

УДК 577.1:577.3:547.9

©Сирота

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НИТРОСИНЕГО ТЕТРАЗОЛИЯ В РЕАКЦИИ АВТООКИСЛЕНИЯ АДРЕНАЛИНА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ

Т.В. Сирота

Учреждение Российской академии наук Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, г. Пущино, Московская область, ул. Институтская, 3; тел.: 8-4967-739170; эл. почта: sirotatv@rambler.ru

Внесение нитросинего тетразолия (НСТ) в реакцию автоокисления адреналина позволило непосредственно идентифицировать образование супероксидных анионов ($O_2^{\bullet-}$) в этой супероксидгенерирующей системе и показать кинетику их накопления. Проведено сравнение кинетики образования адrenoхрома и $O_2^{\bullet-}$ в одинаковых условиях. Обсуждаются представленные автором три возможных подхода к использованию реакции автоокисления адреналина для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) и выявления антиоксидантных свойств различных соединений. Два первых подхода были описаны ранее: спектрофотометрический метод регистрации адrenoхрома, конечного продукта реакции окисления адреналина, при длине волны 347 нм (Сирота, 1999) и полярографический метод, регистрирующий потребление кислорода, который используется для образования $O_2^{\bullet-}$ (Сирота, 2011). Третий, новый подход к этой проблеме, представлен в настоящей работе: спектрофотометрическое определение $O_2^{\bullet-}$ с применением НСТ. Использование этого подхода позволило снизить величину рН карбонатного буфера с 10,5 до 9,7 и уменьшить в 4 раза количество добавляемого адреналина, т.е. созданы более мягкие и экономичные условия для выявления и изучения антиоксидантных свойств исследуемых материалов.

Ключевые слова: адреналин, нитросиний тетразолий, адrenoхром, супероксид, кислород, супероксиддисмутаза.

ВВЕДЕНИЕ. Один из путей метаболизма адреналина, гормона симпатoadреналовой системы, который происходит по хиноидному пути превращения, известен не только образующимися метаболитами – аминохромами, но и возникающими в этом процессе активными формами кислорода [1-5]. Современное состояние этой проблемы достаточно полно освещено в предыдущем нашем исследовании [6].

Моделью хиноидного окисления адреналина, как известно, является реакция автоокисления адреналина в щелочном карбонатном буфере, которая происходит через ряд последовательных этапов с образованием промежуточных соединений до конечного продукта адrenoхрома. При низкой концентрации H^+ самоинициируется процесс внутримолекулярных перестроек молекулы адреналина: происходит его депротонизация, последующая циклизация и образование соединения хиноидной природы – адrenoхрома (рис. 1, схема А) [2, 3, 7, 8]. Электроны от молекулы адреналина и его последующих окисленных промежуточных соединений в процессе этих

АВТООКИСЛЕНИЕ АДРЕНАЛИНА, НИТРОСИНИЙ ТЕТРАЗОЛИЙ И СОД

преобразований поступают на растворённый в среде инкубации кислород. Получая электрон, кислород превращается в супероксид-анион (рис. 1, схемы А и Б) и убыль молекулярного кислорода из среды регистрируется полярографически. Полярографические исследования этого процесса описаны нами ранее [6]. Также ранее было установлено, что образование устойчивого продукта окисления адреналина адrenoхрома можно определять спектрофотометрически не только при 480 нм, как в работах [7] и, применяя некоторые модификации, в работе [9], но и при длине волны 347 нм [10-13]. Предложенный подход показал преимущество для регистрации образования адrenoхрома длину волны 347 нм и возможность использования её для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) и выявления антиоксидантных свойств различных соединений и препаратов, в присутствии которых ингибируется накопление адrenoхрома.

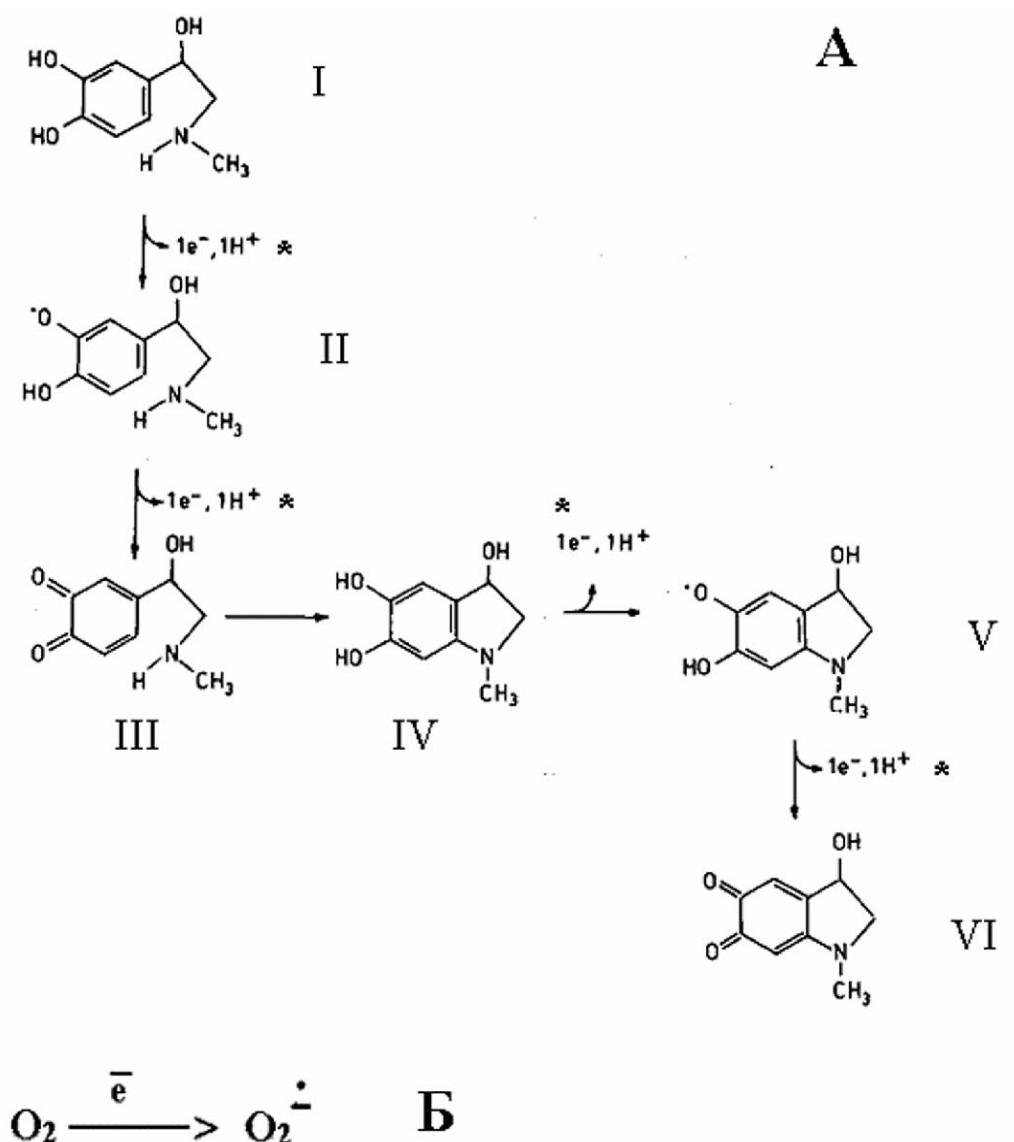


Рисунок 1.

Образование адrenoхрома (А) и супероксид анионов (А и Б) в процессе автоокисления адреналина по хиноидному пути: I - адреналин, II - адреналинсемихинон, III - адреналинхинон, IV - лейкоадrenoхром, V - адrenoхромсемихинон, VI - адrenoхром. Условные обозначения: * - место образования супероксида в реакции согласно схемы Б.

В настоящей работе представлен новый подход в исследовании реакции автоокисления адреналина и предлагается его также использовать для определения активности СОД. Оригинальность этого подхода связана с применением нитросинего тетразолия (НСТ), который был непосредственно внесен в реакцию автоокисления адреналина. Известно, что НСТ применяется для выявления супероксид-анионов в таких супероксигенерирующих системах, как ксантин/ксантиноксидаза [14], NADH/ФМС (феназинметосульфат) [15] и др. [16], однако в реакции автоокисления адреналина НСТ ранее не использовался.

Цель работы: применяя НСТ в реакции автоокисления адреналина, исследовать кинетику образования $O_2^{\bullet-}$ в этом процессе в сравнении с кинетикой образования адrenoхрома; выявить возможности и преимущества использования такого подхода для определения активности СОД и выявления антиоксидантных свойств различных материалов.

МЕТОДИКА. Спектральные исследования автоокисления адреналина проводили в 0,2 М карбонатном буфере при разных значениях pH (9,7; 10,2; 10,5) на спектрофотометре UV/VIS Uvikon-923 (Италия) в режиме “time Driver” в термостатированной кювете при температуре 26°C. При 347 нм регистрировали образование адrenoхрома и при 560 нм образование диформаза, продукта восстановления НСТ. В некоторых случаях для регистрации всего спектра использовали режим “Wavelength Scan”. Реакцию автоокисления адреналина начинали с момента внесения 0,23 мМ или 0,058 мМ адреналина гидрохлорида в буфер при постоянном его перемешивании. НСТ в разных концентрациях добавляли в кювету с карбонатным буфером до адреналина. В опытах с НСТ руководствовались методикой, используемой для определения активности СОД в системе ксантин/ксантиноксидаза и NADH/ФМС [14, 15].

Измерение спектра поглощения фиолетово-синего окрашенного продукта восстановления НСТ показало наличие максимума поглощения в области 560 нм, что соответствует по литературным данным диформазану [16]. Скорость реакции образования адrenoхрома или диформаза оценивали по изменению оптической плотности в единицу времени и рассчитывали по формуле: $\Delta E/\Delta t = (E_t - E_1)/\Delta t$, где E_1 – регистрируемая оптическая плотность при длине волны 347 или 560 нм сразу же после внесения адреналина, E_t – оптическая плотность через время Δt , в течение которого регистрируется автоокисление адреналина (в данных условиях – 2, 3, или 5 мин).

Для исследования супероксидгенерирующей системы автоокисления адреналина в присутствии НСТ использовали также различные вещества с антиоксидантными свойствами, такие как цистеин, ионы меди – $CuSO_4$ и аскорбиновая кислота, которые применялись нами ранее [6, 10], а также гемолизат цельной крови как источник эритроцитарной СОД. Определяли относительную активность реакции (%) в присутствии этих препаратов. Реакцию автоокисления адреналина в этих экспериментах проводили в следующих условиях: 0,2 М карбонатный буфер, pH 9,7; 25 мкМ НСТ; 57,5 мкМ адреналин, температура 26°C, регистрация при длине волны 560 нм. В специальных опытах показано, что добавка используемых препаратов к 0,2 М карбонатному буферу не изменяло величину pH буфера. Количество добавляемого гемолизата пересчитывали на 1 мкл цельной крови и выражали как мкл цельной крови/мл пробы. Объем пробы составлял 2 мл. Гемолизат цельной крови получали как описано ранее: забирали 50 мкл цельной крови, переносили ее в пробирку-эппендорф, содержащую 100 мкл физиологического

раствора с гепарином (20 мкл, 10 Ед), перед началом измерения добавляли 330 мкл дистиллированной воды и проводили гемолиз в течение 10 мин на холоду [17, 18]. Полученный гемолизат в объеме 500 мкл, содержащий 50 мкл цельной крови, хранили на льду.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента (программы Microsoft Excel), определяя среднее значение и стандартное отклонение. Представленные данные являются средними значениями, полученными в независимых экспериментах при 3-6 параллельных измерениях в каждом опыте.

В работе использовались реактивы: 0,1% раствор адреналина гидрохлорида (фармакопейная форма); Na_2CO_3 , нитросиний тетразолий хлорид, супероксиддисмутаза ("Sigma", США); NaHCO_3 ("J.T. Baker", Голландия) и другие квалификации не ниже х.ч. 0,2 М карбонатный буфер готовили из Na_2CO_3 , pH устанавливали добавлением к раствору сухого NaHCO_3 до необходимой величины pH. В процессе работы коррекцию нужной величины pH и, соответственно, установление определенной скорости реакции осуществляли 1 М и 0,1 М растворами HCl.

Все растворы готовили на бидистиллированной воде.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. НСТ известен как индикатор супероксид-анионов [16]. Его внесение в реакцию щелочного автоокисления адреналина позволило непосредственно идентифицировать $\text{O}_2^{\bullet-}$, под действием которых НСТ восстанавливается до диформаза. Кинетика образования диформаза (длина волны 560 нм) представлена на рисунке 2А; её сравнивали с кинетикой образования адrenoхрома (длина волны 347 нм), рисунок 2Б. Исследования проводили при разных значениях pH 0,2 М карбонатного буфера. Как указывалось ранее [10], скорость реакции автоокисления адреналина высоко чувствительна к величине pH, поскольку, щелочные условия способствуют внутримолекулярным перестройкам в молекуле адреналина и превращению его в адrenoхром с образованием супероксидных анионов. Введение НСТ в реакцию автоокисления адреналина показало, что, действительно, в процессе окисления образуются супероксидные анионы. Поток их настолько интенсивный, что добавленное количество НСТ (50 мкМ) при исследуемых значениях pH (10,5 и 10,2), восстанавливается очень быстро: кривая кинетики реакции выходит на плато насыщения уже через 1 мин или 2,5 мин, соответственно (рис. 2А). При pH 9,7 генерация $\text{O}_2^{\bullet-}$ происходит менее интенсивно. Накопление адrenoхрома при этих значениях pH карбонатного буфера происходит значительно медленнее (рис. 2Б) и, как показано ранее [10], выход кинетической кривой на плато при pH карбонатного буфера 10,65, наступает только через 20 мин. Рассчитанные величины скоростей образования продуктов этой реакции при разных значениях pH представлены в виде диаграмм на рисунке 3 А,Б. Следует обратить внимание на размерность шкалы ординат (y) при регистрации диформаза и адrenoхрома (рис. 2 А,Б и рис. 3 А,Б). Поскольку коэффициенты молярной экстинкции (ϵ) адrenoхрома и диформаза соизмеримы: адrenoхром – $\epsilon = 2,28 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ при 310 нм [8]; диформазан – $\epsilon = 2,78 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ при 560 нм [19], видно, что скорость реакции образования диформаза приблизительно в 80 раз выше, чем адrenoхрома. Таким образом, экспериментально показано, что стехиометрия процесса образования адrenoхрома (измерение при длине волны 347 нм) и супероксидных анионов (измерение при длине волны 560 нм) различна. Адrenoхром – конечный продукт окисления адреналина, он образуется

на терминальной стадии реакции, в то время как супероксид генерируется на нескольких промежуточных этапах окисления адреналина (рис. 1А). Естественно, что его количество в пересчете на молекулу адреналина и относительно адrenoхрома, образуется значительно больше. Это и позволило на практике “смягчить” условия проведения реакции. Кроме того, поскольку $O_2^{\bullet-}$ непосредственно “ловится” молекулами НСТ, то по образованию диформазана его можно оценивать количественно.

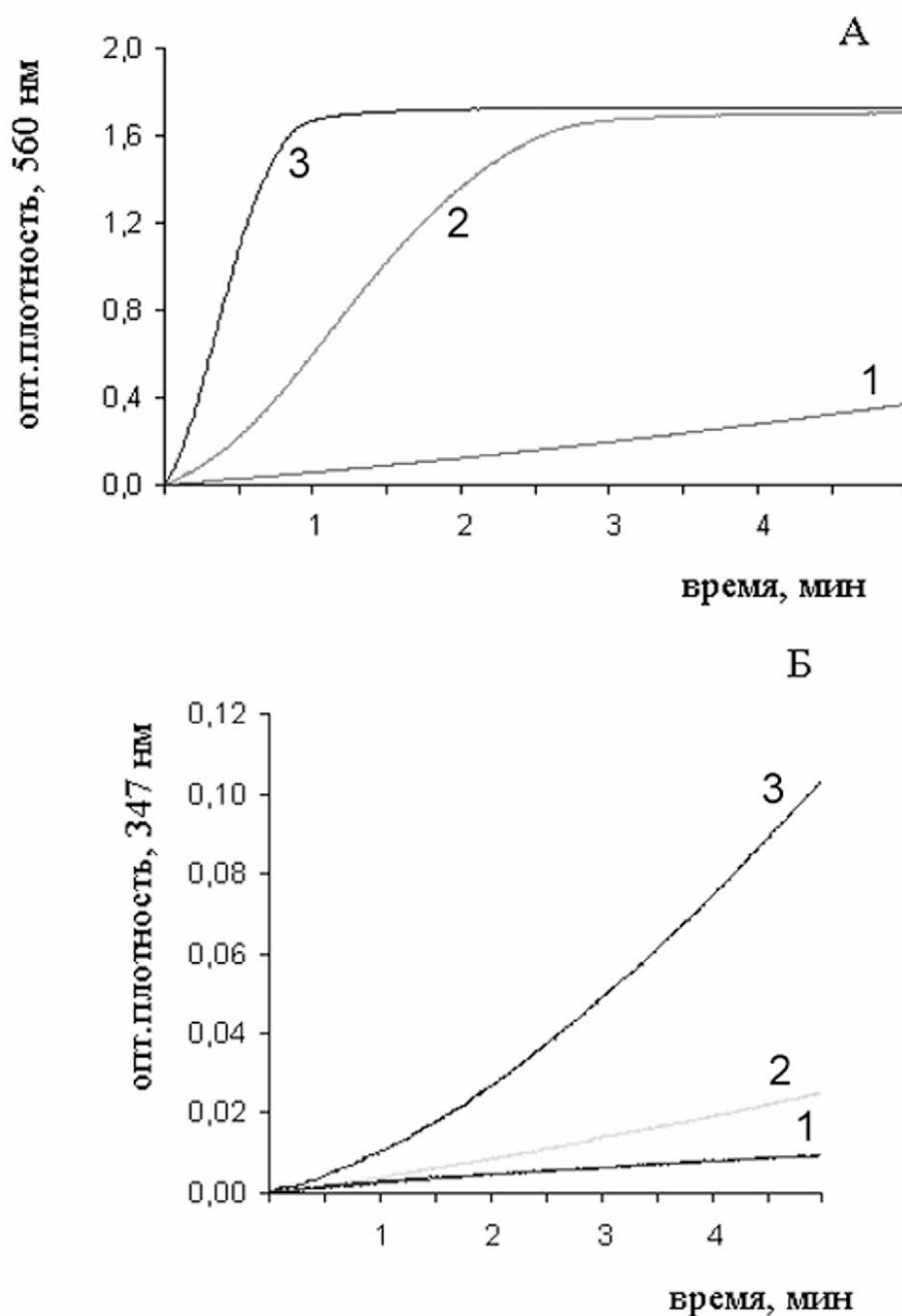


Рисунок 2.

Кинетика образования супероксидных радикалов, регистрация при 560 нм (А), и адrenoхрома - при 347 нм (Б), в реакции автоокисления адреналина при разных значениях рН 0,2 М карбонатного буфера: 1 - рН 9,7; 2 - рН 10,2; 3 - рН 10,5; в присутствии 0,23 мМ адреналина и 50 мкМ НСТ, температура 26°C.

Приведены кривые трёх независимых экспериментов.

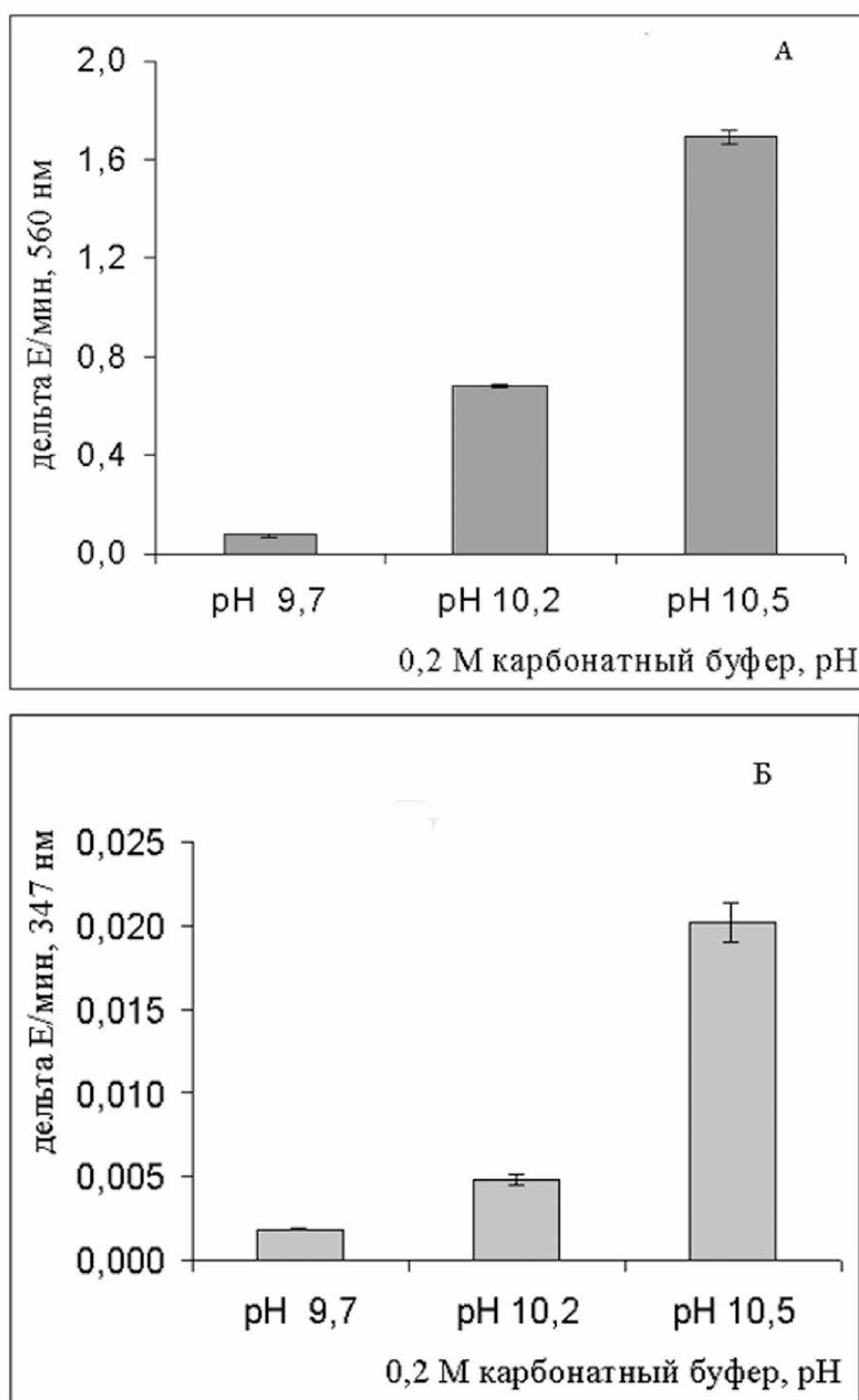


Рисунок 3.

Скорость образования формазана, 560 нм (А), и адренохрома, 347 нм (Б), в реакции автоокисления адреналина при разных значениях pH 0,2 М карбонатного буфера.

Условия проведения реакции как на рисунке 2.

(Расчёт скорости реакции как в разделе “Методика”).

Как известно, процесс автоокисления адреналина является цепной реакцией и подчиняется соответствующим характерным закономерностям, описанным для цепных реакций [20, 21]. Ингибиторный анализ занимает особое место в исследованиях подобных процессов. СОД и препараты с антиоксидантными свойствами являются ингибиторами супероксид-генерирующей реакции автоокисления адреналина. Определение активности СОД и выявление антиоксидантных свойств различных материалов основано на обнаружении их способности ингибировать генерацию супероксидных анионов, для чего необходимо оптимизировать скорость супероксидгенерирующей реакции в контрольной пробе (в отсутствии исследуемых материалов), чтобы корректно определять изучаемые показатели и использовать минимальные количества исследуемых материалов для выявления ингибирующего их действия. Факторы, которые позволяют регулировать скорость реакции в контрольной пробе, – это условия проведения реакции: рН и молярность карбонатного буфера, температура, концентрация адреналина. Добавляя к 0,2 М карбонатному буферу мизерными каплями 0,1 М раствор HCl, устанавливается определенная заданная скорость реакции, которая при регистрации образования адrenoхрома (347 нм) должна быть в диапазоне 0,06-0,07 ед. оптической плотности/мин. Именно в этих условиях мы рекомендуем определять активность СОД гемолизата цельной крови, гемолизата эритроцитов, цитозольных фракций различных тканей и антиоксидантную активность (АОА) различных препаратов. Ингибирующее действие исследуемых материалов не должно быть более 50%, что достигается внесением различных количеств исследуемого материала, но не его разведением. Необходимые экспериментальные условия для регистрации образования адrenoхрома при 347 нм разрабатывались в наших ранних работах [10-12, 17, 18, 22, 23]. Следует также отметить, что в некоторых исследованиях мы вводили специальный показатель характеристики антиоксидантной системы – антиоксидантная мощность [23]. Оценивалась способность биологического материала (гемолизата цельной крови) ингибировать высокую скорость реакции автоокисления адреналина, которая специально создавалась и составляла 0,09-0,1 ед.опт.плот./мин. Этот показатель, антиоксидантная мощность крови, оказался достаточно информативным [23].

При очень высоких скоростях развивающегося цепного процесса достичь ингибирования реакции бывает не просто. Высокая скорости реакции в присутствии НСТ, которая представлена на рисунке 2А не тормозилась даже высокими концентрации коммерческого препарата СОД (данные не приводятся). Для оптимизации скорости реакции автоокисления адреналина использованы разные концентраций НСТ. Из полученных результатов, представленных на рисунке 4, следует, что относительно умеренная скорость реакции наблюдаются при 25 мкМ НСТ. В присутствии НСТ ингибирование реакции ферментом достигалось при следующих условиях: величина рН 0,2 М карбонатного буфера составляла 9,7; концентрация НСТ – 25 мкМ; адреналина – 57,5 мкМ (рис. 5, кривые 2 и 3). Скорость реакции в контрольной пробе (без СОД) должна составлять 0,02-0,03 ед.опт.пл/мин. Такая же скорость реакции регламентируется при работе с супероксид-генерирующей системой ксантин/ксантинооксидаза и НСТ [13]. Необходимо отметить, что регистрация образования адrenoхрома проводится в более жёстких условиях: 0,2 М карбонатный буфер, рН 10,5-10,6 и концентрация адреналина 0,23 мМ.

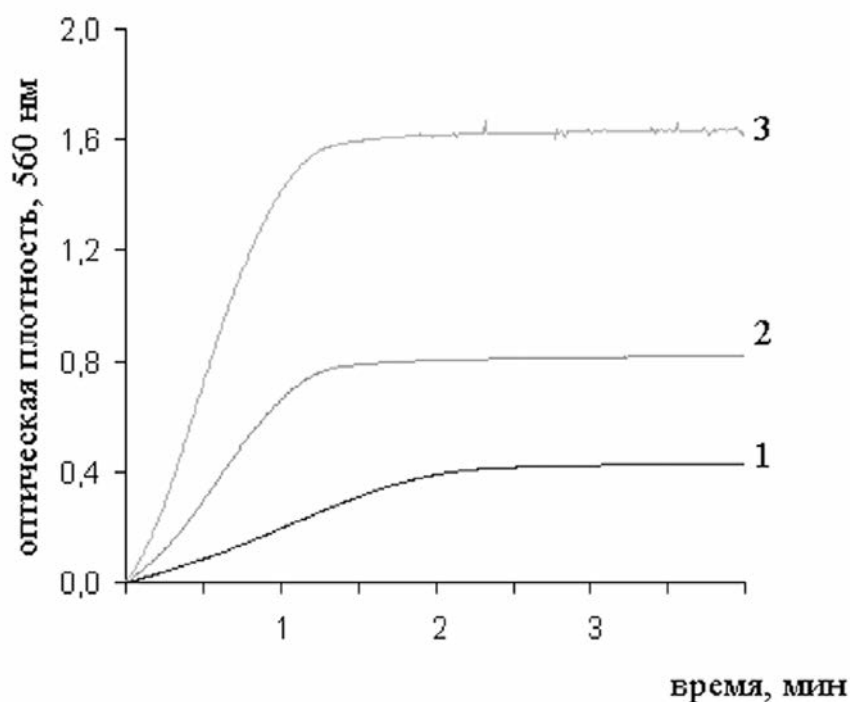


Рисунок 4.

Кинетические кривые восстановления НСТ, добавленного в разных концентрациях к реакции автоокисления адrenalина: 1 - 25 мкМ; 2 - 50 мкМ; 3 - 100 мкМ. Измерения проводили при длине волны 560 нм в 0,2 М карбонатном буфере, pH 10,5, в присутствии 0,23 мМ адrenalина. Условия проведения реакции как на рисунке 2.

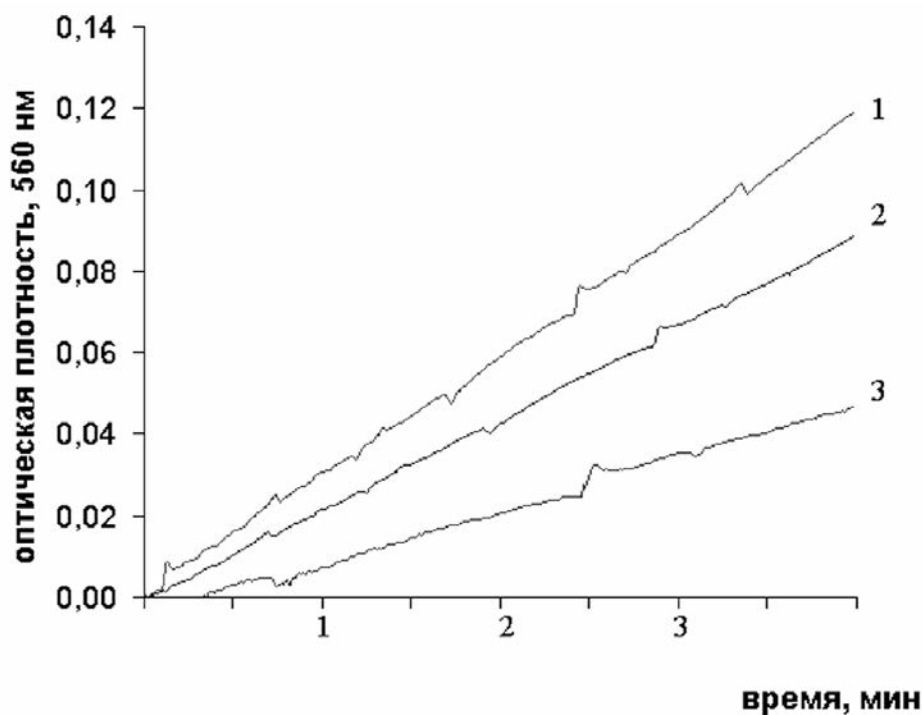


Рисунок 5.

Действие разных концентраций СОД на автоокисление адrenalина: 1 - контроль - в отсутствии СОД; 2 - 0,7 мкг белка/мл; 3 - 1,18 мкг белка/мл. Условия проведения реакции: 0,2 М карбонатный буфер, pH 9,7; 57,5 мкМ адrenalин; 25 мкМ НСТ, температура 26°C.

В таблице представлены данные по исследованию действия различных веществ с антиоксидантными свойствами и гемолизата цельной крови человека, как источника эритроцитарной СОД, на автоокисление адреналина в присутствии НСТ. Показано, что использованные в разной концентрации препараты цистеина, сульфата меди и гемолизата крови человека ингибируют образование диформаза. В опытах с аскорбиновой кислотой получен интересный результат, который требует дальнейшего самостоятельного исследования. Следует отметить, что в присутствии аскорбиновой кислоты ингибируется только стадия инициации цепной реакции – появляется выраженный лаг-период. Задержка во времени развития реакции, наличие лаг-периода, зависит от концентрации добавленной аскорбиновой кислоты. Кривая кинетики автоокисления адреналина в присутствии аскорбиновой кислоты имеет выраженный нелинейный характер. По продолжительности этого лаг-периода можно судить об ингибирующем действии аскорбиновой кислоты. После завершения лаг-периода, скорость окисления адреналина становится соизмеримой с контрольной реакцией (в отсутствии аскорбиновой кислоты).

Таблица. Действие различных химических веществ и гемолизата цельной крови человека на реакцию автоокисления адреналина в присутствии НСТ. Представлена величина относительной активности. Условия реакции см. “Методика”.

Исследуемые препараты	Добавка (мкМ или мкл цельной крови/мл)	Относительная активность (%)
Нет	-	100
Цистеин	1,0	90,6±7,1
	2,5	83,4±1,5
	5,0	75,0±3,1*
	10,0	45,7±1,5*
	20,0	41,2±4,4*
CuSO ₄	2,5	90,3±10,6
	5,0	81,5±6,5
	10,0	62,8±7,9**
	20,0	42,9±2,9**
	50,0	3,4±0,86**
Гемолизат крови	0,5	72,1±3,1
	1,0	68,8±2,9
	1,5	67,6±1,9 [#]
	2,5	61,8±0,59 [#]
	5,0	39,1±0,53 [#]

Примечание: * - $p < 0,005$ - достоверность различий относительно добавки 1,0 мкМ цистеина;
 ** - $p < 0,002$ - достоверность различий относительно добавки 2,5 мкМ CuSO₄;
 # - $p < 0,02$ - достоверность различий относительно добавки 0,5 мкл ц.крови/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Исследуя реакцию автоокисления адреналина, установлены три возможности для регистрации происходящего процесса и использование их как методических подходов для определения активности СОД и выявления антиоксидантных свойств изучаемых соединений. На рисунке 6 представлена обобщающая схема предлагаемых подходов. В процессе окисления адреналина и превращения его в адренохром высвобождающиеся электроны как от адреналина, так и от его промежуточных продуктов окисления ([ППОА] – промежуточные продукты окисления адреналина) поступают на кислород, растворенный в буфере, что и приводит к образованию супероксидных анионов (см. также рис. 1А). $O_2^{\bullet-}$ могут также участвовать в окислении адреналина. Все процессы превращения адреналина показаны на схеме стрелочками. На схеме также отмечены те участки реакции, которые предлагаются и используются автором как методические подходы для оценки активности СОД и выявления антиоксидантных свойств различных материалов. Можно проводить следующие измерения: 1) Образование адренохрома при 347 и 480 нм (спектрофотометрия); 2) Измерение образования восстановленного диформаза под действием $O_2^{\bullet-}$ из НСТ при длине волны 560 нм (спектрофотометрия); 3) Полярографическое измерение потребления кислорода из среды инкубации в процессе автоокисления адреналина, где кислород используется для образования $O_2^{\bullet-}$. СОД и веществами с антиоксидантными свойствами ингибируют эти процессы и степень их ингибирования можно оценить количественно, используя любой из представленных подходов. Самым высокочувствительным способом оценки СОД является вариант “адреналин и НСТ”, который позволяет наблюдать за процессом автоокисления адреналина при более низких значениях pH и меньших количествах адреналина и, соответственно, исследуемого материала. Как указано выше, адренохром – продукт окисления адреналина, образуется на конечной стадии реакции, в то время как супероксид генерируется на нескольких промежуточных этапах окисления адреналина (рис. 1). Очевидно, что его количество в пересчете на молекулу адреналина, в сравнении с адренохромом, образуется значительно больше, что и позволило “смягчить” условия проведения реакции.

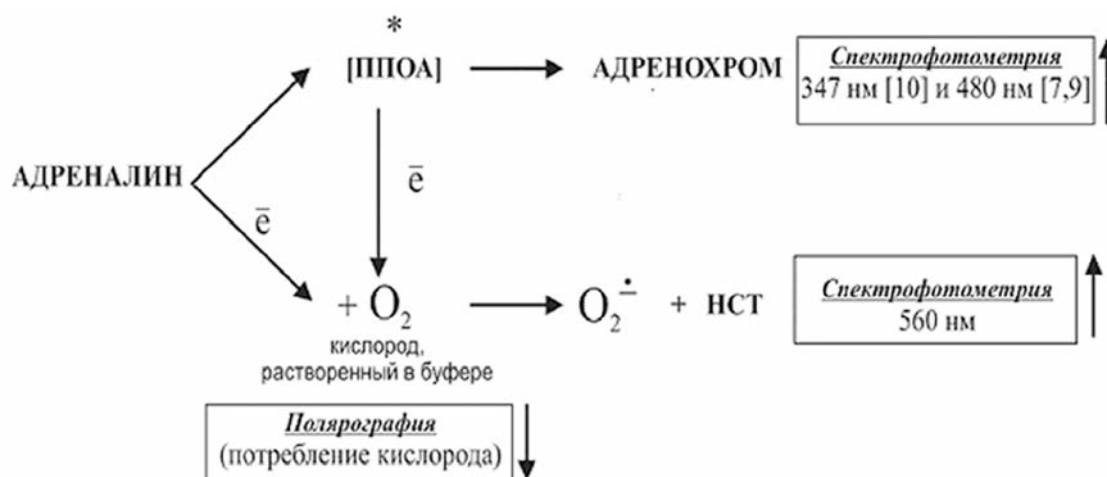


Рисунок 6.

Схема предлагаемых подходов к регистрации процесса хиноидного окисления адреналина (пояснения в тексте).

[ППОА]* - промежуточные продукты окисления адреналина - см. также рисунок 1А;

□ - возрастание оптической плотности при измеряемой длине волны;

↓ - убывание кислорода из среды инкубации.

Таким образом, введение НСТ в реакцию автоокисления адреналина позволило непосредственно измерить образование супероксидных анионов в этом процессе, оценить их поток в сравнении с интенсивностью образования адренохрома. Кроме того, использование НСТ для измерения активности СОД позволило снизить рН буфера и концентрацию адреналина, т.е. сделать условия более “мягкими”, что важно для выявления антиоксидантных свойств исследуемых материалов не устойчивых в щелочных условиях.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 08-04-00163-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колпаков В.Г. (1974) Ж. невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, **74**(8), 1254-1263.
2. Bindoli A., Rigobello M.P., Galzigna L. (1989) Toxicol. Lett., **48**, 3-20.
3. Marques F., Duarte R.O., Moura J.J., Bicho M.P. (1996) Biopl. Signals., **5**, 275-282.
4. Alhasan R., Njus D. (2008) Anal. Biochem., **381**(1), 142-147.
5. Costa V.M., Silva R., Ferreira L.M., Branco P.S., Carvalho F., Bastos M.L., Carvalho R.A., Carvalho M., Remião F. (2007) Chem. Res. Toxicol., **20**(8), 1183-1191.
6. Сирота Т.В. (2011) Биомед. химия, **58**, 77-87.
7. Misra H.P., Fridovich I. (1972) J. Biol. Chem., **247**, 3170-3175.
8. Bors W., Michel C., Saran M., Lengfelder E. (1978) Biochim. Biophys. Acta., **540**, 162-172.
9. Брусков О.С., Герасимов А.М., Панченко Л.Ф. (1976) Бюлл. exper. биол. мед., **81**(1), 33-35.
10. Сирота Т.В. (1999) Вопр. мед. химии, **45**, 263-272.
11. Сирота Т.В. (1999) Патент на изобретение №2144674. Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений.
12. Сирота Т.В., Мирошников А.И., Новиков К.Н. (2010) Биофизика, **55**, 990-995.
13. Щербатов А.Б., Иванов В.К., Сирота Т.В., Третьяков Ю.Д. (2011) Доклады РАН, **437**(2), 197-200.
14. Beauchamp C., Fridovich I. (1971) Anal. Biochem., **44**, 276-287.
15. Nishikimi N., Rao N.A., Yagi K. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun., **46**, 849-854.
16. Altman F.P. (1976) Progr. Histochem. Cytochem., **9**, 1-52.
17. Сирота Т.В., Сафронова В.Г., Амелина С.Е., Мальцева В.Н., Авхачева Н.В., Софин А.Д., Янин В.А., Мубаракишина Э.К., Романова Л.К., Новоселов В.И. (2008) Биофизика, **53**, 886-893.
18. Sirota T.V., Lange N.V., Kosjakova N.I., Vanichkin A.V., Kondrashova M.N. (2000) Current Top. Biophysics, **24**(2), 185-189.
19. Bielski B.H.J., Shiue G.G., Bajuk S. (1980) J. Phys. Chem., **84**(8), 830-833.
20. Эмануэль Н.М., Денисов Е.Т., Майзус З.К. (1965) Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе, М., Наука, с. 13, 203-204.
21. Денисов Е.Т., Саркисов О.М., Лихтенштейн Г.И. (2000) Химическая кинетика, М., Химия, с. 397-413.

22. *Vishnevsky E.L., Kondrashova M.N., Pushkar D.Y., Vishnevsky E., Demidov A.A., Sirota T.V., Temnov A.V., Khunderyakova N.V., Zakharchenko M.V., Kosyakova N.I.* (2003) *Mitochondrion*, **3**(2), 67-73.
23. *Сирота Т.В., Хундерякова Н.В., Кондрашова М.Н.* (2002) В сб.: *Биоантиоксидант*, Москва, сс. 527-528.

Поступила: 06. 04. 2011.

**USE OF NITRO BLUE TETRAZOLIUM IN THE REACTION
OF ADRENALINE AUTOOXIDATION FOR THE DETERMINATION
OF SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY**

T.V. Sirota

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul., 3, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia; tel.: (7)(4967) 739170;
e-mail: sirotatv@rambler.ru

Addition of nitro blue tetrazolium (NBT) into the reaction of adrenaline autooxidation allows to identify directly superoxide anion formation ($O_2^{\bullet-}$) in this superoxide-generating system. The kinetics of formation of adrenochrome and $O_2^{\bullet-}$ were compared under the same conditions. Three possible approaches to the use the adrenaline autooxidation reaction for determining the activity of superoxide dismutase (SOD) and revealing the antioxidant properties of various compounds are discussed. Two of these approaches have been described previously: the spectrophotometric method of the registration of adrenochrome, the final product of adrenaline autooxidation, at 347 nm (Sirota, 1999) and the polarographic method, based on determination of oxygen consumption for $O_2^{\bullet-}$ formation (Sirota, 2011). Here, a novel approach to this problem is presented; it consists in the spectrophotometric determination of $O_2^{\bullet-}$ using NBT. The application of this approach enables one to lower the pH of carbonate buffer from 10.5 to 9.7 and to decrease (4-fold) the amount of added adrenaline, i.e., to generate milder and more effective conditions for revealing and studying the antioxidant properties of examined materials.

Key words: adrenaline, nitro blue tetrazolium, adrenochrome, superoxide, oxygen, superoxide dismutase.