

**α -lipoehappe mõju vase metabolismile neuronaaelses rakukultuuri
mudelis**

Bakalaureusetöö

Anette Reinapu

Juhendajad:

Sigrid Kirss, MSc

Keemia ja biotehnoloogia instituut

Professor Peep Palumaa

Keemia ja biotehnoloogia instituut

Õppekava: Rakenduskeemia ja biotehnoloogia



Effects of α -lipoic acid on copper metabolism in neuronal cell culture

Bachelor's thesis

Anette Reinapu

Supervisors: Sigrid Kirss, MSc

Department of Chemistry and Biotechnology

Professor Peep Palumaa

Department of Chemistry and Biotechnology

Study program: Applied Chemistry and Biotechnology

Tallinn 2023

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Anette Reinapu

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendajad: Sigrid Kirss; Peep Palumaa

[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees:

[allkiri ja kuupäev]

Sisukord

Sissejuhatus	7
1. Kirjanduse ülevaade.....	8
1.1. Alzheimeri tõbi.....	8
1.2. Alzheimeri tõve metallobioloogia.....	9
1.2.1. Vase roll Alzheimeri tõve puhul	10
1.2.2. Vase ionofoorid.....	10
1.3. Teraapiad Alzheimeri tõve puhul.....	12
1.3.1. α -lipoehape	13
2. Töö eesmärgid.....	14
3. Materjalid ja meetodid	15
3.1. Teoreetiline kirjeldus	15
3.1.1. SH-SY5Y rakuliin	15
3.1.2. Ultra kõrge efektiivsusega vedelikkromatograafia	15
3.1.3. Propiidium jodiidi meetod	16
3.2. Eksperimentaalse töö kirjeldus.....	16
3.2.1. SH-SY5Y rakuliini kultiveerimine ja diferentseerimine	16
3.2.2. Ultra kõrge efektiivsusega vedelikkromatograafia meetod.....	17
4. Tulemused.....	20
4.1. Ultra kõrge efektiivsusega vedelikkromatograafia tulemused	20
4.2. Toksilisuse katse tulemused kasutades propiidium iodiidi meetodit.....	22
4.3. Immunotsütokeemia tulemused	30
5. Arutelu	32
Kokkuvõte	34
Abstract.....	35
Tänuavaldused	37
Lisad	38
Kasutatud kirjandus	39

Lühendite loetelu

A β – β -amüloid peptiid

ABD-F – 4-(aminosulfonüül)-7-floro-2,1,3-bensoksadiasool

AK – antikeha

APOE – apolipoproteiin E

APP – amüloid prekursorvalk

AT – Alzheimeri tõbi

Ats-AcOEt – atsetoon etüülatsetaat

BDNF – aju-päritolu neurotroofne faktor (ingl.k. *brain-derived neurotrophic factor*)

CQ - kliokinool

CTR1 – Cu transport proteiin 1

DETC - dietüülditiokarbaanhape

DHLA – diürolipoehape

DLAT – diürolipoüültransatsetülaas

D-PA – d-penitsillamiin

DMEM – rakusööde (ingl.k. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

FBS – veise loote seerum (ingl.k. *Fetal Bovine Serum*)

FDA – Ameerika Ühendriikide toidu- ja raviamet (ingl.k. *Food and Drug Administration*)

ITK - immunotsütokeemia

LA – α -lipoehape

PBS – fosfaatpuhverdatud soolalahus

PEST – penitsilliin ja streptomütsiin

PI – propiidium iodiid

PSEN1/2 – preseniliin 1/2

RA – retinoolhape

SOD1 – superoksiidi dismutaas 1

TCEP – tris(2-karboksüetüül)fosfiin

TFA - trifluoroäädikhape

UHPLC – ultra kõrge efektiivsusega vedelikkromatograafia (ingl.k. *ultra-high performance liquid chromatography*)

Sissejuhatus

Alzheimeri tõbi on levinuim progresseeruv neurodegeneratiivne haigus dementsuse tekkeks, mis mõjutab rohkem kui 55 miljonit inimest maailmas. Kuigi haigust on teatud juba üle sajandi, siis pole jätkuvalt leitud selle vastu efektiivset ravi. Haiguse tekkeks on püstitatud mitmeid erinevaid hüpoteese nagu amüloidse kaskaadi hüpotees, tau hüpotees või metalliioonide hüpotees, mille puhul on metalliioonide, nagu näiteks vase, homöostaas häiritud.

Metalliioonide homöostaasi häired võivad olla varajaseks protsessiks Alzheimeri tõve puhul ning see võib viia amüloidsete naastude tekkeni. Amüloidsed naastud on rakuvälised valgulised ladestused, mis moodustavad komplekse metalliioonidega, seeläbi tekib metalliioonide ülekaal rakuvälises keskkonnas ja defitsiit raku sees. Selle tõttu tuleks ennetada metallide homöostaasi häireid ja kasutada Alzheimeri tõve puhul ühendeid, mis suudavad viia olulisi metallioone, nagu vask, intratsellulaarsesse keskkonda.

α -lipoehape (LA) on looduslik ühend, mida esineb vähesel määral erinevates toitudes ja seda sünteesitakse ka mitokondrites. LA on võimeline läbima vere-aju barjääri ning sellel on võime nihutada vase tasakaalu rakusisese ruumi suunas tänu intratsellulaarsele dihidrolipoehappe vormile.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida LA võimet siseneda rakkudesse ning samuti uurida selle toksilisust vase juuresolekul. LA rakkudesse sisenemise on ajast, vase olemasolust ja LA kontsentratsioonist sõltuv protsess. Töö käigus võrreldi LA toksilisust teiste vase ionofooridega ja näidati, et see ühend pole nii toksiline kui teised. Lisaks viidi läbi immunotsütokeemiline eeluring, mille eesmärgiks oli uurida LA ja vase mõju rakkude morfoloogiale.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Alzheimeri tõbi

Alzheimeri tõbi (AT) on kõige levinuim dementsuse vorm, mida kirjeldas esimesena Alois Alzheimer 1906. aastal. AT on progressiivne neurodegeneratiivne haigus, mida põeb maailmas üle 55 miljoni inimese ning arvatakse, et see number kolmekordistub aastaks 2050 (Alzheimer Europe, 2021-2023). Haigus võib esineda 15 kuni 25 aastat ilma sümptomiteta kerge kognitiivse kahjustuse staadiumis (Scheltens et al., 2021), mille puhul tekivad varajased patoloogilised muutused hippokampuses ja korteksis, kuid need ei avalda veel tõsist mõju igapäevastes tegevustes. Varajase AT staadiumis tekivad patsiendil probleemid keskendumise, mälu ja emotsioonide valdamisega ning võib tekkida depressioon. Hilises AT faasis toimub mastaapne valguliste neurofibrillaarsete kämpude ja amüloidsete naastude akumulatsioon terves korteksis. See tekitab kognitiivseid häireid, põhjustab ka aksonite ja dendriitide kahjustusi ning sünapse kadu (Breijyeh & Karaman, 2020).

Amüloidsete naastud koosnevad peamiselt agregeerunud β -amüloidi peptiididest ($A\beta$) ning neurofibrillaarsed kämbud koosnevad mikrotoubulitega seotud valgust tau (Gouras et al., 2015). $A\beta$ peptiidid lõigatakse proteolüütiliselt transmembraanselt amüloid prekursorvalgust (APP) β - ja γ -sekretaaside poolt. APP on kodeeritud 21. kromosoomis paikneva APP geeni poolt, kus on leitud 30 mutatsiooni, millest 25 on seotud AT-ga ning põhjustavad $A\beta$ akumulatsioonist. Mutatsioonid APP geenis mõjutavad otseselt toksiliste $A\beta$ peptiidide tootmist (Li et al., 2019).

$A\beta$ peptiidid esinevad ajus erineva pikkusega, millest põhilised on $A\beta_{42}$ ja $A\beta_{40}$ ning mõlemad mõjutavad vastastikku teineteise agregatsiooni. $A\beta_{40}$ vormi esineb kordades rohkem, aga amüloidsete naastude moodustumises mängib toksilisemat rolli $A\beta_{42}$. On ka näidatud, et $A\beta_{40}$ vormi üle ekspresseerides, vähenes amüloidsete naastude patoloogia, kuna $A\beta_{40}$ seondub olemasolevate $A\beta_{42}$ agregaatidega (Gu & Guo, 2021). $A\beta$ monomeerid moodustavad nii lahustumatuid amüloidseid naastusid, kui ka lahustuvaid $A\beta$ oligomeere, mis võivad ajus levida (Armstrong & Armstrong, 2009). Lahustuvaid oligomeere peetakse AT puhul toksilisemaks, kuna lahustuv $A\beta$ võib seonduda ekstratsellulaarselt paljude molekulidega, sealhulgas ka metallioonidega, rakupinnal olevate retseptoritega ja rakumembraanidega (G. F. Chen et al., 2017). $A\beta$ patoloogiat põhjustavad ka mutatsioonid geenis preseniliin (PSEN1/2). Mutatsioonid PSEN1 geenis põhjustavad $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ suhte tõusu $A\beta_{40}$ taseme alandamise kaudu (Kelleher & Shen, 2017). Mutatsioonid geenis PSEN2 esinevad palju harvem ja need võivad mängida rolli $A\beta$ ja tau agregatsioonis (Cai et al., 2015).

AT valdkonnas esineb ka hüpotees, mille kohaselt $A\beta$ agregeerumine on vanusest sõltuv reaktsioon liigsete metallioonidega (vask, raud, tsink) ajus, mis indutseerib peptiidide sadestumist ja viib amüloidsete naastude tekkeni (Maczurek et al., 2008). Toksiliste $A\beta$ peptiidide tootmine ning amüloidsete naastude teke viib omakorda edasi neurofibrillaarsete kämpude moodustumiseni (Breijyeh & Karaman, 2020).

Neurofibrillaarsed kämbud on ebanormaalsed hüperfosforüleeritud tau valgu filamendid, mis suudavad üksteise ümber keerduda ning seeläbi moodustada helikaalseid filamente ja akumulēeruda

aksonites ja dendriitides. Rakusisesed kämbud põhjustavad närvikahjustusi, kuna tekivad suured tau valgu filamendid, millel on osaline resistentsus proteolüüsi suhtes. Tekkiv närvikahjustus hõlmab endas kahjustusi aksonaalses transpordis, tekitab kahjustusi mitokondrites ja oksüdatiivset stressi. Sünaptilistesse aladesse tekkinud neurofibrillaarsed kämbud ning $A\beta$ akumulatsioon põhjustavad lõpuks dendriitide ja neuronite hävimist ning presünaptiliste alade kadu (Breijyeh & Karaman, 2020).

AT peamine geneetiline riskitegur on apolipoproteiin E (ApoE), mis mõjutab $A\beta$ toksilisust (Gouras et al., 2015). ApoE on glükoproteiin, mida ekspresseeritakse maksas ning ajus astrotsüütides. ApoE on retseptor vahendatud endotsütoosi ligand lipoproteiini osakeste jaoks, mis on oluline müeliini produtseerimiseks ning aju normaalseks tööks. APOE geen paikneb 19. kromosoomis ning sellel on 3 isovormi, ApoE2, ApoE3 ja ApoE4. ApoE4 mängib olulist rolli $A\beta$ ladestumises ning sellel on ka roll aju veresoonte kahjustustes (Breijyeh & Karaman, 2020; Kim et al., 2009). Inimestel, kes omavad ühte ApoE4 alleeli, on suurem tõenäosus AT kujunemiseks kui neil, kellel see alleel puudub (X. F. Chen et al., 2013).

AT on multifaktoriaalne haigus, mis hõlmab endas nii geneetilisi kui ka keskkonnamõju tegureid, aga selle täpne tekkepõhjus pole siiani kindlaks tehtud (Passeri et al., 2022). Riskifaktoriteks on arvatud ka vanust, sugu, infektsioone, peavigastusi, veresoonehaigusi ning keskkonnamõju tegureid. Haiguse tekkeks on erinevaid hüpoteese, aga neist põhiliseks on amüloidse kaskaadi hüpotees (Hardy & Higgins, 1992). Amüloidse kaskaadi hüpoteesi alusel põhjustavad ekstratsellulaarse $A\beta$ valesi voltumine ja akumulatsioon tau rakusisest ladestumist ja neurotoksisust. AT puhul on uuritud mitmeid erinevaid terapeutilisi võimalusi, aga siiani pole leitud efektiivset ravi (Passeri et al., 2022).

1.2. Alzheimeri tõve metallobioogia

Metalliioonid on tähtsad makro- ja mikroelemendid nii struktuurses kui ka funktsionaalses rollis. Nad osalevad intra- ja ekstratsellulaarsetes reaktsioonides, säilitavad elektrilaenguid ja osmootset rõhku, osalevad fotosünteesil ja elektronide ülekandeprotsessides. Samuti on metalliioonid olulised lihaskude, närvikude ja südame normaalseks toimimiseks ning hapniku transpordiks (Moustakas, 2021). Metallioonid on lisaks kõigele sellele olulised ka mitmete funktsioonide täitmiseks ajus. Nende tasakaalu muutus ajus võib olla aga vastutav kahjustuste eest, mis viivad neuraalsete rakkude apoptoosini (Sales et al., 2019). Alzheimeri tõve põdevatel patsientidel on tavapärane metalliioonide tasakaal muutunud ning seda on seostatud $A\beta$ peptiidide ladestumisega ja tau akumulatsiooniga (Wang et al., 2020). Peptiidide akumulatsioon koos metalliioonidega nagu vask, raud ja tsink põhjustab omakorda reaktiivsete hapniku radikaalide teket ja oksüdatiivset stressi (Sales et al., 2019).

Raua ebanormaalne tasakaal ajus võib olla põhjuseks mitmetele neurodegeneratiivsetele haigustele. Kõrge rauasisalduse toksilisuse põhjuseks on peamiselt kahjustavate hüdroksüülradikaalide teke. Kõrgenenud raua tase on AT puhul seostatud amüloidnaastude ja tau patoloogiaga, kus raua seondumine $A\beta$ või tau valguga tekitab suurenenud neurotoksisust. Raud võimendab ka APP translatsiooni ja $A\beta_{42}$ tootmist (Wang et al., 2020).

Tsink on asendamatu mikroelement, mis on oluline paljude valkude struktuurse või funktsionaalse elemendina. Samuti osaleb tsink DNA sünteesis, aju arengus ning neurotransmissioonil. Ajus on Zn^{2+} ioonid seotud valkudega või hoiustatud vesiikulitesse vabas olekus. Tsink kontsentratsiooni muutus võib esile kutsuda erinevaid haigusi (Xu et al., 2019). Nii tsütoplasmaatilise tsingi kontsentratsiooni tõus kui ka langus on seotud AT-ga ning viitab sellele, et intratsellulaarne tsink peab olema tugevalt reguleeritud. Tsingi seondumine $A\beta$ -ga vähendab selle lahustuvust, suurendades $A\beta$ agregatsiooni ja toksilisust neuronitele (Wang et al., 2020).

1.2.1. Vase roll Alzheimeri tõve puhul

Kõik rakud kehas vajavad vase ioone metaboolsete reaktsioonide läbiviimiseks. Vask on vajalik vaskensüümidele nagu superoksiidi dismutaas 1 (SOD1) ja tsütokroom C oksüdaas (Lei et al., 2021). Vase tase rakkudes ja kudedes peab olema rangelt kontrollitud, sest nii vase puudus (Menkese tõbi) kui ka kõrge vase tase (Wilsoni tõbi) on organismile kahjulikud (Gupta & Lutsenko, 2009). Vase homöostaasi tagamine on rakkudes tugevalt kontrollitud erinevate valkude komplekside poolt, kuhu kuuluvad vaskensüümid, vase šaperonid ja membraanseotud transporterid. Need valgud töötavad koos, et reguleerida vase importi, eksporti ja intratsellulaarse vase kasutust (L. Chen et al., 2022).

Enamiku vase rakkudesse toomisel osaleb kõrge afiinsusega vase transport valk CTR1. CTR1 transpordib rakku Cu^+ vormi ning seejärel antakse see edasi tsütosoolsetele vase šaperonidele nagu näiteks CCS (vase šaperon, mis toimetab Cu^+ SOD1-le) ning vask transporditakse spetsiifiliste valkudeni (L. Chen et al., 2022).

Vase kontsentratsioonid AT patsientide aju kudedes on madalamad võrreldes tervetega ning sellega kaasneb ka vase valkude kontsentratsiooni langus. Samaaegselt esineb liigne vase kontsentratsioon ekstratsellulaarses alas. Rakusisene vase puudus võib põhjustada $A\beta$ tootmist, samas kui liigne ekstratsellulaarne Cu^{2+} võib aga soodustada $A\beta$ sadestumist. Selle tõttu poleks abi lihtsalt vase kontsentratsioonide alandamisest ega tõstmisest, vaid abi võiks olla vase tasemete normaliseerimisest (Lei et al., 2021). Vase ja $A\beta$ oligomeeride kompleksid on võimelised tungima neuronitesse ja vallandama oksüdatiivset stressi. AT puhul on uuritud nii vase taseme tõusu amüloidsete naastude arvelt kui ka vase kontsentratsiooni langust, mille puhul vase sisaldus ajukoos, otsmikukoos, mandelkehas ja hipokampus vähenes kuni 50% võrra võrreldes kontrolliga (Wang et al., 2020). Vase liig võib alandada ka aju võimet vabaneda $A\beta$ peptiididest. Vask võib samuti mõjutada tau valgu fosforüleerimist ja agregatsiooni, suurendades sellega neurotoksisust. (L. Chen et al., 2022).

1.2.2. Vase ionofoorid

AT korral võib olla abiks täiendav vase omastamine ajus, kuna see parandaks ajurakkudes olevat vase puudust, mis tuleneb vanusest ja AT patoloogiast. Selline täiendav vase omastamine ja ekstratsellulaarse vase viimine tagasi rakku on võimalik vase ionofooride abil, mis võivad normaliseerida metalliioonide tasakaalu (Lei et al., 2021).

Elesclomol

Elesclomol on vase ionofoor ning vähivastane ravim, mis mõjutab mitokondriaalset metabolismi ning indutseerib kuproptoosi, mis on uudne vask-sõltuv raku degradatsiooni rada (Tsvetkov et al., 2022). Elesclomol suudab transportida ekstratsellulaarset Cu^{2+} raku mitokondritesse, kus see akumuliseerub ning võib indutseerida oksüdatiivset stressi ja kuproptoosi. Mitokondris indutseerib ensüüm FDX1 üleminekut Cu^{2+} vormist toksilisemasse Cu^+ vormi, mis seondub lipoüleeritud dihidrolipouültransatsetülaasiga (DLAT) ja soodustab omakorda kuproptoosi. Vase tase raku tõiuse pärast ravi elesclomoliga, kuid võib tekkida ka kuproptoos, sest vase tase mitokondrites tõiuse liiga kõrgele muutudes toksiliseks (Zheng et al., 2022; Tsvetkov et al., 2022).

Kliokinool

Kliokinool (5-kloro-7-jodokinoliin-8-ool, CQ) on vase ja tsiingi ionofoor, mis suudab interakteeruda metallioonidega ning seda on uuritud AT ühe võimaliku ravivariandina. Hiire AT mudelitel on näidatud, et CQ suudab vähendada amüloidnaastude teket ning 2001. aastal tõestati, et CQ lahustab $A\beta$ ladestusi surmajärgses inimkoos. Samuti on leitud, et CQ indutseerib autofaagiat või suudab peatada autofaagia tagasi pöörata. Seda efekti on seostatud CQ ionofoorsete omadustega (Perez et al., 2019). Veel on näidatud hiiremudelitel, et CQ suudab transportida ekstratsellulaarset Cu^{2+} ja Zn^{2+} intratsellulaarsesse keskkonda ja parandada sellega AT sümptomeid. Siiski on ka tõestatud SH-SY5Y rakkudel, et CQ pärsib rakkude kasvu rakutsükli peatamise ja autofaagia kaudu (Lv et al., 2020).

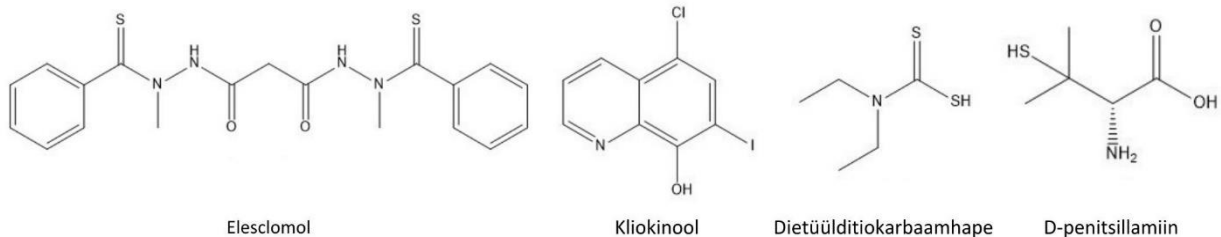
Dietüülditiokarbaamhape

Dietüülditiokarbamaat (DETC) on kasutusel tööstustes, põllumajanduses ja meditsiinis ning see on tuntud metalli ionofoor vase puhul, suutes moodustada komplekse Cu^+ ionidega. Seda on kasutatud vase toksilisuse vähendamiseks ja Wilsoni tõve raviks. Loomkatsetel ja *in vitro* on aga näidatud, et ditiokarbamaadid on neurotoksilised. Toksilisuse põhjuseks võib olla selle võime kelaatida metalle ja/või selle tõttu tekkinud muutuste mõju rakkudele. DETC suudab läbida rakumembraani ja tõsta drastiliselt intratsellulaarse vase kontsentratsiooni, häirides sellega vase homöostaasi. See võib omakorda põhjustada oksüdatiivset stressi vabade hüdroksüüli radikaalide tootmise kaudu ja võib häirida ka vasest sõltuvaid ensüümreaktsioone (Cheng & Trombetta, 2004).

D-penitsillamiin

D-penitsillamiin (D-PA) on tuntud kui vaske siduv ühend, mida on uuritud Wilsoni tõve raviks. D-PA suudab siduda vase ioone ja seeläbi vähendada vase kontsentratsiooni kehas. Samuti on D-PA mõju uuritud AT patsientide puhul, kus see vähendas oksüdatiivset stressi. Vaatamata sellele, et D-PA suudab edukalt vabaneda üleliigsest vasest kehas, on ka tõestatud, et D-PA mõjutab reaktiivsete hapniku ühendite teket läbi Cu^{2+} redutseerimise Cu^+ vormi (Abolaji et al., 2020).

Kõikide kirjeldatud ionofooride molekulaarvalemid on toodud joonisel nr 1.



Joonis 1. Vase ionofooride keemilised molekulaarvalemid. Valemite koostamiseks kasutati ChemDraw tarkvara.

1.3. Teraapiad Alzheimeri tõve puhul

Üle sajandi on teatud AT olemasolust, aga siiani pole selle vastu leitud efektiivset ravi. Kliinilistes uuringutes on läbi aastate töötatud mitmete ravistrateegiatega. Viimase aastakümne jooksul on ravi leidmise fookus suunatud lahustuvatele $A\beta$ oligomeeridele, mis näib olevat toksilisem $A\beta$ vorm. Siiski loodud ravimeetodid on peamiselt sümptomite raviks, mitte haiguse täielikuks ennetamiseks või raviks (Passeri et al., 2022).

Sümptomeid leevendavad ravimeetodid piiravad dementsuse sümptomite progresseerumist. Väljatöötatud ja kasutuses olevad ravimid (donepezil, memantine, galantamine, rivastigmine) jagunevad kahte gruppi: atsetüülkoliini esteraasi inhibiitorid ja anti-glutamiinergilised ained. Atsetüülkoliini esteraasi inhibiitorid suurendavad neuromediaatori atsetüülkoliini taset ajus. Anti-glutamiinergilised ained reguleerivad glutamaadi taset ajus, mille kõrge tase võib põhjustada neuronite surma. Tõhusate ravimeetodite puudumine ja raskused varajases staadiumis AT diagnoosimisel viitavad vajadusele ennetavate ravimeetodite väljatöötamiseks, et aeglustada neurodegeneratiivset protsessi (Passeri et al., 2022).

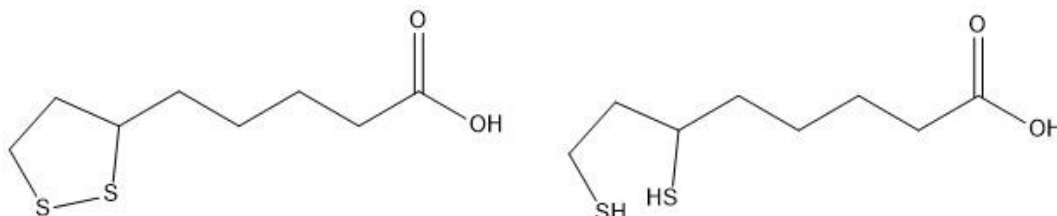
AT puhul on uuritud nii metalliioonide kontsentratsiooni vähesust, nende liiga kui ka valesti paiknemist ning patsientidel on läbi viidud mitmeid kliinilisi uuringuid metalliioonide kelaatimise või moduleerimise eesmärgiga (Wang et al., 2020). AT raviks sobivad kelaativad reagentid peavad olema selektiivsed, madala molekulmassiga, võimelised kinni püüdma vaba redoksaktiivset metalliiooni ning takistama reaktiivsete hapniku radikaalide teket. Üheks võimalikuks ravi variandiks on olnud 8-hüdroksükinioliini derivaat CQ, mis on võimeline läbima vere-aju barjääri, vähendama $A\beta$ peptiidide taset ja taastama metallide homöostaasi. Samuti näib see ühend soodustavat vase- ja tsingiioonide sisenemist rakkudesse. Siiski põhjustas pikaajaline CQ kasutus neuroloogilisi kõrvalmõjusid nagu müeliini kaotust. Veel üheks võimalikuks ravi variandiks on olnud teise põlvkonna 8-hüdroksükinioliini derivaat PTB2, mis on võrreldes CQ-ga väiksemate kõrvalmõjudega, kergemini sünteetisav, kuid samuti suurema lahustuvusega, mis suurendab vere-aju barjääri läbimisvõimet. AT ravi kliinilises faasis ei näidanud see ühend siiski märkimisväärset $A\beta$ kontsentratsioonide vähenemist ega raviefekti (Sales et al., 2019). Kuna nii CQ kui ka PTB2 on sünteetilised ühendid ning pigem toksilised, siis on välja pakutud ka looduslike ühendeid, et normaliseerida vase metabolismi AT puhul.

AT ravi puhul kasutatakse ka $A\beta$ vastaseid antikehasid. Aducanumab on 2021. aastal FDA poolt heaks kiidetud AT ravim. See on inimese monoklonaalse antikeha tüüp, mis suudab selektiivselt interakteeruda nii $A\beta$ lahustuva kui ka $A\beta$ lahustumatu vormiga. See oli esimene ravi variant, mis tõestas, et $A\beta$ eemaldamine parandab kliinilist tulemust (Yang & Sun, 2021). Teiseks sellise toimemehhanismiga ravimiks on FDA poolt 2023. aastal heaks kiidetud lecanemab. See on monoklonaalne antikeha, mis suudab interakteeruda lahustuva $A\beta$ vormiga ja vabaneda sellest. Ravi lecanemabiga 18 kuu jooksul on näidanud tõhusat $A\beta$ hulga vähenemist ajus (Knopman, 2023).

1.3.1. α -lipoehape

AT puhul on paljulubavaks ühendiks looduslik α -lipoehape (LA). Seda sünteesitakse mitokondrites ja teda leidub ka vähesel määral erinevates toitudes (Dieter et al., 2022). LA moodustab kovalentseid sidemeid valkudega ning ta on ensüümide kofaktoriks, osaledes glükoosi ja lipiidide metabolismis ning reguleerib geenide transkriptsiooni. Samuti kõrvaldab see raskmetalle vereringest, mis põhjustavad oksüdatiivset stressi (Salehi et al., 2019).

LA on amfifiline ning on võimeline läbima vere-aju barjääri, samuti sisaldab see ühend kahte tiolrühma (joonis 2) (Dieter et al., 2022). LA redutseerunud vorm dihüdroliipoehape (DHHLA) esineb rakusiseses keskkonnas, kus tal on võime siduda Cu^+ vormi, mis võimaldab nihutada vase tasakaalu ekstratsellulaarsest intratsellulaarsesse keskkonda (Metsla et al., 2022).



Joonis 2. Lipoehappe ja dihüdroliipoehappe struktuurvalem. Valemite koostamiseks kasutati ChemDraw tarkvara.

Metalli kelaatoritega teraapia üheks kõrvalmõjaks on metalle sisaldavate ensüümide nagu insuliini lagundava ensüümi või SOD1 inhibeerimine. On uuritud LA ja DHHLA mõju selliste ensüümide aktiivsusele ning leitud, et isegi millimolaarsetes kontsentratsioonides LA või DHHLA ei alandanud nende ensüümide aktiivsust (Maczurek et al., 2008).

LA-d on kasutatud Saksamaal diabeetilise polüneuropaatia raviks üle 30 aasta ning LA-d on testitud ka AT puhul. Siiski on vajadus täiendavateks uuringuteks, et kinnitada LA sobivust AT ja sellega seotud dementsuse pidurdamiseks (Maczurek et al., 2008).

LA-d sünteesitakse kehas väikestes kogustes, mistõttu on oluline tarbida LA-d lisandina, et saavutada terapeutilist efekti. Mitmed uuringud on näidanud LA terapeutilist toimet 300-1800 mg dooside puhul päevas, manustatuna kolm kuni neli aastat. On ka näidatud, et LA manustamine 600 mg päevas kuue kuu jooksul on ohutu ning tõhus, vähendades reaktiivsete hapniku radikaalide taset (Mendoza-Núñez et al., 2019).

2. Töö eesmärgid

- 1) Uurida LA võimet siseneda diferentseeritud SH-SY5Y rakkudesse;
- 2) Uurida LA toksilisust vase juuresolekul ning võrrelda seda teiste vase ionofooridega kasutades diferentseeritud SH-SY5Y rakke ja propiidium iodiidi meetodit;
- 3) Uurida vase ja LA mõju SH-SY5Y rakkude tsütoskeletile kasutades rakkude immuunotüstoemia meetodit.

3. Materjalid ja meetodid

3.1. Teoreetiline kirjeldus

3.1.1. SH-SY5Y rakuliin

SH-SY5Y inimese neuroblastoomi rakuliin on laialt kasutatav *in vitro* mudel uurimaks neurotoksilisust. SH-SY5Y rakuliin on kolmas subgenoom SK-N-SH rakuliinist, mis saadi neuroblastoomi põdeva patsiendi luuüdi biopsia protseduuril. SH-SY5Y oli esmalt deponeeritud 1970. aastal June L. Biedler'i poolt ATCC-le (American Type Culture Collection) (Kovalevich & Langford, 2013).

SH-SY5Y rakuliini diferentseerimata olekus kasvavad rakud heterogeenselt ja sageli klompidena ning kiirelt paljunedes. Diferentseerumisel retinoolhapet (RA) ja aju päritolu neurotroofse faktori (ingl.k. *brain-derived neurotrophic factor* – BDNF) abil muutub rakuliin läbi erinevate mehhanismide neuroblasti taolisest olekust homogeenseks neuronilaadseks kultuuriks (Krishtal et al., 2019). RA suudab SH-SY5Y rakuliinis esile kutsuda diferentseerumist ning selle aine mõjudes moodustavad rakud neuriite ning omandavad neuronilaadse fenotüübi (*Cell Line Profile*, n.d.). Samuti muudab RA rakud BDNF'i jaoks vastuvõtlikumaks, BDNF aga aktiveerib ekstratsellulaarsed signaaliga reguleeritud kinaasid ja fosfoinositiidi 3-kinaasid, mis vahendavad neurogeneesi ja rakkude ellujäämist (Jämsä et al., 2004).

3.1.2. Ultra kõrge efektiivsusega vedelikkromatograafia

Kromatograafiat kasutatakse lahutamaks uuritavate ainete segude komponente. Ultra kõrge efektiivsusega vedelikkromatograafia (UHPLC) on täiustatud variant võrreldes HPLC-ga, mis võimaldab saavutada kõrgemat kromatograafilist lahutusvõimet ja lühendada ka kromatograafia tööaegu. UHPLC puhul kasutatakse ka väiksema diameetriga kolonni ja see töötab suuremal rõhul kui HPLC (Kaufmann, 2020).

HPLC puhul on kasutuses mitmed erinevad kolonnid. Pöörfaasi HPLC puhul liidetakse hüdrofoobne faas ränidioksiidi maatriksile ning selle puhul on kasutuses C₄, C₈, ja C₁₈ kolonnid. C₁₈ kolonn on tavaliselt eelistatud peptiidide ja väiksemate valkude jaoks (<5000 daltonit) ning selle kolonniga on ka väiksed orgaanilised ained kõige paremini lahutatavad (Carr, 2002).

Töös kasutatud UHPLC instrument:

Shimadzu UHPLC koosnes kahest LC-30AD pumbast, kasutati ka CBM-20A süsteemi regulaatorit, autosamplerit (SIL-30AC) ja degaseerijat (DGU-20A_{5R}). Pööratud faasi kromatograafia analüütiline kolonn oli Kinetex 2.6u C18 100A (150 mm x 4,6 mm i.d.; Phenomenex). Kolonni hoiti 40°C juures kolonni ahjuga CTO-20AC (Shimadzu). Väljavool oli kontrollitud SPD-20A UV/Vis ja RF-20A_{XS} fluorents detektoritega, mille ergastus oli seadistatud 380 nm ja emissioon 510 nm juurde. Eluentidega voolutati 30 minutit lineaarses gradiendis 0 – 50 % B, kasutades H₂O-CH₃CN (5:95) (A) ja H₂O-CH₃CN (95:5) (B)

lahuseid, mis sisaldasid 0,1% trifluoroäädikhapet (TFA). Voolukiiruseks oli 0.5 ml/minutis. Piikide pindalad arvutati kasutades LabSolutions tarkvara 5.42 versiooni (Shimadzu).

3.1.3. Propiidium jodiidi meetod

Propiidium iodiid (PI) on DNA interkalaator, mis suudab seostuda DNA-le. PI on etiidium bromiidi struktuurne pikem analoog, mis omab kvaternaarseid ammooniumrühma sisaldavat kõrvalahelat. See muudab PI molekuli kahekordselt laetuks (Banerjee et al., 2014). PI võime raku siseneda sõltub membraani läbilaskvusest. PI ei sisene elus ega ka varjasse apoptootilisse raku, kuna sellistel rakkudel on plasmamembraan terve. Apoptootiliste rakkude plasma- ja tuumamembraani terviklikkus väheneb ja see võimaldab membraani läbimist ning punase fluorestsentsi teket (Rieger et al., 2011).

3.1.4. Immunotsütokeemia

Immunotsütokeemia (ITK) on meetod, mis võimaldab identifitseerida valke ja teisi makromolekulaarseid komponente rakkudes. Meetod põhineb spetsiifiliste antikehade (AK) kombinatsioonidel, millele on lisatud fluorestsentsmärgis (Burry, 2011). ITK puhul on oluline fikseerimise etapp, et hoida ära autolüüsi ja säilitada morfoloogiat. Enne AK-de pealekandmist tuleb läbi viia blokeerimine, millega välditakse nende ebaspetsiifilist sidumist. Uuritavate valkude AK-dega märgistamiseks kasutatakse kas primaar- (otsene) või sekundaarmärgistamise (mitteotsene) meetodit. Otsese meetodi puhul on primaarne AK liidetud fluorestsentsmärgisega ning see seondub oma sihtmärkepitoobile lisaetappide vajaduseta. Selle meetodi negatiivseks küljeks on suur AK-de maksumus. Mitteotsene immunovärvimise meetod hõlmab endas kaheetapilist inkubatsiooniprotsessi, mille käigus seondub primaarne AK sihtmärkepitoobile ning seejärel seondub fluorestsentsmärgisega sekundaarne AK primaarsele. Mitteotsese märgistamise meetodi puhul peaks primaarne AK pärinema erinevast liigist kui valim, ning sekundaarne AK peab olema primaarse antikeha peremeesliigi vastu. Kombineerides primaarsed ja sekundaarsed AK-d, saab märgistada mitut (reeglina 2-3) sihtmärki (Im et al., 2019).

3.2. Eksperimentaalse töö kirjeldus

3.2.1. SH-SY5Y rakuliini kultiveerimine ja diferentseerimine

SH-SY5Y rakuliini kasvatati inkubaatoris 37°C ja 5% süsinikdioksiidi juures Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) söötmes, kuhu oli lisatud Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco) ning penitsilliin ja streptomütsiin (PEST) (Gibco). Rakkude sööde vahetati iga 2-3 päeva tagant ja rakud jagati 5-7 päeva järel maksimaalselt 20 korda.

Rakuliini diferentseerimine toimus järgneva protokollil alusel: esimesel päeval istutati rakud vajamineva süvikute arvuga plaatidele DMEM söötmes. Teisel ja neljandal päeval teostati söötme vahetus, kuhu oli lisatud 10 µM RA. Kuuendal päeval vahetati sööde seeriumivaba DMEM vastu, kuhu oli lisatud 50 ng/ml BDNF.

Vastavalt läbiviidavale katsele, jagati rakke plaatidele tabel nr 1 alusel. Rakkude õige tiheduse leidmiseks kasutati Countess Automated Cell Counter instrumenti (Invitrogen) ning rakkude lugemiseks trüpaansinist. 10 µl trüpaansinisele lisati 10 µl rakususpensiooni, mis suspendeeriti ning sellest viidi omakorda 10 µl lugemisplaadile.

Tabel 1. Plaadid rakkude kasvatamiseks ning rakkude algtihedus vastavalt läbiviidavale katsele.

Katse	Plaat rakkude kasvatamiseks	Rakkude algmaht süvikus
UHPLC	6 süvikuga plaat	2×10^5 rakku/süvik
Toksikoloogia	96 süvikuga plaat	$1,5 \times 10^4$ rakku/süvik
Immunotsütökeemia	24 süvikuga plaat	1×10^5 rakku/süvik

3.2.2. Ultra kõrge efektiivsusega vedelikkromatograafia meetod

Proovide kandmine rakkudele

UHPLC meetodiga uuriti LA võimet siseneda rakkudesse kolmel ajapunktil – 2 tundi, 5 tundi ja 24 tundi. Peale diferentseerimist inkubeeriti rakke vastavalt erinevatele ajapunktidele kontroll söötmes, söötmes kuhu oli lisatud 20 µM LA või 50 µM LA ning söötmes kuhu oli lisatud 20 µM LA või 50 µM LA koos 5 µM CuCl₂-ga.

Proovide kogumine

Proove koguti kolmel ajapunktil järgneva protokollil alusel: rakud pesti süvikutes oleva söötmega lahti ning koguti kogu rakususpensioon 2 ml katsutitesse. Rakususpensiooniga katsuteid tsentrifuugiti 1 minut 6708 x g juures. Põhja sadenenud rakkudelt koguti 60 µl söötmeproovi uude 1,5 ml katsutisse, ülejäänud sööde eemaldati rakkudelt vaakumiga. Rakkude pesuks lisati 500 µl fosfaatpuhverdatud soolalahust (PBS) (SIGMA), segati vortexil ning tsentrifuugiti uuesti 1 minut 6708 x g juures. Rakkude pesu PBS-ga korrati kaks korda. Enne viimast PBS-ga rakkude tsentrifuugimist määrati rakkude kogus ülaltoodud protokollil alusel. Peale viimast PBS-ga pesu kanti rakkudele 60 µl MQ ja kogu rakususpensioon tõsteti PCR tuubidesse ning nii söötme- kui ka rakuproovid säilitati -80°C juures.

Proovide töötlus

Külmutatud proovid sulatati üles ning PCR-tuubides olevaid rakuproove sonikeeriti BioRuptor Pico instrumendiga (Diagenode) 30 sekundit heli, 30 sekundit paus, 15 kordust. Sonikeeritud rakuproovid tõsteti täies mahus PCR-tuubidest 1,5 ml katsutitesse.

Proovide töötamise meetod on kohandatud ja välja töötatud artikli (Satoh et al., 2007) alusel. Nii söötme- kui ka rakuproovide edasine töötlus käis järgneva protokollil alusel: LA taandamiseks lisati proovidele 10 µl 160 mM TCEP (ACROS ORGANICS) lahust ning inkubeeriti 10 minutit. Seejärel

hapestati proovid 1 µl TFA-ga (Fisher Scientific) ning inkubeeriti 5 minutit. Järgmiseks lisati proovidele 60 µl atsetoon etüülatsetaadi (Ats-AcOEt) 50/50 segu, proove segati vortexil ning tsentrifuugiti 5 minutit 21000 x g. Peale tsentrifuugimist koguti uutesse katsutitesse proovidele tekkinud pealne kiht. Ats-AcOEt lahuse lisamine, tsentrifuugimine ja pealse kihi kogumine viidi läbi kolm korda. Uutesse katsutitesse kogutud proovid kuivatati eksikaatoris. Kuivanud proove lahustati üles 60 µl STB lahuses ja segati vortexil. Seejärel lisati proovidele 10 µl 160 mM TCEP taandajat, inkubeeriti 10 minutit. Järgmiseks lisati proovidele 10 µl 40 mM ABD-F (Tokyo Chemical Industry) fluorentsümärgist ning inkubeeriti samuti 10 minutit. Proovid segati vortexil ning tsentrifuugiti 10 minutit 21000 x g juures. Kui peale tsentrifuugimist esines proovides sadet, siis tõsteti 70 µl uutesse katsutitesse ning korrati tsentrifuugimist. Lõpuks pipeteeriti 60 µl proovi HPLC tuubidesse.

3.2.3. Vase toksilisuse määramine

Proovide kandmine rakkudele

Diferentseeritud rakke inkubeeriti 0-1000 µM CuCl₂ söötmes koos erinevate vaske siduvate ühenditega tabel nr 2 alusel 24 tundi 37°C juures. Proovidele lisati 1 mM glütsiini, mis hoiab vaske paremini lahuses. LA ja CQ lahustati etanoolis kontsentratsiooniga 100 mM, millest tehti edasised lahjendused. Etanooli lõppkontsentratsioon proovides oli alla 1%.

Tabel 2. Töös kasutatud vaske siduvad ühendid ja nende kontsentratsioonid katsetes.

Kasutatud ühend	Kontsentratsioon
α-lipoehape	50-600 µM
Dietüülditiokarbaamhape	1-200 µM
Kliokinool	5-100 µM

Peale 24 tundi lisati proovidele PI (Fluka) lahus lõppkontsentratsiooniga 0,5 mM. PI lahusel lasti inkubatsioonikapis toimida 10 minutit, peale mida mõõdeti fluorestsents. Tulemuste mõõtmisel kasutati TECAN Genios Pro microplate reader aparati, mis mõõtis PI-st tulenevat fluorestsents signaali, mille ergastus oli seadistatud 540 nm ja emissioon 612 nm juurde.

3.2.4. Immunotsütokeemia

Rakkude immunovärvimiseks kasvatati rakke kaevudesse asetatud steriilsetel ja kollageeniga (CORNING) ettevalmistatud alusklaasidel. Diferentseerimata rakkudega viidi läbi eelkatse, mille käigus pildistati töödeldud rakke. Rakke inkubeeriti 24 tundi kõikide proovidega: kontroll, 20 µM LA ilma ja koos 5 µM CuCl₂-ga, 50 µM LA ilma ja koos 5 µM CuCl₂-ga.

Rakkude fikseerimine ja immunovärvimine toimus järgneva protokolliga alusel: rakkudelt eemaldati sööde ja rakke pesti PBS lahusega jää, et vältida rakkude apoptoosi ning valkude denaturatsiooni. PBS

eemaldati ning rakud fikseeriti 4% PFA-ga inkubeerides toatemperatuuril 15 minutit. Seejärel pesti rakke kahel korral PBS lahusega 5 minutit. Raku membraani permeabiliseeriti PBS ja 0,1% TritonX-100 lahusega 5 minuti jooksul, millele järgnes kaks PBS-ga pesu toatemperatuuril roteerides. Rakud blokeeriti 1% BSA lahusega 45 minuti jooksul toatemperatuuril. Primaarse AK lahusega inkubeeriti rakke 60 minutit. Tubuliini vastu kasutati primaarse antikehana hiire anti-beta III tubuliini AK (Abcam), mis oli 1% BSA lahuses 2000 korda lahjendatud. Peale inkubeerimist viidi läbi 3 pesu PBS-ga. Seejärel inkubeeriti rakke toatemperatuuril sekundaarse AK-ga 60 minutit. Töös kasutati sekundaarse antikehana Alexa Fluor 488 kitse antikeha hiire vastu (Invitrogen), mis oli 50 korda lahjendatud 1% BSA lahuses. Rakke pesti PBS-ga kolm korda toatemperatuuril. Seejärel kasteti alusklaasid MQ vette, eemaldati liigne vesi ja lasti õhu käes kuivada ning klaasidele asetati Fluoromount-G™ DAPI-ga (invitrogen). Klaase säilitati kuni analüüsini pimedas 4 °C juures. Rakke analüüsiti laser konfokaalmikroskoobil Zeiss LSM 900 63 x õliimmersiooni abil ja saadud pildid analüüsiti Zen Blue (Zeiss) ja Fiji (ImageJ, NIH) programmide abil. Mikroskopeerimisel oli ergastus seadistatud 493 nm ja emissioon 517 nm juurde.

3.2.5. Statistiline analüüs

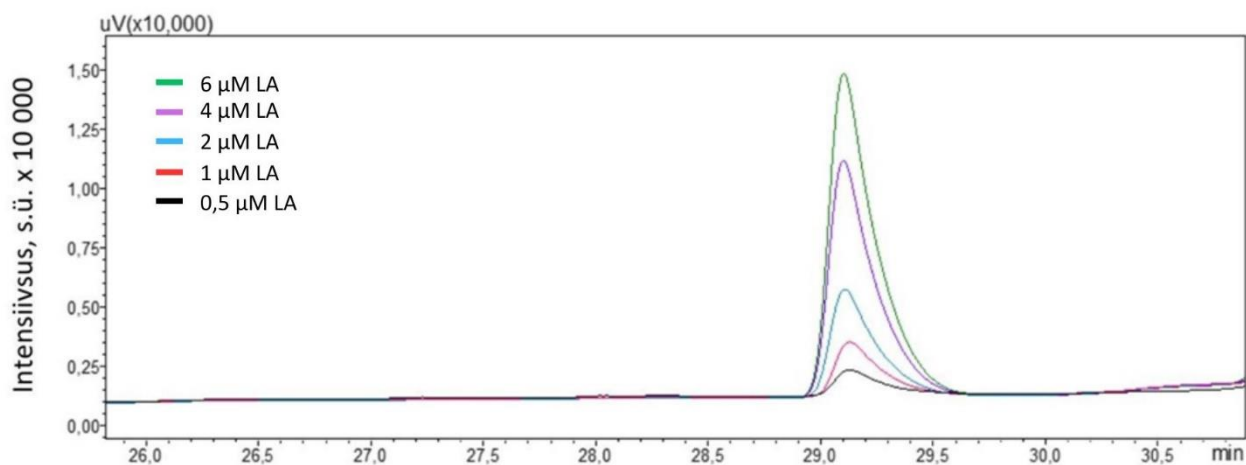
Toksikoloogia katsete analüüsiks viidi läbi statistiline analüüs GraphPad Prism versioon 9 tarkvara abil. Teostati one-way ANOVA test, millele järgnes Dunnett-I mitmekordne võrdlus. Immunotsütokeemia eelkatse analüüsiks kasutati Fiji (ImageJ, NIH) programmi, kus igast vaateväljast tehtud pildilt mõõdeti kõikide rakkude intensiivsus. Mõõdetud rakkude fluorestsentsi intensiivsusest lahutati taustamüra väärtus. GraphPad Prism tarkvara abil teostati samuti one-way ANOVA test, millele järgnes Dunnett-i mitmekordne võrdlus. Töös toodud joonistel on näha mean \pm SEM. Statistiliselt oluline p-väärtus on toodud tärnidena. Kui $p \leq 0.05$, siis *, $p \leq 0.01$, siis **, $p \leq 0.001$, siis *** ja $p \leq 0.0001$, siis ****.

4. Tulemused

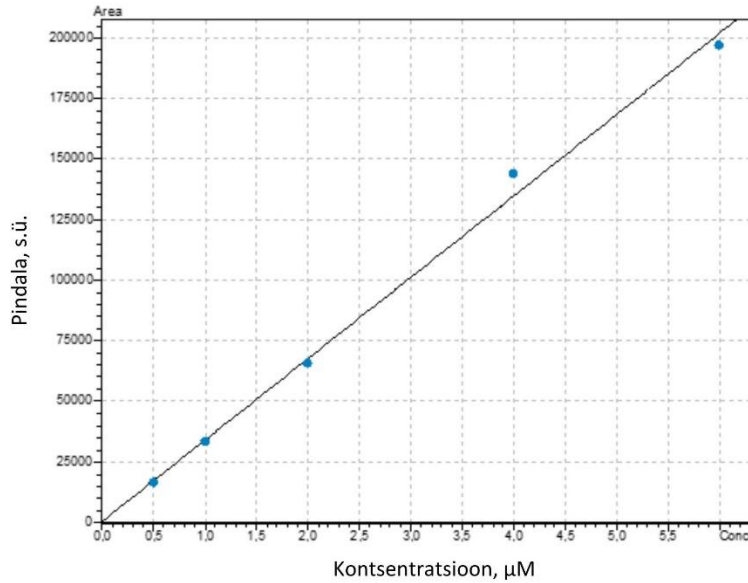
4.1. Ultra kõrge efektiivsusega vedelikkromatograafia tulemused

Uurimaks LA võimet siseneda diferentseeritud SH-SY5Y rakkudesse kolmel ajapunktil kasutati väljatöötatud UHPLC meetodit. Söötme- ja rakuproove koguti peale 2, 5 ja 24 tundi proovidega inkubeerimist.

Eri kontsentratsioonidega ABD-F-LA proovide kromatogrammid on toodud joonisel 3, millest nähtub, et ABD-F-LA retentsiooni aega on 29-29,5 minuti vahel ja fluoretsentsignaali tugevus on kontsentratsioonist sõltuv. Iga eksperimendi jaoks koostati ka kalibratsioon, millest üks on näidatud joonisel nr 4. ABD-F-LA keemiline koostis tehti kindlaks ESI Q-TOF MS meetodil kasutades Agilent Technology 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOF MS instrumenti (Agilent).

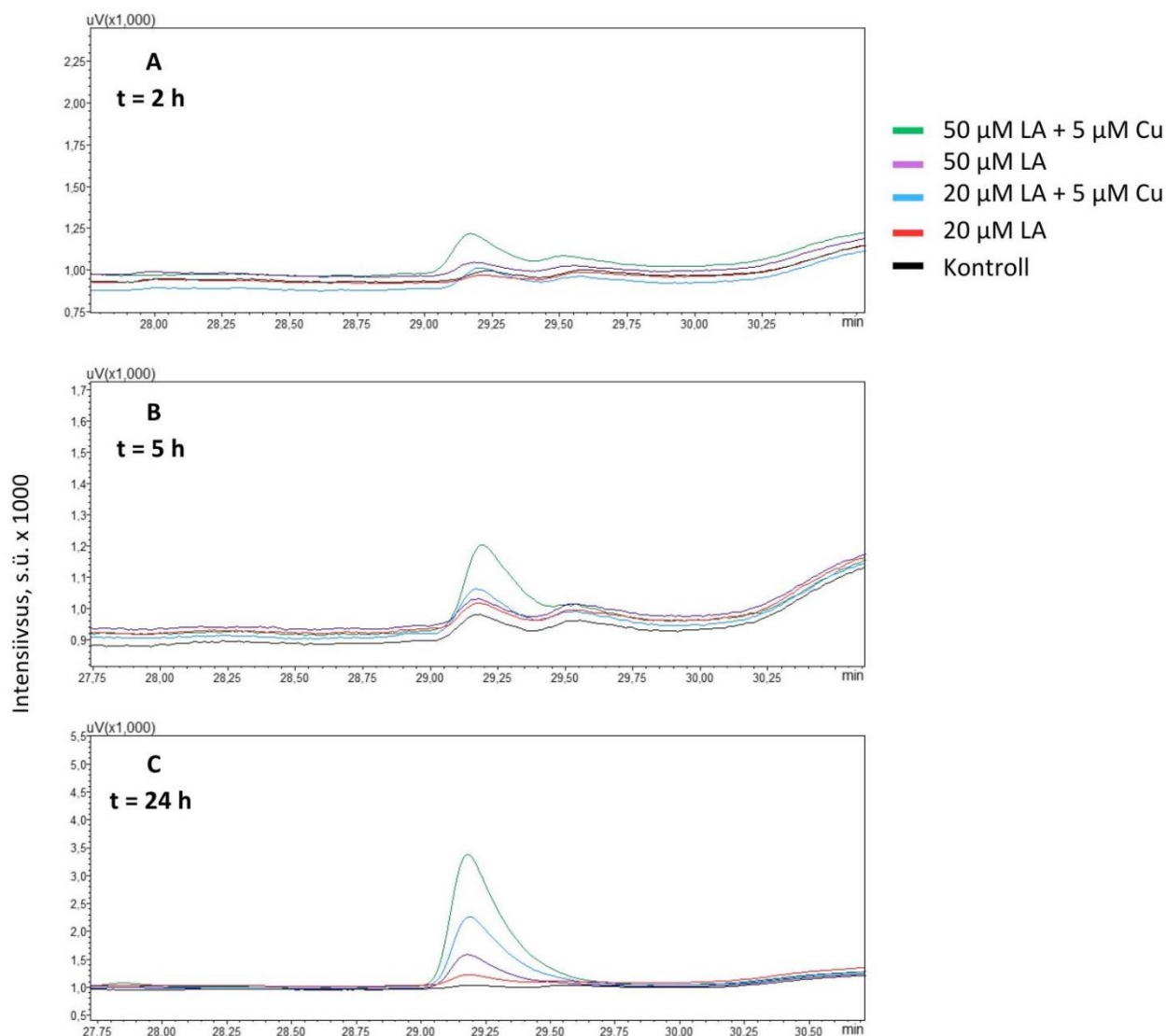


Joonis 3. Kromatogrammid ABD-F-LA määramiseks. Proovid: 6 μM LA (roheline), 4 μM LA (lilla), 2 μM LA (sinine), 1 μM LA (punane), 0,5 μM LA (must). Kromatograafia tingimused: kolonn Kinetex 2.6u C18 100A, 30 minutit lineaarne gradient 0 – 50 % B, kasutades H₂O-CH₃CN (5:95) (A) ja H₂O-CH₃CN (95:5) (B) lahuseid, mis sisaldasid 0,1% trifluoroäädikhapet (TFA). Voolukiirus 0.5 ml/minutis. Fluorestsentsi intensiivsust mõõdeti ergastusega 380 nm ja emissiooniga 510 nm.



Joonis 4. ABD-F-LA kalibratsioonikõver. $R^2=0,9953978$; $y=33567,3*x+491,929$. Kalibratsioonikõver koostati LabSolutions tarkvara 5.42 versiooniga (Shimadzu).

Rakuproovide LA sisaldus oli ajast, vase olemasolust ja kontsentratsioonist sõltuv. Joonisel nr 5 on näha kolmel ajapunktil inkubeeritud proovide kromatogramme, kus peale 2 tundi ja 5 tundi inkubeerimist on LA jõudnud rakkudesse siseneda vähem võrreldes 24 tunniga. Samuti on peale 24 tundi proovidega inkubeerimist näha, et LA tase on rakkudes suurenenud vase juuresolekul, mis viitab LA ja vase ühisele mõjule. Maksimum LA kontsentratsioon, mis rakkudes tuvastati, oli $25 \mu\text{M}$ ning see saadi peale 24 tundi $50 \mu\text{M}$ LA + $5 \mu\text{M}$ CuCl_2 prooviga inkubeerimist.

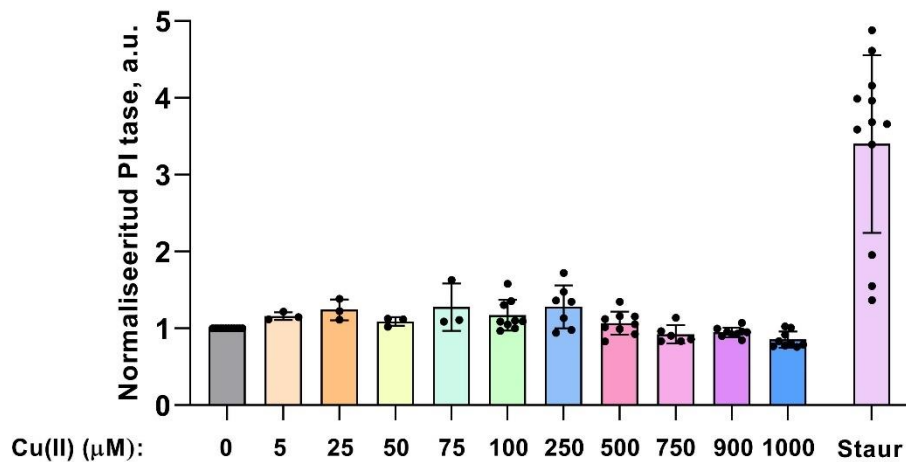


Joonis 5. ABD-F-LA kromatogrammid rakuproovidest. Proovid: 50 μM LA + 5 μM Cu (roheline), 50 μM LA (lilla), 20 μM LA + 5 μM Cu (helesinine), 20 μM LA (punane) ja kontroll (must). Inkubatsiooni aeg (A) – 2 tundi, (B) – 5 tundi ja (C) – 24 tundi. Kromatograafia tingimused: kolonn Kinetex 2.6u C18 100A, 30 minutit lineaarne gradient 0 – 50 % B, kasutades $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$ (5:95) (A) ja $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$ (95:5) (B) lahuseid, mis sisaldasid 0,1% trifluoroäädikhapet (TFA). Voolukiirus 0.5 ml/minutis. Fluorestsentsi intensiivsust mõõdeti ergastusega 380 nm ja emissiooniga 510 nm.

4.2. Toksilisuse katse tulemused kasutades propiidium iodiidi meetodit

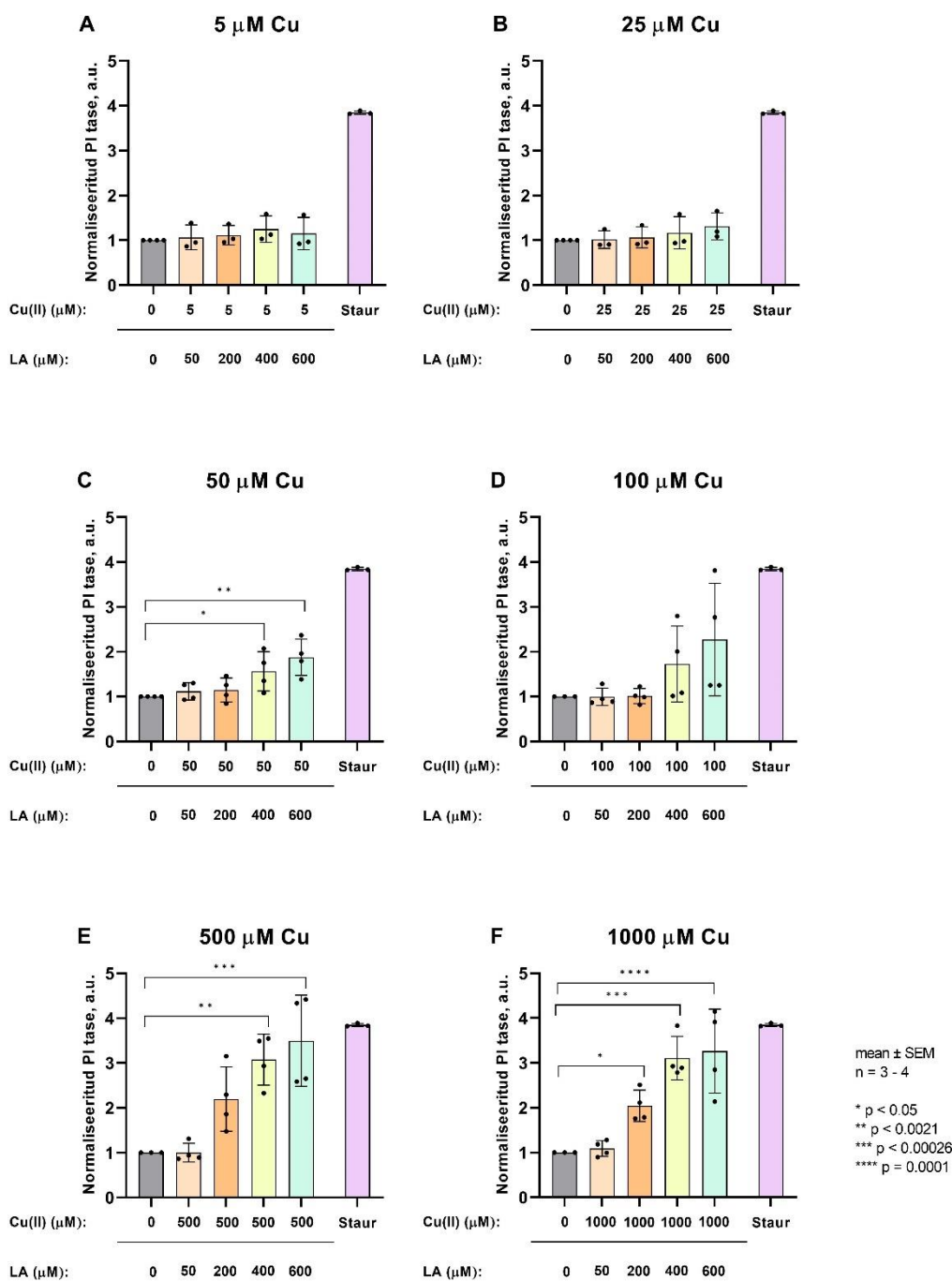
Vase toksilisust uuriti diferentseeritud SH-SY5Y rakkudes LA, CQ ja DETC juuresolekul inkubeerides rakke 24 tundi. Uuriti ka vase enda võimalikku toksilisust.

Vase proovid kontsentratsioonides 0 - 1 mM rakkudele toksiliselt ei mõjunud (Joonis 6). Võimaliku toksilisuse mõju võrdluseks kasutati staurosporiini (Staur).



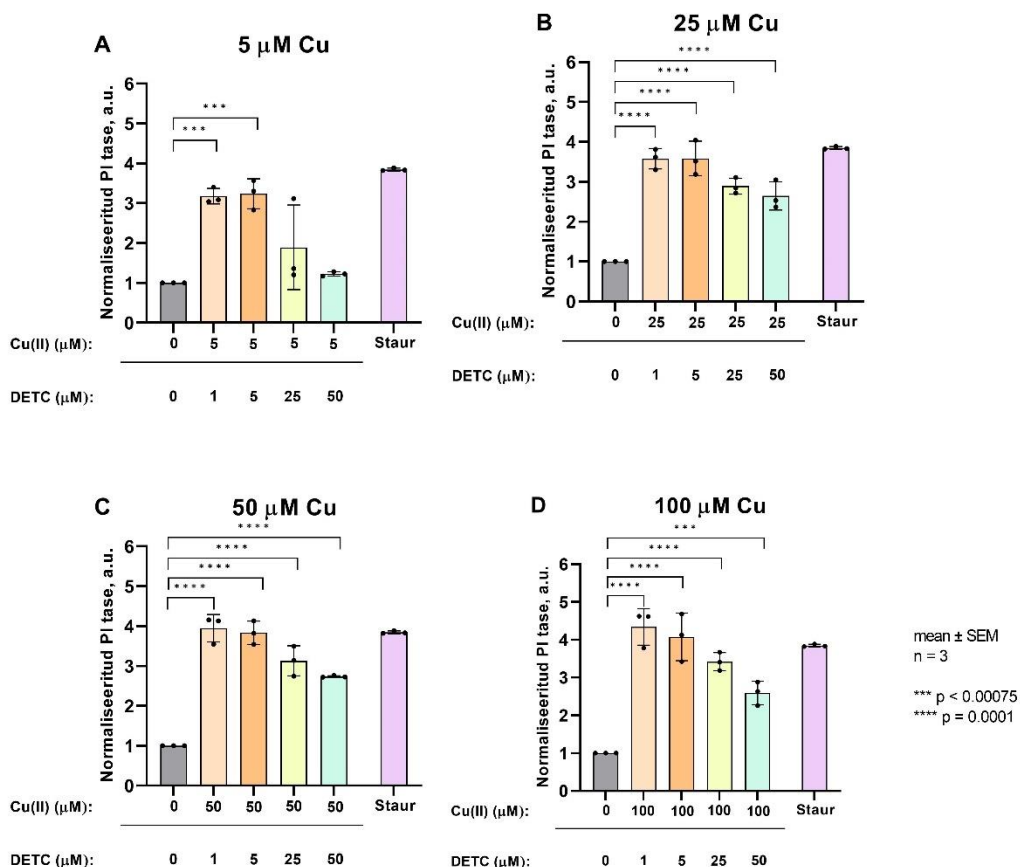
Joonis 6. Vase toksilisus diferentseeritud SH-SY5Y rakkudele mõõdetuna PI meetodiga. Rakke inkubeeriti 0 - 1000 μM CuCl_2 proovidega 24 tundi, proovidele oli lisatud 1mM glütsiin. PI florestsentsi mõõdeti 612 nm juures (ergastamine 540 nm). Võrdlus staurospriiiniga (Staur).

Vase toksilisust uuriti 50 - 600 μM LA-ga kasutades vase kontsentratsioone 0 - 1 mM. Joonisel 7. on näha, et vase toksilisus kasvas alles kõrgete LA ja vase kontsentratsioonide juures.

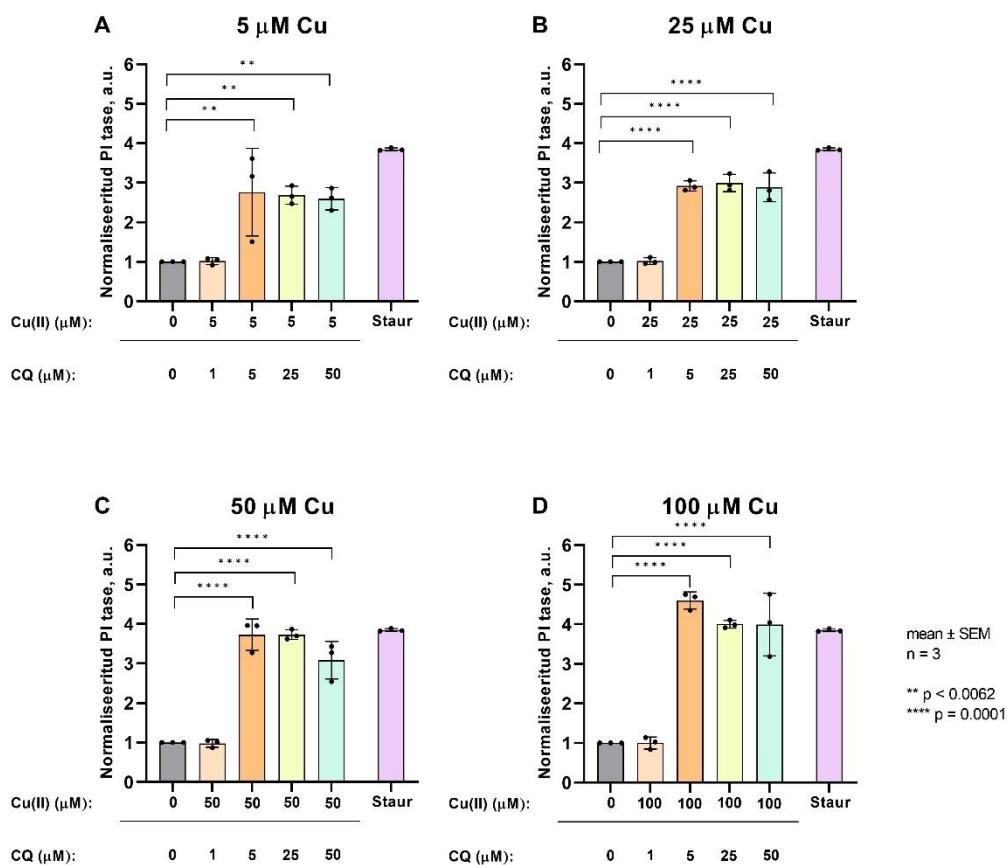


Joonis 7. Vase toksilisus diferentseeritud SH-SY5Y rakkudele LA juuresolekul mõõdetuna PI meetodiga. (A) 5 μM CuCl_2 , (B) 25 μM CuCl_2 , (C) 50 μM CuCl_2 , (D) 100 μM CuCl_2 , (E) 500 μM CuCl_2 ja (F) 1000 μM CuCl_2 mõju rakkudele 0 - 600 μM LA juuresolekul peale 24 tundi inkubeerimist võrdluses Staur-iga. Joonisel on toodud mean \pm SEM; n = 3-4, kus n on sõltumatute katsete korduste arv. Statistilisel analüüsil kasutati one-way ANOVA testi ja Dunnett-I mitmekordset võrdlust.

Koos DETC või CQ-ga mõjus vask rakkudele palju toksilisemalt. Joonisel 8 on näha, et juba 1 μM DETC kontsentratsiooni puhul oli vask rakkudele toksiline ning joonisel 9 on näha CQ toksilisus juba 5 μM kontsentratsiooni juures. Teostati ka eelkatse D-PA-ga, mille puhul oli näha, et vase toksilisus avaldus 200 μM D-PA juuresolekul (Lisa 1).

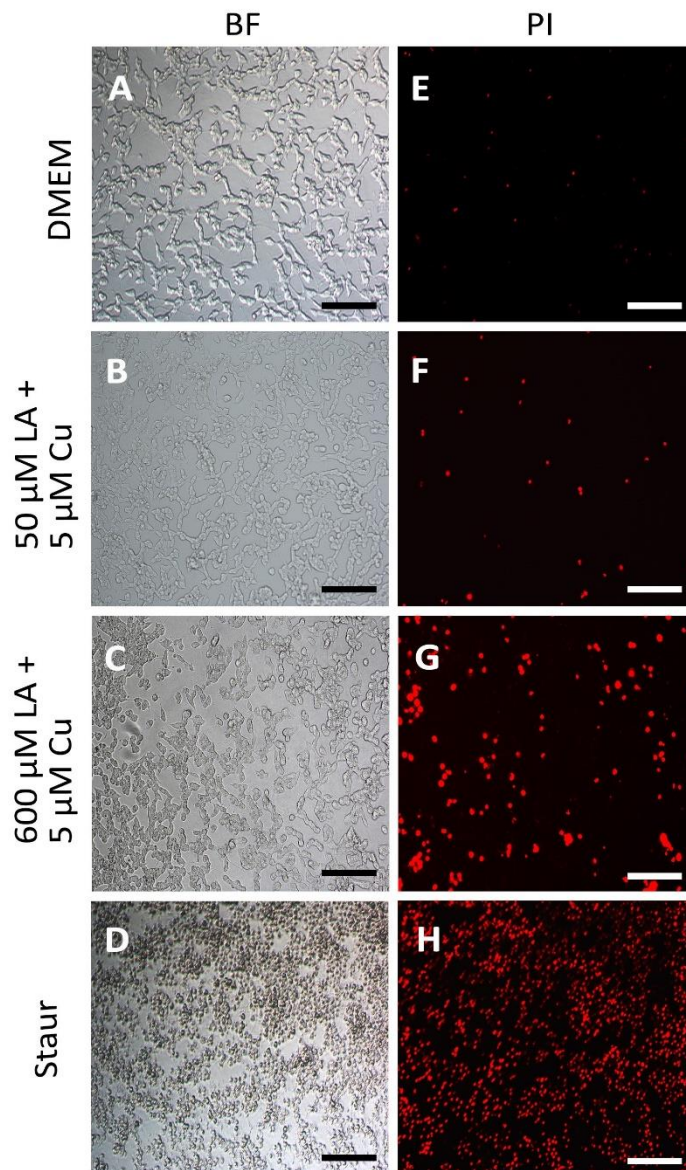


Joonis 8. Vase toksilisus diferentseeritud SH-SY5Y rakkudes DETC juuresolekul mõõdetuna PI meetodil. (A) 5 μM CuCl₂, (B) 25 μM CuCl₂, (C) 50 μM CuCl₂ ja (D) 100 μM CuCl₂ mõju rakkudele 0 – 50 μM DETC juuresolekul peale 24 tundi inkubeerimist võrdluses Staur-iga. Joonisel on ka kujutatud mean \pm SEM; n = 3, kus n on sõltumatute katsete korduste arv. Statistilisel analüüsil kasutati one-way ANOVA testi ja Dunnett'i mitmekordset võrdlust.

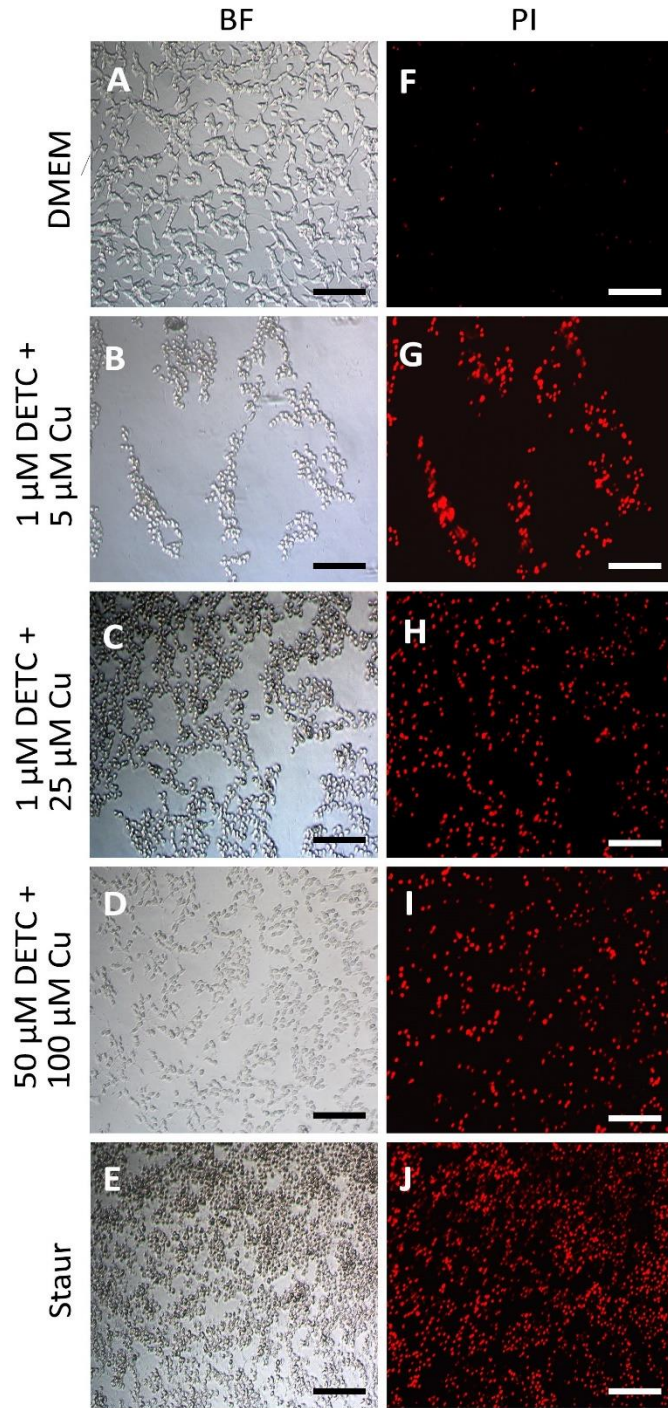


Joonis 9. Vase toksilisus diferentseeritud SH-SY5Y rakkudes CQ juuresolekul mõõdetuna PI meetodiga. (A) 5 μM CuCl₂, (B) 25 μM CuCl₂, (C) 50 μM CuCl₂ ja (D) 100 μM CuCl₂ mõju rakkudele 0 – 50 μM CQ juuresolekul peale 24 tundi inkubeerimist võrdluses Staur-iga. Joonisel on ka kujutatud mean \pm SEM; n = 3, kus n on sõltumatute katsete korduste arv. Statistilisel analüüsil kasutati one-way ANOVA testi ja Dunnett'i mitmekordset võrdlust.

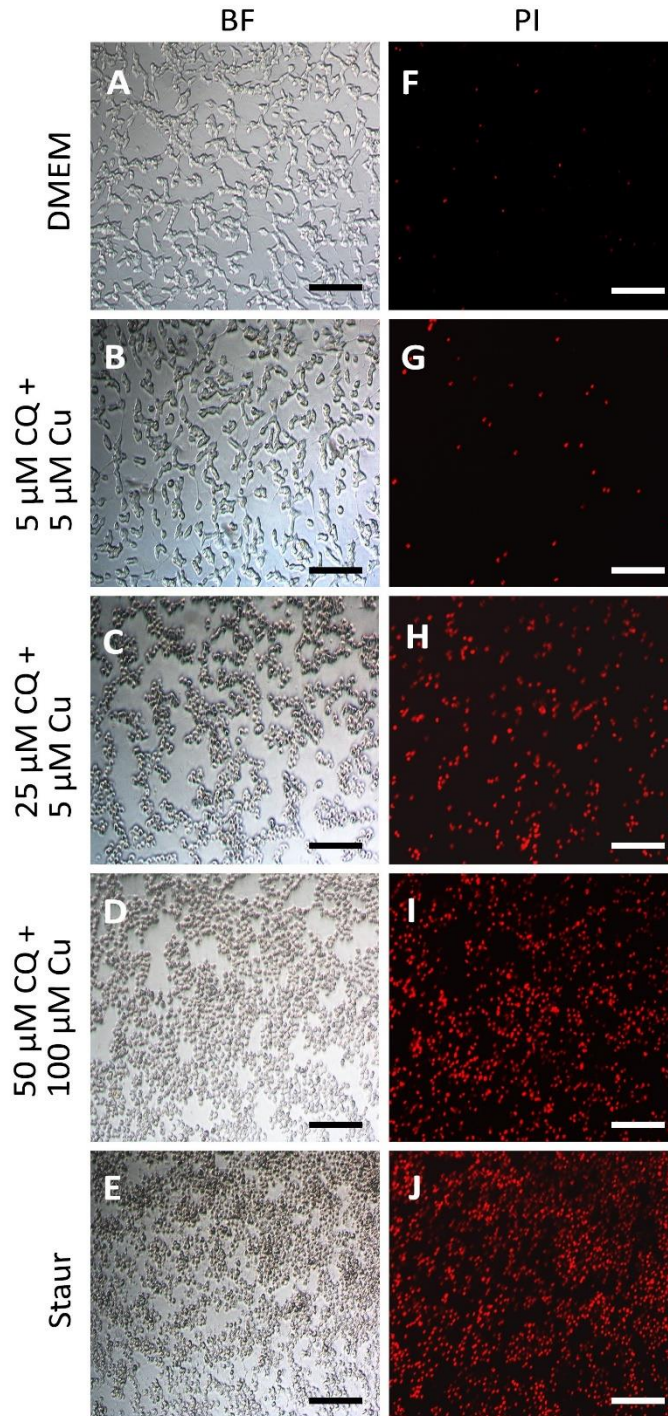
Nii LA (joonis 10), DETC (joonis 11) kui ka CQ-ga (joonis 12) töödeldud rakkudest tehti ka pildid kasutades Zeiss Axiovert 200M fluorestsentsmikroskoopi, mis kinnitavad PI mõõtmistulemusi. LA proovide puhul on näha, et alates 600 μM LA kontsentratsioonist on faaskontrasti pildil näha surnud rakke ning ka tugevamat PI fluorestsents signaali. DETC-ga töödeldud proovide puhul on faaskontrasti pildid näha surnud rakke juba 1 μM kontsentratsiooni puhul ning CQ-ga töödeldud rakkude puhul on näidatud surnud rakkude olemasolu 25 μM CQ juuresolekul.



Joonis 10. Faaskontrast ja PI-värvingu pildid diferentseeritud SH-SY5Y rakkudest peale 24 tundi vase ja LA-ga inkubeerimist. BF (bright-field) rakupildid (A-D) ja PI fluorestsents pildid (E-H). Rakkude pildid ainult söötmes (DMEM) olnud rakkudest (A,E) ning Staur-iga töödeldud rakkudest (D,H). Näidatud on 50 μ M LA + 5 μ M Cu prooviga rakud (B,F) ja 600 μ M LA + 5 μ M Cu prooviga rakud (C,G). Skaalariba 100 μ m.

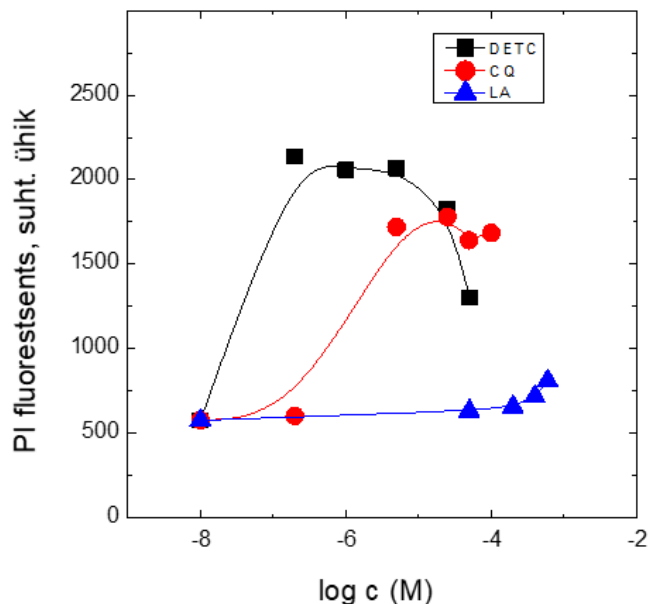


Joonis 11. Faaskontrast ja PI-värvingu pildid diferentseeritud SH-SY5Y rakkudest peale 24 tundi vase ja DETC-ga inkubeerimist. BF (bright-field) rakupildid (A-E) ja PI fluorestsents pildid (F-J). Pildid ainult söötmes (DMEM) olnud rakkudest (A,F) ning Staur-iga töödeldud rakkudest (E,J). Näidatud on 1 μ M DETC + 5 μ M Cu prooviga rakud (B,G), 1 μ M DETC + 25 μ M Cu prooviga rakud (C,H) ja 50 μ M DETC + 100 μ M Cu prooviga rakud (D,I). Skaalariba 100 μ m.



Joonis 12. Faaskontrast ja PI-värvingu pildid diferentseeritud SH-SY5Y rakkudest peale 24 tundi vase ja CQ-ga inkubeerimist. BF (bright-field) rakupildid (A-E) ja PI fluorestsents pildid (F-J). Rakkude pildid ainult söötmes (DMEM) olnud rakkudest (A,F) ning Staur-iga töödeldud rakkudest (E,J). Näidatud on 5 μ M CQ + 5 μ M Cu prooviga rakud (B,G), 25 μ M CQ + 5 μ M Cu prooviga rakud (C,H) ja 50 μ M CQ + 100 μ M Cu prooviga rakud (D,I). Skaalariba 100 μ m.

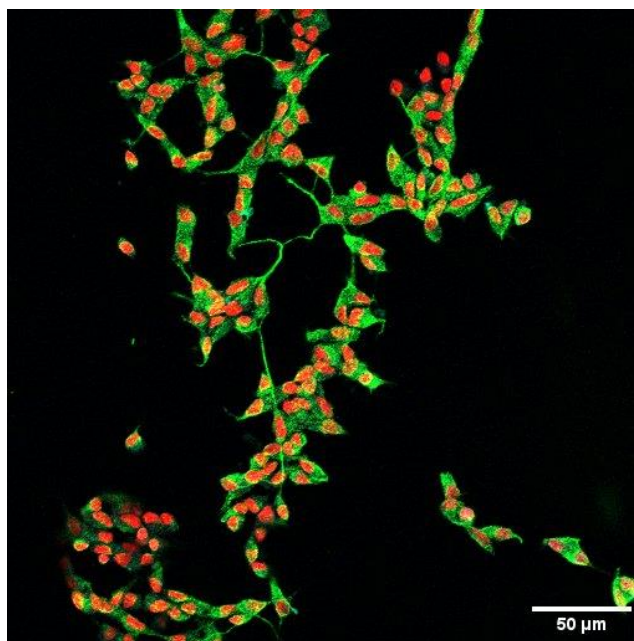
LA, DETC ja CQ toksilisuse mõju omavaheliseks võrdluseks koostati graafik (joonis 13), millelt on näha, et DETC ja CQ juuresolekul avaldub vase toksilisus tunduvalt madalamatel kontsentratsioonidel ning LA toksilisus kasvab alles kõrgete vase ja LA kontsentratsioonide juures.



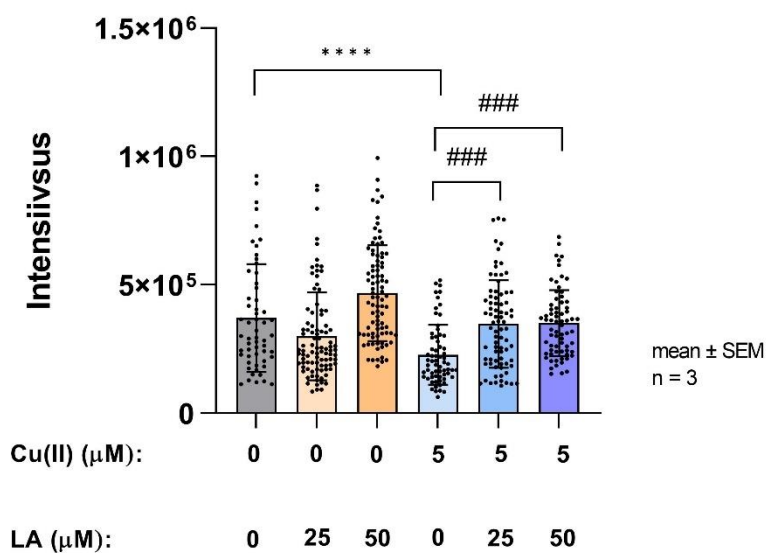
Joonis 13. LA, DETC ja CQ toksilisuse efekti võrdlus. DETC (must), CQ (punane) ja LA (sinine) toksilisuse sõltuvus ühendite kontsentratsioonist. Võrdlus on koostatud kasutades LA kontsentratsioone 0 – 600 μM , DETC kontsentratsioone 0 - 50 μM ning CQ kontsentratsioone 0 – 100 μM . Vase kontsentratsioon 25 μM juures.

4.3. Immunotsütotoemia tulemused

Immuunotsütotoemia puhul viidi läbi eelkatse diferentseerimata rakkudega. Selle käigus teostati immunotsütotoemia meetodil rakkude värving ja nende pildistamine, mis on näidatud joonisel nr 14. Veel teostati erinevate proovidega töödeldud rakkude tubuliini intensiivsuse mõõtmine ja nende võrdlus, mis on näha joonisel nr 15. Võrreldes kontrolliga on näha, et tubuliini fluorestsentsi intensiivsus vähenes, kui rakke inkubeeriti vasega 24 tundi. Vase ja LA-ga proovide puhul säilis tubuliini intensiivsus, mis viitab sellele, et LA-l on vase juuresolekul omadus säilitada rakkude morfoloogiat tänu mikrotuubulite stabiilsuse kaitsmisele. Tubuliini fluorestsentsi intensiivsus oli mõõdetud Fiji (ImageJ, NIH) programmi abil, kus igast vaateväljast tehtud pildilt mõõdeti kõikide rakkude intensiivsus. Mõõdetud rakkude fluorestsentsi intensiivsusest lahutati taustamüra väärtus. Rakkude tubuliini fluorestsentsi väärtus saadi, kui integreeritud tihedusest lahutati valitud raku pindala ja taustanäitude keskmise korrutis.



Joonis 14. Immunotsütökeemia meetodil värvitud SH-SY5Y rakud. Pildil on kujutatud rakud, kus punasega on kujutatud rakutuumad, rohelisega kujutatud tubuliini. Skaalariba 50 μm.



Joonis 15. Tubuliini fluorestsentsi intensiivsus määratuna Fiji (ImageJ, NIH) programmi abil. Tubuliini fluorestsentsi intensiivsus peale 24 tundi inkubeerimist vase ja LA proovidega. Joonisel on toodud mean ± SEM; n = 3 bioloogilist replikaati (kokku 62-97 rakku). Statistilisel analüüsil kasutati one-way ANOVA testi ja Dunnett'i mitmekordset võrdlust. **** p = 0.0001 ja ### p < 0.00012.

5. Arutelu

Alzheimeri tõbi (AT) on neurodegeneratiivne haigus, mille kulg viib dementsuse kujunemiseni. AT puhul tekib $A\beta$ peptiidide akumulatsioon, mis põhjustab amüloidsete naastude teket ja neurodegeneratsiooni. Samuti on haiguse puhul häiritud vase metabolism, kuna amüloidsed naastud seovad metalliioone ning selle tõttu esineb liigne metalliioonide kontsentratsioon ekstratsellulaarses keskkonnas, aga defitsiit raku sees. Selle tõttu oleks vaja leida ühend, mis suudaks siduda vaske ja transportida seda intratsellulaarsesse keskkonda (Maczurek et al., 2008). Selleks ühendiks on meie uurimisrühm välja pakkunud α -lipoehappe (LA), mis suudab siduda vaske ning viia seda rakku (Metsla et al., 2022). LA-d on uuritud ka kliinilistes katsetes, kus 600 mg päevane annus aeglustas kognitiivsete häirete progresseerumist (Mendoza-Núñez et al., 2019).

Töö käigus viidi läbi UHPLC, toksikoloogia ja immunotsütokeemia katsed uurimaks vastavalt LA sisenemist diferentseeritud SH-SY5Y rakkudesse, LA toksilisust võrreldes teiste vase ionofooridega ja LA mõju tubuliini stabiilsusele.

Eelnevalt on näidatud, et LA tõstab vase sisaldust rakus, mis viitab sellele, et LA siseneb rakku, seob vaske ja aitab seeläbi nihutada vase tasakaalu intratsellulaarsesse keskkonda. Töö üheks eesmärgiks oli pöördfaasi kromatograafia meetodiga uurida LA võimet siseneda rakkudesse, mille tulemusena leiti, et LA sisenemine on ajast, vase olemasolust ja LA kontsentratsioonist sõltuv protsess. Peale 24 tunnilist inkubeerimist oli LA-d sisenenud rakkudesse kõige rohkem ning oli ka näha, et LA tase on rakkudes suurenenud vase juuresolekul, mis viitab LA ja vase ühisele mõjule. Samuti on eelnevad uuringud meie laboris näidanud, et ka vase sisenemine rakkudesse toimub 24 tunni jooksul ehk saab öelda, et vase ja LA sisenemine toimub samas ajaskaalas (Metsla et al., 2022)

Eelnevalt on uuritud erinevaid sünteetilisi vase ionofoore AT raviks, näiteks kinoliini derivaate, aga need võivad tõsta liialt vase taset rakus, muutudes toksiliseks ja indutseerides kuproptooosi (Zheng et al., 2022). Käesolevas töös uuriti vase toksilisuse mõju koos LA-ga, DETC-ga, CQ-ga ja teostati ka eelkatsed D-PA-ga. Katsete eesmärgiks oli näidata, et kõikidest kasutatud ühenditest on LA koos vasega rakkudele kõige vähem toksiline. Töö tulemusena näidati, et vask koos LA-ga hakkab rakkudele mõjuma toksiliselt alles väga kõrgete kontsentratsioonide puhul. Samas vask koos DETC-ga on toksiline juba 1 μ M DETC puhul ning vask koos CQ-ga mõjub toksiliselt 5 μ M CQ puhul. Samuti on eelkatsetest näha, et ka D-PA toksilisuse mõju on varem avalduv, kui LA oma. Selle ühendi puhul tekkis toksilisus rakkudele 200 μ M D-PA juuresolekul. Järelikult on LA võimeline nihutama vase tasakaalu rakukeskkonda mitte toksiliselt võrreldes erinevate sünteetiliste ühenditega.

Tubuliini ja aktiini stabiilsus on olulised rakkude morfoloogia seisukohalt ning on näidatud, et vasel on seos aktiini stabiilsuse säilitamisel. AT puhul esineb aga rakus vase defitsiit ning sellisel juhul on häiritud aktiini stabiilsus, mis põhjustab neuronaalseid häireid. Eelnevalt on näidatud, et 24 tundi vasega töödeldud rakkude tubuliini võrgustik ja dendriitne tsütoskelett kahjustub. Kui aga töödeldi rakke vase ja vaske kelaativa ühendiga, siis suurenes tubuliini fluorestsentsi intensiivsus võrreldes kontrolliga (Perrin et al., 2017). Käesoleva töö raames teostati diferentseerimata SH-SY5Y rakkude immunovärvingu eelkatsed ja uuriti tubuliini fluorestsentsi intensiivsust erinevate proovidega vase ja

LA juuresolekul. Tulemusena näidati, et vase proovidega töödeldud rakkude tubuliini fluorestsentsi intensiivsus vähenes, mis tähendab mikrotoubulite stabiilsuse kadu, aga kui vasega proovidele oli lisatud LA, siis tubuliini fluorestsentsi intensiivsus säilis. See eelkatse viitab, et LA-l on omadus säilitada rakkude tsütoskeleti omadusi tänu mikrotoubulite stabiliseerimisele, seega kaitsta neid vase poolt tekitatava kahju eest. LA kaitsva mõju mehhanismi uurimiseks on vaja teostada täiendavaid katseid, koos tubuliini ja aktiini kvantifitseerimisega.

Kokkuvõte

Alzheimeri tõbi (AT) on levinuim haigus dementsuse kujunemiseks. See on progresseeruv neurodegeneratiivne haigus, mis mõjutab maailmas üle 55 miljoni inimese ja arvatakse, et see number kolmekordistub 2050. aastaks. AT olemasolust on teatud juba üle sajandi, aga siiani pole leitud selle vastu ravi. Haiguse tekkeks on püstitatud palju erinevaid hüpoteese, millest tuntuim on amüloidse kaskaadi hüpotees, mille puhul $A\beta$ peptiidide akumulatsioon põhjustab amüloidsete naastude teket ja neurodegeneratsiooni. Samuti on püstitatud hüpotees, mille põhjal arvatakse, et haiguse puhul on häiritud metalliioonide homöostaas, mis on varajane protsess enne amüloidse kaskaadi algust. Amüloidsed naastud seovad metallioone ning see tekitab haiguse puhul ka olukorra, kus esineb liigne metalliioonide kontsentratsioon ekstratsellulaarses keskkonnas, aga defitsiit raku sees. Selle tõttu oleks AT puhul kasu ühenditest, mis suudavad transportida metallioone tagasi intratsellulaarsesse keskkonda.

α -lipohape (LA) on looduslik ühend, mis esineb intratsellulaarses keskkonnas dihidrolipoehappena (DHLA). Tänu DHLA vormile seotakse vaske raku sees, mille tõttu on vase tasakaal nihutatud intratsellulaarse keskkonna suunas. Samuti on LA amfifiilne ja see suudab läbida vere-aju barjääri. LA on testitud ka AT kliinilistes uuringutes, kus on näidatud, et 600 mg päevane annus aeglustas kognitiivsete häirete teket.

Selle töö eesmärkideks oli uurida LA võimet siseneda diferentseeritud SH-SY5Y rakkudesse, uurida LA toksilisust vase juuresolekul ja võrrelda seda teiste vase ionofooridega. Samuti uuriti töö käigus LA ja vase mõju rakkude morfoloogiale.

LA võimet rakkudesse siseneda uuriti kasutades fluorestsentsmärgistatud LA määramist pöördfaasi kromatograafia abil. LA sisenemist uuriti peale 2h, 5h ja 24h proovidega inkubeerimist, kus igal ajapunktil olid proovideks 20 μM LA koos ja ilma vaseta ning 50 μM LA koos ja ilma vaseta. Tulemuseks saadi, et LA sisenemine rakkudesse on ajast, vase olemasolust ja LA kontsentratsioonist sõltuv protsess. Peale 24 tundi proovidega inkubeerimist oli LA-d sisenenud rakkudesse kõige rohkem ning oli ka näha, et LA tase on rakkudes suurenenud vase juuresolekul, mis viitab LA ja vase ühisele mõjule.

LA ja vase toksilisust uuriti kasutades propiidiium iodiidi meetodit. Võrdluseks kasutati kliokinooli, dietüülditiokarbaamhapet ja D-peniitsillamiini. Tulemuseks saadi, et vase toksilisus koos LA-ga avaldub alles väga kõrgete kontsentratsioonide puhul, samas kui kõik võrdluseks võetud ühendid mõjusid toksilisemalt palju madalamatel kontsentratsioonidel.

Immunotsütotoemia meetodil tehtud eelkatse põhjal saadi rakkude pildid, millega teostati tubuliini fluorestsentsi intensiivsuse võrdlus. Proovideks olid 50 μM LA koos ja ilma vaseta, 25 μM LA koos ja ilma vaseta ning 5 μM CuCl_2 . Tulemuseks saadi, et 5 μM CuCl_2 prooviga töödeldud rakkude tubuliini fluorestsentsi intensiivsus oli madalam kui kontrolli oma. Samas proovide puhul, kus oli lisaks vasele ka LA, oli tubuliini intensiivsus paremini säilinud või isegi samal tasemel kontrolliga, mis näitab LA võimet kaitsta tubuliini mikrotuubulite struktuuri.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common progressive neurodegenerative disease. AD affects more than 55 million people worldwide and the number is expected to triple by 2050. AD has been known for over a century but no cure has been found yet. Many different hypotheses have been proposed for the development of the disease. The most noted one is the amyloid cascade hypothesis, in which the accumulation of $A\beta$ peptides causes the formation of amyloid plaques and neurodegeneration. There is also a hypothesis about metal ion homeostasis disturbance which is an early process before the onset of the amyloid cascade. Amyloid plaques bind metal ions which leads to a situation where metal ions present in the extracellular environment in excessive concentrations while there exists deficit inside the cell. Therefore, AD patients would benefit from compounds that can transport metal ions back into the intracellular environment.

α -lipoic acid (LA) is a natural compound that occurs in the intracellular environment as a dihydrolipoic acid (DHLA). Thanks to its reduced DHLA form, copper is bound inside the cell, due to which the copper balance is shifted towards the intracellular environment. In addition, LA is amphiphilic and can cross the blood-brain barrier. LA has also been tested in AD clinical trials, where a daily dose of 600 mg slowed the onset of cognitive disorders.

The aims of the current project were to investigate the ability of LA to enter differentiated SH-SY5Y cells, to study the toxicity of LA in the presence of copper, and compare it with other copper ionophores. The effect of LA and copper on stability of cytoskeletal microtubules was also studied during the work.

The ability of LA to enter cells was investigated using the determination of fluorescently labeled LA by reverse phase chromatography. LA entry was studied after 2 h, 5 h, and 24 h incubation with samples, where at each timepoint the samples were 20 μ M LA with and without copper, 50 μ M LA with and without copper. It was concluded that the entry of LA into the cells depends on time, the presence of copper and the concentration of LA. After 24 h incubation with the samples, cellular concentration of exogenous LA was highest compared to other time points and it was also shown that the level of LA increased in the presence of copper, indicating a synergistic effect of LA and copper.

The toxicity of LA and copper was studied using the propidium iodide method. Clioquinol (CQ), diethyldithiocarbamic acid (DETC) and d-penicillamine (D-PA) were used for the comparison. The results indicated that copper demonstrated very significant cytotoxic effect only at very high concentrations when combined with LA. All the other tested compounds exerted toxic effects at much lower concentrations.

The preliminary experiment for investigation of copper and LA effect the cellular cytoskeletal protein, β -tubulin, was done using the immunocytochemical approach. The images obtained during the current study were used to compare the fluorescence intensity of tubulin which is a marker of microtubules stability. The samples were 50 μ M LA with and without copper, 25 μ M LA with and without copper, and 5 μ M CuCl_2 . As a result, the tubulin fluorescent intensity of the cells treated with 5 μ M CuCl_2 was

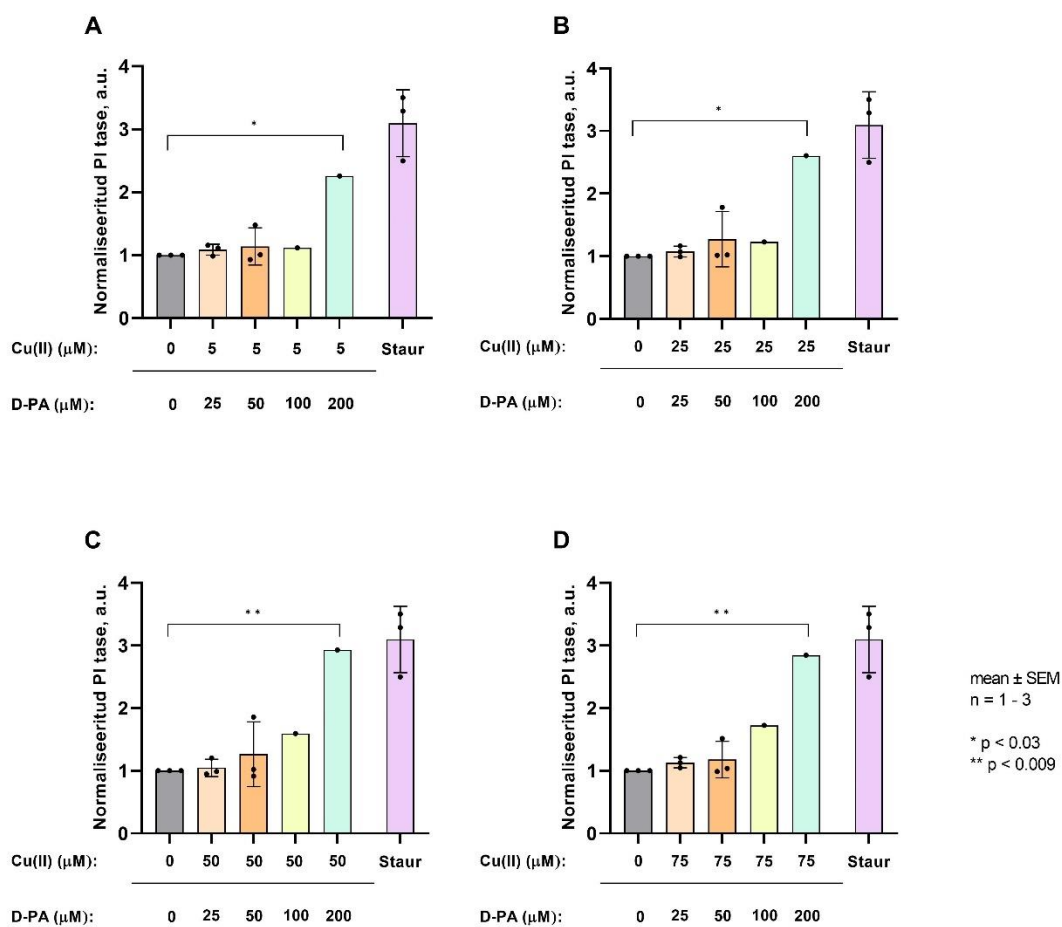
lower compared to the control. However, in samples with LA and copper, tubulin intensity was better preserved or even at the same level as the control indicative of LA protective effect against copper exposure.

Tänuavaldused

Tahaksin tänada oma juhendajaid, Sigrid Kirss ja Peep Palumaa, nende toetuse ja abi eest terve lõputöö teostamise vältel. Samuti tahan tänada Ekaterina Kabinin, kes aitas teostada immunotsütokeemia meetodit ja täiendada lõputöö käsikirja. Tänan ka kõiki teisi metalloproteoomika uurimisrühma liikmeid, kes olid alati valmis jagama oma teadmisi ja häid mõtteid.

Tänan ka oma perekonda ja häid sõpru, kes aitasid mul säilitada motivatsiooni, kuulasid muresid ning toetasid heade sõnadega.

Lisad



Lisa 1. Vase toksilisus diferentseeritud SH-SY5Y rakkudes D-PA juuresolekul. (A) 5 μM CuCl_2 , (B) 25 μM CuCl_2 , (C) 50 μM CuCl_2 ja (D) 75 μM CuCl_2 mõju rakkudele 0 – 200 μM D-PA juuresolekul peale 24 tundi inkubeerimist võrdluses Staur-iga. Joonisel on ka kujutatud mean \pm SEM; n = 1-3, kus n on sõltumatute katsete korduste arv. Statistilisel analüüsil kasutati one-way ANOVA testi ja Dunnett'i mitmekordset võrdlust.

Kasutatud kirjandus

- Abolaji, A. O., Fasae, K. D., Iwezor, C. E., & Farombi, E. O. (2020). D-penicillamine prolongs survival and lessens copper-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology Research*, *9*(4), 346–352. <https://doi.org/10.1093/TOXRES/TFAA032>
- Alzheimer Europe. (2021-2023). Alzheimer's dementia. <https://www.alzheimer-europe.org/dementia/alzheimers-dementia>
- Armstrong, R. A., & Armstrong, R. A. (2009). The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. In *Folia Neuropathologica* (Vol. 47, Issue 4).
- Banerjee, A., Majumder, P., Sanyal, S., Singh, J., Jana, K., Das, C., & Dasgupta, D. (2014). The DNA intercalators ethidium bromide and propidium iodide also bind to core histones. *FEBS Open Bio*, *4*, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.02.006>
- Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 24). MDPI. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25245789>
- Burry, R. W. (2011). Controls for immunocytochemistry: An update. In *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (Vol. 59, Issue 1, pp. 6–12). <https://doi.org/10.1369/jhc.2010.956920>
- Cai, Y., An, S. S. A., & Kim, S. (2015). Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Clinical Interventions in Aging*, *10*, 1163–1172. <https://doi.org/10.2147/CIA.S85808>
- Carr, D. (2002). The Handbook of Analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reversed-Phase HPLC.
- Cell line profile*. (n.d.).
- Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. In *Acta Pharmacologica Sinica* (Vol. 38, Issue 9, pp. 1205–1235). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>
- Chen, L., Min, J., & Wang, F. (2022). Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 7, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01229-y>
- Chen, X. F., Zhang, Y. W., Xu, H., & Bu, G. (2013). Transcriptional regulation and its misregulation in Alzheimer's disease. In *Molecular Brain* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1756-6606-6-44>
- Cheng, S. Y., & Trombetta, L. D. (2004). The induction of amyloid precursor protein and α -synuclein in rat hippocampal astrocytes by diethyldithiocarbamate and copper with or without glutathione. *Toxicology Letters*, *146*(2), 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.09.009>
- Dieter, F., Esselun, C., & Eckert, G. P. (2022). Redox Active α -Lipoic Acid Differentially Improves Mitochondrial Dysfunction in a Cellular Model of Alzheimer and Its Control Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(16). <https://doi.org/10.3390/ijms23169186>

- Gouras, G. K., Olsson, T. T., & Hansson, O. (2015). β -amyloid Peptides and Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. In *Neurotherapeutics* (Vol. 12, Issue 1, pp. 3–11). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0313-y>
- Gu, L., & Guo, Z. (2021). Alzheimer's A β 42 and A β 40 form mixed oligomers with direct molecular interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 534, 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.092>
- Gupta, A., & Lutsenko, S. (2009). Human copper transporters: Mechanism, role in human diseases and therapeutic potential. In *Future Medicinal Chemistry* (Vol. 1, Issue 6, pp. 1125–1142). <https://doi.org/10.4155/fmc.09.84>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). *Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis*.
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). An introduction to performing immunofluorescence staining. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1897, pp. 299–311). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26
- Jämsä, A., Hasslund, K., Cowburn, R. F., Bäckström, A., & Vasänge, M. (2004). The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(3), 993–1000. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.075>
- Kaufmann, A. (2020). The use of UHPLC, IMS, and HRMS in multiresidue analytical methods: A critical review. In *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (Vol. 1158). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122369>
- Kelleher, R. J., & Shen, J. (2017). Presenilin-1 mutations and Alzheimer's disease. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 114, Issue 4, pp. 629–631). National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619574114>
- Kim, J., Basak, J. M., & Holtzman, D. M. (2009). The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. In *Neuron* (Vol. 63, Issue 3, pp. 287–303). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.026>
- Knopman, D. S. (2023). Lecanemab reduces brain amyloid- β and delays cognitive worsening. In *Cell Reports Medicine* (Vol. 4, Issue 3). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.100982>
- Kovalevich, J., & Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in Molecular Biology*, 1078, 9–21. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5_2
- Krishtal, J., Metsla, K., Bragina, O., Tõugu, V., & Palumaa, P. (2019). Toxicity of Amyloid- β Peptides Varies Depending on Differentiation Route of SH-SY5Y Cells. *Journal of Alzheimer's Disease*, 71(3), 879–887. <https://doi.org/10.3233/JAD-190705>
- Lei, P., Ayton, S., & Bush, A. I. (2021). The essential elements of Alzheimer's disease. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 296). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.008207>

- Li, N. M., Liu, K. F., Qiu, Y. J., Zhang, H. H., Nakanishi, H., & Qing, H. (2019). Mutations of beta-amyloid precursor protein alter the consequence of Alzheimer's disease pathogenesis. *Neural Regeneration Research*, 14(4), 658–665. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.247469>
- Lv, X., Zheng, Q., Li, M., Huang, Z., Peng, M., Sun, J., & Shi, P. (2020). Clioquinol induces S-phase cell cycle arrest through the elevation of the calcium level in human neurotypic SH-SY5Y cells. *Metallomics*, 12(2), 173–182. <https://doi.org/10.1039/c9mt00260j>
- Maczurek, A., Hager, K., Kenkies, M., Sharman, M., Martins, R., Engel, J., Carlson, D. A., & Münch, G. (2008). Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 60, Issues 13–14, pp. 1463–1470). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.04.015>
- Mendoza-Núñez, V. M., García-Martínez, B. I., Rosado-Pérez, J., Santiago-Osorio, E., Pedraza-Chaverri, J., & Hernández-Abad, V. J. (2019). The effect of 600 mg alpha-lipoic acid supplementation on oxidative stress, inflammation, and RAGE in older adults with type 2 diabetes mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3276958>
- Metsla, K., Kirss, S., Laks, K., Sildnik, G., Palgi, M., Palumaa, T., Tõugu, V., & Palumaa, P. (2022). α -Lipoic Acid Has the Potential to Normalize Copper Metabolism, Which Is Dysregulated in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 85(2), 711–724. <https://doi.org/10.3233/JAD-215026>
- Moustakas, M. (2021). The role of metal ions in biology, biochemistry and medicine. In *Materials* (Vol. 14, Issue 3, pp. 1–4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma14030549>
- Passeri, E., Elkhoury, K., Morsink, M., Broersen, K., Linder, M., Tamayol, A., Malaplate, C., Yen, F. T., & Arab-Tehrany, E. (2022). Alzheimer's Disease: Treatment Strategies and Their Limitations. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms232213954>
- Perez, D. R., Sklar, L. A., & Chigaev, A. (2019). Clioquinol: To harm or heal. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 199, pp. 155–163). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.03.009>
- Perrin, L., Roudeau, S., Carmona, A., Domart, F., Petersen, J. D., Bohic, S., Yang, Y., Cloetens, P., & Ortega, R. (2017). Zinc and Copper Effects on Stability of Tubulin and Actin Networks in Dendrites and Spines of Hippocampal Neurons. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(7), 1490–1499. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.6b00452>
- Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of Visualized Experiments*, 50. <https://doi.org/10.3791/2597>
- Salehi, B., Berkay Yilmaz, Y., Antika, G., Boyunegmez Tumer, T., Fawzi Mahomoodally, M., Lobine, D., Akram, M., Riaz, M., Capanoglu, E., Sharopov, F., Martins, N., Cho, W. C., & Sharifi-Rad, J. (2019). Insights on the use of α -lipoic acid for therapeutic purposes. *Biomolecules*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/biom9080356>
- Sales, T. A., Prandi, I. G., de Castro, A. A., Leal, D. H. S., da Cunha, E. F. F., Kuca, K., & Ramalho, T. C. (2019). Recent developments in metal-based drugs and chelating agents for neurodegenerative diseases

- treatments. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20081829>
- Satoh, S., Toyo'oka, T., Fukushima, T., & Inagaki, S. (2007). Simultaneous determination of α -lipoic acid and its reduced form by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 854(1–2), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.04.003>
- Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J., & van der Flier, W. M. (2021). Alzheimer's disease. In *The Lancet* (Vol. 397, Issue 10284, pp. 1577–1590). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)
- Tsvetkov, P., Coy, S., Petrova, B., Dreishpoon, M., Verma, A., Abdusamad, M., Rossen, J., Joesch-Cohen, L., Humeidi, R., Spangler, R. D., Eaton, J. K., Frenkel, E., Kocak, M., Corsello, S. M., Lutsenko, S., Kanarek, N., Santagata, S., & Golub, T. R. (2022). Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins. *Science*, 375(6586), 1254–1261. <https://doi.org/10.1126/science.abf0529>
- Wang, L., Yin, Y. L., Liu, X. Z., Shen, P., Zheng, Y. G., Lan, X. R., Lu, C. B., & Wang, J. Z. (2020). Current understanding of metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease. In *Translational Neurodegeneration* (Vol. 9, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00189-z>
- Xu, Y., Xiao, G., Liu, L., & Lang, M. (2019). Zinc transporters in Alzheimer's disease. In *Molecular Brain* (Vol. 12, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0528-2>
- Yang, P., & Sun, F. (2021). Aducanumab: The first targeted Alzheimer's therapy. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 15(3), 166–168. <https://doi.org/10.5582/ddt.2021.01061>
- Zheng, P., Zhou, C., Lu, L., Liu, B., & Ding, Y. (2022). Elesclomol: a copper ionophore targeting mitochondrial metabolism for cancer therapy. In *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* (Vol. 41, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02485-0>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina Anette Reinapu (*autori nimi*)

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose “ α -lipoehape mõju vase metabolismile neuronaalses rakukultuuri mudelis”,

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on Sigrid Kirss ja Peep Palumaa

(*juhendaja nimi*)

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

31.05.2023 (kuupäev)

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingu tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.