

TALLINNA REAALKOOL

ELIISE LEISMANN

MADALMOLEKULAARSETE ÜHENDITE SEOSTUMINE AMÜLOID- β PEPTIIDIGA

JUHENDAJA KAIRIT ZOVO

KASUTATUD LÜHENDID

A β – amüloid-beeta peptiid

APP – amüloidi eellasvalk (*amyloid precursor protein*)

ApoE4 – apolipoproteiin E4

AT – Alzheimeri tõbi

C99–99 – aminohappejäägiline C-terminaalne fragment

ESI-MS – elektropihustusmass-spektomeetria

IS – ioonide mahasurumine (*ion suppression*)

KT – kompuutertomograafia

m/z – massi ja laengu suhe

MRT – magnetresonantstomograafia

PBV – Patentsinine V (*Patent blue V*)

PSEN – preseniliinigeen

ThT – tioflaviin T

SISSEJUHATUS

Alzheimeri tõbi (AT) on vanusest sõltuv pöördumatu ja aeglaselt süvenev närvisüsteemi haigus. See kahjustab ja tapab aeglaselt ajurakke, põhjustades ajumahu vähenemist. Haigel tekivad probleemid mälu, käitumise ja mõtetegevusega. Inimkond vananeb, mille tõttu AT

sagedus järjest tõuseb. Kõige rohkem on haigus levinud üle 65-aastastel. 2006. aasta andmete järgi põeb Alzheimeri tõve üle maailma 26,6 miljonit inimest ning 2050. aastaks ennustatakse, et haigust põeb iga 85. inimene. Hetkel pole tõhusat ravimit loodud. Kasutusel on ravimid, millel on ainult sümptomaatiline toime. Sellepärast on oluline luua tõhus ravim, mis takistaks AT süvenemist.

Alzheimeri tõve põhjustajaks peetakse amüloidsete naastude ning neurofibrillaarsete kämpude tekkimist, mis tapavad närvirakke. Naaste moodustab amüloid-beeta peptiid ($A\beta$), kämpe aga tau valk. On välja töötatud mitmeid strateegiaid, mis taastaksid $A\beta$ produktsiooni ja lõhustamise vahelise tasakaalu. Uurimistöös käsitleti kõige perspektiivsemat ravistrateegiat, mille põhimõte on takistada $A\beta$ fibrillisatsiooni.

Töö eesmärk on korraldada uuringud 10 erineva ühendiga, et uurida nende seostumist ja kompleksi moodustumist $A\beta$ peptiidiga, ning selgitada, mis mehhanismi kaudu nende inhibeeriv mõju avaldub. Hüpootees on, et kui moodustub kompleks $A\beta$ ja aine vahel, siis selle kompleksi moodustumine inhibeerib fibrillaarsete struktuuride moodustumist ning $A\beta$ fibrillisatsiooni. Kompleksi detekteerimine viitab 1:1 fibrillisatsiooni inhibitsiooni mehhanismile.

Uurimistöö praktiline osa viidi läbi TTÜ Geenitehnoloogia instituudis proteoomika laboris. Uuringus kasutati elektropihustus mass-spektomeetriat ja ühe ühendi edasisel uurimisel kasutati ka tioflaviin T fluorestsentsi meetodit. Uuriti $A\beta$ fibrillisatsiooni inhibiitorite seostumise sõltuvust ajast ning kontsentratsioonist.

Siinse uurimistöö esimeses osas antakse ülevaade Alzheimeri tõvest ja ravistrateegiast, mis takistab $A\beta$ fibrillisatsiooni. Teises osas tuuakse ülevaade kasutatud meetoditest ja materjalidest. Kolmandas osas pühendatakse töö tulemustele ning arutelule.

Soovin tänada töö valmimisel ja toimetamisel toeks olnud Kairit Zovo ja Andra Noormäge. Samuti soovin tänada Tallinna tehnikaülikooli, Geenitehnoloogia instituuti ning professor Peep Palumaad, kes võimaldas laboris teha praktilist tööd.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. ALZHEIMERI TÕVE AJALUGU JA OLEMUS

1.1.1. Alzheimeri tõve ajalugu

1901. aastal viidi 51-aastane naine Auguste D. Frankfurdi haiglasse. Ta kannatas kõnedefekti, hallutsinatsioonide, meelepette, paranoia ja agressiivse käitumise all. Tema seisundit uuris doktor nimega Alois Alzheimer (1864–1915) (Berrios 2004).

1903. aastal kolis Alzheimer Müncheni meditsiinikooli, et töötada koos Emil Kraepliniga, kes oli üks parimaid saksa psühhiaatreid. 1906. aastal suri Auguste D. ning tema aju saadeti lahkamisele. Lahkamisel avastati, et Auguste D. aju oli dramaatiliselt vähenenud ning edasistel uuringutel avastas Alzheimer amüloidseid naaste ja neurofibrillaaride kärke, mida peetakse selle haiguse peamiseks põhjustajaks (Nordqvist 2009). Sama aasta novembris esitles Alzheimer Auguste D. juhtumit psühhiaatria koosolekul ning publitseeris oma kõne 1907. aastal. 1910. aastal andis Kraeplin haigusele nimeks Alzheimeri tõbi (Berríos 2004).



Dr. Alois Alzheimer

Joonis 1. Dr Alois Alzheimer. Allikas: Alzheimer's-Resource

1.1.2. Alzheimeri tõbi

Alzheimeri tõbe (AT) peetakse dementsuse alaliigiks. 50–60% kõikidest dementsuse juhtumitest on AT (Blennow 2006). Dementsus on sümptomite kompleks, mida iseloomustab intellektuaalse võime taandareng. AT on aeglaselt süvenev närvisüsteemi haigus, mis kahjustab ning lõpuks hävitab ajurakke, põhjustades mõtlemisvõime, mälu ja teiste aju funktsioonide taandarengut. Tavaliselt areneb haigus aeglaselt ning läheb sedavõrd hullemaks, mida rohkem hävineb neuroneid (Alz 2012).

AT on enamasti levinud üle 65-aastastel, kuid kuni 5% inimestest on varajane AT, mis avaldub nooremas eas (Crystal 2012). 2006. aastal põdes AT-d maailmas 26,6 miljonit inimest. Ennustatakse, et 2050. aastaks põeb maailmas AT-d iga 85. inimene (Brookmeyer et al. 2007). AT patsientide eest hoolitsemine on kulukas ning toob lähedastele kaasa palju stressi. Ravimid nõuavad väga suurt rahalist väljaminekut. Hetkel on olemas vaid sümptomaatiline ravi. Oleks vaja ravimit, mis takistaks tõve süvenemist ning modifitseeriks haiguse kulgu.

1.1.3. Sümptomid. Riskifaktorid. Diagnoos

Nagu ülejäänud keha, nii vananeb ka aju. Enamik inimesi märkab, et mõtlemine on aeglustunud ja informatsioon ei püsi enam meeles. Tugev mälukaotus ning segadus võivad olla aga näitajaks, et ajurakud hävinevad. Kõige esimeseks AT sümptomiks peetakse sageli ekslikult stressi ilminguid (Alz 2012).

Üks levinum varajane sümptom on raskus hoida meeles alles õpitud informatsiooni. AT muutused algavad tavaliselt aju osas, mis mõjutab õppimist. Kui haigus süveneb, tekivad uued sümptomid, milleks on muutused käitumises ja tujus, meeltesegadus, orienteerumatus, agressiivsus, esineb raskusi rääkimise, neelamise ja kõndimisega. Keha funktsioonid lõpetavad tegevuse, mis viib lõpuks haige surmani (Alz 2012).

AT kõige tähtsam riskifaktor on vanus. Pärast 65. eluaastat haigestumise risk kahekordistub iga viie aastaga. AT on haigus, mis areneb enamasti vanemas eas, kuid on ka nooremaid inimesi, kellel võib haigus välja areneda.

Teine riskifaktor on geenid. Inimestel, kelle peres on varem haigus esinenud, on suurem risk haigestuda ning haigus võib välja lüüa nooremas eas. AT-d võivad põhjustada mutatsioonid kolmes erinevas geenis: preseniliin 1 (*PSENI*), preseniliin 2 (*PSEN2*) ja amüloidi eellasvalk (*APP*) (Crystal 2012). Mutatsioonid nendes geenides on seotud A β üleproduktiooniga. Samuti on suurem risk haigestuda inimestel, kes produtseerivad apolipoproteiini E4 isovormi (ApoE4), mille geen asub kromosoomis 19 (Raber, Huang et al. 2004). ApoE4 suurendab A β produktiooni ja vähendab A β väljaviimist ajust.

Downi sündroom suurendab riski haigestuda AT. Downi sündroomi põdevatel inimestel on kolm koopiat 21. kromosoomi, mis sisaldavad *APP* geeni. APP valgust lõigatakse β - ja γ -sekretaasi poolt välja A β peptiid, mida peetakse AT üheks põhjustajaks, seega on Downi sündroomi haigel A β kogus kolmekordne (Alz 2012).

Olulisteks riskifaktoriteks peetakse veel peavigastusi, raskemetalle, suitsetamist, mees- või naissugu, diabeeti, kõrget vererõhu ja kolestorooli taset (Nordqvist 2009). Raskemetallid kogunevad kudedesse kuude ja aastatega, põhjustades oksüdatiivset stressi (Bionutritional 2012). Leitud on seoseid, et kui inimene on õppinud alla kaheksa aasta koolis, on tal suurem risk haigestuda (Crystal 2012).

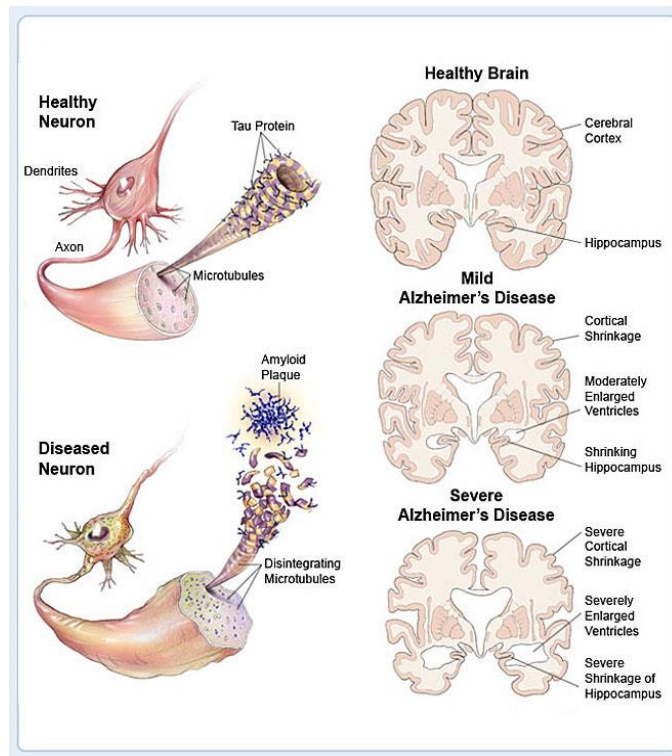
Diagnoos antakse pärast põhjalikku psühhiaatrilist hinnangut, kus hinnatakse patsiendi käitumist ning mentaalset olukorda. Tehakse ka neuropsühholoogilisi teste, kus kontrollitakse inimese intellektuaalsust, mälu, tähelepanu ning keeleoskust (Ahaf 2012). Diagnoosis ei saa enne patsiendi surma täiesti kindel olla. Pärast surma tehakse ajule mikroskoopiline uuring, mis näitab amüloidseid naaste ja neurofibrillaarseid kämpusid. AT

diagnoosimiseks ei ole veel välja töötatud rutiinset testi nagu vereproov, uriiniproov või biopsiaanalüüs, mis aitaks avastada naaste või kämpusid haiguse varases staadiumis (Nordqvist 2009). Teadlased uurivad võtteid, kuidas AT-d täpsemini ning varem diagnoosida. Kilpnäärme funktsiooni ning B12-vitamiini testid on vajalikud dementsuse välja selgitamiseks. Samuti tehakse kompuutertomograafiat (KT) ja magnetresonantstomograafiat (MRT), et välistada ajukasvajad ning hematoomi. Suurt rõhku pannakse biomarkeritele, millest oleks suur abi AT diagnoosimiseks ning ravimite mõju uurimiseks (Blennow 2006).

1.1.4. Alzheimeri tõve patoloogia

Inimese ajus on üle 100 miljardi neuron. Iga neuron on ühendatud teisega, moodustades sidevõrgu. Igal neuronite rühmal on oma ülesanne ning kui üks neuron saab kahjustada, ei saa ta enam teisega kontakti, mis viib neuronite surmani. Arvatakse, et selle põhjustaja on A β peptiid, mis koguneb neuronite vahele, moodustades naaste, mis segavad närvirakkude normaalset omavahelist kommunikatsiooni. Segamine viib neuronite surmani ning inimese võimete taandarenguni. Naastud sisaldavad lisaks A β -peptiidile veel glükoosaminoglükaane, seerumi amüloid P komponenti, apolipoproteiini E, mis võivad omada suurt rolli agregatsiooni protsessis (Alexanderscu 2005). Valk nimega tau koguneb neuronite sisse, moodustades kämpusid, mis viivad samuti neuronite surmani (Alz 2012). Peamiselt paiknevad naastud ja kämbud hipokampuse, amügdala, basaalse eesaju ja entoriaalse ajukoore ajupiirkondades, mis on seotud õppimise, mälu ja emotsioonidega (Mattson 2004). Arvatakse, et oksüdatiivne stress on seotud A β ja tau valgu poolt põhjustatud neuronite suremisega, sest vabade hapniku radikaalide poolt tekitatud kahjustused on märgatavad naastude läheduses ning nendes neuronites, milles leidub neurofibrillaarseid kämpusid (Butterfield. Drake et al. 2001).

Joonisel 2 on näidatud, kuidas tau valgu agregaadid moodustuvad neuroni sisse ning kuidas A β naastud moodustuvad neuronite vahele, lõhkudes neuroni struktuuri, mis viib närviraku suremiseni. Lisaks on joonisel 2 võrreldud AT-d põdeva inimese aju erinevate staadiumite korral terve ajuga ning on märgata, et neuronite suremisega ajumaht väheneb.

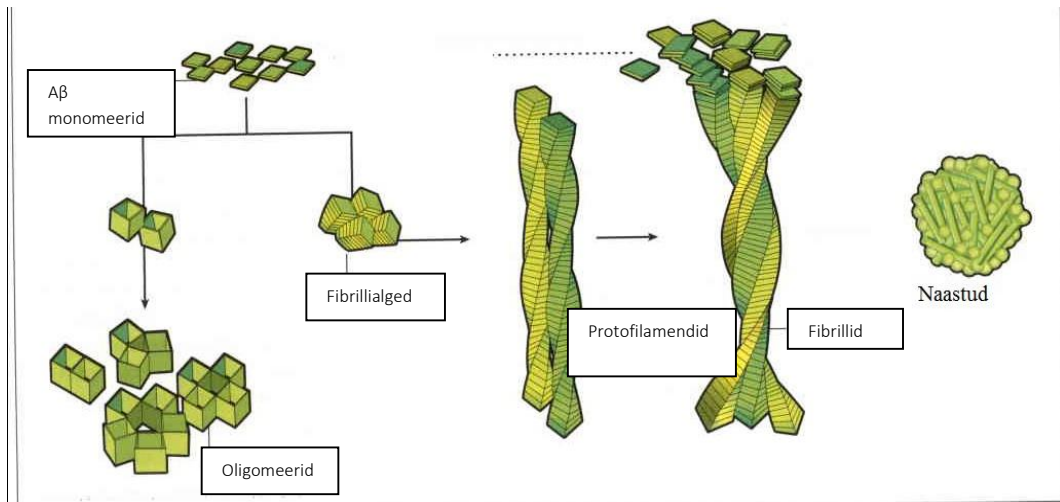


Joonis 2. Vasakul üleval: tau valgust moodustunud kãmbud neuronite sisemuses. Vasakul all: A β -peptiidist moodustunud naastud neuronite umber. Paremalt uestal: terve aju lãbilõige. Paremalt keskel: AT keskmises staadiumis oleva aju lãbilõige. Paremalt all: AT lõppstaadiumis oleva aju lãbilõige. Allikas: Ahaf 2012. Autor: Bob Morreale

1.2. AMÜLOIDKASKAADI HÜPOTEES

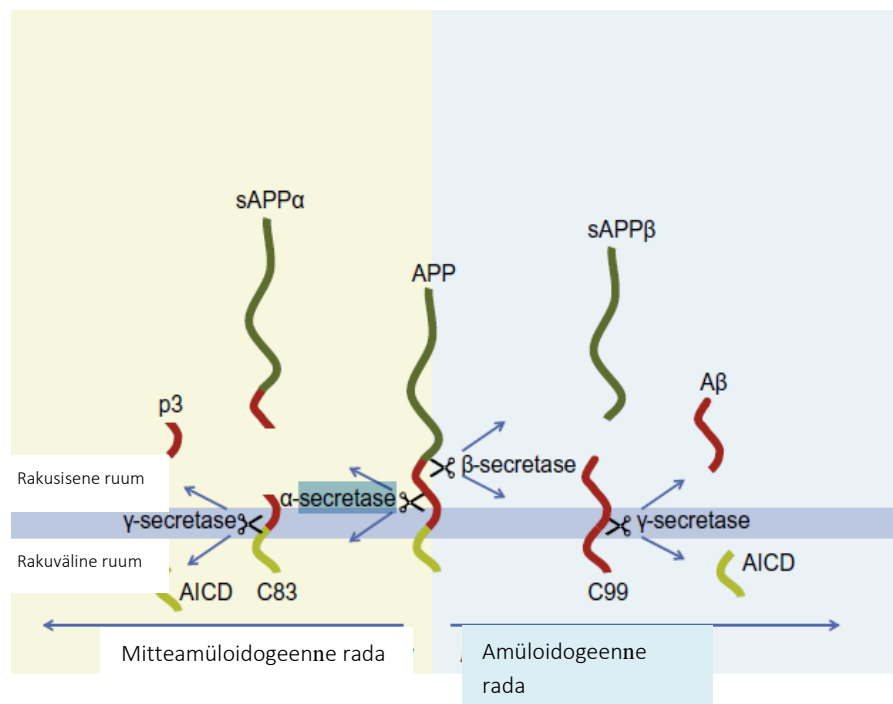
A β moodustatakse suurest valgust nimega APP (*amyloid precursor protein*). Arvatakse, et APP funktsioon kehas on seostuda teiste valkudega rakkude pinnal või aidata rakkudel üksteisega seostuda (Genetics home reference 2013). Sekretaasid on ensüümid, mis lõikavad valgu mitmeteks lõikudeks, mille üks produkt on A β peptiid. A β -peptiidid võivad agregeeruda. Amüloidi kaskaadi hüpoteesi on mitmeid. Üks populaarsemaid on oligomeerne hüpotees, mille põhimõte on, et oligomeerid on neuronitele toksilised. Hiljem moodustavad oligomeerid naaste, kuid toksilised ei ole naastud, vaid oligomeerid, mis on naastu moodustanud. (Rosenzweig 2011). Teine hüpotees keskendub aga fibrillide tekkele, mis võib olla amüloidsete naastude peamiseks põhjuseks. Amüloidfibrillid on pikad hargnemata 6–20 nm laiad polümeerid, mis on füüsiliselt ja keemiliselt stabiilsed (Goldsbury et al. 2011). Fibrillisatsioonil moodustavad A β -peptiidid β -lehe (*β -sheet*) struktuure, mis viivad suurte fibrillistruktuuride tekkele. Fibrilli pikad hargnemata kanalid on omavahel ühendatud vesiniksidemete abil. On tehtud palju uuringuid nii *in vitro* kui ka *in vivo* ning on leitud, et suurtes kontsentratsioonides on oligomeerid toksilised, kuid madalal

kontsentratsioonil moodustub fibrille oligomeeridest tunduvalt rohkem (Tiiman et al. 2013:8). Joonisel 3 on näha, kuidas A β monomeerid moodustavad fibrille või oligomeere.



Joonis 3. A β peptiidi monomeeride agregeerumine. Allikas: Spektrum: Alzheimer 2012: 48

APP lõikamise sekretaasidega võib jagada kaheks: amüloidogeenseks ja mitteamüloidogeenseks. Joonisel 4 on näidatud APP lõikamine sekretaasidega, kus amüloidogeensel teel lõikab kõigepealt β -sekretaas (β -SECRETASE) ning siis γ -sekretaas, et moodustada vees lahustuv *amyloid precursor protein* β (sAPP β) ja A β (Hamley 2012). 99-aminohappejääteline C-terminaalne fragment (C99) jääb membraaniga seotuks, mille lõikab ära γ -sekretaas (Selkoe and Wolfe 2007).



Joonis 4: APP amüloidogeenne ja mitteamüloidogeenne lõikamine β - ja γ -sekretaasidega, mille üks lõpp-produkt on A β_{42} . Allikas: Tiiman et al. 2013: 3

γ -sekretaasikompleksi kesksed komponendid on preseniliinid, mis kodeeritakse *PSEN*-geenidest. γ -sekretaasi kompleksist sõltub, milline $A\beta$ vorm produtseeritakse. Ülekaalus on tavaliselt $A\beta_{40}$ (80–90%), kuid juhul kui on tekkinud mutatsioonid *PSEN*-geenides, siis on ülekaalus $A\beta_{42}$ (5–10%) produktsioon (Selkoe and Wolfe 2007). Mitteamüloidogeense tee puhul toimub esimene lõikamine α -sekretaasi poolt. See lõikab APP-d 83. aminohappe juurest. Selle tõttu ei saa tekkida amüloidogeenseid $A\beta$ -peptiide. Lõikamisel tekivad sAPP α ning 83-järgiline C-terminaalne fragment (C83). Kui AT haigetel on *APP*-s toimunud mutatsioon, siis α -sekretaas ei lõika enam APP-d $A\beta$ kohalt katki (Hamley 2012). Peamine lahustuv $A\beta$ -vorm veres on $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ on bioloogilistes vedelikes vähem levinud. $A\beta_{42}$ moodustab amüloidnaastu tuuma ning on rohkem agregeerumisvõimeline, seepärast väidetakse, et $A\beta_{42}$ on amüloidogeensem (Tiiman et al. 2013: 4).

Vastavalt amüloidkaskaadi hüpoteesile on $A\beta$ agregeerumine naastudeks võimalik tänu sellele, et $A\beta$ produktsiooni ja lõhustumise vaheline tasakaal on häiritud (Hardy and Selkoe 2002). Amüloidkaskaadi hüpoteesil on veel palju lahtisi otsi. Neuropatoloogilised uuringud ei ole leidnud korrelatsiooni amüloidnaastude tiheduse ning dementsuse süvenemise vahel. Teiselt poolt on leitud ulatuslikud neuronite ja sünapsi kaod AT varasemas staadiumis, mis on tugevamas korrelatsioonis kognitiivsete häirete ja dementsuse staadiumiga. Samuti on leitud ka inimeste ajust, kellel ei esine dementsust, sarnaseid amüloidseid naaste, mis on AT haigetel. Järelikult on APP ning $A\beta$ olemas kõigi inimeste ajus. Erinevuseks on, et lahustunud $A\beta$ hulk AT patsientidel on väiksem kui tervetel, sest AT ajus on $A\beta$ agregeerunud kujul (Hardy and Selkoe 2002).

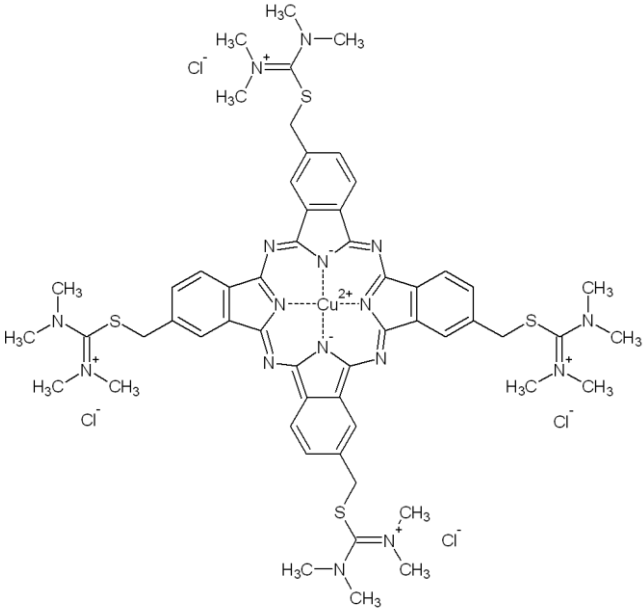
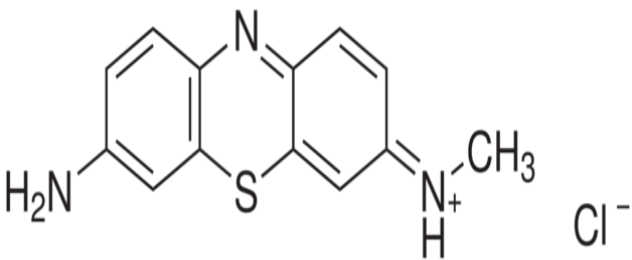
1.3. TAU VALK

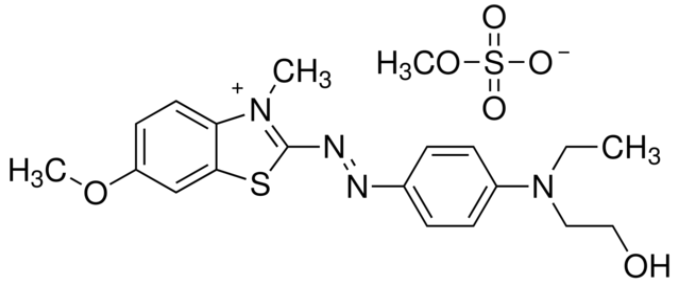
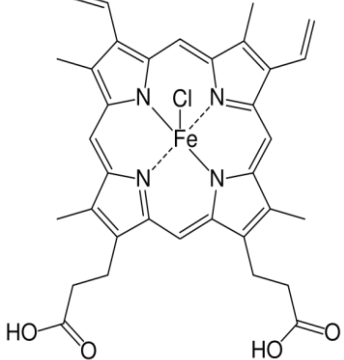
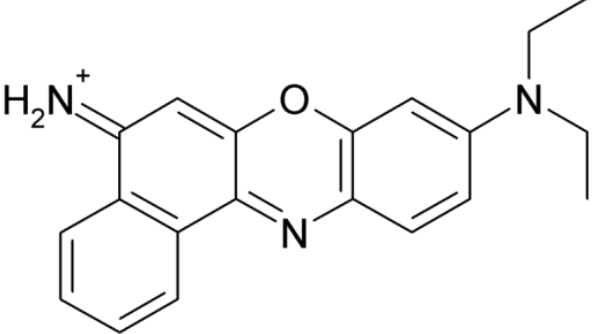
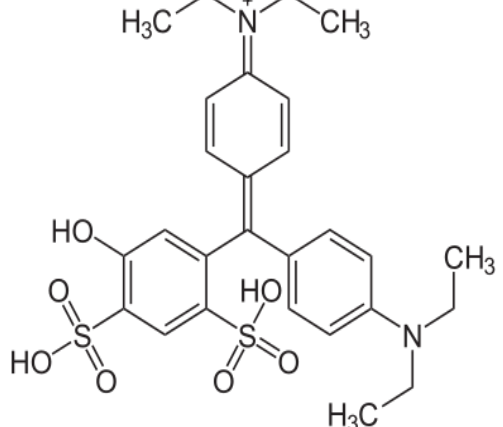
AT üheks põhjustajaks arvatakse olevat neurofibrillaarsed kämbud, mis moodustuvad neuronite sisse. Kämbu põhiline koostisosa on tau valk, mis on osa neuroni tsütoskeletti moodustavate mikrotuubulite struktuurist, mis annab neuronitele toe (Ahaf 2012). Mikrotuubulid transpordivad toitaineid ühest neuroni osast teise. Tau valgu ülesanne on stimuleerida ja stabiliseerida mikrotuubulite tekkimist tubuliinist (Mandelkow 1994). Fosforüleeritud tau valk reguleerib seostumise aktiivsust mikrotuubulitega. Tau valgu optimaalsema funktsiooni tagamiseks on vajalik normaalne fosforüleerituse tase, samas kui hüperfosforüleeritud tau valk kaotab oma bioloogilise aktiivsuse. Hüperfosforüleeritud tau valk põhjustab mikrotuubulite kokkuvarisemise, sest ta on kõik oma funktsioonid kaotanud, ning koondub kämpudeks (Kolarova, Garcia-Sierra et al. 2012). Keha kaitsesüsteemi poolt

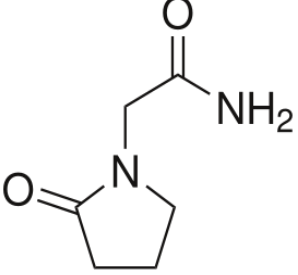
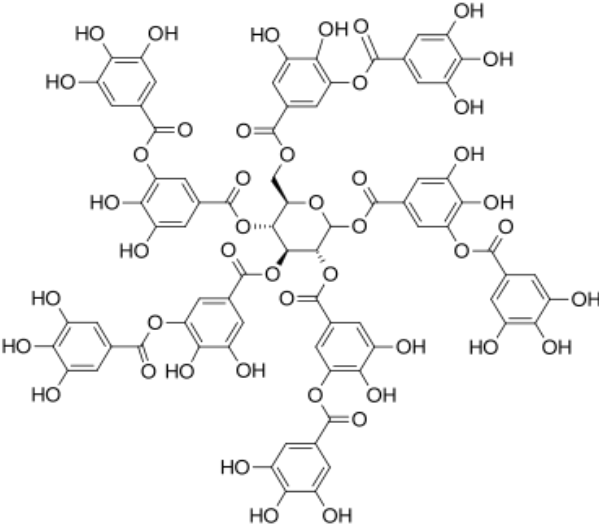
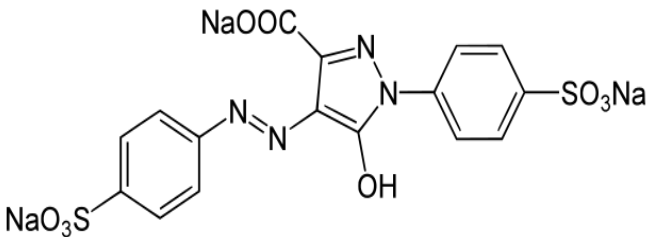
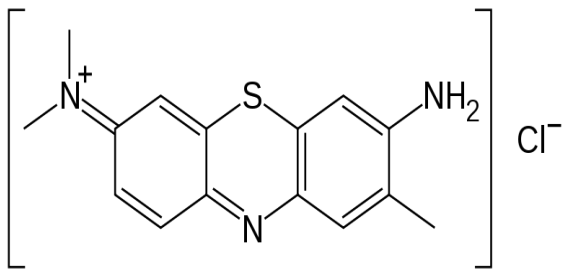
toimuvad reaktsioonid on kämpude proteolüüs ja ubikvitinüleerimine, mis samuti mõjutavad fibrillide teket mingil määral. (Mandelkow 1994:1). Inimese tau valku kodeeriv geen asub 17. kromosoomis. Tau valk seostub ka teiste tsütoskeleti koostisosadega, nagu spektriini ja aktiini kiududega, mis laseb tau-stabiilsel mikrotoubulil seostuda neurofilamentidega, mis piiravad mikrotoubulite võre painduvust (Kolarova, Garcia-Sierra et al. 2012).

1.4. A β AGREGATSIOONI INHIBEERIVAD AINED

A β fibrillisatsiooni takistamine on üks perspektiivsemaid terapeutilisi strateegiaid, mille põhimõte on, et molekul seostub otse A β -peptiidiga, takistab peptiidi fibrillisatsiooni ja toksiliste oligomeeride teket ning viib A β -fibrillid kehast välja. Selle tulemusena hoitakse ära naastude teke ning neuronid jäävad terveks. Aineid, mis seda teeksid, on leitud, kuid tulemused pole olnud piisavalt head, selle tõttu on uute ainete leidmiseks vajalik sõeltestide tegemine. Uurimistöö praktilises osas kasutati kümmet erinevat ainet, mis inhibeerivad A β fibrillisatsiooni.

	<p>Alkiaaniline (Alcian Blue) – M=1298.86 g/mol</p> <p>Veeslahustuv sinakasroheline värv, mis kuulub polüvalentsete põhivärvide hulka. Tahkena on rohekasmusta värvi. pH 5,6 alkiaaniline lahus on toetemperatuuril ebastabiilne. On kõrge lahustuvusega soolalahustes ning jätab pleki aeglasemalt kui teised värvid. Agregeerub madalatel kontsentratsioonidel. Vase ftalotsüaniini rõngas on lahustumatu ning inertne. Kasutatakse polüsahhariidide värvimisel valgus- ja elektronmikroskopeerimisel. Kasutatakse ka želeeriva või määrdainena (Hayat 1993: 80).</p>
	<p>Asuur C (Azure C) –M= 277.78 g/mol</p> <p>Veeslahustuv sinine värv, mille spekter ulatub tsüaanist taevasiniseni, olenevalt kontsentratsioonist. Taevasinist värvi kasutatakse želatiini värvimisel ning meditsiinis kõhre värvimisel. Tahkes olekus on tumeroheline kristalne aine (Chemicaland21 2013)</p>

	<p>Aluseline sinine 41 (Basic Blue 41) – M= 482.57 g/mol</p> <p>Tahkes olekus on tume tsüaani värv pulber. Stabiilne värv, mida kasutatakse akrüülvärvides (World dye variety 2012).</p>
	<p>Hemiin (Hemine) – M= 651.94 g/mol</p> <p>Veeslahustuv rauda sisaldav porfüriin. Punakaspruuni värv aine. Hemiini kasutatakse porfüüria ravimiseks. Kõrvalmõjudeks võib olla paistetud, palavik, ärritus jpt. Hemiin on oluline <i>Haemophilus influenzae</i> kasvaks (Rxlist 2013).</p>
	<p>Niiiluse sinine (Nile Blue /BB12) – 358.845 g/mol</p> <p>Veeslahustuv positiivselt laetud oksüdeerunud värv, mille spekter ulatub sinisest punaseni. Kasutatakse rakkude värvimisel, kus sinine värv toob välja rakutuuma. Kasutatakse ka DNA elektroforeesil ning histoloogilisel värvimisel (Jose, Burgess 2006: 11027).</p>
	<p>Patentsinine V (Patent Blue V) – M=579.71 g/mol</p> <p>Tumesinine sünteetiline toiduvärv. Tahkes olekus on tumelilla pulber. Kasutatakse meditsiinis lümfisõlmede värvimisel. Tekitab 0,9% juhtumitest anafülaktilist efekti, mis võib viia šokini. (Rogler, Rohm et al. 2010).</p>

	<p>Piratsetam (Piracetam) – M = 142.156 g/mol</p> <p>Nootroopiline ravim (intelligentsi tõstja), väga madal toksilisus. Kasutatakse alkoholismi, depressiooni, ärevuse, insuldi ravimisel (Winblad 2005:1).</p>
	<p>Tanniinhape (Tannic acid) – M = 1701.23 g/mol</p> <p>Tanniinhape on üks tanniini tüüp (polüfenool). Veeslahustuv pruunika värvusega nõrk hape, mida põhjustab palju fenoolrühmi struktuuris. Tanniinhapet eraldatakse tarakaunadest, <i>Rhus semialata</i>, <i>Quercus infectoria</i>, Sitsiilia sumac lehtedest. Kasutatakse puidu ja puuvilla värvimisel. Kasutatakse ka rauda sisaldavate metallide korrosiooni takistamiseks. Kasutatakse anti-kõhulahtisuse ravimis. Tanniinhape kiirendab verehüübimist, alandab vererõhku (Gorgas 1909).</p>
	<p>Tartrasiin (Tartrazine) – M = 534.3 g/mol</p> <p>Vees lahustuv sünteetiline sidrunikollane asovärv, mida kasutatakse toiduainetööstuses. Tekitab kõikidest asovärvidest kõige rohkem allergilisi sümptomeid. Arvatakse olevat üheks hüperaktiivsuse põhjustajaks. (UK food guide 2013)</p>
	<p>Toluidiinsinine (Toluidine Blue) – M = 654.575 g/mol</p> <p>Kasutatakse kudede värvimiseks mikroskoopias. Nukleinhapped värvib siniseks ning polüsahhariidid lillaks. Kasutatakse neuropatoloogias (Nicolas et al. 2011).</p>

Joonis 5. Aß inhibeerivate ainete struktuurid. Jooniste allikas: Wikipedia

1.5. PATENT SININE V / PATENT BLUE V

Patent sinine V (PBV) on tumesinine sünteetiline toiduvärv (E131). Seda värvi kasutatakse meditsiinis lümfisõlmede värvimiseks, et neid identifitseerida. PBV võib põhjustada

anafülaktilist šokki ning allergilisi sümptomeid. Esimene anafülaktiline reageering dokumenteeriti 1966. aastal. Pärast seda on täheldatud mitmeid allergilisi sümptomeid, nagu urtikaaria, nahalööve, erüteem, hüpotensiivsed episoodid (madal vererõhk) ja anafülaktiline šokk. 0,7% juhtumitest esines anafülaktiline šokk. Hüpotensiivset episoodi esines 15 minuti ja 2 tunni vahel pärast PBV süstimist (Bezu et al. 2011: 2). Austraalias on selle värvi kasutamine toitudes keelatud, sest arvatakse, et see põhjustab allergilist reaktsiooni. PBV-d kasutatakse ka hambraravis, et leida hambakattu (Wikipeda 2012).

2. MATERJAL JA MEETOD

2.1. MATERJAL

Amüloid beeta peptiid 42 (rPeptide, Bogart, GA, USA)

Etanool, 96%

HEPES, 1M, pH 7,3 (USB Corporation, Cleveland, OH, USA)

NaCl (Scharlau, Hamburg, Saksamaa)

NH₄OH, 25% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Tioflaviin T (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Äädikhape, 99,8% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Testitavad ained:

Alkiaani sinine / Alcian Blue (Loba Chemie, Mumbai, India)

Aluseline sinine 41 / Basic Blue 41 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Asuur C / Azure C (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Hemiin / Hemine (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Niiluse sinine / Nile Blue (Sigma, St. Louis, USA)

Patentsinine V / Patent Blue V, toiduvärv E131 (0.63 % E131)

Piratsetam / Piracetam (TFT, Tallinn, Eesti)

Tanniinhape / Tannic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Tartrasiin / Tartrazine, toiduvärv E102 (Tartrasiini 22%, 76.3% NaCl, Sunset Yellow 1.7%)

Toluidiinsinine / Toluidine blue (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Germany)

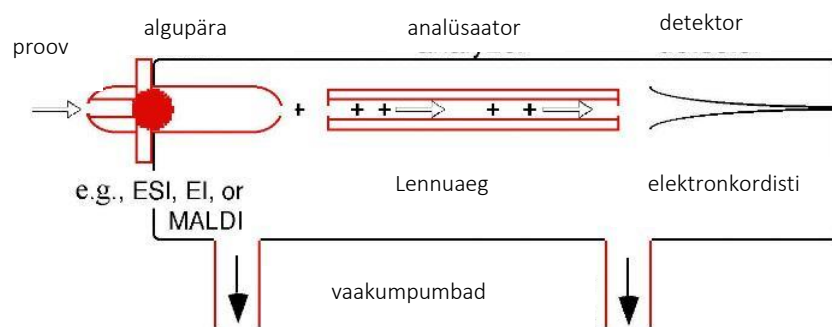
2.2. ELEKTROPIHUSTUS-MASS-SPEKTROMEETRIA (ESI-MS) MÕÕTMISED

A β ₄₂ lahustati 0,02% NH₄OH-s kontsentratsioonini 20 μ M. A β ₄₂ lõppkontsentratsioon kõigis katsetes oli 5 μ M. Ained kaaluti ja lahustati 20%-lises etanoolis 100 μ M kontsentratsioonis ning hoiustati -80 °C juures. Ained, mis kaalumist ei vajanud, lahjendati 100 μ M-ks 20% etanooliga. Edasised lahjendused tehti 20 mM amooniumatsetaathapetiga (pH 7,5). Kaalumised ning ainete lahustamise tegid Kairit Zovo ja Eneken Helk.

Massispektrid koguti ESI-MS instrumendiga (Applied Biosystems). Mõõtmisel kasutatud aparadi parameetrid: voolukiirus 7 μ l/min, ioniseerimisallika gaasi kiirus 50 l/min, kardingaasi kiirus 20 l/min, elektropihusti pinge 5500 V, detektori pinge 2450 V, temperatuur 25 °C. A β ₄₂ fibrillisatsiooni inhibitsiooni uurimiseks testitavate ainete mõjul ESI-MS meetodiga valmistati reaktsioonisegud ainete erinevate lõppkontsentratsioonidega. Kontsentratsioonisõltuvuse uurimiseks oli A β ₄₂ kontsentratsioon 5 μ M ja ainete kontsentratsioonid 10 μ M ja 20 μ M. Et vaadelda protsessi kineetikat, olid ainete ja A β ₄₂ kontsentratsioonid 5 μ M, protsessi jälgiti ESI-MS-ga iga 30 min järel kuni 2 tunni möödumiseni.

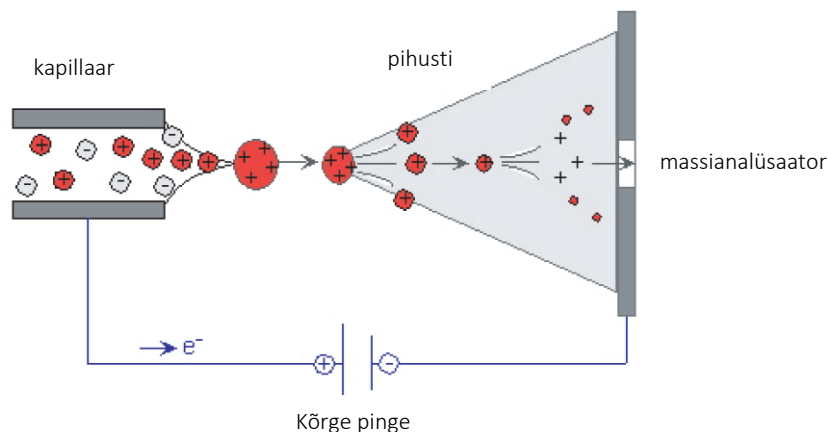
2.2.1. ESI-MSi põhimõte

ESI-MS on analüütiline meetod, mis identifitseerib testitava aine massi saadud massi ja laengu (m/z) suhte põhjal. Elektronpihustus-ionisatsiooni meetodi arendas välja John Fenn 1980. aastate lõpul (Manz et al. 2004: 98). Töös kasutatud ESI-MSi instrumendiga saab määrata ühendi masse 5 ppm (*parts per million*) täpsusega, ehk kui valgu mass on 1 000 000 Da-d (1 aatommassiühik = 1 dalton), siis MS võib eksida +/- 5 Da. Selle põhjal võib öelda, et mass-spektromeetriaga (MS) on võimalik määrata molekulmassi väga täpselt. ESI-MS-ga on võimalik mõõta valke, mille mass ei ole üle 200 000 Da (Proteoomika loeng, Kairit Zovo 2012). MS-is on kolm olulist staadiumi (joonis 6). Kõigepealt moodustatakse molekulist ioonid ehk laetakse kas positiivselt või negatiivselt. Edasi lähevad ioonid massi analüsaatorisse, kus mõõdetakse lennuaega ning sealt edasi antakse signaal detektorisse, kus fikseeritakse lennuaeg (Kerab, Verkerk 2009: 2).



Joonis 6. ESI-MSi tööpõhimõte. Allikas: Proteoomika loeng, Kairit Zovo 2012

Uuritav proov lahustatakse puhvris. Kapillaari süstitakse lahus (70–120 μm) kiirusel 7–100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Kapillaari otsa rakendatakse tugevat pinget (3–6 kV), mis aitab muuta aine tilkadeks (Kebarle, Verkerk 2009: 2). Kui kapillaar on positiivse potentsiaaliga, siis negatiivsed ioonid tõmbuvad kapillaari poole ning positiivsed ioonid suunatakse edasi, moodustades tilgakesi (joonis 7). Temperatuuri ja/või gaasilise lämmastiku koostoimel tilga raadius väheneb ning laengute tihedus tilga pinnal suureneb. Lõpuks jõuab laetud tilga elektrivälja tugevus kriitilisse punkti, tilk lõhkeb väikesteks osadeks ning ioonid paisatakse gaasifaasi (Ho, Lam 2003). Positiivselt laetud ioonid liiguvad edasi vastaselektroodi poole ning massianalüsaatorisse (Caprioli, Sutter 1995). MS-analüüsi puhul ei soovitata kasutada proovis soolasid ja detergente, sest need on ioonsed ning muudavad intensiivsuse madalaks ning müra suureneb. Kui proov sisaldab amiide või aminorühmasid, mis võtavad H^+ vastu, siis kasutatakse positiivse iooni detektsiooni, kus kapillaaril on positiivne potentsiaal. Nendeks aineteks on enamasti valgud. Kui proov sisaldab karboksüülhappe rühma või hüdrüksüülrühmasid, mis annavad ära H^+ , siis kasutatakse negatiivse iooni detektsiooni, kus kapillaari potentsiaal on negatiivne. Selliseks molekuliks on näiteks DNA (Proteoomika loeng, Kairit Zovo 2012). Positiivse detektsiooni korral kasutatakse keskkonnas madalat pH väärtust, et soodustada katioonide moodustumist. Negatiivse detektsiooni puhul kasutatakse kõrgeid pH-väärtuseid (Manz et al. 2004: 99).



Joonis 7. ESI-MSi ioniseerimine. Allikas: Manz et al. 2004: 98

Lennuaja (*time of flight*) massianalüsaatoris antakse ionidele elektrivälja abil kiirendus ning mõõdetakse iooni lennuaega teadaoleva teepikkuse läbimiseks. Iooni kiirus sõltub tema massi ja laengu suhtest. Kergemad osakesed jõuvad detektorini kiiremini kui raskemad. Kui ioon jõuab detektorini, fikseeritakse signaal ning salvestatakse see arvutisüsteemis, kus tehakse kindlaks aine massi ja laengu suhe. Nende andmete põhjal joonistatakse spekter. Spektrit iseloomustavad kitsad ja teravad piigid (Ho et al. 2003: 1; 5).

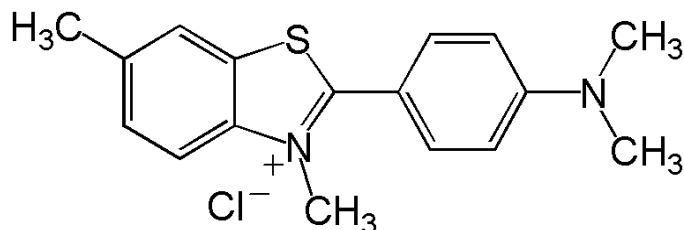
ESI-MSi kõige suurem probleem on *ion suppression* (IS) ehk ionide mahasurumine. ISi põhjustavad peamiselt soolad ja detergendid. Need ained muudavad pihusti tilgakeste moodustamise efektiivsust või aurustumist, mille tõttu tilga raadius ei vähene piisavalt. See omakorda mõjutab laetud ionide hulka gaasifaasis, mis jõuab lõpuks ka detektorisse. On tõestatud, et polaarsemad ained on IS-le vastuvõtlikumad (Annesley 2003: 1). IS toimub ionisatsiooni varajases staadiumis. IS vähendab detektsiooni võimet, mis võib viia valepositiivse tulemuseni (Jessome, Volmer 2006: 3). IS-ga suureneb müra ning intensiivsus langeb.

2.3. TIOFLAVIIN T (ThT) FLUORESTSENTSI MEETOD JA MÕÕTMISED

ThT-d kasutatakse A β -fibrillide visualiseerimiseks ning mõõtmiseks. ThT fluorestsentsi kasutatakse amüloidogeensete haiguste uurimisel, nagu AT, Parkinsoni tõbi ja teist tüüpi diabeet (Kuznetsova et al. 2012: 1). ThT seostub valgufibrilliga, mille tõttu fluorestsentsi intensiivsus tõuseb. ThT-d lisatakse proovidesse mikromolaarses kontsentratsioonis. Fluorestsentsi intensiivsust mõõdetakse, ergastades proovi 450 nm juures ning mõõtes kiirgust (emissiooni) 480 nm juures, kus sidumata ThT ei fluorestseeru (Karafin 2009). Proovi segatakse magnetsegajaga, mis kiirendab fibrilliseerumise protsessi mõnele tunnile. Ilma selleta kestaks katse päevi (Noormägi et al. 2011: 1). ThT-l on mitmeid rakendusi:

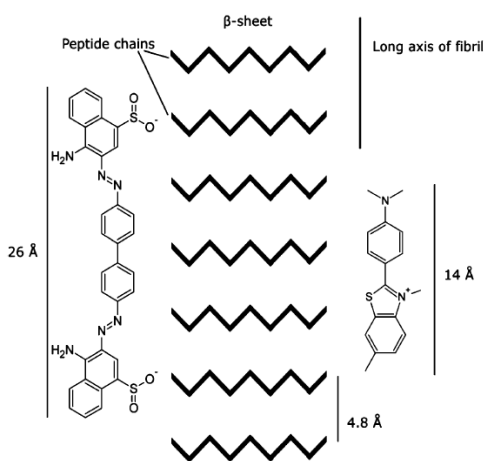
amüloidi tuvastamine koelõikudes, kasutades fluorestsentsmikroskoopi, otsene amüloidfibrillide kasvu jälgimine, kasutades fluorestsensi anisotroopiat, ning *in vitro* amüloidfibrillide moodustumise jälgimine, kasutades fluorestsents-spektroskoopiat (Groenning 2009: 3).

ThT koosneb bensotiasooli ja bensoamiini tsüklist, mis pöörlevad vabalt C-C-sideme ümber (joonis 8). Kui ThT pöörlemist takistada, siis näitab molekul tugevat fluorestsentsi (Biancalana, Koide 2010: 2).



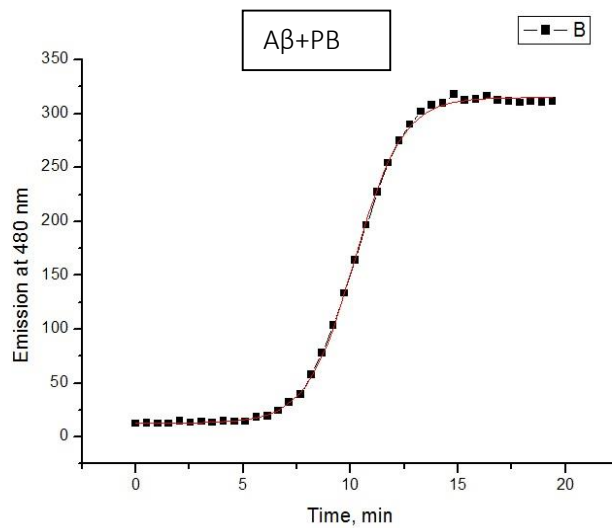
Joonis 8. Thioflaviin T keemiline struktuur. Allikas: Wikipedia

Tänapäeval ei ole ThT seostumisest A β -fibrillidega veel täielikult aru saadud. Üks paljulubav hüpotees on, et ThT võib seostuda kanalitega, mis jooksevad paralleelselt A β -fibrilli teljega. Kanalites võib ThT seostuda monomeeri või dimeerina, moodustades planaarse struktuuri (joonis 9). ThT-l on kerge ligipääs amüloidfibrillide sidumiskohta, indutseerides fluorestsentsi. ThT seostub fibrillidega kiirelt (30 sekundiga). Aeglasem seostumine viitab raskemale ligipääsule suuremates fibrillides (Groenning 2010: 5). Kui ühendi fluorestsents aja möödudes langeb, eemaldub ThT fibrillidelt.



Joonis 9. ThT seostumine A β -fibrillidega. Allikas: Groenning 2010: 6

Joonisel 10 on toodud ThT fluorestsensi iseloomustav graafik. Kiirgus on mõõdetud 480 nM juures. Mõne aja möödudes on ühendi fluorestsents jõudnud platoole ning rohkem ThT molekule A β ₄₂-fibrillidele ei seostu.



Joonis 10. ThT fluorestsents seostumisel A β ₄₂-fibrillidele patentsinise V juuresolekul. Tingimused: PBV 10 μ M, 20 mM Hepes 100 mM NaCl pH 7,3, T = 40 °C

Et välistada valepositiivseid tulemusi, tehti eelkatset, milles kasutati vähemalt 24 tundi varem valmistatud fibrille ehk vanu A β ₄₂-fibrille. Vanadele fibrillidele lisati patentsinine V (PBV) ning vaadeldi, kas PBV konkureerib ThT-ga. Kui fluorestsents langeb, näitab see, et PBV konkureerib ThT-ga ning tõrjub ThT fibrillidelt välja. Kui fluorestsents ei lange, näitab see, et antud meetod on kasutatav PBV mõju uurimiseks fibrillisatsioonile.

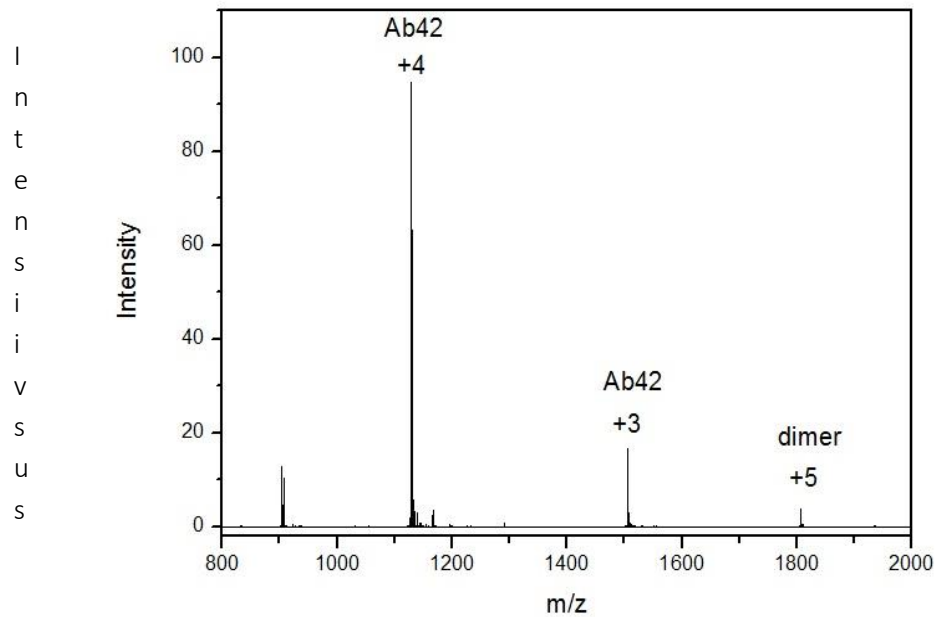
ThT fluorestsentsi katsetes inhibeerimise uurimiseks tehti katseid lahustatud monomeerse A β ₄₂-ga. PBV kontsentratsioonid katsetes oli 0; 10; 20 ja 40 μ M. Katse tegemisel kasutati 5 μ M lahustunud A β ₄₂ ja 5 μ M ThT-d. Puhvriks oli 20 mM Hepes 100 mM NaCl, pH 7,3.

3. TULEMUSED

3.1. A β ₄₂ FIBRILLISATSIOON JA KOMPLEKSI MOODUSTUMINE TESTITUD ÜHENDITEGA

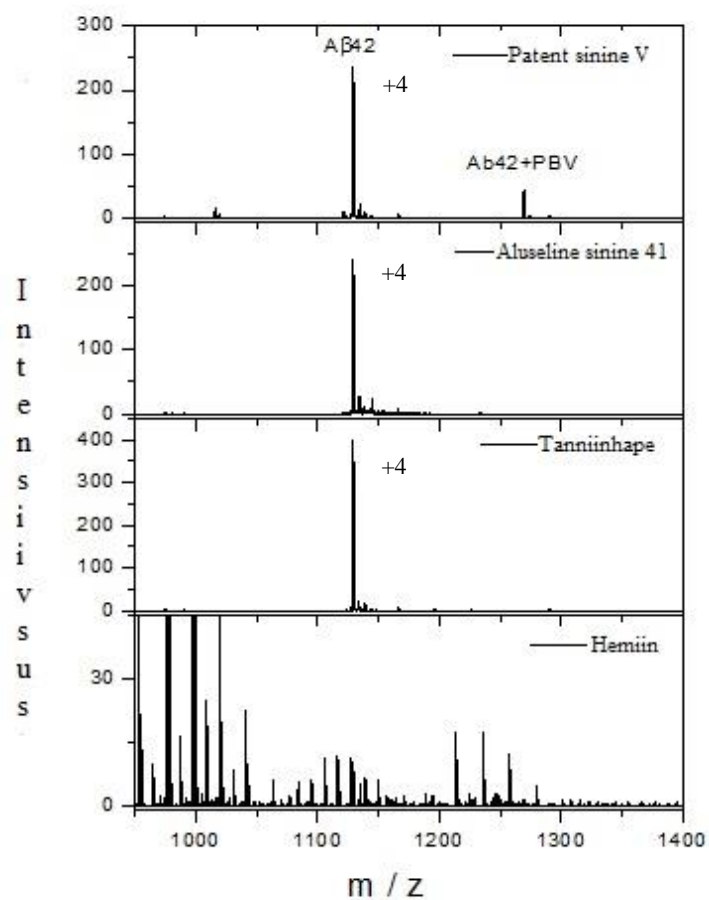
Testitavad ained olid valitud sellised, mis inhibeerivad A β ₄₂ fibrillisatsiooni. Nende ainete inhibeeriv mõju oli määratud A β ₄₂ suhtelise intensiivsuse järgi massispektris (Zovo 2010).

Joonisel 11 on toodud A β ₄₂ piigid laengutega +4 ja +3. A β ₄₂ moodustas dimeeri laenguga +5, millel on aga madal intensiivsus. +4 piigi intensiivsus oli kõige kõrgem, ligikaudu 100.



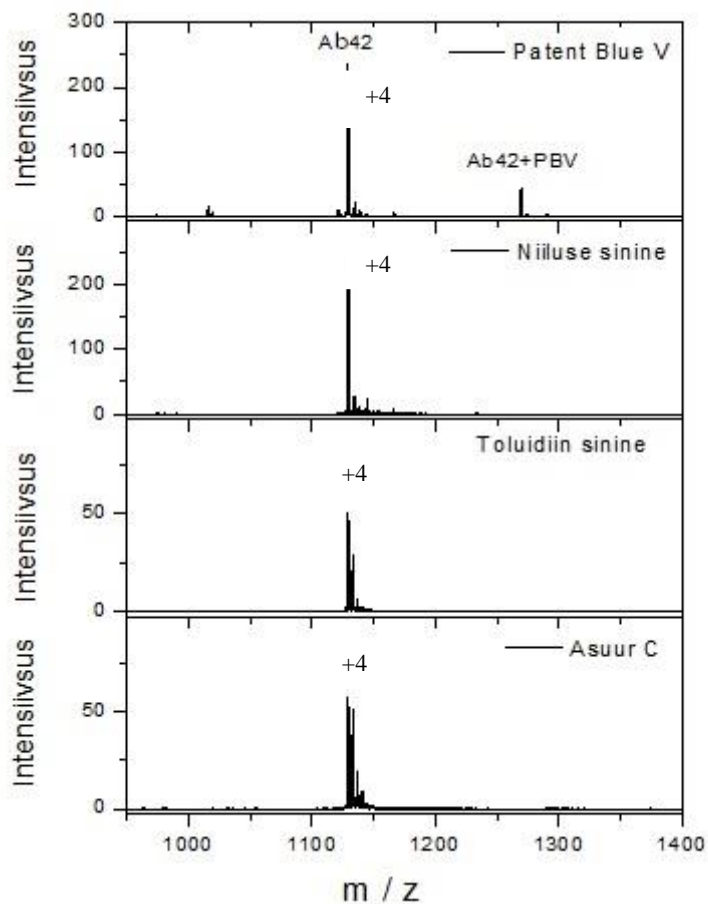
Joonis 11. Aβ₄₂ ESI-MS spekter. Tingimused: 5 μM Aβ₄₂; 20 mM ammooniumatsetaat pH 7,5; T = 25 °C. Joonisel on toodud Aβ₄₂+3 ja +4 laenguvormid, samuti Aβ₄₂ dimeeri +5 laenguvorm

Joonisel 12 on toodud 5 μM PBV, aluselise sinise 41, tanniinhappe ja hemiini massispektrid. Kõikide ainete massispektrid on mõõdetud 60. minutil. Esimesel kolmel ainel on Aβ₄₂ nähtav. Katsetes hemiiniga oli intensiivsus väga madal ja müra kõrge. Arvatavasti hemiin lagunes ega olnud suuteline kompleksi moodustama. Need detekteeritud massid võivad olla hemiini laguproduktid. Aluselise sinise 41-ga ja tanniinhappega oli Aβ₄₂ intensiivsus kõrge, kuid kompleksi siiski ei moodustunud. Ainuke aine, mis positiivse tulemuse andis, oli PBV. Aβ₄₂ mass on 4514.34 g/mol ning ESI-MS detekteeris massi, mis on suurem kui Aβ₄₂ üksi, 5074.51 g/mol, ning nende masside vahe on PBV mass. Järelikult on moodustunud nende kahe aine vaheline kompleks. See viitab 1:1 fibrillisatsiooni inhibitsiooni mehhanismile.



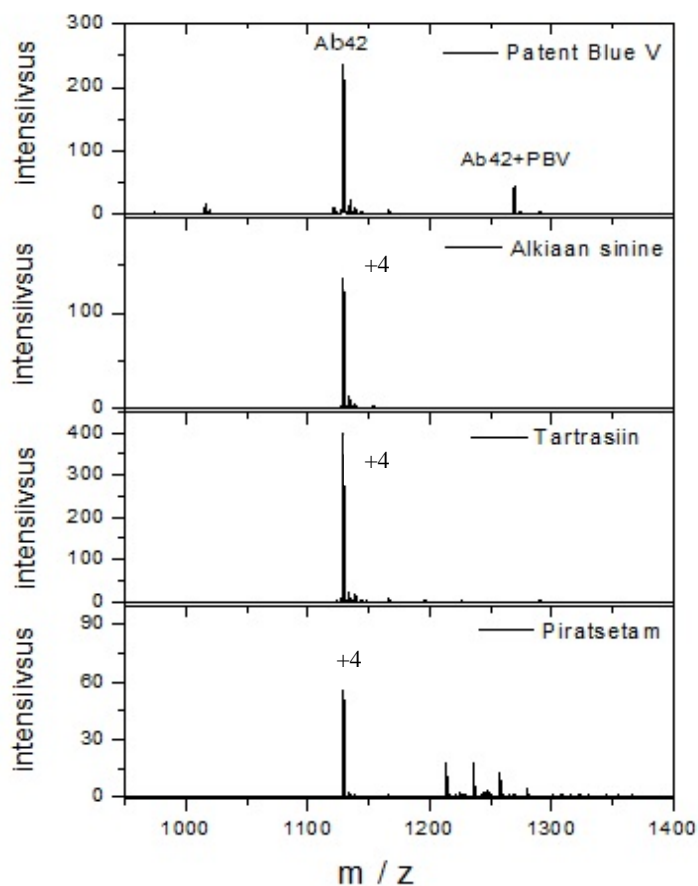
Joonis 12. Patent sinine V, aluseline sinine 41, tanniinhape ja hemiini massispektrid. Tingimused: 5 μ M ained; 5 μ M $A\beta_{42}$; 20 mM ammoonium atsetaat pH 7,5; t=60 min; T= 25 °C

Joonisel 13 on toodud peale PBV veel Niiluse sinise, toluidiinsinise ja asuur C massispektrid. Need ühendid ei moodustanud $A\beta$ -ga komplekse või ei olnud ESI-MS-ga neid võimalik tuvastada. Asuur C spektril on $A\beta_{42}$ intensiivsus madalam ning müra tase võrreldes teistega suurem.



Joonis 13. Patent sinine V, Niiluse sinine, toluidiin sinine, asuur C massispektrid. Tingimused: 5 μ M ained; 5 μ M $A\beta_{42}$; 20 mM ammoonium atsetaat pH 7,5; t = 60 min; T= 25 $^{\circ}$ C

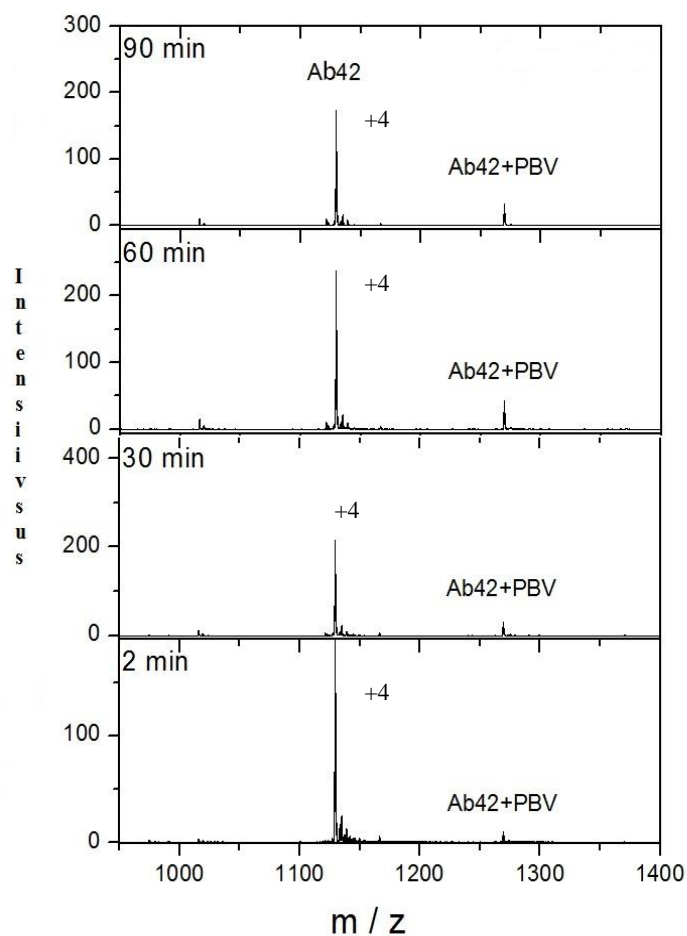
Joonisel 14 on toodud peale PBV veel alkaansinise, tartrasiini- ja piratsetamispektrid. Ka need ained ei moodustunud $A\beta_{42}$ -ga komplekse. Piratsetamianalüüsil oli näha madalat piiki, mille mass oli 4662,1 g/mol, kuid kompleksimass, mis koosneks $A\beta_{42}$ -st ja piratsetamist, peaks olema 4656 g/mol. Katses kasutatud aine võis sisaldada veel teisi ühendeid, millest võis olla tingitud ka suurema massiga kompleks.



Joonis 14. Patentsinise V, alkiiaan sinise, tartrasiini ja piratsetami massispektrid. Tingimused: 5 μ M ained; 5 μ M A β ₄₂; 20 mM ammoonium atsetaat pH 7,5; t = 60 minutit; T = 25 °C

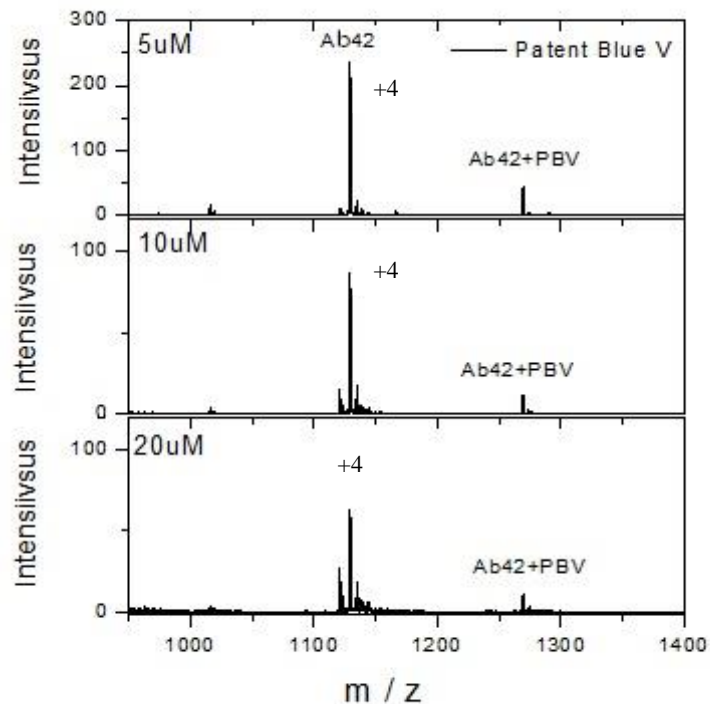
3.1.2. Patentsinise V ja A β ₄₂ vahelise kompleksi moodustumine

Kümnest testitavast ainet oli patentsinine V ainuke, mis kompleksi moodustas. Peale 1:1 suhtes seostumise moodustas A β ₄₂ komplekse ka kahe PBV-ga ja kolme PBV-ga, nende komplekside massid olid vastavalt 5636 g/mol ja 6196 g/mol. Kuna A β ₄₂ moodustas ka dimeere, siis leidis kompleks massiga 9589 g/mol, mis on A β ₄₂ dimeeri (9028,5 g/mol) ja PBV kompleksi mass. Kineetikakatses koguti proovide massispektrid ajapunktidel 2, 30, 60, 90 ja 120 minutit. Üldiselt on kõikidel ajapunktidel moodustunud kompleksi suhteline intensiivsus sama (joonis 15). Järelikult kompleks moodustub kiiresti ning kompleksi moodustumine ajas ei muutu.



Joonis 15. Patentsinise V kompleksi moodustumise sõltuvus ajast. Tingimused: 5 μM $\text{A}\beta_{42}$; 5 μM PBV; 20 mM ammoonium atsetaat pH 7,5; $t = 2, 30, 60, 90$ min; $T = 25$ $^{\circ}\text{C}$

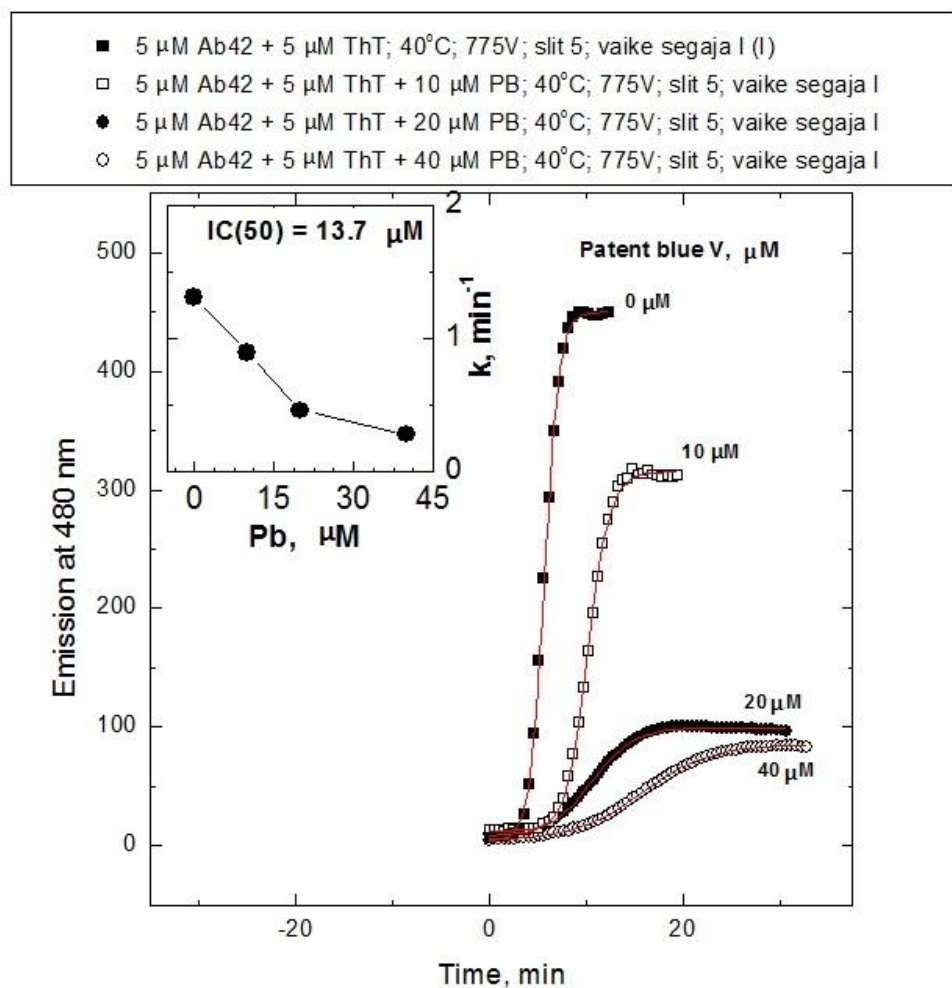
Kontsentratsioonikatsetes oli testitava aine kontsentratsioonideks 5 μM , 10 μM ja 20 μM ning $\text{A}\beta_{42}$ kontsentratsioon 5 μM . Kõige ebasobivamaks kontsentratsiooniks osutus 20 μM PBV, sest $\text{A}\beta_{42}$ piigi intensiivsus on väga madal ja seetõttu oli madal ka kompleksi piik. $\text{A}\beta_{42}$ madal intensiivsus võis olla tingitud sellest, et PBV tekitab ionset supressiooni. Kõige sobivamaks kontsentratsiooniks osutus katsete põhjal 5 μM PBV (joonis 16).



Joonis 16. Patentsinise V ja A β ₄₂ seondumise sõltuvus kontsentratsioonist. Tingimused: 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M PBV; ammoniumatsetaat pH 7,5; t = 60 min; T = 25 °C

3.2. TIOFLAVIIN T KUI PATENTSINISE V JA AB42 VAHELISE KOMPLEKSI MOODUSTUMISE INDIKAATOR

ThT fluorestsentsi eelkatses uuriti PBV konkureerimist ThT-ga seostumisel A β ₄₂-fibrillidele. Katsel lisati 5 μ M A β ₄₂-fibrillidele ja 5 μ M ThT-segule PBV-d erinevates kontsentratsioonides iga natukese aja tagant. Kontsentratsioonideks olid 0,5; 1; 2; 4 ja 10 μ M PBV. Katse käigus fluorestsents ei langenud ja järelkult konkureerimist ei toimunud. Kuna PBV ThT-ga ei konkureeri, on võimalik ThT meetodiga mõõta PBV inhibeerivat toimet A β ₄₂ fibrillisatsioonile. Edasistes katsetes kasutati lahustatud monomeerset A β ₄₂. Joonisel 18 on toodud PBV kontsentratsioonist sõltuv A β ₄₂ fibrillisatsiooni inhibeerimine kasutades ThT meetodit. Umbes 20. minutiks olid kõik graafikud platoole jõudnud ning fluorestsents püsis stabiilsena. See näitab, et A β ₄₂ fibrillisatsiooni protsess on lõpule jõudnud ning rohkem fibrille juurde ei teki. On näha, et PBV inhibeerib A β ₄₂ fibrillisatsiooni ning ei lase fibrillidel moodustuda, sest PBV kontsentratsiooni suurenemisega ThT fluorestsents langeb (joonis 17). IC₅₀ on suurus, mis näitab inhibiitori kontsentratsiooni ehk kui palju teatud ainet on vaja, et teatud bioloogilist protsessi inhibeerida 50% võrra (GlaxoWellcome Pharmacology guide 2012). PBV-l on IC₅₀ 13,7 μ M, ehk see on väga väike kogus, mis kulub poole A β ₄₂ agregatsiooni inhibeerimiseks.



Joonis 17. A β ₄₂ fibrillisatsiooni inhibeerimine patentsinise V erinevatel kontsentratsioonidel ThT fluorestsentsi meetodil. Tingimused: 5 μ M A β ₄₂; 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M PBV; 5 μ M ThT; T = 40 °C; U = 775 V

3.3. ARUTELU

Kõikidest testitud ainetest näitas PBV ainukesena kompleksi moodustumist A β ₄₂-ga. Kompleksi moodustumine PBV-ga ajas ei muutu, sest ESI-MSi katsetes olid kompleksipiikide suhtelised intensiivsused erinevates ajapunktides võrdsed. Komplekse moodustus nii ühe, kahe kui ka kolme PBV-ga. 1:1 vormi tekkis 21%, teisi vorme tekkis vähem, kokku alla 5% (4,3% 1:2 PBV-ga vormi ning 0,4% 1:33 PBV-ga vormi). 2 või 3 PBV seostumine vähendab PBV efektiivsust, sest kõikidele A β ₄₂-le ei pruugi jätkuda inhibiitorit, kui lahuses on PBV ja A β ₄₂ molekule võrdselt. Seega peaks PBV kontsentratsiooni lahuses tõstma. Katsetest selgus, et PBV on võimeline moodustama

kompleksi ka $A\beta_{42}$ dimeeriga, kus $A\beta_{42}$ dimeer on seostunud ainult ühe PBV molekuliga, mis tõstab PBV efektiivsust. Kõige sobilikumaks PBV kontsentratsiooniks osutus $5\mu\text{M}$ PBV, sest kõrgematel kontsentratsioonidel kompleksi osakaal ei suurenenud, kuid $A\beta_{42}$ intensiivsus muutus madalamaks. Intensiivsuse langus võib olla tingitud sellest, et PBV tekitab ioonset supressiooni.

Hemiini massispektrid olid üsna madala intensiivsusega ning müratase oli kõrge. Võib kahtlustada, et hemiin võis laguneda ning detekteeritud massid võisid kuuluda laguneproductidele. Piratsetam küll moodustas kompleksi, kuid kompleksiga oli veel seostunud lisühend. Teised uuritud ühendid komplekse ei moodustanud. Üks põhjus võib olla see, et nende ühendite puhul ei olnud seostumine $A\beta_{42}$ -ga nii tugev ning kompleks lagunes mõõtmise käigus. Järelikult on nende ainete moodustatud komplekside uurimine ESI-MSi meetodiga raskendatud.

ThT eelkatses ei tõrjunud PBV ThT-d $A\beta_{42}$ -fibrillilt välja, järelikult on võimalik ThT meetodiga uurida PBV inhibeerivat toimet $A\beta_{42}$ fibrillisatsioonile. ThT katsed näitasid, et PBV on tugev inhibiitor ning on vaja $13,7\mu\text{M}$ PBV-d et inhibeerida $A\beta_{42}$ fibrillisatsiooni poole võrra, mis on väike ainekogus ravimi jaoks ning seetõttu oleks sobilik ravimikandidaat. Ravimi välja töötamiseks on vajalikud ühendi edasised uuringud. Näiteks *in vitro* katsed neuronitega, et uurida, kuidas PBV rakke mõjutab. Samuti on vajalik uurida, kas PBV moodustab inimesele toksilisi ühendeid ning kas PBV läbib aju-vere barjääri.

KOKKUVÕTE

Alzheimeri tõbi (AT) on vanusest sõltuv pöördumatu ja aeglaselt süvenev närvisüsteemi haigus. Alzheimeri tõve põhjustajaks peetakse amüloidsete naastude ning neurofibrillaarsete käämpude tekkimist, mis tapavad närvirakke. Naaste moodustavad amüloid-beeta peptiidi ($A\beta$) fibrillid, käämpu aga tau valk. Kõige perspektiivikam ravistrateegia on takistada $A\beta$ fibrillisatsiooni. Uurimistöö põhieesmärk oli teha uuringud kümne erineva ainega ning uurida nende seostumist ja kompleksi moodustumist $A\beta_{42}$ -peptiidiga. Samuti oli eesmärk uurida, millise mehhanismi kaudu inhibeeriv mõju avaldub. Hüpotees oli, et kui tekib kompleks aine ja $A\beta_{42}$ vahel, siis see kompleks inhibeeribki $A\beta_{42}$ fibrillisatsiooni. Hüpotees leidis kinnitust vaid ühe ainega, milleks on PBV. ESI-MS-ga uuriti kompleksi moodustumist, mille detekteerimine viitas 1:1 fibrillisatsiooni inhibitsiooni tekkele. Kuid leidis ka 1:2 ja 1:3 $A\beta_{42}$ ja PBV komplekse, mis vähendavad inhibitsiooni efektiivsust. Ka ThT fluorstsentsi katsed näitasid, et PBV ei lase $A\beta_{42}$ -fibrillidel tekkida. Järelikult sobib

PBV A β ₄₂ fibrillisatsiooni inhibiitoriks. Ravimi väljatöötamiseks oleks vaja veel teha täiendavaid teste. Vajalik oleks uurida, kuidas PBV mõjutab rakke, kas PBV moodustab toksilisi ühendeid ning kas PBV läbib aju-vere barjääri.

KASUTATUD MATERJALID

1. Alexandrescu, A.T., 2005. Amyloid accomplices and enforcers. Protein Sci. 14, 1–12.
2. Alzheimer's resource (2012) Loetud: <http://www.alzheimers-resource.com/history-of-alzheimers.html> 20.02.2013
3. Ahaf (2012) Diagnoos. Loetud: <http://www.ahaf.org/alzheimers/about/diagnosis.html> 19.01.2013
4. Ahaf (2012) Meditsiinilised illustratsioonid. Loetud: http://www.ahaf.org/alzheimers/about/understanding/medical_illustrations.html 19.01.2013
5. Annesley, T.M (2003) Ion Suppression in Mass Spectrometry.
6. Armstrong, R.A. (2010) The Pathogenesis of Alzheimer's Disease: A Reevaluation of the "Amyloid Cascade Hypothesis".
7. Berrios, E. (2004) Alzheimeri ajalugu. Loetud: http://genome.wellcome.ac.uk/doc_WTD020951.html 19.01.2013
8. Bezu, C et al. (2011) Anaphylactic response to blue dye during sentinel lymph node biopsy.
9. Biancalana, M, Koide, S. (2010) Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils.
10. Bionutritional Care (2012). Loetud: http://www.bionutritionalcare.com/?page_id=35 20.02.2013
11. Blennow, K et al. (2006) Alzheimer's Disease.
12. Brookmeyer, R et al. (2007) Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. Loetud: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19595937> 19.01.2013
13. Butterfield, D.A et al. (2001) A β peptide, Oxidative stress and Alzheimer's Disease. Loetud: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2885559/> 19.01.2013
14. Caprioli, R, Sutter, M 1995 <http://tera.chem.ut.ee/~jpenchuk/documents/kursused/Mass-spec/2.htm>
15. Chemical Land 21 (2013). Loetud: <http://www.chemicalland21.com/specialtychem/finechem/AZURE%20B.htm> 22.02.2013

16. Crystal, H. (2012) Alzheimeri tõve põhjustavad, staadiumid ja sümptomid. Loetud: http://www.medicinenet.com/alzheimers_disease_causes_stages_and_symptoms/article.htm#tooc 19.01.2013
17. Genetics home reference (2013). Loetud: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/APP> 20.02.2013
18. Glaxo Wellcome Pharmacology guide. Loetud: http://www.pdg.cnb.uam.es/cursos/Barcelona2002/pages/Farmac/Comput_Lab/Guia_Glaxo/index.html 7.02.2013
19. Goldsbury et al. (2011) Amyloid structure and assembly: insights from scanning transmission electron microscopy.
20. Gorgas, F.J.S (1909) Dental Medicine. A Manual of Dental Materia Medica and Therapeutics. Loetud: <http://chestofbooks.com/health/materia-medica-drugs/Manual-Of-Dental-Materia-Medica-And-Therapeutics/Acidum-Tannicum-Tannic-Acid-Tannin.html#USEHlrUZnIW> 22.02.2013
21. Guimarães, F.M et al. (2009) Neurobiological pathways to Alzheimer's disease: amyloid-beta, Tau protein or both?. Loetud: http://www.demneuropsy.com.br/detalhe_artigo.asp?id=167 19.01.2013
22. Groenning, M (2010) Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils- current status.
23. Hamley, I.W. (2012) The Amyloid Beta Peptide: A Chemist's Perspective. Role in Alzheimer's and Fibrillization.
24. Hayat, M.A. (1993) "Stains and cytochemical methods". Loetud: <http://books.google.co.in/books?id=oGj7MLioFIQC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false> 21.02.2013
25. Hardy, J Selkoe, DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.
26. Ho, CS et al. (2003) Electrospray mass spectrometry: principles and clinical applications.
27. Hudson, S.A et al. (2009) The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds.
28. Jessome, L.L, Volmer, D.A (2006) Ion Suppression: A Major Concern in Mass Spectrometry.
29. Jose, J, Burgess, K (2006) Benzophenoxazine-based fluorescent dyes for labeling biomolecules.
30. Karafini, A. (2009) Alzheimeri amüloid-b peptiidi fibrillatsioon ja agregatsioon Zn(II) ja Cu(II) toimetel. Magistritöö.

31. Kebarle, P Verkerk, H (2008) Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now.
32. Kolarova, M et al. (2012) Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease.
33. Kuznetsova, I.M et al. (2012) Analyzing Thioflavin T Binding to Amyloid Fibrils by an Equilibrium Microdialysis-Based Technique.
34. Mandelkow, E (1994) Tau protein and Alzheimer's Disease.
35. Manz, P et al. (2004) Bioanalytical Chemistry.
36. Mattson, M. P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. Nature, lk 631–9.
37. National Institut of Neurological Disorders and Stroke (2012) Alzheimeri tõbi. Loetud: <http://www.ninds.nih.gov/disorders/alzheimersdisease/alzheimersdisease.htm> 19.01.2013
38. National Institute on Aging (2012) Alzheimeri tõbi. Loetud: <http://www.nia.nih.gov/alzheimers/publication/alzheimers-disease-fact-sheet> 19.01.2013
39. Nicholas, SB et al. (2011) Using stereologic techniques for podocyte counting in the mouse: shifting the paradigm.
40. Nordqvist, C. (2009) Alzheimeri ajalugu. Loetud: <http://www.medicalnewstoday.com/articles/159442.php> 19.01.2013
41. Noormägi, A et al. (2011) Interference of low-molecular substances with the thioflavin-T fluorescence assay of amyloid fibrils.
42. Raber, J et al. (2004) ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology.
43. Riggs, L. (2006) Thioflavin T Binding to Amyloid Fibrils.
44. Rogler, V et al. (2010) Patentblau V.
45. Rosenzweig, A. (2011) Amyloid cascade hypotesis of Alzheimer's disease. Loetud: <http://alzheimers.about.com/od/whatisalzheimers/a/Amyloid-Cascade-Hypothesis-Of-Alzheimers-Disease.htm> 19.01.2013
46. Rxlist (2013). Loetud: <http://www.rxlist.com/panhematin-drug.htm> 22.02.2013
47. Selkoje, DJ Wolfe, MS. Presinilin: running with scissors in the membrane.
48. Sigmaaldrich (2013) Azure C. Loetud: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/11667?lang=en®ion=> 19.01.2013
49. Sigmaaldrich (2013) Basic Blue 41. Loetud: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/324825?lang=en®ion=EE> 19.01.2013
50. Zovo, K (2012) Proteoomika loeng „Basic ESI and MALDI“

51. Talaga, D (2006) Amüloid. Loetud: <http://talaga.rutgers.edu/research/amyloid.php> 19.01.2013
52. Tiiman, A et al. (2013) The missing link in the amyloid cascade of Alzheimer's disease – Metal ions.
53. UK Food Guide (2013). Loetud: <http://www.ukfoodguide.net/e102.htm> 22.02.2013
54. Wikipedia (2013) Alcian blue. Loetud: http://en.wikipedia.org/wiki/Alcian_blue 19.01.2013
55. Wikipedia (2013) Hemine. Loetud: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hemin.svg> 19.01.2013
56. Wikipedia (2013) Nile Blue. Loetud: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nile_Blue.png 19.01.2013
57. Wikipedia (2013) Patent Blau V. Loetud: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Patentblau_V.svg 19.01.2013
58. Wikipedia (2013) Piracetam. Loetud: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Piracetam_.svg4 19.01.2013
59. Wikipedia (2013) Tannic acid. Loetud: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Tannic_acid.svg 19.01.2013
60. Wikipedia (2013) Tartrazine. Loetud: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Tartrazine.svg> 19.01.2013
61. Wikipedia (2013) Tolonium chloride. Loetud: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Tolonium_chloride.svg 19.01.2013
62. Wikipedia (2013) Valgu agregatsioon. Loetud: http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_aggregation 19.01.2013
63. Winblad, B (2005) Piracetam: a review of pharmacological properties and clinical uses.
64. World dye variety (2012). Loetud: <http://www.worlddyevariety.com/basic-dyes/basic-blue-41.html> 22.02.2013