методом фирмы Calbiochem®.

МЕТОДИКА. Венозную кровь получали от здоровых доноров, используя в качестве антикоагулянта ЭДТА. Затем кровь центрифугировали 10 минут при 400g. Осадок эритроцитов промывали 2 раза ресуспендируя в 0,9 % растворе NaCl и центрифугировали 5 минут при тех же условиях. Супернатант (верхнюю фракцию) каждый раз отсасывали. От отмытой эритроцитарной массы брали 1,5-2 мл и смешивали с равным количеством физиологического раствора. В результате получали суспензию, концентрацию эритроцитов в которой измеряли на автоматическом анализаторе крови MaxM (Coulter, USA). После этого из полученной суспензии брали 150 мкл и смешивали с 600 мкл дистиллированной воды, получая, таким образом, лизат эритроцитов. Экстракцию СОД проводили по методу [29].

Из работ [10] и [13] были ориентировочно выбраны концентрации компонент. После оптимизации реакционная смесь содержала: 25 мкМ рибофлавина (Serva, Germany), 250 мкМ метионина (Reanal, Hungary), 3 мкМ люцигенина (Sigma, USA) в карбонатном буфере pH 10,6, (общий объем 3 мл).

В настоящей работе использовались супероксиддисмутаза (Sigma, USA), аскорбиновая кислота (Apolda, Germany), мочевиная кислота (Sigma-Aldrich, Germany), глутатион (Boeringer Mannheim, Germany), бикарбонат натрия (Merck, Germany), SOD kit Calbiochem®, USA. Спектрофотометр Secomam® S 1000 (France) использовали для измерения СОД при помощи SOD kit фирмы Calbiochem® (USA). Для измерения фотосенсибилизированной хемилюминесценции использовали прибор Photochem® производства F.A.T. Ltd. (Germany).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На рисунке 1 показана типичная кинетика фотохемилюминесценции в системе рибофлавин-люцигенин. Видно, что сразу после начала УФ облучения происходит вспышка хемилюминесценции, максимальный подъем которой приходится на интервал 50-70 секунд. После этого начинается медленный спад. В качестве основного параметра ФХЛ была выбрана интегральная интенсивность (S, общая площадь, находящаяся под кривой) за 100 секунд.

Облучение рибофлавина ультрафиолетом ($h\nu_1$) в присутствии метионина и кислорода приводит к генерации $O_2^{\bullet-}$ по представленной на рисунке 2 схеме. Из схемы видно, что люцигенин и СОД конкурируют за образующиеся ионы $O_2^{\bullet-}$. При повышении активности СОД меньше ионов $O_2^{\bullet-}$ будут взаимодействовать с люцигенином, что приведет к падению сигнала ФХЛ.

Оптимизация состава системы рибофлавин-люцигенин. Для оптимизации состава измерительной смеси, то есть подбора таких концентраций реагентов, при которых достигается максимальная устойчивость системы при достаточной интенсивности хемилюминесценции и минимальной их затрате была исследована интенсивность ФХЛ в зависимости от концентраций люцигенина, рибофлавина и метионина. На рисунке 3 представлены результаты этих измерений.



Рисунок 1.

Кинетика фотохемилюминесценции в системе рибофлавин-люцигенин при контроле(1) и в присутствии супероксиддисмутазы(2) (условия измерения даны в разделе "Методика").

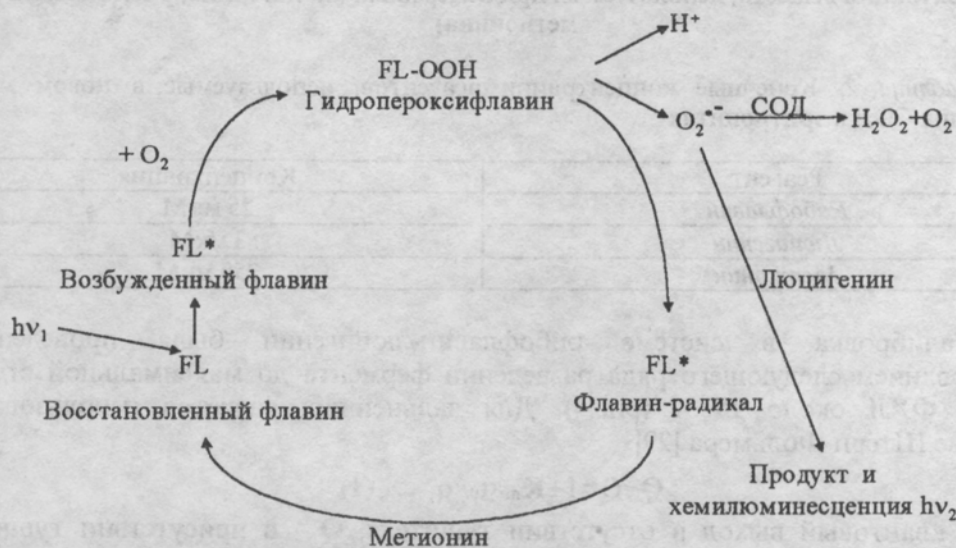


Рисунок 2.

Схема реакций при фотохемилюминесцентном определении супероксиддисмутазы (объяснения даны в тексте).

Видно, что интенсивность ФХЛ монотонно возрастает при увеличении концентрации люцигенина. При значении концентрации около 3 мкМ наблюдалась достаточно высокая вспышка хемилюминесценции. Поэтому, из соображений экономичности, простоты расчета концентрации и достаточной амплитуды сигнала для последующих измерений была выбрана концентрация 3 мкМ. Интенсивность

ФХЛ заметно растет при увеличении концентрации рибофлавина от 10 до 20 мкМ. При дальнейшем увеличении концентрации кривая выходит на плато, достигая значения интенсивности ФХЛ 1,06 отн. ед. при концентрации рибофлавина 35 мкМ. Для последующих измерений была выбрана концентрация 25 мкМ. При возрастании концентрации метионина в системе можно наблюдать такие же изменения, как и в случае с рибофлавином.

На основании полученных результатов выбор был остановлен на такой концентрации метионина, при которой высота вспышки хемилюминесценции лежала в области плато. Полученные результаты обобщены в таблице 2.

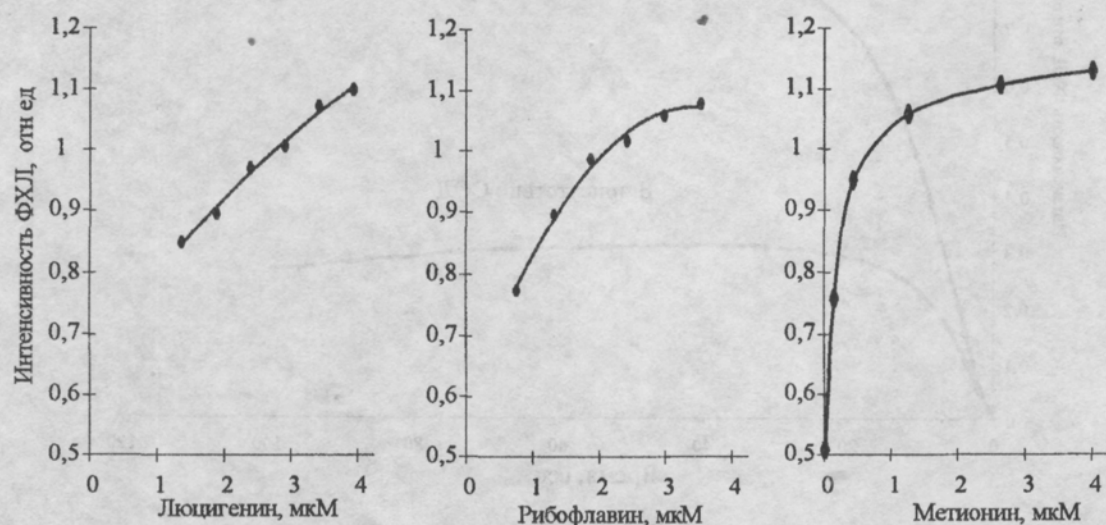


Рисунок 3.

Зависимость интенсивности фотохемилюминесценции в системе рибофлавин-люцигенин от концентрации веществ, используемых при измерениях (люцигенина, рибофлавина и метионина).

Таблица 2. Конечные концентрации реагентов, используемые в новом методе определения СОД в эритроцитах

Реагент	Концентрация
Рибофлавин	25 мкМ
Люцигенин	3 мкМ
Метионин	250 мкМ

Калибровка в системе рибофлавин-люцигенин была проведена с использованием следующего ряда разведений фермента до максимальной степени тушения ФХЛ около 95 % (рис.4). Для дальнейших расчетов использовалось уравнение Штерн-Фольмера [29]

$$Q_0/Q = 1 + K_m \times t_0 \times q, \quad (1)$$

где Q_0 - квантовый выход в отсутствии тушителя, Q - в присутствии тушителя. $1/(K_m \times t_0) = W_{50\%}$ - количество тушителя в пробе, приводящее к 50% ингибированию сигнала ФХЛ, $q = W$ - концентрация тушителя в пробе.

Кривая на рис. 4 может быть линеаризована в соответствии с уравнением (1) при $W_{50\%} = 0,1652$ (см. врезку на рис. 4):

$$S_0/S = 1 + 0,1652 \times W, \quad (2)$$

где S -интегральная интенсивность ФХЛ за 100с в присутствии СОД, S_0 -интегральная интенсивность ФХЛ за 100с без СОД (контроль). Построив калибровочную кривую и определив параметр $W_{50\%}$, можно после измерения интенсивности сигнала ФХЛ

рассчитать количество (активность) СОД в неизвестной пробе W с помощью следующей формулы:

$$W = \frac{S_0/S - 1}{W_{50\%}} \cdot (3)$$

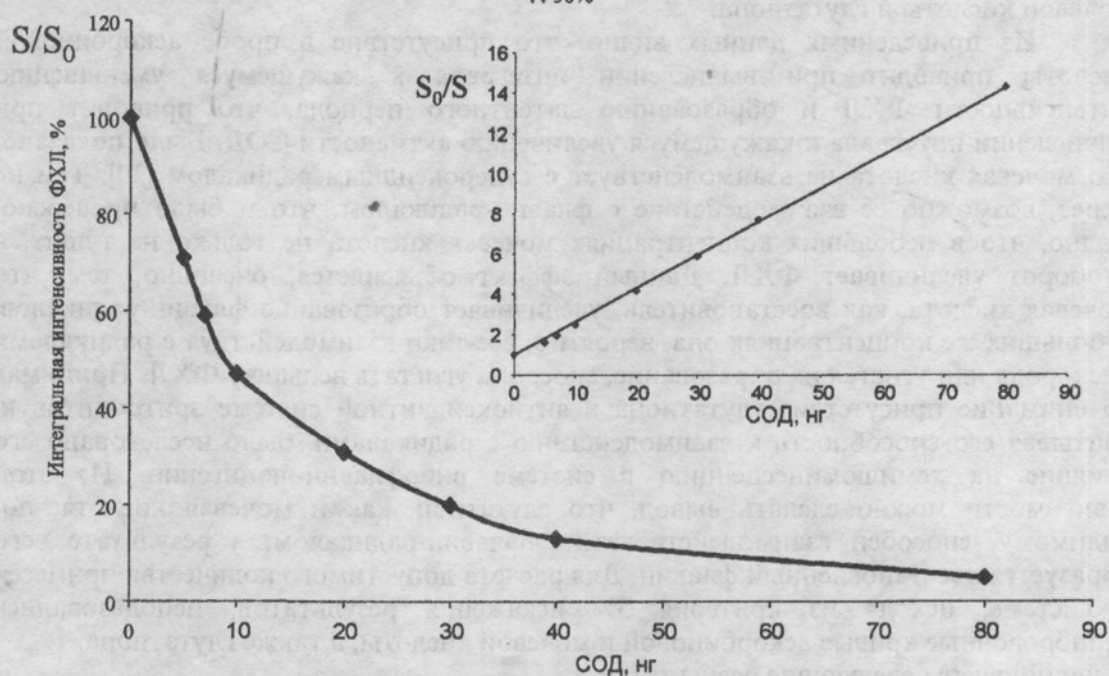


Рисунок 4.

Зависимость интенсивности фотохемилюминесценции в системе рибофлавин-люцигенин от активности супероксиддисмутазы (условия измерения даны в разделе "Методика"). Во врезке представлены те же данные в координатах Штерна-Фольмера (см. уравнение 1)

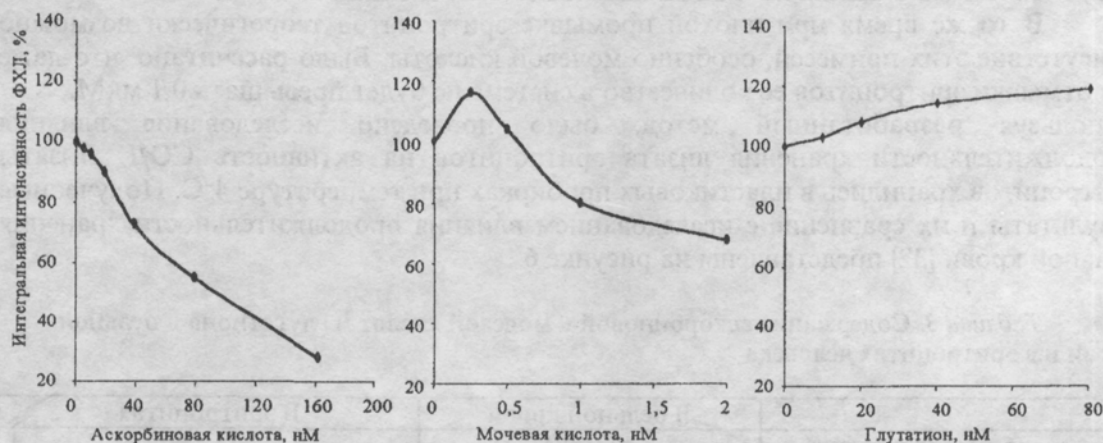


Рисунок 5.

Зависимость интенсивности фотохемилюминесценции в системе рибофлавин-люцигенин от концентрации различных антиоксидантов (аскорбиновой кислоты, мочевой кислоты и глутатиона).

Оценка мешающего действия неферментных антиоксидантов. При выделении СОД из эритроцитов, а особенно из гомогенатов тканей, в пробе возможно присутствие различных примесей, искажающих результаты. Для точной оценки количества супероксиддисмутазы в пробе необходимо оценить влияние на интенсивность ХЛ низкомолекулярных веществ, имеющих антиоксидантную активность.

Взаимодействие супероксидных радикалов с витамином С приводит к его окислению. Образующиеся в результате этого промежуточные радикалы и молекулы гораздо менее активны. На рисунке 5 представлена зависимость ингибирования ФХЛ в системе рибофлавин-люцигенин от концентраций аскорбиновой кислоты, мочевой кислоты и глутатиона.

Из приведенных данных видно, что присутствие в пробе аскорбиновой кислоты приводит при вычислении интеграла к кажущемуся уменьшению интенсивности ФХЛ и образованию латентного периода, что приводит при вычислении интеграла к кажущемуся увеличению активности СОД. Было показано, что мочевая кислота не взаимодействует с супероксидным радикалом [30]. Тем не менее, возможно ее взаимодействие с флавин-радикалом, что и было проверено. Видно, что в небольших концентрациях мочевая кислота не только не тушит, а наоборот увеличивает ФХЛ. Данный эффект объясняется, очевидно, тем, что мочевая кислота, как восстановитель, увеличивает образование флавин-радикалов. В больших же концентрациях она, вероятно, все-таки взаимодействуя с радикалами кислорода или угнетая их образование, способна угнетать вспышку ФХЛ. Принимая во внимание присутствие глутатиона в антиоксидантной системе эритроцитов и, учитывая его способность к взаимодействию с радикалами, было исследовано его влияние на хемилюминесценцию в системе рибофлавин-люцигенин. Из этой зависимости можно сделать вывод, что глутатион, как и мочевая кислота, по-видимому, способен взаимодействовать с флавин-радикалом, в результате чего образуется восстановленный флавин. Для расчета допустимого количества примесей в системе, исходя из критерия 5% искажения результатов, использовались калибровочные кривые аскорбиновой и мочевой кислоты, а также глутатиона.

Были получены следующие результаты:

аскорбиновая кислота	- 3,6 мкМ.
мочевая кислота	- 0,3 мкМ
глутатион	- 4 мкМ

По литературным данным [31] аскорбиновая кислота отсутствует в эритроцитах, а глутатион и мочевая кислота находятся в таких количествах, что не могут оказывать влияния на ФХЛ в нашей системе: таблица 3.

В то же время при плохой промывке эритроцитов теоретически возможно присутствие этих примесей, особенно мочевой кислоты. Было рассчитано, что даже без отмывки эритроцитов ее количество в системе не будет превышать 0,1 мкМ.

Используя разработанный метод, было проведено исследование влияния продолжительности хранения лизата эритроцитов на активность СОД. Лизаты эритроцитов хранились в пластиковых пробирках при температуре 4°C. Полученные результаты и их сравнение с исследованием влияния продолжительности хранения цельной крови [32] представлены на рисунке 6.

Таблица 3. Содержание аскорбиновой и мочевой кислот и глутатиона в цельной крови и в эритроцитах человека

	В цельной крови	В эритроцитах
Аскорбиновая кислота	40 мкМ	-
Мочевая кислота	140 мкМ	150 мкмоль/10 ¹²
Глутатион	1,2 мМ	210 мкмоль/10 ¹²

Видно, что на 14 сутки хранения активность фермента в пробах с цельной кровью меньше на 20%, чем в пробах с лизатом. При этом уменьшение активности СОД в этих пробах на 5%, что может являться допустимой погрешностью, происходит уже на 3 сутки хранения пробы. Из этого можно сделать вывод, что для получения достоверных данных время хранения лизата эритроцитов при температуре 4°C не должно превышать 2 дней.

Сравнение предложенного метода определения СОД с методом фирмы Calbiochem®. Было исследовано 10 проб гемолизата пациентов с помощью нашего метода и метода фирмы Calbiochem®. Для сравнения двух методов были подсчитаны среднее количество фермента, стандартная ошибка среднего и стандартное отклонение. Эти данные представлены в таблице 4.

При сравнении разных методов определения СОД можно пользоваться таким параметром, как чувствительность, которая равна такому количеству фермента, при котором величина контрольного параметра уменьшается в два раза, т.е., в нашем случае, ингибирование составляет 50%. В нашей системе это количество соответствовало 10 нг стандартного препарата СОД фирмы Sigma (USA). У метода фирмы Calbiochem® чувствительность составляла 40 нг.

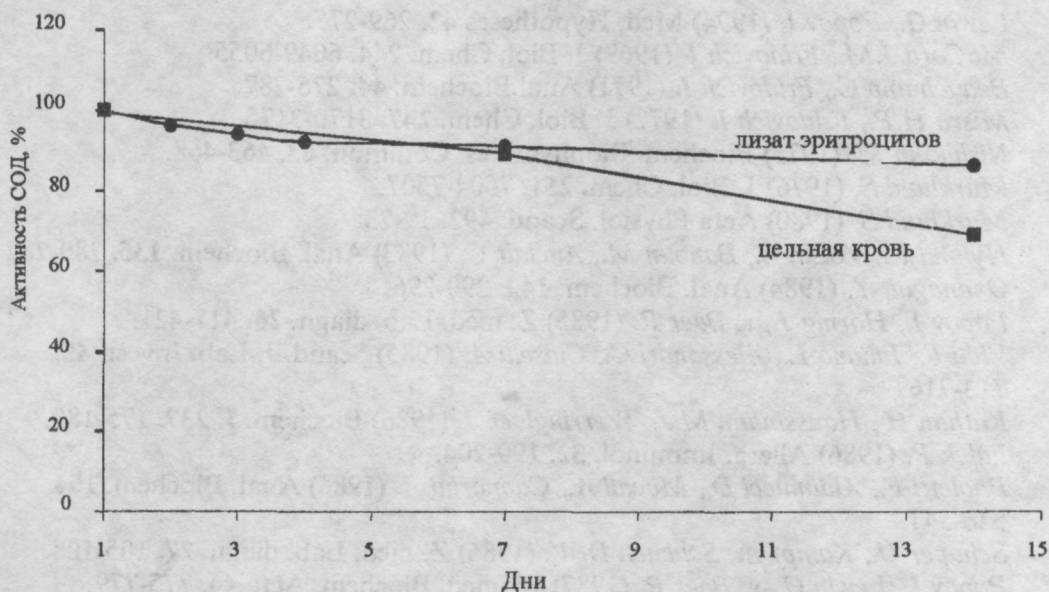


Рисунок 6.

Влияние продолжительности хранения лизата эритроцитов и цельной крови на активность СОД (% исходной).

Таблица 4. Сравнение среднего значения, средней ошибки среднего и стандартного отклонения нашего метода и метода фирмы Calbiochem®.

	Ср. знач.	SD	SEM
Calbiochem®. SOD Kit	13,80	3,03	0,96
Система рибофлавин-люцигенин	15,46	1,41	0,45

Таблица 5. Сравнение активности СОД у мужчин и женщин, а также курящие и некурящие

	\bar{X} (нг/млн.эр)	Стандартная ошибка среднего (SEM)	Стандартное отклонение (SD)	Количество проб (n)
\bar{X} (все пробы)	15,9	$\pm 0,4$	4,15	107
Мужчины	15,01	$\pm 0,49$	4,27	76
Женщины	15,29	$\pm 0,7$	3,89	31
Курящие	15,43	$\pm 0,75$	4,72	40
Некурящие	14,89	$\pm 0,46$	3,72	67

Измерение активности СОД у здоровых доноров. Было измерено 107 проб здоровых доноров. В таблице 5 представлено среднее количество СОД у этих людей и сравнено его количество по половому признаку и в зависимости от курения. Зависимостей активности СОД от пола или курения выявлено не было.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lewin G., Popov I. (1994) *Med. Hypotheses* **42**. 269-275.
2. McCord J.M., Fridovich I. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**. 6049-6055.
3. Beauchamp C., Fridovich I. (1971) *Anal. Biochem.* **44**. 276-287.
4. Misra H.P., Fridovich I. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**. 3170-3175.
5. Nishikimi M. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **63**. 463-468.
6. Marklund S. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**. 7504-7507.
7. Marklund S. (1980) *Acta Physiol. Scand.* **492**. 19-23.
8. Hyland K., Voisin E., Banoun M., Auclair C. (1983) *Anal. Biochem.* **135**. 280-287.
9. Oyanagui, Y. (1984) *Anal. Biochem.* **142**. 290-296.
10. Popov I., Hornig J., v. Baer R. (1985) *Z. med. Lab. diagn.* **26**. 417-421.
11. Violi F., Iuliano L., Alessandri C., Guiselli A. (1985) *Scand. J. Lab. Invest.* **45**. 713-716.
12. Kuthan H., Haussmann M.J., Werringloer J. (1986) *Biochem. J.* **237**. 175-180.
13. Falck P. (1986) *Allerg. Immunol.* **32**. 199-204.
14. Paoletti F., Aldimucci D., Mocali A., Capparini A. (1986) *Anal. Biochem.* **154**. 536-541.
15. Schaper U., Kampf A., Scheuch D.W. (1986) *Z. med. Lab. diagn.* **27**. 105-108.
16. Popov I., Lewin G., v. Baer R. (1987) *Biomed. Biochem. Acta* **46**. 775-779.
17. Corbisier P., Houbion A., Remacle J. (1987) *Anal. Biochem.* **164**. 240-247.
18. Bolann B.J., Ulvik R.J. (1988) Abstract for SFRR Meeting, Paris
19. Sugawara M., Kita T., Lee E.D., Takamatsu J., Hagen G.A., Kuma K., Medeiros-Neto G.A. (1988) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **67**. 1156-1161.
20. Haseloff R.F., Ruder B., Ebert B., Rudolph B., Wischnowsky G.G. (1989) *Wiss. Zeitschrift der Humboldt-Universitat zu Berlin, R. Med.* **38**. 38-41.
21. Grunow M., Schopp W. (1989) *Biomed. Biochim. Acta* **40**. 185-199.
22. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. (1990) *Вопр. мед. хим.* **36** (2) 88-91.
23. Scarpa M., Viglino P., Momo F., Bracco F., Battistin L., Rigo A. (1991) *J. Biochem. Biophys. Methods* **22** (2). 135-144.
24. Nebot C., Moutet M., Huet P., Xu JZ., Yadan JC., Chaudiere J. (1993) *Anal. Biochem.* **214**, 442-451.
25. Laihia J.K., Jansen C.T., Ahotupa M. (1993) *Free. Radic. Biol. Med.* **14** (5). 457-61.
26. Lissi E., Pascual C., del Castillo MD. (1994) *Free. Radic. Biol. Med* **16** (6). 833-837.
27. Porstmann T., Wietschke R. и др. (7 авторов). (1988) *Clin. Chim. Acta* **171**. 1-10.
28. Adachi T., Hirano K., Hayashi K., Muto Y., Okuno F. (1990) *Free. Radic. Biol. Med.* **8**, 25-31.
29. Nishikimi M., Rao N.A., Yagi R. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**. 849-854.

30. Владимирев Ю.А., Потапенко А.Я. (1989) Физико-химические основы фотобиологических процессов. Москва. "Высшая Школа".
31. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Cross C.E. (1992) J. Lab. Clin. Med.
32. Geigy J.R. (1968) Wissenschaftliche Tabellen. 7. Auflage.
33. Lewin G., Popov I., Richter E., Matthes G. (1989) Wiss. Zeitsch. der H.-U. zu Berlin. 38, 1

Поступила 13.11.1998 г.

A SIMPLE METHOD FOR DETERMINATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY BY MEANS OF PHOTOCHEMILUMINESCENCE

D.V. MAGIN⁺, G. LEWIN^{*}, I.N. POPOV^{*}

⁺Moscow State University, Faculty of Basic Medicine, Department of physico-chemical basics of medicine, Malaya Pirogovskaya ul. 1a, Moscow 119828; ^{*}Research Institute for Antioxidant Therapy Co. (F.A.T. Co), Turmstr. 21, 10559 Berlin, FRG.

At present, photochemical detection of SOD-activity is used in most cases, where superoxide production is based on the NADPH oxidase activity or autooxidation of some substances, for instance, adrenaline. The shortcomings of these assays are the requirement of stable pH and temperature and need long-term experiments and sophisticated preliminary work. For this reason a novel method to determine SOD activity have been proposed, based on the photochemiluminescence (PCL), where riboflavine is used as a photosensitizer and lucigenin as a free-radical detector. Minimal concentrations of the system components have been selected, at which PCL intensity became virtually independent on the concentration and was sufficient for proper measurements: 25 nmole/ml of riboflavine, 3 nmole/ml of lucigenin and 250 nmole/ml of methionine. Under this conditions, the amount of SOD causing two-fold inhibition of PCL was 10 ± 0.3 ng of SOD (Sigma, USA). Antioxidants occurring in the blood changed the PCL intensity by 5% at following concentrations: ascorbic acid - above 3.6 μ M, uric acid - above 0.3 μ M, glutathione - above 4.0 μ M. Taking into account the amount of these antioxidants in whole blood and erythrocytes, it has been calculated that the antioxidants containing in the sample do not influence the results of SOD assay, even without erythrocytes washing. The proposed method was compared with a procedure offered by Calbiochem[®]. The amounts of SOD causing two-fold decrease of PCL in our method and that of Calbiochem[®] were 10 and 40 ng (Sigma, USA), and standard deviations 0.45 and 0.96%, respectively. The SOD activity from 107 healthy donors (76 males and 31 females, 40 smokers and 67 non-smokers) has been determined and was found to be 15.1 ± 0.4 ng SOD/ 1×10^9 erythrocytes.

Key words: superoxide dismutase, SOD, photochemiluminescence, PCL, chemiluminescence, assay.