

Neuroprotektív vegyületek hatásmechanizmusának vizsgálata: a metilénkék és a vinpocetin mitokondriális célpontjai

Doktori értekezés

dr. Sváb Gergely

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola
Funkcionális Idegtudományok



Témavezető: Dr. Tretter László, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Jávor-Hocsák Enikő, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Kardon Tamás, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Mandl József, DSc., professor emeritus

Tagok: Dr. Varga Gábor, DSc., egyetemi tanár

Dr. Szarka András, DSc., egyetemi tanár

Budapest
2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés.....	7
1.1. A mitokondrium.....	7
1.1.1. Morfológia.....	7
1.1.2. Bioenergetika.....	7
1.1.3. Reaktív oxigén származékok.....	10
1.1.4. Kalcium homeosztázis.....	11
1.1.5. Apoptózis.....	12
1.1.6. A mitokondriumok szerepe neurodegeneratív megbetegedésekben.....	13
1.1.7. Komplex III.....	16
1.2. Metilénkék.....	19
1.2.1. Történelmi áttekintés.....	19
1.2.2. Alternatív elektrontranszport.....	20
1.2.3. Korábbi, a témához köthető eredmények.....	21
1.3. Vinpocetin.....	22
2. Célkitűzés.....	27
2.1. Metilénkék.....	27
2.2. Vinpocetin.....	28
3. Módszerek.....	29
3.1. Vegyszerek, mérőoldat.....	29
3.2. Agy mitokondriumok izolálása.....	29
3.3. Sejtkultúrák izolálása.....	30
3.4. Szinaptoszómák izolálása patkány agyból.....	30
3.5. A mitokondrium és a szinaptoszóma oxigénfogyasztásának meghatározása.....	31
3.6. A mitokondriális membránpotenciál meghatározása.....	31
3.6.1. TPP ⁺ elektród.....	31
3.6.2. Safranin fluoreszcencia.....	31
3.6.3. TMRM fluoreszcencia.....	32
3.7. A NAD(P)H redoxállapot meghatározása.....	32
3.8. A metilénkék oxidoredukciós állapotának meghatározása.....	33
3.9. A metilénkék elhelyezkedésének vizsgálata.....	33
3.10. A mitokondrium és szinaptoszóma H ₂ O ₂ termelésének vizsgálata.....	34
3.11. A mitokondriális ATP szintézis kinetikai vizsgálata.....	34

3.12.	Az ATP-áz aktivitás mérése.....	34
3.13.	A mitokondriális kalcium tranziens meghatározása	35
3.14.	A késleltetett kalcium dereguláció mérése izolált patkány agy neuronokon....	36
3.15.	A mitokondrium kalcium felvételének vizsgálata	36
3.16.	A mitokondriális duzzadás vizsgálata.....	36
3.17.	Statisztika.....	37
4.	Eredmények.....	38
4.1.	Metilénkék	38
4.1.1.	A metilénkék hatása a mitokondriális oxigénfogyasztásra rágsálókból izolált agyi mitokondriumokban komplex III gátlás esetén	38
4.1.2.	A metilénkék hatása a mitokondriális membránpotenciálra rágsálókból izolált agyi mitokondriumokban komplex III gátlás esetén	41
4.1.2.1.	Membránpotenciál mérések safranin O fluoreszcens festékkel	41
4.1.2.2.	Membránpotenciál mérések TMRM fluoreszcens festékkel.....	43
4.1.3.	A metilénkék hatása a NAD(P)H egyensúlyi állapotára	44
4.1.4.	A metilénkék oxidoredukciója gátlószer jelenlétében és hiányában.....	45
4.1.5.	A metilénkék kompartmentalizációja és hatása a mitokondriális bioenergetikára	47
4.1.6.	A NADH képes redukálni a citokróm <i>c</i> -t metilénkék jelenlétében.....	48
4.1.6.1.	A metilénkék stimulálja a citokróm <i>c</i> redukciót komplex III gátlószer jelenlétében is	48
4.1.6.2.	A metilénkék stimulálja a citokróm <i>c</i> redukciót NADH jelenlétében <i>in vitro</i> körülmények között.....	50
4.1.6.3.	Az acetyl-citokróm <i>c</i> redukciójának NADH függése metilénkék jelenlétében <i>in vitro</i> körülmények között	51
4.1.6.4.	Az acetyl-citokróm <i>c</i> redukciójának metilénkék függése NADH jelenlétében <i>in vitro</i> körülmények között	52
4.2.	Vinpocetin.....	54
4.2.1.	Vinpocetin hatása az oxigénfogyasztásra.....	54
4.2.1.1.	Vinpocetin hatása a szinaptoszóma oxigénfogyasztására	54
4.2.1.2.	Vinpocetin hatása a mitokondriumok oxigénfogyasztására	55
4.2.2.	A vinpocetin hatása a mitokondriális membránpotenciálra	56
4.2.3.	Vinpocetin hatása H ₂ O ₂ termelésre	56
4.2.3.1.	Vinpocetin hatása a szinaptoszóma H ₂ O ₂ termelésére	56
4.2.3.2.	Vinpocetin hatása a mitokondriumok H ₂ O ₂ termelésére.....	57
4.2.4.	A vinpocetin hatása a mitokondrium ATP termelésére.....	59
4.2.5.	A vinpocetin hatása a mitokondrium ATP-áz aktivitására.....	60

4.2.6.	Vinpocetin hatása az agyi kapilláris endothél Ca^{2+} homeosztázisra	62
4.2.7.	Vinpocetin hatása a késleltetett Ca^{2+} deregulációra	63
4.2.8.	Vinpocetin hatása a mitokondriális Ca^{2+} indukált Ca^{2+} felszabadulásra és a mitokondriális duzzadásra	64
5.	Megbeszélés	67
5.1.	A metilénkék képes megszüntetni a komplex III gátlást?	67
5.2.	Az elektrontranszportlánc melyik részei képesek oxidálni a metilénkéket?	68
5.3.	Elektrontranszport a redukált metilénkékről a citokróm <i>c</i> -re	69
5.3.1.	A metilénkék képes redukálni a külső citokróm <i>c</i> -t mitokondrium jelenlétében	69
5.3.2.	A citokróm <i>c</i> redukciója NADH és metilénkék jelenlétében <i>in vitro</i> körülmények között	70
5.4.	A komplex III inhibitorral és metilénkéekkel kezelt mitokondriumok szokatlan oxidációs mintázata	71
5.5.	A vinpocetin vizsgálata	74
5.5.1.	A vinpocetin hatása a Ca^{2+} tranziensre agyi kapilláris endotélien	74
5.5.2.	A vinpocetin hatása a késleltetett Ca^{2+} deregulációra agykérgi neuronokon	74
5.5.3.	A vinpocetin hatása az oxigénfogyasztásra szinaptoszómákon	75
5.5.4.	A vinpocetin hatása a szinaptoszómák H_2O_2 termelésére	75
5.5.5.	A vinpocetin hatása a mitokondriális membránpotenciálra, oxigénfogyasztásra és H_2O_2 termelésére	76
5.5.6.	A vinpocetin hatása a mitokondriális ATP szintézisre és az ATP-áz aktivitásra	76
5.5.7.	A vinpocetin hatásai közti ellentmondások	77
6.	Következtetések	78
7.	Összefoglalás	79
8.	Summary	80
9.	Irodalomjegyzék	81
10.	Saját publikációk jegyzéke	112
	Köszönetnyilvánítás	114

Rövidítések jegyzéke

A β	amyloid- β
acetyl-KoA	acetyl-koenzim A
AD	Alzheimer-kór (Alzheimer's disease)
α GPDH	α -glicerofoszfát-dehidrogenáz
α KG	α -ketoglutarát
AK	adenilát-kináz
ANT	adenin-nukleotid-transzlokáz
AP5	(P ¹ ,P ⁵ -Di(adenosine-5')pentafoszfát, adenilát-kináz gátló
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
cAMP	ciklikus adenosin-monofoszfát
CAT	karboxi-atraktilozid, adenin-nukleotid-transzlokáz gátló
cit bc ₁	citokróm bc ₁
cit b _H	magas potenciálú hemmel rendelkező citokróm b
cit b _L	alacsony potenciálú hemmel rendelkező citokróm b
cit c	citokróm c
cit c ₁	citokróm c ₁
CI-IV	komplex I-IV
CYPD	ciklofilin D
$\Delta\Psi_m$	mitokondriális membránpotenciál
ETC	elektrontranszport lánc (electron transport chain)
FCCP	karbonil-cianid-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazon
FRDA	Friedreich ataxia
FeS	vas-kén komplex
FXN	Fraxin gén
G6PDH	glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz
GM	glutamát-malát szubsztrát kombináció
GPDH	glicerol-3-foszfát-dehidrogenáz
HD	Huntington-kór (Huntington disease)
HK	hexokináz
IL-1b	interleukin-1b

LDH	laktát-dehidrogenáz
MK	metilénkék
mtCU	mitokondriális Ca^{2+} uniporter
mtHCX	mitokondriális $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ kicserélő transzporter
mtNCX	mitokondriális $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kicserélő transzporter
NCLX	plazmamembrán $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kicserélő transzporter
NF- κ B	B sejt kappa lánc termelését segítő magi faktor
I κ B	B sejt kappa lánc termelését gátló factor
mPTP	mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus
PD	Parkinson-kór (Parkinson disease)
PDE1	foszfodiészteráz-1
PDHC	piruvát-dehidrogenáz komplex
PEP	foszfoenol-piruvát
PK	piruvát-kináz
PKA	protein-kináz A
PM	piruvát-malát szubsztrát kombináció
Q	oxidált ubikinon/koenzim Q
Q _i	belső Q kötőhely
Q _o	külső Q kötőhely
QH ₂	redukált ubikinon/koenzim Q/ubikinol
ROS	reaktív oxigénszármazék
SQ	semikinon
TLR	toll-like receptor
TMRM	tetrametil-rhodamine-metil-észter
TNF- α	tumor nekrozis faktor α
TPP ⁺	tetrafenilfoszfonium
UCP	szétkapcsoló fehérje (uncoupling protein)
VDAC	feszültségfüggő anion csatorna

1. Bevezetés

1.1. A mitokondrium

A mitokondrium (gör. mitos = fonalak, chondrin = kis granulum) olyan prokarióta eredetű sejtszervecske, amely a törzsfajlás során endoszimbiózist létesített az eukarióta sejtekkel (van der Giezen and Lenton 2012). Az endoszimbionta elméletet alátámasztja az is, hogy a mitokondriumok saját, a baktériumokhoz hasonló duplaszálú cirkuláris DNS-sel és fehérjeszintetizáló apparátussal rendelkeznek. A mitokondriális fehérjék többségét a sejtmag DNS-e kódolja. A mitokondriális DNS emberben mindössze 37 gént kódol, amiből 13 mitokondriális fehérje, 22 tRNS és 2 mitokondriális riboszómális RNS (Anderson *et al.* 1981) génje. A mitokondriumok fő funkciója a sejtekben az aerob anyagcsere biztosítása, ami annyit jelent, hogy oxigén jelenlétében a szerves vegyületeket CO₂-dá és vízzé alakítják át. Emiatt felfedezésekor, a 19. század végén bioblasznak azaz „életműködtető”-nek nevezték (Altmann R. 1890). Emellett a mitokondriumok számos egyéb feladatot is ellátnak, amik elengedhetetlenek a sejt fiziológiás működéséhez.

1.1.1. Morfológia

A mitokondriumok belső terét a sejt plazmától kettős membránrendszer választja el. A külső membrán, ami az intermembrán teret határolja el a sejt plazmától, porin csatornái révén szabadon átjárható a kisebb molekulák számára. A belső membrán (ami a mátrixot határolja) krisztákat, képez, ezáltal jóval nagyobb felületű a külső membránnál. Itt valósulhat meg a kisebb molekulák és ionok szabályozott transzportja a specifikus transzporterek segítségével, illetve itt található a légzési lánc komplexei is. Ebből is következik, hogy a sejtben található membránok közül arányaiban a mitokondrium belső membránja tartalmazza a legtöbb fehérjét (~80%) (Nicholls DG and Ferguson SJ 2013).

1.1.2. Bioenergetika

A mitokondriumok a metabolizmusban központi helyet foglalnak el. A makromolekulák lebontását követően a mitokondrium mátrixában történik a

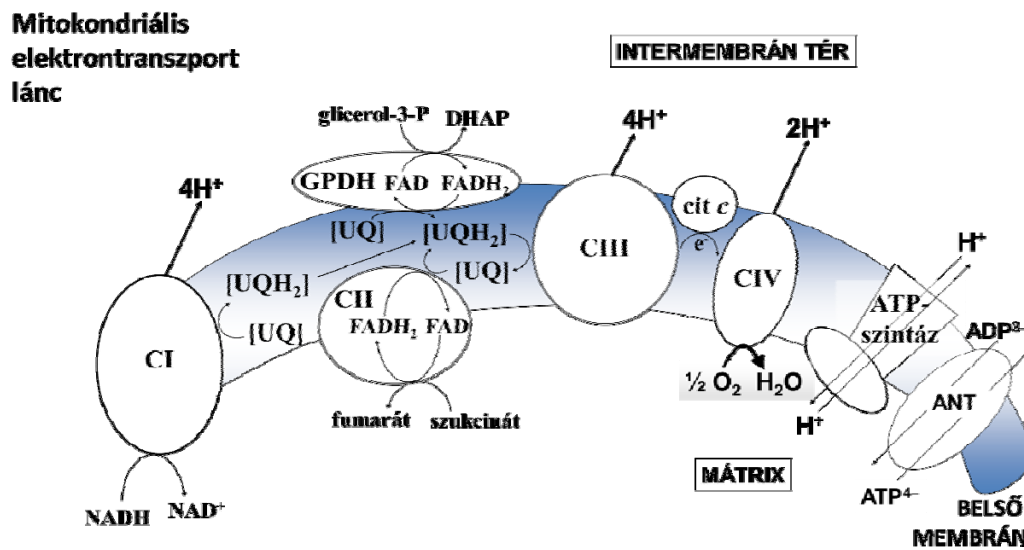
szénhidrátok, zsírok és fehérjék (aminosavak) szénláncának lebontása, melyek közös úton, a citrátkörben oxidálódnak tovább.

A szénhidrátok átalakításának sejten belüli első lépése a glikolízis, melynek során a sejtek által felvett monoszacharidok a citoplazmában piroszőlősavvá (piruvát), redukáló ekvivalensekké és ATP-vé alakulnak. A glikolitikus ATP a citoplazmában a sejt energiaszükségletének részleges fedezésére fordítódik, a piruvát anaerob körülmények között a glikolízisben képződött NADH-val tejsavat (laktátot) képez, aerob körülmények között azonban a piruvát és a NADH is a mitokondriumban használódhat fel. A piruvát esetében a monokarboxilát transzporter biztosítja a mitokondrium belső membránján való átjutást, majd a piruvát dehidrogenáz komplex (PDHC) oxidálja tovább acetil-koenzim A-vá (acetyl-KoA), ami a citrátkörbe lépve oxálacetáttal kondenzálódva citrátot képez. A mitokondrium belső membránja NADH számára nem átjárható, ezért a NADH elektronjai vagy az α -glicerofoszfát dehidrogenáz (α GPDH) ingarendszer FAD-ját redukálva lépnek be a mitokondriális légzési láncba (a mitokondrium belső membrán külső felszíne felől), vagy a malátaszpartát ingarendszeren keresztül malátként jutnak be a mátrixba, ahol NAD^+ -ot redukálnak $\text{NADH}+\text{H}^+$ -vá. A mátrixban keletkezett $\text{NADH}+\text{H}^+$ a mitokondriális elektrontranszportlánc (electron transport chain, ETC) komplex I-én fog oxidálódni.

A zsírsavak lebontásának döntő része szintén a mitokondriumban zajlik. A citoplazmában található zsírsavak a karnitin transzporterrel jutnak be a mitokondriumba, és az úgynevezett β -oxidációban acetyl-KoA-ká darabolódva a szénhidrátoknál leírt módon lépnek be a citrátkörbe. (A folyamat részletei nem képezik a disszertáció tárgyát.)

A fehérjék lebontásából származó aminosavak lebontása változatos módon történik. Az aminosavak aminocsoportja transzaminálással vagy dezaminálással kerül eltávolításra, majd ezt követően a keletkezett ketosav szerkezetétől függően acetyl-KoA-vá és/vagy citrátköri intermedierré alakul. Ezek az intermedierek később tovább oxidálódhatnak és ezzel képesek energiát szolgáltatni, vagy a citrátkör anaplerózisát biztosítva prekuzorként részt venni a felépítő folyamatokban. Ebből következik, hogy a mitokondrium mind az energiatermelésben, mind a lebontásból származó intermedierek redisztribúciójában esszenciális szereppel bír.

Látható, hogy a makromolekulák lebomlása során a keletkező molekulák belépnek a citrátkörbe. A citrátkör működése során NAD^+ -t és FAD-ot redukál és CO_2 -t állít elő. A redukáló ekvivalensek a mitokondrium belső membránjában található ETC különböző fehérjekomplexein tudnak oxidálódni. A NADH a komplex I-en (CI), míg a FADH_2 a komplex II-n (CII; szukcinát dehidrogenáz) oxidálódik. A komplexekre kerülő elektronokat a CI és a CII is a mitokondrium belső membránjában található lipidoldékony ubikinonra (koenzim Q, Q) továbbítja, ami a komplex III-nak (CIII) adja tovább. A CIII-ről az elektronokat a citokróm *c* veszi át, majd továbbítja a komplex IV-re (CIV). A CIV az általa felvett elektronokkal az oxigént fogja redukálni. A CI, a CIII és a CIV a mitokondrium belső membránját átérő fehérjekomplexek, melyek protonpumpa aktivitással rendelkeznek. A komplexek a rajtuk átáramló elektronok energiáját protonok kipumpálására fordítják. A protonoknak a mátrixból az intermembrán térbe jutásával kiépül a protonok elektrokémiai gradiense. Egy NADH oxidációja és az elektrontranszport során a CI és CIII 4-4 protont, míg a CIV 2 protont pumpál ki az intermembrán térbe, így egy NADH molekula oxidációjával párhuzamosan 10, egy FADH_2 oxidációja során azonban csak 6 proton kerül a mátrixból az intermembrán térbe (1. ábra). Az így kipumpált protonok a mátrixba kétféle módon képesek visszaáramlani. Az ATP-szintázon keresztül a protongradiensből származó energia ATP szintézisére fordítódik, illetve szétkapcsolófehérjéken (uncoupling protein, UCP) keresztül, amikor hőtermelésre fordítódik az energia (ennek elsősorban újszülöttkorban van jelentősége, amikor még a szervezet nagy fajlagos felülete miatt extra hőképzést igényel az állandó testhőmérsékletének fenntartásához). Az így visszaáramlott protonok pedig a CIV által redukált oxigénnel vizet képeznek. Az ATP-szintázon képződött ATP ADP-re cserélődik az adenin nukleotid transzlokáz (ANT) cseretranszporterén keresztül, lehetővé téve újabb ATP molekulák szintézisét.



1. ábra: Mitokondriális elektrontranszportlánc. CI-CIV: komplex I-IV, Q: ubikinon, QH₂: ubikinol, DHAP: dihidroxiaceton-foszfát, cit c: citokróm c, GPDH: Glicerol-3-foszfát dehidrogenáz, ANT: adenin-nukleotid-transzlokáz

A fent leírt energiatermelő szerepe miatt gyakran nevezük a mitokondriumokat a sejtek erőműveinek. A sejtek energiaigényétől függően a mitokondriumok mennyisége a különböző szervezetekben, sőt meg szervezeteken belül a különféle sejtípusokban is nagymértékben eltérhet. Azonban a mitokondriumok az oxidatív metabolizmus megvalósításán kívül számos egyéb feladatot is ellátnak, ami szintén befolyásolja a különböző sejtek/szövetek mitokondrium mennyiségét.

1.1.3. Reaktív oxigén származékok

A mitokondriumok a sejt energiaigényének biztosításán túl jelentős mennyiségű reaktív oxigén származék (ROS) képzésben is részt vesznek. A ROS olyan oxigén tartalmú reaktív vegyület, ami a fiziológiás működés során alakul ki a szervezetben. Mivel a mitokondriumok jelentős antioxidáns kapacitással rendelkeznek, így a mitokondriális ROS nagy része nem hagyja el a mitokondriumot. Probléma akkor lép fel, ha a ROS termelés és elimináció egyensúlya megbomlik, vagy a fokozott ROS képződés, vagy a csökkent antioxidáns kapacitás miatt (Andreyev *et al.* 2015), ezt az egyensúlyhiányt nevezik oxidatív stressznek (Sies *et al.* 2017). A fokozott ROS termelés fontos szerepet játszik az agyi ischemia/reperfúziós károsodásban (Halliwell 1992; Love 1999; Starkov *et al.* 2004; Torres-Cuevas *et al.* 2019), a neurodegenerációban

(Dumont and Beal 2011) és a glutamát toxicitásban is (Gulyas *et al.* 2012; Nicholls 2009).

A mitokondrium ROS termelésén keresztül képes modulálni az immunológiai folyamatokat (Bulua *et al.* 2011; West *et al.* 2011), szabályozni az apoptózist (Bender and Martinou 2013; Duchon 2000), a sejtek differenciálódását (Maryanovich and Gross 2013), az autofágiát (Chen *et al.* 2009b), regulálni a sejtek gyulladásos folyamatait (Gurung *et al.* 2015; Mills and O'Neill 2014).

1.1.4. Kalcium homeosztázis

A mitokondrium kalcium felvevő képességéből adódóan képes szabályozni a sejt Ca^{2+} homeosztázisát (Chinopoulos and Adam-Vizi 2006; Duchon 2000; Nicholls 2005; Starkov *et al.* 2004), emellett a mitokondriumban a Ca^{2+} különféle enzimek működésének befolyásolásával az energiatermelést és a metabolizmust is szabályozza (Giorgi *et al.* 2012).

A mitokondriális elektrontranszportlánc hatására kiépülő elektrokémiai gradiens a kétszeresen töltött Ca^{2+} ionokra is hatást gyakorol, ezáltal segít a mitokondriumba történő felhalmozódásukban. A mitokondrium belső membránja impermeábilis a Ca^{2+} ionokra, ezért a Ca^{2+} -felvétel egy elektrogén Ca^{2+} uniporteren (mtCU) keresztül történik (Bragadin 1979). A mtCU hatását a mitokondriális $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mNCX) és a mitokondriális $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mHCX) kicserélők ellensúlyozzák (Crompton 1977; Pozzan 1977). A mitokondriális Ca^{2+} felvételt mitokondriális fúziós fehérjékkel (aequorin, GFP) vizsgálták, amik Ca^{2+} kötés hatására megváltoztatják a fluoreszcenciájukat (Miyawaki 1999; Nagai 2001).

A mitokondriális Ca^{2+} felvételhez a Ca^{2+} ionoknak mind a külső, mind a belső membránon át kell jutni, melyek közül a valódi barrier funkciót a belső mitokondriális membrán látja el, azonban megfigyelték, hogy a feszültségfüggő anion csatornák (VDAC) alacsony szintje a külső mitokondriális membránban, korlátozhatja a mitokondriális Ca^{2+} felvételt (Madesh 2001; Rapizzi 2002). Mivel a VDAC feszültségfüggő kapuzási tulajdonságait számos fehérje (Bcl-2 családba tartozó fehérjék, tubulin) és membránlipid (foszfátidil-kolin, foszfátidil-szerin, foszfátidil-etanolamin) képes módosítani, ezért a Ca^{2+} transzport szabályozás in situ körülmények között ezek által is szabályozható (Rostovtseva 2008). A belső membránban található

mtCU egy alacsony vezetőképességű, rendkívül szelektív Ca^{2+} csatorna, ami ruténiumvörössel és gadolíniummal gátolható. A szabályozás a két transzmembrán domén közti szakaszon valósul meg, ami szükséges a csatorna aktiválásához, és ide kötődik a ruténiumvörös is (De Stefani 2011; Baughman 2011). A mtCU más szabályozó fehérjékkel is kapcsolatba léphet, ilyen a mitokondriális Ca^{2+} felvétel 1 (MICU1) fehérje, ami agonistaként gyors Ca^{2+} felvételt biztosít a mitokondriumokba.

A mitokondriumokból a Ca^{2+} felszabadulása a már korábban említett mNCX és mHCX transzportereken keresztül történik. A mNCX a NCLX plazmamembránban található $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseretranszporter mitokondriális izoformája, ami szelektíven gátolható a CGP37157 molekulával (Cox 1993). A másik lehetőség a mitokondriális Ca^{2+} felszabadulásra a mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus (mPTP), melynek megnyílása során a Ca^{2+} áramlik ki a citoplazmába. Amennyiben mPTP egyik elemét a ciklofilin D-t (CYPD) gátoljuk (ciklosporin A-val), vagy kiütjük (Ppif -/- egérmodell), akkor a szívben az emelkedő Ca^{2+} hatására fokozódott a Ca^{2+} függő mátrix dehidrogenázok aktivitása (Elrod 2010). Emellett a Ppif -/- neuronokban az oxidatív stressz kisebb Ca^{2+} felszabadulást idéz elő, ezáltal csökken a citoplazmatikus Ca^{2+} terhelés (Barsukova 2011).

1.1.5. Apoptózis

A mitokondriumok az apoptózis intrinsic útjában játszanak szerepet. A Bcl2 egy mitokondriumok külső membránjában lokalizálódó fehérje, amely képes megkötni a szintén Bcl2 fehérjecsaldába tartozó pro-apoptotikus faktorokat (Bak, Bax), melynek következtében ő maga anti-apoptotikus hatású. Bcl2 hiányában a mitokondrium membránjának permeabilitása növekszik, citokróm c szabadul fel, és fokozott ROS képződés figyelhető meg. A citokróm c egy adapter fehérjéhez köt (APAF-1), amely egy iniciátor kaszpáz (kaspáz-9) aktiválódását idézi elő. Az így kialakult multiprotein komplex vezet később az apoptózishoz. Az iniciátor kaszpázok ezt követően további kaszpázokat aktiválnak, melyek a különböző sejtalkotók lebontásában játszanak szerepet (Kluck *et al.* 1997).

1.1.6. A mitokondriumok szerepe neurodegeneratív megbetegedésekben

A disszertáció fő célkitűzése, a már korábban neurodegeneratív betegségmodellekben, kognitív deficienciákban illetve állatkísérletekben alkalmazott vegyületek mitokondriális hatásainak vizsgálata, ezért röviden ismertetném a leggyakoribb neurodegeneratív betegségekben a mitokondriumok szerepét.

A neurodegeneratív megbetegedések csoportja mind tüneteik, mind lefutásuk tekintetében egy nagyon heterogén betegségcsoport (Przedborski *et al.* 2003). Általában a kor előrehaladtával progrediálnak, motoros és kognitív romlással járnak, ezáltal csökkentve a beteg életminőségét, és a betegség súlyosbodásával a beteg egyre komolyabb figyelmet igényel a környezetétől. Világszerte egyre emelkedik az átlagéletkor, így több idő áll rendelkezésre a betegség súlyosbodásához, ami komoly szociális és gazdasági hatással van a társadalomra. Sajnos hatékony kezelést még nem sikerült felfedezni, mindössze a progresszió lassítására vannak lehetőségeink.

Évtizedekig az volt az elfogadott nézet, hogy a neuronok károsodása okozza ezeket a betegségeket, azonban később egyre több bizonyítékot találtak rá, hogy a betegségek kialakulásában az asztrociták és az agyi erek is szerepet játszanak (Maragakis and Rothstein 2006;Zacchigna *et al.* 2008). A bizonyítékok között sok esetben előfordul a mitokondriális diszfunkció, mind az öregedés, mind az öregedéssel kapcsolatos neurodegeneratív betegségek kialakulásánál (Bratic and Larsson 2013;Chen and Chan 2009). A mitokondriális diszfunkció hátterében pedig legtöbbször az energiaháztartás károsodása áll.

Alzheimer-kór (AD): Az AD a leggyakoribb neurodegeneratív megbetegedés, melynek ismertetőjelei az amiloid- β ($A\beta$) plakkok és a hiperfoszforilált neurofibrilláris kötegek (Girouard and Iadecola 2006) megjelenése. Ezért az AD kutatásában a két fő irányzat az „amyloid cascade hypothesis” és a „tau and tangle hypothesis” alakult ki (Korczyn 2008;Mudher and Lovestone 2002). Felfedezték, hogy az amiloid plakkok mennyisége és a kognitív képességek romlása között nincs szoros összefüggés, mivel számos terápia, ami csökkenteni tudta az amiloid plakkok méretét, nem befolyásolta a kognitív képességeket (Karran *et al.* 2011;Karran and Hardy 2014). Emellett kimutatták, hogy iszkémiás strokeban is megemelkedik az $A\beta$ prekursor protein

expressziója (Nihashi *et al.* 2001;Shi *et al.* 2000), az amiloid prekursor protein hasításában szerepet játszó β -szekretáz expressziója és aktivitása (Tesco *et al.* 2007;Wen *et al.* 2004a), valamint fokozódik a hiperfoszforiláció (Wen *et al.* 2004b). Emellett A β 1-40 és A β 1-42 felszaporodást találtak humán hippocampusban ischemiás stroke után is (Qi *et al.* 2007). Tekintve, hogy az A β és tau fehérje aggregátumok felszaporodása megfigyelhető traumás agykárosodás esetén is, így emelkedésük nem specifikus jel AD esetén (Chen *et al.* 2009a;Johnson *et al.* 2012b).

Továbbá megfigyelték, hogy metabolikus szindrómában szenvedő betegeknél, ahol csökkent az agyi glükóz metabolizmus, gyakoribb az AD kialakulása (Razay *et al.* 2007;Yaffe *et al.* 2004). A hipometabolizmus következtében általánosságban is elmondható, hogy fokozódik az AD kockázata (Johnson *et al.* 2012a). Az agyi glükóz transzportot és felhasználást csökkentő folyamatok szintén fokozzák az AD kialakulását (Iadecola 2015;Nordberg *et al.* 2010). Ilyen folyamat például az AD-ban szenvedő betegek agyában megfigyelhető GLUT1 transzporterek számának csökkenése, aminek következtében hamarabb kialakul a demencia (Kalaria and Harik 1989;Mooradian *et al.* 1997;Winkler *et al.* 2015). Másik oldalról vizsgálva, a GLUT1 transzporter helyreállítása csökkenti az A β mennyiségét (Winkler *et al.* 2015), illetve az alternatív szubsztrátok (ketontestek) vagy a glükóz felvételt serkentő mechanizmusok (intranazális inzulininterápia) is jótékony hatással bírnak (Mamelak 2012;Stafstrom and Rho 2012;Yarchoan and Arnold 2014).

A mitokondriumok, a korábban említett feladataikon kívül, szabályozzák a szinaptikus transzmissziót és a kognitív funkciókat is (Picard and McEwen 2014). Így nem meglepő, hogy AD-ban nemcsak morfológiai, hanem mitokondriális bioenergetikai és genetikai változásokat is tapasztalhatunk (Mancuso *et al.* 2008;Swerdlow and Khan 2004;Swerdlow *et al.* 2014). Az AD okozta oxidatív stressz közrejátszik a mitokondriális ETC működésének változásában (Morais and De 2010). Mind AD-ban szenvedő betegek, mind transzgenikus egerek agyi mitokondriumaiban megfigyelték, hogy az A β képes kötődni az ETC komplexeihez (Chen *et al.* 2009b;Moran *et al.* 2012). Emellett az AD-ban megtalálható neurofibrilláris kötegek is gátolják a mitokondriális ETC működését, így fokozzák a ROS képzést és csökkentik a mitokondriális membránpotenciált (Moran *et al.* 2012).

Parkinson-kór (PD): A második leggyakoribb neurodegeneratív betegségként tartják számon, legfontosabb ismertetőjele a substantia nigra dopaminerg neuronjainak pusztulása, melynek következtében a striatumban dopaminhiány lép fel. A betegség jellegzetes tünetei a bradykinesia, a rigid izmok, a tremor és az egyensúlyzavar. Napjainkban már lehetséges a tüneti kezelés, azonban a progressziót jelenlegi tudásunk szerint még nem tudjuk megállítani.

Az AD-hoz hasonlóan PD-ban is megfigyelhető az agy csökkent glükóz metabolizmusa (Borghammer *et al.* 2009; Borghammer *et al.* 2010; Borghammer 2012; Dunn *et al.* 2014), azonban ez nem mindig kapcsolódik demenciához (Edison *et al.* 2013). PD-ban is megfigyelhető a mitokondrium károsodása és a fokozott oxidatív stressz. Az ETC CI-ének károsodása valószínűleg szerepet játszik a PD kialakulásában (Franco-Iborra *et al.* 2016), mivel az 1-metil-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropiridin (MPTP, CI gátlószer) irreverzibilis Parkinson szindrómát képes kiváltani (Calne and Langston 1983; Langston and Ballard, Jr. 1983). Emellett rotenon alkalmazása (ami szintén CI gátlószer) szintén képes PD-re jellemző tüneteket kialakítani (Betarbet *et al.* 2000). A PD kutatása során mai napig a fentebb említett két vegyületet használják a betegség modellezésére (Beal 2010). A mitokondriális CI csökkent működése PD-ban szenvedő betegekben azonban nem csak a substantia nigra, hanem az agykéreg neuronjaiban is megtalálható volt (Schapira *et al.* 1990). Megfigyelhető, hogy a PD nem csak a substantia nigrát és nem csak a dopaminerg neuronokat érinti, hanem a többi agyterület különböző neurotranszmittereit is (Lang and Obeso 2004a; Lang and Obeso 2004b).

Annak ellenére, hogy a PD általában nem öröklődik, néhány gén mutációja köthető a mitokondriális károsodáshoz és ennek kapcsán az öröklődő PD-hoz. Ilyen a Parkin és a PINK1 gének, amik normál működéskor a mitokondriális dinamikát és az autofágiát szabályozzák (Moran *et al.* 2012). Mitokondriális károsodásban a PINK1 akkumulálódik a mitokondrium külső membránjában, ahol aktiválja a parkin ubikvitin-ligáz aktivitását. Ezt követően a parkin ubikvitinálja a mitokondrium külső membránjában található fehérjéket, ami később mitofágiához vezet (Pickrell and Youle 2015).

Huntington-kór (HD): A HD kialakulásában is fontos szerepet játszik mitokondriális károsodás. A betegség során a huntingtin fehérje elején található CAG

trinukleotidok által kódolt poliglutamin domén hossza megnövekedik, és a poliglutamin domén hossza korrelációt mutat a betegség súlyosságával. A HD jellegzetességei a striatum GABAerg neuronjainak pusztulása (Damiano *et al.* 2010) és a Huntingtin gén mutációja, aminek következtében az expresszálandó fehérje a mitokondriumokhoz kötődve gátolja azok működését (Choo *et al.* 2004;Orr *et al.* 2008). HD-ben szenvedő betegekben kimutatták, hogy a putamen mitokondriumaiban gátolt a CII, CIII és a CIV (Damiano *et al.* 2010).

Friedreich ataxia (FRDA): A FRDA a leggyakoribb örökletes ataxia, aminek oka a frataxin gén (FXN) károsodása. A HD-hoz hasonlóan itt is egy trinukleotid (GAA) felszaporodása következik be a fehérjét kódoló génben, ennek következtében a transzkripció során működésképtelen fehérje fog keletkezni (Gonzalez-Cabo and Palau 2013;Kaplan 1999). A frataxin normál körülmények között a vas metabolizmusban játszik fontos szerepet, többek között a hem szintézisében és a FeS klaszterek kialakulásában (Gonzalez-Cabo *et al.* 2005;Karthikeyan *et al.* 2003). Ennek következtében zavart szenved a FeS klaszterrel rendelkező enzimek (komplex I, II, III, akonitáz) működése, a mitokondriális ETC károsodásának következtében csökken az oxidatív foszforiláció és az ATP-szintézis, emellett a FeS klaszterek kialakulásának zavara miatt emelkedett vas-szintet lehet detektálni a FRDA-ban szenvedő betegekben (Lodi *et al.* 1999).

1.1.7. Komplex III

A CIII egy fontos csomópont az ETC-ban. Itt történik a QH₂ oxidációja, ami pedig számos különböző lebontó folyamatból származó elektronokat szállítja a CIII-hoz. Ezek közül a legfontosabbak az α -glicerofoszfát-dehidrogenáz (Green 1936), az elektrontraszfer-flavoprotein-dehidrogenáz, ami a zsírsavoxidáció első dehidrogenáz enzimétől vesz át hidrogént és adja át a CoQ-nak (Houten *et al.* 2016), a CI és a CII (Capaldi *et al.* 1988). Ezen kívül további enzimek is képesek a komplex III-hoz továbbítani az elektronokat, ilyen a dihidroorotát-dehidrogenáz (Lieberman and Kornberg 1953), a kolin-dehidrogenáz (Tsuge *et al.* 1980), a prolin-dehidrogenáz 1 és 2 (Servet *et al.* 2012), illetve a szulfid:kinon-oxidoreduktáz (Olson and Straub 2016),

ezáltal mind a négy makromolekula csoportból származó monomerek lebontása során fontos szerephez juthat.

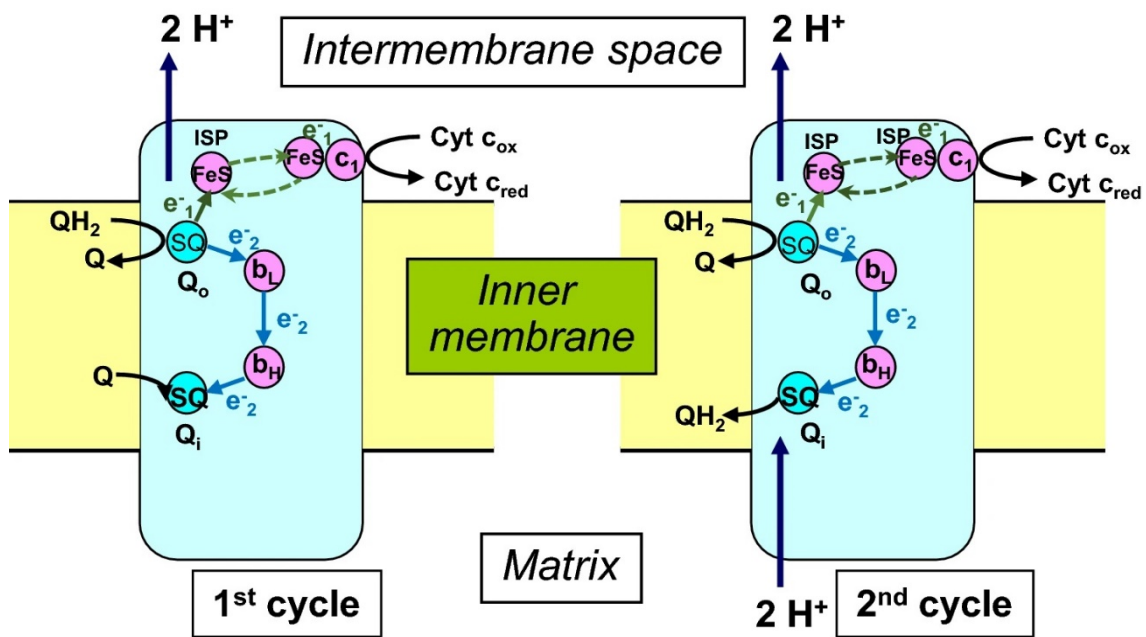
A CIII 11 protein alegységből épül fel, ebből 10 a sejtmagban, egy pedig a mitokondriális DNS-ben van kódolva. Két 11 fehérjéből álló alegység rendeződik egy komplexbe (Sun *et al.* 2003) és alkot egy funkcionális dimert (Hunte *et al.* 2000). Tíz mutációt azonosítottak 2015-ig különböző fehérjékben, melyek a CIII deficienciához köthetőek (Fernandez-Vizarra and Zeviani 2015). Valódi betegség ritkán kapcsolható a CIII károsodáshoz, mivel a mitokondriális betegségek által okozott tünetek nagy variabilitást mutatnak mind szervi előfordulásban mind súlyosságban, így a diagnózis specifikus tünetek hiányában nem egyszerű. Nemrégiben összegyűjtésre kerültek egyes tünetek, melyek valószínűsíthetik a CIII deficienciát (Fernandez-Vizarra and Zeviani 2015).

Jelenleg elfogadott elmélet, hogy a CIII működése során a korábban említett enzimiek által ubikinollá (QH₂, redukált ubikinon) redukált ubikinont oxidálja. Ezt az oxidációs folyamatot nevezzük „Q-ciklusnak”.

A Q-ciklus első lépése során az QH₂ a CIII Q_o oldalához kötődik, ahol a komplex citokróm bc₁ (cit bc₁) alegysége az QH₂ két elektronja közül az egyiket egy FeS komplexnek továbbítja, amely később a CIII citokróm c₁ (cit c₁) alegységét fogja redukálni, ami pedig a citokróm c-nek (cit c) fogja továbbadni az elektront. A Q_o oldalon így egy instabil semiquinon gyök marad vissza. Ezzel párhuzamosan két H⁺ kipumpálása történik. A keletkezett semiquinon normál körülmények között a második elektronját az alacsony potenciálú hemmel rendelkező citokróm b-nek (cit b_L) adja át, ami a magas potenciálú hemmel rendelkező citokróm b-n (cit b_H) keresztül a CIII Q_i oldalán megkötött oxidált ubikinont (Q) fog redukálni, ezzel párhuzamosan a Q_o oldalról disszociál a folyamat során keletkezett Q. Így a ciklus első felében a CIII Q_o oldalán egy QH₂ oxidációja, 2 H⁺ kipumpálása, és egy cit c redukciója történik, míg a CIII Q_i oldalán egy Q redukálódik semiquinon gyökké (ennek a fennmaradó semiquinonnak tulajdonítható a komplex III által termelt ROS jelentős része).

A Q-ciklus második lépés során a CIII Q_o oldalához egy másik QH₂ kötődik, ismét megtörténik a cit bc₁ alegységen a két 2 H⁺ kipumpálása, a cit c₁ alegységen keresztül a redukált cit c keletkezése, és a második elektron transzfere a cyt b_L-en és cyt b_H-n keresztül az CIII Q_i oldalához. Az ide érkező elektron redukálja a korábban

keletkezett semiquinon gyököt, ami a mátrixból származó két 2H^+ segítségével QH_2 -lá alakul vissza. Így a Q-ciklus második lépése során az elsőtől eltérően az QH_2 oxidációjával párhuzamosan a 2H^+ kipumpálásán és a redukált cit c keletkezésén kívül nem egy semiquinon gyök keletkezik (Q-ból), hanem az első lépés során kialakult semiquinon gyök fog az QH_2 második elektronjával és a mátrix 2H^+ -jával egy QH_2 -t képezni.



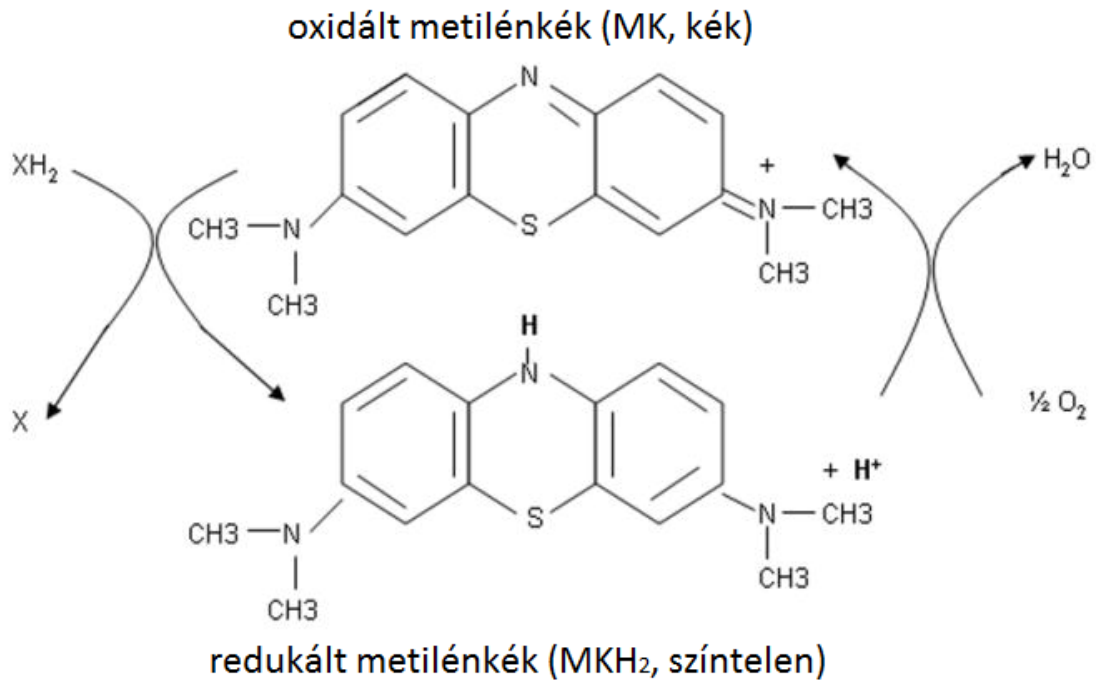
2. ábra: Q-ciklus működésének sémája (Mazat *et al.* 2020). Q: ubikinon, QH_2 : ubikinol, SQ: semikinon, Q_o : külső Q kötőhely, Q_i : belső Q kötőhely, b_L : alacsony potenciálú hemmel rendelkező citokróm *b*, b_H : magas potenciálú hemmel rendelkező citokróm *b*, ISP: vas-kén komplexet tartalmazó fehérje, FeS: vas-kén komplex, c_1 : citokróm c_1

A CIII egyike a mitokondrium legfontosabb reaktív oxigén származékot (ROS) termelő fehérjéinek (Brand 2010;Quinlan *et al.* 2012;Quinlan *et al.* 2013). A CIII antimycinnel vagy myxothiazollal történő gátlása esetén jelentős változást érhetünk el a komplex által termelt ROS mennyiségében (Perevoshchikova *et al.* 2013;Quinlan *et al.* 2011). Mivel ezek a gátlószerek a komplex III különböző részein, a „Q-ciklusban” fejtik ki hatásukat, ezért különböző módon képesek befolyásolni a CIII ROS termelését. Míg a Q_i oldalon gátolni képes vegyületek (antimycin A) a CIII által termelt ROS szint emelkedését okozzák, addig a Q_o oldalon gátolni képes vegyületek (myxothiazol, stigmatellin) a ROS szint csökkenését idézik elő (Bleier and Drose 2013).

1.2. Metilénkék

1.2.1. Történelmi áttekintés

A metilénkék MK egy anilin alapú festék, amit 1876-ban állítottak elő (Schirmer *et al.* 2011), ugyanis akkoriban a textilipar fejlődésének köszönhetően jelentős igény mutatkozott a különböző szintetikus festékek iránt (Oz *et al.* 2011). Ezt követően Hainrich August Bernthsen 1883-ban elsőként szintetizálta a fenotiazin vázat, ami a MK alapváza. A MK-et (ami oxidált formában kék, míg redukált formában színtelen) ugyan szövetfestő anyagként nem használták széles körben, azonban hamar felfigyeltek egyéb lehetséges alkalmazásaira. A MK kezelést 19. század végétől napjainkig széles spektrumon alkalmazták a legkülönbözőbb kórképekben. 1891-ben Guttman és Ehrlich már sikeresen használta a malária kezelésében a plazmodium falciparum ellen (Guttman and Ehrlich 1891), azonban a klorokvin (rezisztencia esetén a kinin/kinidin) terápia alkalmazásának következtében használata visszaszorult. Az 1890-es években pszichiátriai betegeken kezdték alkalmazni, ami 1951-ben az első szintetikus antipszichotikum (klórpromazin) felfedezéséhez vezetett (Ohlow and Moosmann 2011). Az 1900-as évek elején felfedezték, hogy a MK fototerápiás használata antimikrobiális hatással bír (Tuite and Kelly 1993; Wainwright and Crossley 2002). 1930-ban leírták, hogy a MK mind a normál, mind a tumoros szövetekben fokozza az oxigénfogyasztást (Barron 1930). Később a MK toxikus állapotokban történő alkalmazása került előtérbe: használatos methemoglobinémia (Clifton and Leikin 2003; Mansouri and Lurie 1993; Wendel 1939), ciánmérgezés (Alston 2014; Draize 1933) ifoszfamid enkefalopátia (Kupfer *et al.* 1996; Pelgrims *et al.* 2000) és szeptikus sokk (Preiser *et al.* 1995) terápiájában is.



3. ábra: A metilénkék képlete, oxidált és redukált forma (Bruchey and Gonzalez-Lima 2008).

1.2.2. Alternatív elektrontranszport

A metilénkék oxidált formában sötétkék, redukált formában színtelen, így redox indikátorként használható, emellett a körülményektől függően pro-, illetve antioxidáns hatással is rendelkezhet (Tarnok *et al.* 2008).

A metilénkék mitokondriális célpontjaival számos publikáció, míg az ETC-ra kifejtett jótékony hatásával az „alternatív elektrontranszport” néven ismert elmélet foglalkozik (Atamna *et al.* 2008; Wen *et al.* 2011). Az alternatív elektrontranszport alatt azt értjük, hogy az elektronok nem a mitokondriális ETC komplexein haladnak végig a NADH-tól a molekuláris oxigénig, hanem egy alternatív útvonalon, melyet a metilénkék biztosít számukra. Az elmélet szerint, a metilénkék képes átvenni az elektronokat a NADH-ról és/vagy a CI FMN funkciós csoportjáról ezt követően pedig redukálni a citokróm *c*-t, áthidalva ezzel a CI-et és a CIII-at (Atamna *et al.* 2008; Bruchey and Gonzalez-Lima 2008; Poteet *et al.* 2012; Rojas *et al.* 2012; Wen *et al.* 2011). Ezzel képes elősegíteni az elektronok áramlását azáltal, hogy áthidalja a mitokondriális ETC két komplexét, amelynek CI és CIII károsodás során nagy jelentősége van (Atamna *et al.* 2008; Bruchey and Gonzalez-Lima 2008; McCord and Fridovich 1970; Poteet *et al.*

2012;Rojas *et al.* 2012;Wen *et al.* 2011). Ezen tulajdonságának köszönhetően képes csökkenteni a rotenon sejtpusztító hatását a retina és a striatum neuronjaiban (Rojas *et al.* 2009;Rojas *et al.* 2012;Zhang *et al.* 2006).

A MK mitokondriális hatásai közé tartozik a CIV aktivitásának fokozása is (Atamna *et al.* 2008;Callaway *et al.* 2004;Gonzalez-Lima and Bruchey 2004;Poteet *et al.* 2012;Rojas *et al.* 2012). Ezt a jelenséget azzal lehet magyarázni, hogy MK hatására fokozódik az elektrontranszport, a citokróm *c* redukáltabbá válik, ami fokozza a CIV-en áthaladó elektronáramot (Atamna *et al.* 2008;Poteet *et al.* 2012). Ezt a felfedezést alátámasztja több eredmény is. 1) Riha és mtsi megfigyelték, hogy a leukometilénkék (redukált metilénkék) kezelés szignifikánsan képes fokozni az oxigénfogyasztást patkány agyon végzett kísérletekben *in vitro* és *in vivo* körülmények között is (Riha *et al.* 2005). 2) Atamna és mtsi is fokozott oxigénfogyasztást tapasztaltak fibroblaszt sejteken MK hozzáadását követően (Atamna *et al.* 2008). 3) Neuronális sejtek Seahorse műszerrel végzett vizsgálata során is fokozott oxigénfogyasztást és csökkent glikolízist lehetett látni (Poteet *et al.* 2012;Roy *et al.* 2015). 4) MRI és PET vizsgálatok során kimutatták, hogy a MK fokozta az agyi vérkeringést és a sejtek glükózfelvételét (Lin *et al.* 2012), ezáltal serkenti az agyi funkciókat. Farmakokinetikai tulajdonságainak köszönhetően a MK képes átjutni a vér-agy gáton, és a szisztémás keringésben mérhető koncentráció több mint 10-szeresét is képes elérni az idegrendszerben (Peter *et al.* 2000). Ezáltal potenciális vegyület lehet az idegrendszeri betegségeket célzó kezelésekben. Az 1970-es évek óta számos rágszálon illetve emberen végzett kutatás igazolja a MK memóriára kifejtett jótékony hatását, illetve neuroprotektív szerepét (Rojas *et al.* 2012).

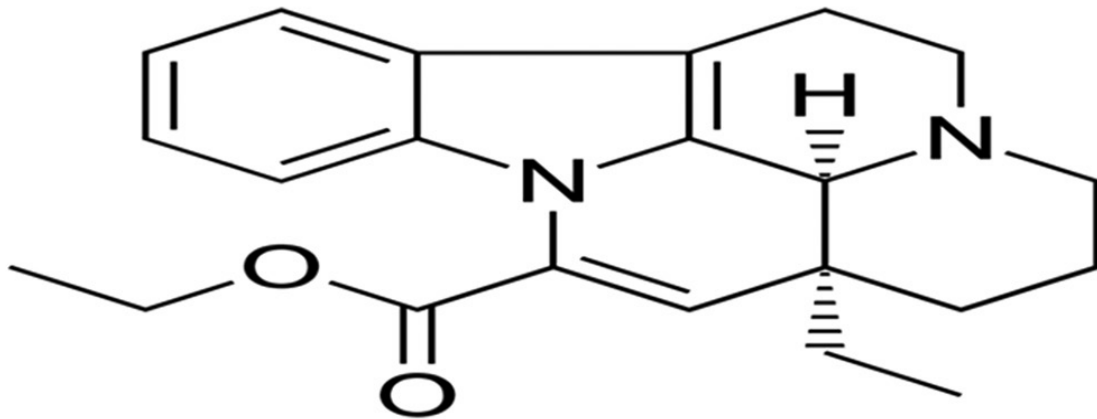
1.2.3. Korábbi, a témához köthető eredmények

Munkacsoportunk korábban megjelent tanulmányaiban, a MK bioenergetikai paraméterekre gyakorolt jótékony hatásáról ír CI és CIII gátolt agyi mitokondriumokon (Tretter *et al.* 2014; Komlódi and Tretter 2017; Mikulás *et al.* 2020). Nemrég azonban egy részben eltérő eredményt publikáltak (Gureev *et al.* 2019). Eredményeik szerint a MK nem képes áthidalni az antimycinnel gátolt CIII-at, amit azzal magyaráztak, hogy egerekben a MK az antimycin gátlási helyétől proximálisan kötődik a CIII-hoz. A szerzők a különböző kísérletekben kapott eltérő eredményeket azzal indokolták, hogy az

eltérés valószínűleg a vizsgált rágcsálófajok eltérő agyi mitokondriumai miatt jött létre. Az irodalom átnézését követően azonban nem találtunk arra utaló jelet, hogy jelentős kvalitatív eltérés lenne a különböző rágcsálók agyi mitokondriumainak bioenergetikai paramétereit között.

1.3. Vinpocetin

A vinpocetin egy szintetikus etil-észter, amit a kis meténg alkaloidjából, az apovincaminból állítottak elő (Alkuraishy *et al.* 2014). A vinpocetin mint hatóanyag, már több mint 40 éve került forgalomba. Ezalatt az idő alatt azt tapasztalták, hogy a szerkezet jól tolerálja a hosszan tartó használatát, emellett alkalmazása során csak enyhe mellékhatásokkal kell számolni (fejfájás, kipirulás, szorongás, szájszárazság, hányinger). A nem szelektív értágító hatása ellenére a vinpocetin nem csökkenti a vérnyomást a szisztémás keringésben sem akut, sem pedig krónikus használat során (Zhang *et al.* 2018). A vinpocetin felszívódása a bélből történik, ami a táplálékkal együtt fokozódik. Míg táplálék nélkül a hasznosulás 6,7 %, addig étkezéssel társítva 60-100 % (Manda *et al.* 2015).



4. ábra: A vinpocetin képlete (Al-Kuraishy *et al.* 2020).

Széles indikációs spektrumban használatos vegyület, alkalmazzák ischémiás neuronális károsodásnál (Nivison-Smith *et al.* 2015), strokeban (Bonoczki *et al.* 2002; Szobor and Klein 1992), agyi vérellátási zavarokban (Rischke and Kriegelstein 1991), neurodegeneratív betegségekben (Heckman *et al.* 2015; Medina 2011),

demenciában és más kognitív deficienciával járó kórképekben (Nivison-Smith *et al.* 2015; Paroczi *et al.* 1998). Emellett nagy előnye, hogy nem lép fel szignifikáns interakció más, szintén iszkémiás stroke-ban használt gyógyszerekkel (oxazepam, imipramin, glibenclamid) (Manda *et al.* 2015).

Az iszkémiás stroke az egyik leggyakoribb halálok a fejlett országokban, ami azonban még fontosabb, a strokeot követő maradandó idegrendszeri károsodás. A betegség számos rizikófaktorral rendelkezik, amelyek között nem befolyásolható (kor, nem, örökletes faktorok, alacsony születési súly) és befolyásolható (diabetes mellitus, magas vérnyomás, dohányzás, elhízás, alkoholizmus, orális fogamzásgátlók) tényezők is szerepelnek (Go *et al.* 2013). A stroke hátterében gyakran artériás plakkon kialakuló trombózis áll, ami ischémiát majd infarktust okoz, emellett az infarktussal határos területeken gyulladást hoz létre. A gyulladást követően megindul a szöveti regeneráció, azonban a stroke helyén maradandó károsodás alakul ki (Macrez *et al.* 2011). Ischémiás állapotban az erek szűkülete és/vagy elzáródása következtében a neuronok számára felvehető oxigén és glükóz mennyisége csökken, ami oxidatív stresszhez vezet. Ezt követően a neuronokban excitotoxikus folyamatok indulnak be, amik során a Ca^{2+} -felszabadulás hatására megtörténik a sejtek elhalása (Sidorov *et al.* 2019). Az elhalt sejtekből felszabaduló különböző proinflammatorikus faktorok hatására károsodik a vér-agy gát (Yang *et al.* 2019) és aktiválódnak a mikroglia sejtek, amelyek a gyulladás fokozásával további sejtpusztulást idéznek elő. Emellett a felszabaduló NF- κ B hatására az endotél simaizmaiban kontrakció következik be, ami fokozza az oxigén- és glükózhiányt.

A vinpocetin az I κ B kinázon keresztül gátolja az NF- κ B útvonalat, ezáltal neuroprotektív hatással bír (Jeon *et al.* 2010; Wu *et al.* 2017). Továbbá dózisfüggően képes gátolni a feszültségfüggő Na^+ és Ca^{2+} csatornákat, melynek következtében csökkenti az excitotoxicitást, az ödémát, és így a sejtpusztulást is (Erdo *et al.* 1996; Tretter and Adam-Vizi 1998). Számos megfigyelés támasztja alá, hogy az oxidatív stressz, az excitotoxicitás, és a rendellenes metabolizmus a neuronok halálához vezet. Azok a folyamatok, melyek cAMP (ciklikus adenzin-monofosztát) csökkenéshez vezetnek, csökkentik a BDNF (brain-derived neurotrophic factor) szintjét, ami az idegsejtek túlélésében játszik szerepet. A PDE1 (foszfodiészteráz-1) főként a striatum és az agykéreg sejtjeiben van jelen, ahol a motoros aktivációban vesz részt (Ahmed *et al.*

2018;Patyar *et al.* 2011). A vinpocetin azáltal, hogy gátolja a PDE1-et, elősegíti a cAMP szint fennmaradását, ezzel javítva a sejtek túlélését (Chiu *et al.* 1988;Hagiwara *et al.* 1984), emellett képes csökkenteni az asztrocita ödémát és az ingerelhetőséget a cAMP-dependens PKA (protein-kináz A) útvonalon keresztül (Vardjan N 2018). A vinpocetin továbbá fokozza a cGMP szintet, ami a kalmodulindependens foszfodiészterázok gátlásán keresztül vasodilatációt idéz elő, ezzel javítva az agy vér-, oxigén-, és glükózellátását, elősegítve a sejtek ATP-termelését. Humán vizsgálatok igazolták, hogy a vinpocetin javítja az agyi perfúziót és oxigénfelhasználást, ezzel megelőzve az állapotromlást a többszörös strokeos betegek esetén is, így a vinpocetint a mai napig használják Európa több országában (Zhang L. and Yang L. 2015).

A vinpocetin jótékony hatásai közé tartozik antioxidáns tulajdonsága is (Al-Kuraishy *et al.* 2019). A reaktív oxigén- és nitrogénszármazékok neuropatológiás szerepe abban rejlik, hogy képesek károsítani a sejtek különböző komponenseit, fehérjéket, lipideket és a DNS-t is. A ROS (szuperoxid, hidrogén-peroxid) termelés növekedése az antioxidáns rendszer kapacitásának csökkenését eredményezi. A vinpocetin antioxidáns tulajdonsága révén képes csökkenteni a ROS mennyiséget, így növelve az idegsejtek oxidatív stresszel szembeni ellenállását, és ebből kifolyólag csökken a lipidperoxidáció és az agyi károsodás mértéke (Slemmer *et al.* 2008). Ez a protektív hatás a kis és közepes vinpocetin dózisok esetén figyelhető meg, míg a magas dózisú vinpocetin fokozza az oxidatív stresszt, prooxidáns és proinflammatorikus hatásokon keresztül (Abdel-Salam OM *et al.* 2016). A vinpocetinnek megfigyelhető gyulladáscsökkentő hatása is, ami miatt szintén protektív hatással bír a központi idegrendszerben. Ischémiás stroke után elsősorban az idegrendszeri gyulladás vezet a másodlagos agykárosodáshoz. Ilyenkor a TLR-ok (toll-like receptor) fokozott expressziója következtében pro inflammatorikus faktorok szabadulnak fel (Gao *et al.* 2017). Ezeknek az útvonalaknak a gátlása az NF- κ B gátlás mellett neuroprotektív hatással bír. Leírták, hogy a vinpocetin gátolja a TNF- α (tumor nekrosis faktor α) által kiváltott NF- κ B aktivációt, a proinflammatorikus faktorok felszabadulását és a gyulladást markerek, mint az IL-1b és az IL-33 képződését kísérletes ischémiás modellben (Zhang *et al.* 2018), emellett atherosclerotikus állapotokban csökkenti a gyulladást citokinek felszabadulását mikrogliákból, makrofágokból és az endotélből (Zhang and Yang 2014). A mikrogliá sejtek az idegrendszer immunsejtjei, melyek

szükség esetén képesek részt venni a sérülés és a fertőzés elleni védekezésben, a gyulladás szabályozásában, emellett a mikroglia feladata az elhalt sejtek, szöveti törmelék eliminációja, majd ezt követően a neurogenesis megindítása és a neuroprotektív faktorok termelése. Másik oldalról nézve a mikroglia részt vesz a gyulladás kialakításában, különböző gyulladásos mediátorok TNF- α , IL-6, IL-1 β és NO felszabadításával (Ma *et al.* 2017). Korábban leírták, hogy vinpocetin hatására csökken a mikroglia aktivitása, és így az idegrendszeri gyulladás. Ezen felül ischémiás strokeot követően az látható, hogy vinpocetin hatására csökken az infarktus területe, ami főként az NF- κ B és a TNF- α expressziójában bekövetkező csökkenésnek tulajdonítható (Wang *et al.* 2014). A vinpocetin továbbá az ischémiás-reperfúziós károsodás csökkentésében is szerepet játszik azáltal, hogy gátolja a perivasculáris makrofágok aktivációját, amik a neuronális károsodás progressziójában kulcsszerepet töltenek be, illetve a gyulladásos citokinek felszabadításával részt vesznek a vér-agy gát károsításában. Emellett az aktivált makrofágok, T-sejtek és dendritikus sejtek beszűrik a károsodott területet, és kemotaktikus faktorok kibocsátásával neutrofil granulocitákat vonzanak a sérüléshez. A vinpocetin ischémiás stroke után gátolja a TNF- α által előidézett I κ B aktivációt a célgénexpressziójával és a gyulladásos faktorok felszabadulásának gátlásával (Jeon *et al.* 2010; Nivison-Smith *et al.* 2017).

A vinpocetin kezelésnek nem csak ischemia idején, hanem a károsodást követően is fontos szerepet tulajdonítanak. A gliasejtek posztischémiai körülmények között kapcsolatba lépnek a különböző immunsejtekkel (makrofágok, limfociták, neutrofil granulociták) és így modulálják az immunreakciót, helyreállítva a homeosztázist, és megelőzve a további neuronális károsodást. Ebben kulcsszerepet játszik a TGF- β és az IL-10, ami elősegíti a válaszreakciót (Yan *et al.* 2009). Tapasztalható ugyanakkor, hogy az ischémiás stroke aktiválja a gyulladást, növeli a vér-agy gát permeabilitását a makrofágokon keresztül, amik hisztamin és más gyulladásos mediátorok kibocsátásával további immunsejteket vonzanak, ezzel fokozva az ischémiás károsodást (Lambertsen *et al.* 2019). Ennek hátterében a mikroglia sejtek különböző differenciálódása játszhat szerepet, mint a klasszikus útvonal (M1) illetve az alternatív útvonal (M2). Az M1 útvonal hatására aktiválódik az indukálható NO-szintáz és a TNF- α , ami a neuronális károsodást okozza. Ezzel szemben M2 aktiváció esetén a sejtekben argináz aktiváció és neuroprotektív citokinek felszabadulása következik be

(Xu *et al.* 2016). Öregedés során károsodik az M2 aktiváció, így az M1 differenciáción átesett sejtek hatása fokozottan érvényesül, ami fokozza az ischémiás károsodást az idősebb betegekben (Lee *et al.* 2013). A mikrogliahoz hasonlóan az asztrociták is képesek aktiválódni stroke esetén. Az asztrociták A1 differenciálódást követően képesek fokozni a neuronális károsodást a komplementrendszer aktivációjával, míg A2 differenciálódás után a neuronok növekedését elősegítő faktorokat képes termelni (Liu and Chopp 2016). A strokeot követő egy hónapban az asztrociták a károsodás helyén aktiválódnak, és egy fokozott gliózis figyelhető meg (Pekny *et al.* 2019). Megfigyelték, hogy a különböző gliasejtek aktivációja által kiváltott gyulladásban bekövetkezett változások a strokeot követő időszakban szövődményeket képesek előidézni, ilyen például a depresszió, epilepszia, demencia és a kognitív károsodás (Ahangar AA *et al.* 2018). Ismert, hogy a vinpocetinnek említésre méltó antioxidáns, gyulladáscsökkentő és antiapoptotikus hatása van mind a mikroglia, mind az asztrocita sejtekre a stroke alatt és azt követően is. Ezen felül a vinpocetin képes csökkenteni a neutrofilek toborzását és a mieloperoxidáz aktivitást egerekben (Jeon *et al.* 2010). Ezért feltételezhető, hogy a vinpocetin mind a stroke alatt, mind a strokeot követően hatékonyan képes gátolni a központi idegrendszer gyulladási folyamatait (Zhuang *et al.* 2013).

A fenti leírásból látható, hogy a vinpocetin több évtizedes alkalmazása során számos célpontját és működési mechanizmusát azonosították mind a központi idegrendszerben átfogóan, mind sejtek szintjén. Már korai vizsgálatok is bemutatták, hogy a mitokondrium potenciális célpontja lehet a vinpocetinnek, mivel a neuronális mitokondriumok ROS termelésükkel hozzájárulnak az ischémiás-reperfúziós károsodáshoz a glutamát excitotoxicitás révén (Colombo *et al.* 2018), a vinpocetin azáltal, hogy képes kötődni a perifériás benzodiazepin receptorokhoz, ezáltal képes gátolni a mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus (mPTP) nyitását (Tarnok *et al.* 2008). Emellett a vinpocetin gátolja a mitokondriális membrán depolarizációját, gátolja a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cserét, megelőzi a mitokondriális Ca^{2+} felszabadulását és a ROS felszabadulását a neuronális károsodás alatt (Nag *et al.* 2019).

Jelen disszertáció a fent leírtakon túl a vinpocetin további mitokondriális hatásainak vizsgálatára fókuszál.

2. Célkitűzés

2.1. Metilénkék

Célunk a metilénkéssel kapcsolatos kísérletekkel az volt, hogy újra megvizsgáljuk, hogy a mitokondriális CIII különböző részeinek gátlása áthidalható-e MK segítségével. A rágcsálófajspecifikus problémák megválaszolása érdekében három különböző fajon végeztünk kísérleteket (egér, patkány, tengerimalac). Modellrendszeren és a rágcsálók agyából preparált mitokondriumokon azt vizsgáltuk, hogy a MK képes-e a CIII-tól disztálisan, közvetlenül a citokróm *c*-nek átadni az elektronjait. Azon felül, hogy megerősítettük korábbi elméletünket, miszerint a CIII inhibitorral (antimycin vagy myxothiazol) kezelt agyi mitokondriumokban a MK képes áthidalni a CIII gátlást, szeretnénk volna megvizsgálni, hogy:

- Van-e különbség az egyes rágcsálófajok mitokondriumainak MK-re adott válaszreakciói között?
- A MK képes-e közvetlenül a citokróm *c*-nek átadni az elektronokat?

Kísérleteink során a gátlószerek és MK egyidejű jelenlétében a kontroll vagy gátlószert kapott mitokondriumok esetében jelentősen eltérő hatást tapasztaltunk, melyek újabb kérdéseket vetettek fel:

- Mi okozza a mitokondrium ADP-re és az adenin-nukleotid-transzlokáz (ANT) gátlószere, karboxi-atraktilátra (CAT) kialakuló szokatlan bioenergetikai hatást CIII inhibitor (myxothiazol vagy antimycin) és MK jelenlétében?
- Hogyan változik a MK lokalizációja és biológiai hatása az oxidáltsági állapotának függvényében?

2.2. Vinpocetin

Az értekezés másik nagy témája a vinpocetin vizsgálata, melyben a célunk a vinpocetin három különböző szinten történő vizsgálata volt: celluláris (primer agyi és endotél sejt kultúrákon), izolált idegvégződéseken (szinaptoszómákon) és izolált rágcső agyi mitokondriumokon. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a vinpocetin:

- Hogyan befolyásolja az agyi kapilláris endotélsejtek mitokondriumainak Ca^{2+} felvételét és leadását?
- Van-e protektív hatása a glutamát toxicitással szemben?
- Milyen hatással van a szinaptoszómák oxigénfogyasztására és H_2O_2 termelésére?
- Befolyásolja-e a mitokondrium bioenergetikai paramétereit (oxigénfogyasztás, membránpotenciál, H_2O_2 termelés, ATP-szintézis, ATP-áz aktivitás, Ca^{2+} homeosztázis és duzzadás)?

3. Módszerek

3.1. Vegyszerek, mérőoldat

A méréseinkhez használt vegyszereket az ADP kivételével a Sigma-tól (St. Louis, MO, USA), az ADP-t pedig a Merck-től (Darmstadt, Germany) szereztük be. A méréseinkhez használt standard mérőoldat összetétele mM-ban: 125 KCl, 20 Hepes, 2 K₂HPO₄, 1 MgCl₂, 0,1 EGTA, 0,025% zsírsav mentes BSA, pH 7,0 (KOH). A BSA használata elengedhetetlen, különben a mitokondriumok gyorsan elveszítik a funkcionalitásukat a szabad zsírsavak jelenlétében (Tretter et al. 2007).

3.2. Agy mitokondriumok izolálása

Az agy mitokondriumok izolálását három különböző rágcsálófajból (egér, patkány, tengerimalac) valósítottuk meg. Az állatok tartását és dekapitálását az orvosbiológiai kutatások állatokra vonatkozó nemzetközi irányelvei (International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals) és a Semmelweis Egyetem állatkísérletekre vonatkozó szabályai (Guidelines for Animal Experiments at Semmelweis University) szerint végeztük. A 2010. szeptember 22-én kelt 2010/63-as EU rendelet értelmében, abban az esetben, ha a kísérleti állatok tartása és leölése szerveik vagy szöveteik felhasználása céljából történik, nem szükséges külön etikai engedély (Chapter 1, Article 3, Definitions 1, Paragraph 2).

A rágcsálók agyát a dekapitációt követően *A pufferben* (225 mM mannitol, 75 mM szukróz, 5 mM HEPES, 1 mM EGTA, pH = 7.0) feldaraboltuk, Potter-Elvehjem homogenizátorral homogenizáltuk, majd ezt követően 3 percig 1,300 g mellett centrifugáltuk. A felülúszó újbóli centrifugálását követően (10 percig, 20,000 g mellett) a csapadékot 15 %-os Percoll oldatban szuszpendáltuk. Az így kapott szuszpenzióval egy Percoll-gradienst készítettünk. Legalulra 40 %-os, fölötte 23 %-os Percoll oldatot, majd ennek tetejére a 15 %-os Percollban oldott mintát rétegeztük rá. Az így kapott gradienst 8 percen keresztül 30,700 g-n centrifugáltuk és fékezés nélkül állítottuk le. A mitokondriális (alsó) frakciót a Percoll oldat eltávolítása után „A” pufferben szuszpendáltuk, majd 10 percig 16,600 g-n centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítását követően a csapadékot ismét szuszpendáltuk *A pufferben*, és további 10 percig 6,300 g mellett centrifugáltuk. Az utolsó centrifugálást és a felülúszó eltávolítását követően a

csapadékot (EGTA-mentes) *B pufferben* szuszpendáltuk (225 mM mannitol, 75 mM szukróz, 5 mM HEPES; pH = 7.4) (Rosenthal *et al.* 1987;Tretter *et al.* 2007). A teljes folyamatot jégen végeztük. A preparálást követően a mitokondriális fehérje mennyiségét módosított Biuret reakcióval (Bradford 1976) határoztuk meg (~30 mg/ml fehérje). A mitokondriumok a preparálást követő 4-6 órán belül kerültek felhasználásra.

3.3. Sejtkultúrák izolálása

Az agyi kapilláris endotél sejtek 3-5 hónapos Wistar patkányokból származtak, melyeket extracelluláris mátrixszal bevont fedőlemezekben növesztettünk (Domotor *et al.* 1999). A sejteket DMEM oldatban tartottuk, mely 17 % plazmából származó BSA-t (First Link, UK), 2 mM glutamint, 80 µg/ml heparint, 150 µg/ml endotélsejt fejlődést segítő adalékot (Sigma), antibiotikumokat, nyomelemeket (C-vitamin, szelén), inzulint, transferrint és glutationt tartalmazott. Kísérleteinket a konfluens állapot elérésekor (6-10 nap után) végeztük a primer sejtkultúrán.

A primer neuron-dús sejtkultúrákat E17 Wistar patkány embriókból izoláltuk. A sejteket 6 mm-es L-poliornitinnel plusz lamininnel bevont 12 well-t tartalmazó lemezen vagy D-polilizinnel bevont Petri csészében tartottuk Neurobasal médiumban (Invitrogen, Carlsbad, CA), melyet 2 % B27 adalékkal és 2 mM glutaminnal egészítettünk ki és 8-12 napig 37 °C-on 5 % CO₂ jelenlétében tároltunk (Chinopoulos *et al.* 2004).

3.4. Szinaptoszómák izolálása patkány agyból

A szinaptoszómák izolálása patkány agykéregből történt (Hajos 1975). A szinaptoszóma frakciót a szukróz (0,8 M) grádienssel történő centrifugálás során kaptuk. A szukrózt jéghideg desztillált vízben oldottuk (0,32 M), majd 20000 rpm fordulatszámra 20 percig ülepítettük a szinaptoszómákat. A csapadék fehérje koncentrációja 20 mg/ml körüli értéket adott. A szinaptoszómákat a használatukig jégen tartottuk.

A szinaptoszómák inkubációját és a kísérletet 37 °C-on standard extracelluláris médiumban végeztük, melynek összetétele (mM): 140 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 glükóz, 10 PIPES, pH=7,38. A szinaptoszómák bioenergetikai paraméterei ezt követően legalább 6 órán keresztül vizsgálhatóak.

3.5. A mitokondrium és a szinaptoszóma oxigénfogyasztásának meghatározása

A szinaptoszóma és a mitokondrium oxigénfogyasztását egy nagy felbontású Clark-típusú elektróddal működő respirométerrel vizsgáltuk (Oxygraph 2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria) (Doerrier *et al.* 2018) 37 °C-on, 2 ml térfogatú kamrákban, állandó kevertetés mellett. Az oxigénelektrodot 100 %-ra (levegő O₂ koncentrációja) és 0 %-ra (ditiónit) kalibráltuk.

A méréseket standard mérőoldatban (lásd. 3.1. Vegyszerek, mérőoldat) végeztük. A mérésekhez használt fehérje koncentrációja néhány kivételtől eltekintve mitokondriumoknál 0,1 mg/ml, míg a szinaptoszóma esetében 2 mg/ml volt. A mitokondriumokat piruvát-malát (5-5 mM), glutamát-malát (5-5 mM) vagy szukcinát (5 mM) szubsztráttal, míg a szinaptoszómákat glükózzal (10 mM) energetizáltunk.

Az eredmények feldolgozása DatLab 4 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria) szoftverrel történt. Az oxigénfogyasztást az oxigénkoncentráció negatív deriváltjaként adtuk meg.

3.6. A mitokondriális membránpotenciál meghatározása

A mitokondriális membránpotenciált ($\Delta\Psi_m$) három különböző módszerrel, TPP⁺ elektróddal, safranin O fluoreszcenciával és ratiometrikus módon TMRM fluoreszcenciával vizsgáltuk.

3.6.1. TPP⁺ elektród

A $\Delta\Psi_m$ mérésének egyik módja a tetrafenilfoszfónium (TPP⁺) elektród használata (Kamo *et al.* 1979). A TPP⁺ egy lipofil kation, ami képes átjutni a membránon. A TPP⁺ elektróddal a TPP⁺ extramitokondriális koncentrációját tudjuk mérni. Ismerve az össz TPP⁺ mennyiségét (2 μ M), a $\Delta\Psi_m$ a Nerst-egyenlet segítségével kiszámolható.

3.6.2. Safranin fluoreszcencia

A safranin egy pozitív töltésű vegyület, amelyet a mitokondrium a $\Delta\Psi_m$ függvényében képes felvenni (Akerman and Wikstrom 1976; Figueira *et al.* 2012). A mitokondriális membrán hiperpolarizálódására a safranin fluoreszcencia intenzitása csökken, mivel a safranin oligomerek elnyelik a monomerek által kibocsátott fényt a

mitokondrium mátrixban. Méréseink 37 °C-on 495 nm excitációs és 585 nm emissziós hullámhosszon végeztük PTI Deltascan fluoreszcens spektrofotométerrel (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA) (Komary *et al.* 2008). A méréseinket *standard mérőoldatban* (lásd. 3.1. Vegyszerek, mérőoldat) végeztük, 0,1 mg/ml mitokondriális fehérjét, 2 µM safranint és piruvát-malát (5-5 mM) szubsztrátot használtunk.

Egyes mérések során az Oroboros O2k műszer O2k- Fluo LED2 Module (Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria) segítségével párhuzamosan tudtuk detektálni az oxigénfogyasztást és a $\Delta\Psi_m$ -t. A fluoreszcens spektrofotométer (PTI Deltascan) és az Oroboros O2k által detektált eredmények megegyeztek.

3.6.3. TMRM fluoreszcencia

A $\Delta\Psi_m$ detektálásának másik módja tetrametil-rhodamine-metil-észter (TMRM) használatával ratiometrikus módon történt (Scaduto, Jr. and Grotyohann 1999; Tretter *et al.* 2007). A mérés során *dual excitation ratiometric mode*-ban használtuk a fluoreszcens spektrofotométert (PTI Deltascan, Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA), ahol két excitációs (546 és 573 nm) és egy emissziós (590 nm) hullámhosszt állítottunk be. Ezt követően kiszámoltuk az 546-590 nm-es és az 573-590 nm-es hullámhosszakon mért fluoreszcens intenzitás hányadosát. Ennek előnye, hogy mivel azonos mintát vizsgálunk, az osztás utáni arány normalizálva lesz az optikai úthosszra, a koncentrációra, a megvilágítás intenzitására és a „fotobleaching”-re is. Emellett az 573 nm-es és az 546 nm-es hullámhosszon gerjesztett TMRM fluoreszcencia intenzitása a $\Delta\Psi_m$ változása során ellentétesen változik, ezért ezek hányadosát vizsgálva nagyobb jelet kapunk (Scaduto, Jr. and Grotyohann 1999).

3.7. A NAD(P)H redoxállapot meghatározása

A NAD(P)H autofluoreszcenciát 344 nm excitációs és 460 nm emissziós hullámhosszon vizsgáltuk 37 °C-on PTI Deltascan fluoreszcens spektrofotométerrel (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA). Méréseinket *standard mérőoldatban* (lásd. 3.1. Vegyszerek, mérőoldat) végeztük, 0,1 mg/ml mitokondriumot és piruvát-malát szubsztrátot (5-5 mM) alkalmaztunk). A NAD(P)H szint változásának detektálását követően 10^3 -szeres fotonszámot ábrázoltuk. A NADH és a NADPH

fluoreszcencia nem választható el egymástól ezzel a módszerrel. Azonban a NAD^+ - NADH pool egy nagyságrenddel nagyobb, mint a NADP^+ - NADPH pool, ezért a mérés során tapasztalt fluoreszcencia változásában a NADH -szint változása a meghatározó.

3.8. A metilénkék oxidoredukciós állapotának meghatározása

A MK oxidáltsági állapotát 660 nm-en vizsgáltuk, mivel a MK oxidált formája ezen a hullámhosszon rendelkezik abszorpciós maximummal, és ebben eltér a redukált MK spektrumától. Méréseink JASCO V-650 spektrofotométerrel (ABL&E-JASCO, Tokió, Japán) (Gorman and Shnider 1988), 37 °C-on, *standard mérőoldatban* (lásd. 3.1. Vegyszerek, mérőoldat) végeztük, 0,1 mg/ml mitokondriumot, piruvát-malát szubsztrátot (PM, 5-5 mM) és 2 μM MK-et használtunk. A megjelenítés során a MK-t tartalmazó mérés eredményéből kivontuk a MK-t nem tartalmazó mérés eredményét, így ki tudtuk szűrni a MK oxidációjától független változásokat.

3.9. A metilénkék elhelyezkedésének vizsgálata

A MK elhelyezkedésének (intra- vagy extramitokondriális) meghatározását JASCO V-650 spektrofotométerrel (ABL&E-JASCO, Tokió, Japán), 37 °C-on végeztük. A méréshez használt mitokondriális fehérje koncentrációja 0,4 mg/ml volt, melyet egy percre MK-vel (2 μM) inkubáltunk. Ezt követően 3 perc múlva PM (5-5 mM) szubsztrátot, majd ismét 3 perc múlva karbonil-cianid-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazon (FCCP, 250 nM) szétkapcsolószert adtunk, és ezzel párhuzamosan detektáltuk az abszorbanciát 660 nm-en. A szubsztrátok és a szétkapcsolószert előtt, illetve a szétkapcsolószert követően 3 perccel mintát vettünk a mérőküvetéből, és ezeket a mintákat 2 percen keresztül 14,300 g mellett centrifugáltuk, majd megmértük a mitokondriummentes felülúszók abszorbanciáját (felülúszó 1, 2, 3). Ezután a felülúszókat levegővel átbuborékolattuk, ezzel teljesen oxidáltuk, majd ditionitot adva teljesen redukáltuk a felülúszóban található MK-t. Így meg tudtuk állapítani, hogy a felülúszó mennyi MK-t tartalmazott, amiből következtetni lehet a mitokondrium által felvett MK mennyiségére.

3.10.A mitokondrium és szinaptoszóma H₂O₂ termelésének vizsgálata

A mitokondrium és a szinaptoszóma H₂O₂ termelését torma peroxidázzal (5 U/2 ml) és Amplex UltraRed (3 μM) festékkel vizsgáltuk (Tretter *et al.* 2007). Az Amplex UltraRed a torma peroxidáz hatására H₂O₂ jelenlétében a fluoreszcens resorufinná alakul. Kísérleteinkben 0,1 mg/ml mitokondrium és 0.5 mg/ml szinaptoszóma koncentrációt alkalmaztunk. A méréshez PTI Deltascan fluoreszcens spektrofotométert (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA) használtunk 550 nm excitációs és 585 nm emissziós hullámhosszon. Minden mérést ismert mennyiségű H₂O₂-dal kalibráltunk.

3.11.A mitokondriális ATP szintézis kinetikai vizsgálata

A mitokondriális ATP szintézis kinetikáját kapcsolt enzimreakcióval vizsgáltuk hexokináz és glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz segítségével (Komlodi and Tretter 2017;Williamson and Corkey 1979). A mitokondriumokat (0,05 mg/ml) a standard mérőoldatban (lásd. 3.1. Vegyszerek, mérőoldat) inkubáltuk. A médiumhoz (2 ml) NADP⁺-ot (3 mM,) hexokinázt (HK, 1,5 U), glükóz-6-foszfát-dehidrogenázt (G6PDH, 0,5 U), glükózt (5 mM), ADP-t (2 mM), AP5-öt (P¹,P⁵-Di(adenosine-5')pentafoszfát, adenilát-kináz (AK) inhibitor, 200 μM) adtunk (Melnick 1979). Mitokondriumok jelenlétében az ADP és a légzési szubsztrát glutamát-malát (GM) ATP-vé alakul, aminek jelentős része elhagyja a mitokondriumot az ANT-n keresztül. Az ATP-t felhasználva a HK glükóz-6-foszfátot állít elő glükózból, melyet a G6PDH fog oxidálni 6-foszfoglükonáttá, ezzel párhuzamosan pedig NADP⁺-ot redukál NADPH-tá. A keletkező NADPH sztöchiometriailag egyenlő a felhasznált ATP mennyiségével, amely a mitokondriumból származott. A NADPH abszorbanciáját 340 nm-es hullámhosszon, 37 °C-on vizsgáljuk JASCO V-650 spektrofotométeren (ABL&E-JASCO, Tokió, Japán). A kalibrációhoz ATP standardot használtunk.

3.12.Az ATP-áz aktivitás mérése

A mitokondrium ATP hidrolízisét légzési szubsztrát hiányában kapcsolt enzimreakcióval vizsgáljuk (Teruel *et al.* 1986). A standard mérőoldathoz (lásd. 3.1. Vegyszerek, mérőoldat) NADH-t (300 μM), laktát-dehidrogenázt (LDH; 2 U/ml),

piruvát-kinázt (PK; 2 U/ml), foszfoenol-piruvátot (PEP; 2mM), ATP-t (0,5 mM) és rotenont (1 μ M) adtunk. Az ATP hidrolízise során keletkező ADP-t a PK foszforilálja ATP-vé, ezzel párhuzamosan a PEP-ot piruváttá alakítja. A keletkező piruvátból a LDH tejsavat állít elő, ezzel párhuzamosan NADH-t oxidál. A NADH fogyás és a hidrolizált ATP sztöchiometriája 1:1. A NADH abszorbanciájának csökkenését 340 nm-es hullámhosszon, 37 °C-on vizsgáljuk JASCO V-650 spektrofotométeren (ABL&E-JASCO, Tokió, Japán). A mérést ismert mennyiségű ADP-vel kalibráltuk.

3.13.A mitokondriális kalcium tranziens meghatározása

In situ mitokondriális és citoplazmatikus kalcium méréseket Wistar patkányok agyi kapillaris endotél sejtjein végeztük el (3.2 fejezet) X-Rhod-1-AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) segítségével (Gerencser AA and Adam-Vizi 2001). A mitokondriális kalcium tranziens ($[Ca^{2+}]_m$) térbeli eloszlását egy Micromax digitális CCD kamerával (Nikon Diaphot 200, Princeton Instruments) készített képeken, és egy felül áteresztő fluoreszcens képekhez használatos szűrővel („the original X-rhod-1 mito filter.flt”) vizsgáltuk az Image Analyst MKII programmal (Image Analyst Software, Novato, CA, USA). A citoplazmatikus kalcium tranziens ($[Ca^{2+}]_c$) ugyanazon a képen vizsgáltuk X-Rhod-1 fluoreszcenciával a sejtmagi régióban. Ezt követően meghatároztuk a csúcs intenzitást, és a felezési időt ($\tau_{1/2}$), ami a csúcs intenzitás és csúcs intenzitás felére csökkenése között eltelt idő.

Fluorimetriás vizsgálatokkal tudjuk mérni a lehetséges optikai vagy kémiai kölcsönhatásokat a vinpocetin és a kalciumszenzitív fluoreszcens festék (X-Rhod-1, Fura-FF) között, hogy kizárjuk a lehetséges artefaktokat, amik a fluoreszcencia megváltozását okozhatják. A vinpocetin vizes oldatának fluoreszcenciája elhanyagolható mértékű mind a Fura-FF 510 nm-es (elnyelés: 340/380 nm) mind az X-Rhod-1 570 nm-es (elnyelés: 535) kisugárzási tartományában. 30 μ M vinpocetinnek nem volt hatása sem az oldott X-Rhod-1, se a Fura-FF fluoreszcenciájára, se magas kalcium tartalmú (40 μ M), se kalciummentes oldatban (pH = 7.4, 37 °C).

3.14.A késleltetett kalcium dereguláció mérése izolált patkány agy neuronokon

A time-lapse fluoreszcens mikroszkópiát a primer kérgi neuron kultúrákon végeztük a fenti fluoreszcens mikroszkóp beállítással UAPO 20 × dry 0.75 NA (20-szoros nagyítás, 0,75-ös numerikus apertúra) lencsével. A sejteket 15 percig, 37 °C-on, Fura-FF-AM festékkel (3 μM) inkubáltuk. Fura-FF fluoreszcencia arányt vizsgáltuk, amihez 340/10 (közép/sávszélesség hullámhossz nm-ben) és 380/10 gerjesztést (Chroma, Rockingham, VT, USA), egy 400DCLP dikroikus tükröt és egy 470LP felül áteresztő szűrőt (Omega Optical, Brattleboro, VT, USA) használtunk (Chinopoulos *et al.* 2004).

3.15.A mitokondrium kalcium felvételének vizsgálata

A mitokondriumokat (0,05 mg/ml) az alábbi reakcióelegyben inkubáltuk (mM): 8 KCl, 110 K-glukonát, 10 NaCl, 10 HEPES, 2 KH₂PO₄, 4 MgCl₂, 10 mannitol, 5 glutamát, 5 malát, 3 ATP, 0,25 ADP, pH 7,25 (KOH) kiegészítve 0,025%-os BSA-val. A szabad kalciumkoncentráció meghatározása a WinMAXC szoftverrel (Gunter and Pfeiffer 1990; Schoenmakers *et al.* 1992) történt. Ca²⁺-ot (CaCl₂) adtunk a mitokondriumokhoz 12,5 μM-os adagokban. A médium Ca²⁺ koncentrációját Calcium-Green 5N (K_D = 4,29 μM) festékkel követtük nyomon. A Calcium-Green fluoreszcencia excitációs hullámhossza 505 nm, emissziós hullámhossza pedig 535 nm.

3.16.A mitokondriális duzzadás vizsgálata

Az izolált mitokondriumok duzzadásából következtetni lehet a mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus (mPTP) nyitására (Gunter and Pfeiffer 1990; Zoratti and Szabo 1995). A fényszórás 590 nm-en detektálható és párhuzamosan követhető a mitokondrium Ca²⁺ felvételével a PTI Deltascan fluoreszcens spektrofotométeren *dual excitation dual emission* módban használva. Minden mérés végeztével alameticint (pórusképző fehérje, 80 μg/2 ml) adtunk a maximális duzzadás eléréséhez.

3.17.Statisztika

Az adatok ábrázolása során az átlag \pm S.E.M.-t használtunk. A statisztikai különbségeket ANOVA-val (SIGMASTAT; Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) vizsgáltuk. Az egyszerű összehasonlítások esetében Student's t-próbát alkalmaztunk. Vizsgálatainkban a különbségeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1. Metilénkék

4.1.1. A metilénkék hatása a mitokondriális oxigénfogyasztásra rágcsálókából izolált agyi mitokondriumokban komplex III gátlás esetén

A mitokondriális bioenergetika jellemzése során érzékeny paraméter az oxigénfogyasztás mértéke. A légzés vizsgálatához három különböző rágcsáló (egér, patkány, tengerimalac) agyából izoláltunk mitokondriumokat, melyek légzését kétféle légzési szubsztrát kombinációval, piruvát+maláttal (PM) és glutamát+maláttal (GM) támogattuk, és emellett két különböző komplex III (CIII) gátlószert (myxothiazol és antimycin) alkalmaztunk. A mérés során különböző légzést befolyásoló anyagokat adtunk és figyeltük a mitokondriális légzés sebességének változását. Először ADP-t adtunk, ami az akceptor kontroll segítségével fokozta a légzést. Ezt követte karboxiatrakitilozid (CAT) hozzáadása, ami az ANT gátlószere, aminek hatására a külsőleg hozzáadott ADP nem képes kicserélődni a mátrixban szintetizálódott ATP-vel, így megszűnik az ATP-szintáz reakcióhoz szükséges szubsztrát (ADP) utánpótlás, ami a protonok intermembrán térben történő felhalmozódásához és ezzel párhuzamosan az ETC lassulásához vezet, ami a csökkent oxigénfogyasztásban nyilvánul meg. Az ANT gátlást követően FCCP-t adtunk, amivel szétkapcsoltuk a mitokondriumokat, ami gátlószert hiányában az oxigénfogyasztás fokozódást váltotta ki (5. ábra (E)).

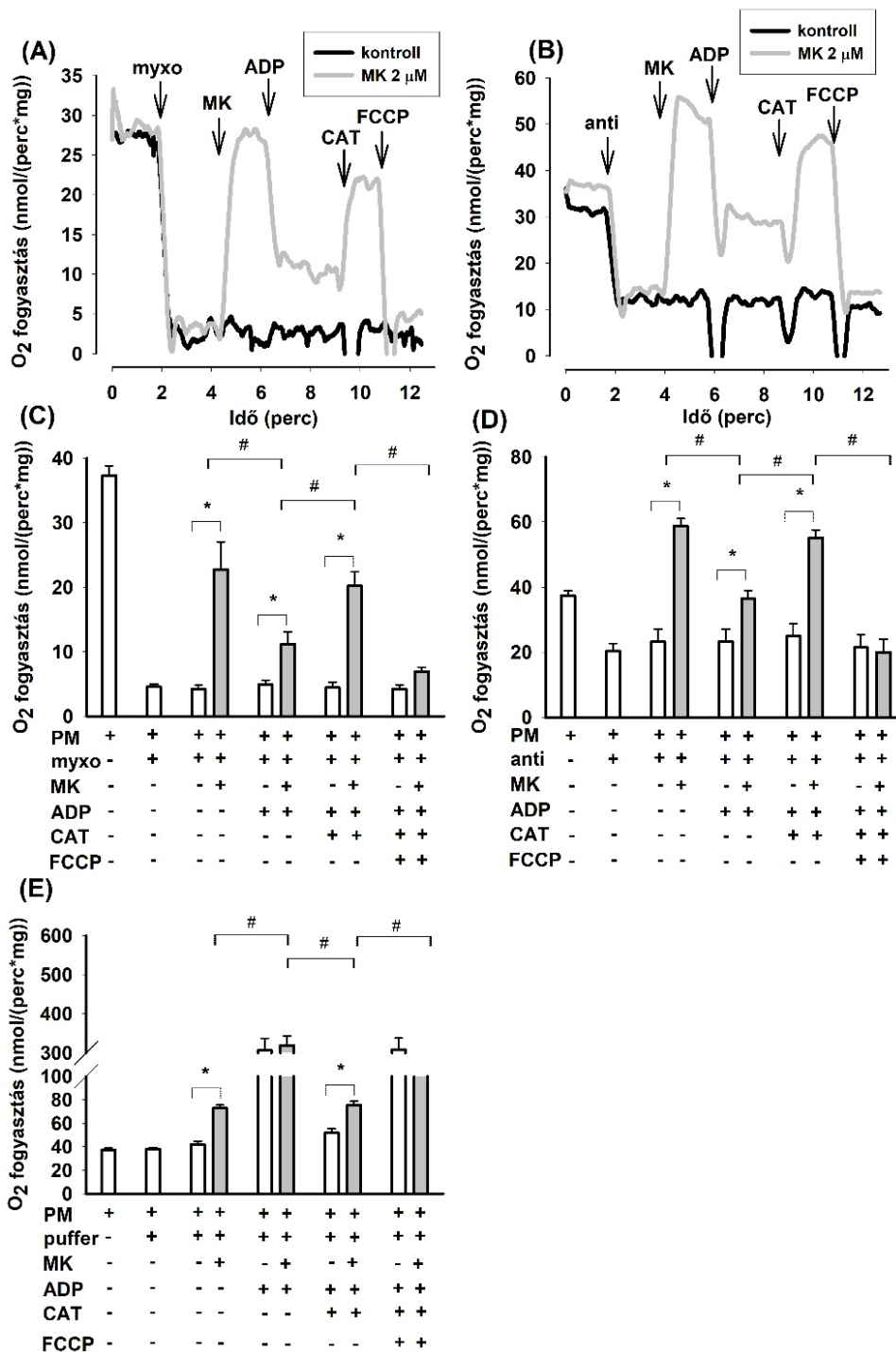
Régóta ismert az a tény, hogy a PM szubsztráttal lélegeztetett antimycinnel kezelt (CIII gátolt) mitokondriumok oxigénfogyasztása csökken (Tretter *et al.* 2014; Von Jagow G and Bohrer C 1975). Ismételt vizsgálat során hasonló eredményeket kaptunk, majd MK (2 μ M) hozzáadás hatására 60 %-kal nőtt az antimycinnel gátolt mitokondriumok oxigénfogyasztása (5. ábra (B) egy reprezentatív görbét, 5. ábra (D) a statisztikai adatokat ($36,7 \pm 2,0 \rightarrow 58,7 \pm 2,3$ nmol/perc/mg fehérje) jeleníti meg). Ezután ADP hozzáadása az antimycinnel kezelt mitokondriumoknál MK nélkül nem okozott szignifikáns változást, azonban az ADP a MK által stimulált légzést csökkentette ($58,7 \pm 2,3 \rightarrow 36,4 \pm 2,6$ nmol/perc/mg fehérje). A CAT (ANT-gátló) szignifikáns ($36,4 \pm 2,6 \rightarrow 55,1 \pm 2,4$ nmol/perc/mg fehérje, 51%) oxigénfogyasztás emelkedést okozott az antimycin + metilénkék + ADP hozzáadását követően a

metilénkéssel kezelt egér agy mitokondriumokon. Az ADP-re bekövetkező légzéseszkökenés, illetve a CAT által kiváltott légzésfokozódás egy szokatlan jelenség. Ezt követően szétkapcsolószert (FCCP) alkalmaztunk, ami gátolta a mitokondriális oxigénfogyasztást. Metilénkék hiányában antimycinnel kezelt mitokondriumoknál nem tapasztaltunk változást ADP és CAT hozzáadását követően.

Abból a célból, hogy a MK komplex III-ra gyakorolt hatását többoldalúan vizsgáljuk, ezért az antimycin mellett egy másik jól ismert inhibitor (myxothiazol) is alkalmaztunk, ami egy disztálisabb ponton képes gátolni a CIII-at (Turrens *et al.* 1985). Az alkalmazott myxothiazol koncentráció (1 μM) esetében a gátlás sokkal kifejezettebb volt (5. ábra (A) egy reprezentatív görbét, 5. ábra (C) a statisztikai adatokat ($36,7 \pm 2,0 \rightarrow 58,7 \pm 2,3$ nmol/perc/mg fehérje) jeleníti meg). Ezt követően a MK (2 μM) hozzáadása ötszörösére növelte az oxidációt ($4,5 \pm 0,6 \rightarrow 22,7 \pm 4,3$ nmol/perc/mg fehérje, 5. ábra (C)). Az antimycin hatásához hasonlóan a MK kezelést követően az ADP hozzáadás csökkentette, míg CAT növelte az oxigénfogyasztást (5. ábra (C)).

Azonos kondíciók mellett hasonló eredményeket kaptunk tengerimalac és patkány agyi mitokondrium esetén is (ábrát nem mutatunk). Kísérleteinket elvégeztük glutamát-malát szubsztráttal is, és szintén hasonló eredményeket kaptunk, tehát a különböző CI szubsztrátok alkalmazása nem volt hatással az eredeti jelenségre: CIII gátolt mitokondriumokon (gátlószertől függetlenül) MK feloldotta a gátlást.

A szokatlan oxidációs mintázat, amely MK hatására CIII gátlószer után figyelhető meg (ADP-re történő légzéseszkökenés, CAT-ra történő légzésfokozódás), további magyarázatra szorul, így vizsgáltuk gátlószer és MB jelenlétében a $\Delta\Psi_m$ -t.



5. ábra: Metilénkék (MK, 2 μM) hatása az oxigénfogyasztásra **egér** agyból izolált mitokondriumokon CIII gátlás esetén. A mitokondriumokat piruvát-malát (5-5 mM) szubsztráttal lélegeztettük, a CIII-at myxothiazollal (1 μM) (A, C) vagy antimycinnel (300 nM) (B, D) gátoltuk. Az E részben a CIII gátlószer nélküli állapotot jelentették meg metilénkék vagy puffer hozzáadására. Az A és B részben két reprezentatív görbe

látható, a fekete vonal a metilénkék hozzáadása nélküli, míg a szürke vonal a metilénkék hozzáadására bekövetkező állapotot mutatja. C, D, E részeken oszlopdiaqramon jelenítjük meg az oxigénfogyasztás átlagát \pm S.E.M. nmol/perc/mg fehérjére vonatkoztatva ($n = 8$). * és # jelek a különböző kondíciók közti szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelölik.

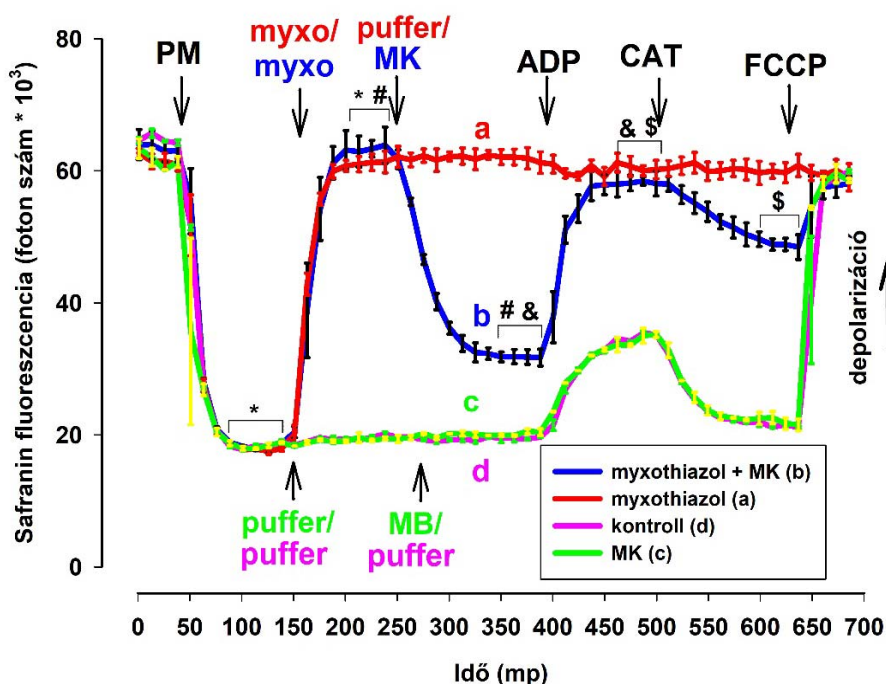
4.1.2. A metilénkék hatása a mitokondriális membránpotenciálra rágsálókból izolált agyi mitokondriumokban komplex III gátlás esetén

A $\Delta\Psi_m$ -t félkvantitatív módon két különböző fluoreszcens módszerrel vizsgáltuk. A safranin fluoreszcencia mérése egyszerűen kivitelezhető és megbízható eredményeket ad. A mérés során hiperpolarizáció hatására csökken a fluoreszcencia intenzitása a safranin oligomerizációja miatt. A TMRM fluoreszcenciával is vizsgáltuk a $\Delta\Psi_m$ -t. A TMRM fluoerszcenciát „*dual excitation ratiometric mode*”-ban vizsgáltuk, és a két hullámhosszon excitált, de ugyanazon az emissziós hullámhosszon detektált fluoreszcencia intenzitásának arányát ábrázoltuk. A TMRM fluoreszcencia (a safranin fluoreszcenciával ellentétben) a mitokondriális membrán hiperpolarizációja esetén emelkedik.

4.1.2.1. Membránpotenciál mérések safranin O fluoreszcens festékkel

A safranin fluoreszcencián alapuló $\Delta\Psi_m$ mérésénél a kísérleti protokoll megegyezett az oxigénfogyasztásnál alkalmazott protokollal. Sok esetben ez a két paraméter vizsgálható azonos küvettában. Légzési szubsztrátok hatására a mitokondrium belső membránja hiperpolarizálódott, amit a fluoreszcens jel csökkenése mutat. Kontroll körülmények között (se CIII gátlószer, se MK nincs jelen), a membrán ADP hatására depolarizálódik, mivel 1) az ANT egy elektrogén transzporter (ADP^{3-} -t visz be a mátrixba és ATP^{4-} -t visz ki a mátrixból); 2) az ADP által előidézett ATP termelés hatására (akceptor kontroll), az intermembrán térből protonok áramlanak a mátrixba, ezzel csökkentve a $\Delta\Psi_m$ -t. Az ANT gátló CAT megszünteti az ADP-ATP cserét, ezáltal megszűnik az akceptor kontroll és az ATP szintézis, ami a gátolja a protonok visszaáramlását a mátrixba. Ennek következtében a protonok ismét felszaporodnak az intermembrán térben az elektrontranszportlánc komplexeinek

protonpumpa aktivitása miatt, aminek eredményeképpen fel tud épülni a kezdeti $\Delta\Psi_m$. Ezután a szétkapcsolószer (FCCP) hatására ismét egy depolarizációt figyelhetünk meg, mivel a protonok visszaáramlása megszünteti a protongradienst (6. ábra d). Gátlószer nélkül adott MK hatására nem tapasztalunk változást a kontroll vizsgálathoz képest (6. ábra c). A CIII gátlószer jelenlétében a CI szubsztráttal lélegeztetett mitokondrium membránja szinte teljes mértékben depolarizálódott (6. ábra a, b). A CIII gátolt mitokondriumok membránja MK hozzáadását követően részlegesen repolarizálódott (6. ábra, b). Az ADP ezek után egy depolarizációt idézett elő (mint ahogy a megfelelően működő CIII-mal rendelkező mitokondriumoknál lenni szokott), majd az ANT gátló CAT hozzáadását követően egy szignifikáns hiperpolarizációt tapasztaltunk. A kísérletet megismételve patkány agyi mitokondriumokon két különböző inhibitorral hasonló eredményt kaptunk (ábrát nem mutatunk). A safranin fluoreszcenciával mért eredmények validálásához méréseinket megismételtük egy másik fluoreszcens festékkel (TMRM) is.

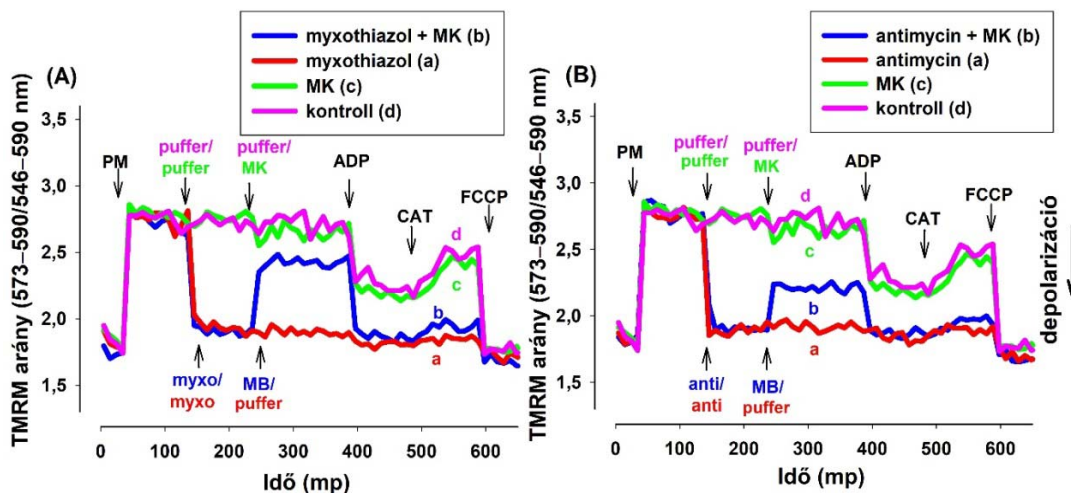


6. ábra: Metilénkék hatása a $\Delta\Psi_m$ -ra **egérből izolált** agyi mitokondriumokon CIII gátlás esetén. A $\Delta\Psi_m$ -t safranin O fluoreszcenciával vizsgáltuk (lásd. 3.1. Vegyszerek, mérőoldat). A mitokondriumokat PM (5-5 mM) szubsztráttal lélegeztettük, a CIII-at myxothiazollal (myxo, 1 μ M) gátoltuk. Az „a” (piros) görbe: inhibitor (myxothiazol); a

„b” (kék) görbe: inhibitor (myxothiazol) és metilénkék (MK, 2 μ M); a „c” (zöld) görbe: metilénkék; A „d” (rózsaszín) görbe: kontroll. A további hozzáadások: ADP (2 mM), CAT (2 μ M), FCCP (250 nM). A görbék az átlag safranin fluoreszcenciát jelölik, a szórás \pm S.E.M. tartományt jelöl (n = 3). *, #, &, \$ jelek a görbék adott pontjai közötti szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelölik.

4.1.2.2. Membránpotenciál mérések TMRM fluoreszcens festékkel

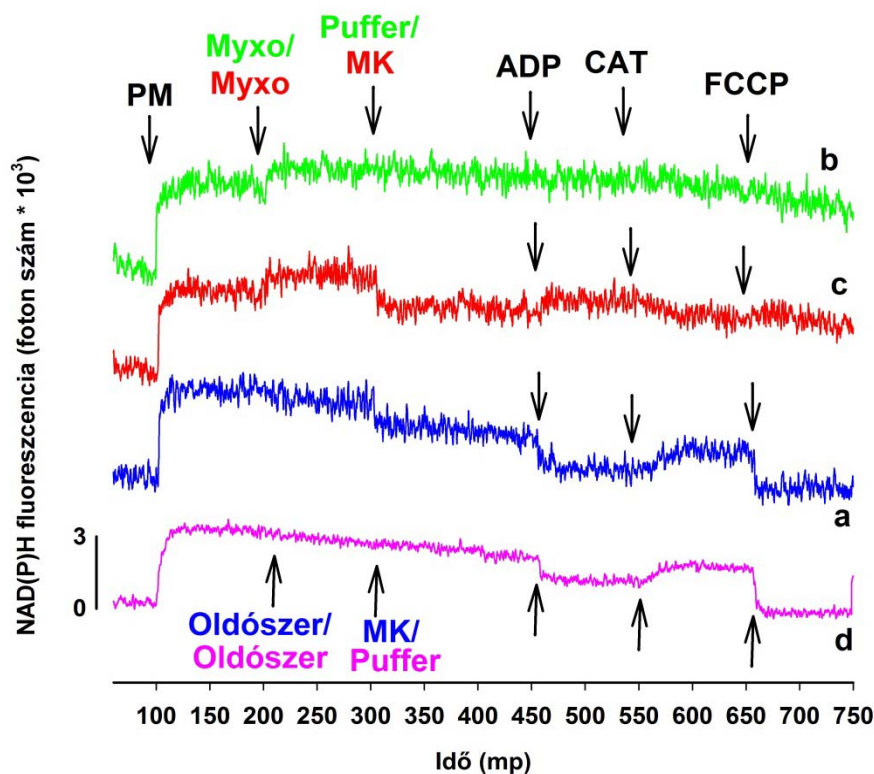
A TMRM fluoreszcencia mérésénél tengerimalac agyból izolált mitokondriumokon végezve a kísérleteket, az eredmények megegyeztek a safranin használata során kapottakkal (7. ábra). Méréseinket elvégeztük patkány és egér agyi mitokondriumain is két különböző gátlószer (A: myxothiazol, B: antimycin) mellett. Az összes esetben hasonló eredményeket kaptunk (utóbbiakról ábrát nem mutauk).



7. *ábra*: Metilénkék hatása a $\Delta\Psi_m$ -ra **tengerimalac** agyból izolált mitokondriumokon CIII gátlás esetén. A $\Delta\Psi_m$ -t TMRM fluoreszcenciával vizsgáltuk (lásd. 3.1. Vegyszerek, mérőoldat). A mitokondriumokat PM (5-5 mM) szubsztráttal lélegeztettük, a komplex III-at myxothiazollal (myxo, 1 μ M) gátoltuk. Az „a” (piros) görbe: inhibitor (myxothiazol); a „b” (kék) görbe: inhibitor (myxothiazol) és metilénkék (MK, 2 μ M); a „c” (zöld) görbe: metilénkék; A „d” (rózsaszín) görbe: kontroll. A további hozzáadások: ADP (2 mM), CAT (2 μ M), FCCP (250 nM). A görbék az átlag TMRM fluoreszcenciák arányát jelöli (n = 3).

4.1.3. A metilénkék hatása a NAD(P)H egyensúlyi állapotára

A NAD(P)H/NAD(P)⁺ egyensúlyi állapota megbízható módon képes mutatni a mitokondrium redox homeosztázisát. A CI, CIII és CIV gátlása ezt az egyensúlyi állapotot képes módosítani. A légzési láncba a gátlás előtt belépő redukáló ekvivalensek egyensúlyi állapota eltolódik a redukált forma irányába, mivel a gátlás miatt nem tudnak oxidálódni. CI szubsztrát esetén (α -ketoglutarát (α KG), PM, GM) a NADH, míg CII szubsztrát (szukcinát) oxidációjának gátlásakor (feltételezve, hogy a gátlószer nem a FAD redukcióját gátolja), a FADH₂ szintje emelkedik meg (Chance and Williams 1955). Már korábban leírták, hogy a MK képes elektronokat átvenni a NAD(P)H-ról (Atamna *et al.* 2008; Tretter *et al.* 2014). Abban az esetben, ha a MK képes az elektronokat a CIII gátolt mitokondriumok ETC-ban a gátlás utáni pontra átvinni, akkor ezzel várhatóan csökkenteni fogja a NAD(P)H szintjét és a NAD(P)H/NAD(P)⁺ arányt. Mivel az antimycin rendelkezik saját optikai jellel a mért hullámhosszon (zavarja a NAD(P)H fluoreszcenciát), ezért ezeket a kísérleteinket myxothiazollal végeztük (8. ábra). Piruvát-malát szubsztrát hozzáadását követően a NAD(P)⁺ pool jelentős mértékben redukálódott. Myxothiazol hiányában („a” (kék) görbe) a metilénkék és az ADP hozzáadása is csökkentette a NAD(P)H fluoreszcenciát, majd az ANT gátló CAT hatására ismét emelkedett a NAD(P)H szint. Hasonló eredményeket kaptunk MK hiányában is („d” (rózsaszín) görbe). Myxothiazol jelenlétében és MK hiányában a myxothiazol hozzáadása megemelte a NAD(P)H szintjét, amit később sem az ADP, sem a CAT nem módosított. Majd az FCCP hatására a NAD(P)H fluoreszcenciában gyakorlatilag nincs változás („b” (zöld) görbe). Amikor a mitokondriumokhoz gátlószert és MK-et is adtunk („c” (piros) görbe), a kezdeti gátlószerre történő emelkedést a MK csökkentette. ADP (emelte a NAD(P)H szintet) és CAT (csökkentette a NAD(P)H szintet) hozzáadását követően a szokatlan tendencia volt megfigyelhető. Kísérleteinket megismételve tengerimalac és egér agyi mitokondriumokon hasonló eredményt kaptunk (ábrát nem mutatunk).



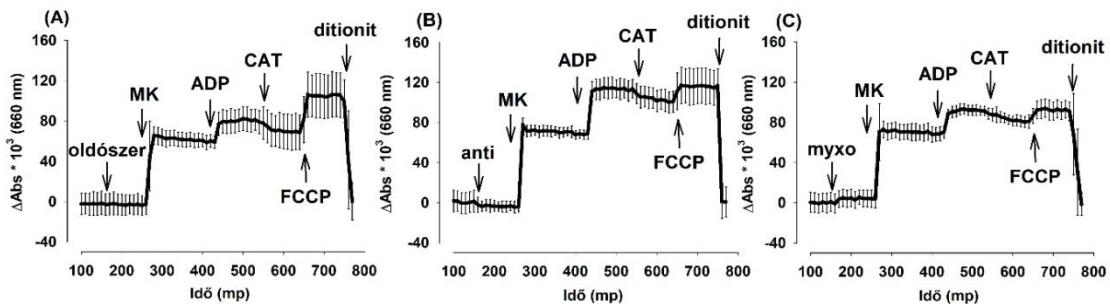
8. ábra: Metilénkék hatása a NAD(P)H/NAD(P)⁺ egyensúlyi állapotára **patkány** agyból izolált mitokondriumokon CIII gátlás esetén. A mitokondriumokat PM (5-5 mM) szubsztráttal lélegeztettük, a CIII-at myxothiazollal (myxo, 1 μ M) gátoltuk. Az „a” (kék) görbe: metilénkék (MK, 2 μ M); a „b” (zöld) görbe: inhibitor (myxothiazol); a „c” (piros) görbe: inhibitor (myxothiazol) és metilénkék; a „d” (rózsaszín) görbe: kontroll. A további hozzáadások: ADP (2 mM), CAT (2 μ M), FCCP (250 nM). A különböző összeállításokhoz tartozó reprezentatív görbéket ábrázoltuk, kísérletszám: n>4. A görbék az y tengelyen eltolva vannak ábrázolva az egymással való zavaró átfedés elkerülése és a könnyebb összehasonlíthatóság érdekében.

4.1.4. A metilénkék oxidoredukciója gátlószer jelenlétében és hiányában

Az oxigénfogyasztás, a $\Delta\Psi_m$ és NAD(P)H/NAD(P)⁺ egyensúlyi állapot vizsgálatánál is tapasztaltuk azt a jelenséget, hogy CIII inhibitor és MK jelenlétében a vizsgált paraméterek épp ellentétes irányba változtak a kontrollhoz viszonyítva. Általában ADP hatására emelkedik az oxigénfogyasztás, csökken a $\Delta\Psi_m$ és a NAD(P)H szint, ANT inhibitor hatására pedig csökkenő mitokondriális légzés, emelkedő $\Delta\Psi_m$ és emelkedő NAD(P)H szint figyelhető meg. Azonban kísérleteink során ezzel ellentétes

változásokat kaptunk az oxigénfogyasztás és a NAD(P)H fluoreszcencia vizsgálatánál. Az ellentmondás megválaszolásához vizsgáltuk a metilénkék oxidoredukciós állapotát, kihasználva azt a spektrális tulajdonságát, hogy az oxidált formának 660 nm-en van egy elnyelési maximuma a látható kék tartományban, ami a redukált forma esetén nem érzékelhető. Ugyanazt a kísérleti protokollt alkalmaztuk, mint az előző négy esetben. Méréseink végén ditionitot adtunk, amely az összes MK-t redukálta, ezáltal megszüntette az elnyelését 660 nm-en.

Mivel a MK oxidáltsági állapotát szeretnénk volna nyomon követni, ezért a kísérletet elvégeztük MK jelenléte nélkül is, majd a két görbét kivontuk egymásból, így tudtuk megkapni a MK oxidáltsági állapotában bekövetkezett változást. A kivonás utáni görbék láthatók a 9. ábrán. Megfigyelhető, hogy a MK inhibitor jelenlétében és hiányában is jelentős mértékű emelkedést okoz az abszorbanciában 660 nm-en. ADP hatására a MK oxidáltabb, míg az ANT gátlás hatására redukáltabbá vált. Ezt követően FCCP hatására ismét oxidálódott, majd ditionit hatására teljesen redukált állapotba került a MK. Ehhez hasonló eredményeket kaptunk, amikor kísérleteinket tengerimalac agykéregből preparált mitokondriumokon végeztük el (ábrát nem mutatunk).

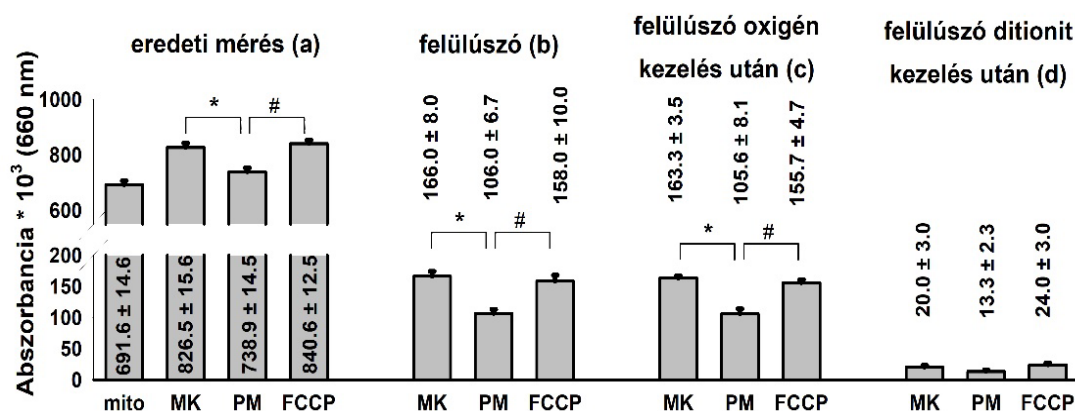


9. ábra: Komplex III gátlószerek hatása a metilénkék (MK, 2 μM) oxidoredukciós állapotára **egér** agyból izolált mitokondriumokon. A részletes mérési protokoll megtalálható a (lásd. 3.1. Vegyszerek, mérőoldat). A mitokondriumokat piruvát-malát (5-5 mM) szubsztráttal lélegeztettük, és az abszorbanciakülönbséget jelenítettük meg metilénkék jelenlétében és hiányában 660 nm-en ($\Delta \text{Abs}_{660} \cdot 10^3$). (A): gátlószertmentes, (B): antimycinnel (anti, 300 nM) gátolt komplex III, (C): myxothiazollal (myxo, 1 μM) gátolt komplex III. A további hozzáadások: ADP (2 mM), CAT (2 μM), FCCP (250 nM). A görbék az átlagos különbséget mutatják \pm S.E.M. szórással (n = 3).

4.1.5. A metilénkék kompartmentalizációja és hatása a mitokondriális bioenergetikára

Ismert tény, hogy az oxidált MK, ami összességében pozitív töltésű, képes bekerülni a mitokondriális mátrixba (Gabrielli *et al.* 2004), azonban valószínűsíthető, hogy a hozzáadott MK-ból a mitokondrium nem a teljes mennyiséget veszi fel. Kísérletünkkel szeretnénk meghatározni, hogy az oxidoredukciós állapotától függően a hozzáadott MK milyen arányban fog megoszlani a mitokondriális és extramitokondriális tér között (nem energizált, szubsztrát által energizált és szétkapcsolt állapotban). A kísérletben tengerimalac agyból izolált mitokondriumokat vizsgáltuk (10. ábrán).

A mérés során a mitokondriumokhoz MK-t adtunk, ami megemelte az abszorbanciát 660 nm-en. Ezt követően a PM szubsztrát hatására csökkent az abszorbancia, mivel az energizált mitokondrium képes redukálni a MK-t. FCCP hozzáadása után a MK redukált/oxidált formájának aránya az oxidált forma irányába tolódik el (10. ábra, a). Az anyagok hozzáadása előtt és a mérés végén mintát vettünk a mérőküvetéből, melyet centrifugáltunk, és a (mitokondriummentes) felülúszóban mértük az abszorbanciát (10. ábra, b). A legalacsonyabb abszorbanciát akkor tapasztaltuk, amikor a mitokondrium energizált állapotban volt (PM hozzáadását követően), azonban a szubsztrátmentes és a szétkapcsolt mitokondrium felülúszója között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. A felülúszókban található MK teljes oxigenálásához levegőt buborékolattunk keresztül a felülúszókon, azonban ez jelentősen nem befolyásolta a felülúszóban detektálható 660 nm-en mért abszorbanciát, vagyis az oxidált MK mennyiségét. Tehát a felülúszóban található MK már közel teljes mértékben oxidált formában volt (10. ábra, c). A harmadik lépésben a felülúszóhoz ditionitot adtunk, ami csökkentette a 660 nm-en mért abszorbanciát (10. ábra, d). Ebből arra következtethetünk, hogy a felülúszó abszorbanciáját a MK adta, ami ditionit hatására redukálódott, ezáltal elveszítette a színét (abszorbanciáját 660 nm-en). A MK-t a mitokondrium képes oxidált formában felvenni, redukálni, majd pedig elengedni. Az energizálatlan és szétkapcsolt mitokondriumok esetében (ahol alacsony a $\Delta\Psi_m$) a mitokondriumok alig képesek felvenni az oxidált (pozitív töltésű) MK-et, míg energizált állapotban (hiperpolarizált membrán esetén) felveszik, redukálják, majd elengedik a redukált (semleges töltésű) MK-t.



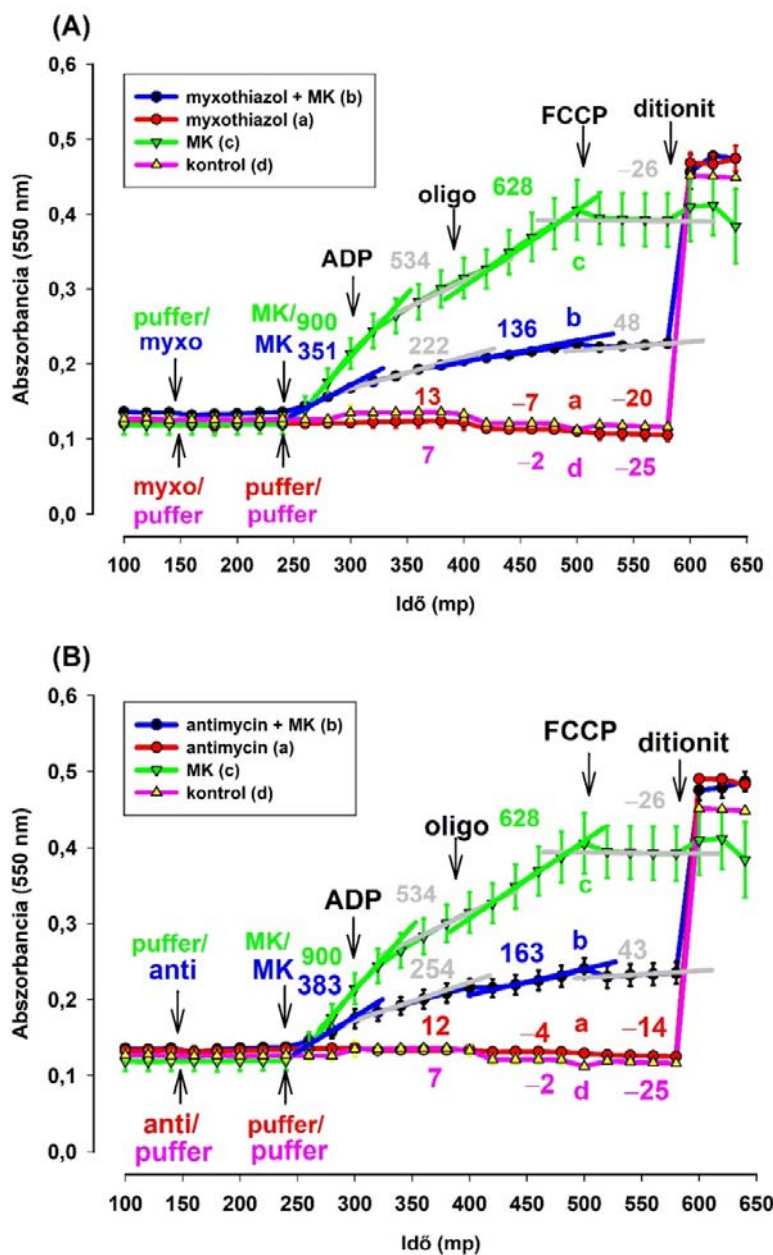
10. ábra: A metilénkék megoszlása a mitokondriális és nem mitokondriális kompartmentek között különböző energia ellátottság esetén. A **tengerimalac** agyból izolált mitokondriumokat standard mérőoldatban (lásd. 3.1. Vegyszerek, mérőoldat) inkubáltuk, részletes mérési protokoll megtalálható a (lásd. 3.9. A metilénkék elhelyezkedésének vizsgálata). A hozzáadások: 1 percnél metilénkék (MK, 2 μ M), 3 percnél PM szubsztrát (5-5 mM), 5 percnél FCCP (250 nM). A hozzáadások előtt minden alkalommal mintavétel történt és azokból a mitokondriumok lecentrifugálását követően az abszorbancia meghatározása történt (b). Az így kapott felülűszókba oxigént buborékoltattunk (c), majd a MK-t ditionittal redukáltuk (d). Az oszlopok az átlagos abszorbanciát jelenítik meg 660 nm-en \pm S.E.M. szórással (n = 10). *, # jelek a különböző kondíciók közti szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelölik.

4.1.6. A NADH képes redukálni a citokróm *c*-t metilénkék jelenlétében

4.1.6.1. A metilénkék stimulálja a citokróm *c* redukciót komplex III gátlószer jelenlétében is

A méréshez a mitokondriumokat tengerimalac agyból izoláltuk, és PM szubsztráttal energizáltuk. A mérés kezdetén külsőleg acetyl-citokróm *c*-t adtunk a mérési médiumhoz, aminek abszorbanciaváltozását detektáltuk, ami arányos a redukáltsági állapotával. Acetyl-citokróm *c* használatára azért volt szükség, mert kevésbé autooxidálódik mint a citokróm *c*, ezért a detektálás során kisebb hibát fogunk tapasztalni. Gátlószer jelenlétében és hiányában sem tapasztaltuk az acetyl-citokróm *c* redukcióját, amennyiben nem adtunk MK-t (11. ábra, a és d). Metilénkék jelenlétében azonban az acetyl-citokróm *c* redukcióját tapasztaltuk, viszont ennek mértéke

különbözött gátlószer jelenlétében (11. ábra, b) illetve hiányában (11. ábra, c). A gátlószer hatására csökkent a meredekség (acetyl-citokrom *c* redukció sebessége). ADP mindkét esetben csökkentette a meredekséget, míg az ATP-szintáz inhibitor (oligomycin) stimulálta az acetyl-citokrom *c* redukciót, mivel (ANT gátlóhoz hasonlóan) képes volt részlegesen visszaállítani a $\Delta\Psi_m$ -t, ami a gyorsabb MK recirkulációért felelős. Kísérletünk alátámasztja azt a feltevésünket, hogy a MK képes átvinni az elektronokat a (mitokondrium által termelt) NADH-ról a (külsőleg adott) acetyl-citokrom *c*-re.

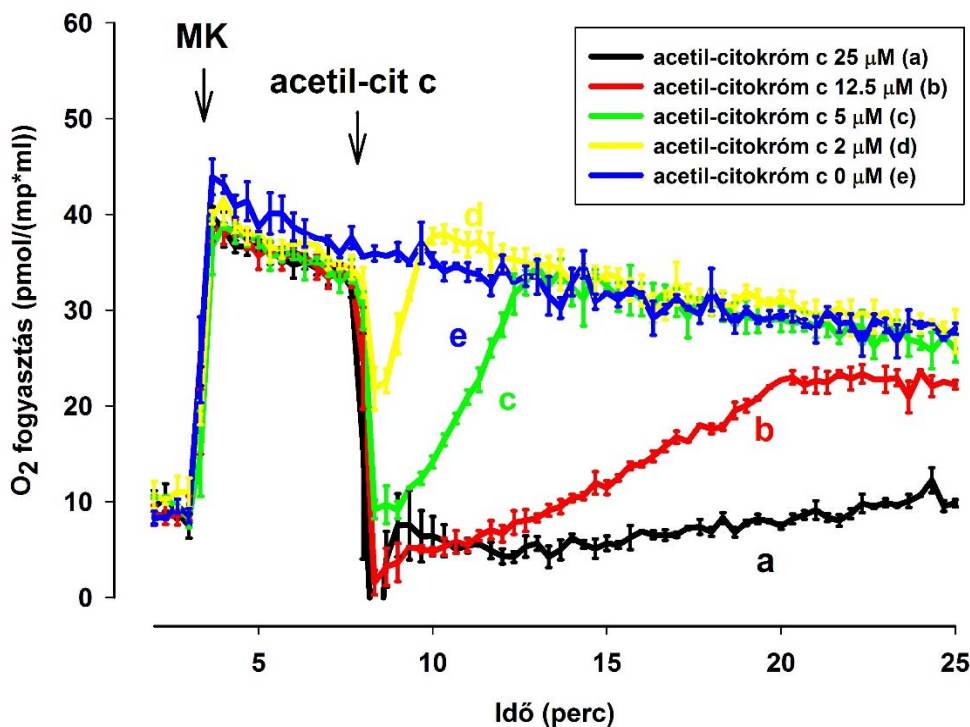


11. ábra: Metilénkék hatása a külsőleg adott acetil-citokrómmal *c* redukciójára **tengerimalac** agyból izolált mitokondriumokon CIII gátlás esetén (myxothiazol (A) vagy antimycin (B)). Az acetil-citokrómmal *c* redukcióját 550 nm-en vizsgáltuk. A standard médiumhoz (lásd. 3.1. Vegyszerek, mérőoldat) acetil-citokrómmal *c*-t (25 μ M) adtunk, a mitokondriumokat PM (5-5 mM) szubsztráttal lélegeztettük. Az „a” (piros) görbe: inhibitor (myxo, 1 μ M; anti, 300 nM); a „b” (kék) görbe: inhibitor és metilénkék (MK, 0,5 μ M); a „c” (zöld) görbe: metilénkék; a „d” (rózsaszín) görbe: kontroll. A további hozzáadások: ADP (2 mM), CAT (2 μ M), FCCP (250 nM). A görbék fölötti számok az abszorbanciaváltozás sebességét jelölik (Δ Abs₅₅₀/mp * 10⁻⁶). Az egyenesek a görbe különböző részeire illeszkednek, amelyeknek a meredekségét számoltuk. A görbék az átlagot \pm S.E.M. (n = 3) jelenítik meg.

4.1.6.2. A metilénkék stimulálja a citokrómmal *c* redukciót NADH jelenlétében *in vitro* körülmények között

Arra a kérdésre szerettünk volna választ kapni, hogy a MK közvetlenül is képes-e redukálni a citokrómmal *c*-t vagy szükséges-e hozzá valamilyen további mitokondriális faktor. Ennek eldöntéséhez a mitokondriummentes standard médiumhoz (lásd. 3.1. Vegyszerek, mérőoldat) NADH-t adtunk és a mérést egy nagy felbontású respirométerrel vizsgáltuk. Kezdetben az oxigénfogyasztás alacsony volt, majd MK hatására jelentősen fokozódott. Ezt követően az oxigénfogyasztás sebessége kismértékben csökkent, ahogy a MK oxidálta a NADH-t (12. ábra). Amikor a kamrába acetil-citokrómmal *c*-t adtunk, az oxigénfogyasztás hirtelen lecsökkent, majd fokozatosan újra elkezdett emelkedni, egészen addig, amíg el nem érte a kontroll (acetil-citokrómmal *c* mentes) állapotot. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a vizsgálat során a hozzáadott acetil-citokrómmal *c* fokozatosan redukálódott, majd amikor elérte a teljesen redukált állapotot, már nem tudott több elektront felvenni a MK-ről. A kísérletből tehát az derül ki, hogy a MK képes felvenni az elektronokat a NADH-ról, ezáltal redukálódni, majd az elektronokat molekuláris oxigénnek átadni (ezt mutatja a megnövekedett oxigénfogyasztás metilénkék hozzáadását követően). Ehhez pedig nem szükséges a mitokondrium működése, amit a kísérleti eredmény is alátámaszt, hogy az acetil-citokrómmal *c* önmagában is képes átvenni az elektronokat a MK-től, ezáltal csökken az oxigénfogyasztás, mivel a MK az acetil-citokrómmal *c*-t preferálja a molekuláris oxigénnel szemben.

szemben. Ahogy az acetil-citokrómm *c* egyre telítettebbé (redukáltabbá) válik, úgy fog egyre nőni az oxigénfogyasztás sebessége (amíg el nem éri a kontroll állapotot), mivel a MK innentől ismét a molekuláris oxigént fogja redukálni. A kísérlet indirekt módon bizonyítja, hogy MK képes átvinni az elektronokat a NADH-ról a citokrómm *c*-re.

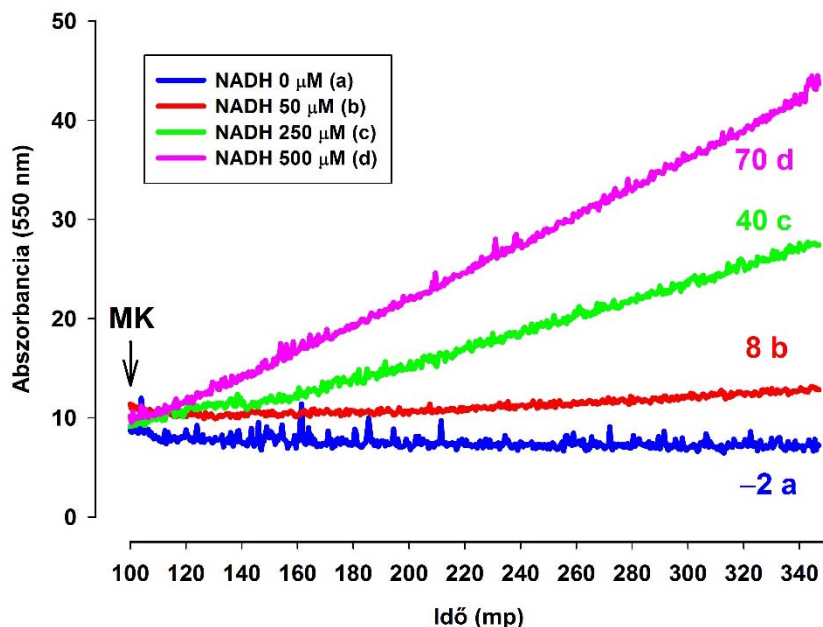


12. ábra: Metilénkék és acetil-citokrómm *c* hatása az oxigénfogyasztásra mitokondriummentes médiumban NADH jelenlétében. A standard médiumhoz (lásd. 3.1. Vegyszerek, mérőoldat) NADH-t (250 μ M) adtunk. Minden görbe esetében metilénkéket (2 μ M) és különböző koncentrációjú acetil-citokrómm *c*-t (a (fekete) 25 μ M; b (piros) 12,5 μ M; c (zöld) 5 μ M; d (sárga) 2 μ M; e (kék) 0 μ M) adtunk. A görbék az átlagot \pm S.E.M. (n = 3) jelenítik meg.

4.1.6.3. Az acetil-citokrómm *c* redukciójának NADH függése metilénkék jelenlétében *in vitro* körülmények között

Megfigyeléseink azt mutatták, hogy a MK képes redukálni az acetil-citokrómm *c*-t, azonban azt is szeretnénk volna megvizsgálni, hogy ezt milyen mértékben befolyásolja a MK elektrondonorja, a NADH (13. ábra). Megfigyelhető, hogy NADH hiányában az

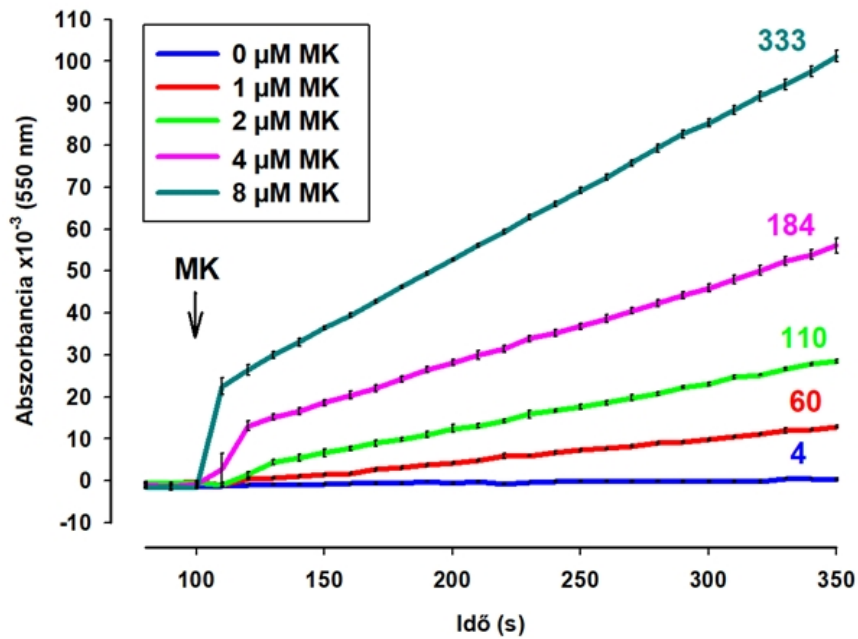
acetil-citokróm *c* nem redukálódik (13. ábra, a (kék)), azonban a NADH koncentráció emelkedésével fokozódik a redukció sebessége.



13. ábra: Metilénkék hatása az acetil-citokróm *c* redukciójára különböző koncentrációjú NADH mellett. Az acetil-citokróm *c* abszorbanciáját 550 nm-en vizsgáltuk. A standard médiumhoz (lásd. 3.1. Vegyszerek, mérőoldat) acetil-citokróm *c*-t (25 μM) és NADH-t (a (kék) 0 μM; b (piros) 50 μM; c (zöld) 250 μM; d (rózsaszín) 500 μM) adtunk. Minden görbe esetében metilénkék (2 μM) hatására indult meg az acetil-citokróm *c* redukciója. A görbék fölötti számok az abszorbanciaváltozás sebességét jelölik ($\Delta\text{Abs}_{550}/\text{mp} \cdot 10^{-6}$). A görbék az átlagot \pm S.E.M. ($n = 3$) jelenítik meg.

4.1.6.4. Az acetil-citokróm *c* redukciójának metilénkék függése NADH jelenlétében *in vitro* körülmények között

Az előző vizsgálat mintájára megismételtük a kísérletünket, azonban most arra voltunk kíváncsiak, hogy a redukció sebessége függ-e a hozzáadott MK mennyiségétől (14. ábra). Megfigyelhető, hogy MK hiányában az acetil-citokróm *c* nem redukálódik (14. ábra, a (kék)), azonban a MK koncentráció emelkedésével fokozódik a redukció sebessége.



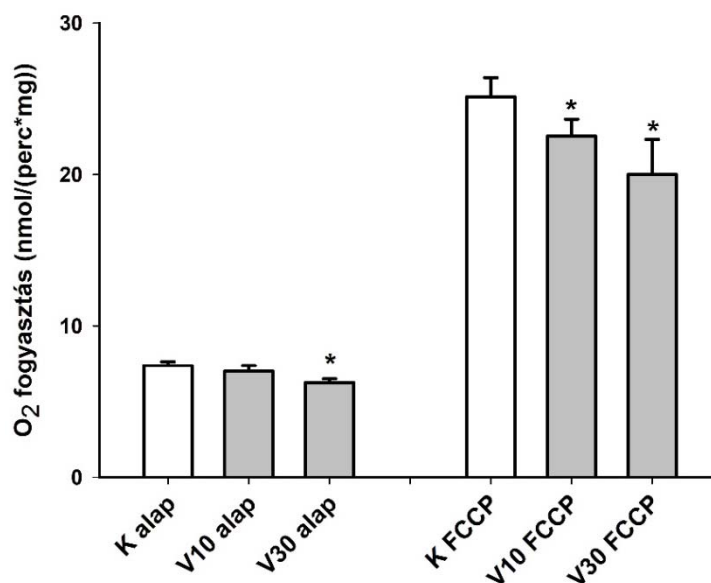
14. ábra: Különböző koncentrációjú metilénkék hatása az acetil-citokrómmal c redukciójára NADH jelenlétében. Az acetil-citokrómmal c abszorbanciáját 550 nm-en vizsgáltuk. A standard médiumhoz (lásd. 3.1. Vegyszerek, mérőoldat) acetil-citokrómmal c -t (25 μM) és NADH-t (250 μM) adtunk. Minden görbe esetében metilénkék (kék 0 μM ; piros 1 μM ; zöld 2 μM ; rózsaszín 4 μM ; szürke 8 μM) hatására indult meg az acetil-citokrómmal c redukciója. A görbék fölötti számok az abszorbanciaváltozás sebességét jelölik ($\Delta\text{Abs}_{550}/\text{mp} * 10^{-6}$). A görbék az átlagot jelenítik meg, a szórás \pm S.E.M. tartományt jelöl ($n = 3$).

4.2. Vinpocetin

4.2.1. Vinpocetin hatása az oxigénfogyasztásra

4.2.1.1. Vinpocetin hatása a szinaptoszóma oxigénfogyasztására

A patkány agyi szinaptoszómák vizsgálata *in situ* állapotban jól tükrözi a szinaptoszóma mitokondriumainak szubsztrátoxidációját. A szinaptoszóma preparátum ugyan szennyezett szabad mitokondriumokkal, azonban ezeknek a döntő többsége az extracelluláris Ca^{2+} koncentráció hatására PTP nyílás következtében funkcióképtelen, illetve a szokásos, glukózzal történő szinaptoszóma energizálásból nem képes energiát előállítani. Vinpocetin hatására csökkent mind a nyugalmi, mind a szétkapcsolószert által stimulált légzés a glukózzal (10 mM) energizált idegi végkészülékekben (15. ábra). A glukóz laktátra cserélése ugyanezt az eredményt adta (ábrát nem mutatunk).

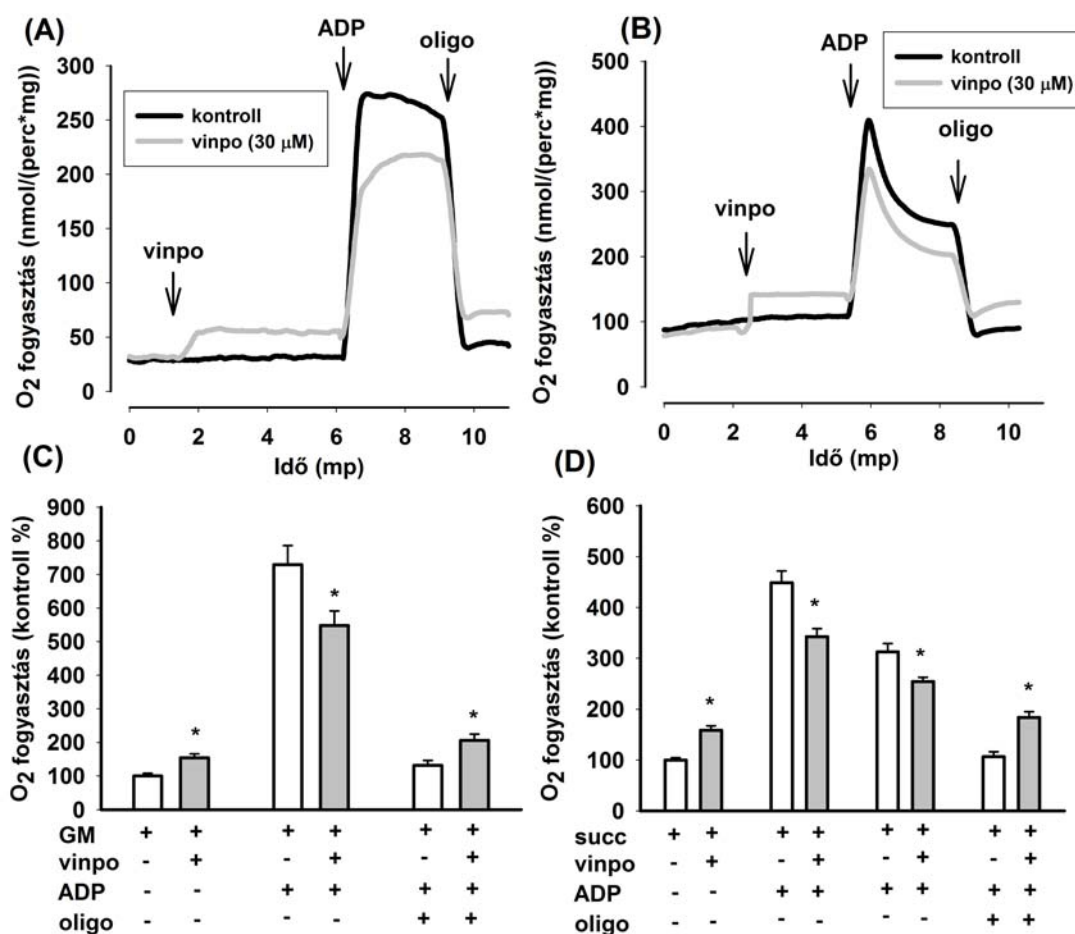


15. ábra: Vinpocetin hatása a **patkány agyi** szinaptoszómák oxigénfogyasztására. A szinaptoszómákat glukózt (10 mM) tartalmazó médiumban inkubáltuk 5 percig vinpocetin nélkül kontroll körülmények között (K, fehér oszlopok), illetve vinpocetin jelenlétében (V, szürke oszlopok, 10 és 30 μM). Kezdetben a nyugalmi légzést (K/V10/V30 alap) majd a szétkapcsolóval stimulált (500 nM, K/V10/V30 FCCP)

légzést mértük. Az oszlopok az átlag \pm S.E.M. ($n > 4$) értéket mutatják. * jelek a szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelölik a kontrollal összehasonlítva.

4.2.1.2. Vinpocetin hatása a mitokondriumok oxigénfogyasztására

A tengerimalac agyi mitokondriumait CI (GM, 5-5 mM) vagy CII (szukcinát, 5 mM) szubsztráttal energizáltuk. A nyugalmi légzés alatt (csak szubsztrát jelenlétében) a vinpocetin hozzáadása fokozta az oxigénfogyasztást. Ezzel szemben az ADP stimulált légzés vinpocetin hiányában nagyobb mértékű volt, mint vinpocetin jelenlétében, az alkalmazott szubsztráttól függetlenül (16. ábra). Ha ADP hozzáadását követően alkalmaztuk a vinpocetint, akkor a légzés vinpocetin hatására csökkent (nem mutatjuk). Oligomycin hozzáadása csökkentette a mitokondriális légzést az ADP hozzáadása előtti szintre, ezzel meghagyva a kontrollhoz viszonyított, vinpocetin jelenlétében megfigyelhető megnövekedett oxigénfogyasztást, ami a vinca alkaloidokra jellemző szétkapcsoló hatásra utal.



16. ábra: Vinpocetin hatása **tengerimalac** agyból izolált mitokondriumok oxigénfogyasztására. A mitokondriumokat GM (A, C) vagy szukcinát (B, D) szubsztráttal lélegeztettük a standard mérőoldatban. A mitokondriumokhoz vinpocetint (vinpo; 30 μ M), ADP-t (2 mM) és oligomycint (oligo; 5 μ M) adtunk. Az A (GM) és a B (szukcinát) ábra 1-1 reprezentatív görbét jelenít meg. A C (GM) és D (szukcinát) görbén a statisztika látható, a fehér oszlopok a kontroll körülmények alatt mért, míg a szürke oszlopok a vinpocetinnel kezelt mitokondriumok oxigénfogyasztását mutatja, átlag \pm S.E.M. ($n > 5$). * jelek a szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelölik a kontrollal összehasonlítva.

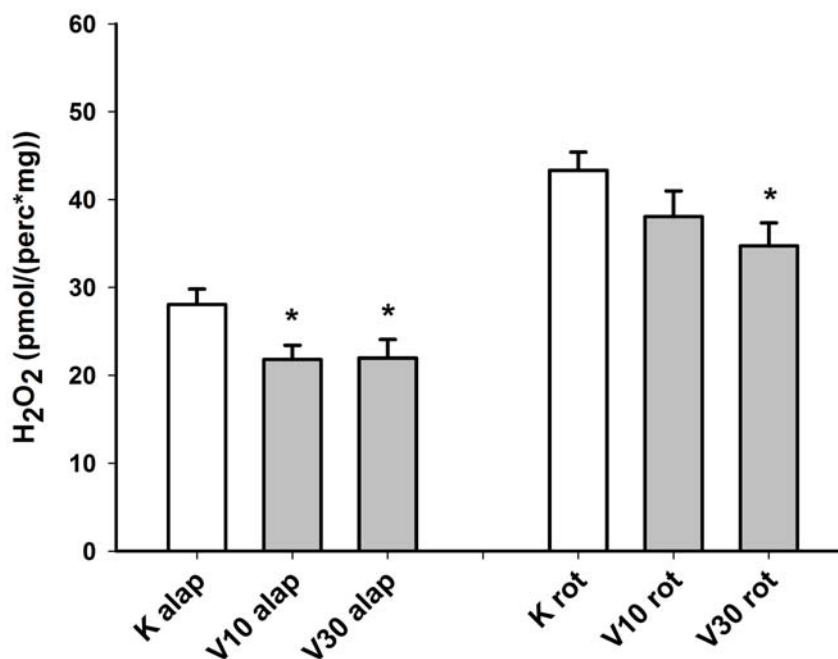
4.2.2. A vinpocetin hatása a mitokondriális membránpotenciálra

A tengerimalac agyból izolált mitokondriumok membránpotenciálját TPP^+ elektróddal vizsgáltuk. A mitokondriumokat GM vagy szukcinát szubsztráttal energizáltuk. A $\Delta\Psi_m$ kialakulását követően vinpocetinnel (30 μ M) kezeltük a mitokondriumokat. A vinpocetin csökkentette a $\Delta\Psi_m$ -t $4,0 \pm 0,6$ mV értékkel. Szukcináttal lélegeztetett mitokondriumok esetében is hasonló depolarizációt tapasztaltunk (ábrát nem mutatunk).

4.2.3. Vinpocetin hatása H_2O_2 termelésre

4.2.3.1. Vinpocetin hatása a szinaptoszóma H_2O_2 termelésére

A szinaptoszómákban a ROS termelése főként a mitokondriumok számlájára írható. A vinpocetin agykérgi szinaptoszómák ROS képzésre gyakorolt hatásának vizsgálatához a szinaptoszómákat glükózzal (10 mM) tápláltuk, és vinpocetinnel inkubáltuk 5 percen keresztül. A vinpocetin hatására 22 %-kal csökkent a H_2O_2 termelés. A vinpocetin CI inhibitor (rotenon) jelenlétében is csökkentette a H_2O_2 termelést (17. ábra).



17. ábra: Vinpocetin hatása a **patkány** agyi szinaptoszámák H₂O₂ termelésére. A szinaptoszómákat glükózt (10 mM) tartalmazó médiumban inkubáltuk 5 percig vinpocetin nélkül kontroll körülmények között (K, üres oszlopok), illetve vinpocetin jelenlétében (V, szürke (10 μ M és 30 μ M) oszlopok). Kezdetben a nyugalmi (K/V10/V30 alap) majd a rotenonnal stimulált (1 μ M, K/V10/V30 rot) H₂O₂ termelést mértük. A nyugalmi H₂O₂ termelést az Amplex UltraRed és a torna peroxidáz hozzáadását követően mértük, majd 200 mp múlva adtuk a rotenont. Az oszlopok az átlag \pm S.E.M. (n > 4) értéket mutatják. * jelek a szignifikáns különbséget (p < 0,05) jelölik a kontrollal összehasonlítva.

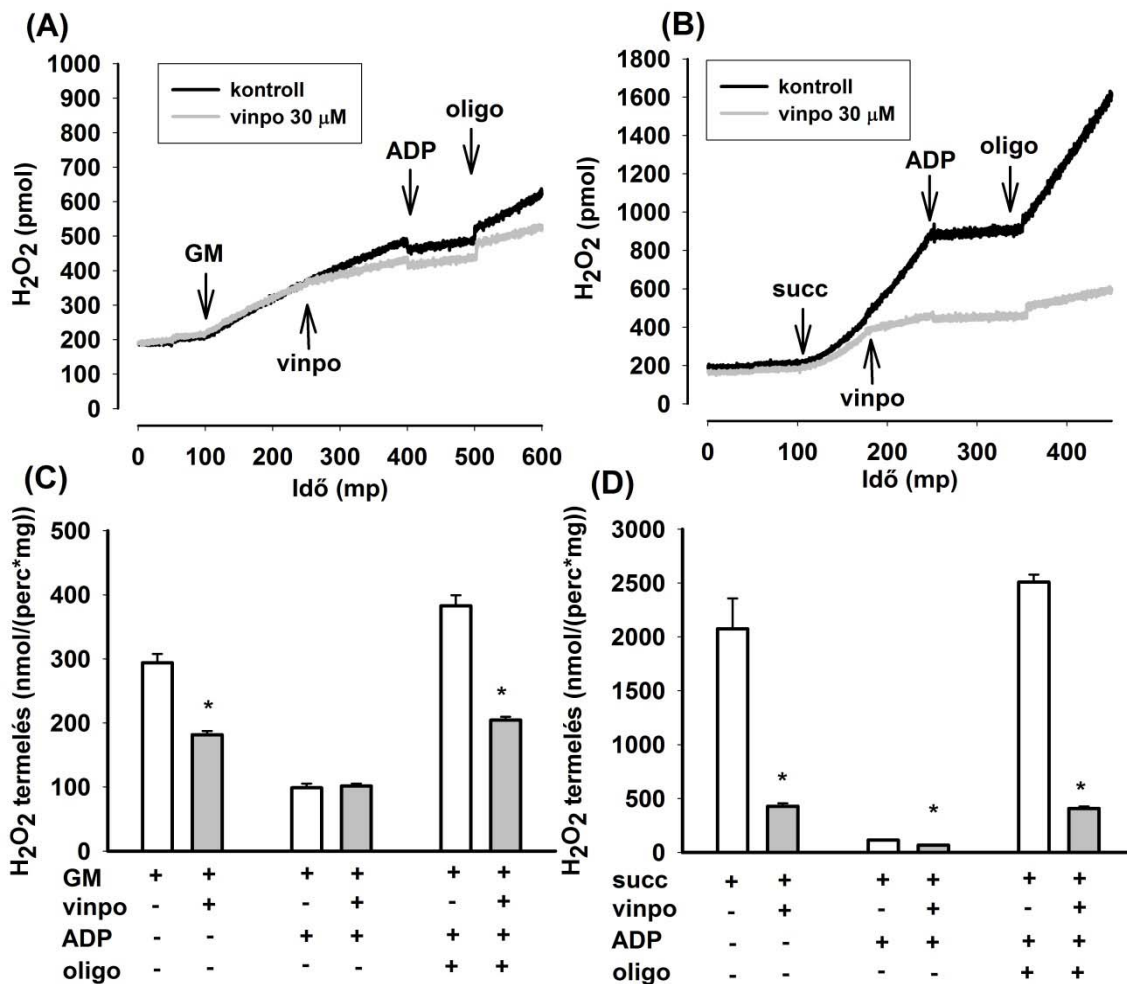
4.2.3.2. Vinpocetin hatása a mitokondriumok H₂O₂ termelésére

Általában elmondható, hogy szoros összefüggés figyelhető meg a mitokondriális oxigénfogyasztás és a mitokondrium H₂O₂ termelése között. A tengerimalac agyi mitokondriumok H₂O₂ termelését CI (GM, 5-5 mM) vagy CII (szukcinát, 5 mM) szubsztrát hozzáadást követően vizsgáltuk.

CI szubsztrát esetén a nyugalmi ROS termelés csak töredéke volt a szukcinát által kiváltott ROS termelésnek, ami összhangban van munkacsoportunk korábbi eredményeivel (Komary *et al.* 2008) és az irodalmi adatokkal (Starkov *et al.* 2002). A vinpocetin GM jelenlétében csökkentette a H₂O₂ termelést (18. ábra A, C). ADP

hozzáadására fokozódott a légzés, és ezzel párhuzamosan csökkent a H_2O_2 termelés vinpocetin jelenlétében és hiányában is. Az ATP szintézis oligomycinnel történő gátlásakor ismét fokozódott a H_2O_2 termelés, viszont a növekedés mértéke lényegesen kisebb volt vinpocetin jelenlétében (201 %), mint vinpocetin nélkül (387 %).

Szukcináttal lélegeztetett agyi mitokondriumok esetén a ROS képzés 2074 ± 282 pmol/(perc*mg fehérje) volt, ami ADP hozzáadását követően lényegesen lecsökkent (94,6 %-kal) kontroll körülmények között. Amennyiben szukcinátot követően vinpocetint adtunk, a H_2O_2 termelés 79,4 %-kal csökkent. Az ATP szintézis gátlása után ismét emelkedett a H_2O_2 termelés, kontroll körülmények között 22,2-szeres, azonban vinpocetin jelenlétében mindössze 6,1-szeres volt a növekedés (18. ábra B, D).

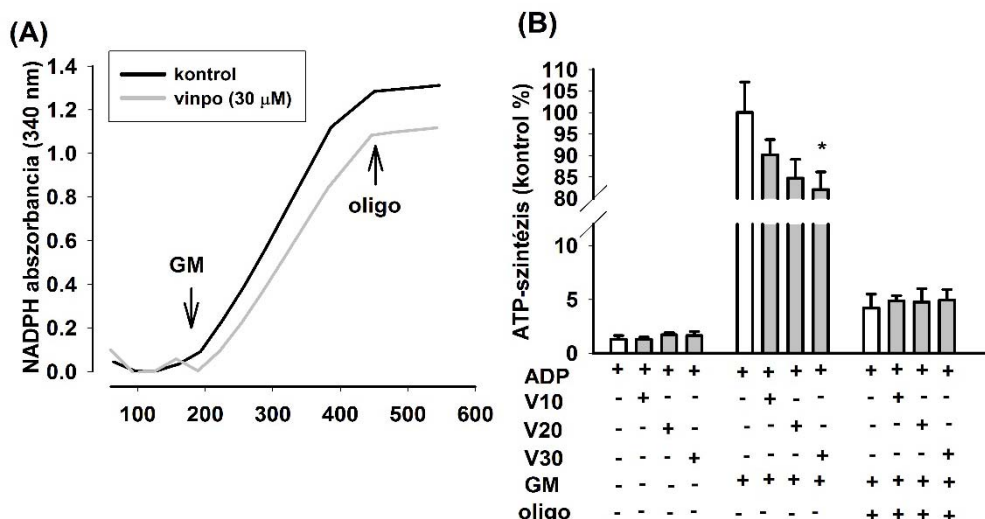


18. ábra: Vinpocetin hatása **tengerimalac** agyból izolált mitokondriumok H_2O_2 termelésére. A mitokondriumokat GM (A, C) vagy szukcinát (B, D) szubsztráttal lélegeztettük a standard mérőoldatban. A mitokondriumokhoz vinpocetint (vinpo; 30 μM), ADP-t (2 mM), oligomycint (oligo; 5 μM) adtunk, majd minden mérést követően két alkalommal 100 pm H_2O_2 -vel (cal) kalibráltuk a mérésünket (ábrán nem látható). Az A (GM) és a B (szukcinát) ábra egy-egy reprezentatív görbét jelenít meg. A C (GM) és D (szukcinát) görbén a statisztika látható, a fehér oszlopok a kontroll körülmények közötti, míg a szürke oszlopok a vinpocetinnel kezelt mitokondriumok H_2O_2 termelését mutatja, átlag \pm S.E.M. ($n > 4$). * jelek a szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelölik a kontrollal összehasonlítva.

4.2.4. A vinpocetin hatása a mitokondrium ATP termelésére

A mitokondrium legfontosabb bioenergetikai funkciója az ATP szintézis biztosítása. Az ADP hatására vinpocetin jelenlétében kisebb mértékű légzésfokozódás és egy jelentősebb membránpolarizáció következett be, mint vinpocetin hiányában, ami kihat az ATP termelésre. A mitokondrium ATP termelése légzési szubsztrátok és ADP jelenlétében képes információt adni a komplex bioenergetikai állapotról.

A mitokondriális ATP termelés GM (5-5 mM) jelenlétében vinpocetin hatására dóziszfüggő módon változott (19. ábra). 30 μM vinpocetin hozzáadására az ATP szintézis $17,9 \pm 4,6$ %-kal csökkent. Oligomycin hatására az ATP termelés majdnem 95 %-ot csökkent, ami azt mutatja, hogy az ATP termelés szinte teljes egészében az oxidatív foszforiláció következtében jön létre.

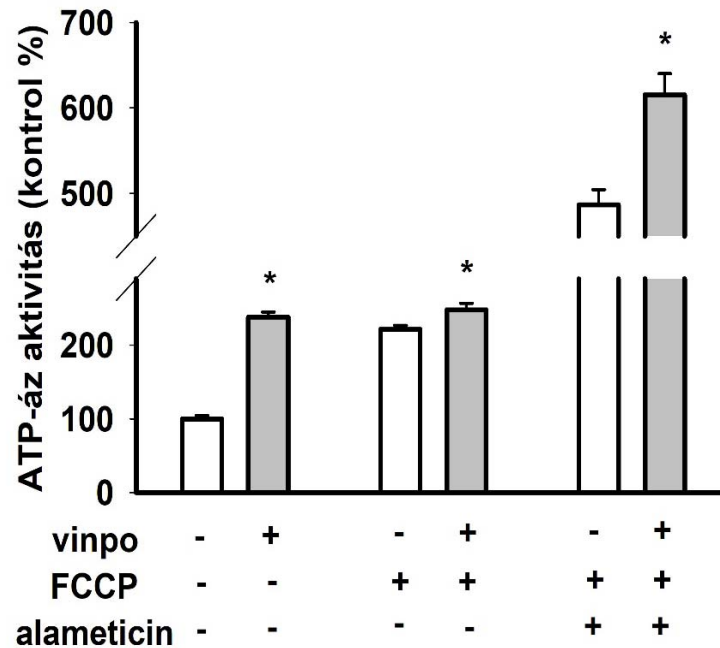


19. ábra: A vinpocetin hatása a mitokondriális ATP termelésre. A **tengerimalac** agyból izolált mitokondriumokat (0,05 mg/ml) standard mérőoldatban, AP5 (200 μM), ADP (2 mM), NADP⁺ (3 mM), változó koncentrációjú vinpocetin (0/10/20/30 μM) és a méréshez szükséges HK (1,5 U/ml) és G6PDH (0,5 U/ml) enzimek jelenlétében inkubáltuk. A mérőoldathoz 200 mp eltelté után GM (5-5 mM) szubsztrátot adtunk, ami elindította az oxidatív szubsztrát-dependens ATP szintézist, majd újabb 200 mp múlva oligomycinnel (oligo; 5 μM) gátoltuk az oxidatív foszforilációt. A mérés során az ATP mennyiségével ekvivalens mennyiségű NADPH keletkezett, melyet spektrofotométeren, 340 nm-en detektáltunk. Az A görbe egy reprezentatív görbét ábrázol (fekete a kontroll, szürke a 30 μM vinpocetinnel kezelt), míg a B görbén oszlopdiagram formájában láthatóak az eredmények. A fehér oszlop a kontroll (K), míg a szürke oszlopok a különböző koncentrációjú vinpocetinnel (V10/V20/V30) kezelt mitokondriumok ATP termelését mutatják (átlag ± S.E.M.; n > 4). * jelöli a szignifikáns különbséget (p < 0,05) a kontrollal összehasonlítva.

4.2.5. A vinpocetin hatása a mitokondrium ATP-áz aktivitására

Az ATP szintézise az oxidatív foszforiláción keresztül számos faktortól függ: a légzési szubsztrát és az ADP transzportjától, az ETC és a citrátkör aktivitásától. Ezért szerettük volna az ATP-szintáz aktivitásának mérését reverz módon is megvalósítani, kizárólag ATP-vel táplált mitokondrium ADP termelésének mérésével. A mitokondriumokhoz vinpocetint (30 μM) vagy puffert adtunk. Vinpocetin jelenlétében

az ATP hidrolízise több mint duplájára emelkedett (137 %-kal nőtt). Szétkapcsolószert (FCCP; 250 nM) hatására csökkent a különbség a kontroll és a vinpocetinnel kezelt mitokondriumok ATP hidrolízise között. A maximális ATP hidrolízis vizsgálatához alameticinnel permeabilizáltuk a membránt és azt tapasztaltuk, hogy vinpocetin hatására fokozódott az ATP-áz aktivitás (20. ábra).

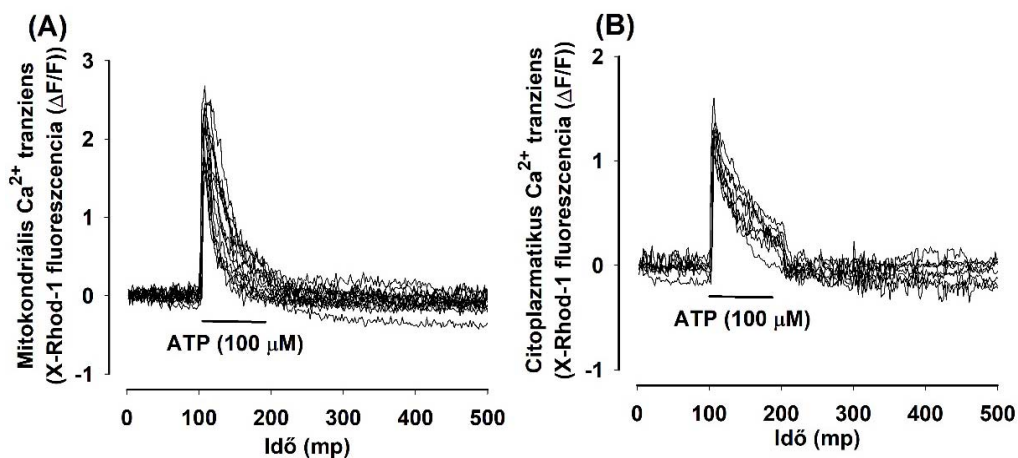


20. ábra: A vinpocetin hatása a mitokondrium ATP-áz aktivitására. A **tengerimalac** agyból izolált mitokondriumokat (0,05 mg/ml) standard mérőoldatban, NADH (300 μ M), vinpocetin (30 μ M), PEP (2 mM) és a méréshez szükséges PK (2 U/ml) és LDH (2 U/ml U) enzimek jelenlétében inkubáltuk. Külsőleg adott ATP (500 μ M) után vizsgáltuk a nyugalmi, a szétkapcsolás (FCCP adása) utáni és a permeabilizált (alameticin adása utáni) mitokondrium ATP-áz aktivitását. A mérés során a hidrolizált ATP mennyiségével ekvivalens mennyiségű NADH fogyott, melyet spektrofotométeren, 340 nm-en detektáltunk. A fehér oszlop a kontroll, míg a szürke oszlop a vinpocetinnel kezelt mitokondriumok ATP-áz aktivitását mutatják (átlag \pm S.E.M.; $n > 4$). * jelöli a szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) a kontrollal összehasonlítva.

4.2.6. Vinpocetin hatása az agyi kapilláris endothél Ca^{2+} homeosztázisra

Az agyi kapilláris endothél Ca^{2+} homeosztázisának vizsgálatához patkány agyi endotélsejtekből készített sejt kultúrát stimuláltunk ATP-vel ($100 \mu\text{M}$), melynek hatására Ca^{2+} tranziens jött létre mind a mitokondriumokban (21. ábra A), mind a citoplazmában (21. ábra B) a purinerg receptorok aktivációja és az inozitol-1,4,5-trifoszfát (IP3) mediált endoplazmatikus retikulumból történő Ca^{2+} felszabadulás miatt (Domotor *et al.* 1999). A mitokondrium Ca^{2+} felvétele a citoplazmából elsősorban a Ca^{2+} uniporteren keresztül, míg leadása a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseretranszporton keresztül valósul meg (Feno *et al.* 2021).

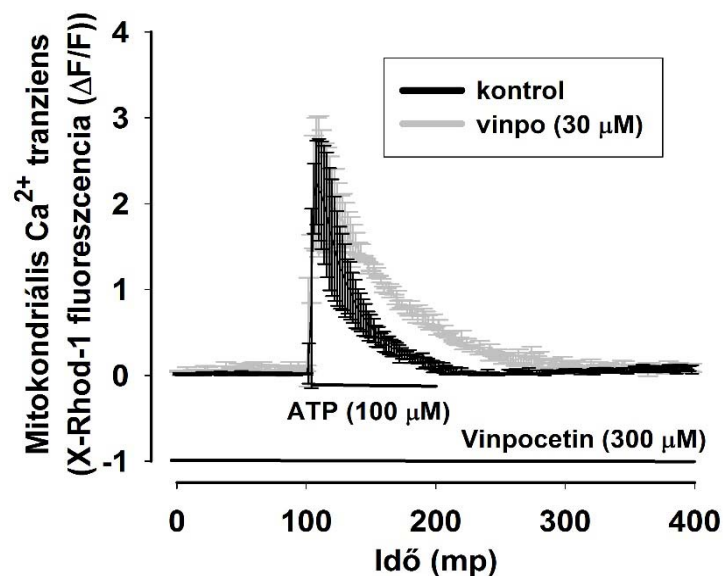
Minden olyan változás, ami létrejön a mitokondrium Ca^{2+} „kezelése” során, az változást indukál a Ca^{2+} tranziens maximális amplitúdójában vagy a felezési idejében (21. ábra). A maximális amplitúdóban bekövetkező változás mind a Ca^{2+} felvételben, mind a Ca^{2+} leadásban bekövetkező változás következménye lehet, míg a Ca^{2+} tranziens felezési idejének változása általában a Ca^{2+} leadásban bekövetkezett változást jelöli.



21. ábra: ATP ($100 \mu\text{M}$) hatására bekövetkező mitokondriális (A) és a citoplazmatikus (B) Ca^{2+} tranziens **patkány** agyi endotél sejtekből készített primer sejt kultúrán. A mitokondriális és a citoplazmatikus Ca^{2+} tranziens meghatározása ugyanarról a felvételtől készült képfeldolgozási módszerek segítségével; 17 sejtről készített 3 mérésből.

Patkány agyi endotél sejteken 10 μM vinpocetinnek nem volt szignifikáns hatása sem a mitokondriális, sem a citoplazmatikus Ca^{2+} tranziensre (ábrát nem mutatunk). Habár 30 μM vinpocetin előkezelés szignifikánsan növelte a mitokondriális Ca^{2+} tranziens felezési idejét ($\tau_{1/2} = 23,5 \pm 6,8$ -ról $\tau_{1/2} = 42,0 \pm 6,2$ másodpercre változott, $p < 0,05$), a maximális amplitúdót nem változtatta meg ($2,24 \pm 0,48$ -ról $2,22 \pm 0,77$ -ra változott; relatív fluoreszcencia változást mutatunk $\Delta F/F_0$) (22. ábra).

A citoplazmatikus Ca^{2+} tranziens paramétereiben nem tapasztaltunk szignifikáns változást ($\tau_{1/2} = 33,3 \pm 5,2$ -ről $\tau_{1/2} = 29,0 \pm 8,69$ másodpercre, míg az amplitúdó $1,33 \pm 0,13$ -ról $1,53 \pm 0,15$ relatív egységre változott). Ábrát nem mutatunk.



22. ábra: Vinpocetin (30 μM) hatására bekövetkező mitokondriális Ca^{2+} tranziens változása **patkány** agyi endothel sejtekből készített primer sejt kultúrán. Átlag \pm S.E.M. ($n = 3$) értékeket ábrázoltuk.

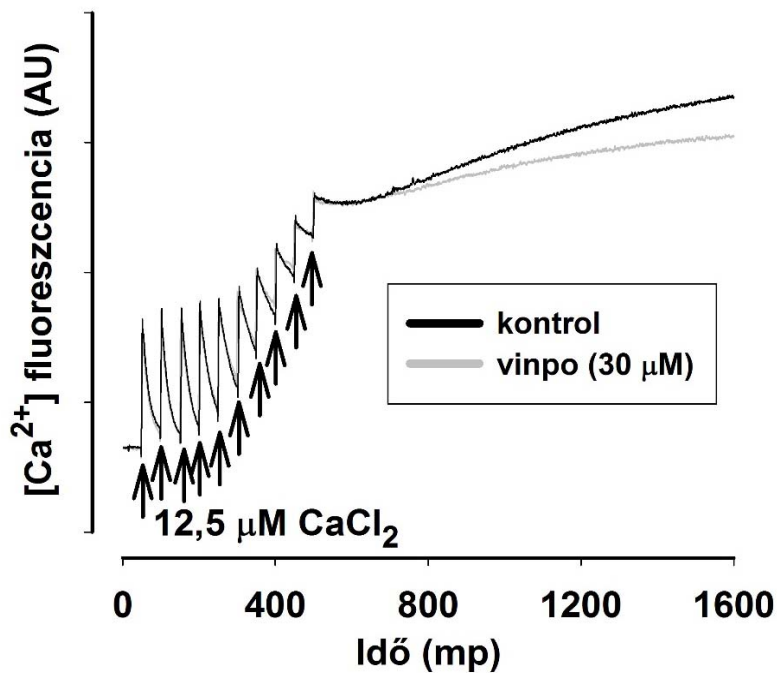
4.2.7. Vinpocetin hatása a késleltetett Ca^{2+} deregulációra

A késleltetett Ca^{2+} dereguláció a glutamát toxicitás modellje, amikor a központi idegrendszerben tartós glutamát stimuláció során a rendkívül magas a Ca^{2+} beáramlás a glutamát receptorokon keresztül. Ennek következtében károsodik a sejtekben Ca^{2+} és az energia homeosztázis, ami sejthalálhoz vezet (Nicholls *et al.* 2007). Ezt jelzi a tartósan

magas intrcelluláris Ca^{2+} szint (késleltetett Ca^{2+} dereguláció). Primer agykérgi neuronokat stimuláltunk glutamáttal (3 μM) és glicinnel (10 μM) 20 percig Mg^{2+} mentes médiumban. Ezalatt a Ca^{2+} koncentrációt vizsgáltuk különálló sejteken alacsony affinitású Ca^{2+} szenzitív fluoreszcens festékkel (Fura-FF). A glutamát indukálta Ca^{2+} csúcsot egy tranziens plató követte a citoplazmatikus Ca^{2+} koncentrációban, ami alacsonyabb volt, mint a csúcs, de magasabb, mint a kezdeti szint. Ez a plató fázis nagy varianciát mutat az egyes sejtek között, azonban minden sejtnél egy idő után irreverzibilis emelkedést tapasztaltunk a Ca^{2+} koncentrációban. Vinpocetin kezelés nem védte meg a sejteket a késleltetett Ca^{2+} deregulációtól. Sem a dereguláció átlagos idejében, sem a deregulációs választ adó sejtek mennyiségében nem tapasztaltunk különbséget a mérés ideje alatt (20 perc). Ábrát nem mutatunk.

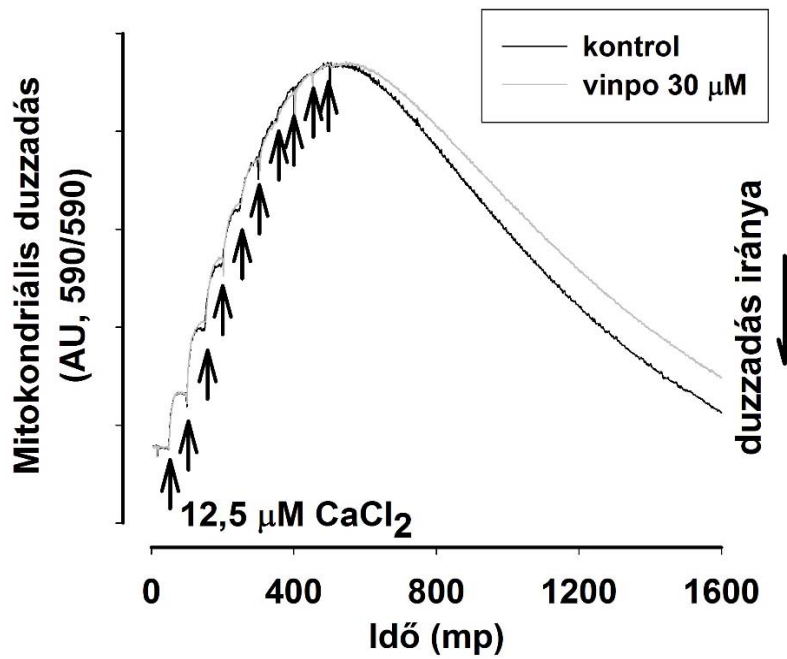
4.2.8. Vinpocetin hatása a mitokondriális Ca^{2+} indukált Ca^{2+} felszabadulásra és a mitokondriális duzzadásra

A mitokondrium egyik funkciója az energiatermelés mellett a Ca^{2+} homeosztázis fenntartása. A Ca^{2+} felvételi kapacitás felméréséhez Ca^{2+} impulzusokat (12,5 μM) alkalmaztunk 50 mp-es időközönként, mely felvételre került a mitokondriumba (23. ábra A). A felvétel gyorsan bekövetkezett: a Ca^{2+} uniporter V_{max} értékére 1,2 μM $\text{Ca}^{2+}/(\text{perc} \cdot \text{mg fehérje})$ adódott. A Ca^{2+} impulzusok adásának hatására a mitokondrium Ca^{2+} felvevő kapacitása egy idő után megszűnt. Amikor a Ca^{2+} felvétel véget ért, a mitokondrium elkezdte elengedni a raktározott Ca^{2+} -ot a mitokondriális permeabilitási tranziációs pórus (mPTP) nyitásán keresztül (Ca^{2+} indukálta Ca^{2+} felszabadulás; mCICR). Vinpocetin jelenlétében (30 μM) a mitokondrium maximális Ca^{2+} felvevő kapacitása változatlan maradt, míg a mCICR csökkent, ami az mPTP gátlására utal (23. ábra).



23. ábra: Vinpocetin (30 µM) hatására a mitokondriális Ca²⁺ homeosztázisra, Ca²⁺ felvételre és mCICR-ra. **Patkány** agyból izolált mitokondriumokat (0,05 mg/ml) inkubáltunk a reakcióelegyben (lásd. 3.15.), ehhez CaCl₂ impulzusokat adtunk 50 mp-enként. A médium szabad Ca²⁺ szintjét Calcium-Green 5 N fluoreszcenciával vizsgáltuk 535 nm-en vinpocetin jelenlétében (vinpo 30 µM, szürke) és hiányában (kontroll, fekete). A Ca²⁺ puffer kapacitás elvesztését a mCICR követte. A görbék reprezentatív méréseket mutatnak (n > 3).

A mitokondrium mCICR mérésével párhuzamosan ugyanabban a mintában vizsgáltuk a Ca²⁺ indukálta duzzadást is (24. ábra). Vinpocetin (30 µM) jelenlétében a mitokondriális duzzadás (a mPTP indikátora) csökkent, amit a kisebb csökkenés jelez a fényszórásban a mCICR-t követően.



24. ábra: Vinpocetin (30 μM) hatása a Ca^{2+} indukálta duzzadásra. A mitokondriumok (0,05 mg/ml) duzzadását a Ca^{2+} felvétellel párhuzamosan detektáltuk fényszórás vizsgálatával a 3.15 fejezetben ismertetett reakcióelegyben vinpocetin jelenlétében (vinpo 30 μM , szürke) és hiányában (kontroll, fekete). A duzzadás és a Ca^{2+} pufferkapacitás maximumát a mitokondrium egyszerre érte el. A görbék reprezentatív méréseket mutatnak ($n > 3$).

5. Megbeszélés

5.1. A metilénkék képes megszüntetni a komplex III gátlást?

PhD-munkám során célunk a MK rágeszálók agyi mitokondriumaira gyakorolt hatásának vizsgálata volt. A mitokondriális működés különböző paramétereit CI (NADH-termelő) szubsztrátok jelenlétében (PM) vizsgáltuk. A MK redoxpotenciáljának köszönhetően képes átvenni az elektronokat a NADH-ról és ezt később továbbadni a citokróm *c*-nek. Ennek következtében képes áthidalni az ETC proximálisabb komplexeit, így biztosítva a NADH oxidációját és a folyamatos elektronáramlást az ETC CIII-től disztálisan elhelyezkedő részére, amelynek fontos szerepe van CI és CIII károsodás során.

A MK vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy szignifikáns mértékben képes fokozni az oxigénfogyasztást a CIII gátlószerrel (antimycin vagy myxothiazol) kezelt mitokondriumokon. Ez az eredmény összhangban van a korábbi eredményeinkkel (Tretter *et al.* 2014), amelyek viszont ellentétesek egy másik munkacsoport által publikált vizsgálatokkal (Gureev *et al.* 2019). Ennek lehetséges okaként felmerült a különböző rágeszálófajok közti eltérés (munkacsoportunk tengerimalacból, míg Gureev munkacsoportja egerek agyából preparálta a kísérletekhez szükséges mitokondriumokat). Későbbi vizsgálataink során azonban kimutattuk, hogy a CIII-gátolt mitokondriumok esetében a MK azonos hatást vált ki a három vizsgált rágeszálófaj (egér, patkány, tengerimalac) esetén (Svab *et al.* 2021). A MK mindhárom rágeszálófaj CIII gátolt mitokondriumain képes volt részlegesen visszaállítani a mitokondriális $\Delta\Psi_m$ -t, ezáltal növelni az oxigénfogyasztást, amelynek csökkenése a CIII gátlószer hatására következett be. A műtermékek kiszűrése érdekében két különböző fluoreszcens festékkel (safranin O, TMRM) is vizsgáltuk a $\Delta\Psi_m$ változását. Mindkét festék minden vizsgált rágeszálófaj esetén azonos eredményeket adott a két CIII inhibitor (antimycin, myxothiazol) mellett (safranin: egér (6. ábra), patkányt nem mutatunk; TMRM: tengerimalac (7. ábra), egeret és patkányt nem mutatunk). Az eredmények igazolásához további anyagokat (ADP, CAT) alkalmaztunk. ADP hatására a CIII gátolt és MK-kel kezelt mitokondriumokban depolarizálódott a membrán, CAT hatására pedig polarizálódott, ami összhangban áll az oxigénfogyasztás változásával (ADP hatására csökkent, míg CAT hatására fokozódott az oxigénfogyasztás intenzitása). A MK az

oxigénfogyasztás és a membránpotenciál részleges visszaállításával szerepet játszhat a gátolt CIII funkcióval járó kórképek terápiájában.

5.2. Az elektrontranszportlánc melyik részei képesek oxidálni a metilénkéket?

A korábbi oxidációs eredmények (egér (5. ábra), patkány és tengerimalac eredményeket nem ábrázoltuk) rámutattak, hogy a MK képes visszaállítani az oxigénfogyasztást, az előzőleg CIII gátlószerral kezelt agyi mitokondriumokon, habár ezzel párhuzamosan a $\Delta\Psi_m$ -t nem állítja vissza az inhibitor hiányában tapasztalható értékre. Ennek a jelenségnek több magyarázata is lehet: 1) a MK egy ismert fényérzékenyítő és ROS-termelő vegyület (Gureev *et al.* 2019; Porat *et al.* 1996; Tuite and Kelly 1993), így a MK részt vesz a metilénkék indukálta ROS képzésben, ami emeli az oxigénfogyasztást. Fontos megjegyezni, hogy a H_2O_2 -képződés több mint egy nagyságrenddel kisebb, mint amit az oxidációs eredmények alapján számolni lehet (Tretter *et al.* 2014), így a többlet oxigénfogyasztás csak részben fordítható H_2O_2 termelésre. A MK által létrehozott CIII áthidaló hatás jelentős mértékben csökkenti az ETC hatékonyságát (10 H^+ kipumpálása helyett csak 2 H^+ -t pumpál ki egy NADH oxidációjával párhuzamosan). Ebből következően a protongradiens kiépülése lassabban történik meg, kisebb $\Delta\Psi_m$ épül fel, ezáltal az elektronok könnyebben tudnak végighaladni az ETC-on. Kísérleteinkben is azt figyeltük meg, hogy a MK fokozza az oxidációt inhibitor jelenlétében és annak hiányában is. A MK elektrontranszporter hatását olyankor képes kifejteni, amikor magas a NADH/NAD⁺ illetve ha nagy az elektronsűrűség a CI FMN-jén. Mivel ilyen állapot jön létre a CI szubsztráttal lélegeztetett mitokondriumban CI és/vagy CIII gátlás esetén, ezért a MK hatását elsősorban ezekben az állapotokban figyelhetjük meg. Bár a $\Delta\Psi_m$ nem áll helyre teljes mértékben, viszont egy szignifikáns hiperpolarizáció megfigyelhető. Az oxigénfogyasztás és a $\Delta\Psi_m$ mérés eredményei együttesen utalnak arra, hogy a CIII blokkolása esetén a MK tud elektronátvivőként funkcionálni, és a blokk előtti résztől a CIII-at megkerülve helyreállítani az elektronáramlást, növelve ezzel a protonok kipumpálásának sebességét, és részlegesen helyreállítva a $\Delta\Psi_m$ -t.

5.3. Elektrontranszport a redukált metilénkékről a citokróm *c*-re

5.3.1. A metilénkék képes redukálni a külső citokróm *c*-t mitokondrium jelenlétében

Annak igazolására, hogy a MK képes-e redukálni a citokróm *c*-t, a méréseink során a mitokondriumokhoz acetyl-citokróm *c*-t adtunk, és ennek redukcióját vizsgáltuk. Az acetyl-citokróm *c* előnye a nem acetylált formájával szemben, hogy kevésbé képes autooxidációra, ezáltal kisebb hibával tudjuk detektálni a redukció mértékét, mivel a visszaoxidálódással nem szükséges számolni. Azért volt szükség az acetyl-citokróm *c* külső forrásból való pótlására, mivel a mitokondrium saját citokróm *c* mennyisége annyira kihígul a mérőtér fogatban, hogy még 100 %-os redukció esetén is csak 10^{-3} nagyságrendbe esne az abszorbancia változása, amit nem lennénk képesek megfelelő pontossággal detektálni. Kezdetben a mitokondriumokhoz acetyl-citokróm *c*-t és CI légzési szubsztrátot (PM) adtunk, majd az alapvonal felvételét követően CIII gátlószert, MK-et, ADP-t, oligomycint, FCCP-t, majd pedig kontrollként az oldatban maradó acetyl-citokróm *c* redukciójához ditionitot használtunk. MK jelenléte nélkül a külsőleg adott acetyl-citokróm *c* nem volt képes redukálódni. MK hozzáadása esetén fokozódott a külsőleg adott acetyl-citokróm *c* redukciója, mivel a MK képes volt redukálni azt. Amikor gátlószer és MK is jelen volt, a redukció sebessége lassabb volt, mivel a depolarizáltabb membrán miatt kevesebb MK-et vett fel a mitokondrium, ami egy lassabb elektrontranszportot eredményezett. Vizsgálatunk egyértelműen bizonyítja, hogy a MK képes redukálni a külsőleg hozzáadott acetyl-citokróm *c*-t. Figyelembe véve, hogy a mitokondriumban mérhető saját citokróm *c* koncentráció (Gear and Bednarek 1972) legalább tízszerese az általunk használt acetyl-citokróm *c* koncentrációnak (25 μ M), nagyon valószínű, hogy a MK képes a mitokondrium saját citokróm *c* készletét is redukálni.

A fent leírtaknak egyik fontos feltétele, hogy a MK szabadon tudjon a mitokondrium belső membránján keresztül transzportálódni. Feltételeztük, hogy az oxidált MK felvételét fokozza a mitokondriális membrán hiperpolarizációja, mivel az oxidált MK pozitív töltéssel rendelkezik (MK^{2+}). A pozitív töltésű MK a redukció során elveszíti a töltését, így képes elhagyni a mitokondriális mátrixot és redukálni a belső membránban lévő citokróm *c*-t és a mérőoldatban levő acetyl-citokróm *c*-t. Ennek következtében a MK újra oxidált formába kerül és egy új redox ciklus során ismét

felvételre tud kerülni a mitokondriumba. Eredményeinket nagymértékben alátámasztják Gabriellinek és munkacsoportjának eredményei (Gabrielli *et al.* 2004).

5.3.2. A citokróm *c* redukciója NADH és metilénkék jelenlétében *in vitro* körülmények között

NADH jelenlétében (mitokondriumok hiányában) egy lassú oxigénfogyasztás figyelhető meg, ami valószínűsíthetően a NADH autooxidációjának következménye, ahol a NADH elektronjait a molekuláris oxigénnek adja át (12. ábra). MK hozzáadását követően megnövekedett az oxigénfogyasztás. A különböző koncentrációban adott acetil-citokróm *c* hatására hirtelen lecsökkent az oxigénfogyasztás, mivel a NADH MK által stimulált oxidációja következtében bekövetkező fokozott oxigén redukciót az acetil-citokróm *c* redukciója váltotta fel, csökkentve ezzel az oxigénfogyasztást. Ez a csökkent oxigénfogyasztás azonban fokozatosan visszaáll az eredeti értékre a hozzáadott acetil-citokróm *c* koncentrációtól függően (minél több acetil-citokróm *c* volt jelen, annál tovább maradt alacsony az oxigénfogyasztás). Kísérletünk bizonyíték arra, hogy a redukált NADH autooxidációja során képes a molekuláris oxigént redukálni, amit a MK képes felgyorsítani. Emellett a MK képes a NADH-ról átvett elektronokat az acetil-citokróm *c*-nek továbbadni. Minél nagyobb mennyiségben adtunk acetil-citokróm *c*-t a mérési médiumhoz, annál lassabban állt vissza az oxigénfogyasztás az eredeti szintre. Ebből arra következtethetünk, hogy acetil-citokróm *c* jelenlétében a MK redukció tekintetében az acetil-citokróm *c*-t preferálja a molekuláris oxigénnel szemben. A mérés előrehaladtával csökken a kamrában az oxidált acetil-citokróm *c* mennyisége, aminek következtében a MK elektron akceptora ismét a molekuláris oxigén lesz, ezáltal pedig fokozódni fog az oxigénfogyasztás is.

A NADH jelenlétében MK hatására bekövetkező acetil-citokróm *c* redukciót bizonyító további kísérlet eredményeket a 13. ábra mutatja be. Változó mennyiségű NADH és állandó mennyiségű acetil-citokróm *c* esetén MK hiányában nem tapasztalható acetil-citokróm *c* redukció. A MK hozzáadását követően azonban a kezdeti NADH koncentráció függvényében acetil-citokróm *c* redukció fokozódást figyelhetünk meg. Hasonló eredményeket korábban már más munkacsoport is publikált (McCord and Fridovich 1970). Jelen esetben viszont azt tudjuk igazolni, hogy MK hiányában a NADH nem képes redukálni az acetil-citokróm *c*-t, azonban MK jelenlétében képes a NADH elektronjait az acetil-citokróm *c*-re továbbítani. Ezek a

kísérletek is megerősítik a korábbi feltevést, hogy a MK képes lehet csökkenteni a CIII deficienciában kialakuló káros bioenergetikai következményeket. Ez annak ellenére történik, hogy MK jelenlétében a fenntartott elektrontranszport jóval kisebb mértékű protongradiens kialakulását és alacsonyabb $\Delta\Psi_m$ -t eredményez mint ép ETC esetén. Azonban mivel a MK fenntartja a redukáló ekvivalensek oxidációját, ezáltal képes fokozni a citrátkör sebességét. Így ugyan csökken az oxidatív foszforiláció hatékonysága, azonban ilyen körülmények között fokozódhat a szubsztrát-szintű foszforiláció (Komlodi and Tretter 2017), ami a citrátkör működésének felgyorsulása esetén a szukcinát-tiokináz működésnek eredményeként jön létre.

5.4. A komplex III inhibitorral és metilénkéssel kezelt mitokondriumok szokatlan oxidációs mintázata

Phd-munkám MK-kel foglalkozó részének másik fontos kérdése, hogy mi okozza a szokatlan oxidációs mintázatot és a NAD(P)H egyensúlyban bekövetkező változást a CIII-mal és MK-kel is kezelt mitokondriumokon.

Általában a szubsztráttal ellátott mitokondriumokban ADP hatására megemelkedik az oxidatív foszforiláció sebessége. Ennek következtében fokozódik az oxigénfogyasztás, csökken a $\Delta\Psi_m$ és a NADH/NAD⁺ arány, ami a citrátkör felgyorsulását eredményezi. Ennek értelmében, ha gátoljuk az ATP szintézist vagy azáltal, hogy gátoljuk adenin-nukleotid transzportot, specifikusabban az ANT-t, vagy úgy, hogy oligomycinnel gátoljuk az ATP-szintézist, akkor ellentétes hatást kellene tapasztalnunk. Az ADP által fokozott légzésnek csökkenni, míg a NADH/NAD⁺ aránynak emelkedni és membránnak hiperpolarizálódni kellene. Kontroll körülmények között valóban ezt lehet látni. Azonban ha a mitokondriumokat CIII gátlószerezrel és MK-kel kezeljük, ADP hatására bár a membrán depolarizálódik (6. ábra és 7. ábra), az oxigénfogyasztás ezzel párhuzamosan lecsökken (5. ábra) és a NAD(P)H szint emelkedik (8. ábra). ANT gátló hatására hiperpolarizálódik a membrán, felgyorsul az oxigénfogyasztás és csökken a NADH szint. Ezen eredmények magyarázata a MK oxidoredukciós állapotának változásában, valamint a MK mitokondrium és környezete közötti eloszlásában keresendő. A 8. ábra a MK oxidoredukciós állapotát és lokalizációját mutatja be. Amikor a MK-t nem energizált (szubsztrátmentes) mitokondriumokhoz adjuk, nem kapunk szignifikáns változást. Szubsztrát hatására a

MK felvételre kerül a mitokondriumba. Szétkapcsolószer (FCCP) hatására a $\Delta\Psi_m$ megszűntetése következik be, ami ismét lecsökkenti a mitokondriumban található MK mennyiségét. Egy hozzávetőleges számolást végezve a MK moláris extinkciós koefficiensének felhasználásával ($\epsilon = 71,547 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) meghatározhatjuk a mitokondrium által felvett MK mennyiségét. A $2 \mu\text{M}$ MK hozzáadása a nem energizált mitokondriumokhoz ($0,4 \text{ mg/ml}$) $\Delta A_{660} = 0,135$ abszorbanciaváltozást okoz, ami $1,8 \mu\text{M}$ MK koncentrációnak felel meg, ami elfogadható eredménynek (10% eltérés) számít. CI szubsztrát (PM) hozzáadását követően csökken az oxidált MK koncentrációja a felülúszóban és a mitokondriumban is. A felülúszóban mérhető abszorbancia 34 %-kal csökken. Durva becsléssel élve, ha $1 \mu\text{l/mg}$ -nak vesszük a mitokondriális térfogatot, akkor az derül ki, hogy energizált állapotban a mitokondriumban található MK mennyisége több mint két nagyságrenddel nagyobb, mint az extramitokondriális térben. A fel nem vett MK a felülúszóban marad és oxidálódik (vagy a centrifugálás alatt oxidálódik), mivel a felülúszón történő levegő átbuborékoltatás már nem módosítja szignifikáns mértékben az oxidált MK mennyiségét (nem nő az abszorbancia 660 nm -en). Összegezve tehát a mitokondrium oxidált formában képes felvenni a MK-t, majd redukálja azt, és részben elengedi. Ezzel tudjuk magyarázni kísérleteink szokatlan eredményeit. A CIII inhibitor jelenlétében a metilénkék abszorbancia változásának detektálásával tudjuk vizsgálni a MK oxidoredukciós állapotát.

Összegezve a magyarázatot, CIII gátlószer és MK hiányában ADP hatására megnő az oxigénfogyasztás, depolarizálódik a membrán és csökken a NAD(P)H fluoreszcencia, míg CAT hatására éppen ellenkező hatás következik be: csökken az oxigénfogyasztás, hiperpolarizálódik a membrán és nő a NAD(P)H fluoreszcencia.

Ha csak MK-t alkalmazunk CIII gátlószer nélkül, akkor a metilénkék önmagában (az általunk alkalmazott dózisban) nem változtatja meg a $\Delta\Psi_m$ -t (Tretter *et al.* 2014), de fokozza a nyugalmi légzést és csökkenti a NAD(P)H fluoreszcenciát, mivel az elektronokat a NADH-ról a citokróm *c*-re továbbítja. Ezek az elektronok azonban a szokásos NADH oxidációja során kipumpált 10 H^+ helyett csak 2 H^+ -t (CIV-en keresztül a citokróm *c* oxidációja során) transzportálnak az intermembrán térbe.

Ha csak CIII gátlószer használunk MK nélkül, akkor sem az ADP, sem a CAT nem képes befolyásolni az oxigénfogyasztást, a $\Delta\Psi_m$ -t és a NAD(P)H egyensúlyt.

CIII gátlószer és MK együttes jelenlétekor az ADP hozzáadása csökkenti az oxigénfogyasztást. Ezt a jelenséget azzal magyarázhatjuk, hogy az ADP depolarizálja a membránt. A MK adása az ADP előtt részlegesen visszaállítja a $\Delta\Psi_m$ -t (6. ábra és 7. ábra). ADP beáramlása a mitokondriumba depolarizálja a membránt, mivel az ANT egy elektrogén transzporter ($\text{ADP}^{3-} \leftrightarrow \text{ATP}^{4-}$) (Gropp *et al.* 1999). A depolarizáció hatására csökkenni fog a mitokondrium MK felvétele, így a kevesebb MK kevésbé lesz képes felvenni az elektronokat a belső membránról illetve a NADH-ról. A csökkent MK felvétel kevesebb NADH-t fog tudni oxidálni, ezáltal nőni fog a NAD(P)H/NAD(P)^+ arány és csökkenni az oxigénfogyasztás. A csökkent oxigénfogyasztás tehát annak a következménye, hogy a kevesebb rendelkezésre álló MK kevésbé fogja tudni áthidalni a CIII gátlást, kevesebb citokróm *c*-t fog redukálni, így a CIV kevesebb oxigént fog fogyasztani. Az ADP felvétele a mitokondriumba az ANT-n keresztül történik, vele párhuzamosan a mitokondrium ATP-t ad le, ezért az ATP szintézise elengedhetetlen az ANT fiziológiai irányú (ADP be/ATP ki) működéséhez. Két lehetséges úton tudja a mitokondrium pótolni a kieső oxidatív foszforiláció során termelt ATP-t. Egyik lehetséges mód a különböző adenilát-kináz izoenzimek (Barkulis and Lehninger 1951; Chinopoulos and Seyfried 2018; Panayiotou *et al.* 2014), amik a mitokondriális mátrixban működnek. A másik út a citrátkörben található szubsztrát-szintű foszforiláció. A szubsztrát-szintű foszforiláció működéséhez nincs szükség protonok kipumpálására vagy magas $\Delta\Psi_m$ -ra, mindössze a citrátkör aktivitásától függ, amit pedig a redukáló ekvivalensek mennyisége képes befolyásolni. A MK ezeket a redukált koenzimeket képes oxidálni, ezáltal fenntartva a citrátkör folyamatos működését.

5.5. A vinpocetin vizsgálata

A Phd-munkám másik nagy témája a vinpocetin hatásainak vizsgálata volt. A vinpocetint évtizedek óta használják a klinikai gyakorlatban, és számos lehetséges molekuláris és strukturális célpontját azonosították, amin keresztül jótékony hatást képes kifejteni. Bár a vinpocetin perifériás benzodiazepin receptorhoz való kötődését már korábban leírták (Gulyas *et al.* 2005; Vas *et al.* 2008), a mitokondriummal foglalkozó tanulmányok később nem foglalkoztak ennek felderítésével, így jelen munkában a vinpocetin bioenergetikai aspektusait vizsgáljuk primer agyi kapilláris endotélien, neuronokon, izolált idegvégződéseken (szinaptoszómák) és izolált mitokondriumokon.

5.5.1. A vinpocetin hatása a Ca^{2+} tranziensre agyi kapilláris endotélien

A vér-agy gát integritása fontos barrier szerepet tölt be, ezért elengedhetetlen a központi idegrendszer homeosztázisának fenntartásához (Abbott *et al.* 2010). Az agyi kapilláris sejtekben a purinerg szignál hatására megemelkedik a citoplazmatikus és mitokondriális Ca^{2+} szint (21. ábra). Vinpocetin jelenlétében a mitokondriális Ca^{2+} tranziens csúcsa nem változik, azonban a felezési idő megnő, tehát a Ca^{2+} felszabadulás lelassul vinpocetin jelenlétében (22. ábra). Ez a jelenség esetleg a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kicseréléséért felelős transzporter gátlásának számlájára írható, ami a mitokondrium Ca^{2+} leadásában a legfontosabb szerepet tölti be (Hoppe 2010). A vinpocetin ezen hatásához hasonló látunk CGP-37157 alkalmazásakor, ami egy erőteljes gátlószere a mitokondriális Na^+ függő Ca^{2+} felszabadulásnak (Gerencser AA and Adam-Vizi 2001). A CGP-37157 szintén rendelkezik neuroprotektív hatással (Garcia-Casas *et al.* 2018). Az ioncsatornák blokkolása is a vinpocetin hatásai közé tartozik, például hatékonyan képes blokkolni a tetrodotoxin szenzitív Na^+ csatornát, ami egy további lehetséges magyarázatként szolgálhat.

5.5.2. A vinpocetin hatása a késleltetett Ca^{2+} deregulációra agykérgi neuronokon

A késleltetett Ca^{2+} dereguláció a glutamát toxicitás modellje (lásd 4.2.7). A vinpocetin nem befolyásolta a késleltetett Ca^{2+} deregulációt a primer agykérgi

neuronokon. Eredményeink különböznek más kutatócsoportok eredményeitől (Jeon *et al.* 2010), aminek oka a kutatásunkban alkalmazott magas glutamát koncentráció lehet (300 μM -t alkalmaztunk 20 percig szemben a 25 μM -os koncentráció 30 perces alkalmazásával).

5.5.3. A vinpocetin hatása az oxigénfogyasztásra szinaptoszómákon

A szinaptoszómák oxigénfogyasztása az *in situ* mitokondriumok szubsztrát oxidációjának számlájára írható (Abdel-Rahman *et al.* 2016). A szinaptoszómák energiaforrásaként glükózt alkalmaztunk, ami kezdetben a glikolízisben, majd a mitokondriumban metabolizálódott. Kompromisszumos megoldásként a mitokondriális oxigénfogyasztást glükóz hozzáadásával vizsgáltuk, mivel ilyenkor a szinaptoszóma preparálás során keletkezett szabad mitokondriumok nem képesek a glükóz hasznosítására, így a mért oxigénfogyasztás kizárólag a szinaptoszóma oxigénfogyasztását tükrözi (15. ábra). Azért, hogy meggyőződjünk arról, hogy nem a glükózfelvétel vagy a glikolízis befolyásolja a szinaptoszómális oxigénfogyasztást, kísérleteinket megismételtük laktáttal is. A vinpocetin ugyanúgy gátolta a szinaptoszómák oxigénfogyasztását glükóz vagy laktát jelenlétében is, ezzel kizárva annak lehetőségét, hogy a gátlás a glükóz metabolizmusra lenne specifikus. Ezen megfigyelések irányították figyelmünket az izolált mitokondriumok vizsgálatára.

5.5.4. A vinpocetin hatása a szinaptoszómák H_2O_2 termelésére

Vinpocetin gátolta a H_2O_2 képződést a szinaptoszómákban. A szinaptoszóma H_2O_2 termelésének vizsgálatához Amplex UltraRed fluoreszcens festéket és torna peroxidázt használtunk, ami indirekt információt képes szolgáltatni a ROS homeosztázisról. Az információk indirektek, mivel 1) a ROS forrása nem csak a mitokondrium lehet, mivel a NADPH-oxidázok (Abdel-Rahman *et al.* 2016; Valencia *et al.* 2013) és a nitrogén-monoxid-szintáz (Alekseenko *et al.* 2012) is képesek ROS képzésre, 2) a citoplazma is tartalmaz számos enzimátikus ROS elimináló rendszert (Bizzozero *et al.* 2006; Cardoso *et al.* 1998) és a mi módszerünk extra-szinaptoszómális térben detektál. Mivel a mitokondriális és a plazmamembrán között is találhatóak ROS termelő és elimináló rendszerek, a direkt mitokondriális ROS termelés meghatározásához a későbbiekben izolált mitokondriumokat használtunk.

5.5.5. A vinpocetin hatása a mitokondriális membránpotenciálra, oxigénfogyasztásra és H₂O₂ termelésére

Vinpocetin hatására a mitokondriális membrán enyhén depolarizálódott ($4,0 \pm 0,6$ mV) és ADP hiányában együtt járt az oxidáció fokozódásával (16. ábra), ami szétkapcsolásszerű hatást váltott ki mind GM, mind szukcinát alkalmazásakor. ADP hiányában vagy oligomycin jelenlétében a $\Delta\Psi_m$ megemelkedett, és a redox-centrumok redukált állapotba kerültek. Ilyen kondíciók mellett a mitokondriumok H₂O₂ termelése fokozódott, mind CI mind CII szubsztrátok esetében (18. ábra). Ilyen körülmények között még enyhe depolarizáció is képes exponenciálisan csökkenteni a ROS képződést (Korshunov *et al.* 1997; Miwa *et al.* 2003; Starkov *et al.* 2002). Tehát a vinpocetin ROS csökkentő hatásának lehetséges magyarázata a vinpocetin enyhe szétkapcsoló hatásával magyarázható. Ez a szétkapcsoló hatás azonban ADP stimulált légzés esetén nem tapasztalható. A depolarizációhoz hasonlóan, ADP-mentes környezetben a légzés gátlása is független volt az alkalmazott szubsztrátoktól (GM vagy szukcinát). Ez a megfigyelés valószínűsíti, hogy vagy a CI-et és CII-t, vagy a CIII-at, vagy a CIV-et (vagy ezek valamilyen kombinációját) képes gátolni a vinpocetin.

5.5.6. A vinpocetin hatása a mitokondriális ATP szintézisre és az ATP-áz aktivitásra

Vinpocetin hatására csökkent a mitokondriális ATP szintézis GM szubsztrát alkalmazásakor, ezzel szemben szubsztrát hiányában emelkedett ATP hidrolízist tapasztaltunk. A konkrét ok, ami a fenti összehasonlítást magyarázza, hogy az ATP szintézis összességében több paramétertől függ. A hatékony ATP termelés mögött számos mechanizmus áll, amik egymással tökéletes összhangban dolgoznak. Ezért nehéz megbecsülni, hogy megfigyelésünk melyik aspektusa áll a neuroprotekciónak háttérében. Az enyhe csökkenés az ATP szintézisben az enyhe szétkapcsolás következménye. A kevésbé hatékony ATP termelés azonban nem előnyös a sejt túlélés szempontjából. Másrésztől azonban a szétkapcsolás okozta membránpotenciál csökkenése csökkentette a ROS termelést és képes fokozni a ROS eliminációt a NADPH képzés fokozásával, ami a NADP⁺ függő izocitrát-dehidrogenáz működése során valósulhat meg. Ennek következményeként javulhat a mitokondrium és a sejt redox homeosztázisa.

Az emelkedett ATP hidrolízis azt sugallja, hogy a vinpocetin nem gátolja az ATP szintáz reverz működését (és talán a forward módot se).

5.5.7. A vinpocetin hatásai közti ellentmondások

A vinpocetin vizsgálata során kapott megfigyeléseink között találhatóak ellentmondásosak. Néhány közülük negatív, mint például a csökkent mitokondriális légzés és ATP szintézis, azonban egyes hatásokat különböző módon is értelmezhetünk. Ilyen például az enyhe szétkapcsolás, illetve az endotélsejtekben tapasztalható Ca^{2+} tranziens felezési idejének emelkedése, ami valószínűleg a mitokondriális $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kicserélő transzport gátlásának tulajdonítható. Végezetül pedig a vinpocetinnek vannak egyértelműen pozitív hatásai, mint például a Ca^{2+} indukálta mitokondriális duzzadás, késleltetett mCICR és a mitokondriális H_2O_2 termelés jelentős gátlása.

Összességében elmondható, hogy az enyhe depolarizáció és a csökkent mitokondriális H_2O_2 kibocsátás fontos szerepet játszhat abban, hogy a vinpocetinnek jótékony hatása van a neuronális károsodással járó patológiás kórképekben.

Tehát a fent leírtak alapján arra következtethetünk, hogy a vinpocetin valószínűleg több molekuláris támadásponton keresztül képes kifejteni a hatását.

6. Következtetések

A genomszekvenálás korában, amikor képesek vagyunk kapcsolatot találni az egyes betegségek genetikai háttere és a nem specifikus tünetek között, az úgynevezett „ritka betegségek” mint egyes mitokondriális betegségek, nem is annyira ritkák, mint korábban gondoltuk. Ezen betegségek terápiájában hatásosak lehetnek a jól tolerálható gyógyszerek, mint a metilénkék és a vinpocetin (vagy ezek analógjai), melyek alkalmazása során nem merültek fel komolyabb mellékhatások, így valószínűsíthetjük, hogy a gyógyszerek pozitív hatásai dominánsak *in vivo* körülmények között.

Fontos azon megjegyezni, hogy a szokatlan vagy ritka bioenergetikai jelenségek, mint például amit jelen munkában is bemutatunk, gondolkodásra és vitára ösztönöznek, hogy jobban megértsük a redox folyamatok molekuláris hátterét.

7. Összefoglalás

Munkánk során a MK CIII gátolt rágsáló mitokondriumok bioenergetikájára gyakorolt hatását vizsgáltuk három különböző rágsálófajon.

Új eredményeink a következők:

- A MK képes fokozni az oxigénfogyasztást és csökkenti a NADH/NAD⁺ arányt mindhárom rágsálófajon CIII gátlás esetén.
- Az oxidált MK felvételre kerül a mitokondriumba; MK felvétel mértéke a mitokondriális membrán polarizációjának függvénye.
- A CIII gátlószer és a MK együttes jelenlétében létrejövő szokatlan bioenergetikai jelenségek hátterében a MK oxidációs állapotának és lokalizációjának változása áll.
- A NADH nem képes az elektronokat közvetlenül a citokróm *c*-nek átadni, MK jelenlétében viszont a citokróm *c* redukciójának mértéke arányos a NADH és a MK koncentrációjával. Citokróm *c* hiányában in vitro körülmények között a MK a molekuláris oxigénnek képes átadni az elektronokat.

Munkánk másik nagy témája a vinpocetin vizsgálata volt, ahol a vinpocetin bioenergetikai paraméterekre gyakorolt hatását vizsgáltuk agyi működést javító hatásának ismeretében különböző modellrendszereken.

Új eredményeink a következők:

- A vinpocetin koncentrációfüggő módon fokozta a szinaptoszóma oxigénfogyasztását mind nyugalmi, mind szétkapcsolt állapotban.
- A mitokondriális oxigénfogyasztás vinpocetin jelenlétében nyugalmi állapotban és az ATP-szintézis gátlása esetén emelkedett, azonban az ADP stimulált légzés intenzitása csökkent.
- A vinpocetin csökkentette a H₂O₂ termelést a glükózzal lélegeztetett és a szétkapcsolt szinaptoszómák esetében, GM-tal vagy szukcináttal lélegeztetett mitokondriumokon.
- Izolált mitokondriumokon vinpocetin hatására csökkent az energetizált mitokondriumok ATP-szintézise, azonban az ATP-áz aktivitásuk fokozódott.
- A vinpocetin 30 μM-os koncentrációban lassította a Ca²⁺ leadást, de a citoplazmatikus Ca²⁺ változására nem volt hatással.
- Vinpocetin hatására a mitokondrium Ca²⁺ felvétele nem változott, a mCICR azonban csökkent, amellyel párhuzamosan a mitokondriális duzzadás mértéke is csökkent.

8. Summary

The aim of our first topic is to investigate the effect of methylene blue on the bioenergetics of CIII inhibited rodent mitochondria.

Our new results are as follows:

- MB is able to increase oxygen consumption and decrease NADH/NAD⁺ ratio in all three rodent species upon CIII inhibition.
- Oxidized MB is taken up into the mitochondria; the rate of MB uptake is a function of mitochondrial membrane polarization.
- The unusual bioenergetic phenomena detected in the presence of CIII inhibitor and MB are due to the changes in the oxidoreduction state and localization of MB.
- NADH cannot transfer electrons directly to cytochrome *c*, but in the presence of MB the rate of reduction of cytochrome *c* is proportional to the concentration of NADH and MB. In the absence of cytochrome *c* MB transfers electrons to molecular oxygen.

The aim of our second topic is to investigate the effect of vinpocetine on various bioenergetic parameters in light of its neuroprotective effects.

Our new results are as follows:

- Vinpocetine enhances synaptosomal oxygen consumption in a concentration-dependent manner in both resting and uncoupled states.
- Mitochondrial oxygen consumption is increased in the presence of vinpocetine in the absence of ADP or upon inhibition of the ATP synthesis, however decreased in ADP-stimulated respiration.
- Vinpocetine reduces H₂O₂ production in both glucose-fed and uncoupled synaptosomes, and in both GM and succinate-fed mitochondria.
- In isolated mitochondria, vinpocetine causes a decrease in ATP synthesis in energized mitochondria, but the mitochondrial ATPase activity is enhanced.
- Vinpocetine at a concentration of 30 μM already decelerates Ca²⁺ release, but has no effect on cytoplasmic Ca²⁺ changes.
- Vinpocetine does not alter mitochondrial Ca²⁺ uptake, but mCICR decreases. In parallel, the rate of mitochondrial swelling decreases with vinpocetine.

9. Irodalomjegyzék

Abbott N. J., Patabendige A. A., Dolman D. E., Yusof S. R. and Begley D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **37**, 13-25.

Abdel-Rahman E. A., Mahmoud A. M., Aaliya A., Radwan Y., Yasseen B., Al-Okda A., Atwa A., Elhanafy E., Habashy M. and Ali S. S. (2016). Resolving Contributions of Oxygen-Consuming and ROS-Generating Enzymes at the Synapse. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, 1089364.

Abdel-Salam O.M., Hamdy S.M., Seadawy S.A., Galal A.F., Abouelfadl D.M. and Atrees S.S. (2016). Effect of piracetam, vincamine, vinpocetine, and donepezil on oxidative stress and neurodegeneration induced by aluminum chloride in rats. *Comp Clin Pathol* **25**, 305-18.

Ahangar A.A., Saadat P., Alijanpour S., Galeshi M. and Hosseinalipour S. (2018). Post ischemic stroke complication: How much nursing diagnosis are confirms by neurologist. *J Patient Care* **4**, 2.

Ahmed H. I., Abdel-Sattar S. A. and Zaky H. S. (2018). Vinpocetine halts ketamine-induced schizophrenia-like deficits in rats: impact on BDNF and GSK-3beta/beta-catenin pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **391**, 1327-1338.

Akerman K. E. and Wikstrom M. K. (1976). Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* **68**, 191-197.

Alekseenko A. V., Lemeshchenko V. V., Pekun T. G., Waseem T. V. and Fedorovich S. V. (2012). Glutamate-induced free radical formation in rat brain synaptosomes is not

dependent on intrasynaptosomal mitochondria membrane potential. *Neurosci. Lett.* **513**, 238-242.

Al-Kuraishy H. M., Al-Gareeb A. I. and Al-Nami M. S. (2019). Vinpocetine Improves Oxidative Stress and Pro-Inflammatory Mediators in Acute Kidney Injury. *Int. J. Prev. Med.* **10**, 142.

Alkuraishy H. M., Al-Gareeb A. I. and Albuhadilly A. K. (2014). Vinpocetine and pyritinol: a new model for blood rheological modulation in cerebrovascular disorders-a randomized controlled clinical study. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 324307.

Al-Kuraishy H. M., Al-Gareeb A. I., Naji M. T., Al-Mamorry F. (2020). Role of vinpocetine in ischemic stroke and poststroke outcomes: A critical review. *Brain Circ.* **6**(1):1-10.

Alston T. A. (2014). Why does methylene blue reduce methemoglobin in benzocaine poisoning but beneficially oxidize hemoglobin in cyanide poisoning. *J. Clin. Anesth.* **26**, 702-703.

Altmann R. (1890). *Die Elementarorganismen und ihre Beziehung zu den Zellen.* Verlag von Veit and COMP.

Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., de Bruijn M. H., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J., Staden R. and Young I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457-465.

Andreyev A. Y., Kushnareva Y. E., Murphy A. N. and Starkov A. A. (2015). Mitochondrial ROS Metabolism: 10 Years Later. *Biochemistry (Mosc.)* **80**, 517-531.

Atamna H., Nguyen A., Schultz C., Boyle K., Newberry J., Kato H. and Ames B. N. (2008). Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways. *FASEB J.* **22**, 703-712.

Barkulis S. S. and Lehninger A. L. (1951). Myokinase and the adenine nucleotide specificity in oxidative phosphorylations. *J. Biol. Chem.* **190**, 339-344.

Barron E. S. (1930). The Catalytic effect of methylene blue on the oxygen consumption of tumors and normal tissues. *J. Exp. Med.* **52**, 447-456.

Barsukova A. G., Bourdette D. & Forte M. (2011). Mitochondrial calcium and its regulation in neurodegeneration induced by oxidative stress. *Eur. J. Neurosci.* **34**, 437–447

Baughman J. M., Perocchi F., Girgis H. S., Plovanich M., Belcher-Timme C. A., Sancak Y., Bao X. R., Strittmatter L., Goldberger O., Bogorad R. L., Kotliansky V. and Mootha V. K. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**, 341–345.

Beal M. F. (2010). Parkinson's disease: a model dilemma. *Nature* **466**, S8-10.

Bender T. and Martinou J. C. (2013). Where killers meet--permeabilization of the outer mitochondrial membrane during apoptosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a011106.

Bereczki D. and Fekete I. (2000). Vinpocetine for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database. Syst. Rev.* CD000480.

Betarbet R., Sherer T. B., MacKenzie G., Garcia-Osuna M., Panov A. V. and Greenamyre J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* **3**, 1301-1306.

Bizzozero O. A., Ziegler J. L., De J. G. and Bolognani F. (2006). Acute depletion of reduced glutathione causes extensive carbonylation of rat brain proteins. *J. Neurosci. Res.* **83**, 656-667.

Bleier L. and Droese S. (2013). Superoxide generation by complex III: from mechanistic rationales to functional consequences. *Biochim. Biophys. Acta* **1827**, 1320-1331.

Bonoczk P., Panczel G. and Nagy Z. (2002). Vinpocetine increases cerebral blood flow and oxygenation in stroke patients: a near infrared spectroscopy and transcranial Doppler study. *Eur. J. Ultrasound* **15**, 85-91.

Borghammer P. (2012). Perfusion and metabolism imaging studies in Parkinson's disease. *Dan. Med. J.* **59**, B4466.

Borghammer P., Chakravarty M., Jonsdottir K. Y., Sato N., Matsuda H., Ito K., Arahata Y., Kato T. and Gjedde A. (2010). Cortical hypometabolism and hypoperfusion in Parkinson's disease is extensive: probably even at early disease stages. *Brain Struct. Funct.* **214**, 303-317.

Borghammer P., Cumming P., Aanerud J. and Gjedde A. (2009). Artefactual subcortical hyperperfusion in PET studies normalized to global mean: lessons from Parkinson's disease. *Neuroimage*. **45**, 249-257.

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. **72**, 248-254.

Bragadin M., Pozzan T. & Azzone G. F. (1979). Activation energies and enthalpies during Ca²⁺ transport in rat liver mitochondria. *FEBS Lett*. **104**, 347–351.

Brand M. D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol*. **45**, 466-472.

Bratic A. and Larsson N. G. (2013). The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest* **123**, 951-957.

Bruchey A. K. and Gonzalez-Lima F. (2008). Behavioral, Physiological and Biochemical Hormetic Responses to the Autoxidizable Dye Methylene Blue. *Am. J. Pharmacol. Toxicol*. **3**, 72-79.

Bulua A. C., Simon A., Maddipati R., Pelletier M., Park H., Kim K. Y., Sack M. N., Kastner D. L. and Siegel R. M. (2011). Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J. Exp. Med*. **208**, 519-533.

Cadenas S. (2018). Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg*. **1859**, 940-950.

Callaway N. L., Riha P. D., Bruchey A. K., Munshi Z. and Gonzalez-Lima F. (2004). Methylene blue improves brain oxidative metabolism and memory retention in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **77**, 175-181.

Calne D. B. and Langston J. W. (1983). Aetiology of Parkinson's disease. *Lancet* **2**, 1457-1459.

Capaldi R. A., Halphen D. G., Zhang Y. Z. and Yanamura W. (1988). Complexity and tissue specificity of the mitochondrial respiratory chain. *J. Bioenerg. Biomembr.* **20**, 291-311.

Cardoso S. M., Pereira C. and Oliveira C. R. (1998). The protective effect of vitamin E, idebenone and reduced glutathione on free radical mediated injury in rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 703-710.

Chance B. and Williams G. R. (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. IV. The respiratory chain. *J. Biol. Chem.* **217**, 429-438.

Chen H. and Chan D. C. (2009). Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* **18**, R169-R176.

Chen X. H., Johnson V. E., Uryu K., Trojanowski J. Q. and Smith D. H. (2009a). A lack of amyloid beta plaques despite persistent accumulation of amyloid beta in axons of long-term survivors of traumatic brain injury. *Brain Pathol.* **19**, 214-223.

Chen Y., Azad M. B. and Gibson S. B. (2009b). Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death. Differ.* **16**, 1040-1052.

Chinopoulos C. and Adam-Vizi V. (2006). Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme. *FEBS J.* **273**, 433-450.

Chinopoulos C., Gerencser A. A., Doczi J., Fiskum G. and Adam-Vizi V. (2004). Inhibition of glutamate-induced delayed calcium deregulation by 2-APB and La^{3+} in cultured cortical neurones. *J. Neurochem.* **91**, 471-483.

Chinopoulos C. and Seyfried T. N. (2018). Mitochondrial Substrate-Level Phosphorylation as Energy Source for Glioblastoma: Review and Hypothesis. *ASN. Neuro.* **10**, 1759091418818261.

Chiu P. J., Tetzloff G., Ahn H. S. and Sybertz E. J. (1988). Comparative effects of vinpocetine and 8-Br-cyclic GMP on the contraction and ^{45}Ca -fluxes in the rabbit aorta. *Am. J. Hypertens.* **1**, 262-268.

Choo Y. S., Johnson G. V., MacDonald M., Detloff P. J. and Lesort M. (2004). Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1407-1420.

Clifton J. and Leikin J. B. (2003). Methylene blue. *Am. J. Ther.* **10**, 289-291.

Colombo B. B., Fattori V., Guazelli C. F. S., Zaninelli T. H., Carvalho T. T., Ferraz C. R., Bussmann A. J. C., Ruiz-Miyazawa K. W., Baracat M. M., Casagrande R. and Verri W. A., Jr. (2018). Vinpocetine Ameliorates Acetic Acid-Induced Colitis by Inhibiting NF-kappaB Activation in Mice. *Inflammation* **41**, 1276-1289.

Cox D. A., Conforti L., Sperelakis N. & Matlib M. A. (1993). Selectivity of inhibition of Na^+ - Ca^{2+} exchange of heart mitochondria by benzothiazepine CGP-37157. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **21**, 595–599.

Crompton M., Kunzi M. & Carafoli E. (1977). The calcium-induced and sodium-induced effluxes of calcium from heart mitochondria. Evidence for a sodium-calcium carrier. *Eur. J. Biochem.* **79**, 549–558.

Damiano M., Galvan L., Deglon N. and Brouillet E. (2010). Mitochondria in Huntington's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1802**, 52-61.

De Stefani D., Raffaello A., Teardo E., Szabo I. & Rizzuto R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**, 336–340.

Doerrier C., Garcia-Souza L. F., Krumschnabel G., Wohlfarter Y., Meszaros A. T. and Gnaiger E. (2018). High-Resolution Fluorescence Respirometry and OXPHOS Protocols for Human Cells, Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Muscle, and Isolated Mitochondria. *Methods Mol. Biol.* **1782**, 31-70.

Domotor E., Abbott N. J. and Adam-Vizi V. (1999). Na^+ - Ca^{2+} exchange and its implications for calcium homeostasis in primary cultured rat brain microvascular endothelial cells. *J. Physiol* **515 (Pt 1)**, 147-155.

Draize J. H. (1933). Sodium tetrathionate and methylene blue in cyanide and carbon monoxide poisoning. *Science* **78**, 145.

Duchen M. R. (2000). Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J. Physiol* **529 Pt 1**, 57-68.

Dumont M. and Beal M. F. (2011). Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 1014-1026.

Dunn L., Allen G. F., Mamais A., Ling H., Li A., Duberley K. E., Hargreaves I. P., Pope S., Holton J. L., Lees A., Heales S. J. and Bandopadhyay R. (2014). Dysregulation of glucose metabolism is an early event in sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* **35**, 1111-1115.

Edison P., Ahmed I., Fan Z., Hinz R., Gelosa G., Ray C. K., Walker Z., Turkheimer F. E. and Brooks D. J. (2013). Microglia, amyloid, and glucose metabolism in Parkinson's disease with and without dementia. *Neuropsychopharmacology* **38**, 938-949.

Erdo S. A., Molnar P., Lakics V., Bence J. Z. and Tomoskozi Z. (1996). Vincamine and vincanol are potent blockers of voltage-gated Na⁺ channels. *Eur. J. Pharmacol.* **314**, 69-73.

Feno S., Rizzuto R., Raffaello A. and Vecellio R. D. (2021). The molecular complexity of the Mitochondrial Calcium Uniporter. *Cell Calcium* **93**, 102322.

Fernandez-Vizarra E. and Zeviani M. (2015). Nuclear gene mutations as the cause of mitochondrial complex III deficiency. *Front Genet.* **6**, 134.

Figueira T. R., Melo D. R., Vercesi A. E. and Castilho R. F. (2012). Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells. *Methods Mol. Biol.* **810**, 103-117.

Franco-Iborra S., Vila M. and Perier C. (2016). The Parkinson Disease Mitochondrial Hypothesis: Where Are We at. *Neuroscientist*. **22**, 266-277.

Gabrielli D., Belisle E., Severino D., Kowaltowski A. J. and Baptista M. S. (2004). Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. *Photochem. Photobiol.* **79**, 227-232.

Gao W., Xiong Y., Li Q. and Yang H. (2017). Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases: A Journey from Molecular to Nano Therapeutics. *Front Physiol* **8**, 508.

Garcia-Casas P., Arias-Del-Val J., Alvarez-Illera P., Wojnicz A., de Los R. C., Fonteriz R. I., Montero M. and Alvarez J. (2018). The Neuroprotector Benzothiazepine CGP37157 Extends Lifespan in *C. elegans* Worms. *Front Aging Neurosci.* **10**, 440.

Gear A. R. and Bednarek J. M. (1972). Direct counting and sizing of mitochondria in solution. *J. Cell Biol.* **54**, 325-345.

Gerencser A. A. and Adam-Vizi V. (2001). Selective, high-resolution fluorescence imaging of mitochondrial Ca^{2+} concentration. *Cell Calcium* **30**, 311-321.

Giorgi C., Agnoletto C., Bononi A., Bonora M., De M. E., Marchi S., Missiroli S., Patergnani S., Poletti F., Rimessi A., Suski J. M., Wieckowski M. R. and Pinton P. (2012). Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine. *Mitochondrion*. **12**, 77-85.

Girouard H. and Iadecola C. (2006). Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J. Appl. Physiol (1985.)* **100**, 328-335.

Go A. S., Mozaffarian D., Roger V. L., Benjamin E. J., Berry J. D., Borden W. B., Bravata D. M., Dai S., Ford E. S., Fox C. S., Franco S., Fullerton H. J., Gillespie C., Hailpern S. M., Heit J. A., Howard V. J., Huffman M. D., Kissela B. M., Kittner S. J., Lackland D. T., Lichtman J. H., Lisabeth L. D., Magid D., Marcus G. M., Marelli A., Matchar D. B., McGuire D. K., Mohler E. R., Moy C. S., Mussolino M. E., Nichol G., Paynter N. P., Schreiner P. J., Sorlie P. D., Stein J., Turan T. N., Virani S. S., Wong N. D., Woo D. and Turner M. B. (2013). Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **127**, e6-e245.

Gonzalez-Cabo P. and Palau F. (2013). Mitochondrial pathophysiology in Friedreich's ataxia. *J. Neurochem.* **126 Suppl 1**, 53-64.

Gonzalez-Cabo P., Vazquez-Manrique R. P., Garcia-Gimeno M. A., Sanz P. and Palau F. (2005). Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2091-2098.

Gonzalez-Lima F. and Bruchey A. K. (2004). Extinction memory improvement by the metabolic enhancer methylene blue. *Learn. Mem.* **11**, 633-640.

Gorman E. S. and Shnider M. R. (1988). Effect of methylene blue on the absorbance of solutions of haemoglobin. *Br. J. Anaesth.* **60**, 439-444.

Green D. E. (1936). alpha-Glycerophosphate dehydrogenase. *Biochem. J.* **30**, 629-644.

Gropp T., Brustovetsky N., Klingenberg M., Muller V., Fendler K. and Bamberg E. (1999). Kinetics of electrogenic transport by the ADP/ATP carrier. *Biophys. J.* **77**, 714-726.

Gulyas B., Halldin C., Vas A., Banati R. B., Shchukin E., Finnema S., Tarkainen J., Tihanyi K., Szilagyi G. and Farde L. (2005). [11C]vinpocetine: a prospective peripheral benzodiazepine receptor ligand for primate PET studies. *J. Neurol. Sci.* **229-230**, 219-223.

Gulyas B., Toth M., Vas A., Shchukin E., Kostulas K., Hillert J. and Halldin C. (2012). Visualising neuroinflammation in post-stroke patients: a comparative PET study with the TSPO molecular imaging biomarkers [11C]PK11195 and [11C]vinpocetine. *Curr. Radiopharm.* **5**, 19-28.

Gunter T. E. and Pfeiffer D. R. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol* **258**, C755-C786.

Gureev A. P., Shaforostova E. A., Popov V. N. and Starkov A. A. (2019). Methylene blue does not bypass Complex III antimycin block in mouse brain mitochondria. *FEBS Lett.* **593**, 499-503.

Gurung P., Lukens J. R. and Kanneganti T. D. (2015). Mitochondria: diversity in the regulation of the NLRP3 inflammasome. *Trends Mol. Med.* **21**, 193-201.

Guttman P. and Ehrlich P. (1891). Über die Wirkung des Methylenblau bei Malar. *Berlin Klin Wochenschr* **28**, 953-956.

Hagiwara M., Endo T. and Hidaka H. (1984). Effects of vinpocetine on cyclic nucleotide metabolism in vascular smooth muscle. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 453-457.

Hajos F. (1975). An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.* **93**, 485-489.

Halliwell B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* **59**, 1609-1623.

Heckman P. R., Wouters C. and Prickaerts J. (2015). Phosphodiesterase inhibitors as a target for cognition enhancement in aging and Alzheimer's disease: a translational overview. *Curr. Pharm. Des* **21**, 317-331.

Hoppe U. C. (2010). Mitochondrial calcium channels. *FEBS Lett.* **584**, 1975-1981.

Houten S. M., Violante S., Ventura F. V. and Wanders R. J. (2016). The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid beta-Oxidation and Its Genetic Disorders. *Annu. Rev. Physiol* **78**, 23-44.

Hunte C., Koepke J., Lange C., Rossmann T. and Michel H. (2000). Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure.* **8**, 669-684.

Iadecola C. (2015). Sugar and Alzheimer's disease: a bittersweet truth. *Nat. Neurosci.* **18**, 477-478.

Jeon K. I., Xu X., Aizawa T., Lim J. H., Jono H., Kwon D. S., Abe J., Berk B. C., Li J. D. and Yan C. (2010). Vinpocetine inhibits NF-kappaB-dependent inflammation via an IKK-dependent but PDE-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**, 9795-9800.

Johnson K. A., Fox N. C., Sperling R. A. and Klunk W. E. (2012a). Brain imaging in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006213.

Johnson V. E., Stewart W. and Smith D. H. (2012b). Widespread tau and amyloid-beta pathology many years after a single traumatic brain injury in humans. *Brain Pathol.* **22**, 142-149.

Kalaria R. N. and Harik S. I. (1989). Reduced glucose transporter at the blood-brain barrier and in cerebral cortex in Alzheimer disease. *J. Neurochem.* **53**, 1083-1088.

Kamo N., Muratsugu M., Hongoh R. and Kobatake Y. (1979). Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. Membr. Biol.* **49**, 105-121.

Kaplan J. (1999). Friedreich's ataxia is a mitochondrial disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 10948-10949.

Karran E. and Hardy J. (2014). A critique of the drug discovery and phase 3 clinical programs targeting the amyloid hypothesis for Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* **76**, 185-205.

Karran E., Mercken M. and De S. B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 698-712.

Karthikeyan G., Santos J. H., Graziewicz M. A., Copeland W. C., Isaya G., Van H. B. and Resnick M. A. (2003). Reduction in frataxin causes progressive accumulation of mitochondrial damage. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 3331-3342.

Kluck R. M., Bossy-Wetzel E., Green D. R. and Newmeyer D. D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-1136.

Komary Z., Tretter L. and Adam-Vizi V. (2008). H₂O₂ generation is decreased by calcium in isolated brain mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1777**, 800-807.

Komlodi T. and Tretter L. (2017). Methylene blue stimulates substrate-level phosphorylation catalysed by succinyl-CoA ligase in the citric acid cycle. *Neuropharmacology* **123**, 287-298.

Korczyn A. D. (2008). The amyloid cascade hypothesis. *Alzheimers. Dement.* **4**, 176-178.

Korshunov S. S., Skulachev V. P. and Starkov A. A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* **416**, 15-18.

Kupfer A., Aeschlimann C. and Cerny T. (1996). Methylene blue and the neurotoxic mechanisms of ifosfamide encephalopathy. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **50**, 249-252.

Lambertsen K. L., Finsen B. and Clausen B. H. (2019). Post-stroke inflammation-target or tool for therapy. *Acta Neuropathol.* **137**, 693-714.

Lang A. E. and Obeso J. A. (2004a). Challenges in Parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough. *Lancet Neurol.* **3**, 309-316.

Lang A. E. and Obeso J. A. (2004b). Time to move beyond nigrostriatal dopamine deficiency in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **55**, 761-765.

Langston J. W. and Ballard P. A., Jr. (1983). Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N. Engl. J. Med.* **309**, 310.

Lee D. C., Ruiz C. R., Lebson L., Selenica M. L., Rizer J., Hunt J. B., Jr., Rojiani R., Reid P., Kammath S., Nash K., Dickey C. A., Gordon M. and Morgan D. (2013). Aging enhances classical activation but mitigates alternative activation in the central nervous system. *Neurobiol. Aging* **34**, 1610-1620.

Lieberman I. and Kornberg A. (1953). Enzymic synthesis and breakdown of a pyrimidine, orotic acid. I. Dihydro-orotic dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 223-234.

Lin A. L., Poteet E., Du F., Gourav R. C., Liu R., Wen Y., Bresnen A., Huang S., Fox P. T., Yang S. H. and Duong T. Q. (2012). Methylene blue as a cerebral metabolic and hemodynamic enhancer. *PLoS. One.* **7**, e46585.

Liu Z. and Chopp M. (2016). Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Prog. Neurobiol.* **144**, 103-120.

Lodi R., Cooper J. M., Bradley J. L., Manners D., Styles P., Taylor D. J. and Schapira A. H. (1999). Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with Friedreich ataxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 11492-11495.

Love S. (1999). Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol.* **9**, 119-131.

Ma Y., Wang J., Wang Y. and Yang G. Y. (2017). The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Prog. Neurobiol.* **157**, 247-272.

Macrez R., Ali C., Toutirais O., Le M. B., Defer G., Dirnagl U. and Vivien D. (2011). Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. *Lancet Neurol.* **10**, 471-480.

Madesh M. & Hajnoczky G. (2001). VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J. Cell Biol.* **155**, 1003–1015.

Mamelak M. (2012). Sporadic Alzheimer's disease: the starving brain. *J. Alzheimers. Dis.* **31**, 459-474.

Mancuso M., Orsucci D., Siciliano G. and Murri L. (2008). Mitochondria, mitochondrial DNA and Alzheimer's disease. What comes first. *Curr. Alzheimer Res.* **5**, 457-468.

Manda V. K., Avula B., Dale O. R., Chittiboyina A. G., Khan I. A., Walker L. A. and Khan S. I. (2015). Studies on Pharmacokinetic Drug Interaction Potential of Vinpocetine. *Medicines. (Basel)* **2**, 93-105.

Mansouri A. and Lurie A. A. (1993). Concise review: methemoglobinemia. *Am. J. Hematol.* **42**, 7-12.

Maragakis N. J. and Rothstein J. D. (2006). Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **2**, 679-689.

Maryanovich M. and Gross A. (2013). A ROS rheostat for cell fate regulation. *Trends Cell Biol.* **23**, 129-134.

Mazat J. P., Devin A. and Ransac S. (2020). Modelling mitochondrial ROS production by the respiratory chain. *Cell Mol. Life Sci.* **77**, 455-465.

McCord J. M. and Fridovich I. (1970). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers. *J. Biol. Chem.* **245**, 1374-1377.

Medina A. E. (2011). Therapeutic utility of phosphodiesterase type I inhibitors in neurological conditions. *Front Neurosci.* **5**, 21.

Mikulás K, Komlódi T, Földes A, Sváb G, Horváth G, Nagy ÁM, Ambrus A, Gyulai-Gaál S, Gera I, Hermann P, Varga G, Tretter L. (2000) Bioenergetic Impairment of Triethylene Glycol Dimethacrylate- (TEGDMA-) Treated Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) and Isolated Brain Mitochondria are Amended by Redox Compound Methylene Blue. *Materials (Basel).* **6**;13(16):3472.

Mills E. and O'Neill L. A. (2014). Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol.* **24**, 313-320.

Miwa S., St-Pierre J., Partridge L. and Brand M. D. (2003). Superoxide and hydrogen peroxide production by *Drosophila* mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 938-948.

Miyawaki A., Griesbeck O., Heim R. & Tsien R. Y. (1999). Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 2135–2140.

Mooradian A. D., Chung H. C. and Shah G. N. (1997). GLUT-1 expression in the cerebra of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **18**, 469-474.

Morais V. A. and De S. B. (2010). Mitochondria dysfunction and neurodegenerative disorders: cause or consequence. *J. Alzheimers. Dis.* **20 Suppl 2**, S255-S263.

Moran M., Moreno-Lastres D., Marin-Buera L., Arenas J., Martin M. A. and Ugalde C. (2012). Mitochondrial respiratory chain dysfunction: implications in neurodegeneration. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 595-609.

Mudher A. and Lovestone S. (2002). Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands. *Trends Neurosci.* **25**, 22-26.

Nag S., Krasikova R., Airaksinen A. J., Arakawa R., Petukhovd M. and Gulyas B. (2019). Synthesis and biological evaluation of [(18F)fluorovinpocetine, a potential PET radioligand for TSPO imaging. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **29**, 2270-2274.

Nagai, T., Sawano, A., Park, E. S. & Miyawaki, A. (2001). Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 3197–3202.

Nicholls D. G. and Ferguson SJ (2013). *Bioenergetics*. Academic Press, Elsevier, Oxford.

Nicholls D. G. (2005). Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium* **38**, 311-317.

Nicholls D. G. (2009). Mitochondrial calcium function and dysfunction in the central nervous system. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 1416-1424.

Nicholls D. G., Johnson-Cadwell L., Vesce S., Jekabsons M. and Yadava N. (2007). Bioenergetics of mitochondria in cultured neurons and their role in glutamate excitotoxicity. *J. Neurosci. Res.* **85**, 3206-3212.

Nihashi T., Inao S., Kajita Y., Kawai T., Sugimoto T., Niwa M., Kabeya R., Hata N., Hayashi S. and Yoshida J. (2001). Expression and distribution of beta amyloid precursor protein and beta amyloid peptide in reactive astrocytes after transient middle cerebral artery occlusion. *Acta Neurochir. (Wien.)* **143**, 287-295.

Nivison-Smith L., Khoo P., Acosta M. L. and Kalloniatis M. (2017). Pre-treatment with vinpocetine protects against retinal ischemia. *Exp. Eye Res.* **154**, 126-138.

Nivison-Smith L., O'Brien B. J., Truong M., Guo C. X., Kalloniatis M. and Acosta M. L. (2015). Vinpocetine modulates metabolic activity and function during retinal ischemia. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **308**, C737-C749.

Nordberg A., Rinne J. O., Kadir A. and Langstrom B. (2010). The use of PET in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **6**, 78-87.

Ohlow M. J. and Moosmann B. (2011). Phenothiazine: the seven lives of pharmacology's first lead structure. *Drug Discov. Today* **16**, 119-131.

Olson K. R. and Straub K. D. (2016). The Role of Hydrogen Sulfide in Evolution and the Evolution of Hydrogen Sulfide in Metabolism and Signaling. *Physiology. (Bethesda.)* **31**, 60-72.

Orr A. L., Li S., Wang C. E., Li H., Wang J., Rong J., Xu X., Mastroberardino P. G., Greenamyre J. T. and Li X. J. (2008). N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *J. Neurosci.* **28**, 2783-2792.

Oz M., Lorke D. E., Hasan M. and Petroianu G. A. (2011). Cellular and molecular actions of Methylene Blue in the nervous system. *Med. Res. Rev.* **31**, 93-117.

Panayiotou C., Solaroli N. and Karlsson A. (2014). The many isoforms of human adenylate kinases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **49**, 75-83.

Paroczai M., Kiss B. and Karpati E. (1998). Effect of RGH-2716 on learning and memory deficits of young and aged rats in water-labyrinth. *Brain Res. Bull.* **45**, 475-488.

Patyar S., Prakash A., Modi M. and Medhi B. (2011). Role of vinpocetine in cerebrovascular diseases. *Pharmacol. Rep.* **63**, 618-628.

Pekny M., Wilhelmsson U., Tatlisumak T. and Pekna M. (2019). Astrocyte activation and reactive gliosis-A new target in stroke. *Neurosci. Lett.* **689**, 45-55.

Pelgrims J., De V. F., Van den Brande J., Schrijvers D., Prove A. and Vermorken J. B. (2000). Methylene blue in the treatment and prevention of ifosfamide-induced encephalopathy: report of 12 cases and a review of the literature. *Br. J. Cancer* **82**, 291-294.

Perevoshchikova I. V., Quinlan C. L., Orr A. L., Gerencser A. A. and Brand M. D. (2013). Sites of superoxide and hydrogen peroxide production during fatty acid oxidation in rat skeletal muscle mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **61**, 298-309.

Peter C., Hongwan D., Kupfer A. and Lauterburg B. H. (2000). Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **56**, 247-250.

Picard M. and McEwen B. S. (2014). Mitochondria impact brain function and cognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **111**, 7-8.

Porat R., Gilbert S. and Magilner D. (1996). Methylene blue-induced phototoxicity: an unrecognized complication. *Pediatrics* **97**, 717-721.

Poteet E., Winters A., Yan L. J., Shufelt K., Green K. N., Simpkins J. W., Wen Y. and Yang S. H. (2012). Neuroprotective actions of methylene blue and its derivatives. *PLoS. One.* **7**, e48279.

Pozzan T., Bragadin M. & Azzone G. F. (1977). Disequilibrium between steady-state Ca^{2+} accumulation ratio and membrane potential in mitochondria. Pathway and role of Ca^{2+} efflux. *Biochemistry* **16**, 5618–5625.

Preiser J. C., Lejeune P., Roman A., Carlier E., De B. D., Leeman M., Kahn R. J. and Vincent J. L. (1995). Methylene blue administration in septic shock: a clinical trial. *Crit Care Med.* **23**, 259-264.

Przedborski S., Vila M. and Jackson-Lewis V. (2003). Neurodegeneration: what is it and where are we. *J. Clin. Invest* **111**, 3-10.

Qi J. P., Wu H., Yang Y., Wang D. D., Chen Y. X., Gu Y. H. and Liu T. (2007). Cerebral ischemia and Alzheimer's disease: the expression of amyloid-beta and apolipoprotein E in human hippocampus. *J. Alzheimers. Dis.* **12**, 335-341.

Quinlan C. L., Gerencser A. A., Treberg J. R. and Brand M. D. (2011). The mechanism of superoxide production by the antimycin-inhibited mitochondrial Q-cycle. *J. Biol. Chem.* **286**, 31361-31372.

Quinlan C. L., Perevoshchikova I. V., Hey-Mogensen M., Orr A. L. and Brand M. D. (2013). Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox. Biol.* **1**, 304-312.

Quinlan C. L., Treberg J. R., Perevoshchikova I. V., Orr A. L. and Brand M. D. (2012). Native rates of superoxide production from multiple sites in isolated mitochondria measured using endogenous reporters. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 1807-1817.

Razay G., Vreugdenhil A. and Wilcock G. (2007). The metabolic syndrome and Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **64**, 93-96.

Riha P. D., Bruchey A. K., Echevarria D. J. and Gonzalez-Lima F. (2005). Memory facilitation by methylene blue: dose-dependent effect on behavior and brain oxygen consumption. *Eur. J. Pharmacol.* **511**, 151-158.

Rischke R. and Krieglstein J. (1991). Protective effect of vinpocetine against brain damage caused by ischemia. *Jpn. J. Pharmacol.* **56**, 349-356.

Rojas J. C., Bruchey A. K. and Gonzalez-Lima F. (2012). Neurometabolic mechanisms for memory enhancement and neuroprotection of methylene blue. *Prog. Neurobiol.* **96**, 32-45.

Rojas J. C., John J. M., Lee J. and Gonzalez-Lima F. (2009). Methylene blue provides behavioral and metabolic neuroprotection against optic neuropathy. *Neurotox. Res.* **15**, 260-273.

Rosenthal R. E., Hamud F., Fiskum G., Varghese P. J. and Sharpe S. (1987). Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **7**, 752-758.

Rostovtseva T. K. & Bezrukov S. M. (2008). VDAC regulation: role of cytosolic proteins and mitochondrial lipids. *J. Bioenerg. Biomembr.* **40**, 163–170.

Roy C. G., Winters A., Rich R. M., Ryou M. G., Gryczynski Z., Yuan F., Yang S. H. and Liu R. (2015). Methylene blue protects astrocytes against glucose oxygen deprivation by improving cellular respiration. *PLoS. One.* **10**, e0123096.

Scaduto R. C., Jr. and Grotyohann L. W. (1999). Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys. J.* **76**, 469-477.

Schapira A. H., Cooper J. M., Dexter D., Clark J. B., Jenner P. and Marsden C. D. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **54**, 823-827.

Schirmer R. H., Adler H., Pickhardt M. and Mandelkow E. (2011). "Lest we forget you-methylene blue...". *Neurobiol. Aging* **32**, 2325-16.

Schoenmakers T. J., Visser G. J., Flik G. and Theuvenet A. P. (1992). Chelator: an improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions. *Biotechniques* **12**, 870-879.

Servet C., Ghelis T., Richard L., Zilberstein A. and Savoure A. (2012). Proline dehydrogenase: a key enzyme in controlling cellular homeostasis. *Front Biosci. (Landmark. Ed)* **17**, 607-620.

Shi J., Yang S. H., Stubley L., Day A. L. and Simpkins J. W. (2000). Hypoperfusion induces overexpression of beta-amyloid precursor protein mRNA in a focal ischemic rodent model. *Brain Res.* **853**, 1-4.

Sidorov E., Sanghera D. K. and Vanamala J. K. P. (2019). Biomarker for Ischemic Stroke Using Metabolome: A Clinician Perspective. *J. Stroke* **21**, 31-41.

Sies H, Berndt C, Jones DP. (2017) Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* **20**;86:715-748.

Slemmer J. E., Shacka J. J., Sweeney M. I. and Weber J. T. (2008). Antioxidants and free radical scavengers for the treatment of stroke, traumatic brain injury and aging. *Curr. Med. Chem.* **15**, 404-414.

Stafstrom C. E. and Rho J. M. (2012). The ketogenic diet as a treatment paradigm for diverse neurological disorders. *Front Pharmacol.* **3**, 59.

Starkov A. A., Chinopoulos C. and Fiskum G. (2004). Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. *Cell Calcium* **36**, 257-264.

Starkov A. A., Polster B. M. and Fiskum G. (2002). Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. *J. Neurochem.* **83**, 220-228.

Sun G., Kinter M. T. and Anderson V. E. (2003). Mass spectrometric characterization of mitochondrial electron transport complexes: subunits of the rat heart ubiquinol-cytochrome c reductase. *J. Mass Spectrom.* **38**, 531-539.

Svab G., Kokas M., Sipos I., Ambrus A. and Tretter L. (2021). Methylene Blue Bridges the Inhibition and Produces Unusual Respiratory Changes in Complex III-Inhibited Mitochondria. Studies on Rats, Mice and Guinea Pigs. *Antioxidants. (Basel)* **10**.

Swerdlow R. H., Burns J. M. and Khan S. M. (2014). The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* **1842**, 1219-1231.

Swerdlow R. H. and Khan S. M. (2004). A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Med. Hypotheses* **63**, 8-20.

Szobor A. and Klein M. (1992). Examinations of the relative fluidity in cerebrovascular disease patients. *Ther. Hung.* **40**, 8-11.

Tarnok K., Kiss E., Luiten P. G., Nyakas C., Tihanyi K., Schlett K. and Eisel U. L. (2008). Effects of Vinpocetine on mitochondrial function and neuroprotection in primary cortical neurons. *Neurochem. Int.* **53**, 289-295.

Teruel J. A., Tudela J., Fernandez-Belda F., Garcia-Carmona F., Garcia-Canovas F. and Gomez-Fernandez J. C. (1986). A kinetic study of the irreversible inhibition of an enzyme measured in the presence of coupled enzymes. Fluorescein isothiocyanate as inhibitor of the adenosinetriphosphatase activity from sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* **869**, 8-15.

Tesco G., Koh Y. H., Kang E. L., Cameron A. N., Das S., Sena-Esteves M., Hiltunen M., Yang S. H., Zhong Z., Shen Y., Simpkins J. W. and Tanzi R. E. (2007). Depletion of GGA3 stabilizes BACE and enhances beta-secretase activity. *Neuron* **54**, 721-737.

Torres-Cuevas I., Corral-Debrinski M. and Gressens P. (2019). Brain oxidative damage in murine models of neonatal hypoxia/ischemia and reoxygenation. *Free Radic. Biol. Med.* **142**, 3-15.

Tretter L. and Adam-Vizi V. (1998). The neuroprotective drug vinpocetine prevents veratridine-induced $[Na^+]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$ rise in synaptosomes. *Neuroreport* **9**, 1849-1853.

Tretter L., Horvath G., Holgyesi A., Essek F. and Adam-Vizi V. (2014). Enhanced hydrogen peroxide generation accompanies the beneficial bioenergetic effects of methylene blue in isolated brain mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **77**, 317-330.

Tretter L., Takacs K., Hegedus V. and Adam-Vizi V. (2007). Characteristics of alpha-glycerophosphate-evoked H₂O₂ generation in brain mitochondria. *J. Neurochem.* **100**, 650-663.

Tsuge H., Nakano Y., Onishi H., Futamura Y. and Ohashi K. (1980). A novel purification and some properties of rat liver mitochondrial choline dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **614**, 274-284.

Tuite E. M. and Kelly J. M. (1993). Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. *J. Photochem. Photobiol. B* **21**, 103-124.

Turrens J. F., Alexandre A. and Lehninger A. L. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **237**, 408-414.

Valencia A., Sapp E., Kimm J. S., McClory H., Reeves P. B., Alexander J., Ansong K. A., Masso N., Frosch M. P., Kegel K. B., Li X. and DiFiglia M. (2013). Elevated NADPH oxidase activity contributes to oxidative stress and cell death in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 1112-1131.

van der Giezen M. and Lenton T. M. (2012). The rise of oxygen and complex life. *J. Eukaryot. Microbiol.* **59**, 111-113.

Vardjan N (2018). Mechanism and Drug Targets for Reducing Cell Edema (Neuroprotection) and Cytoplasmic Excitability in Astrocytes in Normal and pathological States. *United States Patent* 15.

Vas A., Shchukin Y., Karrenbauer V. D., Cselenyi Z., Kostulas K., Hillert J., Savic I., Takano A., Halldin C. and Gulyas B. (2008) Functional neuroimaging in multiple sclerosis with radiolabelled glia markers: preliminary comparative PET studies with [11C]vinpocetine and [11C]PK11195 in patients. *J. Neurol. Sci.* **264**, 9-17.

Von Jagow G and Bohrer C (1975). Inhibition of electron transfer from ferrocyanochrome b to ubiquinone, cytochrome c1 and duroquinone by antimycin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **387**, 409-424.

Wainwright M. and Crossley K. B. (2002). Methylene Blue--a therapeutic dye for all seasons. *J. Chemother.* **14**, 431-443.

Wang H., Zhang K., Zhao L., Tang J., Gao L. and Wei Z. (2014). Anti-inflammatory effects of vinpocetine on the functional expression of nuclear factor-kappa B and tumor necrosis factor-alpha in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury. *Neurosci. Lett.* **566**, 247-251.

Wen Y., Li W., Poteet E. C., Xie L., Tan C., Yan L. J., Ju X., Liu R., Qian H., Marvin M. A., Goldberg M. S., She H., Mao Z., Simpkins J. W. and Yang S. H. (2011). Alternative mitochondrial electron transfer as a novel strategy for neuroprotection. *J. Biol. Chem.* **286**, 16504-16515.

Wen Y., Onyewuchi O., Yang S., Liu R. and Simpkins J. W. (2004a) Increased beta-secretase activity and expression in rats following transient cerebral ischemia. *Brain Res.* **1009**, 1-8.

Wen Y., Yang S., Liu R. and Simpkins J. W. (2004b) Transient cerebral ischemia induces site-specific hyperphosphorylation of tau protein. *Brain Res.* **1022**, 30-38.

Wendel W. B. (1939) THE CONTROL OF METHEMOGLOBINEMIA WITH METHYLENE BLUE. *J. Clin. Invest* **18**, 179-185.

West A. P., Shadel G. S. and Ghosh S. (2011) Mitochondria in innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 389-402.

Williamson J. R. and Corkey B. E. (1979) Assay of citric acid cycle intermediates and related compounds--update with tissue metabolite levels and intracellular distribution. *Methods Enzymol.* **55**, 200-222.

Winkler E. A., Nishida Y., Sagare A. P., Rege S. V., Bell R. D., Perlmutter D., Sengillo J. D., Hillman S., Kong P., Nelson A. R., Sullivan J. S., Zhao Z., Meiselman H. J., Wendy R. B., Soto J., Abel E. D., Makshanoff J., Zuniga E., De Vivo D. C. and Zlokovic B. V. (2015) GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. *Nat. Neurosci.* **18**, 521-530.

Wu L. R., Liu L., Xiong X. Y., Zhang Q., Wang F. X., Gong C. X., Zhong Q., Yang Y. R., Meng Z. Y. and Yang Q. W. (2017). Vinpocetine alleviate cerebral ischemia/reperfusion injury by down-regulating TLR4/MyD88/NF-kappaB signaling. *Oncotarget*. **8**, 80315-80324.

Xu L., He D. and Bai Y. (2016). Microglia-Mediated Inflammation and Neurodegenerative Disease. *Mol. Neurobiol.* **53**, 6709-6715.

Yaffe K., Kanaya A., Lindquist K., Simonsick E. M., Harris T., Shorr R. I., Tylavsky F. A. and Newman A. B. (2004). The metabolic syndrome, inflammation, and risk of cognitive decline. *JAMA* **292**, 2237-2242.

Yan J., Greer J. M., Etherington K., Cadigan G. P., Cavanagh H., Henderson R. D., O'Sullivan J. D., Pandian J. D., Read S. J. and McCombe P. A. (2009). Immune activation in the peripheral blood of patients with acute ischemic stroke. *J. Neuroimmunol.* **206**, 112-117.

Yang C., Hawkins K. E., Dore S. and Candelario-Jalil E. (2019). Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **316**, C135-C153.

Yarchoan M. and Arnold S. E. (2014). Repurposing diabetes drugs for brain insulin resistance in Alzheimer disease. *Diabetes* **63**, 2253-2261.

Zacchigna S., Lambrechts D. and Carmeliet P. (2008). Neurovascular signalling defects in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 169-181.

Zhang F., Yan C., Wei C., Yao Y., Ma X., Gong Z., Liu S., Zang D., Chen J., Shi F. D. and Hao J. (2018). Vinpocetine Inhibits NF-kappaB-Dependent Inflammation in Acute Ischemic Stroke Patients. *Transl. Stroke Res.* **9**, 174-184.

Zhang L. and Yang L. (2015). Anti-inflammatory effects of vinpocetine in atherosclerosis and ischemic stroke: a review of the literature. *Molecules.* **20**, 335-347.

Zhang X., Rojas J. C. and Gonzalez-Lima F. (2006). Methylene blue prevents neurodegeneration caused by rotenone in the retina. *Neurotox. Res.* **9**, 47-57.

Zhuang J., Peng W., Li H., Lu Y., Wang K., Fan F., Li S. and Xu Y. (2013). Inhibitory effects of vinpocetine on the progression of atherosclerosis are mediated by Akt/NF-kappaB dependent mechanisms in apoE^{-/-} mice. *PLoS. One.* **8**, e82509.

Zoratti M. and Szabo I. (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 139-176.

10.Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció alapját képező tudományos közlemények:

Sváb G, Doczi J, Gerencsér AA, Ambrus A, Gallyas F, Sümegi B, Tretter L

The Mitochondrial Targets of Neuroprotective Drug Vinpocetine on Primary Neuron Cultures, Brain Capillary Endothelial Cells, Synaptosomes, and Brain Mitochondria. *Neurochemical Research*. 44(10): 2435-2447.

DOI: 10.1007/s11064-019-02871-9

Folyóirat/Szakcikk/Tudományos

IF: 3.038 (2019)

Sváb G, Kokas M, Sipos I, Ambrus A, Tretter L

Methylene Blue Bridges the Inhibition and Produces Unusual Respiratory Changes in Complex III Inhibited Mitochondria. *Studies on Rats, Mice and Guinea Pigs*.

Antioxidants (Basel). 10(2):305.

DOI: 10.3390/antiox10020305.

Folyóirat/Szakcikk/Tudományos

IF: 7.675 (2021)

Egyéb -nem az értekezés témájában megjelent- tudományok közlemények:

Mikulás K, Komlódi T, Földes A, Sváb G, Horváth G, Nagy ÁM, Ambrus A, Gyulai-Gaál S, Gera I, Hermann P, Varga G, Tretter L

Bioenergetic Impairment of Triethylene Glycol Dimethacrylate- (TEGDMA-) Treated Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) and Isolated Brain Mitochondria are Amended by Redox Compound Methylene Blue.

Materials (Basel). 13(16): 3472.

DOI: 10.3390/ma13163472.

Folyóirat/Szakcikk/Tudományos

IF: 3.623 (2020)

Saskői É, Hujber Z, Nyíró G, Likó I, Mátyási B, Petővári G, Mészáros K, Kovács AL, Pathy L, Supekar S, Fan H, Sváb G, Tretter L, Sarkar A, Nazir A, Sebestyén A, Patócs A, Mehta A, Takács-Vellai K

The SDHB Arg230His mutation causing familial paraganglioma alters glycolysis in a new *Caenorhabditis elegans* model.

Disease Models and Mechanisms. 13(10): dmm044925.

DOI: 10.1242/dmm.044925.

Folyóirat/Szakcikk/Tudományos

IF: 5.758 (2020)

Horváth G, Sváb G, Komlódi T, Ravasz D, Kacsó G, Doczi J, Chinopoulos C, Ambrus A, Tretter L

Reduced mitochondrial ROS production in α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDH) subunit (E2 and/or E3) heterozygote knock out animals. Reverse electron flow-induced H₂O₂ formation is also modified in the heterozygote KO animals.

Antioxidants (Basel). 11(8):1487

DOI: 10.3390/antiox11081487

Folyóirat/Szakcikk/Tudományos

IF: 7.675 (2021)

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni a rengeteg segítséget témavezetőmnek, Tretter László professzor úrnak, akinek előadásai már másodéves orvostanhallgató koromban felkeltették az érdeklődésemet a metabolizmus iránt, majd először TDK, később pedig PhD-hallgatóként mindenben támogatott. Olyan gondolkodásmódot képviselt, nem csak szakmailag, hanem emberileg is, ami mindig követendő példa lesz számomra.

Professzor úr mellett szeretnék köszönetet mondani Ádám Veronika professzor asszonynak és Csanády László professzor úrnak az Orvosi Biokémiai Intézet korábbi és jelenlegi igazgatójának is, akik lehetővé tették, hogy az Intézet életében TDK majd később PhD-hallgatóként részt vegyek.

Szeretnék köszönetet mondani kollegáimnak és PhD-hallgató társaimnak, Töröcsik Beátának, Komlódi Tímeának, Ravasz Dórának, Szabó Eszternek, Nemes-Nikodém Évának, Ozohanics Olivérnek, Kokas Mártonnak és Horváth Gergőnek, aki mindig segítőkészek voltak és bármikor lehetett rájuk számítani, emellett olyan légkört teremtettek, amiben öröm volt dolgozni.

Szeretném megköszönni Takács Katalinnak és Várnagy Andreának, akik a mitokondriális kísérletekben, és Dóczi Juditnak, aki a sejtes munkák kivitelezésében nyújtott rengeteg szakmai és technikai segítséget.

Végül, de nem utolsó sorban pedig szeretnék köszönetet mondani szüleimnek, húgomnak és barátaimnak, akik folyamatosan mellettem álltak és minden téren végig támogattak.