

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

СУПЕРОКСИДГЕНЕРИРУЮЩАЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ
НИКОТИНАМИДНЫХ КОФЕРМЕНТОВ *IN VITRO*

Т.В. Сирота*, М.В. Акуленко, Н.П. Сирота

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пушкино, Московская область, ул. Институтская, 3; *e-mail: sirotatv@rambler.ru

Обнаружены новые свойства никотинамидных коферментов (NAD, NADP, NADH, NADPH): супероксидгенерирующая и антиоксидантная активности. Коферменты способны генерировать супероксид анионы ($O_2^{\bullet-}$), попадая в щелочную среду; и могут быть ловушками $O_2^{\bullet-}$, ингибируя процесс генерации в супероксидгенерирующих модельных системах, проявляя, таким образом, антиоксидантные свойства. Собственно, сам никотинамид, который является функциональной частью в молекуле кофермента в окислительно-восстановительных процессах, *in vitro* проявил только антиоксидантную активность. Антиоксидантные свойства были установлены и у аденозина, входящего в состав молекулы кофермента. Все эти свойства коферментов и их компонентов необходимо учитывать при использовании в научных исследованиях и медицине.

Ключевые слова: никотинамидные коферменты; NAD; NADP; NADH; NADPH; супероксид; нитросиний тетразолий

DOI: 10.18097/BMCRM00276

Сокращения: АФК – активные формы кислорода; НСТ – нитросиний тетразолий; АOA – антиоксидантная активность; СОД – супероксиддисмутаза.

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что основная функция никотинамидных коферментов (NAD, NADH, NADP, NADPH) заключается в их участии в разнообразных окислительно-восстановительных реакциях клетки. Редокс превращения коферментов связаны с никотинамидом, который в окисленных формах (NAD^+ и $NADP^+$) может принимать, а в восстановленных – отдавать гидрид-ион (H^-) (рис.1). Так функционируют коферменты как кофакторы оксидоредуктаз. Окислительно-восстановительный гомеостаз в клетке поддерживается парами NAD/NADH и NADP/NADPH; непосредственно при их

участии происходит процесс появления активных форм кислорода (АФК) и функционирование системы антиоксидантной защиты [1-5]. Нарушение баланса в этих реакциях приводит к энергетическому стрессу, окислительному стрессу и, в конечном итоге, к патологическим состояниям [1, 4, 5]. Участие никотинамидных коферментов установлено и в других клеточных процессах, таких как клеточная сигнализация, возрастные изменения и гибель клеток, а также в функционировании иммунных защитных систем организма [3-6]. Функции никотинамидных коферментов связаны, таким образом, с фундаментальными процессами в клетке и организме в целом.

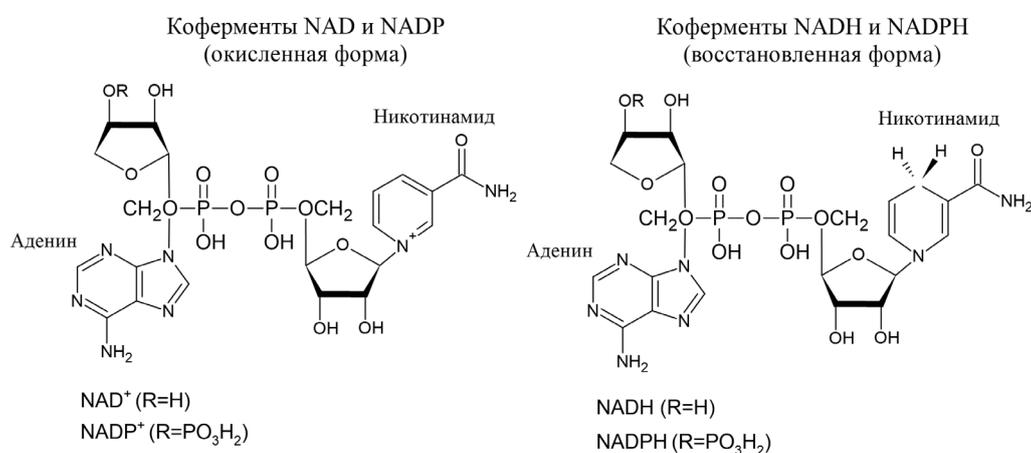


Рисунок 1. Структурные формулы окисленной и восстановленной формы коферментов.



Ранее мы обнаружили новое свойство никотинамидных коферментов: как окисленные, так и восстановленные формы коферментов способны генерировать супероксид в щелочной среде, т.е. они обладают супероксидгенерирующей активностью [7, 8]. Было известно, что NAD и NADP могут образовывать аддукты с различными ионами, в том числе и с гидроксильным анионом OH^- [9, 10], однако значение этого феномена с позиции АФК и понятия «супероксид», не обсуждалось. Нами предложен механизм этого феномена, который связан с молекулой никотинамида в составе кофермента, но он иной [8], отличный от окислительно-восстановительных реакций.

В настоящей работе представлены и другие свойства коферментов: в системе *in vitro* они проявляют также антиоксидантную активность (АОА).

Цель настоящей работы – продемонстрировать супероксидгенерирующую активность коферментов, учитывая ранее проведенные эксперименты [7, 8] и исследовать АОА этих соединений

МЕТОДИКА

Реактивы

В работе использовали следующие реактивы: никотинамид («AppliChem», Германия); NAD («Sigma», США; «Dia-M», Россия); NADPH, NADP, NADH («Reanal», Венгрия; «Sigma-Aldrich», США; «Fluka», Германия); СОД (superoxide dismutase, КФ 1.15.1.1, 3.35 units/мг белка, «Sigma»); ХО (xanthine oxidase, КФ 1.17.3.2), 0.3 units/мг protein («Sigma-Aldrich»); Na_2CO_3 , нитросиний тетразолий («Sigma»; «Dia-M»), NaHCO_3 («J. T. Baker», Голландия); фармакопейную форму 0.1% адреналина гидрохлорида Московского эндокринного завода.

Во всех экспериментах восстановленные формы пиридиннуклеотидов, NADH и NADPH, спектрально проверяли на наличие пика при длине волны 340 нм.

Кинетические исследования проводили на спектрофотометре UVIKON 923 Double Beam UV/VIS Spectrophotometer («Kontron instruments», Италия) в 1-см кювете в режиме «time Drive» при длине волны 560 нм в соответствующих буферных растворах при комнатной температуре или иной, указанной в подписях к рисунку. В работе также использовали спектрофотометр Specord UV/VIS («Carl Zeiss Jena», Германия).

Супероксидгенерирующую активность выявляли с использованием известного классического реагента НСТ (нитросиний тетразолий), применяемого для идентификации $\text{O}_2^{\bullet-}$. НСТ под действием образующегося супероксида восстанавливается до диформаза, который регистрируется при длине волны 560 нм [11]. В спектрофотометрическую кювету с буфером вносили исследуемые вещества, 0.075 мМ НСТ присутствовал во всех пробах. В экспериментах с NAD после записи кинетики реакции в течение 10 мин и последующих еще 10 мин содержимое кюветы переносили в пробирку с плотно закрывающейся пробкой, чтобы изолировать от кислорода воздуха, и оставляли на продолжительное время. Наблюдали появление или отсутствие окрашенных продуктов в опытной и соответствующих контрольных пробах.

Также для идентификации $\text{O}_2^{\bullet-}$ были проведены эксперименты с супероксиддисмутазой (СОД).

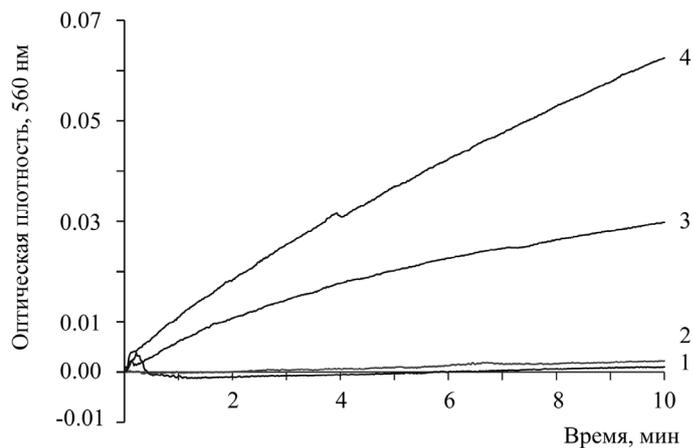


Рисунок 2. Кинетика образования диформаза в 0.2 М карбонатном буфере, pH 10.8, содержащем 0.075 мМ НСТ в присутствии: 1 - 1.5 мМ NAD и 2 - продолжение записи; 3 - 1.5 мМ NADH; 4 - 1.5 мМ NADP. Температура 22°C.

Антиоксидантную активность определяли с применением супероксидгенерирующей ферментативной системы ксантин-ксантиноксидаза [12] и супероксидгенерирующей модельной химической реакции автоокисления адреналина [13, 14]. Регистрировали образование диформаза. Способность исследуемых соединений ингибировать ксантин-ксантиноксидазную реакцию или процесс автоокисления адреналина оценивали как проявление АОА. Ксантин-ксантиноксидазную реакцию проводили, как описано [12]: в 50 мМ Na_2CO_3 буфере, pH 10.2, с 0.4 мМ ЭДТА, в присутствии 0.025 мМ НСТ и коммерческого препарата ксантиноксидазы, 11 мкг белка/мл. Реакцию начинали внесением 0.1 мМ ксантина. Реакцию автоокисления адреналина в щелочной среде проводили по протоколу, описанному ранее [13, 14.] Спектральные исследования проводили в 0.2 М карбонатном буфере (pH 10.6) в присутствии 0.05 мМ НСТ, реакцию начинали внесением 0.058 мМ адреналина. Время регистрации во всех измерениях составило 3-4 мин. Накопление диформаза оценивали по изменению оптической плотности в единицу времени и рассчитывали по формуле: $\Delta E/\Delta t = (E_t - E_0)/\Delta t$, где E_t – регистрируемая оптическая плотность при 560 нм сразу же после внесения адреналина; E_0 – оптическая плотность через время Δt , в течение которого регистрируется автоокисление адреналина. АОА выражали в условных единицах: 1% ингибирования = 1 усл.ед.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t критерия Стьюдента (программы Microsoft Excel): определяли среднее значение (M), стандартное отклонение (SD). Представленные графики являются конкретными экспериментальными кривыми из типичных многократно полученных при 4-6 параллельных измерениях в каждом опыте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Феномен наличия супероксидгенерирующей активности никотинамидных коферментов описан нами ранее [7, 8]. В настоящем исследовании представлены эксперименты, демонстрирующие это свойство (рис. 2)

Показана кинетика образования диформаза при участии NADH (кривая 3) и NADP (кривая 4). В присутствии

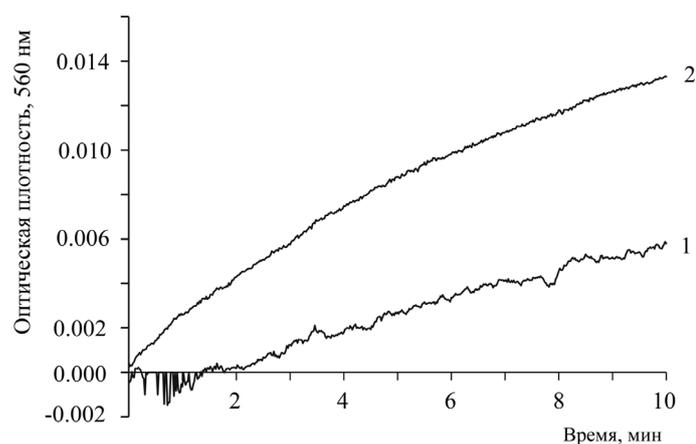


Рисунок 3. Влияние СОД на образование супероксида с участием 1 мМ NADH: 1- фермент, 0.92 мкг белка/мл, присутствует в 0.2 М карбонатном буфере, рН 11.35, содержащем 0.075 мМ НСТ; 2 – контроль: буфер и NADH.

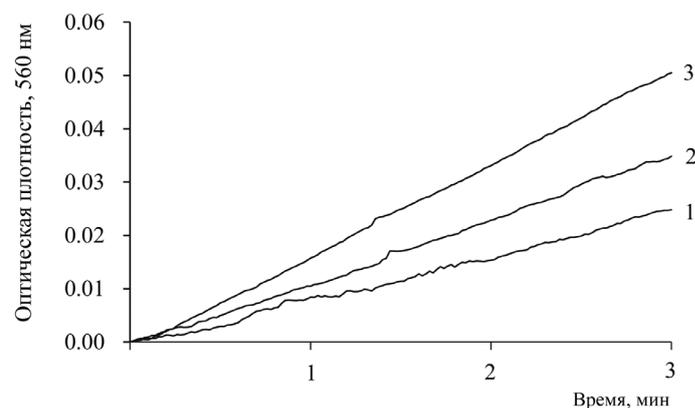


Рисунок 4. Влияние различных концентраций NADPH на кинетику образования диформаза в супероксидгенерирующей реакции ксантин-ксантинооксидаза: 1 – 1.0 мМ; 2 – 0.5 мМ; 3 – контроль. Условия измерения: 50 мМ карбонатный буфер, рН 10.2, содержащий 0.4 мМ ЭДТА, 0.1 мМ ксантин, 0.025 мМ НСТ, ксантинооксидаза 11 мкг белка/мл. Температура 19°C.

NAD диформаза не регистрируется в течение 20 мин (кривая 1 и 2) и требуется значительно большее время для его выявления. Как описано в разделе «Методика», после записи кинетики этой пробы, содержимое кюветы переносили в пробирку и через некоторое время видели появление окрашенного продукта. Такой же результат наблюдали и ранее [7].

На рисунке 3 показано: СОД ингибирует процесс генерации супероксида, что указывают на образование именно $O_2^{\bullet-}$ (кривая 1). Наблюдается появление лаг периода в продолжение 2 мин, и через 4 мин ингибирующий эффект составлял приблизительно 75 %.

Для существования супероксида и его идентификации необходима щелочная среда. При создании таких условий и была обнаружена супероксидгенерирующая активность исследуемых соединений. Щелочные условия используют в различных методиках для регистрации $O_2^{\bullet-}$ [7, 8, 12-16]. В обнаруженном феномене донором электрона является именно сама молекула кофермента, которая способна образовывать аддукты с гидроксильным анионом OH^- буфера. В результате такого взаимодействия происходит образование $O_2^{\bullet-}$. Механизм процесса описан в нашем исследовании [8]. В обзорных статьях, где обсуждаются

различные системы генерации супероксида [6, 17], никотинамидные коферменты не рассматриваются.

Установленные прооксидантные свойства коферментов предполагают проявление ими и антиоксидантной активности, поскольку окислительно-восстановительные процессы в биологических системах сопряжены и происходят при участии определенных соединений, таковыми и являются коферменты. Используя модельные супероксидгенерирующие системы, было проведено исследование антиоксидантных свойств коферментов. Применяли две супероксидгенерирующие модели: ферментативная реакция ксантин-ксантинооксидаза [12] и химическая реакция автоокисления адреналина в щелочной среде, моделирующая процесс хиноидного окисления катехоламинов в организме [14-16]. Ингибирование генерации супероксида оценивали как АОА.

На рисунке 4 показана кинетика реакции накопления диформаза в присутствии 1.0 и 0.5 мМ NADPH (кривые 1 и 2) в реакции ксантин-ксантинооксидаза; ингибирующий эффект составлял 53% и 32% соответственно.

В этой же супероксидгенерирующей системе исследованы и другие соединения (табл. 1).

Таблица 1. Антиоксидантная активность исследуемых соединений в супероксидгенерирующей ферментативной реакции ксантин-ксантинооксидаза.

Вещества	Концентрация, мМ	Скорость, (Допт.плот., 560 нм/мин)	АОА, усл.ед.
Контроль	-	0.0178 ± 0.0011	-
NADPH	1.0	0.0096 ± 0.0017*	42.8 ± 9.8
NADP ⁺	1.0	0.0016 ± 0.0005*	91.3 ± 2.1
	0.25	0.0037 ± 0.0015*	79.5 ± 3.5
NADH	1.0	0.0090 ± 0.0013*	54.1 ± 6.2
	2.0	0.0071 ± 0.0015*	60.8 ± 3.2
Никотинамид	1.0	0.0103 ± 0.0014*	37.7 ± 3.7
	2.0	0.0039 ± 0.0016*	77.6 ± 4.2
Аденозин	1.0	0.0121 ± 0.0013*	45.2 ± 3.81
СОД (0.46 мкг/мл)		0.0019 ± 0.0001*	89.3 ± 1.2

Примечание. Условия реакции: 50 мМ Na-карбонатный буфер, рН 10.2, содержащий 0.4 мМ ЭДТА; 0.025 мМ НСТ, 0.1 мМ ксантин, ксантинооксидаза 11 мкг белка/мл; * достоверное различие р относительно контроля: $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$.

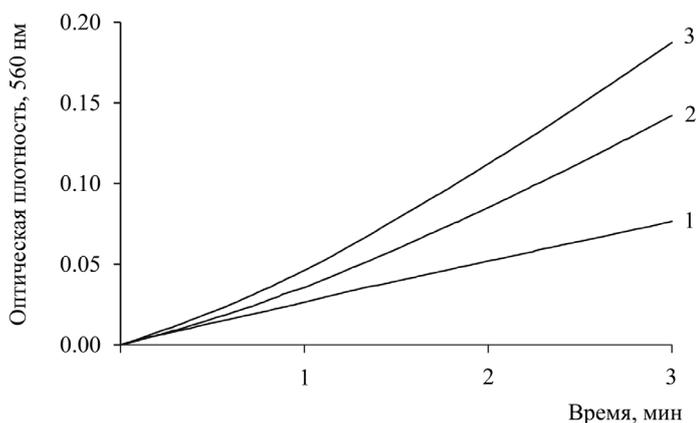


Рисунок 5. Сравнение антиоксидантного действия NADH и NAD на кинетику образования диформаза в реакции автоокисления адреналина: 1 – 1.0 mM NADH; 2 – 1.0 mM NAD; 3 - контроль. Условия реакции: 0.2 M карбонатный буфер, pH 10.6; 0.05 mM HCT, 0.058 mM адреналин. Температура 20°C.

В таблице 1 представлены результаты определения АОА: скорость реакции образования диформаза и рассчитанная АОА (см. раздел «Методика»). Кроме коферментов были исследованы вещества, которые как компоненты входят в состав молекулы кофермента (рис.1), никотинамид и аденозин. Установлено, что все соединения достоверно ингибируют процесс генерации супероксида. Наибольшим антиоксидантным эффектом, сравнимым с СОД, обладал NADP (1 mM); наблюдался и выраженный концентрационный эффект. В той же концентрации восстановленная форма кофермента NADPH была менее эффективна. Несколько иным было действие NADH: увеличение концентрации NADH от 1 mM до 2 mM не приводило к усилению ингибирования. Антиоксидантные свойства выявлены у никотинамида и аденозина, которые, как было показано ранее [7, 8], не обладали супероксидгенирующей активностью.

Некоторые коферменты были исследованы и в другой супероксидгенирующей модельной системе – реакция автоокисления адреналина в щелочной среде, которая известна как цепная реакция и используется для выявления и исследования антиоксидантных свойств различных препаратов [13-16].

На рисунке 5 показано сравнение ингибирующего действия NADH (кривая 1) и NAD (кривая 2). Восстановленный кофермент сильнее ингибирует генерацию супероксида, 60% и 28%, соответственно.

На рисунке 6 демонстрируется ингибирующее действие различных концентраций NADH в этой же реакции; представлены величины рассчитанной АОА кофермента.

Установлено, что коферменты ингибируют генерацию супероксида в модельных супероксидгенирующих системах, т.е. являются антиоксидантами, т.е. ловушками $O_2^{\bullet-}$ (рис. 4-6, табл. 1). Такой же способностью обладают никотинамид и аденозин, входящие в состав молекулы кофермента (табл. 1). Супероксидгенирующую активность проявляют только коферменты, т.е. они прооксиданты (рис. 2 и [7, 8]), но таких свойств нет у аденозина, ADP, АТФ [7] и никотинамида [8].

Результаты настоящей работы раскрывают новые химические свойства коферментов: способность генерировать супероксиды в щелочной среде и быть

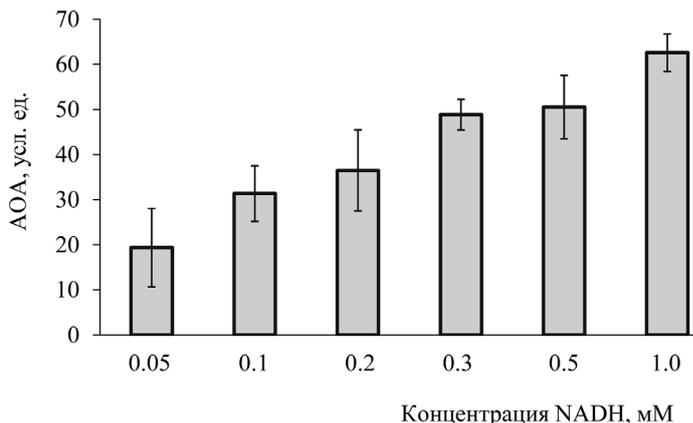


Рисунок 6. Антиоксидантная активность различных концентраций NADH. Условия измерения: 0.2 M карбонатный буфер, pH 10.6; 0.05 mM HCT, 0.058 mM адреналин. Температура 20°C.

ингибиторами в супероксидгенирующих системах. Таким образом, *in vitro* коферменты проявляют супероксидгенирующую и антиоксидантную активность и их можно считать бифункциональными биомолекулами. В литературе описываются различные способы генерации супероксид-анионов: химические, ферментативные, биологические, техногенные и др. [6, 17], но нет примеров с участием коферментов. В нашем исследовании показано, что коферменты способны генерировать супероксид путем образования аддуктов с ионами среды и через химическое изменение собственной молекулы. Можно предположить, что в клетке, в органеллах (например, митохондриях), где физиологическая температура существенно выше, чем в экспериментах *in vitro*, при локальных изменениях pH может появляться $O_2^{\bullet-}$ как неконтролируемый химический реагент. Возможно, что таким образом молекула кофермента и именно через pH способна самостоятельно участвовать в клеточной сигнализации, а при избытке супероксида в среде выполнять и роль антиоксиданта. Наличие антиоксидантной способности этих соединений также показано в настоящей работе.

В литературе активно обсуждается возможность применения коферментов и их компонентов в терапевтических целях [3, 6, 18-23]; также отмечается важность способа их доставки [3, 23]. Проведенные исследования предполагают, что NAD может использоваться как терапевтическое средство при ишемических и травматических повреждениях мозга, при неврологических расстройствах опосредованных PARP-1 [3, 18-20, 22, 23]. Применяется интраназальный способ доставки лекарства [3, 23]. При лечении экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита животным вводили препарат внутривентриально и сделан вывод об эффективном и перспективном средстве лечения иммунных заболеваний и рассеянного склероза [20, 23]. NAD улучшил лечение регулируя SIRT1 путем ингибирования сигнального пути PI3K/Akt/mTOR [22]. Получены перспективные результаты с применением NAD в моделях, где с целью замедления процесса старения задействованы сиртуины [22-23]. Использовали ключевой предшественник NAD никотинамидмононуклеотид (NMN) для лечения в клеточной модели болезнь Паркинсона [21].

Необходимо отметить, что, вероятно, как перспективный путь в лечении и профилактике заболеваний, следует искать пути регуляции биосинтеза коферментов в организме

и/или использование их предшественников. Такой подход мы рекомендовали и ранее [24]. В экспериментальных исследованиях с использованием коферментов как лекарственных препаратов необходимо учитывать их свойство – способность генерировать супероксид в щелочной среде и быть антиоксидантом.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Н.Е. Ляминой за техническую помощь в проведении экспериментов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-00223-25-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Koju, N., Qin, Z., Sheng, R. (2022) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in redox balance and diseases: a friend or foe? *Acta Pharmacologica Sinica*, **43**, 1889–1904. DOI: 10.1038/s41401-021-00838-7
2. Kirsch, M., Groot, H. (2001) NAD(P)H, a directly operating antioxidant? *FASEB J.*, **15**(9), 1569-1574. DOI: 10.1096/fj.00-0823hyp
3. Ying, W. (2006) NAD⁺ and NADH in cellular functions and cell death. *Front. Biosci.*, **11**, 3129–3148. DOI: 10.2741/2038
4. Ray, P.D., Huang, B.W., Tsuji, Y. (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.*, **24**(5), 981–990. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008
5. Schieber, M., Chandel, N.S. (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.*, **24**(10), R453-462. DOI: 10.1016/j.cub.2014.03.034
6. Andrés, C.M.C, Pérez de la Lastra, J.M., Andrés Juan, C., Plou, F.J., Pérez-Lebeña, E. (2023) Superoxide anion chemistry - its role at the core of the innate immunity. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**(3), 1841. DOI: 10.3390/ijms24031841
7. Sirota, T. (2023) Superoxide generation by nicotinamide coenzymes. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **6**(1), e00188. DOI: 10.18097/BMCRM00188
8. Sirota, T.V. (2024) Superoxide generating activity of nicotinamide coenzymes. *Biophysics*, **69**, 18–24. DOI: 10.1134/S0006350924700039
9. Guilbert, C.C., Johnson, S.L. (1971) Isolation and characterization of the fluorescent alkali product from diphosphopyridine nucleotide. *Biochemistry*, **10**(12), 2313-2316. DOI: 10.1021/bi00788a021
10. Metzler, D.E., Metzler, C.M. (2003) *Biochemistry: the chemical reactions of living cells*, 2nd Edition, Academic Press, New York, **1**, 1973 p.
11. Altman, F.P. (1976) Tetrazolium salts and formazans. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, **9**(3), 1-56. DOI: 10.1016/S0079-6336(76)80015-0
12. Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, **44**(1), 276-87. DOI: 10.1016/0003-2697(71)90370-8
13. Sirota, T.V. (2012) Use of nitro blue tetrazolium in the reaction of adrenaline autooxidation for the determination of superoxide dismutase activity. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **58**(1), 77-87. DOI: 10.1134/PBMC20125801077
14. Sirota, T.V. (2016) Standardization and regulation of the rate of the superoxide-generating adrenaline autoxidation reaction used for evaluation of pro/antioxidant properties of various materials. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **62**(6), 650-655. DOI: 10.1134/PBMC20166206650
15. Sirota, T.V., Sirota, N.P. (2022) On the Mechanism of Oxygen Activation in Chemical and Biological Systems. *Biophysics*, **67**(1), 1–7. DOI: 10.1134/S000635092201016X
16. Sirota, T.V. (2020) A chain reaction of adrenaline autoxidation is a model of quinoid oxidation of catecholamines. *Biophysics*, **65**, 548–556. DOI: 10.1134/S00063509200402
17. Hayyan, M., Hashim, M.A., AlNashef, I.M. (2016) Superoxide ion: generation and chemical implications. *Chem Rev.*, **116**(5), 3029-85. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00407
18. Ma, Y., Nie, H., Chen, H., Li, J., Hong, Y., Wang, B., Wang, C., Zhang, J., Cao, W., Zhang, M., Xu, Y., Ding, X., Yin, S.K., Qu, X., Ying, W. (2015) NAD⁺/NADH metabolism and NAD⁺-dependent enzymes in cell death and ischemic brain injury: current advances and therapeutic implications. *Curr. Med. Chem.*, **22**(10), 1239-1247. DOI: 10.2174/0929867322666150209154420
19. Kamal, S., Babar, S., Ali, W., Rehman, K., Hussain, A., Akash, M.S.H. (2024) Sirtuin insights: bridging the gap between cellular processes and therapeutic applications. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **397**, 9315–9344. DOI: 10.1007/s00210-024-03263-9
20. Wang, J., Zhao, C., Kong, P., Sun, H., Sun, Z., Bian, G., Sun, Y., Guo, L. (2016) Treatment with NAD(+) inhibited experimental autoimmune encephalomyelitis by activating AMPK/SIRT1 signaling pathway and modulating Th1/Th17 immune responses in mice. *Int. Immunopharmacol.*, **39**, 287-294. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.07.036
21. Lu, L., Tang, L., Wei, W., Hong, Y., Chen, H., Ying, W., Chen, S. (2014) Nicotinamide mononucleotide improves energy activity and survival rate in an in vitro model of Parkinson's disease. *Exp. Ther. Med.*, **8**(3), 943-950. DOI: 10.3892/etm.2014.1842
22. Wang, J., Song, X., Tan, G., Sun, P., Guo, L., Zhang, N., Wang, J., Li, B. (2021) NAD⁺ improved experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating SIRT1 to inhibit PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Aging (Albany NY)*, **13**(24), 25931-25943. DOI: 10.18632/aging.203781
23. Pollak, N., Dölle, C., Ziegler, M. (2007) The power to reduce: pyridine nucleotides--small molecules with a multitude of functions. *Biochem. J.*, **402**(2), 205-18. DOI: 10.1042/BJ20061638
24. Sirota, T.V. (2020) Effect of sulfur-containing compounds on the quinoid process of adrenaline autoxidation; Potential Neuroprotectors. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **65**(4), 316-323. DOI: 10.18097/PBMC20196504316

Поступила: 18.04.2025

После доработки: 19.05.2025

Принята к публикации: 22.05.2025

SUPEROXIDIZING AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF NICOTINAMIDE COENZYMES *IN VITRO****T.V. Sirota**, *M.V. Akulenko*, *N.P. Sirota***

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
3 Institutskaya str., Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia; *e-mail: sirotatv@rambler.ru

New properties of nicotinamide coenzymes (NAD, NADP, NADH, NADPH) have been discovered: superoxide-generating and antioxidant activities. Coenzymes are capable of generating superoxide anions ($O_2^{\bullet-}$), entering an alkaline environment; and can be $O_2^{\bullet-}$ traps, inhibiting the generation process in superoxide-generating model systems, thus exhibiting antioxidant properties. Actually, nicotinamide itself, which is a functional part in the coenzyme molecule in oxidation-reduction processes, showed only antioxidant activity *in vitro*. Antioxidant properties have also been found in adenosine, which is part of the coenzyme molecule. Thus, it has been established for the first time that coenzymes, according to their chemical properties, are bifunctional molecules. It is assumed that they participate in cellular signaling through the generation of superoxide and, in the case of excess superoxide in the environment, they can be antioxidants. All these properties of coenzymes and their components must be taken into account when used in scientific research and medicine.

Key words: nicotinamide coenzyme; NAD; NADP; NADH; NADPH; superoxide, nitroblue tetrazolium

FUNDING

The work was carried out within the framework of the State Assignment of ITEB RAS No. 075-00223-25-00.

Received: 18.04.2024, revised: 19.05.2025, accepted: 22.05.2025