

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

Doktori tézisek

**dr. Sváb Gergely**

Semmelweis Egyetem  
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



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 bizottság elnöke:

Elnök: Dr. Mandl József, DSc., egyetemi tanár  
Tagok: Dr. Varga Gábor, DSc., egyetemi tanár  
Dr. Szarka András, Ph.D., egyetemi tanár

Budapest  
2023



# BEVEZETÉS

## Metilénkék

A metilénkék (MK) egy anilin alapú festék, amit 1876-ban állítottak elő. Alapvázát a fenotiazin vázat 1883-ban szintetizálták. A MK kezelést 19. század végétől alkalmazták kezdetben malária, napjainkban methemoglobinémia kezelésében.

A metilénkék elektrontranszportláncra kifejtett hatásával az „alternatív elektrontranszport” elmélet foglalkozik, miszerint a MK átveszi az elektronokat a NADH-ról, és ezt követően pedig áthidalva a komplex I-et (CI) az elektronokat a légzési lánc CIII komplexére és/vagy a citokróm c-re viszi át, ezzel elősegítve az elektronok áramlását, amelynek CI és CIII károsodás kezelése során lehet jelentősége.

Munkacsoportunk korábban vizsgálta a MK mitokondriális bioenergetikai paraméterekre gyakorolt hatását. Egyebek mellett megállapítottuk, hogy a MK a komplex III-at gátló antimycin hatását is képes felfüggeszteni, nemrég azonban az általunk leírtaktól több ponton is eltérő eredményeket publikáltak, mely szerint a MK nem képes áthidalni az antimycinnel gátolt CIII-at, mivel a MK az antimycin gátlási helyétől

proximálisan kötődik a CIII-hoz. A szerzők az eltérő eredményeket a rágsálófajok közötti mitokondriális különbségekkel indokolták (mi a vizsgálatainkhoz tengerimalacokat, ők egereket használtak).

## **Vinpocetin**

A vinpocetin egy szintetikus etil-észter, amit a kis meténg alkaloidjából, az apovincaminből állítottak a elő és 40 éves alkalmazása során jó terápiás effektusok mellett csak enyhe mellékhatásokat tapasztaltak. Széles spektrumban alkalmazott vegyület, használják ischémiás neuronális károsodásnál, neurodegeneratív betegségekben, demenciában, és más kognitív deficienciával járó kórképekben.

A több évtizedes alkalmazás során számos célpontját és működési mechanizmusát azonosították mind a központi idegrendszerben, mind sejtek szintjén. Már a korai vizsgálatok is arra utaltak, hogy a mitokondrium potenciális célpontja lehet a vinpocetinnek. Vinpocetin gátolta az amyloid beta peptid mitokondriális légzési komplexeket blokkoló hatását, és kimutatták a perifériás benzodiazepin receptorokhoz való kötődését is.

# CÉLKITŰZÉSEK

## Metilénkék (MK)

Célunk a MK-vel végzett kísérleteinkben az volt, hogy több oldalról megvizsgáljuk a komplex III gátlásának MK-vel való felfüggeszthetőségét és ennek fajspecifitását. Három rágcsálófaj: egér, patkány és tengerimalac agy mitokondriumain kétféle CIII gátlószerezrel megvizsgáltuk, hogy a CIII gátlása áthidalható-e MK segítségével. Modellrendszeren és a rágcsáló agyi mitokondriumokon azt is vizsgáltuk, hogy a MK képes-e a CIII-tól disztálisan, közvetlenül a citokróm *c*-nek átadni az elektronjait.

Kísérleteink során a gátlószerek és MK egyidejű jelenlétében teljesen szokatlan hatásokat tapasztaltunk, a kontroll vagy a csak gátlószert kapott mitokondriumokhoz képest. Nevezetesen ADP hatására légzéscsökkenés és a NADH koncentráció emelkedése következett be a csökkenő membránpotenciál mellett, míg az adenin nukleotid transzlokáz gátlása fokozott oxigénfogyasztást és a NADH koncentráció csökkenését eredményezett. Vizsgálatinkban a fentebb felsorolt szokatlan eredményekre is kívántunk magyarázatot adni. Ezzel párhuzamosan azt is szeretnénk kideríteni,

hogyan változik a MK lokalizációja és biológiai hatása az oxidáltsági állapotának függvényében.

## **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 rágcsáló agyi mitokondriumokon.

Arra voltunk kíváncsiak, hogy a vinpocetin hogyan befolyásolja az agyi kapilláris endotélsejtek mitokondriumainak  $\text{Ca}^{2+}$  felvételét és leadását. Szerettük volna megvizsgálni, hogy a vinpocetin rendelkezik-e protektív hatással a glutamát toxicitással szemben, illetve hogy befolyásolja-e a szinaptoszómák oxigénfogyasztását és  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelését.

Másik kérdésünk az volt, hogy a vinpocetin hatással van-e a mitokondrium bioenergetikai paramétereire (oxigénfogyasztás, membránpotenciál,  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelés, ATP-szintézis, ATP-áz aktivitás,  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis és duzzadás).

# MÓDSZEREK

## **Mitokondrium izolálás**

Az agy mitokondriumok izolálását három különböző rágcsálófajból (egér, patkány, tengerimalac) differenciál centrifugálással valósítottuk meg Percoll gradiens segítségével. A mitokondriális fehérje koncentrációt módosított biuret reakcióval határoztuk meg.

## **A mitokondriális oxigénfogyasztás meghatározása**

A mitokondrium oxigénfogyasztását nagy felbontású Clark-típusú elektróddal működő respirométerrel vizsgáltuk. A mitokondriumokat piruvát-malát, glutamát-malát vagy szukcinát szubsztráttal, míg a szinaptoszómákat glükózzal energetizáltunk, az eredmények feldolgozása DatLab 4 szoftverrel történt.

## **A mitokondriális membránpotenciál meghatározása**

A mitokondriális membránpotenciálváltozásait szemikvantitatív módon safranin fluoreszcencia, illetve TMRM fluoreszcencia változásával mértük, ez utóbbit ratiometrikus módon, két excitációs és egy emissziós hullámhosszon, a két fluoreszcens intenzitás hányadosát mutatva be.

## **A mitokondriális NAD(P)H redoxállapot meghatározása**

A NAD(P)H autofluoreszcenciát 344 nm excitációs és 460 nm emissziós hullámhosszon vizsgáltuk fluoreszcens spektrofotométerrel. A  $\text{NAD}^+$ -NADH pool egy nagyságrenddel nagyobb, mint a  $\text{NADP}^+$ -NADPH pool, ezért a mérés során tapasztalt fluoreszcencia változásában a NADH-szint változása a meghatározó.

## **A metilénkék oxidoredukciós állapotának meghatározása**

A MK oxidáltsági állapotát 660 nm-en vizsgáltuk, mivel a MK oxidált formája ezen a hullámhosszon eltér a redukált MK spektrumától. Méréseink JASCO V-650 spektrofotométerrel végeztük. 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.

## **A metilénkék elhelyezkedésének vizsgálata**

A MK elhelyezkedésének meghatározását JASCO V-650 spektrofotométerrel végeztük. A méréshez használt mitokondriumokat MK-vel inkubáltunk. Ezt követően egyenlő időközönként (3 perc) szubsztrátot, szétkapcsolószert adtunk, és detektáltuk az abszorbanciát.



A szubsztrátok és a szétkapcsolószer előtt, illetve a szétkapcsolószert követően mintát vettünk, és a mintákat centrifugáltuk, majd megmértük a felülúszók abszorbanciáját. Ezután a felülúszókat oxidáltuk, majd ditionittal redukáltuk a felülúszóban található MK-t. A felülúszó MK tartalmából lehet következtetni a mitokondrium által felvett MK mennyiségére.

### **A mitokondrium $H_2O_2$ termelésének vizsgálata**

A mitokondrium  $H_2O_2$  termelését torma peroxidázzal és Amplex UltraRed festékkal vizsgáltuk. Az Amplex UltraRed a torma peroxidáz hatására  $H_2O_2$  jelenlétében a fluoreszcens resorufinná alakul. A méréshez PTI Deltascan fluoreszcens spektrofotométert használtunk 550 nm excitációs és 585 nm emissziós hullámhosszon.

### **A mitokondriális ATP szintézis kinetikai vizsgálata**

A mitokondriális ATP szintézis kinetikáját kapcsolt enzimreakcióval vizsgáltuk hexokináz és glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz segítségével. A médiumhoz  $NADP^+$ -ot, glükózt, ADP-t, adenilát-kináz adtunk. A keletkező NADPH sztöchiometriailag egyenlő a felhasznált ATP mennyiségével, amely a

mitokondriumból származott. A NADPH abszorbanciáját JASCO V-650 spektrofotométeren vizsgáltuk.

### **Az ATP-áz aktivitás mérése**

A mitokondrium ATP hidrolízisét légzési szubsztrát hiányában kapcsolt enzimreakcióval vizsgáltuk. A mitokondriumokhoz ATP-t, NADH-t, laktát-dehidrogenázt (LDH), piruvát-kinázt (PK), foszfoenol-piruvátot (PEP) és rotenont adtunk. Az ATP hidrolízise során keletkező ADP-t a PK foszforilálja ATP-vé, ezzel párhuzamosan a PEP-et 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 JASCO V-650 spektrofotométeren vizsgáltuk.

# EREDMÉNYEK

## **Fontosabb megállapítások a metilénkék és a mitokondriumok kölcsönhatásával kapcsolatosan**

A mitokondriális működés különböző paramétereit CI szubsztrátok jelenlétében vizsgáltuk. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a MK szignifikáns mértékben képes fokozni az oxigénfogyasztást a CIII gátlószerrel kezelt mitokondriumokon. Ez az eredmény ellentétes egy másik munkacsoport által publikált vizsgálatokkal, akik más rágcsálófajon végezték a méréseiket. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a CIII-gátló mitokondriumok esetében a MK azonos hatást vált ki a három vizsgált rágcsálófaj esetén. A MK mindhárom rágcsálófaj CIII gátló mitokondriumain képes volt részlegesen visszaállítani a mitokondriális membránpotenciált, ezáltal növelni az oxigénfogyasztást, amelynek csökkenése a CIII gátlószer hatására következett be. Ezt követően egy szokatlan bioenergetikai jelenséget figyeltünk meg: ADP hatására a CIII gátló és MK-vel kezelt mitokondriumokban a membrán depolarizációval párhuzamosan csökkent az oxigénfogyasztás és emelkedett a NADH/NAD<sup>+</sup> arány, majd ezt követően CAT hatására polarizálódott a

membrán, amivel párhuzamosan emelkedett az oxigénfogyasztás és csökkent a NADH/NAD<sup>+</sup> arány. A jelenség háttérében a MK membránpotenciál függő működése áll. A polarizált mitokondrium hatékonyabban képes felvenni a pozitív töltésű MK-et, ezáltal a MK könnyebben veheti át a légzési lánc gátlószertől proximálisan elhelyezkedő komponenseitől az elektronokat, így fokozottan érvényesül a MK elektron-szállító hatása, melynek következtében az elektronok a NADH-ról a citokróm *c*-re kerülnek, ezáltal fokozódik az elektrontranszport lánc működése, ami a NADH/NAD<sup>+</sup> arány csökkenését és az oxigénfogyasztás emelkedését vonja maga után.

Egy másik kísérletsorozatban a citokróm *c* redukcióját vizsgálva a mitokondriumokhoz citokróm *c*-t és CI légzési szubsztrátot, majd ezt követően CIII gátlószert, MK-et, ADP-t majd oligomycint adtunk, hasonló következtetést vonhattunk le. MK jelenléte nélkül a citokróm *c* nem volt képes redukálódni. MK hozzáadása fokozta a citokróm *c* redukcióját, mivel a MK képes volt redukálni azt. Ennek feltétele, hogy a MK szabadon tudjon a mitokondrium belső membránján keresztül transzportálódni. Amikor gátlószert és MK is

jelen volt, a redukció sebessége lassabb volt, mint a csak MK-kel kezelt mitokondriumok esetében, mivel a pozitív töltésű oxidált MK nehezebben tud bekerülni a (gátlószer által) depolarizált mitokondriumba, ezért a mitokondrium kevesebb MK-et vesz fel, ami egy lassabb elektrontranszportot eredményez. A pozitív töltésű MK a redukció során elveszíti a töltését, elhagyja a mitokondriumot és redukálja a citokróom *c*-t. Ezt követően a MK újra oxidált formába kerül, így egy új redox ciklusban vehet részt.

### **Fontosabb megállapítások a vinpocetin mitokondriális, neuroprotekciónal kapcsolatos hatásairól**

A vinpocetin bioenergetikai aspektusait vizsgáltuk primer agyi kapilláris endotélium, neuronokon, szinaptoszómákon és izolált mitokondriumokon.

Eredményeink alapján vinpocetin hatására az ATP-által kiváltott mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens csúcsa nem változik (agyai kapilláris endotel sejteken mérve), azonban a felezési idő megnő, tehát a  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulás lelassul vinpocetin jelenlétében. Ez a jelenség feltehetően a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  kicseréléséért felelős transzporter gátlásának

tulajdonítható, amely transzporter a mitokondrium  $\text{Ca}^{2+}$  leadásában a legfontosabb szerepet tölti be. A késleltetett  $\text{Ca}^{2+}$  dereguláció a glutamát toxicitás modellje, mely során az ionotrop glutamát receptorok stimulációja következtében jelentős  $\text{Ca}^{2+}$  terhelés éri a sejtet és ennek eredményeként a mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórus megnyílása következtében tönkremegy a sejtek  $\text{Ca}^{2+}$  és energia homeosztázisa. Az általunk alkalmazott modellben a vinpocetin nem befolyásolta a késleltetett  $\text{Ca}^{2+}$  deregulációt agykérgi neuronokon.

A vinpocetin gátolta a szinaptoszómák oxigénfogyasztását és a  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelését glükóz jelenlétében. A vinpocetin  $\text{H}_2\text{O}_2$  képződést csökkentő hatását izolált mitokondriumokban, többféle légzési szubsztráttal energetizált állapotban is kimutattuk. A vinpocetin a ROS képződést a mitokondrium különböző légzési állapotaiban is (state 3, state 4 respiráció) gátolta.

Vinpocetin hatására a mitokondriumok belső membránja enyhén depolarizálódott, ez ADP hiányában együtt járt az oxidáció fokozódásával mind glutamát-malát, mind szukcinát alkalmazásakor. ADP jelenlétében a vinpocetin gátolta a mitokondriumok oxigénfogyasztását.

Vinpocetin hatására csökkent a mitokondriális ATP szintézis GM szubsztrát alkalmazásakor, ezzel szemben szubsztrát hiányában a mitokondriumhoz külsőleg hozzáadott ATP hidrolízisének fokozódását tapasztaltuk. A vinpocetin azonban csökkentette a mitokondriumok kalcium indukálta duzzadását, és a kalcium indukálta kalcium felszabadulást, azaz a permeabilitás tranzíciós pórus megnyílását.

# KÖVETKEZTETÉSEK

## Metilénkék

Munkánk során a MK CIII gátolt mitokondriumok bioenergetikájára gyakorolt hatását vizsgáltuk. Bebizonyítottuk, hogy a MK képes áthidalni a CIII gátlást, fokozni a mitokondriális oxidációt, polarizálni a gátlószerek által depolarizált belső membránt. Igazoltuk, hogy a MK képes a NADH-t oxidálni, és az elektronokat a citokróm *c*-re átvive képes részlegesen helyreállítani a mitokondriális elektrontranszportot, aminek egyes, CIII deficienciával járó neurodegeneratív kórképek kezelésében is szerepe lehet.

Lehetséges magyarázatot adtunk a CIII gátlószer és MK együttes jelenléte esetén bekövetkező szokatlan bioenergetikai jelenségekre, amelyek a mitokondriális oxigénfogyasztást, membránpotenciált és a NADH/NAD<sup>+</sup> egyensúlyt érintik. A jelenségek hátterében a MK oxidoredukciójakor észlelhető töltésváltozása, ennek következtében pedig mitokondriális lokalizációjában, így a mitokondriális kölcsönhatásokban beálló változások állhatnak.



A ritka mitokondriális betegségek terápiájában egy olyan, jól tolerálható gyógyszer, mint a MK hatásos lehet a bioenergetikai funkciók javításában.

## **Vinpocetin**

Munkám másik nagy témája a vinpocetin vizsgálata volt, ahol a vinca alkaloid különböző bioenergetikai paraméterekre gyakorolt hatását vizsgáltuk négyféle modellrendszeren.

A vinpocetin az általunk vizsgált rendszerekben negatív bioenergetikai hatásokat is mutatott, mint például a csökkent mitokondriális légzés és ATP szintézis. Az enyhe szétkapcsoló hatás vinpocetin jelenlétében csökkentheti a reperfüziós károsodás során a hiperpolarizáció által kiváltott reverz elektron transzportot és a hozzá kapcsolódó nagyfokú ROS képzést. A  $\text{Ca}^{2+}$  indukálta mitokondriális duzzadás csökkentése, a késleltetett mitokondriális kalcium-indukált  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulás, azaz a permeabilitás tranzíciós pórus nyitásának gátlása és a mitokondriális  $\text{H}_2\text{O}_2$  képzése jelentős csökkentése egyértelműen pozitív hatások.

Összességében elmondható, hogy a fentebb említett pozitív bioenergetikai hatások fontos szerepet játszhatnak abban, hogy a vinpocetinnek jótékony hatása van a neuronális károsodással járó patológiás kórképekben.

## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

*Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények*

Svab G, Doczi J, Gerencser AA, Ambrus A, Gallyas F, Sümegi B, Tretter L. (2019) 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.

IF.: 3.038

Sváb G, Kokas M, Sipos I, Ambrus A, 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*. **10**(2):305.

IF.: 7.675

*Az értekezés témájához nem kapcsolódó 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. (2020) 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.

IF.: 3.623

Saskóí É, Hujber Z, Nyíró G, Likó I, Mátyási B, Petővári G, Mészáros K, Kovács AL, Patthy L, Supekar S, Fan H, Sváb G, Tretter L, Sarkar A, Nazir A, Sebestyén A, Patócs A, Mehta A, Takács-Vellai K. (2020) The SDHB Arg230His mutation causing familial paraganglioma alters glycolysis in a new *Caenorhabditis elegans* model. *Disease Models and Mechanisms*. **13**(10): dmm044925.

IF.: 5.758

Horváth G, Sváb G, Komlódi T, Ravasz D, Kacsó G, Doczi J, Chinopoulos C, Ambrus A, Tretter L. (2022) Reduced mitochondrial ROS production in  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase ( $\alpha$ -KGDH) subunit (E2 and/or E3) heterozygote knock out animals. Reverse electron flow-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation is also modified in the heterozygote KO animals. *Antioxidants (Basel)*. **11**(8):1487

IF.: 7.675