

ГЕНЕРАЦИЯ СУПЕРОКСИДА НИКОТИНАМИДНЫМИ КОФЕРМЕНТАМИ

Т. В. Сирота

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

Никотинамидные коферменты в щелочной среде генерируют супероксидные радикалы ($O_2^{\bullet-}$), которые обнаруживаются присутствующим в буфере нитросиним тетразолием (НСТ) по регистрации продукта восстановления НСТ диформаза. Ингибирование образования диформаза происходит при добавлении в систему супероксиддисмутазы (СОД), что подтверждает возникновение $O_2^{\bullet-}$. Наиболее активная генерация происходит при использовании NADPH. При использовании NADP и NADH скорость генерации значительно снижена (приблизительно на 50%). При использовании NAD при тех же условиях и за то же время образование $O_2^{\bullet-}$ обнаружено не было, однако через 4 ч в этой же пробе был выявлен диформазан. Ряд активности, выстроенный по скорости генерации супероксида, имеет вид: NADPH > NADH \geq NADP > NAD. Другие исследованные вещества (аденозин, ADP и ATP) не обладали способностью генерировать супероксид даже на протяжении длительного времени. В клетке, где возможно локальное изменение pH среды, никотинамидные коферменты могут быть потенциальными источниками $O_2^{\bullet-}$ и, таким образом, участвовать в клеточной сигнализации. Изменение pH может инициировать этот процесс.

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

DOI: 10.18097/BMCRM00188

ВВЕДЕНИЕ

Роль супероксида, выполняющего регуляторную и сигнальную функцию в биологических системах, активно обсуждается в литературе [1-4]. Образование $O_2^{\bullet-}$, как известно, происходит при одноэлектронном восстановлении кислорода. Электроны в основном могут быть митохондриального происхождения и от NADPH-оксидазы [3].

Роль никотинамидных коферментов, как окисленных, так и восстановленных форм (NADP и NADPH, NAD и NADH) общеизвестна в энергетическом метаболизме. Окислительно-восстановительные процессы в живых системах происходят при непосредственном их участии. Возникло современное понятие и направление исследований – «редокс-состояние» клетки и организма в целом [5].

Относительно недавно открыты иные функции этих соединений, не связанные с окислительно-восстановительными реакциями: NAD и NADH участвуют в таких клеточных процессах, как регуляция гомеостаза кальция, гибель клеток и экспрессия генов [1, 6, 7]. Исходя из данных литературы и собственных исследований Weihaï делает предположение, что «NAD и NADH вместе с ATP и Ca^{2+} могут быть четырьмя фундаментальными компонентами жизни, которые могут существенно влиять почти на все основные биологические процессы», и обращает внимание, что «внеклеточный NAD может быть новой сигнальной молекулой» [6].

В настоящей работе установлено уникальное свойство исследованных соединений: NADPH, NADP, NADH и в меньшей степени NAD способны генерировать супероксиды

в модельной системе. В аэробных условиях в присутствии этих веществ кислород, диффузно растворенный в щелочном буфере, восстанавливается до супероксида. Чтобы зарегистрировать и выявить супероксид, как известно, следует продлить время его существования, для чего необходимы щелочные условия [8-10]. В супероксидгенерирующих реакциях, таких как ксантин-ксантиоксидаза, автоокисление адреналина, глюкоза-глюкозооксидаза [10], ФМС/NADH [11] применяются буферы с щелочным pH. Используя такие условия, мы впервые показали образование супероксид анионов при функционировании фермента глюкозооксидаза [10].

Поиск естественных биологических супероксидгенерирующих систем в организме – актуальная проблема. На практике также необходимы химические и биологические модели *in vitro* для выявления фермента супероксиддисмутазы (СОД), определения ее активности, а также для исследования анти/прооксидантных свойств различных материалов. Для этой цели могут быть использованы никотинамидные коферменты, способные генерировать $O_2^{\bullet-}$ в щелочной среде. В литературе это свойство никотинамидных коферментов не описано.

Особо следует отметить, что генерация супероксида в условиях проводимого эксперимента происходит в отсутствие такого вещества как феназинметасульфат (ФМС), который использовали в модели ФМС/NADH [11]. В работах [11-14] авторы, используя систему ФМС/NADH и нитросиний тетразолий (НСТ), пытались объяснить химизм процесса, приписывая важную роль ФМС, считая его главным источником и/или переносчиком электрона в процессе образовании супероксида [11-14]. Их взгляды



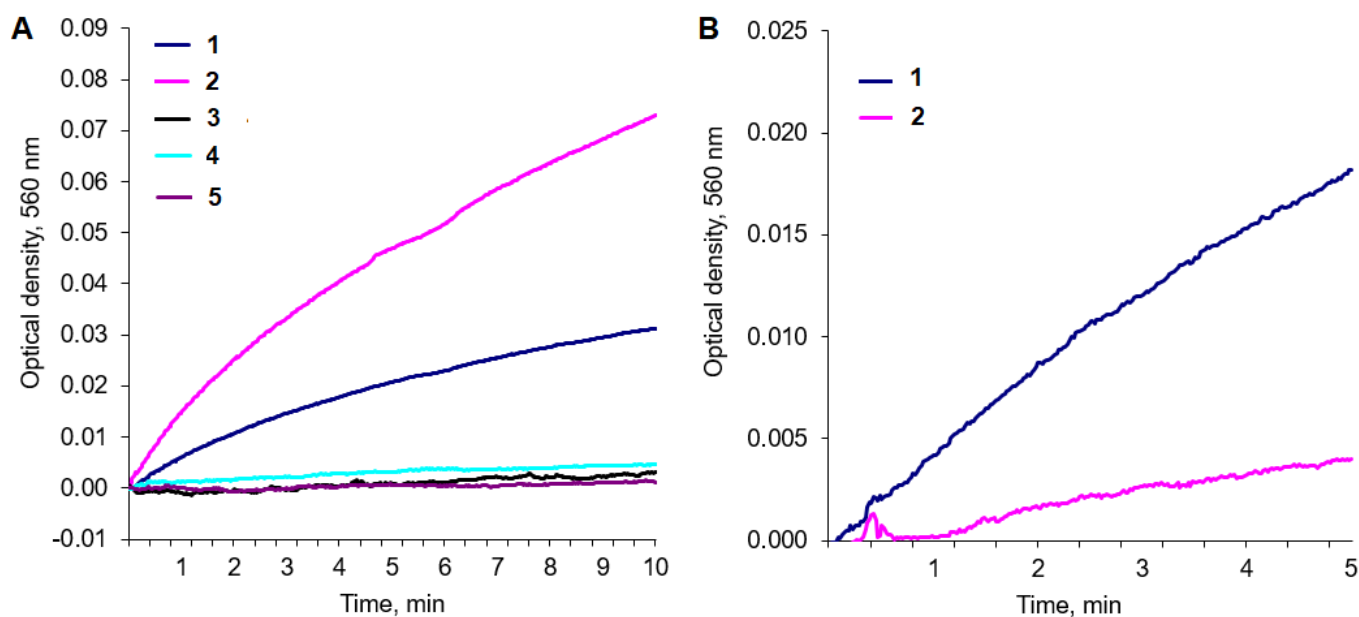


Рисунок 1. А – Кинетика образования диформаза в 0.2 М карбонатном буфере, pH 10.8, содержащем 0.075 мМ НСТ при участии 1.5 мМ соответствующего кофермента: 1 – NADPH, 2 – NADH. Контроли: в буфере нет НСТ и добавлены: 3 – NADPH, 4 – NADP; 5 – в буфере только НСТ и нет никотинамидных коферментов. **Б** – Действие СОД на генерацию супероксида при участии NADH: 1 – в буфер добавлен NADH; 2 – то же в присутствии СОД, 0.92 мкг белка/мл. Условия реакции, как на рис.1 А.

несколько различались, но основное место в применяемых схемах отводилось именно ФМС. В нашем исследовании ФМС не был использован, и генерация супероксида происходила при внесении в буфер только никотинамидного кофермента. Буфер содержал НСТ, необходимый для обнаружения супероксид анионов.

Вопрос – откуда «берутся» электроны, поступающие на кислород – остается открытым. Основным результатом настоящей работы – обнаружена способность никотинамидных коферментов создавать супероксид анионы.

МЕТОДИКА

Кинетические исследования

Кинетические исследования проводили на спектрофотометре UVIKON 923 Double Beam UV/VIS Spectrophotometer («Kontron instruments», Италия) в 1-см кювете в режиме «time Driver» в течение 5-10 мин при длине волны 560 нм в 0.2 М карбонатном буфере, pH которого задавали в диапазоне 10.55-11.3, при комнатной температуре. В буфер вносили никотинамидные коферменты NADPH, NADP, NADH, NAD или другие вещества в качестве контрольных образцов. НСТ присутствовал во всех пробах (0.075 мМ). В работе также использовали спектрофотометр Specord UV/VIS («Carl Zeiss Jena», Германия).

В некоторых экспериментах после записи кинетики реакции содержимое спектрофотометрической кюветы переносили в пробирки с плотно закрывающейся пробкой для изоляции от кислорода воздуха и оставляли на продолжительное время. Наблюдали появление или отсутствие окрашенных продуктов.

Супероксидгенерирующая активность исследуемых соединений представляли в виде скорости реакции, которую рассчитывали как изменение оптической плотности при длине волны 560 нм в единицу времени (за 1 мин) на

линейном участке кривой. В случае, если кинетика имеет гиперболический характер, брали для расчета начальный участок кривой. Выявленные различия активности исследуемых соединений сохранялись и в том случае, когда за интервал времени принимали 5 мин.

Реактивы

В работе использовали следующие реактивы: Na_2CO_3 , нитросиний тетразолий, ADP, ATP, аденозин, NAD («Sigma», США; Диа-М, Россия), NADPH, NADP, NADH («Reanal», Венгрия; «Sigma-Aldrich» Fluka, Германии); СОД (супероксиддисмутаз, КФ 1.15.1.1) («Sigma», США); NaHCO_3 («J. T. Baker», Голландия).

Восстановленные формы пиридиннуклеотидов, NADH и NADPH, спектрально проверяли на наличие пика при длине волны 340 нм.

Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t критерия Стьюдента (программы Microsoft Excel): определяли среднее значение (M), стандартное отклонение (s.d.) (данные таблицы 1). Представленные графики являются конкретными экспериментальными кривыми из типичных многократно полученных при 4-6 параллельных измерениях в каждом опыте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В отсутствии ФМС в щелочной карбонатный буфер, содержащий НСТ, добавили NADH, создав таким образом условия постановки контрольной пробы для супероксидгенерирующей системы ФМС/NADH, и вели спектрофотометрическую регистрацию при длине волны 560 нм. Такой эксперимент не был проведен в работе, где представлена система ФМС/NADH [11]. Было обнаружено

Таблица 1. Супероксидгенерирующая активность исследуемых соединений.

Вещества	Концентрация, мМ	Скорость, (Допт.пл., 560 нм/мин)	Примечания
NADPH	1.5	0.0163±0.0026	
NADP	1.5	0.0071±0.0011	
NADH	1.5	0.0070±0.0010	
NAD	1.5	Нет кинетики в течение 10 мин	Диформаза́н обнаружен через 4 ч
NADH	1.0	0.0046±0.0002	(см. также рис. 1Б, кривая 1).
NADH + СОД	1.0	0.0013±0.0002	СОД, 0.92 мкг/мл, см. рис. 1 Б, кривая 2
Аденозин	1.5	Нет кинетики в течение 10 мин	Нет диформаза́на (19 час)
ADP	1.5	Нет кинетики в течение 10 мин	Нет диформаза́на (19 час)
ATP	1.5	Нет кинетики в течение 10 мин	Нет диформаза́на (19 час)

Примечание. Условия реакции: 0.2 М карбонатный буфер, pH 10.8, 0.075 мМ НСТ, регистрация 10 мин. Скорость рассчитывали за первую минуту от начала регистрации (объяснения в разделе Методы).

нарастание оптической плотности и появление синевато-фиолетового окрашивания (рис. 1А, кривая 2). На рисунке 1А также показана более интенсивная кинетика генерации супероксида при использовании NADPH (кривая 1). В отсутствие НСТ при добавлении NADH или NADPH кинетика не была обнаружена, поскольку в пробе отсутствует индикатор, необходимый для идентификации супероксида (кривая 3 и 4). Нет кинетики (кривая 5) в контрольной пробе буфер + НСТ. Проведенные эксперименты показали, что скорость реакции зависела от величины pH буфера, температуры и концентрации кофермента. Были подобраны оптимальные условия для обнаруженного эффекта: прежде всего увеличили pH, а также исследовали диапазон концентраций кофермента (от 0.36 мМ до 1.5 мМ). Далее в оптимизированных условиях были проведены все последующие исследования, представленные на рисунке 1 и в таблице 1. На рисунке 1Б показано ингибирующее действие СОД в процессе накопления диформаза́на, что указывает на природу образующегося в этой системе радикала. NADH вызывал генерацию $O_2^{\bullet-}$, ингибирующее действие СОД составляло около 80% (рис. 1Б).

В этих же условиях были исследованы и другие коферменты, супероксидгенерирующая активность которых, определяемая по скорости образования диформаза́на, представлена в таблице 1. В соответствии с полученными результатами был выстроен ряд активности исследованных соединений: NADPH > NADH ≥ NADP > NAD.

Результаты, полученные для NAD, отличались: в течение 10 мин регистрации появление диформаза́на не было обнаружено. Однако содержимое кюветы, перенесенное в пробирку и плотно закрытое пробкой, через 4 часа экспозиции стало окрашенным, т.е. образовался диформаза́н ($E_{560 \text{ нм}} = 0.256$). Следовательно, генерация супероксида происходит и в присутствии NAD, только значительно медленнее. В ряд активности внесли и это соединение. Следует отметить, что супероксидгенерирующая активность NADH и NADP практически одинаковая.

Были также исследованы и другие вещества – аденозин, ADP и ATP, содержащие, как и никотинамидные коферменты, в составе молекулы аденин (6-аминопурин). Эти соединения не вызывали генерацию супероксида в течение 10-минутной регистрации и более продолжительного времени инкубации. Длительная 19-часовая экспозиция этих проб (буфер + вещество + НСТ) в закрытой пробирке не выявила цветных продуктов реакции. Оптическая плотность при длине волны 560 нм исследуемых образцов была: $E_{\text{Аденозин}} = 0.0001$;

$$E_{\text{ATP}} = 0.0001; E_{\text{ADP}} = 0.0001; E_{\text{NADH}} = 0.6200.$$

В экспериментах, результаты которых представлены на рисунках 2 и 3, была предпринята попытка установить, что происходит с коферментом в процессе образования супероксида, т.е. каким образом эти соединения выполняют функцию электронодатора, поставляя электрон на молекулярный кислород, растворенный в буфере, где и происходит одноэлектронное восстановление кислорода, согласно формуле (1):



На рисунке 2 показаны спектры восстановленных и окисленных NADPH и NADP (кривые 1 и 2 соответственно). Пик при 260 нм обусловлен наличием аденина, его присутствие характерно для всех никотинамидных коферментов (NAD, NADH, NADP и NADPH). Пик при 340 нм появляется только для восстановленных форм (NADH и NADPH), что обусловлено перестройкой пиридинового кольца: исчезает одна двойная связь и кольцо приобретает хиноидный характер (кривая 1). На рисунке 3 представлены спектры продуктов реакции после 10-минутной регистрации кинетики NADPH и NADP в щелочном буфере. Кривая 1 – это продукты NADP, кривая 2 и 3 – продукты NADPH до и после разведения дистиллированной водой 1:1 соответственно. Разведение позволило увидеть пик при длине волны 340 нм (кривая 3). Широкий спектр в области 560 нм (как описано в [15]) указывает на присутствие диформаза́на, а наличие пика при 340 нм – на сохранность молекулы восстановленного NADPH (рис. 3).

Таким образом, показано, что образование супероксид-анионов в аэробных условиях в щелочном карбонатном буфере наблюдается при использовании всех исследованных никотинамидных коферментов, однако скорость генерации $O_2^{\bullet-}$ различна. Наиболее интенсивная – при использовании NADPH. Важная особенность обнаруженного феномена – не требуется присутствие ФМС, в отличие от [11-14], где из никотинамидных коферментов был использован только NADH и только совместно с ФМС. В настоящей работе показано, что никотинамидные коферменты в щелочных условиях «сами» создают супероксид-анионы и источником электронов в этом процессе является, очевидно, собственно молекула кофермента, не зависимо от ее формы (окисленная или восстановленная). Вероятно, генерация $O_2^{\bullet-}$ связана со структурными перестройками молекулы вещества в щелочной среде в результате которых освобождаются

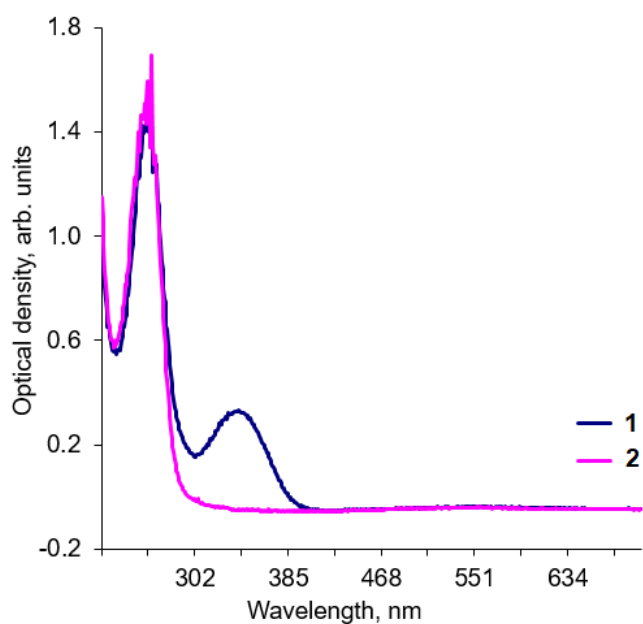


Рисунок 2. Спектры 0.1 mM NADPH (кривая 1) и 0.1 mM NADP (кривая 2) в бидистиллированной воде.

электроны, поступающие в буфер и на кислород (формула 1). Можно предположить, что пиридиннуклеотиды работают как кофакторы ферментов, превращая конкретный субстрат в продукт в окислительно-восстановительных реакциях. С коферментом происходят именно структурные изменения на уровне молекулы, а не химическое их превращение. Химические превращения вещества в продукт реакции происходят, к примеру, в таких супероксидгенерирующих системах, как ксантин-ксантиноксидаза и автоокисление адреналина [16], где происходит сопряженное образование супероксид анионов. В системе *in vitro* кофермент + буфер + НСТ нет субстрата как такового, и электроны на кислород поставляют именно коферменты, т.е. они и являются электронодонорами. Следует отметить, что стабильность окисленной и восстановленной форм никотинамидных коферментов зависит от pH среды. Восстановленная форма устойчива в щелочных растворах [17]. Это особенно важно в описанных экспериментах, поскольку исследования были проведены при щелочном pH, необходимом для существования супероксида.

Особенности обнаруженного феномена:

1. генерация активнее всего происходит при использовании NADPH;
2. восстановленные формы (NADPH и NADH) активнее, чем окисленные (NADP и NAD);
3. активность NADH практически сравнима с NADP.

Полученные результаты демонстрируют обнаруженное нами уникальное свойство исследованных соединений. Можно предполагать их возможное участие как сигнальных молекул в регуляции различных биологических процессов, действие которых опосредуется через образование $O_2^{\cdot-}$ при изменении pH среды.

Как может реализоваться в биологической системе обнаруженное свойство никотинамидных коферментов – быть электронодонорами для молекулярного кислорода, что и приводит к возникновению $O_2^{\cdot-}$ – требует дальнейшего исследования. Термин «электронодоноры» взят из обзорной статьи [18], посвященной супероксиду, в которой описаны различные способы генерации $O_2^{\cdot-}$ (химические,

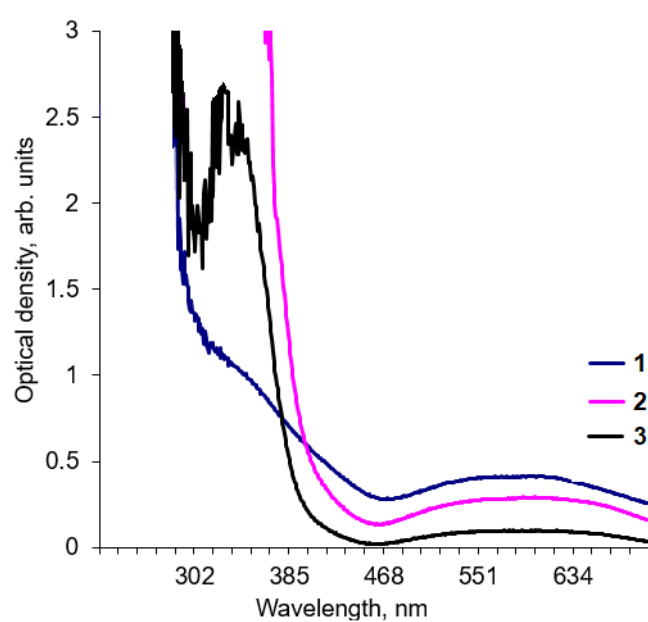


Рисунок 3. Спектры продуктов реакции после 10-минутного присутствия NADP и NADPH в 0.2 М карбонатном буфере, pH 11.3, содержащем 0.075 мМ НСТ: 1- продукты 1.5 мМ NADP; 2- продукты 1.5 мМ NADPH; 3 - после разведения бидистиллированной водой 1: 1 продуктов NADPH.

технологические на электродных поверхностях с применением в практике, биологические и др.), но нет информации о способности молекул никотинамидных коферментов создавать супероксиды. Выявленное нами свойство этих соединений в литературе из базы данных PubMed не описано.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружено новое свойство никотинамидных коферментов (NADPH, NADH, NADP и NAD) – их супероксидгенерирующая активность, проявляющаяся в щелочной среде. Интенсивность генерации зависит от концентрации вещества, температуры, и, что особенно важно, от величины pH. Изменения pH – регуляторный механизм многих биохимических процессов: активация или торможение активности ферментов, поддержание протонных мембранных градиентов с участием АТФ-аз и ионных обменников [19]. В настоящей работе показано, что никотинамидные коферменты при попадании в щелочную среду могут быть источником супероксидных радикалов: (NADPH, NADH, NADP, NAD) \rightarrow pH \uparrow \rightarrow $O_2^{\cdot-}$.

Ряд активности исследованных никотинамидных коферментов, выстроенный по скорости генерации супероксида, имеет вид: NADPH > NADH \geq NADP > NAD.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-01027-22-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ray, P. D., Huang, Bo-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
2. Zenkov, N.K., Kolpakov, A.R., Menshchikova, E.B. (2015) Keap1/Nrf2/are redox-sensitive system as a pharmacological target in cardiovascular diseases. *Sibirskii nauchnii meditsinskii zhurnal*, **35**(5), 5-25.
3. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39**(1), 44-84. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001
4. Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., Hekimi, S. (2018) Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology*, **217**, 1915-1928. DOI: 10.1083/jcb.201708007
5. Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis & Antioxidants Retrived November 16, 2021, from www.isanh.net
6. Weihai, Y. (2006) NAD⁺ and NADH in cellular functions and cell death. *Frontiers in Bioscience*, **11**, 3129 – 3148. DOI: 10.2741/2038
7. Pollak, N., Dölle, C., Ziegler, M. (2007) The power to reduce: pyridine nucleotides--small molecules with a multitude of functions. *The Biochemical journal*, **402**(2), 205-218. DOI: 10.1042/BJ20061638
8. Alhasan, R., Njus, D. (2008) The epinephrine assay for superoxide: Why dopamine does not work. *Analytical Biochemistry*, **381**(1), 142-147. DOI: 10.1016/j.ab.2008.06.030
9. Zenkov, N.K., Menshchikova, E.B. (1993) Activated oxygen metabolites in biological systems. *Uspechi sovremnoi biologii*, **113**(3), 286-296.
10. 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
11. Nishikimi, M., Appaji, N., Yagi, K. (1972) The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**(2), 849-854. DOI: 10.1016/s0006-291x(72)80218-3
12. Ponti, V., Dianzani, M.U., Cheeseman, K., Slater, T. F. (1978) Studies on the reduction of nitroblue tetrazolium chloride mediated through the action of NADH and phenazine methosulphate. *Chemico-Biological Interactions*, **23**(3), 281-291. DOI: 10.1016/0009-2797(78)90090-x
13. Picker, S.D., Fridovich, I. (1984) On the mechanism of production of superoxide radical by reaction mixtures containing NADH, phenazine methosulfate, and nitroblue tetrazolium. *Archives of Biochemistry Biophysics*, **228**, 155-158. DOI: 10.1016/0003-9861(84)90056-0
14. Rao, U. M. (1989) Source of superoxide anion radical in aerobic mixtures consisting of NAD[P]H, 5-methylphenazinium methyl sulfate and nitroblue tetrazolium chloride. *Free Radicals Biology and Medicine*, **7**(5), 513-519. DOI:10.1016/0891-5849(89)90027-0
15. Altman, F.P. (1976) Tetrazolium salts and formazans. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, **9**(3), 1-52. DOI:10.1016/s0079-6336(76)80015-0
16. Sirota, T.V. (2020) A chain reaction of adrenaline autoxidation is a model of quinoid oxidation of catecholamines. *Biophysics*, **65** (4), 548. DOI: 10.1134/S0006350920040223
17. *Spravochnik po biokhimii* (1971) (ed. F.L. Kalinin, V.P. Lobov, V.A. Zhidkov), pp. 320-322, Naukova Dumka, Kyiv.
18. Hayyan, M., Hashim, M.A., AlNashef, I.M. (2016) Superoxide ion: Generation and chemical implications. *Chemical Reviews*, **116**(5), 3029–3085. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00407
19. Berezhnov, A.V., Soutar, M.P., Fedotova, E.I., Frolova, M.S., Plum-Favreau, H., Zinchenko, V.P., Abramov, A. Y. (2016) Intracellular pH modulates autophagy and m itophagy. *The Journal of biological chemistry*, **291**(16), 8701- 8708. DOI: 10.1074/jbc.M115.691774

Поступила: 12.02.2023
 После доработки: 27.02.2023
 Принята к публикации: 01.03.2023

SUPEROXIDE GENERATION BY NICOTINAMIDE COENZYMES

T.V. Sirota

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics,
 ul. Institutskaya 3; Pushchino, 142290 Russia; *e-mail: sirotatv@rambler.ru

Nicotinamide coenzymes can generate superoxide radicals in alkaline environment. Their formation was registered by reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) present in the buffer with formation of diformazan. Inhibition of diformazan formation occurs when superoxide dismutase (SOD) is added to the system, thus confirming generation of O₂^{-•}. The highest superoxide generating activity was observed with NADPH. In the case of NADPH and NADH, the rate of superoxide generation was significantly lower (by approximately 50%). No O₂^{-•} was detected when NAD was used under the same conditions and in the same time; however, 4 h later, diformazan was detected in the same sample. The superoxide generating activity decreased in the following order: NADPH > NADH ≥ NADP > NAD. Other compounds tested (adenosine, ADP and ATP) did not generate superoxide radicals even after prolonged incubation. In a cell, where a local changes in the pH of the environment are possible, nicotinamide coenzymes can be potential sources of O₂^{-•} and thus participate in cell signaling. A change in pH can initiate this process.

Key words: superoxide; nitroblue tetrazolium; diformazan; nicotinamide coenzymes; NADPH; NADP; NADH; NAD

FUNDING

The work was carried out within the framework of the State assignment ITEB RAS No. 075-01027-22-00.

Received: 12.02.2023, revised: 27.02.2023, accepted: 01.03.2023