

СУПЕРОКСИДГЕНЕРИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ НИКОТИНАМИДНЫХ КОФЕРМЕНТОВ

© 2024 г. Т.В. Сирота*,#

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
ул. Институтская, 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: sirotatv@rambler.ru

Поступила в редакцию 17.01.2024 г.

После доработки 24.01.2024 г.

Принята к публикации 26.01.2024 г.

Показано, что никотинамидные коферменты (НАДФН, НАДН, НАДФ⁺, НАД⁺) способны генерировать супероксид-анионы (O₂^{•−}) в щелочной среде. Супероксидгенерирующая активность коферментов проявляется при высоком значении pH и чувствительна к СОД. Однако сам никотинамид, который является функциональной частью молекул коферментов, не обладает таким свойством. Проведенные полярографические исследования показали, что в присутствии коферментов наблюдается потребление молекулярного кислорода из буфера, т.е. происходит активация кислорода, связанная с образованием O₂^{•−}. На основании полученных результатов и литературных данных предложен механизм возникновения O₂^{•−} через путь образования аддуктов никотинамида, входящего в состав молекулы кофермента, и гидроксильных анионов (ОН[−]). Возможно, что в щадящих условиях в организме исследованные коферменты, выполняя свои основные функции, при необходимости могут генерировать и супероксид, т.е. быть сигнальными молекулами.

Ключевые слова: супероксид, никотинамидные коферменты, НАДФН, НАДН, НАДФ⁺, НАД⁺, никотинамид, нитросиний тетразолий, полярография, аддукты, гидроксильные анионы.

DOI: 10.31857/S0006302924010032, EDN: RIBSKI

Ранее нами было обнаружено, что никотинамидные коферменты НАДФН, НАДН, НАДФ⁺ и НАД⁺ как в восстановленной, так и в окисленной формах способны с разной эффективностью генерировать супероксид-анионы в щелочной среде [1]. Электронодонором в этом процессе, очевидно, является молекула кофермента. Необходимое условие — высокая величина pH. Однако для существования супероксида и его идентификации необходимы именно такие условия, которые и создаются в различных методиках для обнаружения O₂^{•−} [1, 2]. Используя такой подход, мы выявили образование супероксида в реакции «глюкоза—глюкозооксидаза» [2]. Таких данных в литературе не было и считалось, что продуктом реакции является только пероксид водорода. Мы показали, что в этой реакции может происходить и одноэлектронное восстановление молекулярного кислорода.

Обнаруженная супероксидгенерирующая активность коферментов в доступной литературе не описана; в обзорных статьях 2016 и 2023 гг., где перечисляются различные системы генерации супероксида, никотинамидные коферменты не представлены [3, 4].

Настоящая работа является продолжением наших исследований [1]. Феномен выявляется в щелочной среде, величина pH которой не может быть в условиях клетки и организма. Однако факт наличия такой активности дает возможность предположить, что в щадящих условиях, в живой системе, где физиологическая температура существенно выше, чем в экспериментах *in vitro*, процесс генерации O₂^{•−} может иметь место. Иные факторы, в том числе изменение pH, вероятно, может приводить к образованию супероксида молекулами коферментов в клетке.

НАД⁺ и НАДН, НАДФ⁺ участвуют во многих клеточных процессах, не связанных с окислительно-восстановительными реакциями [5–7]. В то же время способность этих соединений образовывать аддукты с различными ионами, в том

Сокращения: НСТ — нитросиний тетразолий, СОД — супероксиддисмутаза.

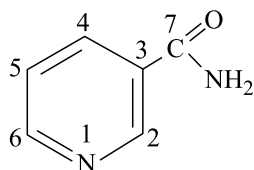


Рис. 1. Структурная формула никотинамида [9].

числе и с гидроксильным анионом OH^- , может иметь функциональное значение [8], но какое именно не обсуждается.

Известно, что функционально активная часть молекулы кофермента в окислительно-восстановительных реакциях — никотинамид (рис. 1) [9].

Химизм окислительно-восстановительного процесса с участием кофермента представлен на рис. 2.

Полученные в настоящей работе результаты показывают, что только никотинамидные коферменты, но не молекула никотинамида способны создавать супероксидные анион-радикалы. В предыдущей работе [1] было сделано предположение, что именно молекула кофермента и является электронодонором. Но был неясен механизм этого процесса, т.е. как это «работает».

Цель настоящего исследования — выяснить механизм супероксидгенирующей активности коферментов. Были проведены спектральные и полярографические исследования. Полученные результаты и литературные данные позволили

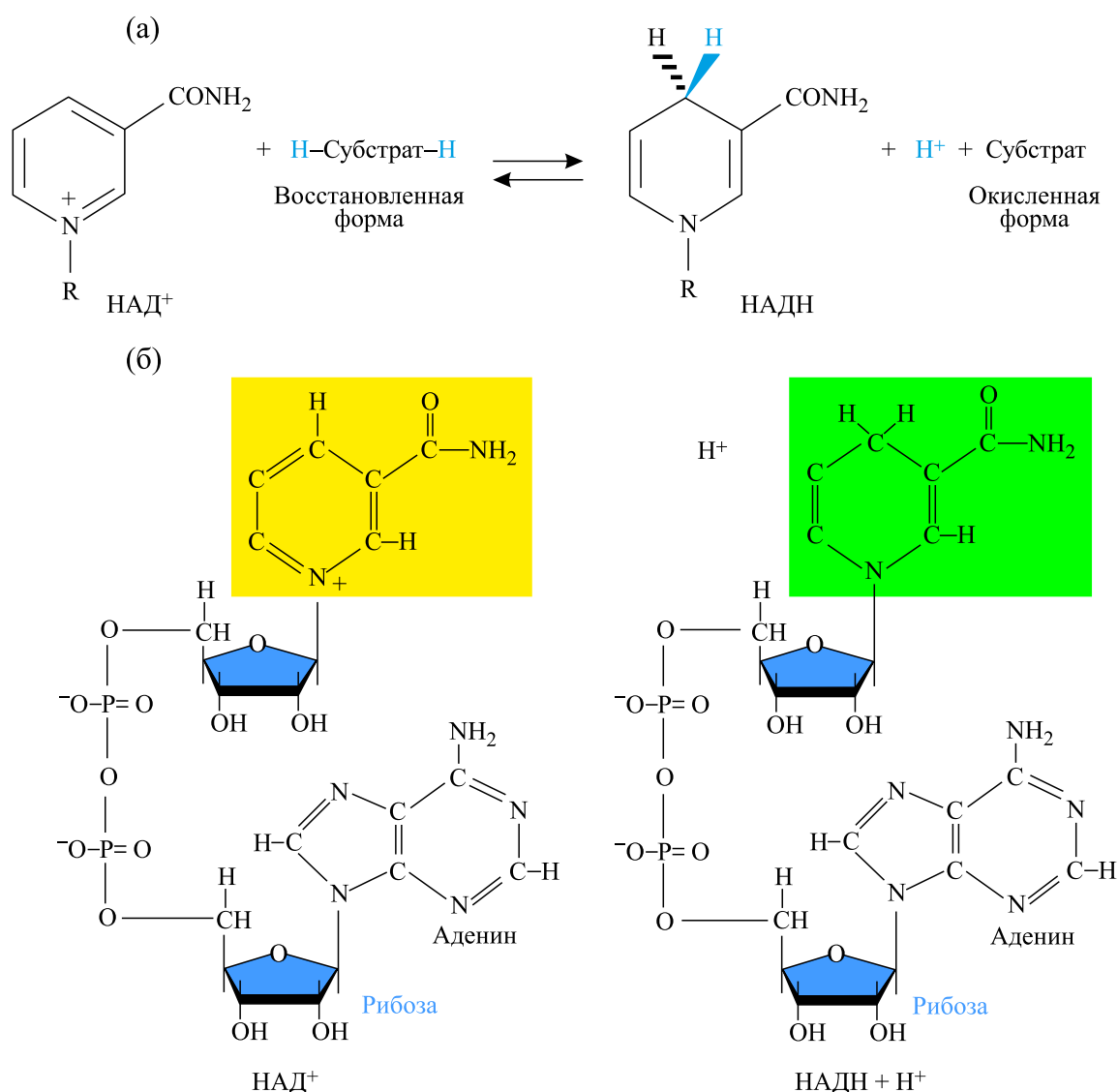


Рис. 2. (а) — Окислительно-восстановительный процесс с участием никотинамидных коферментов в общем виде; (б) — структурные формулы окисленной и восстановленной форм коферментов [9].

предположить механизм этого феномена и объяснить, почему обнаруженное свойство характерно как для восстановленных, так и для окисленных форм коферментов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кинетические исследования проводили на спектрофотометре UVIKON 923 Double Beam UV/VIS Spectrophotometer (Kontron instruments, Италия) в односантиметровой кювете в режиме time Driver в течение 5–10 мин при длине волны 560 нм в 0.2 М карбонатном буфере при заданных значениях pH, температура (комнатная или иная) указана в подписях. В работе также использовали спектрофотометр Specord UV/VIS (Carl Zeiss Jena, Германия) с компьютерной регистрацией. В буфер вносили исследуемые вещества: никотинамид, никотинамидные коферменты (НАДФН, НАДН, НАДФ⁺, НАД⁺). Нитросиний тетразолий (НСТ) в концентрации 0.05 или 0.075 мМ присутствовал во всех пробах. В некоторых экспериментах после записи кинетики реакции содержимое спектрофотометрической кюветы переносили в пробирки с плотно закрывающейся пробкой, чтобы изолировать от кислорода воздуха, и оставляли на продолжительное время. Наблюдала появление или отсутствие окрашенных продуктов.

Опыты с разной концентрацией коферментов проводили, используя пробы после записи спектров. Из этих проб, где в 2 мл воды находится вещество с заданной концентрацией, отбирали 1 мл раствора, вносили 0.05 мМ НСТ и добавляли 1 мл 0.2 М карбонатного буфера, pH 10.9. Регистрировали кинетику образования диформаза фотометрически при длине волны 560 нм и температуре 32°C. Таким образом, в кювете в 0.1 М карбонатном буфере находилась половина исследуемого вещества, которое присутствовало в кювете при регистрации спектра.

Супероксидгенирующую активность исследуемых соединений представляли как скорость реакции и рассчитывали изменение величины 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.

Полярмографические исследования проводили на установке с закрытым платиновым электродом Кларка в термостатированной кювете объемом 1 мл с фиксированной скоростью перемешивания при температуре 32°C. Использовалась система автоматической регистрации потребления

кислорода: АЦП и программное обеспечение. Условия проведения реакции такие же, как и в спектрофотометрических исследованиях с некоторой детализацией, указанной в подписях к рисунку. Для сравнения были поставлены эксперименты с супероксидгенирующей модельной системой автоокисления адреналина в щелочной среде. Реакцию проводили согласно протоколу, разработанному нами ранее [10] и описанному в работе [2], однако pH буфера поднимали до 10.9, как в спектрофотометрических экспериментах. Реакцию начинали внесением в кювету 0.23 мМ адреналина гидрохлорида. Также были поставлены опыты с сульфитом натрия (Na₂SO₃), который вносили в кювету в сухом виде на шпатель.

После полярмографической регистрации содержимое из кюветы переносили в пробирки с плотно закрывающейся пробкой и добавляли НСТ. Визуально наблюдали образование или отсутствие окраски.

Реактивы. В работе использовали следующие реактивы: никотинамид (Allichem, Германия); НАД⁺ (Sigma, США; «Диа-М», Россия); НАДФН, НАДФ⁺, НАДН (Reanal, Венгрия; Sigma-Aldrich, Fluka); СОД (супероксиддисмутаза, КФ 1.15.1.1, 3.35 units/мг белка, Sigma, США); Na₂CO₃, нитросиний тетразолий (Sigma, США; «Диа-М», Россия), NaHCO₃ (J. T. Baker, Голландия); фармакопейную форму 0.1% адреналина гидрохлорида Московского эндокринного завода. Сульфит натрия – отечественный препарат.

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

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что никотинамидные коферменты способны в щелочной среде генерировать супероксид-анионы. Согласно величине скорости генерации O₂^{•-} был представлен ряд активности этих соединений: НАДФН > НАДН ≥ ≥ НАДФ > НАД [1].

В настоящей работе продолжено исследование этого феномена. Важно было изучить поведение никотинамида, функционально активной части молекулы кофермента. На рис. 3 показаны полученные результаты. Никотинамид не проявил су-

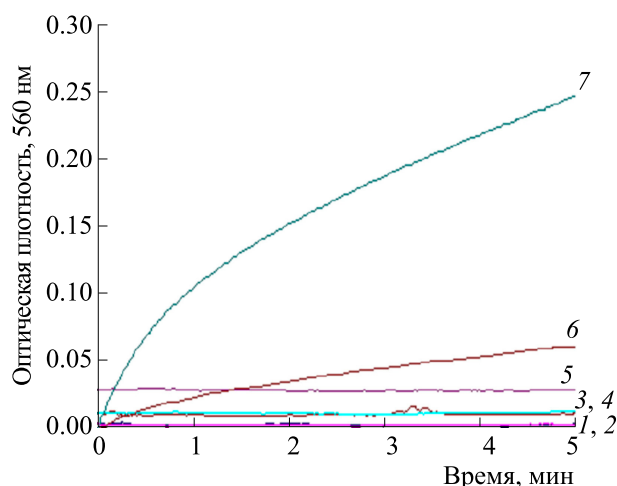


Рис. 3. Регистрация образования диформаза в присутствии никотинамида (кривые 1–5) и НАДФ⁺ (кривые 6 и 7) в 0.2 М карбонатном буфере, pH 10.6 или 11.3, содержащем 0.075 мМ НСТ, температура 20°C: 1 – 1.5 мМ никотинамида, pH 10.6; 2 – продолжение записи; 3 – 1.5 мМ никотинамида, pH 11.3; 4 – продолжение записи; 5 – 3 мМ никотинамида, pH 11.3; 6 – 0.5 мМ НАДФ⁺, pH буфера 11.3; 7 – 1.5 мМ НАДФ⁺, pH 11.3.

пероксидгенерирующую активность при pH 10.6 и 11.3, регистрация 5 мин и еще 5 мин (кривые 1 и 2, кривые 3 и 4), а также и при более высокой концентрации вещества – 3 мМ, pH среды 11.3 (кривая 5). В этих же условиях (при pH 11.3) в присутствии кофермента НАДФ⁺ в концентрациях 0.5 и 1.5 мМ (кривые 6 и 7) регистрировали образование диформаза, продукта восстановления НСТ. Пробы с никотинамидом, соответствующие записи кривых 1–5, были перенесены в пробирки на более продолжительную экспозицию (см. раздел «Материалы и методы»). В продолжении 20 ч не наблюдали образования цветной окраски, т.е. никотинамид не создает супероксиды.

Величина pH – необходимый параметр для проявления супероксидгенерирующей активности кофермента. Кинетика реакции образования $O_2^{\cdot -}$ в присутствии НАДФН при разных значениях pH показана на рис. 4, табл. 1 представлены данные рассчитанной скорости процесса.

На рис. 5 представлены результаты эксперимента с разными концентрациями НАДФН; постановка опыта детально описана в разделе «Материалы и методы», и процесс происходит при более высокой температуре (32°C). В этих условиях образование супероксида наблюдалось при более низких концентрациях кофермента.

На рис. 6 показано ингибирующее действие СОД на процесс генерации $O_2^{\cdot -}$ коферментом

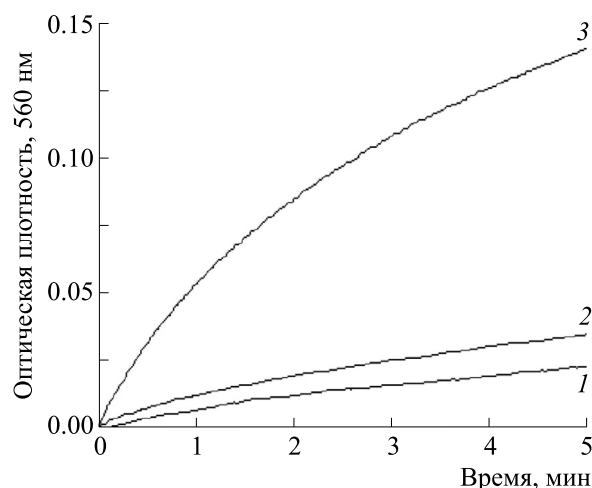


Рис. 4. Кинетика образования диформаза в присутствии 1.5 мМ НАДФН в 0.2 М карбонатном буфере, содержащем 0.075 мМ НСТ, при разных значениях pH: 1 – pH 10.6; 2 – pH 10.8; 3 – pH 11.3. Температура 21°C.

НАДФ⁺ (кривая 1). Скорость реакции в течение первой минуты снижается на 66.7%, и кинетика становится линейной в сравнении с контролем, где в пробе только буфер и НАДФ⁺ (кривая 2). Эффект СОД наблюдался и в предыдущих опытах с использованием НАДН [1].

Ранее нами было высказано предположение, что супероксидгенерирующая активность, очевидно, связана со структурными перестройками никотинамида в составе молекулы кофермента, что и приводит к высвобождению электрона, который далее используется для восстановления молекулярного кислорода [1]. Иначе говоря, донором электронов является именно молекула кофермента, сам же никотинамид, как показано выше (рис. 3), не способен «отдавать» электроны и генерировать $O_2^{\cdot -}$.

Мы провели полярографические исследования с целью «отследить» в присутствии кофер-

Таблица 1. Супероксидгенерирующая активность НАДФН при разных значениях pH

Величина pH	Скорость, ед. опт. пл. (560 нм)/мин
10.6	0.0046 ± 0.0004
10.8	0.0072 ± 0.0006
11.3	0.0290 ± 0.0014

Примечание. Условия реакции: 1.5 мМ НАДФН, 0.2 М карбонатный буфер, 0.075 мМ НСТ. Температура 21°C.

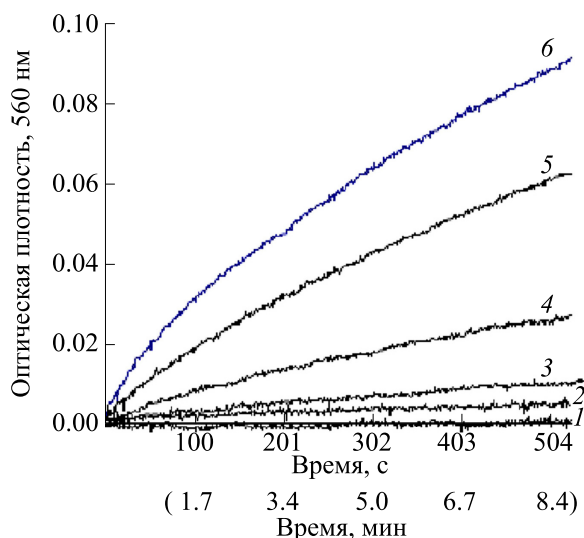


Рис. 5. Кинетика образования диформаза в присутствии разных концентраций НАДФН в 0.1 М карбонатном буфере, pH 10.9, содержащем 0.075 мМ НСТ: 1 – 0.00078 мМ; 2 – 0.00156 мМ; 3 – 0.00313 мМ; 4 – 0.00625 мМ; 5 – 0.0125 мМ; 6 – 0.025 мМ. Описание постановки опыта в разделе «Материалы и методы». Температура 32°C.

ментов поведение молекулярного кислорода, растворенного в буфере. Если действительно электрон поступает в буфер и «попадает» далее на кислород, то, как известно, происходит активация молекулярного кислорода, и должна наблюдаться его убыль из среды, что и регистрирует электрод Кларка. В супероксидгенирирующих системах, как нами показано ранее [2], такой процесс и происходит. На рис. 7 представлены полученные результаты. Как и ожидалось, мы увидели потребление молекулярного кислорода после внесения в буфер НАДН и НАДФН (кривые 2 и 3). Полученные результаты указывают, что действительно происходит активация кислорода. Добавка НСТ к пробам из полярографической кю-

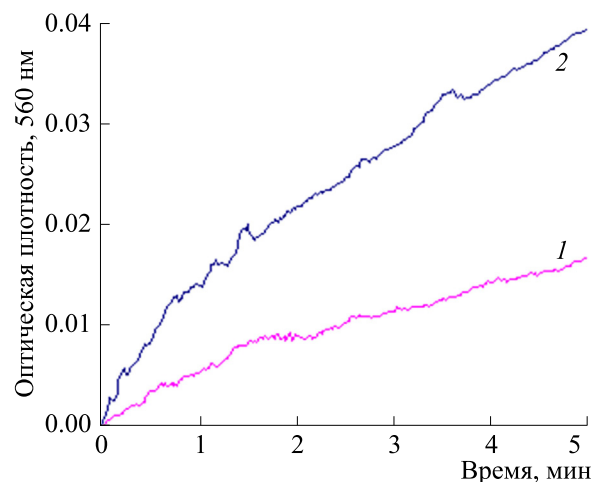


Рис. 6. Действие СОД на генерацию супероксида при участии НАДФ⁺: 1 – фермент, 0.92 мкг белка/мл, находится в 0.2 М карбонатном буфере, pH 11.2, содержащем 0.075 мМ НСТ; 2 – контроль: буфер и НАДФ⁺. Температура 31°C.

веты демонстрирует наличие цветной окраски образующегося диформаза (визуальные наблюдения), что указывает на образование $O_2^{\bullet-}$.

«Кислородные» эффекты коферментов сравнили с классической супероксидгенирирующей модельной системой автоокисления адреналина, которая хорошо изучена [2, 10–13]. На рис. 7 (кривая 4) показана полярографическая регистрация потребления кислорода при внесении в буфер адреналина. Регистрируется интенсивная убыль кислорода, и добавка в эту пробу НСТ вызывает образование большого количества диформаза, цветного продукта восстановления НСТ, который, как известно [14], плохо растворим, и потому наблюдаются как цвет, так и мощный осадок.

В качестве альтернативного контроля была поставлена проба с сульфитом натрия. Данное ве-

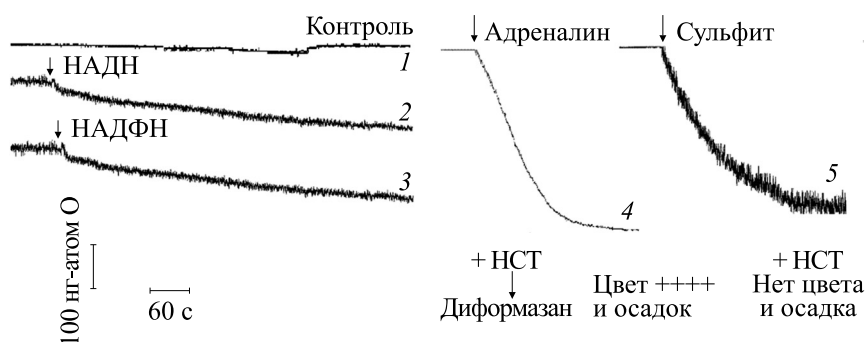


Рис. 7. Регистрация потребления кислорода при добавлении в 0.2 М карбонатный буфер, pH 10.9, следующих соединений: 2 – 8 мМ НАДН; 3 – 8 мМ НАДФН; 4 – 0.23 мМ адреналин; 5 – сульфит натрия. Кривая 1 – контроль, в кювете только буфер. Температура 31°C.

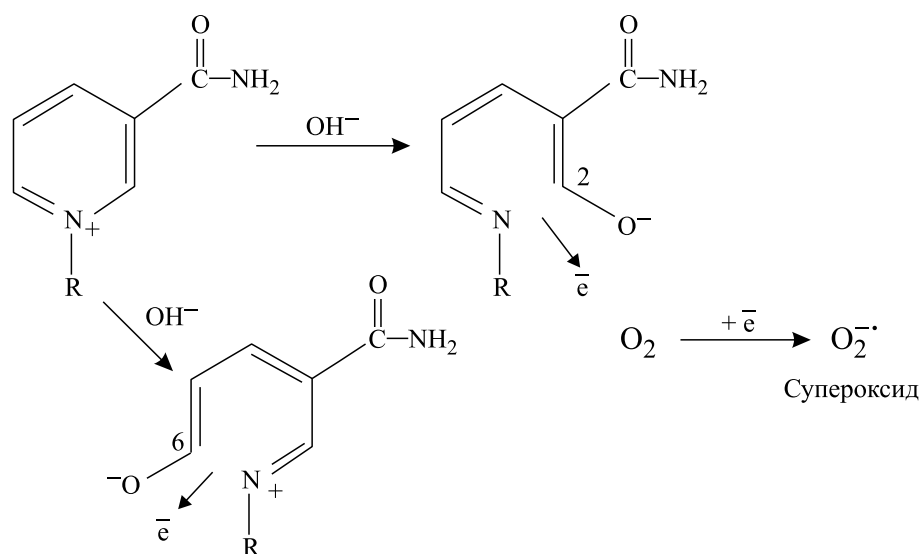


Рис. 8. Образование аддуктов пиридиннуклеотидами с гидроксильной группой OH^- (согласно работам [8, 15], с некоторыми изменениями). Объяснения в тексте.

щество используется для полного удаления кислорода из раствора. При добавлении его в буфер наблюдается мощное потребление кислорода (рис. 7, кривая 5); сульфит натрия вступает в химическую реакцию с кислородом, диффузно растворенным в буфере, образуя сульфат натрия. Внесение НСТ в эту пробу не выявляет цветного продукта, нет и осадка, т.е. $\text{O}_2^{\cdot -}$ не образуется.

Возникает вопрос — откуда берется электрон в экспериментах с коферментами, который восстанавливает молекулярный кислород с образованием супероксида и каков механизм этого феномена? Ответ был найден в литературных данных, где описана способность никотинамидных коферментов НАД^+ и НАДФ^+ образовывать аддукты в различных условиях [8, 15], в том числе и в присутствии гидроксильных анионов (OH^-). В работе [15] авторы показали, что же происходит в результате взаимодействия DPN (Diphosphopyridine Nucleotide — устаревшее название, современное название — NAD , НАД^+) и OH^- . Методами ИК-спектроскопии, УФ-флуоресценции и ЯМР были выделены и охарактеризованы щелочные продукты DPN. Сделан вывод: происходит разрыв никотинамидного кольца в молекуле кофермента в положении 2 и 6 (рис. 8). Необходимо отметить, что «судьба» кислорода не отслеживалась и речь о супероксиде не велась. Тема эта не обсуждалась.

Полученные результаты настоящего исследования и наши ранние данные [1] позволяют сообщить о новом свойстве никотинамидных коферментов — наличии супероксидгенерирующей активности; донором электронов в этом процессе,

очевидно, является никотинамид в молекуле кофермента, а механизм явления связан с высвобождением электрона при раскрытии никотинамидного кольца (рис. 8). Собственно, молекула никотинамида не в составе кофермента не обладает супероксидгенерирующей активностью. Вероятно, необходимо наличие других соединений, входящих в состав молекулы кофермента, а именно: аденина, рибозы и фосфата. Они, по-видимому, и облегчают раскрытие никотинамидного кольца, но при этом, очевидно, неважно, окисленная или восстановленная форма кофермента взаимодействует с OH^- . Представляемые в работе физико-химические процессы связаны не с окислительно-восстановительными превращениями никотинамида в составе кофермента, а исключительно с его иными структурными изменениями.

Следует отметить, что образование аддуктов никотинамидными коферментами возможно и с участием других анионов, например CN^- [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, обнаружена и впервые исследована уникальная способность никотинамидных коферментов генерировать $\text{O}_2^{\cdot -}$. В литературе этот феномен не описан. Механизм процесса связан, очевидно, с образованием аддуктов при участии кольца никотинамида и гидроксильного аниона OH^- среды. Возможно, благодаря этой способности через $\text{O}_2^{\cdot -}$ может выполняться сигнальная функция молекулы кофермента. Известно, что митохондрии и НАД(Ф)Н -оксидазы, главные источники супероксида в клетке [3, 4,

16], и, несмотря на наличие мощных антиоксидантных систем, именно они «поставляют» как вредные, так и полезные активные формы кислорода. Описанные в проведенной работе возможности коферментов предполагают их участие в образовании активных форм кислорода. Относительно простые химические соединения, «маленькие» молекулы, коферменты, а не биологические структуры, могут быть донорами электронов и неферментативно образовывать супероксиды, и они, эти супероксиды, не биологического происхождения. Этот химический путь образования супероксида с участием коферментов заслуживает особого внимания, поскольку коферменты имеют биогенное происхождение и их биосинтез происходит исключительно в организме. Реализация супероксидгенирующей способности коферментов в живой системе может быть предметом дальнейшего исследования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность сотрудникам ИТЭБ РАН В.А. Шлектарёву и Ф.И. Ильясову, а также В.С. Семёнову (ИБК РАН) за техническую помощь при работе с полярографической установкой и спектрофотометром, а также Н.Е. Ляминой (ИТЭБ РАН) за техническую помощь в проведении экспериментов и в подготовке публикации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-00224-24-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сирота Т. В. Генерация супероксида никотинамидными коферментами. *Biomed. Chem.: Research and Methods*, **6** (1), e00188 (2023). DOI: 10.18097/BMCRM00188
2. Сирота Т. В. и Сирота Н. П. К механизму активации кислорода в химических и биологических системах. *Биофизика*, **67** (1), 5–13 (2022). DOI: 10.31857/S000630292201001X
3. Naayan M., Hashim M. A., and Al Nashef I. M. Superoxide ion: generation and chemical implications. *Chem. Rev.*, **116** (5), 3029–3085 (2016). DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00407
4. Andrés C. M. C., Pérez de la Lastra J. M., Andrés Juan C., Plou F. J., and Pérez-Lebeña E. Superoxide anion chemistry – its role at the core of the innate immunity. *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (3), 1841, (2023). DOI: 10.3390/ijms24031841
5. Ray P. D., Huang Bo-W., and Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.*, **24** (5), 981–990 (2012). DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008
6. Weihai Y. NAD^+ and NADH in cellular functions and cell death, *Front. Biosci.*, **11**, 3129–3148 (2006). DOI: 10.2741/2038
7. Pollak N., Dölle C., and Ziegler M. The power to reduce: pyridine nucleotides-small molecules with a multitude of functions. *Biochem. J.*, **402** (2), 205–218 (2007). DOI: 10.1042/BJ20061638
8. Мешлер Д. *Биохимия: химические реакции в живой клетке* (Мир, М., 1980), т. 2, сс. 250–253.
9. http://vmede.org/sait/?page=15&id=Bioorganicheskaja_himija_tykavkina_2010&menu=Bioorganicheskaja_himija_tykavkina_2010
10. Sirota T. V. A novel approach to study the reaction of adrenaline autooxidation: a possibility for polarographic determination of superoxide dismutase activity and antioxidant properties of various preparations. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. B: Biomedical Chemistry*, **5** (3), 253–259 (2011). DOI: 10.1134/S1990750811030139
11. Сирота Т. В. Использование нитросинего тетразолия в реакции автоокисления адреналина для определения активности супероксиддисмутазы. *Биомедицинская химия*, **59** (4), 399–410 (2013). DOI: 10.18097/pbmc20135904399
12. Сирота Т. В. Цепная реакция автоокисления адреналина — модель хиноидного окисления катехоламинов. *Биофизика*, **65** (4), 646–655 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920040031
13. Misra H. P. and Fridovich I. J. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, **247** (10), 3170–3175 (1972).
14. Altman F. P. Tetrazolium salts and formazans. *Progr. Histochem. Cytochem.*, **9** (3), 1–56 (1976). DOI: 10.1016/S0079-6336(76)80015-0
15. Guilbert C. C. and Johnson S. L. Isolation and characterization of the fluorescent alkali product from diphosphopyridine nucleotide. *Biochemistry*, **10** (12), 2313–2316 (1971). DOI: 10.1021/bi00788a021
16. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., and Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39** (1), 44–84 (2007). DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001

Superoxide Generating Activity of Nicotinamide Coenzymes**T.V. Sirota***

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

It has been shown that nicotinamide coenzymes (NADPH, NADH, NADP^+ , NAD^+) are capable of generating superoxide anions ($\text{O}_2^{\cdot-}$) in an alkaline environment. The superoxide-generating activity of coenzymes is associated with high pH values and is sensitive to SOD. However, nicotinamide itself, being a functional part of coenzyme molecules, does not have this property. Polarographic studies have shown that in the presence of coenzymes, molecular oxygen is consumed from the buffer, namely oxygen activation occurs due to the formation of $\text{O}_2^{\cdot-}$. Based on the results obtained and in accordance with the literature, our observations suggest that the formation of adducts of nicotinamide, which is part of the coenzyme molecule, and hydroxyl anions (OH^-) may lead to the formation of $\text{O}_2^{\cdot-}$. Under mild conditions in the organism, the studied coenzymes, while performing their main functions, are expected to generate superoxide, meaning that they can be signaling molecules.

Keywords: superoxide, nicotinamide coenzymes, NADPH, NADH, NADP^+ , NAD^+ , nicotinamide, nitroblue tetrazolium, polarography, adducts, hydroxyl anions