

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО

Обзор

© 2022 А.П. Гуреев^{1,2*}, И.С. Садовникова¹, В.Н. Попов^{1,2}

¹ Воронежский государственный университет,
394018 Воронеж, Россия; электронная почта: gureev@bio.vsu.ru

² Воронежский государственный университет инженерных технологий, 394036 Воронеж, Россия

Поступила в редакцию 03.05.2022

После доработки 07.07.2022

Принята к публикации 15.07.2022

Метиленовый синий (МС) является первым полностью синтетическим веществом, которое нашло своё применение в медицине более 120 лет назад для лечения малярии. Сейчас МС одобрен для лечения метгемоглобинемии, но есть предпосылки для его репозиционирования в сторону нейропротекции. Перспективность данного соединения подтверждается тем, что на различных моделях была показана эффективность при терапии болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, моделях черепно-мозговых травм, бокового амиотического склероза, депрессивных расстройствах и т.д. Но задача данного обзора – не столько сконцентрироваться на описании терапевтических эффектов МС при лечении всевозможных нейродегенераций, сколько углубиться в механизмы действия сигнальных путей, на которые данный препарат оказывает прямое или косвенное влияние. МС может функционировать как альтернативный переносчик электронов в дыхательной цепи митохондрий при нарушении работы цепи переноса электронов. Он может оказывать противовоспалительный и антиапоптотический эффекты, ингибировать моноаминоксидазы и NO-синтазы, активировать сигнальные пути, которые обеспечивают обновление митохондриального пула – митохондриальный биогенез и аутофагию, препятствовать агрегации белков с неправильной укладкой. Понимание и комплексное изучение всех аспектов прямого и косвенного действия МС, а не только какого-либо одного эффекта может помочь в его дальнейшем исследовании, в том числе и на клиническом уровне.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: метиленовый синий, нейродегенерация, болезнь Альцгеймера, тау-белок, альтернативный транспорт электронов, Nrf2/ARE сигнальный путь, апоптоз, аутофагия, воспаление, моноаминоксидаза, NO-синтаза.

DOI: 10.31857/S0320972522090019, **EDN:** AZNPIL

ВВЕДЕНИЕ

Метиленовый синий (МС; 3,7-бисдиметил-аминофенотиазин хлорид) представляет собой темно-зелёные кристаллы или кристаллический порошок с бронзовым блеском, в воде образует темно-синий раствор, который обычно используется в качестве красителя. Он хоро-

шо растворим в воде и хлороформе, умеренно растворим в спирте. Максимумы поглощения МС составляют 609 и 668 нм, молекулярная масса — 319,852 г/моль [1]. МС не является природным веществом и впервые был синтезирован в 1876 г. химиком Генрихом Каро. Год спустя МС стал первым красителем, запатентованным в Германии [2]. В настоящее время

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; БАС – боковой амиотрофический склероз; МАО – моноаминоксидаза; МС – метиленовый синий; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; АМПК – АМФ-активируемая протеинкиназа; ARE – антиоксидант-респонсивный элемент; cGMP – циклический гуанозинмонофосфат; CRH – кортикотропин-релизинг-гормон; GSK3 β – киназа гликогенсинтазы 3 β ; НТТ – хантингтин; Keap1 – kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1; mTORC1 – мишень рапамицина млекопитающих, комплекс 1; NF- κ B – ядерный фактор каппа-B; NOS – NO-синтаза; Nrf2 – ядерный фактор, связанный с эритроидным фактором 2; PGC-1 α – гамма-коактиватор 1-альфа-рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; PMCA – Ca²⁺-АТРаза плазматической мембраны; sGC – растворимая гуанилатциклаза; SOD1 – супероксиддисмутаза 1; STAT – преобразователь сигнала и активатор транскрипции; TNF- α – фактор некроза опухолей альфа.

* Адресат для корреспонденции.

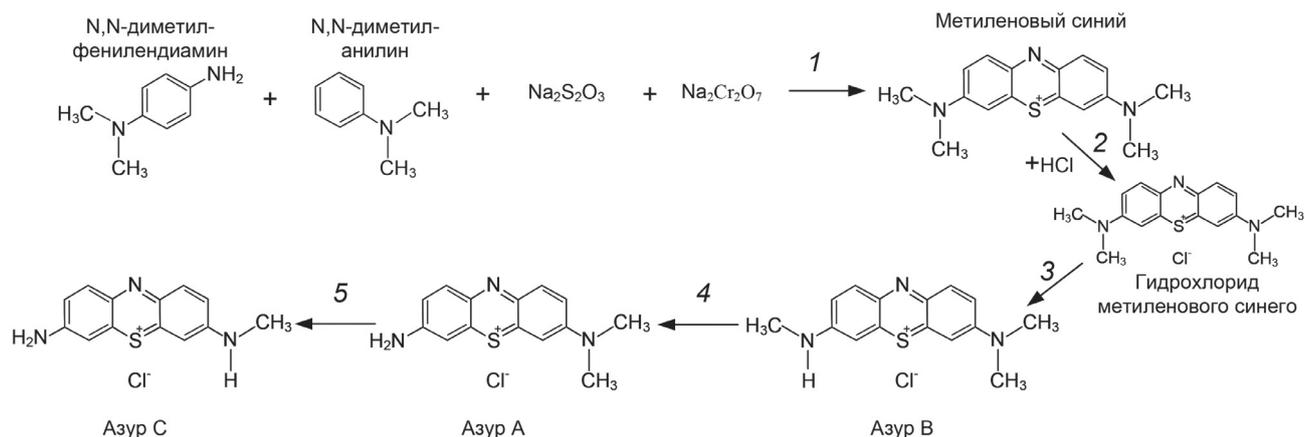


Рис. 1. Синтез и метаболизм МС. 1 – синтез МС. 2 – гидрохлорирование МС. 3–5 – деметилирование МС и последовательное формирование азуров А, В и С

МС синтезируют окислением N,N-диметилфенилендиамина дихроматом натрия ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) в присутствии тиосульфата натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) и дальнейшим окислением в присутствии N,N-диметиланилина [3] (рис. 1, реакция 1). Гидрохлорид МС получают за счёт добавления к раствору красителя 30%-ной соляной кислоты и насыщенного раствора хлорида натрия; после фильтрации продукт промывают 2%-ным раствором хлорида натрия (рис. 1, реакция 2). Резонансные структуры МС обычно изображают с формальным зарядом, расположенным на атоме серы (рис. 1) или на одном из атомов азота (не показано) [4]. Кроме того, МС может быть представлен в виде трёх наиболее распространённых N-деметилованных аналогов: азур А, азур В и азур С [5] (рис. 1, реакции 3–5).

Раствор МС имеет синий цвет в окислительной среде, но превращается в лейко-МС (бесцветную форму) при воздействии восстановителя [3]. Есть много применений МС в аналитической химии или в быту, но в большей степени этот краситель прославился как первый полностью синтетический препарат, применяемый в медицине [6].

Наиболее ранние упоминания о влиянии МС на психологическое состояние человека относятся к концу XIX века. Тогда были получены данные об обезболивающих эффектах МС [7] и его седативном эффекте при различных формах психозов [8]. МС, а точнее его фенотиазиновое ядро, стал основой для синтеза ряда нейролептических препаратов в 1950-х гг., в том числе хлорпромазина и флуфеназина, которые являются незаменимыми препаратами для лечения психотических расстройств. Некоторые исследователи считают, что появление фенотиазинов является началом такого раздела в пси-

хиатрии, как биологическая психиатрия [9]. В это же время МС продолжал использоваться в медицине, но только в качестве красителя для других нейролептиков, что помогало контролировать приём лекарств у пациентов психиатрических клиник за счёт окрашивания мочи в синий цвет [6]. Единичные исследования проводились во второй половине 1930-х гг. Было показано, что МС приносит пользу пациентам, страдающим кататонической деменцией [10] и снижает смертность при эпилептических приступах [11].

Интерес к МС как к нейролептику возродился в 70–80-х гг. XX века, когда появились данные, что повышенный уровень ванадия может иметь этиологическое значение при маниакально-депрессивном расстройстве [12]. Было показано, что МС катализирует восстановление ванадата до ванадила, что значительно подавляло депрессивное поведение [13]. Ещё раньше появились первые данные, демонстрирующие, что МС оказывает влияние на процессы запоминания и сохранения памяти у крыс [14]. В середине 90-х гг. было показано, что МС ингибирует агрегацию тау-белков, а, следовательно, может иметь клиническое применение для лечения болезни Альцгеймера [15].

Позже на основе МС было разработано несколько поколений препаратов, с которыми были проведены клинические исследования, но полученные результаты оказались весьма противоречивыми. Во II-й фазе клинических испытаний был показан положительный эффект препарата на основе МС у пациентов с лёгкой и средней степенью тяжести болезни Альцгеймера (NCT005153330) [16]. Но на этапе фазы III клинических исследований у экспериментальной группы, получавшей таблетки, содержащие 75 и 125 мг МС, не было выявля-

но улучшений по сравнению с группой плацебо (NCT01689246) [17]. Примечательно, что группа плацебо получала тот же препарат, но в концентрации 4 мг, чтобы цвет мочи у группы плацебо не отличался от цвета мочи пациентов из экспериментальной группы. Позже было показано, что даже в концентрации 4 мг/день МС оказывает тот же эффект, что и в высоких концентрациях. Поэтому некоторые исследователи причиной неудачи фазы III клинических испытаний называют некорректный дизайн исследования [18]. В связи с этим в 2018 г. было запущено ещё одно клиническое испытание, где препарат будет использоваться в концентрации 16 и 8 мг/день, а в качестве плацебо будут использованы другие препараты для придания моче характерного цвета. Полное окончание клинических испытаний ожидается в июне 2023 г. (NCT03446001).

В последнее десятилетие проведено много исследований терапевтического эффекта МС при болезни Хантингтона [19, 20], болезни Паркинсона [21, 22], черепно-мозговых травмах [23–25], ишемических повреждениях головного мозга [26, 27], травмах спинного мозга [28], боковом амиотрофическом склерозе [29] и т.д. Высока вероятность, что в скором времени начнутся клинические испытания МС для лечения других нейродегенеративных и психических заболеваний. Цель данного обзора – не столько суммировать данные о нейропротекторных эффектах МС, сколько проанализировать основные метаболические и сигнальные пути, на которые оказывает влияние МС. Особое внимание уделяется способности МС осуществлять альтернативный транспорт электронов в митохондриях, активировать аутофагию и сигнальный путь Nrf2/ARE, ингибировать моноаминоксидазы (MAO) и NO-синтазы (NOS), препятствовать апоптозу, воспалительным процессам и агрегации неправильно свёрнутых белков.

МЕТИЛЕНОВЫЙ СИНИЙ КАК АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ПЕРЕНОСЧИК ЭЛЕКТРОНОВ

Этиология большинства нейродегенеративных заболеваний зачастую комплексная. Наиболее распространёнными факторами, которые способствуют нейродегенерации, являются митохондриальные дефекты и окислительный стресс. Митохондриальные дефекты приводят к увеличению скорости образования активных форм кислорода (АФК), а окислительный стресс, в свою очередь, являет-

ся основной причиной митохондриальных дефектов [30]. Митохондрии имеют несколько сайтов, которые ответственны за продукцию АФК, и большинство из них расположены на внутренней митохондриальной мембране. Комплекс I является основным местом продукции митохондриальных АФК. Кроме того, ингибирование комплекса I приводит к дефициту АТФ и гипертрофии многих NAD^+ -зависимых ферментов [31]. Митохондрии растений в процессе эволюции приобрели альтернативные пути дыхания, которые включают ротенон-нечувствительные $NAD(P)H$ -дегидрогеназы и альтернативную оксидазу. Они позволяют за счёт рассеивания мембранного потенциала снизить продукцию АФК и предотвратить перевосстановление компонентов катаболических путей [32]. У митохондрий животных тоже есть механизм рассеивания мембранного потенциала – мягкое разобщение, которое осуществляется белками-разобщителями (uncoupling proteins – UCPs), вызывающими утечку протонов, снижение мембранного потенциала и сокращение уровня продукции АФК [33]. Имеется целый ряд фармацевтических разобщителей, среди которых наибольший интерес представляет 2,4-динитрофенол (2,4-ДНФ), действующий как протонофор. Вначале 2,4-ДНФ широко использовался в качестве метаболического препарата для снижения веса. В дальнейшем была показана его значительная острая токсичность, и 2,4-ДНФ был запрещён для использования в некоторых странах [34]. Но не только протонофоры могут вызывать рассеивание мембранного потенциала. Альтернативный транспорт электронов с помощью МС является ещё одним способом модуляции митохондриального метаболизма, который, помимо снижения мембранного потенциала, позволяет обходить нарушенные или заингибированные дыхательные комплексы [35]. МС одобрен управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA), поэтому повторение истории с неожиданным обнаружением токсичности 2,4-ДНФ крайне маловероятно.

Первые сведения о том, что МС может увеличивать скорость дыхания, были получены в конце 1920-х – начале 1930-х гг. Исследования проводились на безъядерных эритроцитах птиц и млекопитающих [36], неоплодотворённых яйцах морских звёзд [37], в которых изучались окислительно-восстановительные свойства МС. В 1938 г. Elliott и Greig [38] обнаружили, что сукцинат может окисляться до фумарата в присутствии МС, который «принимает атомы водорода и восстанавливается до

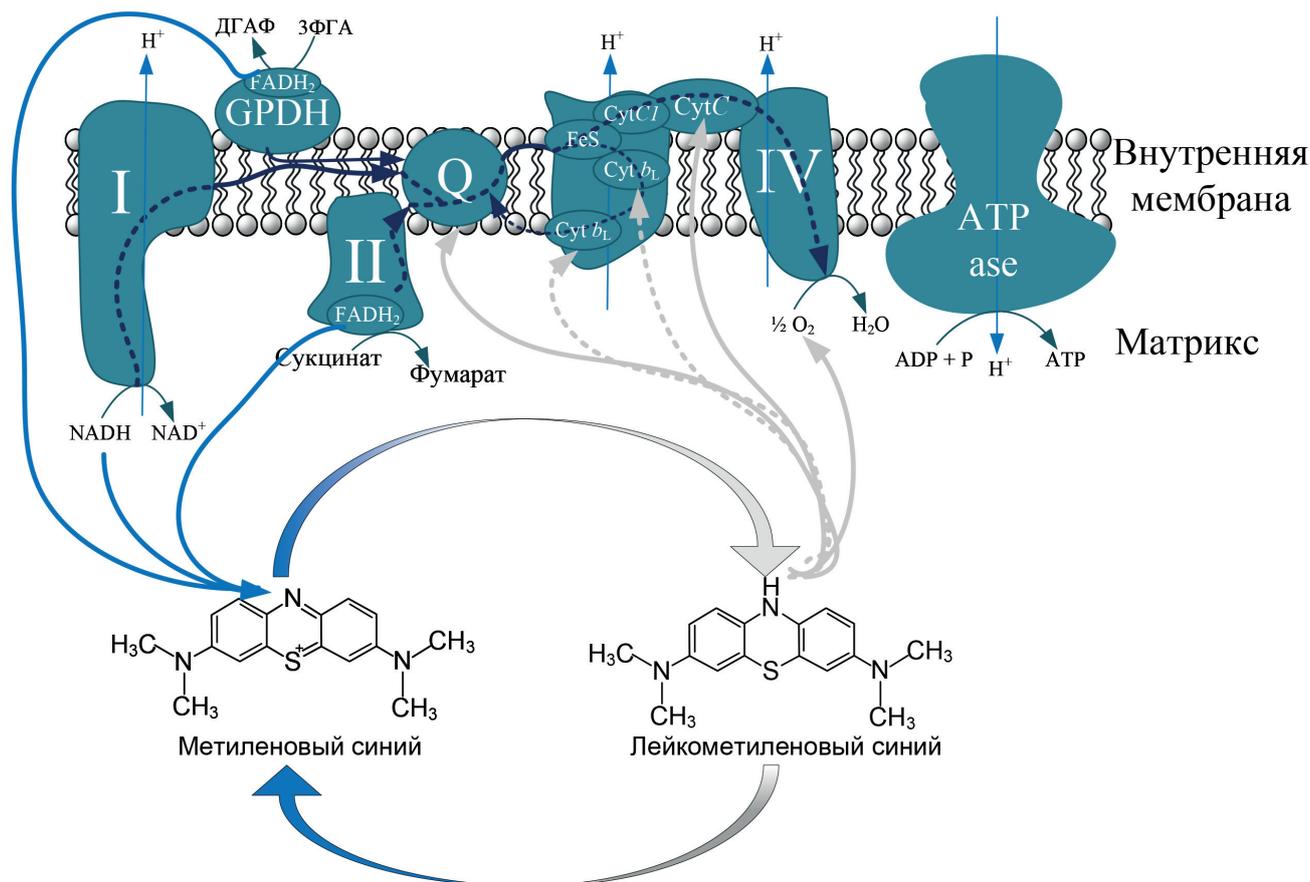


Рис. 2. Функционирование МС в качестве альтернативного переносчика электронов. МС может принимать электроны от NADH и FADH₂, которые в норме окисляются в I- и II-комплексах ЭТЦ, а также α-глицерофосфатдегидрогеназы (GPDH), которая катализирует реакцию превращения глицеральдегид-3-фосфата (3-ФГА) в дигидроксиацетонфосфат (ДГАФ). При этом сам МС восстанавливается до бесцветной лейкоформы. Лейко-МС может отдавать электроны на убихинон, комплекс III, цитохром с (Cyt c), а также на молекулярный кислород

лейко-МС». Тогда как в обычных условиях, без МС, акцептором протонов являлся окисленный цитохром. В 1949 г. Slater [39] изучал сукцинатдегидрогеназный комплекс в сердечной мышце и в почках и показал, что цитохром *b* участвует в катализе восстановления МС сукцинатом (рис. 2). Далее было обнаружено, что убихинон и его гомологи могут опосредовать реакцию между электрон-транспортной цепью (ЭТЦ) и МС [40], а также тот факт, что МС может окислять NADPH [41].

Исследования МС на изолированных митохондриях начались ближе к началу XXI века. Было показано, что МС может стимулировать митохондриальное дыхание, которое было ингибировано хлорацетальдегидом, модулирующим митохондриальный окислительный метаболизм длинноцепочечных жирных кислот в печени. В то же время МС стимулировал преимущественно дыхание в состоянии 4 по Чансу (нефосфорилирующее дыхание), а не в состоянии 3 по Чансу (фосфорилирующее дыхание), что позволяет характеризовать МС как разоб-

щитель фосфорилированного дыхания [42, 43]. Последующие работы показали, что МС увеличивает активность цитохром *c*-оксидазы [44]. Это подтвердило предположение о том, что МС функционирует как альтернативный переносчик электронов (рис. 2). Донором электронов для МС является NADH, а цитохром *c* — акцептором [35]. Позже было показано, что МС увеличивает скорость дыхания, если в качестве субстрата для дыхания используется сукцинат и α-глицерофосфат. Таким образом, сукцинатдегидрогеназа и α-глицерофосфатдегидрогеназа (GPDH) также способны участвовать в передаче электронов на МС [45] (рис. 2). При этом МС может переносить электроны не только на цитохром *c*, но и непосредственно на O₂, что проявлялось в МС-зависимом увеличении скорости продукции H₂O₂, которое было неоднократно продемонстрировано [43, 45–47] (рис. 2). Таким образом, механически МС является прооксидантом, который может увеличивать скорость продукции H₂O₂, что было показано как при добавлении МС

к изолированным митохондриям [45, 48], так и при терапии МС *in vivo* [46]. Но при этом в концентрациях до 100 мкМ не было показано генотоксичного эффекта МС в отношении митохондриального генома [48]. В 2015 г. в работе Atamna et al. [49] окислительный стресс, индуцированный МС, характеризуется термином «мягкий окислительный стресс», который не оказывает деструктивного эффекта на клеточные компоненты, но может запускать некоторые сигнальные механизмы (в том числе и опосредующие антиоксидантный эффект МС), которые обсуждаются в последующих разделах.

Альтернативный транспорт электронов позволяет обходить ингибированный комплекс I. Было показано, что МС шунтирует блок, который создавался ротеноном [45, 47, 50, 51] и диметакрилат триэтиленгликолем (Triethylene glycol dimethacrylate – TEGDMA) [52]. Однако открытым остаётся вопрос о возможности обхода комплекса III. Tretter et al. [45] и Sváb et al. [53] показали, что МС увеличивал скорость дыхания и восстанавливал мембранный потенциал при ингибировании антимицином и миксотиазолом, что согласуется с данными, свидетельствующими о повышении активности цитохром *c*-оксидазы. В 2019 г. Gureev et al. [47], напротив, показали, что МС не восстанавливает дыхание и мембранный потенциал, ингибированные антимицином, но при этом восстанавливает дыхание и мембранный потенциал, ингибируемые ротеноном. Это более согласуется с результатами Slater [39], показавшего участие цитохрома *b* в катализе восстановления МС сукцинатом (рис. 2). Причина различий нуждается в дальнейшем разъяснении. Однако эти расхождения в механизме функционирования не носят принципиальный характер, так как нарушения в комплексе I, а не в комплексе III чаще всего приводят к развитию митохондриально-зависимых патологий [54].

МЕТИЛЕНОВЫЙ СИНИЙ КАК ИНГИБИТОР АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ

Неправильный фолдинг, агрегация и аккумуляция белков в головном мозге зачастую являются причиной запуска патологических процессов, которые приводят к гибели нейронов и развитию нейродегенеративных заболеваний. Накопление белков с неправильной структурой, таких как амилоид- β и фосфорилированный тау-белок, связано с развитием болезни Альцгеймера. Неправильно свёрнутые и агрегированные белки вызывают митохондриальную дисфункцию, которая приводит к

повышению уровня АФК и окислительному стрессу, вызывают нейровоспаление за счёт активации микроглии, что приводит к повреждению синапсов и гибели нейронов [55].

В 1996 г. Wischik et al. [15] впервые показали, что МС в наномолярных концентрациях ингибирует агрегацию тау-белка и нарушает стабильность протеазорезистентных парных спиральных филаментов (paired helical filaments – PHF) (рис. 3). Ингибирование образования тау-филаментов с помощью МС было впоследствии подтверждено Taniguchi et al. [56] – в 2005 г., и Hattori et al. [57] – в 2008 г. Диета с добавлением МС приводила к значительному снижению уровня фосфорилированного тау-белка у мышей линии P301S [58] и линии Тау Δ K [59]. МС ингибировал олигомеризацию мономеров амилоида- β [60]. Также фотовозбуждённые молекулы МС блокировали агрегацию амилоида- β за счёт его окисления синглетным кислородом, образующимся в ходе фотохимической реакции [61]. МС активировал Ca^{2+} -АТФазу плазматической мембраны (plasma membrane Ca^{2+} ATPase – PMCA), играющую важную роль в поддержании гомеостаза цитозольного кальция в концентрации, которая необходима для нормального функционирования нейронов. МС препятствует инактивации PMCA, вызванной накоплением амилоида- β и тау [62, 63].

Неправильный фолдинг белков играет ключевую роль в патогенезе болезни Хантингтона (рис. 3). Мутантная форма белка хантинтина (НТТ) склонна к расщеплению, неправильному фолдингу и агрегации. Накопление агрегатов в конечном итоге приводит к дисфункции нейронов [64]. МС ингибировал агрегацию нерастворимого мутантного белка НТТ *in vitro* и снижал нейротоксичность [19]. Дальнейшие исследования показали, что МС защищает сердце *Drosophila melanogaster* от НТТ-индуцированной токсичности, но не оказывает эффекта в нейронах из-за плохого прохождения через гематоэнцефалический барьер *D. melanogaster* [20].

Имеются данные, показывающие, что МС является потенциально эффективным препаратом для лечения прионных болезней – семейство редких, но фатальных патологий, поражающих людей и различные виды животных. Было продемонстрировано, что МС влияет на кинетику олигомеризации неправильно свёрнутого прионного белка (PrP) и уменьшает количество олигомера примерно на 30% [65] (рис. 3).

Ряд исследований выявили связь между патогенезом бокового амиотрофического скле-

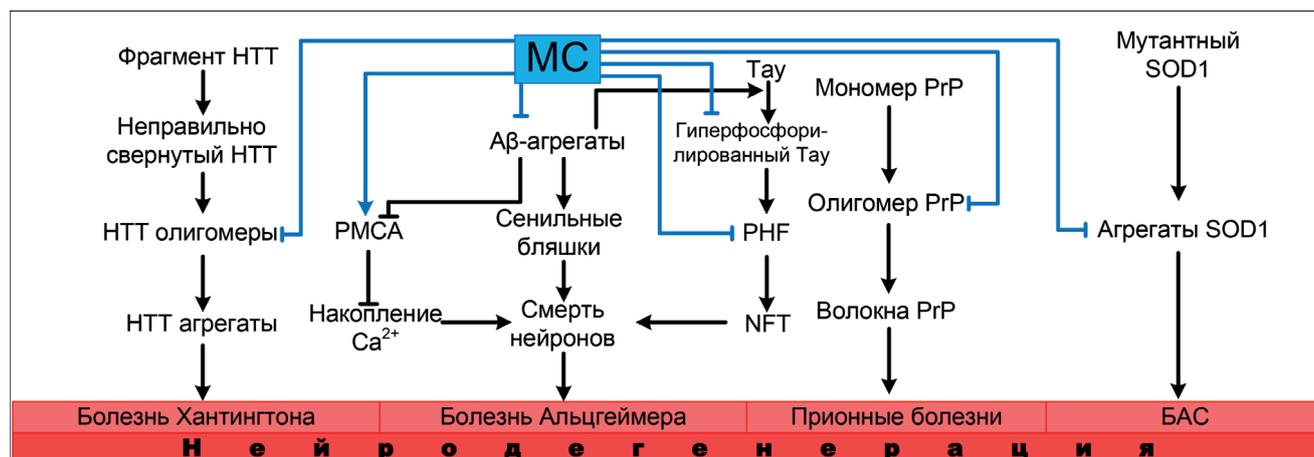


Рис. 3. МС ингибирует олигомеризацию и последующее агрегирование расщеплённого мутантного белка НТТ, что может замедлять патогенез болезни Хантингтона. МС препятствует накоплению амилоида-β (Аβ), гиперфосфорилированию тау-белка и, следовательно, образованию нейрофибриллярных клубков (NFT), способствует активации РМСА, что в сумме позволяет замедлить патогенез болезни Альцгеймера. МС препятствует олигомеризации неправильно свернутого прионного белка (PrP) и неправильно свернутого SOD1, что замедляет течение прионных заболеваний и БАС

роза (БАС), неправильным фолдингом и агрегацией супероксиддисмутазы 1 (SOD1) [66]. Было показано, что МС модулирует спонтанную амилоидную агрегацию SOD1 в клеточных линиях [67, 68] и животных моделях *Danio rerio* и *Caenorhabditis elegans* [69, 70] (рис. 3).

МЕТИЛЕНОВЫЙ СИНИЙ КАК АКТИВАТОР СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NRF2/ARE

Сигнальный путь Nrf2/ARE (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element) регулирует экспрессию генов, кодирующих белки с цитопротекторными свойствами, например, антиоксидантные ферменты, белки фазы II детоксикации ксенобиотиков, противовоспалительные белки, а также метаболические ферменты и регуляторы, участвующие в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза [71] (рис. 4). Ядерный фактор, связанный с эритроидным фактором 2 (Nrf2), представляет собой короткоживущий белок (время жизни около 15 мин), который при отсутствии активирующих факторов подвергается убиквитинированию и протеосомной деградации. На сегодняшний день хорошо описаны две системы убиквитинлигаз, которые опосредуют деградацию Nrf2: Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1 (Keap1) и киназа гликогенсинтазы 3β (GSK3β) [72]. Индукторы Nrf2 представляют собой факторы, которые способствуют высвобождению Nrf2 от Keap1 или GSK3β, что приводит к транслокации Nrf2 в ядро и связыванию с факторами транскрипции основной лейциновой молнии (bZip) (чаще всего малыми MAF) и коакти-

ватором СВР (CREB-binding protein), который обладает гистон-ацетилтрансферазной активностью, приводящей к изменениям в структуре хроматина. Это обеспечивает релаксацию ARE-содержащего промотора и связывание с РНК-полимеразой. Подобный механизм регулирует экспрессию большинства генов-мишеней Nrf2 [73].

Было показано, что МС увеличивает экспрессию гена *Nfe2l2* (ген, кодирующий Nrf2), генов антиоксидантов: *Ho-1* (кодирующего гем-оксигеназу), *Nqo1* (кодирующего NAD(P)H хинондегидрогеназу 1), *Gclc* и *Gclm* (кодирующих каталитическую и модифицирующую субъединицы гамма-глутамилцистеинсинтазы соответственно), *Trx1* и *Trx2* (кодирующих тиоредоксины 1 и 2), *TrxR1* и *TrxR2* (кодирующих тиоредоксинредуктазы 1 и 2), *Grx1* и *Grx2* (кодирующих глутаредоксины 1 и 2), *Prx6* (кодирующего перкосиредоксин 6) и препятствует нейротоксичности, ассоциированной с тау-белком [45]. МС препятствовал возрастному снижению экспрессии антиоксидантного гена *Sod2* (кодирующего супероксиддисмутазу) [46] (рис. 4). Участие пути Nrf2/ARE в задержке клеточного старения обсуждалось Atamna et al. [49]. Активация Nrf2, индуцированная МС, оказывала терапевтический эффект при колите, индуцированном TNBS (2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid) [74]. До сих пор нет прямых доказательств того, что МС непосредственно окисляет Keap1 или GSK3β. Было высказано предположение, что индуцированная МС продукция H₂O₂ может стимулировать окисление Keap1 или GSK3β, последующую активацию Nrf2 и усиление антиоксидантной защиты [45, 46]. Примечательно,

антиапоптотические свойства, которые будут рассмотрены ниже.

Апоптоз можно разделить на три фазы: внешний путь, внутренний путь и эффекторная фаза. Внешний путь активируется лигандами смерти (TNF- α (Tumor necrosis factor-alpha), FASL (Fas ligand), TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)), которые связываются с соответствующими рецепторами на клеточной поверхности, запуская процесс их агрегации [93] (рис. 5). Эта агрегация задействует адапторные белки в цитоплазматическом участке рецепторов, формируя сигнальный комплекс, индуцирующий клеточную гибель (DISC, death-inducing signaling complex). DISC стимулирует автокаталитическую активацию каспазы-8 и её высвобождение в цитоплазму, где она активирует каспазный каскад [94].

Внутренний путь апоптоза ассоциирован с митохондриями. Различные митохондриальные дисфункции, например, пермеабилитация наружной мембраны, открытие митохондриальных пор проницаемости, вызывают выход цитохрома *c* и Araf1 (Apoptotic protease activating factor 1) из митохондрий [95] (рис. 5). Эти два компонента олигомеризуются и образуют сложную структуру – апоптосому, которая необходима для расщепления прокаспазы до её активной формы, каспазы-9, которая, в свою очередь, расщепляет и активирует другие прокаспазы в эффекторные каспазы [96]. Внешний и внутренний пути апоптоза связываются друг с другом с помощью белка Bid (BH3 interacting-domain death agonist). Активная каспаза-8 расщепляет белок Bid. Укороченная форма Bid (truncated Bid, tBid) транслоцируется в митохондрии и активирует проапоптотические белки (Bcl-2-associated X protein, Bax) и деактивирует антиапоптотические белки (B-cell lymphoma 2, Bcl-2), которые влияют на высвобождение цитохрома *c* [97]. Эффекторная фаза апоптоза осуществляется каспазами 3 и 6. Они вызывают деградацию ядерного материала, в том числе ДНК, а также других клеточных компонентов, в частности цитоскелета [98].

Запрограммированная гибель клеток посредством апоптоза служит естественным барьером для развития опухолей. С другой стороны, активация апоптоза играет ключевую роль в прогрессировании неврологических расстройств, таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, черепно-мозговая травма и БАС, как показано в исследованиях на многих моделях [99]. Терапия с МС может подавлять апоптоз через PI3-K/Akt/GSK-3 β -зависимый путь при кровоизлиянии в мозг [100].

У мышей с ишемией головного мозга, которые подвергались терапии МС, уровни p53 и Bax были снижены, а количество белка Bcl-2 было увеличено [85]. МС также снижал уровень Bax и увеличивал экспрессию белка Bcl-2 при колите, вызванном TNBS [74], и индуцированном ротеноном повреждении nigrostriальной системы [101]. МС, по всей видимости, не напрямую взаимодействует с Bcl-2 и Bax, а косвенно. Скорее всего, МС оказывает влияние на уровни про- и антиапоптотических факторов, ингибируя TNF- α [100, 101] или препятствуя возникновению митохондриальных дисфункций. Например, МС предотвращал открытие митохондриальных пор [102].

МС снижал количество цитохрома *c* в цитозоле и активность каспазы-3 [26, 27, 101–104], каспазы-6 [104, 105], каспазы-8 [26, 103], каспазы-9 [27, 102] и каспазы-1, отвечающей за пироптоз [106]. Для каспазы-1, каспазы-3 и каспазы-6 было показано, что МС может непосредственно окислять их каталитические домены и ингибировать их активность [103] (рис. 5). Были получены и противоположные данные, показывающие, что МС уменьшал острое ишемическое повреждение головного мозга, но количество апоптотических клеток не уменьшалось, а даже несколько увеличивалось, однако при этом снижался процент некротических клеток [87].

МЕТИЛЕНОВЫЙ СИНИЙ КАК СУПРЕССОР ВОСПАЛЕНИЯ

Воспаление представляет собой сложную реакцию организма на различные внешние и внутренние раздражители. Воспаление характеризуется физиологическими процессами (увеличением артериального давления, изменением проницаемости сосудов), клеточными процессами (увеличением количества лейкоцитов) и молекулярными процессами (увеличением уровня провоспалительных медиаторов). Неконтролируемое острое воспаление может стать причиной хронического воспаления, способствуя развитию различных нейродегенеративных заболеваний [107]. Иммунный ответ человека регулируется сложной сетью медиаторов, таких как интерлейкины (IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18, IL-10), TNF- α и др. (рис. 5). Воспалительные стимулы связываются со специфическими рецепторами. Активация рецептора запускает важные внутриклеточные сигнальные пути, такие как ядерный фактор каппа-В (NF- κ B), митоген-активируемая протеинкиназа (MAPK), янус-киназа (JAK), сиг-

нальные белки и активаторы транскрипции из семейства белков STAT (Signal transducer and activator of transcription) [108].

Уровни провоспалительных цитокинов в тканях являются маркерами воспалительных процессов. TNF- α – один из наиболее мультифункциональных и хорошо изученных цитокинов. Его основными источниками являются макрофаги и Т-клетки, но было описано, что многие другие клетки, такие как В-клетки, нейтрофилы и эндотелиальные клетки, также продуцируют TNF- α . Несколько исследований показали, что МС вызывает снижение уровня TNF- α в различных тканях и при различных физиологических состояниях [99, 100] (рис. 5). TNF- α связывается с TNFR1/2 и приводит к TRAF-2 (TNF receptor-associated factor 2)-зависимой активации NF- κ B [109]. NF- κ B контролирует экспрессию многих генов, участвующих в воспалении, и, по-видимому, NF- κ B проявляет хроническую активность при многих воспалительных заболеваниях [110]. МС также снижает уровень NF- κ B [101].

IL-1 α и IL-1 β являются каноническими активаторами NF- κ B. МС значительно снижает экспрессию и уровень белков IL-1 α / β [100, 111, 112]. IL-6 также является провоспалительным цитокином. Передача сигнала IL-6 включает активацию JAK, а затем приводит к активации транскрипционного фактора STAT3. STAT3 фосфорилируется и образует димеры с другими членами семейства STAT. Активированный комплекс STAT3 транслоцируется в ядро и регулирует экспрессию широкого спектра генов, в том числе генов, кодирующих провоспалительные цитокины [113]. Неоднократно было показано, что МС снижает уровень IL-6 [29, 74, 100, 112] и других провоспалительных факторов: IL-12 [29], IL-17 [74, 112] и IL-18 [100, 112] (рис. 5).

Не все интерлейкины являются провоспалительными. Например, IL-10 играет решающую роль в предотвращении воспалительных и аутоиммунных патологий [114]. Имеются данные о том, что IL-10 подавляет работу других провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α [115]. МС повышал уровень IL-10 в тканях в соответствии с его противовоспалительным действием [100, 112] (рис. 5).

МЕТИЛЕНОВЫЙ СИНИЙ КАК ИНГИБИТОР МОНОАМИНОКСИДАЗЫ

Моноаминоксидазы (MAO) регулируют синаптические и внутринейрональные кон-

центрации норадреналина, серотонина и дофамина (рис. 6). MAO имеет две изоформы: MAO типа А и MAO типа В. MAO-А в первую очередь отвечает за метаболизм серотонина. Обе изоформы ответственны за метаболизм дофамина [116]. Согласно серотониновой теории депрессии, MAO-А катализирует окислительное дезаминирование серотонина (5-НТ), превращая его в 5-гидрокси-3-индолуксусный альдегид (5-НИАЛ), который в дальнейшем перерабатывается в 5-гидрокси-3-индолуксусную кислоту (5-НИАА) с помощью альдегиддегидрогеназы [117].

Астроциты также участвуют в регуляции метаболизма серотонина за счёт поглощения серотонина транспортёром обратного захвата серотонина (SERT) и последующей деградации с помощью MAO-А [118]. Кроме того, фермент MAO-А опосредует окисление дофамина в 3,4-дигидроксифенилацетальдегид (DOPAL) наряду с образованием H₂O₂ в пресинаптических окончаниях. MAO-В метаболизирует дофамин в 3,4-дигидроксифенилуксусную кислоту (DOPAC), а катехол-О-метилтрансфераза (COMT) расщепляет его до гомованилиновой кислоты (HVA) в астроцитах [119]. Антидепрессивный эффект ингибирования MAO заключается в повышении уровня всех биогенных аминов [120].

Первое упоминание о том, что МС ингибирует MAO, было сделано в 1996 г. [121]. МС ингибирует обе изоформы MAO, но MAO-А в несколько раз сильнее, чем MAO-В [122] (рис. 6, б). Позже эффективность МС против депрессии была показана на животных моделях [123]. Стоит отметить, что некоторые производные МС, например азуран В, более эффективны при лечении психотических расстройств [4, 60, 124, 125].

МЕТИЛЕНОВЫЙ СИНИЙ КАК ИНГИБИТОР NO-СИНТАЗЫ

Белки семейства NO-синтаз (NOS) являются важными регуляторами психологического состояния человека. Существует несколько форм NOS, выполняющих определённые функции. Нейрональная NOS (nNOS) локализуется в синаптических шипиках, эндотелиальная NOS (eNOS) – в эндотелиальных клетках сосудов головного мозга и двигательных нейронах, индуцируемая NOS (iNOS) – в астроцитах и микроглии и индуцируется при некоторых патологических состояниях [126]. Воспалительные процессы являются важными факторами активации iNOS в астроцитах и микроглии гип-

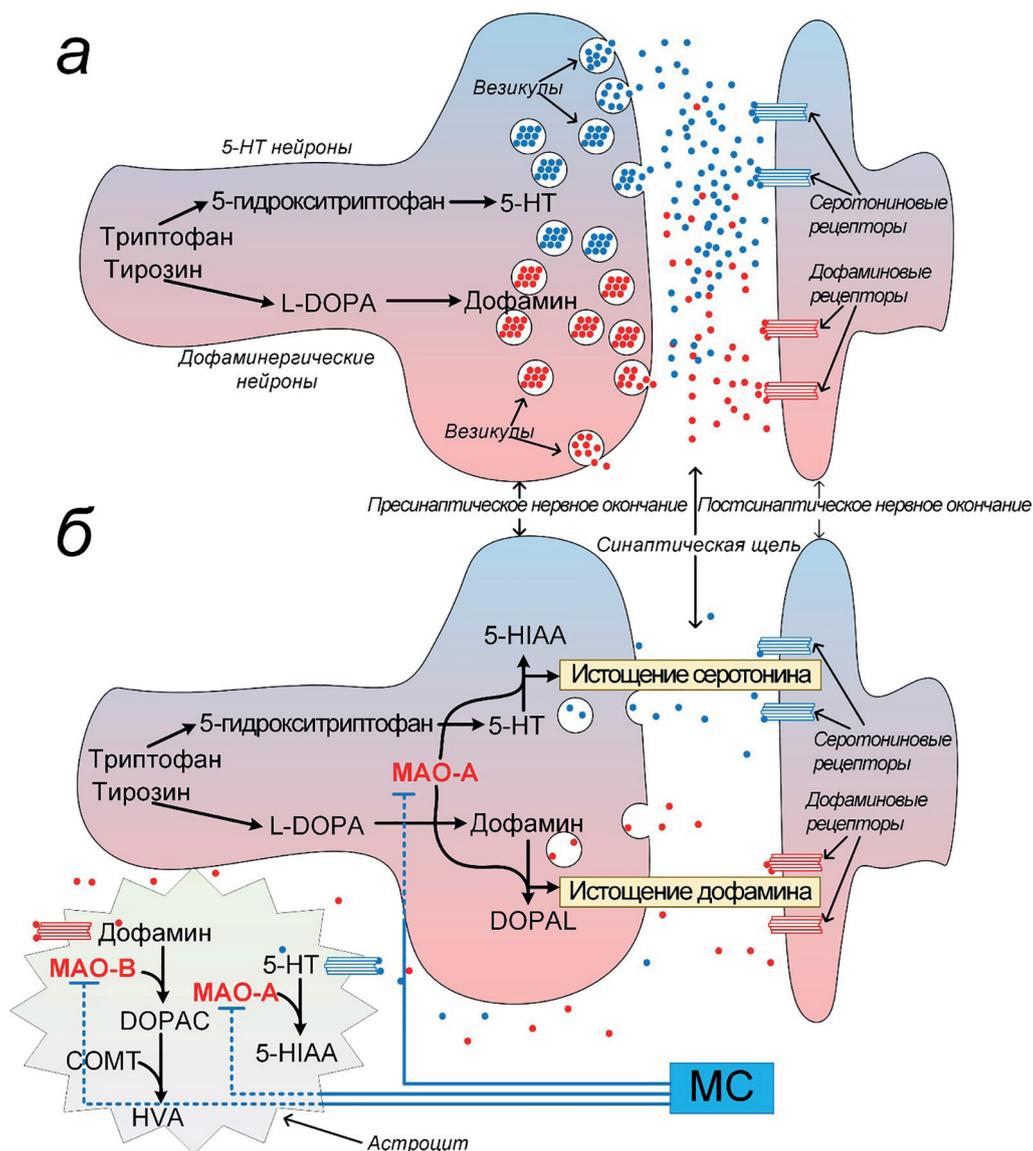


Рис. 6. Влияние МС на метаболизм серотонина и дофамина. *а* – Синтез и метаболизм серотонина и дофамина в нормальных физиологических условиях. *б* – Метаболизм серотонина и дофамина в условиях активации MAO-A и MAO-B в синапсах и астроцитах. MAO-A способствует окислению дофамина в 3,4-дигидроксифенилацетальдегид (DOPAL). MAO-B метаболизирует дофамин в 3,4-дигидроксифенилуксусную кислоту (DOPAC), а катехол-О-метилтрансфераза (COMT) расщепляет его до гомованилиновой кислоты (HVA) в астроцитах. МС препятствует истощению серотонина и дофамина за счёт ингибирования MAO-A и MAO-B

покампа [127] (рис. 7). Повышение уровня NO приводит к активации растворимой гуанилатциклазы (sGC)/циклического гуанозинмонофосфата (сGMP). Этот сигнальный путь является ключевой особенностью когнитивного дефицита и депрессии [128]. Сигнальный путь iNOS/NO/sGC/cGMP в пресинаптических окончаниях вызывает высвобождение глутамата, который активирует постсинаптические рецепторы N-метил-D-аспартата (NMDAR) для увеличения концентрации Ca^{2+} и дальнейшей активации NO, полученного от nNOS [129]. Кроме того, глюкокортикоиды могут активировать nNOS через высокоаффинный минерало-

кортикоидный рецептор (MR). В свою очередь, NO подавляет локальную экспрессию глюкокортикоидных рецепторов (GR) посредством сигнальных путей sGC/cGMP и пероксинитрита ($ONOO^-$), регулируемых внеклеточным сигналом киназ (ERK). Это приводит к повышению уровня гипоталамического кортикотропин-рилизинг-гормона (CRH) [130]. Гипоталамическая секреция CRH стимулирует переднюю долю гипофиза к высвобождению адренокортикотропного гормона (АСТН), который вызывает надпочечниковую секрецию глюкокортикоидов. Повышенный уровень глюкокортикоидов, CRH и АСТН, является фактором депрессивно-

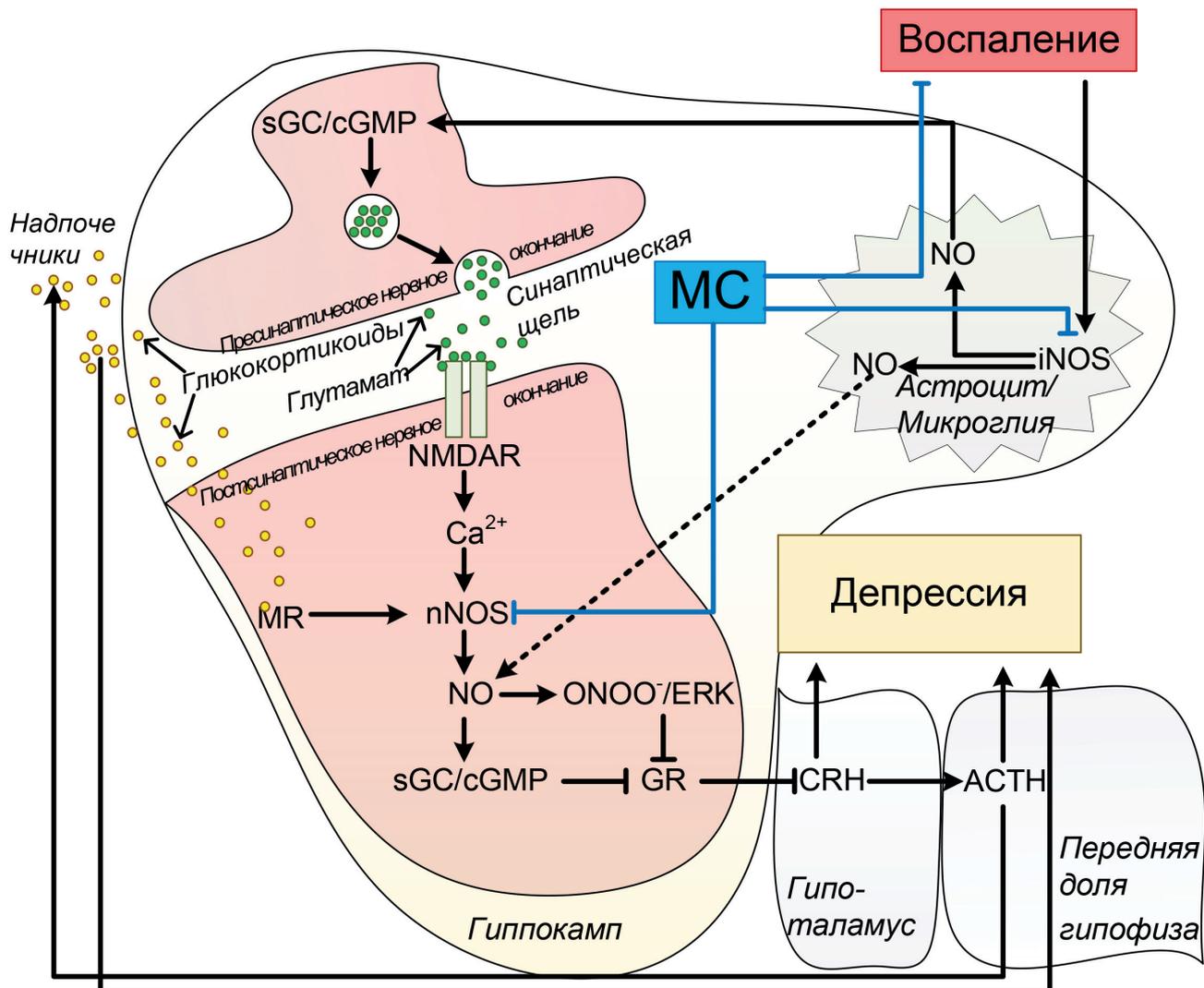


Рис. 7. Влияние MC на iNOS и nNOS способствует блокированию активности sGC/cGMP, снижению гипоталамической секреции CRH, секреции глюкокортикоидов и препятствует развитию депрессивного состояния

го поведения, так как в нормальных условиях их низкий уровень поддерживается отрицательной обратной связью [131].

Фармакологическое ингибирование NOS может снижать показатели депрессивноподобного поведения на животных моделях [129] (рис. 7). Mayer et al. [132] показали, что *in vitro* MC полностью ингибирует NOS при концентрации 30 мкМ, а также ингибирует sGC, но в меньшей степени (50% ингибирования – при 60 мкМ и максимальное ингибирование 72% – при 1 мМ), из-за чего авторы сделали вывод, что MC нельзя считать мощным и селективным ингибитор NOS, хотя ранее было показано, что MC ингибирует продукцию GMP [133]. Позже было показано ингибирующее действие MC на NOS и sGC не только *in vitro* [134], но и *in vivo* [135, 136]. Однако MC использовался в достаточно высоких

концентрациях: до 1 мМ – при введении через микродиализный зонд [135] и 100 мг/кг – при внутривенных инъекциях [136]. Хотя последующие исследования показали, что MC уже в концентрации 3 мг/кг (внутривенная инъекция) специфически ингибирует iNOS при липополисахарид-индуцированном стрессе [137]. В принципе, стоит отметить, что дозозависимость эффекта MC на ингибирование NOS нуждается в дальнейшем изучении, потому что высокие концентрации MC сами по себе могут быть токсичны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, MC является плейотропным препаратом, который может одновременно действовать на несколько сигнальных путей, которые,

как правило, между собой крайне тесно переплетаются. Множественные эффекты МС крайне важно учитывать при проведении клинических испытаний. Кроме того, МС обладает крайне интересной фармакодинамикой, которая зачастую не учитывалась при дизайне некоторых клинических испытаний и послужила причиной их неудачи [18]. Данный обзор направлен на то, чтобы обобщить и в будущих исследованиях учитывать максимально все возможные эффекты МС при воздействии на ЦНС, принимать во внимание переплетения между апоптотическими путями, про/противовоспалительными процессами, сигнальными каскадами, которые регулируют митохондриальный биогенез, антиоксидатную защиту, уровни нейромедиаторов и неправильно свёрнутых и агрегированных белков. Глубокое и всестороннее понимание всех возможных эпигенетических, биохимических и физиологических последствий употребления МС позволит более корректно планировать эксперименты для оценки его нейропротекторных свойств.

Вклад авторов. А.П. Гуреев – написание текста, И.С. Садовникова – поиск и аннотация статей, подготовка рисунков, В.Н. Попов – концепция и руководство.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и Высшего образования Российской Федерации в рамках Государственного задания университетам в области научной деятельности на 2020–2022 гг. (проект № FZGU-2020-0044), стипендии Президента Российской Федерации молодым учёным и аспирантам (проект № СП-2802.2021.4), гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских учёных и по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-1375.2022.5).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- O'Neil, M. J. (2013) *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, Cambridge, UK, Royal Society of Chemistry, England.
- Deutsches Reich Patent no. 1886, December 15, 1877 Badische Anilin- und Sodafabrik [BASF] (Mannheim, Germany), "Verfahren zur Darstellung blauer Farbstoffe aus Dimethylanilin und anderen tertiären aromatischen Monaminen" (Method for preparation of blue dyes from dimethylaniline and other tertiary aromatic monoamines), Deutsches Reich Patent no. 1886 (December 15, 1877).
- Berneth, H. (2008) *Azine dyes*. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Weinheim, Germany.
- Delpont, A., Harvey, B. H., Petzer, A., and Petzer, J. P. (2017) The monoamine oxidase inhibition properties of selected structural analogues of methylene blue, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **325**, 1–8, doi: 10.1016/j.taap.2017.03.026.
- Gaudette, N. F., and Lodge, J. W. (2005) Determination of methylene blue and leucomethylene blue in male and female Fischer 344 rat urine and B6C3F1 mouse urine, *J. Anal. Toxicol.*, **29**, 28–33, doi: 10.1093/jat/29.1.28.
- Schirmer, R. H., Adler, H., Pickhardt, M., and Mandelkow, E. (2011) "Lest we forget you – methylene blue...", *Neurobiol. Aging*, **32**, 2325.e7–2325.e2.325E16, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.12.012.
- Ehrlich, P., and Leppmann, A., (1890) Ueber schmerzstillende Wirkung des Methylenblau, *Dtsch. Med. Wochenschr.*, **16**, 493–494.
- Bodoni, P. (1899) Dell'azione sedativa del bleu di metilene in varie forme di psicosi [in Italian], *Clin. Med. Ital.*, pp. 217–222.
- Ohlow, M. J., and Moosmann, B. (2011) Phenothiazine: the seven lives of pharmacology's first lead structure, *Drug Discov. Today*, **16**, 119–131, doi: 10.1016/j.drudis.2011.01.001.
- Alleiksaht, W. J. (1938) The use of methylene blue in the treatment of catatonic dementia praecox patients, *Psychiatric Quarterly*, **12**, 245–252.
- Kajdi, L., and Taylor, C. V. (1938) The use of intravenous methylene blue in status convulsivus, *Am. J. Insanity*, **94**, 1369–1376, doi: 10.1176/ajp.94.6.1369.
- Naylor, G. J., and Smith, A. H. (1981) Vanadium: a possible aetiological factor in manic depressive illness, *Psychol. Med.*, **11**, 249–256, doi: 10.1017/s0033291700052065.
- Naylor, G. J., Martin, B., Hopwood, S. E., and Watson, Y. (1986) A two-year double-blind crossover trial of the prophylactic effect of methylene blue in manic depressive psychosis, *Biol. Psychiatry*, **21**, 915–920, doi: 10.1016/0006-3223(86)90265-9.
- Martinez, J. L., Jensen, R. A., Vasquez, B. J., McGuinness, T., and McGaugh, J. L. (1978) Methylene blue alters retention of inhibitory avoidance responses, *Psychobiology*, **6**, 387–390, doi: 10.3758/BF03326744.
- Wischnik, C. M., Edwards, P. C., Lai, R. Y., Roth, M., and Harrington, C. R. (1996) Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by

- phenothiazines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11213-11218, doi: 10.1073/pnas.93.20.11213.
16. Wischik, C. M., Staff, R. T., Wischik, D. J., Bentham, P., Murray, A. D., et al. (2015) Tau aggregation inhibitor therapy: an exploratory phase 2 study in mild or moderate Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.*, **44**, 705-720, doi: 10.3233/JAD-142874.
 17. Gauthier, S., Feldman, H. H., Schneider, L. S., Wilcock, G. K., Frisoni, G. B., et al. (2016) Efficacy and safety of tau-aggregation inhibitor therapy in patients with mild or moderate Alzheimer's disease: a randomised, controlled, double-blind, parallel-arm, phase 3 trial, *Lancet*, **388**, 2873-2884, doi: 10.1016/S0140-6736(16)31275-2.
 18. Hashweh, N. N., Bartochowski, Z., Khoury, R., and Grossberg, G. T. (2020) An evaluation of hydromethylthionine as a treatment option for Alzheimer's disease, *Expert Opin. Pharmacother.*, **21**, 619-627, doi: 10.1080/14656566.2020.1719066.
 19. Sontag, E. M., Lotz, G. P., Agrawal, N., Tran, A., Aron, R., et al. (2012) Methylene blue modulates huntingtin aggregation intermediates and is protective in Huntington's disease models, *J. Neurosci.*, **32**, 11109-11119, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0895-12.2012.
 20. Heidari, R., Monnier, V., Martin, E., and Tricoire, H. (2015) Methylene blue partially rescues heart defects in a drosophila model of Huntington's disease, *J. Huntington's Dis.*, **4**, 173-186, doi: 10.3233/JHD-140130.
 21. Bariotto-Dos-Santos, K., Padovan-Neto, F. E., Bortolanza, M., Dos-Santos-Pereira, M., Raisman-Vozari, R., et al. (2019) Repurposing an established drug: an emerging role for methylene blue in L-DOPA-induced dyskinesia, *Eur. J. Neurosci.*, **49**, 869-882, doi: 10.1111/ejn.14079.
 22. Bhurtel, S., Katila, N., Neupane, S., Srivastav, S., Park, P. H., et al. (2018) Methylene blue protects dopaminergic neurons against MPTP-induced neurotoxicity by upregulating brain-derived neurotrophic factor, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1431**, 58-71, doi: 10.1111/nyas.13870.
 23. Stelmashook, E. V., Genrikhs, E. E., Mukhaleva, E. V., Kapkaeva, M. R., Kondratenko, R. V., et al. (2019) Neuroprotective effects of methylene blue *in vivo* and *in vitro*, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **167**, 455-459, doi: 10.1007/s10517-019-04548-3.
 24. Genrikhs, E. E., Stelmashook, E. V., Voronkov, D. N., Novikova, S. V., Alexandrova, O. P., et al. (2020) The delayed neuroprotective effect of methylene blue in experimental rat brain trauma, *Antioxidants*, **9**, 377, doi: 10.3390/antiox9050377.
 25. Genrikhs, E. E., Stelmashook, E. V., Voronkov, D. N., Novikova, S. V., Alexandrova, O. P., et al. (2020) The single intravenous administration of methylene blue after traumatic brain injury diminishes neurological deficit, blood-brain barrier disruption and decrease in the expression of S100 protein in rats, *Brain Res.*, **1740**, 146854, doi: 10.1016/j.brainres.2020.146854.
 26. Lu, Q., Tucker, D., Dong, Y., Zhao, N., and Zhang, Q. (2016) Neuroprotective and functional improvement effects of methylene blue in global cerebral ischemia, *Mol. Neurobiol.*, **53**, 5344-5355, doi: 10.1007/s12035-015-9455-0.
 27. Li, L., Yang, R., Li, P., Lu, H., Hao, J., et al. (2018) Combination treatment with methylene blue and hypothermia in global cerebral ischemia, *Mol. Neurobiol.*, **55**, 2042-2055, doi: 10.1007/s12035-017-0470-1.
 28. Lin, Z. H., Wang, S. Y., Chen, L. L., Zhuang, J. Y., Ke, Q. F., et al. (2017) Methylene blue mitigates acute neuroinflammation after spinal cord injury through inhibiting NLRP3 inflammasome activation in microglia, *Front. Cell Neurosci.*, **11**, 391, doi: 10.3389/fncel.2017.00391.
 29. Dibaj, P., Zschüntzsch, J., Steffens, H., Scheffel, J., Göricke, B., et al. (2012) Influence of methylene blue on microglia-induced inflammation and motor neuron degeneration in the SOD1(G93A) model for ALS, *PLoS One*, **7**, e43963, doi: 10.1371/journal.pone.0043963.
 30. Zeevalk, G. D., Bernard, L. P., Song, C., Gluck, M., and Ehrhart, J. (2005) Mitochondrial inhibition and oxidative stress: reciprocating players in neurodegeneration, *Antioxid. Redox Signal.*, **7**, 1117-1139, doi: 10.1089/ars.2005.7.1117.
 31. Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., and Starkov, A. A. (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species, *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 200-214, doi: 10.1007/s10541-005-0102-7.
 32. Eubel, H., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., and Braun, H. P. (2004) Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria, *Plant Physiol. Biochem.*, **42**, 937-942, doi: 10.1016/j.plaphy.2004.09.010.
 33. Cadenas, S. (2018) Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1859**, 940-950, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.05.019.
 34. Grundlingh, J., Dargan, P. I., El-Zanfaly, M., and Wood, D. M. (2011) 2,4-dinitrophenol (DNP): a weight loss agent with significant acute toxicity and risk of death, *J. Med. Toxicol.*, **7**, 205-212, doi: 10.1007/s13181-011-0162-6.
 35. Wen, Y., Li, W., Poteet, E. C., Xie, L., Tan, C., et al. (2011) Alternative mitochondrial electron transfer as a novel strategy for neuroprotection, *J. Biol. Chem.*, **286**, 16504-16515, doi: 10.1074/jbc.M110.208447.
 36. Harrop, G. A., and Barron, E. S. (1928) Studies on blood cell metabolism: I. The effect of methylene blue and other dyes upon the oxygen consumption of mammalian and avian erythrocytes, *J. Exp. Med.*, **48**, 207-223, doi: 10.1084/jem.48.2.207.
 37. Barron, E. S., and Hoffman, L. A. (1930) The catalytic effect of dyes on the oxygen consumption of living cells, *J. Gen. Physiol.*, **13**, 483-494, doi: 10.1085/jgp.13.4.483.
 38. Elliott, K. A., and Greig, M. E. (1938) The distribution of the succinic oxidase system in animal tissues, *Biochem. J.*, **32**, 1407-1423, doi: 10.1042/bj0321407.

39. Slater, E. C. (1949) A respiratory catalyst required for the reduction of cytochrome c by cytochrome b, *Biochem. J.*, **45**, 14-30, doi: 10.1042/bj0450014.
40. Redfearn, E. R. (1961) The role of ubiquinone (coenzyme Q) and its homologues in mediating the reduction of methylene blue by succinate in heart-muscle preparations, *Biochim. Biophys. Acta*, **53**, 581-583, doi: 10.1016/0006-3002(61)90220-7.
41. Tönz, O. (1968) The congenital methemoglobinemias. Physiology and pathophysiology of the hemoglobin metabolism, *Bibliotheca Haematologica*, **28**, 1-146.
42. Visarius, T. M., Stucki, J. W., and Lauterburg, B. H. (1997) Stimulation of respiration by methylene blue in rat liver mitochondria, *FEBS Lett.*, **412**, 157-160, doi: 10.1016/s0014-5793(97)00767-9.
43. Gureev, A. P., Samoylova, N. A., Potanina, D. V., and Popov, V. N. (2021) Effect of methylene blue and its metabolite – azure I – on bioenergetic parameters of intact mice brain mitochondria, *Biomed. Khim.*, **67**, 485-490, doi: 10.18097/PBMC20216706485.
44. Callaway, N. L., Riha, P. D., Wrubel, K. M., McCollum, D., and Gonzalez-Lima, F. (2002) Methylene blue restores spatial memory retention impaired by an inhibitor of cytochrome oxidase in rats, *Neurosci. Lett.*, **332**, 83-86, doi: 10.1016/s0304-3940(02)00827-3.
45. Tretter, L., Horvath, G., Hölgyesi, 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, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.024.
46. Gureev, A. P., Syromyatnikov, M. Y., Gorbacheva, T. M., Starkov, A. A., and Popov, V. N. (2016) Methylene blue improves sensorimotor phenotype and decreases anxiety in parallel with activating brain mitochondria biogenesis in mid-age mice, *Neurosci. Res.*, **113**, 19-27, doi: 10.1016/j.neures.2016.07.006.
47. 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, doi: 10.1002/1873-3468.13332.
48. Gureev, A. P., Shaforostova, E. A., Laver, D. A., Khorolskaya, V. G., Syromyatnikov, M. Y., et al. (2019) Methylene blue elicits non-genotoxic H₂O₂ production and protects brain mitochondria from rotenone toxicity, *J. Appl. Biomed.*, **17**, 107-114, doi: 10.32725/jab.2019.008.
49. Atamna, H., Atamna, W., Al-Eyd, G., Shanower, G., and Dhahbi, J. M. (2015) Combined activation of the energy and cellular-defense pathways may explain the potent anti-senescence activity of methylene blue, *Redox Biol.*, **6**, 426-435, doi: 10.1016/j.redox.2015.09.004.
50. 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, doi: 10.1007/BF03033307.
51. Poteet, E., Winters, A., Yan, L. J., Shufelt, K., Green, K. N., et al. (2012) Neuroprotective actions of methylene blue and its derivatives, *PLoS One*, **7**, e48279, doi: 10.1371/journal.pone.0048279.
52. Mikulás, K., Komlódi, T., Földes, A., Sváb, G., Horváth, G., et al. (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*, **13**, 3472, doi: 10.3390/ma13163472.
53. Sváb, 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*, **10**, 305, doi: 10.3390/antiox10020305.
54. Irwin, M. H., Parameshwaran, K., and Pinkert, C. A. (2013) Mouse models of mitochondrial complex I dysfunction, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **45**, 34-40, doi: 10.1016/j.biocel.2012.08.009.
55. Bahn, G., and Jo, D. G. (2019) Therapeutic approaches to Alzheimer's disease through modulation of NRF2, *Neuromol. Med.*, **21**, 1-11, doi: 10.1007/s12017-018-08523-5.
56. Taniguchi, S., Suzuki, N., Masuda, M., Hisanaga, S., Iwatsubo, T., et al. (2005) Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins, *J. Biol. Chem.*, **280**, 7614-7623, doi: 10.1074/jbc.M408714200.
57. Hattori, M., Sugino, E., Minoura, K., In, Y., Sumida, M., et al. (2008) Different inhibitory response of cyanidin and methylene blue for filament formation of tau microtubule-binding domain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **374**, 158-163, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.07.001.
58. Stack, C., Jainuddin, S., Elipenhali, C., Gerges, M., Starkova, N., et al. (2014) Methylene blue upregulates Nrf2/ARE genes and prevents tau-related neurotoxicity, *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 3716-3732, doi: 10.1093/hmg/ddu080.
59. Hochgräfe, K., Sydow, A., Matenia, D., Cadinu, D., Könen, S., et al. (2015) Preventive methylene blue treatment preserves cognition in mice expressing full-length pro-aggregant human Tau, *Acta Neuropathol. Commun.*, **3**, 25, doi: 10.1186/s40478-015-0204-4.
60. Necula, M., Breydo, L., Milton, S., Kaye, R., van der Veer, W. E., et al. (2007) Methylene blue inhibits amyloid Abeta oligomerization by promoting fibrillization, *Biochemistry*, **46**, 8850-8860, doi: 10.1021/bi700411k.
61. Lee, B. I., Suh, Y. S., Chung, Y. J., Yu, K., and Park, C. B. (2017) Shedding light on Alzheimer's β -amyloidosis: photosensitized methylene blue inhibits self-assembly of β -amyloid peptides and disintegrates their aggregates, *Sci. Rep.*, **7**, 7523, doi: 10.1038/s41598-017-07581-2.
62. Berrocal, M., Corbacho, I., Gutierrez-Merino, C., and Mata, A. M. (2018) Methylene blue activates the PMCA activity and cross-interacts with amyloid β -peptide, blocking A β -mediated PMCA inhibition, *Neuropharmacology*, **139**, 163-172, doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.07.012.

63. Berrocal, M., Caballero-Bermejo, M., Gutierrez-Merino, C., and Mata, A. M. (2019) Methylene blue blocks and reverses the inhibitory effect of Tau on PMCA function, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 3521, doi: 10.3390/ijms20143521.
64. Illarioshkin, S. N., Klyushnikov, S. A., Vigont, V. A., Seliverstov, Y. A., and Kaznacheeva, E. V. (2018) Molecular pathogenesis in Huntington's disease, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1030-1039, doi: 10.1134/S0006297918090043.
65. Cavaliere, P., Torrent, J., Prigent, S., Granata, V., Pauwels, K., et al. (2013) Binding of methylene blue to a surface cleft inhibits the oligomerization and fibrillization of prion protein, *Biochim. Biophys. Acta*, **1832**, 20-28, doi: 10.1016/j.bbadis.2012.09.005.
66. Paré, B., Lehmann, M., Beaudin, M., Nordström, U., Saikali, S., et al. (2018) Misfolded SOD1 pathology in sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *Sci. Rep.*, **8**, 14223, doi: 10.1038/s41598-018-31773-z.
67. Yamashita, M., Nonaka, T., Arai, T., Kametani, F., Buchman, V. L., et al. (2009) Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models, *FEBS Lett.*, **583**, 2419-2424, doi: 10.1016/j.febslet.2009.06.042.
68. Musteikyte, G., Ziaunys, M., and Smirnovas, V. (2020) Methylene blue inhibits nucleation and elongation of SOD1 amyloid fibrils, *PeerJ*, **8**, e9719, doi: 10.7717/peerj.9719.
69. Vaccaro, A., Patten, S. A., Ciura, S., Maios, C., Therrien, M., et al. (2012) Methylene blue protects against TDP-43 and FUS neuronal toxicity in *C. elegans* and *D. rerio*, *PLoS One*, **7**, e42117, doi: 10.1371/journal.pone.0042117.
70. Vaccaro, A., Patten, S. A., Aggad, D., Julien, C., Maios, C., et al. (2013) Pharmacological reduction of ER stress protects against TDP-43 neuronal toxicity *in vivo*, *Neurobiol. Dis.*, **55**, 64-75, doi: 10.1016/j.nbd.2013.03.015.
71. Dinkova-Kostova, A. T., and Abramov, A. Y. (2015) The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function, *Free Radic. Biol. Med.*, **88**, 179-188, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.036.
72. Hayes, J. D., Chowdhry, S., Dinkova-Kostova, A. T., and Sutherland, C. (2015) Dual regulation of transcription factor Nrf2 by Keap1 and by the combined actions of β -TrCP and GSK-3, *Biochem. Soc. Trans.*, **43**, 611-620, doi: 10.1042/BST20150011.
73. Zenkov, N. K., Kozhin, P. M., Chechushkov, A. V., Martinovich, G. G., Kandalintseva, N. V., et al. (2017) Mazes of Nrf2 regulation, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 556-564, doi: 10.1134/S0006297917050030.
74. El Sayed, N. S., and Sayed, A. S. (2019) Protective effect of methylene blue on TNBS-induced colitis in rats mediated through the modulation of inflammatory and apoptotic signalling pathways, *Arch. Toxicol.*, **93**, 2927-2942, doi: 10.1007/s00204-019-02548-w.
75. Kaur, S., and Benov, L. T. (2020) Methylene blue induces the soxRS regulon of *Escherichia coli*, *Chem. Biol. Interact.*, **329**, 109222, doi: 10.1016/j.cbi.2020.109222.
76. Gureev, A. P., Shaforostova, E. A., and Popov, V. N. (2019) Regulation of mitochondrial biogenesis as a way for active longevity: interaction between the Nrf2 and PGC-1 α signaling pathways, *Front. Genet.*, **10**, 435, doi: 10.3389/fgene.2019.00435.
77. Fernandez-Marcos, P. J., and Auwerx, J. (2011) Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis, *Am. J. Clin. Nutr.*, **93**, 884S-890S, doi: 10.3945/ajcn.110.001917.
78. Islam, H., Hood, D. A., and Gurd, B. J. (2020) Looking beyond PGC-1 α : emerging regulators of exercise-induced skeletal muscle mitochondrial biogenesis and their activation by dietary compounds, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, **45**, 11-23, doi: 10.1139/apnm-2019-0069.
79. Xie, L., Li, W., Winters, A., Yuan, F., Jin, K., et al. (2013) Methylene blue induces macroautophagy through 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase pathway to protect neurons from serum deprivation, *Front. Cell Neurosci.*, **7**, 56, doi: 10.3389/fncel.2013.00056.
80. Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010) Autophagy and the integrated stress response, *Mol. Cell*, **40**, 280-293, doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.023.
81. Telli, M. L., Nagata, H., Wapnir, I., Acharya, C. R., Zablotsky, K., et al. (2021) Intratumoral plasmid IL12 expands CD8⁺ T cells and induces a CXCR3 gene signature in triple-negative breast tumors that sensitizes patients to anti-PD-1 therapy, *Clin. Cancer Res.*, **27**, 2481-2493, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3944.
82. Wong, E., and Cuervo, A. M. (2010) Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases, *Nat. Neurosci.*, **13**, 805-811, doi: 10.1038/nn.2575.
83. Medina, D. X., Caccamo, A., and Oddo, S. (2011) Methylene blue reduces $\text{A}\beta$ levels and rescues early cognitive deficit by increasing proteasome activity, *Brain Pathol.*, **21**, 140-149, doi: 10.1111/j.1750-3639.2010.00430.x.
84. Congdon, E. E., Wu, J. W., Myeku, N., Figueroa, Y. H., Herman, M., et al. (2012) Methylthioninium chloride (methylene blue) induces autophagy and attenuates tauopathy *in vitro* and *in vivo*, *Autophagy*, **8**, 609-622, doi: 10.4161/auto.19048.
85. Jiang, Z., Watts, L. T., Huang, S., Shen, Q., Rodriguez, P., et al. (2015) The effects of methylene blue on autophagy and apoptosis in MRI-defined normal tissue, ischemic penumbra and ischemic core, *PLoS One*, **10**, e0131929, doi: 10.1371/journal.pone.0131929.
86. Zhao, M., Liang, F., Xu, H., Yan, W., and Zhang, J. (2016) Methylene blue exerts a neuroprotective effect against traumatic brain injury by promoting autophagy and inhibiting microglial activation, *Mol. Med. Rep.*, **13**, 13-20, doi: 10.3892/mmr.2015.4551.
87. Di, Y., He, Y. L., Zhao, T., Huang, X., Wu, K. W., et al. (2015) Methylene blue reduces acute cerebral ischemic injury via the induction of mitophagy, *Mol. Med.*, **21**, 420-429, doi: 10.2119/molmed.2015.00038.

88. Gureev, A. P., Sadovnikova, I. S., Starkov, N. N., Starkov, A. A., and Popov, V. N. (2020) p62-Nrf2-p62 mitophagy regulatory loop as a target for preventive therapy of neurodegenerative diseases, *Brain Sci.*, **10**, 847, doi: 10.3390/brainsci10110847.
89. Murata, H., Takamatsu, H., Liu, S., Kataoka, K., Huh, N. H., et al. (2015) NRF2 regulates PINK1 expression under oxidative stress conditions, *PLoS One*, **10**, e0142438, doi: 10.1371/journal.pone.0142438.
90. Dos Santos, A. F., Terra, L. F., Wailemann, R. A., Oliveira, T. C., Gomes, V. M., et al. (2017) Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells, *BMC Cancer*, **17**, 194, doi: 10.1186/s12885-017-3179-7.
91. Lucky, S. S., Soo, K. C., and Zhang, Y. (2015) Nanoparticles in photodynamic therapy, *Chem. Rev.*, **115**, 1990-2042, doi: 10.1021/cr5004198.
92. Tardivo, J. P., Del Giglio, A., de Oliveira, C. S., Gabrielli, D. S., Junqueira, H. C., et al. (2005) Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2**, 175-191, doi: 10.1016/S1572-1000(05)00097-9.
93. Eimon, P. M., Kratz, E., Varfolomeev, E., Hymowitz, S. G., Stern, H., et al. (2006) Delineation of the cell-extrinsic apoptosis pathway in the zebrafish, *Cell Death Differ.*, **13**, 1619-1630, doi: 10.1038/sj.cdd.4402015.
94. Bellail, A. C., Tse, M. C., Song, J. H., Phuphanich, S., Olson, J. J., et al. (2010) DR5-mediated DISC controls caspase-8 cleavage and initiation of apoptosis in human glioblastomas, *J. Cell Mol. Med.*, **14**, 1303-1317, doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00777.x.
95. Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., et al. (2006) Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria, *Cell Death Differ.*, **13**, 1423-1433, doi: 10.1038/sj.cdd.4401950.
96. Wu, C. C., and Bratton, S. B. (2013) Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species, *Antioxid Redox Signal.*, **19**, 546-558, doi: 10.1089/ars.2012.4905.
97. Roy, S., and Nicholson, D. W. (2000) Cross-talk in cell death signaling, *J. Exp. Med.*, **192**, F21-F25.
98. Connolly, P. F., Jäger, R., and Fearnhead, H. O. (2014) New roles for old enzymes: killer caspases as the engine of cell behavior changes, *Front. Physiol.*, **5**, 149, doi: 10.3389/fphys.2014.00149.
99. Radi, E., Formichi, P., Battisti, C., and Federico, A. (2014) Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases, *J. Alzheimer's Dis.*, **42**, S125-S152, doi: 10.3233/JAD-132738.
100. Chen, C., Zhou, F., Zeng, L., Jiang, Z., and Hu, Z. (2019) Methylene blue offers neuroprotection after intracerebral hemorrhage in rats through the PI3K/Akt/GSK3 β signaling pathway, *J. Cell Physiol.*, **234**, 5304-5318, doi: 10.1002/jcp.27339.
101. Abdel-Salam, O., Omara, E., Youness, E., Khadrawy, Y., Mohammed, N., et al. (2014) Rotenone-induced nigrostriatal toxicity is reduced by methylene blue, *J. Neurorestoratol.*, **2**, 65-80, doi: 10.2147/JN.S49207.
102. Lee, K. K., and Boelsterli, U. A. (2014) Bypassing the compromised mitochondrial electron transport with methylene blue alleviates efavirenz/isoniazid-induced oxidant stress and mitochondria-mediated cell death in mouse hepatocytes, *Redox Biol.*, **2**, 599-609, doi: 10.1016/j.redox.2014.03.003.
103. Abdelkader, N. F., Farid, H. A., Youness, E. R., Abdel-Salam, O., and Zaki, H. F. (2020) The role of KATP channel blockade and activation in the protection against neurodegeneration in the rotenone model of Parkinson's disease, *Life Sci.*, **257**, 118070, doi: 10.1016/j.lfs.2020.118070.
104. Pakavathkumar, P., Sharma, G., Kaushal, V., Foveau, B., and LeBlanc, A. C. (2015) Methylene blue inhibits caspases by oxidation of the catalytic cysteine, *Sci. Rep.*, **5**, 13730, doi: 10.1038/srep13730.
105. Zhou, L., Flores, J., Noël, A., Beauchet, O., Sjöström, P. J., et al. (2019) Methylene blue inhibits Caspase-6 activity, and reverses Caspase-6-induced cognitive impairment and neuroinflammation in aged mice, *Acta Neuropathol. Commun.*, **7**, 210, doi: 10.1186/s40478-019-0856-6.
106. Ahn, H., Kang, S. G., Yoon, S. I., Ko, H. J., Kim, P. H., et al. (2017) Methylene blue inhibits NLRP3, NLRC4, AIM2, and non-canonical inflammasome activation, *Sci. Rep.*, **7**, 12409, doi: 10.1038/s41598-017-12635-6.
107. Amor, S., Puentes, F., Baker, D., and van der Valk, P. (2010) Inflammation in neurodegenerative diseases, *Immunology*, **129**, 154-169, doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03225.x.
108. Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., et al. (2017) Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs, *Oncotarget*, **9**, 7204-7218, doi: 10.18632/oncotarget.23208.
109. Zelová, H., and Hošek, J. (2013) TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances, *Inflamm. Res.*, **62**, 641-651, doi: 10.1007/s00011-013-0633-0.
110. Monaco, C., Andreacos, E., Kiriakidis, S., Mauri, C., Bicknell, C., et al. (2004) Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 5634-5639, doi: 10.1073/pnas.0401060101.
111. Liu, J. J., Lu, L., Hu, F. Q., Yuan, H., Xu, Q., et al. (2018) Methylene blue attenuates renal ischemia-reperfusion injury by negative regulation of NLRP3 signaling pathway, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **22**, 2847-2853, doi: 10.26355/eurrev_201805_14986.
112. Zheng, J., and Li, Q. (2019) Methylene blue regulates inflammatory response in osteoarthritis by noncoding long chain RNA CILinc02, *J. Cell Biochem.*, **120**, 3331-3338, doi: 10.1002/jcb.27602.
113. Wang, S. W., and Sun, Y. M. (2014) The IL-6/JAK/STAT3 pathway: potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer (review), *Int. J. Oncol.*, **44**, 1032-1040, doi: 10.3892/ijo.2014.2259.
114. Lobo-Silva, D., Carriche, G. M., Castro, A. G., Roque, S., and Saraiva, M. (2016) Balancing

- the immune response in the brain: IL-10 and its regulation, *J. Neuroinflamm.*, **13**, 297, doi: 10.1186/s12974-016-0763-8.
115. Riley, J. K., Takeda, K., Akira, S., and Schreiber, R. D. (1999) Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action, *J. Biol. Chem.*, **274**, 16513-16521, doi: 10.1074/jbc.274.23.16513.
 116. Shih, J. C., Chen, K., and Ridd, M. J. (1999) Role of MAO A and B in neurotransmitter metabolism and behavior, *Pol. J. Pharmacol.*, **51**, 25-29.
 117. Godar, S. C., Bortolato, M., Frau, R., Dousti, M., Chen, K., et al. (2011) Maladaptive defensive behaviours in monoamine oxidase A-deficient mice, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **14**, 1195-1207, doi: 10.1017/S1461145710001483.
 118. Watson, C., Bates, J., and Franczak, R. (2009) Serotonin regulation by astrocytes, *FASEB J.*, **23**, 790.2, doi: 10.1096/fasebj.23.1_supplement.790.2.
 119. Paudel, P., Park, S. E., Seong, S. H., Jung, H. A., and Choi, J. S. (2019) Novel Diels-Alder type adducts from morus alba root bark targeting human monoamine oxidase and dopaminergic receptors for the management of neurodegenerative diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 6232, doi: 10.3390/ijms20246232.
 120. Ordway, G. A., Farley, J. T., Dilley, G. E., Overholser, J. C., Meltzer, H. Y., et al. (1999) Quantitative distribution of monoamine oxidase A in brainstem monoamine nuclei is normal in major depression, *Brain Res.*, **847**, 71-79, doi: 10.1016/s0006-8993(99)02043-0.
 121. Aeschlimann, C., Cerny, T., and Küpfer, A. (1996) Inhibition of (mono)amine oxidase activity and prevention of ifosfamide encephalopathy by methylene blue, *Drug Metabol. Dispos.*, **24**, 1336-1339.
 122. Ramsay, R. R., Dunford, C., and Gillman, P. K. (2007) Methylene blue and serotonin toxicity: inhibition of monoamine oxidase A (MAO A) confirms a theoretical prediction, *Br. J. Pharmacol.*, **152**, 946-951, doi: 10.1038/sj.bjp.0707430.
 123. Harvey, B. H., Duvenhage, I., Viljoen, F., Scheepers, N., Malan, S. F., et al. (2010) Role of monoamine oxidase, nitric oxide synthase and regional brain monoamines in the antidepressant-like effects of methylene blue and selected structural analogues, *Biochem. Pharmacol.*, **80**, 1580-1591, doi: 10.1016/j.bcp.2010.07.037.
 124. Delpont, A., Harvey, B. H., Petzer, A., and Petzer, J. P. (2014) Azure B and a synthetic structural analogue of methylene blue, ethylthioninium chloride, present with antidepressant-like properties, *Life Sci.*, **117**, 56-66, doi: 10.1016/j.lfs.2014.10.005.
 125. Petzer, A., Harvey, B. H., Wegener, G., and Petzer, J. P. (2012) Azure B, a metabolite of methylene blue, is a high-potency, reversible inhibitor of monoamine oxidase, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **258**, 403-409, doi: 10.1016/j.taap.2011.12.005.
 126. Reis, P. A., Gonçalves de Albuquerque, C. F., Maron-Gutierrez, T., Silva, A. R., and de Castro Faria Neto, H. C. (2017) Role of nitric oxide synthase in the function of the central nervous system under normal and infectious conditions, *Nitric Oxide Synthase*, IntechOpen, doi: 10.5772/67816.
 127. Czapski, G. A., Cakala, M., Chalimoniuk, M., Gajkowska, B., and Strosznajder, J. B. (2007) Role of nitric oxide in the brain during lipopolysaccharide-evoked systemic inflammation, *J. Neurosci. Res.*, **85**, 1694-1703, doi: 10.1002/jnr.21294.
 128. Zhou, X. Y., Zhang, F., Ying, C. J., Chen, J., Chen, L., et al. (2017) Inhibition of iNOS alleviates cognitive deficits and depression in diabetic mice through downregulating the NO/sGC/cGMP/PKG signal pathway, *Behav. Brain Res.*, **322**, 70-82, doi: 10.1016/j.bbr.2016.12.046.
 129. Chen, H. J., Spiers, J. G., Sernia, C., and Lavidis, N. A. (2015) Response of the nitroergic system to activation of the neuroendocrine stress axis, *Front. Neurosci.*, **9**, 3, doi: 10.3389/fnins.2015.00003.
 130. Zhou, Q. G., Zhu, L. J., Chen, C., Wu, H. Y., Luo, C. X., et al. (2011) Hippocampal neuronal nitric oxide synthase mediates the stress-related depressive behaviors of glucocorticoids by downregulating glucocorticoid receptor, *J. Neurosci.*, **31**, 7579-7590, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0004-11.2011.
 131. Gragnoli, C. (2014) Hypothesis of the neuroendocrine cortisol pathway gene role in the comorbidity of depression, type 2 diabetes, and metabolic syndrome, *Appl. Clin. Genet.*, **7**, 43-53, doi: 10.2147/TACG.S39993.
 132. Mayer, B., Brunner, F., and Schmidt, K. (1993) Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue, *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 367-374, doi: 10.1016/0006-2952(93)90072-5.
 133. Ignarro, L. J., Burke, T. M., Wood, K. S., Wolin, M. S., and Kadowitz, P. J. (1984) Association between cyclic GMP accumulation and acetylcholine-elicited relaxation of bovine intrapulmonary artery, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **228**, 682-690.
 134. Luo, D., Das, S., and Vincent, S. R. (1995) Effects of methylene blue and LY83583 on neuronal nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase, *Eur. J. Pharmacol.*, **290**, 247-251, doi: 10.1016/0922-4106(95)00084-4.
 135. Volke, V., Wegener, G., Vasar, E., and Rosenberg, R. (1999) Methylene blue inhibits hippocampal nitric oxide synthase activity *in vivo*, *Brain Res.*, **826**, 303-305, doi: 10.1016/s0006-8993(99)01253-6.
 136. Deutsch, S., Rosse, R., Paul, S., Tomasino, V., Koetznner, L., et al. (1996) 7-Nitroindazole and methylene blue, inhibitors of neuronal nitric oxide synthase and NO-stimulated guanylate cyclase, block MK-801-elicited behaviors in mice, *Neuropsychopharmacology*, **15**, 37-43, doi: 10.1016/0893-133X(95)00153-5.
 137. Lomniczi, A., Cebral, E., Canteros, G., McCann, S. M., and Rettori, V. (2000) Methylene blue inhibits the increase of inducible nitric oxide synthase activity induced by stress and lipopolysaccharide in the medial basal hypothalamus of rats, *Neuroimmunomodulation*, **8**, 122-127, doi: 10.1159/000054271.

MOLECULAR MECHANISMS OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF METHYLENE BLUE

Review

A. P. Gureev^{1,2*}, I. S. Sadovnikova¹, and V. N. Popov^{1,2}

¹ Voronezh State University, 394018 Voronezh, Russia; E-mail: gureev@bio.vsu.ru

² Voronezh State University of Engineering Technologies, 394036 Voronezh, Russia

Methylene blue (MB) is the first fully synthetic compound that found its way into medicine over 120 years ago to treat malaria. Today MB is approved for the treatment of methemoglobinemia, but there are premises for its repositioning towards neuroprotection. The promise of this compound is confirmed by the effectiveness in the treatment of Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's diseases, models of traumatic brain injury, amniotic lateral sclerosis, depressive disorders, etc. in various models. However, the goal of this review is not so much to focus on describing the therapeutic effects of MB in the treatment of various neurodegenerations, but to delve into the mechanisms of direct or indirect effect by this drug on the signaling pathways. MB can act as an alternative electron carrier in the mitochondrial respiratory chain in condition of disturbed electron transport chain. It can have anti-inflammatory and anti-apoptotic effects, inhibit monoamine oxidases (MAOs) and NO synthase, activate signaling pathways that provide renewal of the mitochondrial pool – mitochondrial biogenesis and autophagy, and prevent the aggregation of misfolded proteins. Understanding and comprehensive study of all aspects of the direct and indirect action of MB, and not just any one effect, can help in its further research, including at the clinical level.

Keywords: methylene blue, neurodegeneration, Alzheimer's disease, tau protein, alternative electron transport, Nrf2/ARE signaling pathway, apoptosis, autophagy, inflammation, monoamine oxidase, NO synthase