

МОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НАДН НА УРОВЕНЬ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В УСЛОВИЯХ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ И ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Ю.А. Лысенко*, С.Ю. Земляная, М.А. Наквасина, В.Г. Артюхов

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 07.10.2024 г.

Аннотация. Целью настоящей работы явилось изучение модулирующего действия НАДН на степень фотосенсибилизированной метиленовым голубым (МГ) инактивации лактатдегидрогеназы, облученной ультрафиолетовым и красным светом. Методами спектрофотометрии и измерения каталитической активности исследованы оптические и функциональные характеристики лактатдегидрогеназы из мышц свиньи (ЛДГ; L-лактат: НАД⁺-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.27), облученной ультрафиолетовым (240÷390 нм; 151 Дж/(м²·мин))⁻¹ и красным (665 ± 15 нм; 20 мВт/см²) светом в присутствии сенсибилизатора – метиленового голубого – и кофактора – НАДН. Показано, что при УФ-облучении фермента в диапазоне доз 0,15÷2,27 кДж/м² в присутствии метиленового голубого (10⁻⁶ моль/л) НАДН (10⁻⁵ моль/л) проявляет фотопротекторное действие. Воздействие красного света индуцирует сенсибилизирующий эффект кофактора. Выявлено, что спектральные характеристики смеси метиленового голубого и лактатдегидрогеназы статистически значимо не отличаются от таковых для отдельных компонентов раствора.

Добавление НАДН (4·10⁻⁸ моль/л) к УФ-облучаемой ЛДГ не изменяет экспоненциальный характер фотомодификации белка, но индуцирует увеличение константы его УФ-инактивации, что указывает на сенсибилизирующее действие кофактора.

Показано, что НАДН в концентрации 10⁻⁵ моль/л оказывает фотопротекторное действие по отношению к изменениям уровня каталитической активности ЛДГ (10⁻⁸÷10⁻⁶ моль/л) при воздействии УФ-излучения (240÷390 нм) в дозах 0,15÷2,27 кДж/м² в присутствии метиленового голубого (10⁻⁶ моль/л).

При исследовании фоточувствительности ЛДГ (10⁻⁸ и 10⁻⁷ моль/л), облученной красным светом в присутствии метиленового голубого (10⁻⁶ моль/л), выявлен сенсибилизирующий эффект кофактора (10⁻⁵ моль/л) по отношению к молекулам ЛДГ. Полученные результаты расширяют теоретические представления о потенциальных механизмах, лежащих в основе процессов направленной регуляции функций ключевых ферментов клеточного метаболизма в условиях патологии и воздействия физико-химических факторов среды.

Ключевые слова: активные формы кислорода, каталитическая активность, лактатдегидрогеназа, метиленовый голубой, НАДН, УФ-излучение, фотодинамическое воздействие, фотоинактивация, фотопротектор, фотосенсибилизатор.

В настоящее время олигомерный белок – фермент терминальной стадии пути Эмбдена – Мейергофа – Парнаса – лактатдегидрогеназа (ЛДГ; L-лактат: НАД⁺-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.27) – исследуется на предмет использования в качестве одной из перспективных мишеней в рамках терапии онкозаболеваний: выявлено, что клетки ряда опухолей имеют повышенные уровни экспрессии и активности ЛДГ, и, соответственно, характери-

зуются высокой интенсивностью гликолиза (это связывают, например, с адаптацией к условиям гипоксии (анаэробный гликолиз) и/или к высоким скоростям пролиферации (аэробный гликолиз, эффект Варбурга)) [1–3]. Обсуждаются предположения об использовании критерия «высокий уровень активности ЛДГ» как маркера снижения эффективности противоопухолевого иммунитета [4]. Продукт катализируемой ЛДГ обратимой реакции восстановления пирувата – лактат – рассматривается в качестве стимулятора роста опухоли,

© Лысенко Ю.А., Земляная С.Ю., Наквасина М.А., Артюхов В.Г., 2024

так как повышение его локальной концентрации способствует инвазии и метастазированию неоплазмы, опухолевому ангиогенезу [3]. В связи с этим проводились многочисленные исследования в рамках решения вопроса о поиске и синтезе направленных ингибиторов каталитической активности ЛДГ, связывающихся с ферментом в области активного центра [5, 6], однако, полученные в условиях *in vitro* эффекты, как правило, плохо воспроизводились *in vivo*. Таким образом, ЛДГ по ряду причин считается мишенью, слабо поддающейся лекарственному воздействию, и, соответственно, представляется актуальным расширение исследований по выявлению потенциальных путей модуляции каталитической активности этого фермента при воздействии физико-химических факторов различной природы.

Одним из способов лечения ряда заболеваний, в том числе опухолевой этиологии, является фотодинамическая терапия, предполагающая использование веществ-сенситизаторов, к числу которых относится, в частности, тиазиновый краситель – метиленовый голубой (далее МГ) [7]. Проводятся исследования на предмет использования этого вещества для контроля уровня опухолевой оксигенации [8]; при метгемоглобинемии [9], септическом шоке [10], а также в ходе лечения нейродегенеративных заболеваний [11–14]. МГ – потенциальный модулятор окислительно-восстановительного статуса клетки, так как он обладает способностью обратимо присоединять электроны, донором которых могут выступать переносчики восстановительных эквивалентов клетки, например, НАД(Ф)Н [15, 16]. НАДН также является конформационным кофактором лактатдегидрогеназы. В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилось изучение модулирующего действия НАДН на степень фотосенсибилизированной метиленовым голубым инактивации лактатдегидрогеназы, облученной ультрафиолетовым (поглощение излучения ферментом, кофактором и сенситизатором) и красным светом (абсорбция квантов только красителем).

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования явился коммерческий препарат лактатдегидрогеназы из мышц свиньи, представляющий собой изоформу M_4 (другие обозначения: ЛДГ-5; LDHA, далее ЛДГ) в виде кристаллической суспензии в 2,2 моль/л сульфате аммония, предварительно обессоленный методом гель-проникающей хроматографии (Shephadex

G-50 fine; «Pharmacia», Швеция). Концентрацию растворов фермента определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм с использованием коэффициента молярной экстинкции $1,96 \cdot 10^5$ л(моль·см)⁻¹. Функциональную активность ЛДГ оценивали по скорости окисления НАДН, определяемой спектрофотометрически при 340 нм (конечные концентрации используемых при этом веществ составляли: Na-фосфатный буфер – 0,1 моль/л, pH 7,4; ЛДГ (буферный раствор) – 10^{-8} моль/л; пирuvat натрия (буферный раствор) – $1,5 \cdot 10^{-3}$ моль/л; НАДН (буферный раствор) – $5,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л [17]. Активность фермента выражали в мкмоль/мин по формуле: $A = (\Delta D_{340} V_0) / (\epsilon t)$, где $\Delta D_{340} = D_0 - D$; V_0 – объем реакционной смеси, л; ϵ – коэффициент молярной экстинкции НАДН при длине волны 340 нм, равный $6,22 \cdot 10^3$ л(моль·см)⁻¹; l – длина оптического пути кюветы – 1 см; t – время измерения – 0,5 мин. УФ-облучение исходных растворов производилось в кювете с двойными стенками для термостатирования (20 ± 1 °C) при постоянном перемешивании магнитной мешалкой. В качестве источника излучения использовали ртутно-кварцевую лампу типа ДРТ-400. Интегральный поток УФ-света (240–390 нм) выделяли при помощи светофильтра УФС-1. Объем облучаемых образцов составлял 3 мл; расстояние от оси лампы до объекта – 23 см; интенсивность облучения – 151 Дж(м²·мин)⁻¹. Источником света для фотосенсибилизированного окисления служило устройство «УЛОКС», изготовленное по лазерной технологии на основе трехкомпонентного твердого раствора галлия, мышьяка и алюминия. Длина волны максимума излучения – 665 ± 15 нм; диапазон излучения – 630–700 нм; выходная интенсивность излучения – 20 мВт/см². Источник располагался на расстоянии 3 см от образца. В качестве сенситизирующего агента применяли раствор метиленового голубого. Электронные спектры поглощения растворов ЛДГ и ее смеси с МГ регистрировали с помощью спектрофотометра СФ-46. Статистическую обработку данных осуществляли методами параметрической статистики. Обсуждаются статистически значимые отличия между измеряемыми показателями при уровне значимости 0,05.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

НАДН выступает в роли конформационного кофактора по отношению к молекуле лактатдегидрогеназы: присоединение этого лиганда к ее активному центру индуцирует изменение вторичной структуры фермента – частичную деспе-

рализацию и компактизацию белковой глобулы. Имеются данные о способности НАДН неспецифически акцептировать $^1\text{O}_2$ и другие активированные кислородные метаболиты [18]. Ранее нами было показано участие этих агентов в процессе УФ-индуцированной инактивации лактатдегидрогеназы [19]. Таким образом, введение НАДН в раствор ЛДГ до облучения может модулировать ее фоточувствительность.

Для получения более полной картины, описывающей взаимодействие света с изучаемым биополимером в присутствии низкомолекулярных соединений, представляется целесообразным исследовать зависимость эффекта фотоинактивации ЛДГ от времени УФ-облучения. Кинетический анализ позволяет вычислить количественные характеристики фотоинактивации белка, а именно: порядок реакции по концентрации компонентов, время полупревращения субстрата, константу скорости фотоинактивации.

Нами исследованы кинетические кривые фотоинактивации лактатдегидрогеназы (10^{-8} моль/л) в присутствии НАДН ($4 \cdot 10^{-8}$ и $4 \cdot 10^{-7}$ моль/л). На рис. 1 представлена зависимость остаточной ферментативной активности ЛДГ (A) от времени УФ-облучения в полулогарифмических координатах. Для количественного описания этого процесса использовали константы фотоинактивации (k_f), рассчитанные по тангенсу угла наклона линейной анаморфозы исходной кривой «доза – эффект» в координатах $[\ln(A/A_0); t]$, где A – текущее, а A_0 – контрольное (без облучения) значения каталитической активности фермента. Были получены следующие данные: УФ-облучение апобелка в диапазоне доз $0,00 \div 9,06$ кДж/м² ($0 \div 60$ мин) индуцировало падение его ферментативной активности (рис. 1, кривая 1). Константа фотоинактивации для свободной ЛДГ оказалась равной $3,6 \cdot 10^{-4}$ 1/с. Экспоненциальный характер фотоинактивации свидетельствует об отсутствии процессов реактивации УФ-модифицированного белка и позволяет отнести последовательность фотохимических реакций ЛДГ к категории мономолекулярных реакций первого порядка. Время полупревращения ЛДГ (период, в течение которого каталитическая активность белка уменьшается на 50 %) в этом случае составит: $t_{1/2} = \ln 2/k_f = 0,693/k = 286 \text{ с} = 21 \text{ мин}$.

При УФ-облучении фермента в присутствии НАДН ($4 \cdot 10^{-8}$ моль/л; рис. 1, кривая 2) экспоненциальный характер полученной кривой сохраняется, но константа фотоинактивации увеличивается до $5,3 \cdot 10^{-4}$ с⁻¹. Следовательно, при данном соотноше-

нии молекул белка и кофактора последний оказывает сенсibilизирующее воздействие на изменение каталитической активности лактатдегидрогеназы при ее УФ-облучении. Степень занятости активных центров лигандом составляет для данной концентрации приблизительно 1,0 %, то есть практически все молекулы НАДН находятся в системе в свободной форме. Возможно, в этом случае при поглощении молекулами кофермента квантов УФ-света генерируется фотопродукты, способные вступать во взаимодействие с молекулами ЛДГ, вызывая изменения структурно-функциональных характеристик последних.

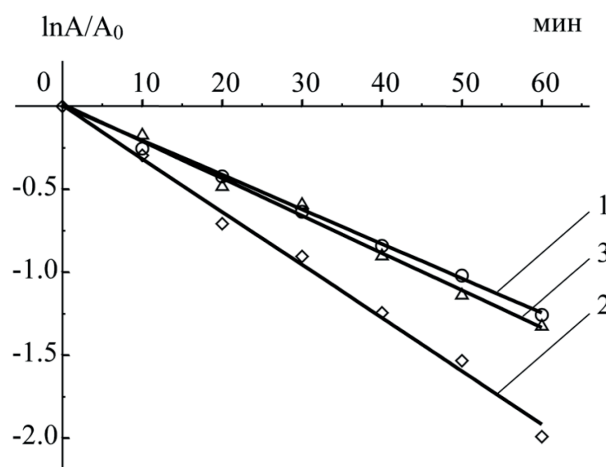


Рис. 1. Кинетические кривые УФ-инактивации ЛДГ (10^{-8} моль/л (1)) в присутствии НАДН ($4 \cdot 10^{-8}$ (2) и $4 \cdot 10^{-7}$ моль/л (3)): по оси ординат — натуральный логарифм отношения значений остаточной каталитической активности (A) к величине активности контрольного образца (без облучения; A_0); по оси абсцисс — время облучения, мин

Облучение лактатдегидрогеназы в комплексе с НАДН ($4 \cdot 10^{-7}$ моль/л) не сопровождается статистически значимыми изменениями степени инактивации фермента по сравнению с таковой для контрольной кривой (рис. 1, кривые 3 и 1 соответственно). Константа фотоинактивации в данном случае составляет $3,6 \cdot 10^{-4}$ с⁻¹. Таким образом, УФ-чувствительность фермента при этой концентрации кофактора статистически значимо не отличается от таковой для свободного биополимера.

Фотомодификация молекул белка может осуществляться не только вследствие непосредственного поглощения им квантов световой энергии, но и при добавлении в облучаемую систему экзогенных веществ — сенсibilизаторов, усиливающих повреждающее действие излучения и расширяющих спектр действия исходных компонентов. В этом качестве мы использовали катионный тиазиновый

краситель — метиленовый голубой (рис. 4), известный как эффективный генератор синглетного молекулярного кислорода [7, 20].

Спектральные характеристики данного вещества представлены на рис. 2. Это соединение примечательно тем, что может существовать в различных молекулярных формах: мономерной и агрегированной — димерной (при концентрациях выше 10^{-4} моль/л). Вероятно, молекулы МГ будут обладать различным фотосенсибилизирующим действием в зависимости от концентрации вещества и длины волны действующего излучения.

С целью подтверждения этого факта мы исследовали изменения каталитической активности ЛДГ в смеси с МГ после облучения образцов красным (абсорбция излучения лишь красителем) и ультрафиолетовым светом (поглощение квантов энергии как белком, так и экзогенным агентом).

Нами изучено влияние метиленового голубого (10^{-6} моль/л) и НАДН (10^{-5} моль/л) на кинетические кривые фотоинактивации УФ-облученной ЛДГ. На рис. 3 (I–III) представлена зависимость остаточной ферментативной активности ЛДГ, УФ-модифицированной в присутствии метиленового голубого и НАДН, от дозы облучения. Для фермента во всех использованных концентраци-

ях (10^{-8} – 10^{-6} моль/л) с увеличением дозы облучения наблюдается монотонное снижение каталитической активности. Однако направленность действия модификаторов при этом оказалась различной. Рис. 3 (Iб–IIIб) иллюстрирует изменения степени модифицирующего действия МГ и НАДН по отношению к ЛДГ, УФ-облученной в различных дозах. Фотосенсибилизирующий эффект МГ выражали разностью величин остаточной каталитической активности ЛДГ, облученной в свободной форме и в присутствии МГ.

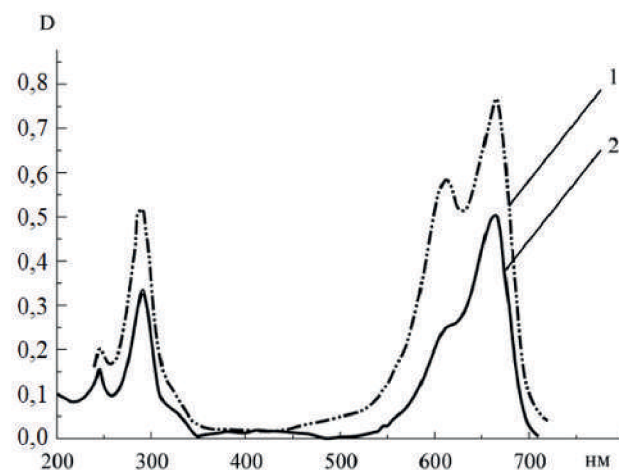


Рис. 2. Спектры поглощения водных растворов метиленового голубого (10^{-5} (1) и $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л (2))

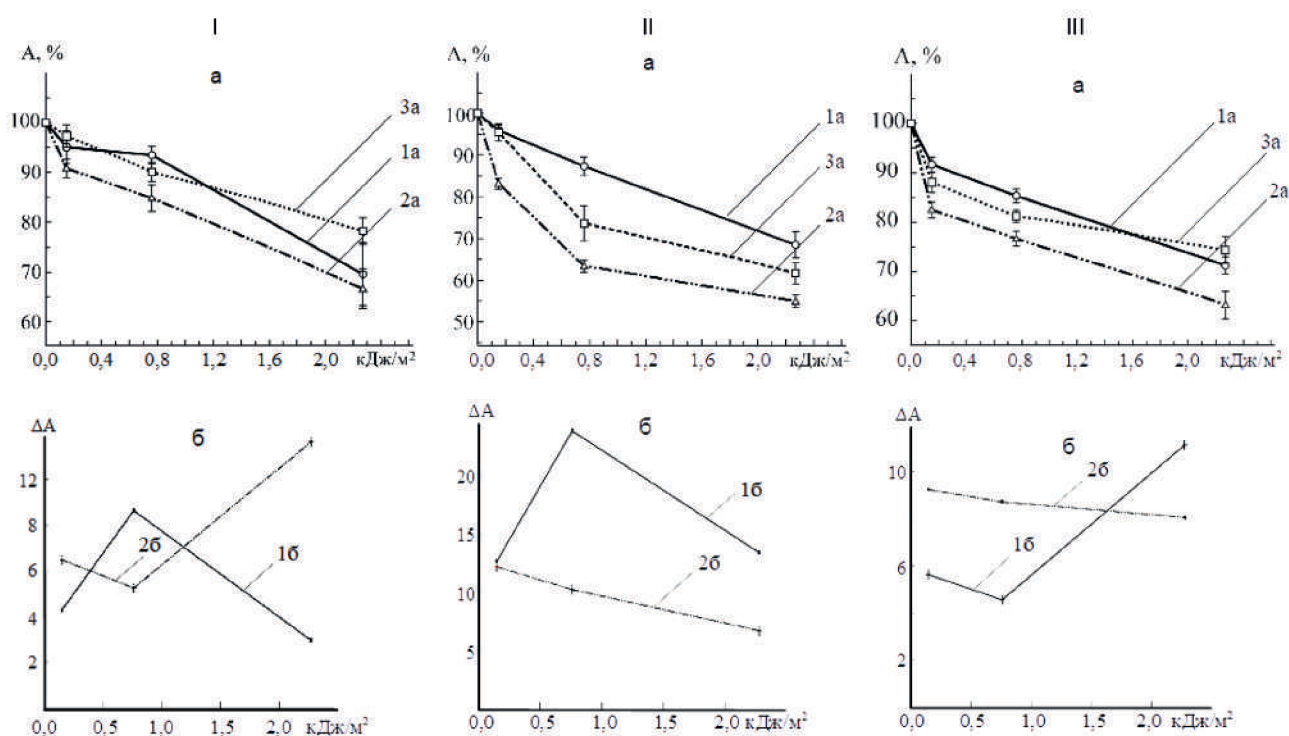


Рис. 3. Модифицирующее действие МГ (10^{-6} моль/л) и НАДН (10^{-5} моль/л) на степень инактивации УФ-облученной ЛДГ в концентрациях (моль/л): I — 10^{-8} ; II — 10^{-7} ; III — 10^{-6} ; 1а — ЛДГ; 2а — ЛДГ + МГ; 3а — то же + НАДН; 1б — сенсибилизирующий эффект МГ; 2б — фотопротекторный эффект НАДН (объяснение в тексте)

Фотопротекторный эффект НАДН определяли по разнице между значениями ферментативной активности белка, модифицированного УФ-светом в смеси с красителем и кофактором, и в присутствии только МГ.

Для ЛДГ (10^{-8} моль/л; рис. 3 (I)) повреждающий эффект сенсibilизатора проявляется лишь после УФ-модификации в дозе $0,76$ кДж/м² и составляет $8,6$ %; а присутствие НАДН отражается на величине остаточной активности ЛДГ в результате облучения в дозе $2,27$ кДж/м²: протекторный эффект этого экзогенного соединения составляет $11,6$ %.

При увеличении концентрации ЛДГ до 10^{-7} моль/л (рис. 3 (II)) усиление ингибирования каталитической активности ЛДГ в присутствии МГ наблюдалось на всем протяжении кривой фотоинактивации, достигая максимальной величины ($24,0$ %) при дозе облучения $0,76$ кДж/м². Кофермент полностью нивелировал действие красителя в начальной точке кривой инактивации (доза $0,15$ кДж/м²), а при увеличении энергетической экспозиции протекторное действие НАДН ослабевало.

По отношению к ЛДГ (10^{-6} моль/л) наибольшая величина инактивации была зарегистрирована при фотомодификации в дозе $0,15$ кДж/м² и составила $9,2$ % (рис. 3 (III)). НАДН проявлял наибольшее защитное действие при облучении в дозе $2,27$ кДж/м² (фотопротекторный эффект – $11,1$ %).

При исследовании зависимости функциональной активности ЛДГ (10^{-6} моль/л) в присутствии метиленового голубого (10^{-4} моль/л) от дозы УФ-света выявляется сенсibilизирующий эффект метиленового голубого как при дозе облучения $0,76$, так и $2,27$ кДж/м² ($8,7$ и $7,0$ % соответственно; данные не показаны).

Выявление механизмов фотосенсibilизирующего действия МГ при облучении его смеси с ЛДГ УФ-светом осложняется тем, что в изучаемой системе образуются различные продукты фотолиза самого белка в результате прямого действия излучения (например, сольватированные электроны, свободные радикалы белка). Возможно, эти активные интермедиаты взаимодействуют с НАДН и МГ. В рамках холофермента не исключена передача энергии, поглощенной молекулой белка, на никотинамидную компоненту кофактора, что может способствовать уменьшению инактивирующего действия излучения, поглощенного ЛДГ.

Далее нами исследованы изменения ферментативной активности ЛДГ (10^{-8} моль/л) при облучении ее растворов красным светом в течение 15 мин в присутствии метиленового голубого в концентра-

циях 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} моль/л. Результаты проведенных экспериментов представлены на рис. 4 (I). Нами показано, что наибольший эффект фотосенсibilизации в данных условиях достигается при использовании МГ (10^{-6} моль/л): ферментативная активность ЛДГ снижается на $33,5$ %.

Определение фоточувствительности белка при добавлении в систему ЛДГ (10^{-8} моль/л)–метиленовый голубой (10^{-6} моль/л) до облучения НАДН в различных концентрациях (рис. 4 (IIa)) позволило сделать заключение о том, что кофактор (10^{-5} моль/л) вызывает дополнительную, по сравнению с облучением ЛДГ в присутствии МГ, инактивацию белка (остаточная каталитическая активность – $58,2$ %). Аналогичные явления наблюдаются при облучении ЛДГ (10^{-7} моль/л) (рис. 4 (IIб)). Фотосенсibilизирующий эффект кофактора составляет $8,0$ %.

Итак, нами выявлено, что при поглощении красителем красного света обнаруживается фото-

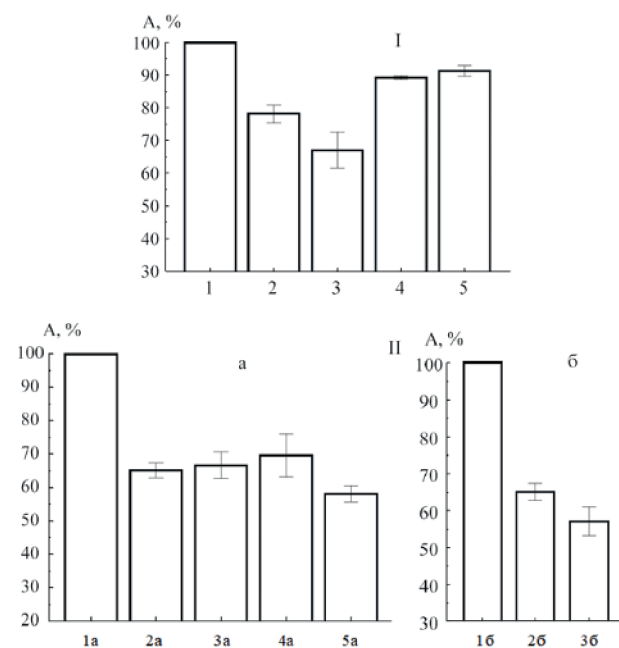


Рис. 4. Модифицирующее действие НАДН на степень сенсibilизированной МГ фотоинактивации ЛДГ в условиях облучения красным светом; I: 1 – ЛДГ (10^{-8} моль/л); ЛДГ, облученная в присутствии МГ концентраций (моль/л): 2 – 10^{-7} ; 3 – 10^{-6} ; 4 – 10^{-5} ; 5 – 10^{-4} ; IIa: 1a – ЛДГ (10^{-8} моль/л); 2a – то же после облучения в присутствии МГ (10^{-6} моль/л); то же (2a) + НАДН концентраций (моль/л): 3a – 10^{-7} ; 4a – 10^{-6} ; 5a – 10^{-5} ; IIб: 1б – ЛДГ (10^{-7} моль/л); 2б – то же после облучения в присутствии МГ (10^{-6} моль/л); 3б – то же (2б) + НАДН (10^{-5} моль/л); по оси ординат – остаточная каталитическая активность ЛДГ (A), %

сенсibilизирующее действие НАДН по отношению к ЛДГ. При облучении белка в УФ-диапазоне в присутствии метиленового голубого при определенных условиях облучения выявляется защитное влияние кофактора.

Инактивация лактатдегидрогеназы при фотосенсibilизированном окислении может быть индуцирована комплексообразованием красителя с поверхностными участками белковой глобулы, что благоприятствует протеканию процессов типа I, а именно, непосредственной химической реакции сенсibilизатора в триплетном состоянии с аминокислотными остатками ЛДГ.

Известно, что взаимодействие отдельных молекул при образовании комплекса может сопровождаться трансформацией их исходных спектральных характеристик. В связи с этим нами исследованы спектры поглощения белка и красителя в УФ- и видимом диапазонах спектра.

Метиленовый голубой имеет полосу поглощения в видимой области с максимумом при длине волны 665 нм (рис. 2). ЛДГ на данном участке шкалы электромагнитных излучений не обладает собственным поглощением. Следовательно, изменения абсорбционных характеристик смеси белок – краситель в данном диапазоне по сравнению с таковыми для МГ будет свидетельствовать о наличии взаимодействия этих соединений. Нами зарегистрированы спектры поглощения метиленового голубого (10^{-6} моль/л) в смеси ЛДГ (10^{-6} моль/л) (данные не приведены). Установлено, что спектр поглощения смеси ЛДГ–метиленовый голубой в области длин волн 590÷700 нм не отличается от такового для красителя в свободной форме. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что предполагаемые взаимодействия белка с красителем не оказывают регистрируемого примененным нами методом влияния на состояние хромофорных группировок МГ.

Таким образом, нами продемонстрировано разнонаправленное действие НАДН на изменения уровня каталитической активности ЛДГ, облученной УФ- и видимым светом в свободной форме и в присутствии МГ. ЛДГ из мышц свиньи (изоформа М₄) является гомотетрамером, каждый из протомеров которого представлен цепью из 332 аминокислотных остатков (UniProtKB: P00339). В качестве основных хромофорных групп в используемом нами для облучения образцов УФ-диапазоне (240÷390 нм) в данном случае выступают (в расчете на мономер): 6 аминокислотных остатков тирптофана, 7 – тирозина, 7 – фенилала-

нина; в меньшей степени – 5 цистеина, 12 – гистидина. Необходимо отметить, что His 193 входит в состав активного центра белка (рис. 5в), выполняя роль донора-акцептора протона в акте катализа, и его фотоповреждение может приводить к инактивации энзима. Известно также, что гистидин является одним из наиболее эффективных акцепторов синглетного кислорода (1O_2), который генерируется в условиях фотосенсibilизации.

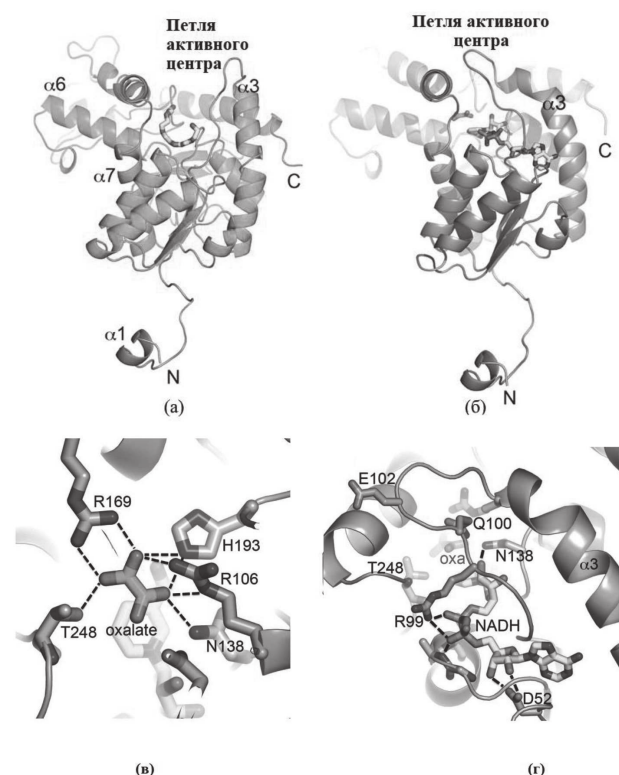


Рис. 5. Субъединица ЛДГ М₄ человека в состоянии апо- (а) и холофермента в комплексе с оксалатом и НАДН (б), и область ее активного центра в комплексе с оксалатом (в) и НАДН (г): по S. Kolappan и соавт., 2015 [21]; объяснение — в тексте

Совокупность фотосенсibilизированных реакций обычно подразделяют на два основных пула: реакции типа I (с участием 1O_2) и реакции типа II, в которых принимают участие радикальные состояния сенсibilизатора, супероксидные радикалы и др. При поглощении МГ квантов видимого света может осуществляться фотовосстановление красителя до семихинона (присоединяется один электрон) и лейкоформы (присоединяются 2 электрона и протон) в присутствии веществ, легко отдающих атомы водорода. В частности, показано [22], что НАДН (являясь энергичным восстановителем, благодаря наличию хиноидной структуры никотинамидного кольца) способен окисляться до НАД⁺

при фотовозбуждении МГ, а промежуточными продуктами при этом выступают радикалы кофактора и красителя. Перечисленные соединения способны передавать электрон растворенному кислороду с генерацией супероксидного анион-радикала и пероксида водорода (рис. 6). Эти активные интермедиаты могут вступать во взаимодействие с ЛДГ, обуславливая ее дополнительную фотоинактивацию.

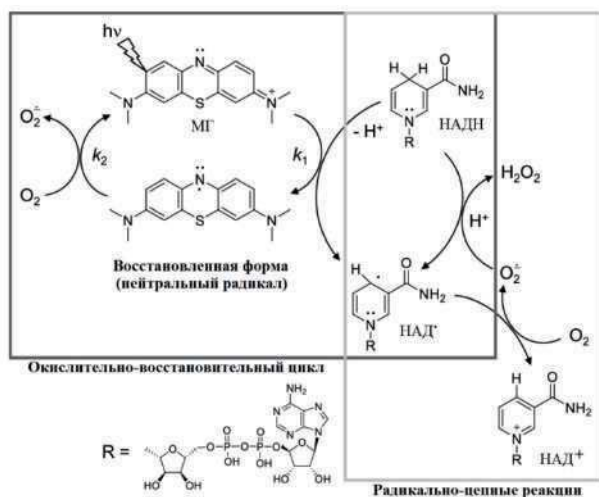


Рис. 6. Гипотетический схема окисления НАДН фенотиазиновыми красителями в условиях их фотовозбуждения: стрелками обозначены реакции, сопровождающиеся переходом электрона от одного соединения к другому (по: K. Hirakawa, M. Mori, 2021 [22])

Таким образом, нами исследованы фотоиндуцированные изменения функционального состояния лактатдегидрогеназы из мышц свиньи в свободной форме, а также в присутствии НАДН и МГ различных концентраций.

Установлено, что модулирующий эффект кофактора по отношению к уровню ферментативной активности ЛДГ в условиях фотосенсибилизированного метиленовым голубым окисления белка определяется условиями облучения, а именно, спектральным диапазоном длин волн УФ- и видимого света, а также значениями концентраций компонентов в системе.

При поглощении красителем энергии квантов с $\lambda_{\max} = 665$ нм обнаружено фотосенсибилизирующее действие НАДН (10^{-5} моль/л), а в результате облучения белка в присутствии МГ в УФ-диапазоне выявлен протекторный эффект кофактора в той же концентрации. При воздействии УФ-света (240÷390 нм) на каталитическую активность ЛДГ в смеси с НАДН в отсутствие МГ может наблюдаться как защитное, так и сенсибилизирующее действие кофактора, ко-

торое определяется концентрацией последнего. Протекторный эффект НАДН при УФ-облучении в присутствии МГ может быть обусловлен реализацией следующих возможных процессов: формированием более фоторезистентной конформации ЛДГ в комплексе с НАДН по сравнению с таковой апофермента (закрытая конформация; рис. 5б); переносом энергии с возбужденных аминокислотных остатков белка на кофермент; акцептированием активных форм кислорода; экранирующим эффектом НАДН в области длин волн 240÷340 нм. Результатом вышеперечисленного может являться частичное нивелирование стадий фотоповреждения фермента, осуществляющихся при непосредственном поглощении его молекулами энергии квантов. Практическое участие этих явлений в актах защиты белка от фотоинактивации требует дальнейшего изучения. Можно предположить, что сенсибилизирующее действие НАДН связано с образованием его радикальных состояний и сопутствующих этому активных форм кислорода, вызывающих дополнительные повреждения фермента.

Результаты проведенных исследований углубляют представления о молекулярных механизмах воздействия оптического излучения различного спектрального состава на функционирование одного из ключевых ферментов окислительного метаболизма — ЛДГ. Они могут быть использованы при разработке способов направленного регулирования ответных реакций биологических систем на действие света в условиях проведения фотодинамической терапии ряда заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jurisic V. The Actual Role of LDH as Tumor Marker, Biochemical and Clinical Aspects / V. Jurisic, S. Radenkovic, G. Konjevic // Adv. Exp. Med. Biol. — 2015. — Vol. 867. — P. 115-124.
2. Feng Y. Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy / Y. Feng, Y. Xiong, T. Qiao, X. Li, L. Jia, Y. Han // Cancer Med. — 2018. — Vol. 7, № 12. — P. 6124-6136.
3. Thabault L. Discovery of a novel lactate dehydrogenase tetramerization domain using epitope mapping and peptides / L. Thabault, M. Liberelle, K. Koruza, E. Yildiz, N. Joudiou, J. Messens, L. Brisson, J. Wouters, P. Sonveaux, R. Frédérick // J. Biol. Chem. — 2021. — Vol. 296: 100422. — doi: 10.1016/j.jbc.2021.100422.
4. Van Wilpe S. Lactate dehydrogenase: a marker of diminished antitumor immunity / S. Van

- Wilpe, R. Koornstra, M. Den Brok, J.W. De Groot, C. Blank, J. De Vries, W. Gerritsen, N. Mehra // *Oncoimmunology*. — 2020. — Vol. 9, № 1: 1731942. — doi: 10.1080/2162402X.2020.1731942.
5. Poli G. Three-Dimensional Analysis of the Interactions between hLDH5 and Its Inhibitors / G. Poli, C. Granchi, M. Aissaoui, F. Minutolo, T. Tuccinardi // *Molecules*. — 2017. — Vol. 22, № 12: 2217. — doi: 10.3390/molecules22122217.
6. Zhang S.L. Targeting cancer metabolism to develop human lactate dehydrogenase (hLDH)5 inhibitors / S.L. Zhang, Y. He, K.Y. Tam // *Drug Discov. Today*. — 2018. — Vol. 23, № 7. — P. 1407-1415.
7. Taldaev A. Methylene blue in anticancer photodynamic therapy: systematic review of preclinical studies / A. Taldaev, R. Terekhov, I. Nikitin, E. Melnik, V. Kuzina, M. Klochko, I. Reshetov, A. Shiryayev, V. Loschenov, G. Ramenskaya // *Front. Pharmacol.* — 2023. — Vol. 14: 1264961. — doi: 10.3389/fphar.2023.1264961.
8. Pominova D. The use of methylene blue to control the tumor oxygenation level / D. Pominova, A. Ryabova, A. Skobeltsin, I. Markova, K. Linkov, I. Romanishkin // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. — 2024. — Vol. 46: 104047.
9. Liang C. Hemoperfusion combined with methylene blue in treating methemoglobinemia caused by emamectin benzoate + indoxacarb poisoning: A case report and literature review / C. Liang, S. Cui, L. Geng // *Asian J. Surg.* — 2023. — Vol. 46, № 12. — P. 5899-5900.
10. Arias-Ortiz J. Administration of methylene blue in septic shock: pros and cons / J. Arias-Ortiz, J.L. Vincent // *Crit. Care*. — 2024. — Vol. 28, № 1: 46. — doi: 10.1186/s13054-024-04839-w.
11. Yang S.H. Alternative mitochondrial electron transfer for the treatment of neurodegenerative diseases and cancers: Methylene blue connects the dots / S.H. Yang, W. Li, N. Sumien, M. Forster, J.W. Simpkins, R. Liu // *Prog. Neurobiol.* — 2017. — Vol. 157. — P. 273-291.
12. Yang L. Mitochondria as a target for neuroprotection: role of methylene blue and photobiomodulation / L. Yang, H. Youngblood, C. Wu, Q. Zhang // *Transl. Neurodegener.* — 2020. — Vol. 9, № 1: 19. — <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00197-z>.
13. Gureev A.P. Molecular Mechanisms of the Neuroprotective Effect of Methylene Blue / A.P. Gureev, I.S. Sadovnikova, V.N. Popov // *Biochemistry (Mosc)*. — 2022. — Vol. 87, № 9. — P. 940-956.
14. Isaev N.K. Methylene blue and its potential in the treatment of traumatic brain injury, brain ischemia, and Alzheimer's disease / N.K. Isaev, E.E. Genrikhs, E.V. Stelmashook // *Reviews in the Neurosciences*. — 2024. — doi: 10.1515/revneuro-2024-0007.
15. Sevcik P. Dunford Kinetics of the oxidation of NADH by methylene blue in a closed system / P. Sevcik, H. B. Dunford // *J. Phys. Chem.* — 1991. — Vol. 95, № 6. — P. 2411-2415.
16. Schirmer R.H. «Lest we forget you methylene blue...» / R.H. Schirmer, H. Adler, M. Pickhardt, E. Mandelkow // *Neurobiol. Aging*. — 2011. — Vol. 32, № 12: 2325.e7-16.
17. Artyukhov V.G. Regularities in the kinetics of photoinactivation of lactate dehydrogenase molecules by the action of UV light in different microenvironment / V.G. Artyukhov, Yu.A. Lysenko, M.A. Nakvasina // *Biofizika*. — 2000. — Vol. 45, № 3. — P. 427-431.
18. Nau R.E.P. Compartmentalization Accelerates Photosensitized NADH to NAD⁺ Conversion / R.E.P. Nau, J. Bösking, A. Pannwitz // *ChemPhotoChem*. — 2022. — Vol. 6, № 11.
19. Артюхов В.Г. Активные формы кислорода и степень УФ-модификации структурно-функциональных свойств лактатдегидрогеназы / В.Г. Артюхов, М.А. Наквасина, Ю.А. Лысенко // *Радиационная биология. Радиоэкология*. — 1997. — Т. 37, № 3. — С. 453-460.
20. Lin X. Methylene Blue-Doped Carbonized Polymer Dots: A Potent Photooxygenation Scavenger Targeting Alzheimer's β -Amyloid / X. Lin, H. Zhang, W. Liu, X. Dong, Y. Sun // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. — 2023. — Vol. 15, № 37. — P. 44062-44074.
21. Kolappan S. Structures of lactate dehydrogenase A (LDHA) in apo, ternary and inhibitor-bound forms / S. Kolappan, D.L. Shen, R. Mosi, J. Sun, E.J. McEachern, D.J. Vocadlo, L. Craig // *Acta Crystallographica Section D*. — 2015. — Vol. 71, № 2. — P. 185-195.
22. Hirakawa K. Phenothiazine Dyes Induce NADH Photooxidation through Electron Transfer: Kinetics and the Effect of Copper Ions / K. Hirakawa, M. Mori // *ACS Omega*. — 2021. — Vol. 6, № 12. — P. 8630-8636.

Воронежский государственный университет
Лысенко Юлия Александровна, кандидат биологических наук, ассистент кафедры биофизики и биотехнологии
E-mail: lysenko@bio.vsu.ru

Voronezh State University
Lysenko Yulia. A., PhD., assistant professor,
Department of Biophysics and Biotechnology;
e-mail: lysenko@bio.vsu.ru

Земляная Светлана Юрьевна, студентка кафедры биофизики и биотехнологии

Zemlyanaya S.Yu., student, Department of Biophysics and Biotechnology

Наквасина Марина Александровна, доктор биологических наук, профессор кафедры биофизики и биотехнологии

Nakvasina Marina. A., DSci., Professor of Biophysics and Biotechnology Department

Артюхов Валерий Григорьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии;
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Artyukhov Valery. G., DSci., Full Professor; Head of the Department of Biophysics and Biotechnology;
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

MODULATING EFFECT OF NADH ON THE LEVEL OF CATALYTIC ACTIVITY OF LACTATE DEHYDROGENASE UNDER CONDITIONS OF UV IRRADIATION AND PHOTODYNAMIC ACTION

Yu. A. Lysenko, S. Yu. Zemlyanaya, M. A. Nakvasina, V. G. Artyukhov

Voronezh State University

Abstract. The aim of this study is to investigate the modulating effect of NADH on the degree of photosensitized by methylene blue (MB) inactivation of lactate dehydrogenase irradiated with ultraviolet and red light. The functional and optical characteristics of pig muscle lactate dehydrogenase (LDH; L-lactate: NAD^+ oxidoreductase; EC 1.1.1.27) irradiated with ultraviolet ($240\div 390$ nm; $151 \text{ J}(\text{m}^2 \text{ min})^{-1}$) and red (665 ± 15 nm; $20 \text{ mW}/\text{cm}^2$) light in the presence of sensitizer (methylene blue) and cofactor (NADH) were studied using spectrophotometry and catalytic activity measurements. It was shown that NADH (10^{-5} M) exhibits a photoprotective effect when the enzyme is irradiated with UV ($0.15\div 2.27 \text{ kJ}/\text{m}^2$) in the presence of methylene blue (10^{-6} M). Exposure to red light induces a sensitizing effect of the cofactor. It was revealed that the spectral characteristics of the mixture of methylene blue and lactate dehydrogenase do not differ statistically significantly from those of the individual components of the solution.

The addition of NADH ($4 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) to UV-irradiated LDH does not change the exponential nature of the protein photomodification, but induces an increase in the constant of its UV inactivation, which indicates its sensitizing effect. It was shown that NADH (10^{-5} M) has a photoprotective effect with respect to changes in the level of LDH catalytic activity ($10^{-8}\div 10^{-6} \text{ M}$) when exposed to UV radiation ($240\div 390$ nm; $0.15\div 2.27 \text{ kJ}/\text{m}^2$) in the presence of methylene blue (10^{-6} M). In the study of the photosensitivity of LDH (10^{-8} and 10^{-7} M) irradiated with red light in the presence of methylene blue (10^{-6} M), the sensitizing effect of the cofactor (10^{-5} M) in relation to LDH molecules was revealed. The results obtained expand theoretical understanding of the potential mechanisms underlying the processes of targeted regulation of the functions of key enzymes of cellular metabolism under pathological conditions and the influence of physicochemical environmental factors.

Keywords: reactive oxygen species, catalytic activity, lactate dehydrogenase, methylene blue, NADH, UV radiation, photodynamic action, photoinactivation, photoprotector, photosensitizer.

REFERENCES

1. Jurisic V. The Actual Role of LDH as Tumor Marker, Biochemical and Clinical Aspects / V. Jurisic, S. Radenkovic, G. Konjevic // Adv. Exp. Med. Biol. — 2015. — Vol. 867. — P. 115-124.
2. Feng Y. Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer

therapy / Y. Feng, Y. Xiong, T. Qiao, X. Li, L. Jia, Y. Han // Cancer Med. — 2018. — Vol. 7, № 12. — P. 6124-6136.

3. Thabault L. Discovery of a novel lactate dehydrogenase tetramerization domain using epitope mapping and peptides / L. Thabault, M. Liberelle, K. Koruza, E. Yildiz, N. Joudiou, J. Messens, L.

- Brisson, J. Wouters, P. Sonveaux, R. Frédérick // *J. Biol. Chem.* — 2021. — Vol. 296: 100422. — doi: 10.1016/j.jbc.2021.100422.
4. Van Wilpe S. Lactate dehydrogenase: a marker of diminished antitumor immunity / S. Van Wilpe, R. Koornstra, M. Den Brok, J.W. De Groot, C. Blank, J. De Vries, W. Gerritsen, N. Mehra // *Oncoimmunology.* — 2020. — Vol. 9, № 1: 1731942. — doi: 10.1080/2162402X.2020.1731942.
5. Poli G. Three-Dimensional Analysis of the Interactions between hLDH5 and Its Inhibitors / G. Poli, C. Granchi, M. Aissaoui, F. Minutolo, T. Tuccinardi // *Molecules.* — 2017. — Vol. 22, № 12: 2217. — doi: 10.3390/molecules22122217.
6. Zhang S.L. Targeting cancer metabolism to develop human lactate dehydrogenase (hLDH)5 inhibitors / S.L. Zhang, Y. He, K.Y. Tam // *Drug Discov. Today.* — 2018. — Vol. 23, № 7. — P. 1407-1415.
7. Taldaev A. Methylene blue in anticancer photodynamic therapy: systematic review of preclinical studies / A. Taldaev, R. Terekhov, I. Nikitin, E. Melnik, V. Kuzina, M. Klochko, I. Reshetov, A. Shiryayev, V. Loschenov, G. Ramenskaya // *Front. Pharmacol.* — 2023. — Vol. 14: 1264961. — doi: 10.3389/fphar.2023.1264961.
8. Pominova D. The use of methylene blue to control the tumor oxygenation level / D. Pominova, A. Ryabova, A. Skobeltsin, I. Markova, K. Linkov, I. Romanishkin // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* — 2024. — Vol. 46: 104047. — <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2024.104047>.
9. Liang C. Hemoperfusion combined with methylene blue in treating methemoglobinemia caused by emamectin benzoate + indoxacarb poisoning: A case report and literature review / C. Liang, S. Cui, L. Geng // *Asian J. Surg.* — 2023. — Vol. 46, № 12. — P. 5899-5900.
10. Arias-Ortiz J. Administration of methylene blue in septic shock: pros and cons / J. Arias-Ortiz, J.L. Vincent // *Crit. Care.* — 2024. — Vol. 28, № 1: 46. — doi: 10.1186/s13054-024-04839-w.
11. Yang S.H. Alternative mitochondrial electron transfer for the treatment of neurodegenerative diseases and cancers: Methylene blue connects the dots / S.H. Yang, W. Li, N. Sumien, M. Forster, J.W. Simpkins, R. Liu // *Prog. Neurobiol.* — 2017. — Vol. 157. — P. 273-291.
12. Yang L. Mitochondria as a target for neuroprotection: role of methylene blue and photobiomodulation / L. Yang, H. Youngblood, C. Wu, Q. Zhang // *Transl. Neurodegener.* — 2020. — Vol. 9, № 1: 19. — <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00197-z>.
13. Gureev A.P. Molecular Mechanisms of the Neuroprotective Effect of Methylene Blue / A.P. Gureev, I.S. Sadovnikova, V.N. Popov // *Biochemistry (Mosc).* — 2022. — Vol. 87, № 9. — P. 940-956.
14. Isaev N.K. Methylene blue and its potential in the treatment of traumatic brain injury, brain ischemia, and Alzheimer's disease / N.K. Isaev, E.E. Genrikhs, E.V. Stelmashook // *Reviews in the Neurosciences.* — 2024. — doi: 10.1515/revneuro-2024-0007.
15. Sevcik P. Dunford Kinetics of the oxidation of NADH by methylene blue in a closed system / P. Sevcik, H. B. Dunford // *J. Phys. Chem.* — 1991. — Vol. 95, № 6. — P. 2411-2415.
16. Schirmer R.H. «Lest we forget you methylene blue...» / R.H. Schirmer, H. Adler, M. Pickhardt, E. Mandelkow // *Neurobiol. Aging.* — 2011. — Vol. 32, № 12: 2325.e7-16. — doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.12.012.
17. Artyukhov V.G. Regularities in the kinetics of photoinactivation of lactate dehydrogenase molecules by the action of UV light in different microenvironment / V.G. Artyukhov, Yu.A. Lysenko, M.A. Nakvasina // *Biofizika.* — 2000. — Vol. 45, № 3. — P. 427-431.
18. Nau R.E.P. Compartmentalization Accelerates Photosensitized NADH to NAD⁺ Conversion / R.E.P. Nau, J. Bösking, A. Pannwitz // *ChemPhotoChem.* — 2022. — Vol. 6, № 11. — <https://doi.org/10.1002/cptc.202200158>.
19. Artyukhov V.G. Aktivnye formy kisloroda i stepen' UF-modifikatsii strukturno-funktsional'nykh svoystv laktatdegidrogenazy / V.G. Artyukhov, M.A. Nakvasina, Yu.A. Lysenko // *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya.* — 1997. — T. 37, № 3. — S. 453-460.
20. Lin X. Methylene Blue-Doped Carbonized Polymer Dots: A Potent Photooxygenation Scavenger Targeting Alzheimer's β -Amyloid / X. Lin, H. Zhang, W. Liu, X. Dong, Y. Sun // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* — 2023. — Vol. 15, № 37. — P. 44062-44074.
21. Kolappan S. Structures of lactate dehydrogenase A (LDHA) in apo, ternary and inhibitor-bound forms / S. Kolappan, D.L. Shen, R. Mosi, J. Sun, E.J. McEachern, D.J. Vocadlo, L. Craig // *Acta Crystallographica Section D.* — 2015. — Vol. 71, № 2. — P. 185-195.
22. Hirakawa K. Phenothiazine Dyes Induce NADH Photooxidation through Electron Transfer: Kinetics and the Effect of Copper Ions / K. Hirakawa, M. Mori // *ACS Omega.* — 2021. — Vol. 6, № 12. — P. 8630-8636.