

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 69-916.:577.175.522:577.15:612.111

©Т.В.Сирота

НОВЫЙ ПОДХОД В ИССЛЕДОВАНИИ ПРОЦЕССА АУТООКИСЛЕНИЯ АДРЕНАЛИНА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЕГО ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВНОСТИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ

Т.В.СИРОТА

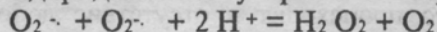
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пушино, Московская область, 142292,
Эл. почта: sirotatv@venus.itib.serpukhov.su

Обнаружено, что в процессе аутоокисления низких концентраций адреналина (230 мкМ) в щелочной среде (рН 10,65) при комнатной температуре и в отсутствие дополнительных источников окисления интенсивно нарастает поглощение с максимумом при 347 нм (волновое число 28,8). Установлено, что появление этого продукта окисления адреналина, не описанное ранее в литературе, значительно опережает по времени образование адrenoхрома (поглощение при 480 нм) и ингибируется супероксиддисмутазой (СОД). Показано, что как и СОД, гемолизат эритроцитов и некоторые исследованные антиоксиданты (аскорбат и цистеин), ингибируют образование этого соединения. Предлагается использовать определение этого вещества для измерения как активности СОД, так и антиоксидантной активности различных соединений и биологических материалов. Дополнительным преимуществом предлагаемого подхода является возможность применения легко доступных, недорогих химических реактивов: 0,1 % аптечный раствор адреналина и 0,2 М карбонатный буфер.

Ключевые слова: аутоокисление адреналина, антиоксиданты, супероксиддисмутаза, гемолизат эритроцитов.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время выявлена связь между многими заболеваниями и процессами свободно-радикального окисления [1]. Вышедшие из-под контроля антиоксидантной защиты процессы свободно-радикального окисления могут являться причиной многих заболеваний: воспалительные процессы, гипоксические и реперфузионные повреждения тканей, бронхолегочные заболевания, старение, канцерогенез и др. [2].

Для установления диагноза, наблюдения за процессом лечения и характером течения болезни (обострение, стадия ремиссии) важно определить состояние системы антиоксидантной защиты. Важнейшим ферментом этой системы является супероксиддисмутаза (СОД; КФ 1.15.1.1), которая катализирует превращение высоко реакционного аниона радикала кислорода (супероксид анион, $O_2^{\cdot -}$) в относительно менее активную перекись водорода и молекулярный кислород:



Активность этого фермента в эритроцитах исследуется с целью выяснения состояния антиоксидантной системы защиты организма в условиях патологического процесса [3-11]. Повышение активности СОД рассматривается как фактор, увеличивающий общую антиоксидантную защиту клетки и препятствующий развитию

патологии [7, 12, 13]. В настоящее время интерес к ферментам защиты от окислительного стресса и, в частности, к СОД, очень велик [1-13].

В литературе описано большое количество методов определения СОД. Один из широко используемых подходов для определения активности СОД основан на способности фермента ингибировать аутоокисление адреналина, которое инициируется супероксидными радикалами, возникающими при взаимодействии адреналина со следами металлов в щелочной среде. Происходит цепная реакция, механизм которой описан в работах [14-16]. Количество образующегося в результате этого процесса адrenoхрома (поглощение 480 нм или 490 нм [17]) служит мерой оценки интенсивности аутоокисления адреналина. Поскольку эта реакция инициируется супероксидными радикалами, фермент супероксиддисмутаза, перехватывая продукт одноэлектронного восстановления кислорода (супероксид анион), является специфическим ингибитором этого процесса. Фридович И. и соавтр. предложили использовать процесс ингибирования аутоокисления адреналина как способ измерения активности СОД [18, 14, 15]. В работах более позднего периода для определения активности СОД использовали также реакцию аутоокисления пирогаллола [19] и реакцию окисления кверцетина [20]. В настоящее время интерес к ферментам защиты от окислительного стресса и, в частности, к СОД, очень велик [1-13].

Так как спонтанные реакции дисмутации протекают обычно очень медленно, стационарные концентрации супероксида, которые могут быть в химических или ферментативных реакциях, низкие. Поэтому, чтобы определить активность СОД, в исследуемую систему обычно вносят дополнительные источники генерации супероксидного аниона, такие как ферментативная система ксантин-ксантиноксидаза [14,18,21], НАДН-феназинметасульфат (ФМС) [22,23]. В такой сопряженной реакции, в отсутствие СОД, образующийся супероксид может восстанавливать нитросиний тетразолиевый (НСТ) до гидразинтетразолия [21-23], восстанавливать окисленный цитохром с [18,22], окислять адреналин до адrenoхрома [14,18]. В присутствии СОД, конкурирующей за супероксидные анионы, процент восстановления НСТ, цитохрома с, окисления адреналина уменьшается.

На основе этого подхода, были предложен целый ряд методов химического определения супероксидного аниона [24], методы спектрофотометрического определения активности фермента, основанные на его способности восстанавливать цитохром с и тетранитрометан [18], нитросиний тетразолиевый в присутствии ксантин-ксантиноксидазы [21] или НАДН-феназинметасульфата (ФМС) [22, 23], или окислять адреналин [14,15,17,18]. Окисление низких концентраций адреналина (200 мкМ) до адrenoхрома происходило в щелочной среде (рН 10,1) при участии дополнительной системы генерации O_2^- [18]. В других работах использовалась более высокая концентрация адреналина - до 1 мМ [17] или высокая - до 30°C - температура инкубационной среды, однако прирост величины оптической плотности конечного продукта окисления адреналина, адrenoхрома, составлял в последнем случае всего только 0,001 ед./мин [14].

Таким образом, количество методов определения СОД, требуют дорогих и не всегда доступных реактивов (НСТ, ФМС, цитохром с, ксантин-ксантиноксидаза и др.).

В настоящей работе предложен новый подход для измерения активности СОД по аутоокислению адреналина, основанный не на измерении количества образующегося адrenoхрома, как описано в литературе, а, как установлено в настоящем исследовании, по ранее появляющемуся продукту окисления адреналина, имеющему поглощение в области 347 нм, образование которого происходит в отсутствие дополнительных источников генерации O_2^- и чувствительно к СОД. Следует отметить, что для предлагаемого подхода к измерению активности СОД необходимы доступные, недорогие реактивы - аптечный раствор 0,1% адреналина и 0,2 М бикарбонатный буфер, рН 10,65.

МЕТОДИКА. В работе использовали 0,1% (5,46 мМ) аптечный раствор адреналина, 0,2 М бикарбонатный буфер, pH 10,65 (Na_2CO_3 «Sigma», США; NaHCO_3 «J.T.Baker», Голландия). pH устанавливали добавлением к 0,2 М раствору Na_2CO_3 сухого реактива NaHCO_3 до необходимой величины pH. Также использовали 0,2 М глицин-NaOH и 0,2 М боратный буферы (глицин «Reanal», Венгрия). Готовили раствор СОД ("Serva", Германия) 100 мкг/мл в 0,9 % NaCl-трис, pH 7,4. Остальные реактивы были отечественного производства, «ХЧ». Все растворы готовили на бидистиллированной воде. Исследования проводились в нетермостатированной кювете при комнатной температуре, которая в период проведения экспериментов изменялась в диапазоне от 12° до 22° С.

UV-VIS спектры и величины оптической плотности растворов регистрировали на спектрофотометре Specord UV-VIS или Specord M-40 (Германия). Для получения гемолизата эритроцитов (источник СОД), брали 100 мкл крови из пальца пациента в 900 мкл 10% цитрата натрия. Центрифугированием отделяли осадок эритроцитов, который дважды промывали 1 мл физ. раствора NaCl, избегая грубых механических воздействий и обрабатывали 0,3 % NaCl, содержащим 0,02 % сапонины, в соотношении 1 объем взвеси эритроцитов и 2 объема раствора, как описано в работе [25]. Можно получать гемолизат более простым способом: к взвеси промытых эритроцитов добавить H_2O в соотношении 1 мл крови: 0,6 мл H_2O [17].

Кинетику процесса аутоокисления адреналина в различных условиях и в присутствии исследуемых препаратов представляли графически с помощью компьютерных программ «Harward Graphics» и «Sigma Plot». Результаты представлены по данным 3-4 независимых экспериментов, на рисунках показаны данные 2-3 параллельных измерений одной пробы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Процедура проведения реакции аутоокисления адреналина. К 2 мл карбонатного (или любого исследуемого) буфера добавляли 100 мкл 0,1% раствора адреналина, тщательно и быстро перемешивали, помещали в спектрофотометр и /или регистрировали весь UV-VIS спектр или измеряли величину оптической плотности при длине волны 347 нм (волновое число 28,8) через 15, 30 секунд в течение 3-5 мин [26]. При работе с гемолизатами в кювету к 2 мл буфера добавляли 10 мкл исследуемого гемолизата и затем 100 мкл 0,1% раствора адреналина, перемешивали и измеряли нарастание оптической плотности как описано выше. В контрольную пробу, против которой проводилось измерение, также добавляли 10 мкл этого же гемолизата, но не вносился адреналин.

Спектральные исследования. Спектр водного раствора адреналина представлен на рис. 1. А. При помещении адреналина в щелочную среду (бикарбонатный буфер, pH 10,65) наблюдается небольшой сдвиг максимума поглощения в УФ-области (280 нм) и появление некоторого поглощения при 330-350 нм, которое увеличивается во времени (рис. 1, Б). Наблюдая за процессом аутоокисления адреналина в щелочной среде, постоянно регистрируя весь спектр в течение 10-15 мин, удалось обнаружить динамику спектральных изменений при 347 нм.

Таким образом, было установлено, что в щелочной среде в условиях комнатной температуры происходит интенсивный процесс аутоокисления адреналина, который можно оценивать не по накоплению адrenoхрома (480 нм), как описано в выше цитируемых работах [14,15,17,18], а по некоторому продукту, поглощаемому при 347 нм. Причем, в течение 1- 6 мин при температуре 15° - 20° С накопление адrenoхрома еще не наблюдается (нет поглощения при 480 нм) (рис. 1).

На рис. 2, Б и В представлены спектральные изменения, регистрируемые во времени при аутоокислении адреналина в щелочной среде в присутствии ионов двухвалентного железа. Показано, что Fe^{2+} приводит к более быстрому нарастанию

поглощения в области 347 нм (сравнить с данными на рис. 1) и к более раннему появлению пика при 480 нм, характерного для адrenoхрома.

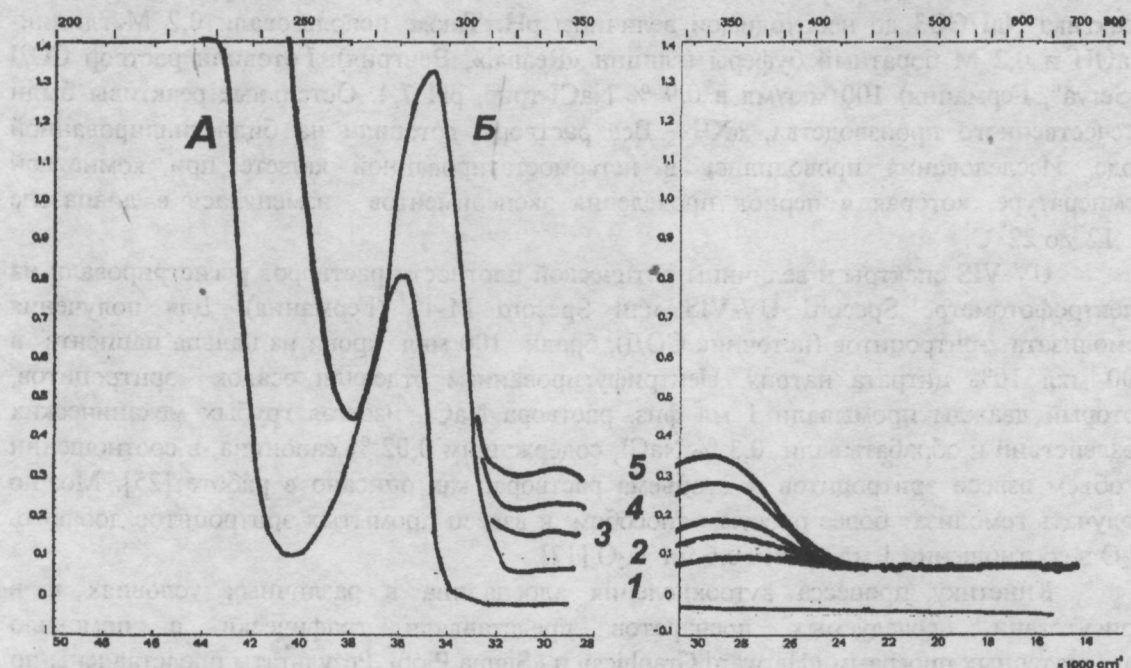


Рисунок 1.

Спектры поглощения адреналина (230 мкМ) в воде (А) и карбонатном буфере, рН 10,65 (Б) во времени: 1- 30 сек, 2 - 1 мин, 3 - 2,5 мин, 4 - 4,5 мин, 5 - 6 мин.

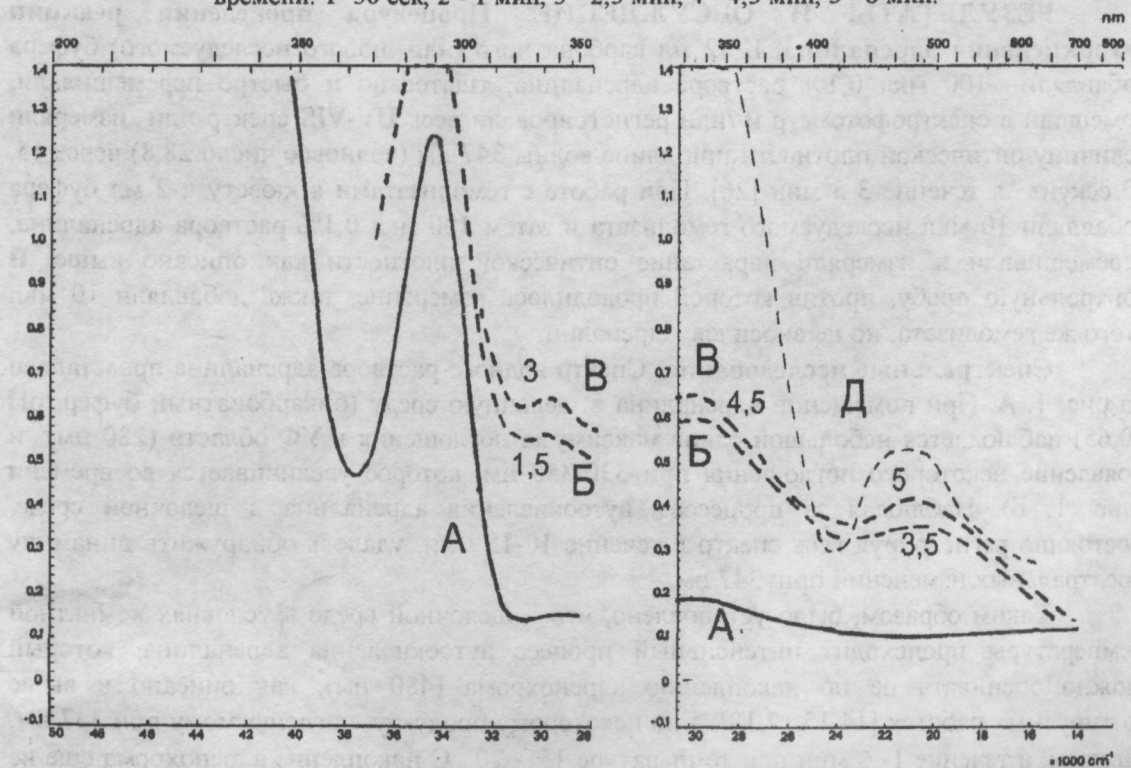


Рисунок 2.

Спектральные изменения при аутоокислении адреналина в щелочной среде (А), в том же буфере во времени в присутствии 50 мкМ Fe^{2+} (Б, В) и в КСl-фосфатном буфере, рН 7,0 в присутствии $K_3[Fe(CN)_6]$ (Д). Цифрами на кривой Б и В указано конкретное время регистрации в минутах.

Важно отметить, что с появлением поглощения в области 480 нм, амплитуда пика при 347 нм не уменьшается и что амплитуда пика при 347 нм значительно больше, чем амплитуда пика при 480 нм. Это особенно ярко наблюдается в экспериментах с применением сильного окислителя $K_3[Fe(CN)_6]$ (рис. 2, Д). В его присутствии окисление адреналина происходило при pH 7,0 [26, 27] (использовали KCl-фосфатный буфер, pH 7,0): раствор желто-лимонного цвета изменялся до розовой окраски и затем приобретал оранжевый цвет. Появление этой окраски соответствует появлению пика поглощения при 480 нм. Это область поглощения адренохрома (рис. 2, Д).

Действие СОД. Для настоящего исследования важен вопрос: чувствительно ли поглощение при 347 нм к СОД? На рис. 3 показано, ингибирующее действие коммерческого препарата СОД на процесс аутоокисления адреналина, регистрируемое по поглощению в области 347 нм. Бычий сывороточный альбумин (BSA), используемый как контроль, подобного действия не оказывал (рис. 3).

После 3-х минутного кипячения фермента, его ингибирующее действие утрачивалось (рис. 4).

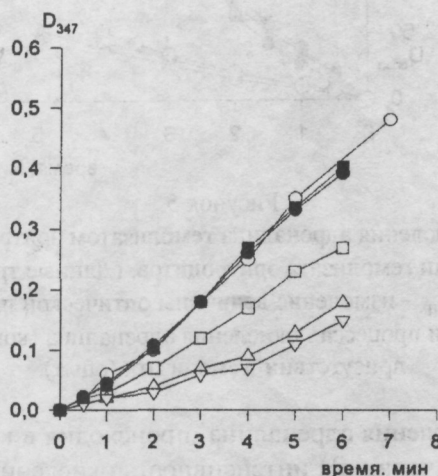


Рисунок 3.

Влияние различных концентраций СОД и BSA на аутоокисление адреналина: O - контроль; □ - 100 нг/мл СОД; Δ - 600 нг/мл СОД; ▽ - 800 нг/мл СОД; ■ - 500 нг/мл BSA; ○ - 1 мкг/мл BSA.

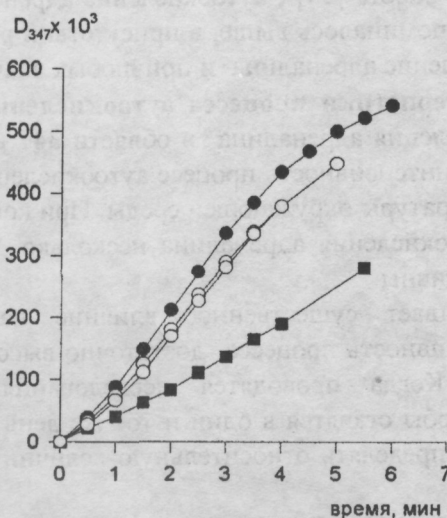


Рисунок 4.

Действие СОД на процесс аутоокисления адреналина до и после кипячения фермента: O - контроль; □ - СОД (1 мкг/мл) до кипячения, O - СОД после кипячения (данные двух параллельных измерений.)

Гемолизат эритроцитов, как источник активной супероксиддисмутазы, также ингибировал аутоокисление адреналина (рис. 5).

Влияние pH. Существенное влияние на процесс аутоокисления адреналина, регистрируемое при длине волны 347 нм оказывала величина pH раствора.

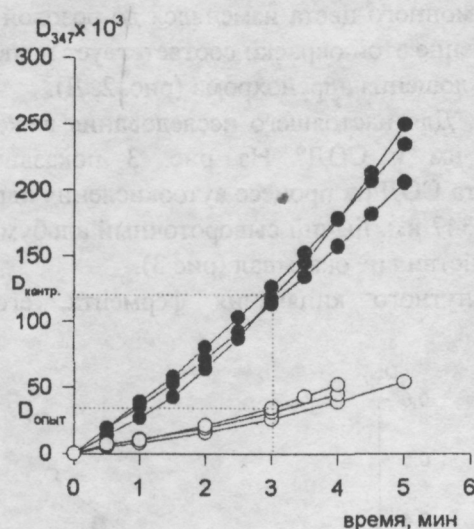


Рисунок 5.

Ингибирование аутоокисления адреналина гемолизатом эритроцитов крови человека:

О - контроль; О - в присутствии гемолизата эритроцитов. (Данные трех параллельных измерений.)

На графике отмечено: $\Delta D_{\text{контр.}}$ - изменение величины оптической плотности при 347 нм через 3 мин от начала регистрации процесса окисления адреналина (контроль), $\Delta D_{\text{опыт}}$ - то же, в присутствии гемолизата (опыт).

Наиболее ярко процесс окисления адреналина происходил в карбонатном буфере при pH 10,65; при более низких значениях pH интенсивность окисления адреналина существенно ослабевала (рис. 6, А). Необходимо отметить, что процесс аутоокисления адреналина зависел и от состава буфера. При том же значении pH аутоокисление адреналина в глициновом (рис. 6, Б) и в боратном (данные не приводятся) буферах шло значительно медленнее. Как показано в работе [14], аутоокисление адреналина не происходило при pH ниже 8,5. Однако, как упоминалось выше, в присутствии различных окислителей [26, 27] можно наблюдать окисление адреналина и при любых значениях pH (см. рис. 2, Д).

Некоторые характеристики процесса аутоокисления адреналина. Динамика образования продукта окисления адреналина в области 347 нм представлена на рис. 7. Необходимо отметить, что интенсивность процесса аутоокисления адреналина зависела от присутствия ЭДТА и температуры окружающей среды. При концентрации ЭДТА порядка 200-500 мкМ процесс аутоокисления адреналина несколько замедлялся, концентрации 20-100 мкМ были неэффективны.

Температура оказывает существенное влияние на процесс аутоокисления адреналина. Однако интенсивность процесса достаточно высокая и можно работать при комнатной температуре. Когда проводятся исследования различных препаратов, контрольная и опытные пробы ставятся в один и тот же день и в одинаковых условиях, что позволяет достоверно определять относительную величину активности исследуемых препаратов.

Было проведено исследование некоторых соединений, которые могут быть ловушками активных форм кислорода, выступая, таким образом, в роли антиоксидантов. Исследовали действие азиды натрия, аскорбиновой кислоты и цистеина. Азид натрия в концентрации 500 мкМ, 1 и 2 мМ не оказывал существенного влияния на аутоокисление адреналина (данные не приводятся), в то же

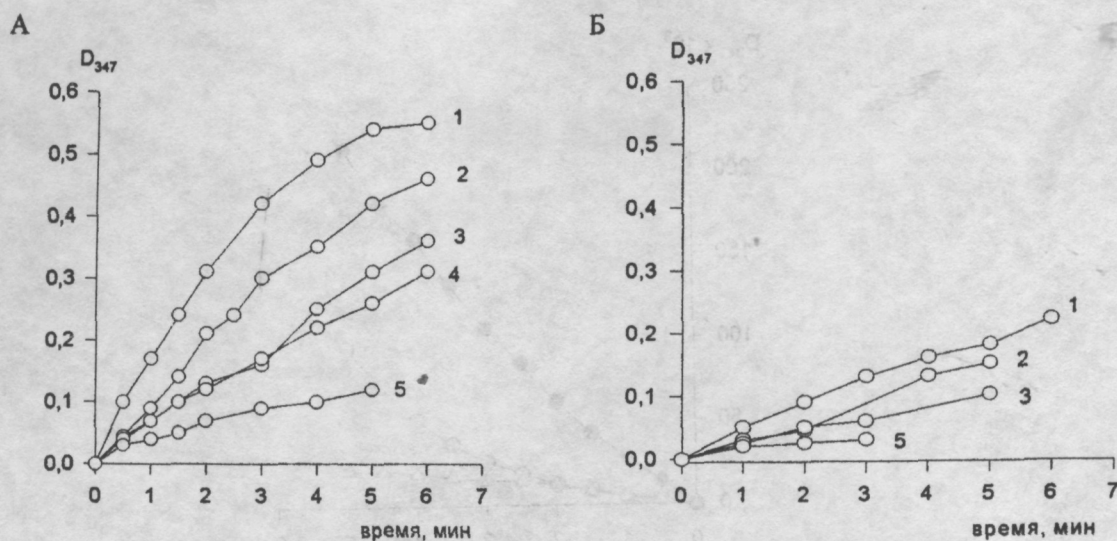


Рисунок 6.

Влияние различных величин pH карбонатного (А) и 0,2 М глицин-NaOH буферов (Б) на ход реакции аутоокисления адреналина, измерение проведено при длине волны 347 нм. Величины pH: 1-10,65; 2-10,55; 3 -10,45; 4 -10,3 ; 5-10,2.

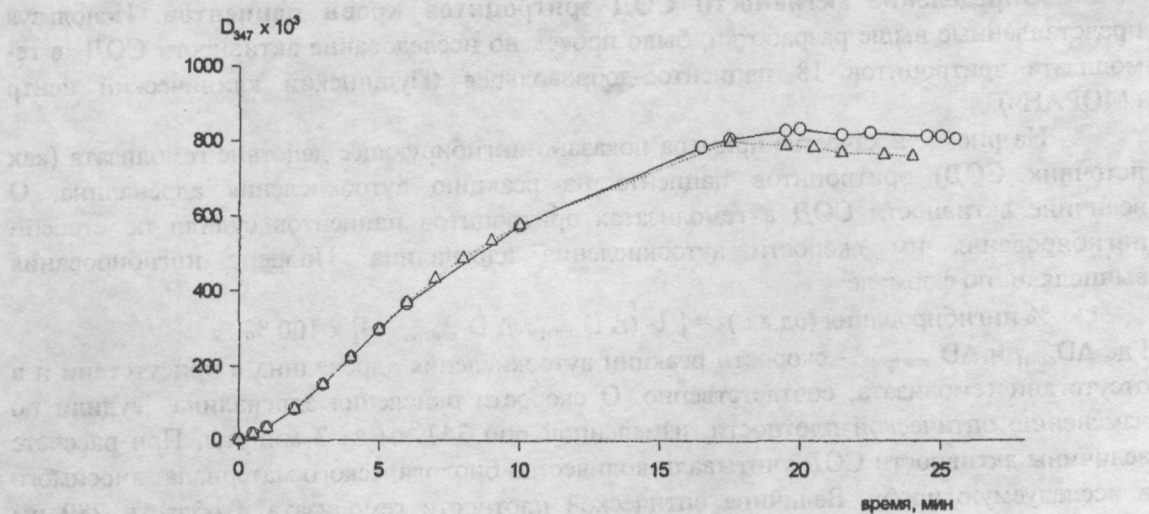


Рисунок 7.

Динамика реакции аутоокисления адреналина (230 мкМ) в карбонатном буфере, pH 10,65, измеряемая при длине волны 347 нм. Приведены данные двух параллельных измерений.

время аскорбат в микромолярных концентрациях (5, 25 мкМ) существенно ингибировал эту реакцию (рис. 8). Следует отметить, что окисление кверцетина, описанное в работе [20], было не чувствительно к более высоким концентрациям азид натрия (6 - 60 мМ) и ингибировалось более высокими концентрациями аскорбата: 3 мМ - 100% ингибирование, 300 мкМ - 80% ингибирование [11].

Сильное ингибирующее действие оказывали цистеин и ионы меди (рис. 9 А, Б). Проверено, что добавление тестируемых соединений в 0,2 М карбонатный буфер не изменяло его величины pH.

Реакцию аутоокисления адреналина предлагается использовать как тест-систему для оценки антиоксидантной активности различных соединений.

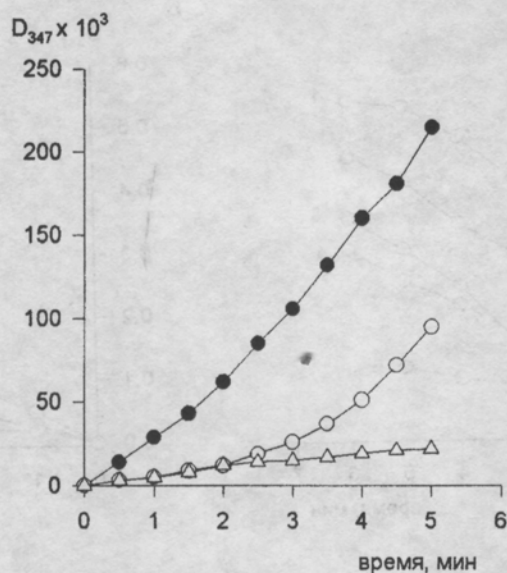


Рисунок 8.

Влияние аскорбиновой кислоты на аутоокисление адреналина. О - контроль; ○ - 5 мкМ; △ - 25 мкМ.

Определение активности СОД эритроцитов крови пациентов. Используя представленные выше разработки, было проведено исследование активности СОД в гемолизате эритроцитов 18 пациентов-добровольцев (Пущинский клинический центр «МОРАН»).

На рис. 5, в качестве примера показано ингибирующее действие гемолизата (как источник СОД) эритроцитов пациента на реакцию аутоокисления адреналина. О величине активности СОД в гемолизатах эритроцитов пациентов судили по степени ингибирования им скорости аутоокисления адреналина. Процент ингибирования вычисляли по формуле:

$$\% \text{ ингибирования (ед.ак.)} = [1 - (\Delta D_{\text{опыт}} / \Delta D_{\text{контроль}})] \times 100 \%$$

Где $\Delta D_{\text{опыт}}$ и $\Delta D_{\text{контроль}}$ - скорости реакции аутоокисления адреналина в присутствии и в отсутствии гемолизата, соответственно. О скорости окисления адреналина судили по изменению оптической плотности, измеренной при 347 нм за 3 минуты. При расчете величины активности СОД учитывали количество биологического материала вносимого в исследуемую пробу. Величина оптической плотности гемолизата в области 280 нм использовалась для оценки количества материала в пробе. Удельную активность фермента рассчитывали на 0,1 ед. оптической плотности при 280 нм (удельная активность фермента).

Величина удельной активности СОД эритроцитов крови обследованной группы пациентов (n=18), колебалась в диапазоне от 17 единиц активности (ед. акт.) до 42 ед.ак. и зависела от индивидуального состояния пациента.

Так была выявлена высокая активность СОД у пациентов с низким уровнем гемоглобина. Известно, что активность СОД коррелирует с содержанием гемоглобина и уровнем анемии [7,12]. Отмечено, что у пациентов, имеющих высокое значение СОЕ в клиническом анализе крови, активность СОД повышена. СОД эритроцитов крови некоторых пациентов, имеющих хронические заболевания различной этиологии, была снижена.

Таким образом, предварительный клинический материал по определению активности СОД эритроцитов показал возможность использования предлагаемого нами подхода для оценки активности фермента антиоксидантной защиты.

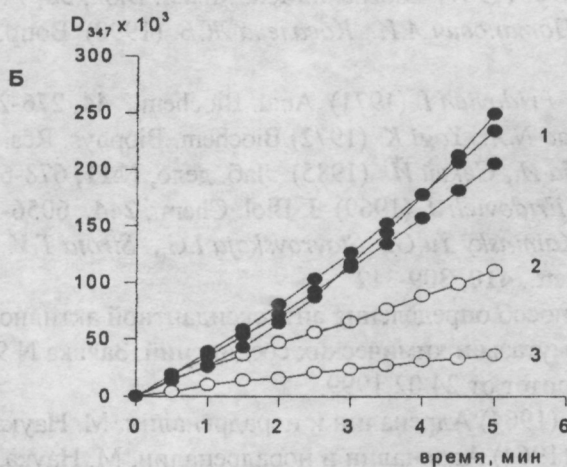
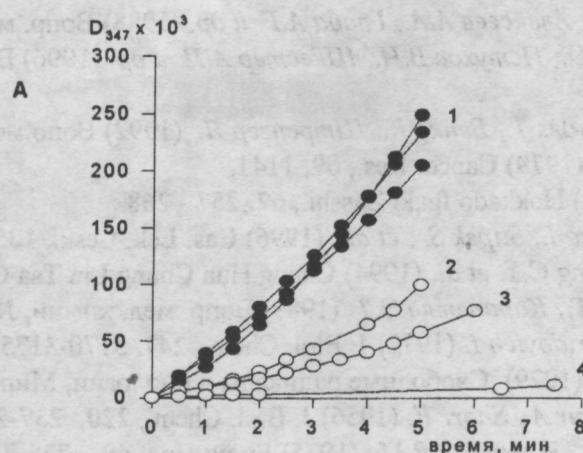


Рисунок 9.

Влияние цистеина (А) и ионов меди (CuSO_4) (Б) на процесс аутоокисления адреналина:

А: 1 - контроль; 2 - 2,5 мкМ; 3 - 5 мкМ; 4 - 25 мкМ. Б: 1 - контроль; 2 - 50 мкМ; 3 - 100 мкМ.

Кроме того, сделано принципиальное заключение, что используя крайне не дорогие, абсолютно доступные химические реактивы можно определять активность СОД или препаратов содержащих ее по способности фермента ингибировать аутоокисление адреналина, а именно, ингибировать накопление продукта аутоокисления адреналина, поглощающего при 347 нм.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке (гранты РФФИ N 96-15-97854 и N 96-04-490530 и ГНТП «Здоровье населения России» договор N 031 ПЗ97. Автор выражает свою признательность проф. М.Н. Кондрашовой за поддержку и Н.П. Сирота за помощь в работе. Автор благодарен д.б.н Косяковой Н.И. и терапевту Лянге Н.В. за предоставление биологического материала (препараты крови пациентов) и клинических результатов наблюдений.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Gutteridge J. M. C. (1993) Free Radic. Res. Commun., 19, 141-158.
2. Меньщиков Е.Б. Зенков И.П. (1993) Успехи совр. биологии, 113, 4, 442-455.
3. Терехина Н. А., Петрович Ю.Ф. (1992) Вопр. мед. химии, 38 (5), 62- 63.
4. Crapo J., Tierneг D.F. (1974) Amer. J. Physiol., 226, 1404-1407.
5. Sjostrom K., Crapo J. (1981) Ball. Europ. Physiophath. Res., 17, 31-41.

6. Карелин А.А., Алексеев А.А., Глоба А.Г. и др. (1988) *Вопр. мед. химии*, №5, 107-110.
7. Кумерова А.О., Петухов В.И., Шкестер А.П. и др. (1996) *Вопр. мед. химии*, 42, 144-147.
8. Чевари С., Андял Т., Бенке К., Штрэнгер Я. (1992) *Вопр. мед. химии*, 38, 4-5.
9. Oberley L.W. (1979) *Cancer Res.*, 59, 1141.
10. Saito T. (1987) *Hokkado Igaki Zasshi.*, 62, 257-268.
11. Zima T., Spicka I., Stipek S., et al. (1996) *Cas. Lek. Cesk.*, 135, 14-17.
12. Zhu C.S., Zhang C.Y. et al. (1994) *Chung Hua Chung Liu Tsa Chin.*, 16, 1, 7-16.
13. Карагезян К.Г., Карапетян Э.Т. (1989) *Вопр. мед. химии*, №4, 11-12.
14. Misra H.P., Fridovich I. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 3170-3175.
15. Фридович И. (1979) *Свободные радикалы в биологии*, Мир. М., 1, 272-308.
16. Green S., Mazur A., Shorr E. (1956) *J. Biol. Chem.*, 220, 237-255.
17. Симонян М.А., Набалдян Р.М. (1975) *Бюохимия*, 40, 726-734.
18. McCord J.M., Fridovich I. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055.
19. Tho L., Candlish J. (1987) *Biochem. Med. Metab. Biol.*, 38, 74-80.
20. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. (1990) *Вопр. мед. химии*, 36, (2), 88-91.
21. Beauchamp C., Fridovich I. (1971) *Anal. Biochem.*, 44, 276-287.
22. Nishikimi N., Rao N.A., Yagi K. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46, 849-854.
23. Чевари С., Чаба И., Секей Й. (1985) *Лаб. дело*, №11, 678-681.
24. McCord J.M., Fridovich J. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 6056-6063.
25. Kosenko E.A., Kaminsky Yu.G., Stavrovskaja I.G., Sirota T.V., Kondrashova M.N. (1997) *FEBS Lett.*, 410, 309-312.
26. Сирота Т.В. Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений, Заявка N 99103192 (003673), приоритет от 24.02.1999.
27. Матлина Э.Ш. (1964) *Адреналин и норадреналин*, М. Наука, с. 272.
28. Манухин Б.Н. (1964) *Адреналин и норадреналин*, М. Наука, с. 297-300.

Поступила 09.02 98 г.

A NEW APPROACH TO THE INVESTIGATION OF ADRENALINE AUTOOXIDATION AND ITS APPLICATION FOR DETERMINATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY.

T.V.SIROTA

Institute of Theoretical and experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142292, Russia E-mail: sirotatv@venus.iteb.serpukhov.su

The intensive rise of absorptionh maximum at 347 nm (wave number 28.8) was found during autoxidation of low concentrations of adrenaline (230 µM) in alkaline pH (10,65) under room temperature and in the absence of additional sources of superoxide. It was stated that the appearance of this product of adrenaline oxidation, which was not reported earlier, is considerably more rapid than formation of adrenochrome (absorbtion at 480 nm) and is inhibited by superoxide dismutase (SOD). It was shown that erythrocyte hemolysate and some studied antioxidants (ascorbate and cysteine) inhibit formation of this substance like SOD. The determination of the described substance can be used for measurement of both: activity of SOD or antioxidant activity of different biological materials. The possibility to use available not expensive chemicals (0.1% adrenaline solution from drug store, 0.2 M bicarbonate buffer) serves as an additional advantage of the proposed method.

Key words: the autooxidation of adrenalin, antioxidantes, superoxide dismutase (SOD), hemolysate of human erythrocytes.