

HUGO TREFFNERI GÜMNAASIUM

MARTTI VANKER

12.C KLASS

LENTIVIIRUSLAADSETE PARTIKLITE ELUTSÜKLI INHIBEERIMINE GALEENILISTE VEDELPREPARAATIDE ABIL

JUHENDAJAD: PhD EVA ŽUSINAITE, SAIMA KAARNA

SISSEJUHATUS

Tänu teaduse ja tehnoloogia tormilisele arengule viimase viie kümnendi jooksul on viirused viimaks leidnud väljundeid inimsoo hüvanguks näiteks geeniteraapia näol. Sellegipoolest on viirused tuntumad eelkõige kui rakusisesed parasiidid, mis peremeesorganismile tihti vaevusi tekitavad. Viiruste põhjustatud infektsioonid toovad kaasa ka palju surmajuhtumeid. Näitlikustamiseks toogem välja rõugeviiruse epideemia, mille tõttu hukkus ainuüksi 20. sajandil vähemalt pool miljardit inimest. Võrdlusmomendina saab välja tuua, et kõik sõjalised konfliktid selles ajavahemikus nõudsid hinnanguliselt vaid 150 miljonit inimest. [1] Rõugeviirus suudeti aga lõppkokkuvõttes alistada, sest juba 1980. aastal kuulutas Maailma Terviseorganisatsioon rõuged kõrvaldatuks, ja seda kõike tänu intensiivsele ülemaailmsele immuniseerimisprogrammile [2].

Võrreldes eelmise näitega on tunduvalt edutum olnud retroviiruste vastaste vaktsiinide loomine. Üks aktuaalsemaid retroviiruseid on inimese immuunpuudulikkuse viirus (*Human Immunodeficiency Virus*, HIV), mille kandjate arvuks hinnati 2015. aastal 36,7 miljonit inimest ning mille tagajärjel suri samal aastal omandatud immuunpuudulikkuse sündroomi (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*, AIDS) tõttu hinnanguliselt 1,1 miljonit inimest [3]. HIV-d ei ole võimalik organismist täielikult kõrvaldada, kuid retroviiruse vastase keemiaravi HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) abil saab viiruse levikut organismis kontrolli all hoida. Eelnimetatud raviprogramm seisneb mitmete keemiliste ainete kasutamises, mis pärsvad HI-viiruse elutsükli erinevaid protsesse [4]. Paraku on aga tõsiasi, et HIV on oma teatud geneetiliste iseärasuste tõttu äärmiselt kiiresti evolutsioneeruv ning seetõttu on teada juhtumeid HAART ravimite suhtes resistentsetest HI-viirustüvedest. Üks ilmselge lahendus

probleemile oleks töötada välja uusi antiretroviraalseid ühendeid, mida HIV-vastases ravis kasutada. Mõistlik on pöörata pilk looduse poole, sest hinnatakse, et praegugi umbes 40% kõigist ravimpreparaatidest on taimse päritoluga [5].

Käesoleva uurimistöö põhieesmärgiks on uurida ja iseloomustada taimsete vedelpreparaatide, mis on osalt autori enda poolt valmistatud, otsest mõju lentiviiruslaadsete partiklite elutsüklile ning määrata preparaatide antiretroviraalne aktiivsus.

Põhieesmärgi täitmiseks jaotati põhieesmärk omakorda kolmeks alameesmärgiks: anda käsitletava uurimisobjekti mõistmiseks ülevaade lentiviiruste olemusest, levikust ja infektsioonitsüklist; valmistada teekummelist, lõhnast kummelist ja mustast pässikust etanooltõmmised; analüüsida kõigi preparaatide tsütotoksilisust rakukultuurile; analüüsida kõigi preparaatide otsest mõju lentiviiruslaadsete partiklite elutsüklile.

Eesmärkidest lähtuvalt sõnastati kolm uurimisküsimust:

- 1) Kui suures ulatuses on valimis olevad preparaadid võimelised lentiviiruslaadsete partiklite elutegevust otseselt inhibeerima võrreldes kliiniliselt kasutatava retroviirusvastase ravimiga?
- 2) Mil moel erinevad teekummeli ja lõhnava kummeli etanooltõmmiste antiretroviraalsed omadused?
- 3) Mil moel erinevad autori valmistatud musta pässiku tinktuuri ja apteekides müüdava musta pässiku ekstrakti Befungin antiretroviraalsed omadused?

Praktilisele osale eelnevalt ja referatiivse osa kirjutamiseks tutvuti asjakohase teaduskirjandusega. Eesmärkide täitmiseks ja küsimustele vastuste leidmiseks teostati laboratoorseid katseid Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudi (TÜTI) rakendusviroloogia laboris ja farmaatsia instituudi õppelaboris 2016. a juulist 2017. a maini. Uurimistöö praktilise osa teostamist TÜTI viroloogia laborites võimaldas rakendusviroloogia uurimisrühma juht professor Andres Merits ja farmaatsia instituudi õppelaboris farmaatsia instituudi juhataja professor Ain Raal, kes oli ka antud uurimistöö konsultant.

Autor on tänulik kõigile, kes antud uurimistöö valmimisse oma panuse on andnud. Esmajärjekorras avaldab autor tänu oma ülikoolipoolsele juhendajale Eva Žusinaitele, kes võttis kõige muu hulgas enda kohuseks tutvustada autorile ka korrektset töökultuuri ja töövõtteid. Just õiged töövõtted ja korrektsus laboris on taganud töö praktilise osa usaldusväärsuse. Samuti tänab autor enda koolipoolset juhendajat Saima Kaarnat, kes uurimistööd põhjalikult luges ja tänuväärseid soovitusi andis. Farmakognootilise poole peal olid suureks abiks professor Ain Raal ja doktorant Janne Sepp, nendest viimase kogutud lõhnava kummeli droogi kasutati tinktuuri valmistamiseks.

SISUKORD

1. ÜLEVAADE LENTIVIIRUSTEST	6
1.1. VIIRUSTE TAKSONOOMIA	6
1.2. LENTIVIIRUSTE LEVIK	7
1.3. LENTIVIIRUSTE EHITUS JA INFEKTSIOONITSÜKKEL	8
1.4. VIIRUSVASTASTE ÜHENDITE RAVIMÄRKLAUAD	11
1.5. RAVIMTAIMED VIIRUSHAIGUSTE RAVIS	12
1.6. LENTIVIIRUSPÕHINE EKSPRESSIOONISÜSTEEM	13
2. VALIMI ÜLEVAADE	14
2.1. TEEKUMMEL (<i>CHAMOMILLA RECUTITA</i>)	14
2.2. LÕHNAV KUMMEL (<i>CHAMOMILLA SUAVEOLENS</i>)	14
2.3. MUST PÄSSIK (<i>INONOTUS OBLIQUUS</i>)	15
2.4. BEFUNGIN	16
2.5. HARILIK SAIALILL (<i>CALENDULA OFFICINALIS</i>)	16
2.6. PURPUR-SIILKÜBAR (<i>ECHINACEA PURPUREA</i>)	16
2.7. CITROSEPT	17
2.8. AASIA-KULDJUUR (<i>RHODIOLA ASIATICA</i>)	17
3. METOODIKA	17
3.1. EKSPERIMENTAALSES OSAS KASUTATUD MATERJALID	18
3.2. VIIRUSLAADSETE PARTIKLITE VALMISTAMINE	19
3.3. GALEENILISTE VEDELPREPARAATIDE VALMISTAMINE	22
3.4. PREPARAATIDE TSÜTOTOKSILISUSE ANALÜÜS	26
3.5. PREPARAATIDE LAHJENDUSTE VALMISTAMINE JA LISAMINE RAKKUDELE	26
3.6. PREPARAATIDE VIIRUSLAADSETE PARTIKLITE ELUTSÜKLIT INHIBEERIVA MÕJU HINDAMINE	27
4. TULEMUSED JA ARUTELU	30
4.1. PREPARAATIDE TSÜTOTOKSILISUSE ANALÜÜSIDE TULEMUSED	30
4.2. PREPARAATIDE ANTIRETROVIRAALSE VÕIME HINDAMINE	32
4.3. ARUTELU	35
5. KOKKUVÕTE	36
6. SUMMARY	37
7. KASUTATUD ALLIKATE LOETELU	38
LISAD	40
LISA 1. LENTIVIIRUS-LAADSETE PARTIKLITE VALMISTAMISEKS KASUTATUD PLASMIIDID	40
LISA 2. TSÜTOTOKSILISUSE ANALÜÜSI TULEMUSED	41

KASUTATUD LÜHENDITE LOETELU

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> ; omandatud immuunpuudulikkuse sündroom
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> ; veiseseerumi albumiin
cDNA	<i>Complementary DNA</i> ; komplementaarne (koopia) DNA
cfu	<i>colony forming unit</i> ; kolooniaid moodustav ühik
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Essential Medium</i> , imetajatelt pärinevate rakuliinide kasvatamiseks kasutatav sööde
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; desoksüribonukleiinhape
ds	<i>double stranded</i> ; lühend märgistab nukleiinhappe kaheaahelalisust
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> ; soolekepike
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> ; veise loote seerum
FIV	<i>Feline Immunodeficiency Virus</i> ; kaslaste immuunpuudulikkuse viirus
GauLuc	<i>Gaussia luciferase</i> ; <i>Gaussia</i> lutsiferaas, aerjalalises leiduv bioluminestsentsi tekitav ensüüm
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i> ; HIV-i vastu suunatud antiretroviirusravi
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> ; inimese immuunpuudulikkuse viirus
HSV	<i>Herpes Simplex Virus</i> ; herpesviirus
IC50	<i>Inhibitory Concentration 50</i> ; poolväärtus maksimaalsest inhibeerivast kontsentratsioonist
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> ; modifitseeritud koostisega DMEM sööde
kb	<i>Kilobase</i> ; kilobaspaar, nukleiinhapete molekulide pikkuse mõõtmiseks kasutatav ühik
kD	Kilodalton; valkude molekulmassi mõõtmiseks kasutatav ühik
LB	<i>Lysogeny Broth</i> ; bakterite kasvatamiseks kasutatav sööde
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> ; teatud viiruste genoomides esinev kindla funktsiooniga kordusjärjestus
mRNA	<i>Messenger-RNA</i> ; RNA, millelt ribosoomid valku transleerivad
MTT	3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid, mitokondriaalse ensüümi substraat
Opti-MEM	<i>Optimal Minimal Essential Medium</i> ; koekultuuris kasutatav seerumvaba sööde

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> ; koekultuuris kasutatav fosfaatpuhverdatud soolalahus
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> ; ribonukleinhape
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i> ; primaate nakatav immuunpuudulikkuse viirus
SV40	<i>Simian Virus 40</i> ; ahve nakatav polüoomiviirus
tRNA	<i>Transport-RNA</i> ; RNA, mis viib translatsiooniks aminohappeid ribosoomideni
VLP	<i>Virus-Like Particle</i> ; viiruslaadne partikkel
VSV	<i>Vesicular Stomatitis Virus</i> ; vesikulaarse stomatiidi viirus

1. ÜLEVAADE LENTIVIIRUSTEST

1.1. Viiruste taksonoomia

Nii nagu eluslooduse esindajatega on kombeks, klassifitseeritakse ka viiruseid erinevatesse taksonoomilistesse üksustesse. Viiruste puhul raskendab olukorda asjaolu, et nende päritolu ei ole täpselt teada, ei ole leitud ka nende ühtegi ühist eellast. Üldlevinud on viis klassifitseerida viiruseid morfoloogia ja replikatsioonitsükli alusel. [6, lk 55]

Üks tuntumaid viise klassifitseerida viiruseid käib Baltimore'i skeemi alusel, kus lähtutakse asjaolust, et valgu sünteesiks on mRNA sünteesi moodapääsmatu. Eristavaks tunnuseks on selle klassifikatsiooni puhul võetud viiruse pärilikkusaine, millest teatud hetkel mRNA sünteesitakse. [6, lk 18]

Baltimore'i klassifikatsiooni alusel jagunevad viirused seitsmesse klassi:

1. Positiivse (+) RNA ahelaga viirused (nt poliomüeliidi viirus ja C-hepatiidi viirus)
2. Negatiivse (-) RNA ahelaga viirused (nt marutaudi tekitav viirus ja ebola viirus)
3. kaheaahelalise RNA-ga (dsRNA) viirused (nt reoviiruste hulka kuuluv rotaviirus)
4. positiivse (+) DNA ahelaga viirused (nt parvoviirused)
5. kaheaahelalise DNA-ga (dsDNA) viirused (nt kõik herpesviirused ja papilloomiviirused)
6. kaheaahelalise DNA-ga pöördtranskriptsiooni kasutavad viirused (nt B-hepatiidi viirus)
7. positiivse RNA ahelaga pöördtranskriptsiooni kasutavad viirused (nt retroviirused). [10]

Kuna mRNA on tinglikult positiivse (+) ahelaga, loetakse positiivseks (+) ahelaks pärilikkusainet, mille järjestus on identne vastava mRNA-ga [6, lk 19]. Negatiivne ahel on seega selline, mis on vastava mRNA-ga komplementaarne.

Retroviiruste taksonoomia

Baltimore'i klassifikatsiooni alusel kuuluvad retroviirused 4. klassi. Retroviiruste ühiseks omaduseks on ensüüm pöördtranskriptaasi ehk revertaasi olemasolu partiklites. See vahendab viiruse RNA genoomi põhjal toimuvat cDNA (*complementary DNA*) ehk proviiruse sünteesi. Arvata, et revertaas on ainuomane vaid retroviirustele, on ekslik, sest sarnaseid ensüüme leidub ka näiteks B-hepatiidi viiruse partiklites. Üks ainuomasemaid tunnuseid retroviirustele on aga ensüüm integraas, mis vahendab viiruse juba DNA kujul oleva genoomi juhuslikku integreerumist peremeesraku genoomi. [6, lk 835]

Retroviiruste sugukond jaguneb kaheks alamsugukonnaks, *orthoretrovirinae* ja *spumavirinae*. Nendest viimase alamsugukonna moodustab ainsana spumaviiruste perekond. *Orthoretrovirinae* alamsugukonda kuuluvad alfa-, beeta-, gamma-, delta- ja epsilonretroviirused ning lisaks lentiviirused. Omakorda loetakse alfa-, beeta- ja gammaretroviiruseid lihtsateks retroviirusteks, kuid delta- ja epsilonretroviiruseid ning lentiviiruseid keerulisteks retroviirusteks. Keerulisteks nimetatakse just neid retroviiruseid, mille genoomis on kodeeritud lisaks struktuursetele valkudele ka regulatoorsed valgud. [6, lk 835]

Antud töö uurimisobjektiks oli lentiviirus. Lentiviiruste seas on enim tuntud kindlasti HIV-1 ja HIV-2, kuid samasse perekonda kuuluvad ka näiteks FIV (*Feline Immunodeficiency Virus*), mis põhjustab kaslastel immuunpuudulikkust, ja SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*), mis on levinud immuunpuudulikkuse põhjustaja primaatide seas [6, lk 625].

1.2. Lentiviiruste levik

Lentiviirused on levinud üle kogu maailma ja peremeesorganismide hulka kuulub rohkelt erinevaid imetajaid. Peale inimese on lentiviiruseid leitud ka primaatidelt, kassidelt, hobustelt, lammastelt, kitsedelt, lehmadel ja küülikutelt. 1970ndate lõpus alanud HIV pandeemia on üks värvikamaid näiteid viiruste võimest kulutulena levida ja kahju põhjustada, teisisõnu olla edukad. Kuna HIV on kahtlematult enim uuritud lentiviirus, käsitlemegi järgnevalt tema leviku tagamaid. [4]

Ilmselt on HIV näol tegu ühe noore viirusega, kuna on teada, et antud viirus on tekkinud SIV peremehe vahetamisel. Arvatakse, et esimest korda toimus inimese nakatumine HIV-1-ga umbes 80 aastat tagasi, HIV-2-ga aga 70 aastat tagasi. Viiruse ülekanne ahvilt inimesele on toimunud korduvalt ja sellest tulenevalt esineb mõlemal HIV tüübil erinevaid gruppe (HIV-1 puhul nt grupid M, N ja O). Ülekanne arvatakse olevat toimuda saanud tänu Kesk- ja Lääne-Aafrikas levinud kombele tarvitada toiduks ahviliha. Praegugi on leitud, et ligi 17% Aafrika turgudel leiduvast ahvilihast on SIV-ga nakatunud. Teadaolevalt ei põhjusta SIV oma algsetele peremeestele – ahvidele – nähtavaid haigustunnuseid. Siit võib järeldada, et nad on kohastunud viirusega koos eksisteerima või on viirus evolutsiooni käigus muutunud peremehe suhtes vähem agressiivseks. [4, lk 68]

Vähem kui kümme aastat pärast pandeemia algust (1980. aastaks) oli HIV levinud juba vähemalt viiele kontinendile, nakatunute arvuks oli hinnanguliselt 100 000–300 000 inimest. 1983.aastal isoleeriti esimest korda HIV-1 ja hakati viirust teadvustama ja sellesse nakatumist teadlikult vältima. [4]

1.3. Lentiviiruste ehitus ja infektsioonitsükkel

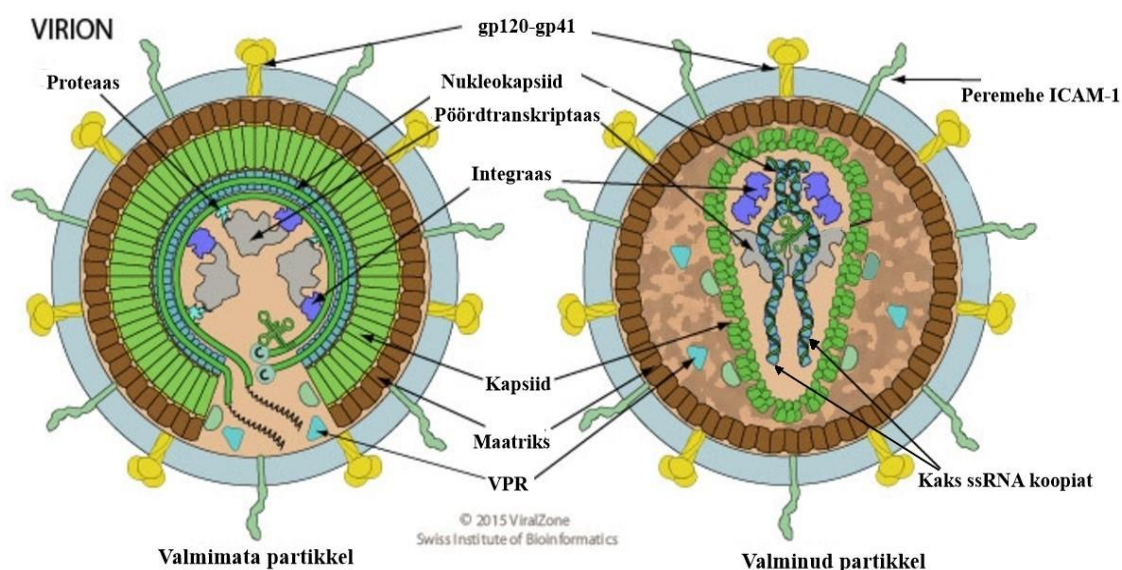
Antud peatükis käsitletakse lentiviiruste ehitust ja infektsioonitsüklit HIV, täpsemalt HIV-1 näitel, kuna ta kuulub lentiviiruste hulka ja on nende seast vaieldamatult enim uuritud.

HIV on viirus, mis kahjustab immuunsüsteemi, jättes organismi erinevatele infektsioonidele – bakteritele, seentele, protistidele ja teistele viirustele – vastuvõtlikuks. Seda seisundit nimetatakse omandatud immuunpuudulikkuseks ehk AIDS-ks (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*). [7]

1.3.1. HIV-1 viiruspartikli ehitus

HIV-1 partikkel on üldjoontes sarnane teiste retroviirustega (joonis 1), eristab teda aga partikli sees asuv koonusekujuline kapsiid, mille diameeter ühes otsas on 40–60 nm, teises otsas aga umbes 20 nm. Suur osa kapsiidivalgust esineb ca 250 heksameeri ja 12 pentameerina. Tavaliselt on ühe partikli kohta vaid üks kapsiid, samas on leitud ka kahe või rohkema kapsiidiga partikleid. [7]

Terve HIV-1 partikli diameetriks on 80–110 nm. Valminud viiruspartikli pinnal on vaid kaks viirusvalku, ülejäänud pinnavalgud pärinevad peremeesrakult. Viirusvalkudeks on transmembraanne valk ja partikli pinnavalk, molekulmassidega vastavalt ligikaudu 41 kD ja 120 kD. Nende valkude nimed on ka vastavalt gp41 ja gp120, kus gp tähendab glükoproteiini. gp120 on tugevalt glükosüleeritud ja omab viit suure varieeruvusega domeeni. gp41 valgu C-terminaalne ots asub partikli sees, kus ta on seotud maatriksvalguga. Elektronmikroskoobi abil võib näha ogasid, neid on tüüpiliselt umbes 14 iga partikli kohta. Iga ogakene on tegelikult gp41-gp120 trimeer, kus distaalse osa moodustab kolmekordne gp120 kordus, proksimaalse osa aga kolm gp41 molekuli. Nukleoproteiin on nagu teistelgi retroviirustel tugevalt aluseline. HIV-1 partiklist on leitud ka peremeesrakkudele omaseid valke. [7]



Joonis 1. Lentiviiruse virioni valmimata partikli (vasakul) ja valminud partikli (paremal) morfoloogia.

Autoriõiguste omaniku loaga modifitseeritud allikast:

http://viralzone.expasy.org/264?outline=all_by_species.

HIV genoom on 9,3 kb (*kilobase*) pikk. HIV-1 näol on tegemist keerulist tüüpi retroviirusega. Seda seetõttu, et tema genoomis on kolm struktuurset polüproteiini kodeerivat geeni, mis leiduvad kõigis retroviirustes (*gag*, *pol* ja *env*), ning lisaks veel kuus mittestruktuurset valku kodeerivat geeni (*vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* ja *nef*). *tat* ja *rev* on regulatoorsed geenid ja viiruse replikatsiooniks vajalikud, ülejäänud neli ei ole viiruse paljunemiseks vajalikud. [6]

Geenilühendite tähendused on lahti kirjutatud tabelites 1 ja 2. Igal valgul on mitmeid rolle ja koos kontrollivad nad viiruse geeniekspressiooni, modifitseerivad peremeesorganismi immuunvastust ja osalevad rakusiseses viiruspartikli komponentide transpordis. [7]

Tabel 1. Retroviirustele omaste geenilühendite täispikad nimetused ja funktsioonid. [7, lk 196]

Geeni nimetus	Lühend	Vastava valgu ülesanne
<i>Group-specific antigen</i>	<i>gag</i>	Partiklisiseste struktuursete valkude kodeerimine
<i>Polymerase</i>	<i>pol</i>	Pöördtranskriptaasi ja integraasi kodeerimine
<i>Envelope</i>	<i>env</i>	Partikli pinnavalkude ja transmembraansete valkude kodeerimine

Tabel 2. HIV-1 reguleerivate geenide lühendite täispikad nimetused ja funktsioonid. [7, lk 207]

Geeni nimetus	Lühend	Ülesanne
<i>Viral infectivity factor</i>	<i>vif</i>	Kaitse APOBEC valkude eest
<i>Viral protein R</i>	<i>vpr</i>	Integratsioonieelse kompleksi viimine peremeesraku tuuma
<i>Virion protein U</i>	<i>vpu</i>	Partiklite pungumine
<i>Transactivator of transcription</i>	<i>tat</i>	Transkriptsioonifaktor
<i>Regulator of expression of virion proteins</i>	<i>rev</i>	Hilise faasi geeniekspressioon
<i>Negative regulatory factor</i>	<i>nef</i>	Kaitse immuunsüsteemi eest

1.3.2. HIV-1 replikatsioonitsükkel

HIV-1 on üks neist viirustest, mis on võimeline nakatama mittejagunevaid rakke, kuna ta on võimeline läbima tuumapoori. Enamik retroviiruseid vajab seevastu jagunemisvõimelisi rakke, kuna tuuma pääsemiseks on vajalik neile peremeesraku tuumamembraani lagunemine, mis toimub ajutiselt raku jagunemise käigus. HIV-1 kasutab peremehe CD4 retseptorit, mis kuulub immunoglobuliinide hulka. CD4 esineb mitmete rakutüüpide pinnal, nagu nt T-abistajarakud ja mõned makrofaagid. Viiruse sihtmärgiks on peamiselt CD4-positiivsed T-rakud. [7]

Peremeesrakku sisenemine toimub juhul, kui gp120 tunneb ära CD4 välimise domeeni. gp120 peab lisaks kinnituma peremeesraku pinnal olevale koretseptorile. Enamasti toimib koretseptorina tsütokiini CCR5 retseptor, harvem ka CXCR4 retseptor. [8]

gp120 ja peremeesraku kahe retseptori vahel aset leidv interaktsioon tekitab drastilise muutuse gp41 konformatsioonis, mis algatab viiruspartikli ja peremeesraku membraanide kokkusulandumise. Viiruse maatriks ja nukleokapsiid vabastatakse raku tsütoplasmasse ja nad muutuvad üheks pöördtranskriptsiooni kompleksiks, mis sisaldab maatriksvalku, vpr-i, pöördtranskriptaasi ja integraasi koos viiruse genoomi ja tRNA-ga. [7]

Pöördtranskriptaasi kompleks seondub peremeesraku mikrofilamentidele ja saab alata pöördtranskriptsiooni protsess ehk DNA süntees RNA ja DNA matriitsil. Sünteesil DNAsse tekkinud vigade parandamisvõime on teiste looduses leiduvate polümeraasidega võrreldes puudulik. Seetõttu paigutab pöördtranskriptaas 1–10 nukleotiidi iga sünteesitava proviiruse DNA molekuli kohta valesi. Just selle tõttu on HIV niivõrd muutlik ja immuunsüsteemile, vaktsiinidele ning ka antiviraalidele ehk viirusvastastele ravimitele raske sihtmärk. [8]

Arvatakse, et HIV-1 partiklid jõuavadki peremeesraku tuumani mikrofilamentide abil. Tuuma pääsevad nad tuumapooride kaudu. Tuumas osalevad seejärel viiruse integraas ja peremeesraku ensüümid proviiruse integreerumisel peremeesraku kromosoomi. [7]

Pärast proviiruse integreerumist peremeesraku genoomi on võimalik kaks erinevat stsenaariumi: latentne infektsioon, kus viiruse RNA-d alguses ei transleerita, või aktiivne infektsioon, kus viiruse RNA-d hakatakse kohe transleerima. See tähendab, et latentse infektsiooni puhul ei hakata uusi viiruspartikli komponente kohe tootma, mistõttu ei ole võimalik ka nakatunud rakke immuunsüsteemil eristada. [8]

Viiruse latentsust reguleerivad transkriptsiooni kontrollelemendid, mis asuvad viiruse genoomi LTR (*Long Terminal Repeat*) piirkondades. Neid kontrollelemente tunnevad ära peremeesraku transkriptsioonifaktorid. [8] Pärast transkriptsioonifaktorite seostumist viiruse genoomi kontrollelementidele saab alata transkriptsioon, seejärel ka viiruse valkude tootmine ehk translatsioon ja viiruse genoomi paljundamine ehk replikatsioon.

Struktuursete valkude piisaval kogunemisel algab viiruspartiklite kokkupakkimine. Kaks viiruse genoomi RNA koopiat paarduvad komplementaarsete järjestuste kohal ja moodustavad RNA dimeeri. Gag ja gag-pol valgumolekulid seostuvad dimeeriga ja moodustavad korrapärase struktuuri. See seostumine toimub tänu viiruse genoomis leiduvale pakkimissignaalile Ψ . Partiklisse pakitakse ka vpr, nef ja vif valgud. [7]

Viiruspartiklite pungumine peremeesrakust välja toimub kolesteroolirikastes plasmamembraani piirkondades. Pungumise ajal või pärast seda aktiveeritakse viiruse proteaas, mis lõikab gag ja gag-pol polüproteiinid valminud partikli koostisosadeks.

1.4. Viirusvastaste ühendite ravimärklauad

Nii bakterite kui ka viiruste puhul tuvastati nende omadus haigusi põhjustada 19. sajandi lõpul. Antibiootikumid võeti laialdaselt kasutusele 1940ndatel, seevastu viirusvastaste ravimite kliiniline kasutuselevõtt leidis aset 1960ndatel. Peamine põhjus hilisematele ravivõimalustele on asjaolu, et viirused paljunevad peremeesrakus, kasutades selleks peremeesraku vahendeid, s.o organelle, ATP-d, aminohappeid, nukleiinhappeid jne. Seega on viiruste puhul ilmselgeid märklaudu vähem, mille vastu teraapia suunata. Näiteks paljud antibiootikumid toimivad nii, et inhibeerivad bakteri rakukesta sünteesi, kuna selline rakukest imetajarakkudel puudub. Kuna paljud viirused ei oma tunnuseid, mis eristaks neid peremeesrakust, siis on aktiivsete ühendite väljatöötamine, mis toimiksid laia spektri viiruste vastu, ebatõenäoline. Igal viirusel on iseloomulikud replikatsiooniks vajalikud valgud, seega realistlikum lahendus oleks arendada ühendeid, mis toimiksid ühe kindla viiruse vastu. [8, lk 444]

Hetkel on otseselt toimivate antiretroviraalide märklaudu neli: viiruspartikli kinnitumine ning sisenemine sihtmärkrakku, pöördtranskriptaas, integraas ja proteaas.

Viiruspartikli kinnitumise ja sisenemise inhibeerimine võib toimuda nii viiruspartikli membraanvalgu blokeerimise kui ka peremeesraku membraanretseptori blokeerimise kaudu. HIV-1 infektsiooni ravis on sellisteks ravimiteks enfuvirtiid, mis seostub viiruse valgule gp41, ja maraviroc, mis seostub peremeesraku valgule CCR5. [8, lk 447]

Pöördtranskriptaas on HIV puhul üks olulisemaid sihtmärke, kuna ta on hoopis erinev kõigist peremehe ensüümidest. Pöördtranskriptaasi saavad inhibeerida kaks erineva keemilise ehitusega aineklassi: nukleosiidanaloogid ja mittenukleosiidanaloogid. Nukleosiidanaloogid matkivad loomulike DNA koostisosade, nukleosiidide ehitust. Nukleosiidanaloogid inhibeerivad otseselt pöördtranskriptaasi, lülitades pikenevasse DNA ahelasse ja peatades selle edasise sünteesi. HIV-1 puhul kasutatavateks nukleosiidanaloogideks on näiteks azidotümidin ehk zidovudiin (lühendina AZT) ja lamivudiin. Mittenukleosiidanaloogid avastati hiljem, nad seonduvad aktiivtsentrist kaugemal ning „lukustavad“ pöördtranskriptaasi mitteaktiivsesse konformatsiooni, inhibeerides selle tööd [8, lk 451]. Ka antud uurimistöö eksperimentaalses osas kasutatakse positiivse kontrollina üht mittenukleosiidanaloogi, milleks on nevirapiin.

HIV-1 proteaas on heaks sihtmärgiks, kuna ta lõikab polüpeptiide fenüülalaniini ja proliini vahelt, milleks on inimese proteaasid praktiliselt võimelised pole. Proteaasi inhibiitorid võivadki olla peptiidilaadse ehitusega, kus on olemas ka side, millele proteaas saab seonduda, kuid seejärel blokeerub [8, lk 452–453]. HIV proteaasi inhibiitorite esindajateks on indinaviir ja ritonaviir.

1.5. Ravimtaimed viirushaiguste ravis

Etnofarmakoloogia uurimine on oluline osa uute antiviraalse toimega ühendite leidmiseks. Suur hulk teadusartikleid on publitseeritud teemal, mis ongi uurinud etnomeditiinil kasutatavate ravimtaimede otsest mõju haigust põhjustavate viiruste vastu, seda ka põllumajanduses ja loomakasvatuses aktuaalsete viirushaiguste vastu. Uuritaksegi just peaaesjalikult loodusrahvaste rahvameditsiini ja usutav toime kattubki sageli laboratoorsete katsete käigus leitud toimega.

Ravimtaimede hulgast on leitud toimeaineid praktiliselt kõikide viiruste vastu, mis inimest nakatavad ja haigust põhjustavad. Ravimtaime mõju ei pruugi olla alati otseselt haiguspõhjustaja vastu: nii võib ka HIV nakkuse puhul aidata ravimtaim, milles sisalduvad

antimikroobsed ained, mis hoiaksid ära erinevad bakteriaalsed infektsioonid, millega organismi nõrgestatud immuunsüsteem toime ei tuleks. Teiste haiguste puhul võib kaudne mõju tuleneda ka ravimtaime omadusest tugevdada organismi immuunvastust.

Näiteks on täheldatud ühe Lõuna-Aafrika taime, *Pelargonium sidoides*'e toimet, mis takistab HIV-1 partiklidel immuunrakkudele kinnitumast ja hoiab seeläbi ära nende nakatumise [9].

HSV-1 (*Herpes Simplex Virus 1*) ja HSV-2 (*Herpes Simplex Virus 2*) vastu on näidatud väga hästi toimivat sulgja kalanhoe atsetoonitõmmised (*Kalanchoe pinnata*), taime looduslik levila on Madagaskaril. [10]

1.6. Lentiviiruspõhine ekspressioonisüsteem

Lentiviiruslaadsete partiklite valmistamiseks kasutati kommertsiaalset Invitrogen™ Virapower™ Lentiviral Expression Systems komplekti, mis sisaldas kolme pakkeplasmidi (*pLP1*, *pLP2*, *pVSV-G*), ja ekspressiooniplasmidi (*pLentiGauLuc*), mille valmistas TÜ tehnoloogiainstituudis doktorant A. Selyutina. Kommertsiaalse komplekti abil saadavaid viiruspartikleid nimetatakse viiruslaadseteks, kuna erinevalt metsiktüüpi viirusest ei ole nad võimelised end esimesest põlvkonnast edasi tootma. Seeläbi on nad inimesele ohutud, kuid samaaegselt toimiv katsesüsteem.

Geenitehnoloogia teel saadud pakkeplasmididelt kodeeritakse peremeesrakus viiruse struktuurseid valke gag ja pol (lisa 1, joonis 12). Pakkeplasmidides ei ole kolmanda struktuurse valgu geeni ehk *env*-i, mis kodeeriks tavaolukorras viiruspartikli pinnavalke, kuna selle asemele on sisestatud VSV (*Vesicular stomatitis virus*) G-glükoproteiini geen (lisa 1, joonis 12). Loomulikud HIV-1 pinnavalgud on välja jäetud, kuna nad saavad seonduda ja seeläbi nakatada vaid CD4+ immuunrakke, mida on laboris raske kultiveerida. VSV G-glükoproteiiniga pseudotüpeeritud lentiviiruslaadsed partiklid ehk partiklid, mille loomulikud pinnavalgud on võõraste vastu välja vahetatud, ei ole peremeesraku pinnavalkude suhtes antud juhul nii spetsiifilised.

Ekspressiooniplasmiidil paikneb meile huvi pakkuv *Gaussia* lutsiferaasi kodeeriv markergeen (lisa 1, joonis 12). Selle geeni ekspressiooni efektiivsust ehk lutsiferaasi hulka mõõtes saab hiljem viiruslaadsete partiklite elutegevust hinnata. Ekspressiooniplasmiid sisaldab veel geene, tänu millele lutsiferaasi ekspresseeriv mRNA viiruspartiklitesse pakitakse, samuti sisaldub seal tsütomegaloviiruse promooter, mis lutsiferaasi ekspressiooni käivitab (lisa 1, joonis 12). Kõigis plasmidides on ka resistentsusgeen antibiootikumi vastu. Pakkeplasmidides on ampitsilliini vastane resistentsusgeen, ekspressiooniplasmiidis aga blastitsidiini vastane resistentsusgeen (lisa 1, joonis 12). Resistentsusgeen on vajalik plasmide sisaldavate

rakkude selektsiooniks: antibiootikumi sisaldavas rakusöötmes jäävad ellu vaid rakud, mis on võtnud endasse vastava plasmidi.

Transfekteeritavaks rakuliiniks oli HEK293-T/17, mis on inimloote neerukoest pärinevad rakud, kuhu on viidud SV40 (*Simian Virus 40*) suur T-antigeen. SV40 suur T-antigeen tõstab rakus oleva ekspressiooniplasmidi koopiaarvu ning suurendab toodetavate viiruslaadsete partiklite arvu. [11]

2. VALIMI ÜLEVAADE

Valimi koostamisel peeti silmas, et valmistatav preparaat oleks vees lahustuv, kuna rakkudele osutub preparaat kättesaadavaks vaid söötmes (vee baasil) lahustunud kujul. Seetõttu jäigi esialgsest valimist välja näiteks tee-melaleukast (*Melaleuca aetheroleum*), rahvakeeli teepuust saadav vees mittelahustuv teepuuõli, mille viirusvastaseid omadusi on varem leitud näiteks gripiviiruse puhul [12]. Valimi koostamisel püüti lähtuda ka sellest, et ravimtaim oleks kasutust leidnud rahvameditsiinis viirushaiguste ravis.

2.1. Teekummel (*Chamomilla recutita*)

Teekummel on korvõieliste hulka kuuluv iseloomuliku aroomiga rohttaim, mis on levinud Euroopast Loode-Aasiani. Ta on levinud üle kogu Eesti hajusalt kultuurist metsistunult prahipaikadel ja teeservadel. [5, lk 296] Teekummeli droogina kasutatakse selle taime korvõisikuid, mida kogutakse õitsemise alguses. Rahvameditsiinis on kasutatud ka teekummeli ürti [5, lk 296]. Toimeainetest on teekummelis eeterlik õli, mille moodustavad hamasuleen, farneseen, bisabolool ja muud ained. Leidub ka erinevaid flavonoide, kumariine, tanniine ja lima. [5, lk 296]. Teekummelit on kasutatud peamiselt kui põletikuvastast ja spasme lõõgastavat arstimit. Ka seedehäirete ja seedeelundite põletike korral on leidnud taime droog kasutust. Välispidiselt kasutatakse ka antiseptilise vahendina. [5, lk 296]

2.2. Lõhnav kummel (*Chamomilla suaveolens*)

Lõhnav kummel ehk ubihein on üheaastane rohttaim, mille kerakujulised kollased korvõisikud on erinevalt teekummelist keelõiteta. Õitel esineb samuti iseloomulik aroom. Eestis esineb see taim naturaliseerunud tulnuktaimena tüüpiliselt erinevatel kõvaks tallatud pinnasega paikadel

nagu teeääred ja õued. [13] Lõhnava kummeli droogina kasutatakse korvõisikuid, mida kogutakse õitsemise alguses. Harvem kasutatakse taime maapealse osa ülemist kahte kolmandikku. [13] Keemiliselt koostiselt on lõhnava kummeli eeterlikku õli, mis on koostiselt sarnane teekummeli omaga, kuid ei sisalda hamasuleeni. Leidub ka flavonoide, kumariine ja tanniine. [13] Lõhnava kummel on ravimisel leidnud kasutust kui silelihaste spasme lõõgastav ja põletiku- ja kõhupuhitusevastane ravimtaim. Välispidiselt kasutatakse naha- ja limaskestapõletike ning halvasti paranevate haavade korral. [13, lk 189] Ehkki toime arvatavasti lõhnava kummel olevat võrdväärne teekummeliga, kasutatakse teda ravimtaimena kordades vähem.

2.3. Must pässik (*Inonotus obliquus*)

Must pässik on taelikuliste hulka kuuluv torikseen, mis parasiteerib peamiselt kaskedel ning põhjustab tüves ajapikku valgemädanikku. Ta moodustab puu tüvele äratuntava moodustise, mida rahvasuus nimetatakse ka kasekäsnaks. Musta pässikut esineb hajusalt parasvöötme metsade puudel, Eestis on kirjanduse andmetel väga sage [13], autori arvates, kes musta pässikut ka ise otsis (joonis 2), üsna haruldane.



Droogina kasutatakse seene tekitatud steriilset moodustist, täpsemalt selle keskosa, mis oma olemuselt on läbipõimunud mütseel. Droogi korjatakse aasta ringi ning soovitavalt elavatelt puudelt. [5]

Keemiliselt koostiselt on tekitatud moodustis üsna kordumatu ja ainuomase koostisega. Esineb näiteks fenoolseid aldehyide, polüfenoole, fenoolhappeid, kinoone, flavonoide, alkaloidid, pigmentaineid, tšaagahapet, polüsahhariide ja muid aineid. Pigmentainetel on omadus muutuda hüdrolyüsil fenoolhapeteks [13]. Üldiselt on musta pässiku keemilist koostist seni vähe uuritud.

Joonis 2. Must pässik kasetüvel. Autori erakogu

Loomkatsed on näidanud, et must pässik võib omada mõnede kasvajarakkude arengut takistavat mõju, lisaks parandab see veel ka vähihaige enesetunnet, vähendab higistamist, langetab pisut vererõhku ja pulsisagedust. [13]

2.4. Befungin

Antud uurimistöös uuriti enne musta pässiku tõmmise valmistamist käsimüügis olevat preparaati Befungin. See on olemuselt kasekäsna tinktuur, milles sisaldub ka 1,5% koobaltsulfaati ja 1% koobaltkloriidi [14].

2.5. Harilik saialill (*Calendula officinalis*)

Saialill on üheaastane kollaste kuni oranžikate õisikutega korvõieliste hulka kuuluv rohttaim. Levikuala on Lõuna- ja Kesk-Euroopas, Lääne-Aasias ja Põhja-Ameerikas. Eestis kasvatatakse tihti ilu- ja ravimtaimena, looduslikult ei esine. [13, lk 151]

Droogina kasutatakse saialille õisikuid, mida kogutakse juulist septembrini. Keemilise koostise poolest on enim esinevad flavonoidid, saponiinid, triterpeenalkoholid, karotenoidid, kumariinid, eeterlikud õlid ja polüsahhariidid. [13, lk 151]

Saialille tõmmistel on näidatud olevat kudede taastumist soodustav, põletikuvastane, sapinõristust soodustav toime. Leitud on ka immuunsüsteemi tugevdav ja kasvajarakkude arengut pidurdav toime. Toimib ka mõningate nahahaigusi põhjustavate seente ja viiruste vastaselt. [13, lk 151]

2.6. Purpur-siilkübar (*Echinacea purpurea*)

Purpur-siilkübar ehk punane siilkübar, mis varem arvati ka päevakübara perekonda, on mitmeaastane korvõieliste hulka kuuluv suurte õisikutega rohttaim. See taim pärineb Põhja-Ameerika lõunaosast, nüüdseks kasvatatakse seda ilutaimena rohkelt ka Euroopas, sealhulgas Eestis. Siilkübara droogina on kasutuses peamiselt juur ja ürt, harvemini ka korvõisikud või vaid keelõied. Keemiliselt koostiselt on siilkübar väga mitmekesine. Selles leidub polüsahhariide, amiide, orgaanilisi happeid, glükosiide, eeterlikke õlisid, pürrolüsidiinalkaloide, polüüine, ensüüme ja mineraalaineid. Siilkübarat kasutatakse immuunsüsteemi tugevdava ja põletikuvastase ravimtaimena. Mõjub pärssivalt nii bakterite,

seente kui ka viiruste elutegevusele. *In vitro* on veenvalt tõestatud siilkübara tõmmiste pärssivat mõju herpesviirusele ja gripiviirusele [15].

2.7. Citrosept

Citrosept on käsimüügis müüdav toidulisand, mis sisaldab greipfruudiseemne ekstrakti, C-vitamiini, vett ja glütserooli. [16] Greipfruudiseemne ekstraktil on varem leitud antiviraalne, antibakteriaalne ja antifungaalne toime. Ekstrakti peamisteks koostisosadeks on flavonoidid, askorbiinhape ehk C-vitamiin, tokoferoolid, sidrunhape, limoneen ja steroolid. [17]

2.8. Aasia-kuldjuur (*Rhodiola asiatica*)

Aasia-kuldjuur on seni väheuuritud ravimtaim, mis kasvab Siberi aladel. Enam uuritud on sellega samasse perekonda kuuluv roosilõhnaline kuldjuur, mida kasvatatakse kohati ka Eestis ilu- ja ravimtaimena. Aasia-kuldjuure droogina kasutatakse juurt, mis tükeldatakse ja kuivatatakse. [5] Kuldjuure koostisse kuulub fenoolne alkohol türosool ja tema glükosiid salidroosiid. Veel leidub selles kaneelalkoholi glükosiide, monoterpeenglükosiide, tanniine, eeterlikku õli, flavonoide, flavolignaane ja muud. Aasia-kuldjuure koostis sarnaneb roosilõhnalise kuldjuure omaga, kuid sisaldab rohkem punaseid pigmentaineid. [5] Uurimistöös kasutatavat tinktuuri ei valmistanud autor, see saadi farmaatsia instituudi õppelaborist, kus see valmistati matseratsiooni meetodil.

3. METOODIKA

Antud uurimistöös rakendatud metoodika sarnaneb suuresti erinevate ravimiuuringute prekliinilisele osale, mille eesmärgiks on raviainete biokeemiliste, füsioloogiliste ja toksiliste omaduste määramine. Täpsemalt on see analoogne prekliiniliste katsete ühe kõige esimese etapiga, kus uuritakse raviaine mõju *in vitro* raku tasandil, seega erinevatel eukarüootsetel rakukultuuridel. Prekliinilise osa viimases faasis jõutakse välja katseloomadeni, kus tuleksid välja raviaine farmakokineetilised omadused ja metaboliseerimise iseärasused, mida antud uurimuses ei käsitleta.

3.1. Eksperimentaalses osas kasutatud materjalid

3.1.1. Bakteritüved ja söötmed

Eksperimentaalses osas vajaliku ekspressioonikonstrukti paljundamiseks kasutati *Escherichia coli* ehk soolekepikese XL-10 tüve. Bakteritüve kasvatati LB (*Lysogeny Broth*, Difco) söötmes (10 g/l trüptooni, 5 g/l pärmiekstrakti, 5 g/l NaCl). Söötmesse lisati ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml.

3.1.2. Rakuliinid ja nende söötmed

Transfektsiooni teostati eksperimentaalses osas HEK-293-T/17 rakuliinil, mis pärineb inimloote neerukoest [18]. See rakuliin ekspresseerib SV40 suurt T-antigeeni, mis seondudes SV40 replikatsiooni alguspunktile ekspressiooniplasmiidil suurendab plasmidi koopiaarvu rakkudes, seega võimendades viiruslaadsete partiklite tootmist. Selline rakuliini valik oli ette antud viiruslaadsete partiklite tootmiseks kasutatud Virapower™ Lentiviral Expression Systems kasutusjuhendis [11]. Rakke kasvatati 37 °C juures 5% CO₂ sisaldavas ja veeauruga küllastatud keskkonnas (rakuinkubaatoris) DMEM (*Dulbecco's Modified Essential Medium*) söötmes, kuhu oli lisatud 10% veise loote seerumit (FBS, *Fetal Bovine Serum*) ning 100 ühikut/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini.

Tsütotoksilisuse analüüs ja transfektsioon viidi läbi U2OS rakuliinil, mis on inimese luukasvaja rakuliin. Viiruslaadsete partiklite tootmise komplekti kasutusjuhendi kohaselt sobib transfekkeeritavaks rakuliiniks mistahes imetaja rakuliin [11]. Rakke kasvatati rakuinkubaatoris IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) söötmes, kuhu oli lisatud 10% FBS ning 100 ühikut/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini.

3.1.3. Plasmidsed konstruktid

Viiruspartiklite valmistamiseks kasutati nelja plasmidi, millest kolm pakkimisplasmidi olid Virapower™ komplekti osad (*pLP1*, *pLP2*, *pVSV-G*) ja ekspressiooniplasmiid oli TÜ tehnoloogiainstituudis doktorant A. Selyutina poolt eelnevalt valmistatud *pLentiGauLuc*.

3.2. Viiruslaadsete partiklite valmistamine

3.2.1. Ekspressioonikonstrukti paljundamine



Joonis 3. Petri tassile moodustunud bakterikolooniad. Autori erakogu.

Ekspressiooniplasmiidi paljundamiseks transformeeriti *E. coli* XL-10 rakke kuumašoki meetodil. Transformatsioon tähendab plasmiidi sisestamist bakterisse. Selleks lisati bakterikultuurile 1 ng *pLentiGauLuc wt* plasmiidset vektorit ja hoiti baktereid jääl 10 minutit. Kuumašokki tehti termostaadis 42 °C juures 90 sekundi vältel, mille järel asetati bakteritega tuub kaheks minutiks tagasi jääle. Tuubi lisati 800 µl LB söödet ning asetati loksutisse üheks tunniks. Bakterirakud tsentrifuugiti tuubi põhja 1200× g juures 2 minutit, resuspendeeriti 100 µl söötmes ja külvati Petri tassile, millel oli ampitsilliini (100 µg/µl) sisaldav LB tardsööde. Inkubatsioon toimus 37 °C juures üleöö.

Järgneval päeval, kui kolooniad olid tassile moodustunud (joonis 3), toimus inokulatsioon: Petri tassil olnud suvaliselt valitud kolooniast võeti pipetiotsikuga bakterirakke ning kukutati 100 ml LB vedelsöötme kolbi, kuhu oli lisatud ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml. Kolb asetati 37 °C juurde loksutisse inkubeerima 16 tunniks. Plasmiidse DNA eraldamine sooritati Macherey-Nagel NucleoBond® Xtra Midi EF komplekti reagentide kasutades, jälgides tootja juhiseid. Bakterid koguti, tsentrifuugides 10 minutit 5525× g juures. Bakterisade resuspendeeriti 8 ml RES-EF puhvril, kuhu oli eelnevalt lisatud ensüümi RNAas A. Lisati 8 ml lüüsipuhvrit (LYS-EF), segati õrnalt ning jäeti paariks minutiks seisma. Tuubi lisati 8 ml neutraliseerimispuhvrit (NEU-EF) ja segati. Lüüsunud rakkude mass koguti, tsentrifuugides 5525× g juures 10 minuti jooksul. Supernatant kanti EQU-EF puhvriga DNA-d siduval eelniisutatud kolonnile ning lasti kolonnist läbi joosta. Kolonni pesti kolm korda pesupuhvritega

FIL-EF, ENDO-EF ja WASH-EF. Plasmiidne DNA elueeriti filtrilt ELU-EF puhvriga ja sadestati isopropanooli lisamisega ning tsentrifuugimisega 4 °C ja 15000× g juures 30 minuti jooksul. DNA sadet pesti 70% etanooliga ja tsentrifuugiti samadel tingimustel 2 minutit. Piiritus eemaldati tuubist, DNA sadet kuivatati 37 °C juures ja lahustati 180 µl vees. DNA kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriga Thermo Scientific NanoDrop2000 abil ja saadi tulemuseks 1254 ng/µl.

3.2.2. HEK293-T/17 rakuliini transfektsioon

Transfektsiooni jaoks ehk selleks, et plasmiidide kujul olevad nukleiinhapped rakkudesse viia, tõsteti 3 µg igast neljast olemasolevast plasmiidist kokku 1,5 ml tuubi (*pLP1*, *pLP2*, *pVSV-G* ja eelnevalt valmistatud *pLentiGauLuc*). 15 ml tuubi lisati 1,5 ml Opti-MEM (Life Technologies) seerumvaba söödet. Samasse tuubi lisati eelnevalt valmistatud plasmiidisegu. Teise 15 ml tuubiga toimiti samamoodi, kuid sinna lisati 36 µl Lipofectamine 2000 (Life Technologies) reagenti, segul lasti seista viis minutit. Lipofectamine 2000 reagent on lipiidne ühend ja see moodustab plasmiidse DNA-ga komplekse. Kompleks vähendab vastastikmõju DNA ja fosfolipiidse rakumembraani vahel ning soodustab DNA sattumist rakku. Kahe tuubi sisud tõsteti kokku ning suspendeeriti õrnalt ja lasti seista 20 minutit, sellega oli valmis transfektsioonisegu (3 ml).

Kahelt 100 mm diameetriga koekultuuri tassilt, kus kasvasid kinnitunult HEK-293-T/17 rakud, aspireeriti sööde ehk imeti plaadid söötimest tühjaks ning lisati 2 ml värsket DMEM söödet. Rakud võeti pipetiga suspendeerides tassilt lahti söötmesse ja koguti 15 ml tuubi. Tühja 1,5 ml tuubi lisati 10 µl 0,4% trüpaansinist (Thermo Fisher Scientific) ja 10 µl rakususpensiooni ning rakud loendati Countess loenduriga (Invitrogen). Seejärel lahjendati rakususpensioon söötmega tiheduseni $1,2 \times 10^6$ rakku/ml. Sellise tihedusega rakususpensiooni võeti 5 ml, mis lisati uuele 100 mm diameetriga koekultuuri tassile ja kuhu lisati ka 5 ml söödet, 3 ml transfektsioonisegu ja suspendeeriti. Rakke inkubeeriti rakuinkubaatoris 24 h ja järgmisel päeval vahetati sööde. Tasse inkubeeriti lisaks veel 48 tundi.

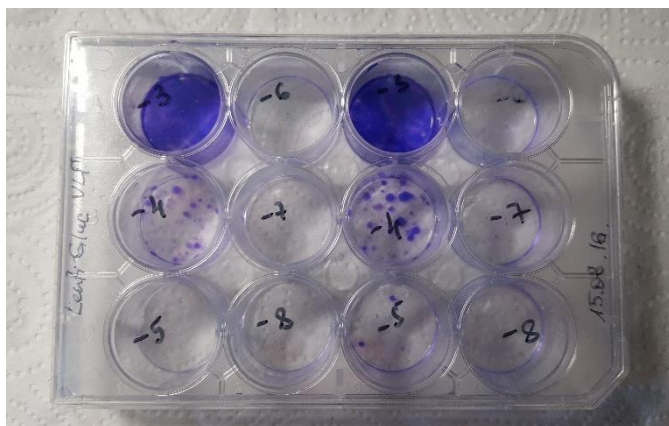
3.2.3. Viiruslaadsete partiklite (VLP) kogumine ja (nende tiitri leidmine

Transfekteeritud rakkudelt viidi supernatant 15 ml tuubi ning tsentrifuugiti 10 minutit 3220 × g juures, et vabaneda surnud rakkudest ja rakujääkidest. Tsentrifugimise järel tõsteti supernatant 14 × 89 mm ultratsentrifuugi tuubi (Beckman). Ultratsentrifuugi tuub täideti

söötmega nii, et ülevalt servast jäi umbes 5 mm vaba ruumi. Ultratsentrifuugimiseks valmistati ette ka tasakaalustustuub, mis täideti söötmega. Tuubid tasakaalustati täpsusega <10 mg.

Ultratsentrifuugimiseks kasutati Beckman Coulter Optima™ L-90k ultratsentrifuugi. Kaks ultratsentrifuugi tuubi asetati SW41 rootoris ja tsentrifuugiti 3 h kiirusel 25 000 pööret minutis 4 °C juures ($107\,170 \times g$). Tuubist aspireeriti sööde, nii et põhjas asuv sööde, kuhu viiruslaadsed partiklid sadenenud olid, jäi puutumata. Põhjas olev sade ei pruugi olla nähtav. Sellesse tuubi lisati 100 µl puhvrit (Tris pH 7,5 50 mM; NaCl 150 mM; EDTA 0,5 mM). Tuub kaeti parafilmiga ja hoiti üleöö 4 °C juures, et lahustada põhja sadenenud VLP-de klomp. Järgneval päeval suspendeeriti VLP-sid õrnalt, jagati 20 µl kaupa 1,5 ml tuubidesse ning säilitati –80 °C juures.

Tiitrimiseks kasutati U2OS rakukultuuri, mis oli külvatud 12-kannulistele plaatidele. Tiitri määramiseks tehti valmistatud VLP-dest 10-kordseid lahjendusi IMDM rakusöötmes, mis sisaldas 6 µ/ml Polybrene'i (Sigma Aldrich). Polybrene (kommertsiaalne nimetus heksadimetriinbromiidile) on viroloogias laialdaselt kasutatud aine, mis tõstab viiruspartiklite, eriti just retroviiruspartiklite võimet kinnituda peremeesrakule. On leitud, et see ühend on võimeline tõstma partiklite nakatusvõimet 100 kuni 1000 korda sõltuvalt kasutatavast rakukultuurist [19]. VLP lahjendusi tehti 1,5 ml tuubides lõppmahus 500 µl, vahemikus 10^{-3} kuni 10^{-8} . Lahjenduste tegemisel vahetati iga kord pipetiotsikut ning segati korralikult tuubi sisu. Rakkudega 12-kannu plaadilt aspireeriti sööde ning alustades kõige lahjemast lahjendusest lisati vastavalt igasse auku 100 µl VLP suspensiooni. Tiitrimist tehti kahes paralleelis. Rakuplaati kallutati järskude liigutuste seeriaga veendumaks, et rakud ei kuivaks.



Joonis 4. Rakuplaadile fikseeritud blastitsidiin-resistentsed U2OS rakkude kolooniad, mis on lisatud kristallvioleti mõjul värvunud lillakaks. Autori erakogu

Rakuplaati inkubeeriti 1 tund rakuinkubaatoris, selle aja sees kallutati plaati iga 10 minuti järel. Pärast inkubeerimist lisati igasse kannu 1 ml söödet. Söödet vahetati iga kolme päeva tagant,

söötmesse oli VLP-dega nakatatud rakkude selektsiooniks lisatud blastitsidiin kontsentratsiooniga 10 µg/ml. Kolooniade moodustumiseks kulus umbes 2 nädalat.

Rakuplaadilt eemaldati sööde kuue kannu kaupa ning lisati asemele kristallvioleti lahust (0,25% kristallviolett, 1,85% formaldehüüd, 10% etanool, 35 mM Tris, 0,5% CaCl₂), nii et põhi oleks kaetud. Seejärel oodati 10 minutit ning pesti kannud sooja vee all värvist puhtaks. Plaat kuivatati veest õhu käes. Kristallviolett siseneb elusatesse rakkudesse, värvides need lillaks ning formaldehüüd fikseerib rakud tassi külge. Töötuse tulemusena on pesemise järel augu põhjas nähtavad selgelt eristatavad lillad rakkude kolooniad (joonis 4), millest igaüks on saanud alguse ühest VLP-ga nakatatud rakust.

Kokku loendati kolooniad teises ja kolmandas lahjenduses (10⁻⁴ ja 10⁻⁵) lähtuvalt sellest, et kolooniad oleks kergesti eristatavad. Tiiter leiti kolooniade arvu ja nakatamissöötme mahu suhtarvu jagatise kaudu. Kahe lahjenduse tiitri keskmine on lõplik tiiter, antud VLP preparaadi puhul $2,95 \times 10^6$ cfu/ml (*colony forming unit per ml* – kolooniaid moodustavat ühikut ml kohta)

3.3. Galeeniliste vedelpreparaatide valmistamine

Galeenilised preparaadid on taimsest või loomsest toormaterjalist valmistatud ravivahendid. Galeeniliste preparaatide nimi tuleneb omaaegselt Rooma arstilt-apteekrilt Galenoselt (130–210 pKr). Osad galeeniliste preparaatide valmistamisviisid on Galenose enda poolt välja töötatud. Sellised preparaadid nagu tinktuurid, leotised ja ekstraktid on välja töötatud teiste poolt. [20]

Teekummeli, lõhnava kummeli ja musta pässiku tõmmised valmistati kõik perkolatsiooni meetodit kasutades. Perkolatsioon on ekstraktsioonimeetod, kus ekstrahent ehk solvent voolab läbi liikumatu droogisamba [20]. Peale perkolatsiooni on levinud ka kaks teist ekstraheerimismenetlust: matseratsioon ja digestioon. Esimene neist oli aasia kuldjuure valmistamise viis. Matseratsiooni põhimõte seisneb selles, et droog, antud juhul aasia kuldjuure kuivatatud ja peenestatud juur (droog) jäeti solventi, 70% etanooli, seisma toatemperatuuril. [21]

Kui loetleda perkolatsiooni positiivseid ja negatiivseid külgi, siis perkolatsioon võimaldab võrreldes matseratsiooniga droogi paremini ekstraheerida, kuigi see on võrreldes kaasaegsemate ekstraheerimismeetoditega väheproduktiivne. Samas saab öelda, et droogist pärinevate temperatuuritundlike ainete lagunemine on suhteliselt minimaalne, kuna protsessi viiakse läbi toatemperatuuril. [20, 21]

Preparaatide valmistamise protseduur teostati TÜ Farmaatsiainstituudi õppelaboris prof Ain Raali juuresolekul ja vahetute juhthööride alusel.

3.3.1. Teekummeli ja lõhnava kummeli tinktuur

Kummelite droogide päritolu oli erinev: teekummeli õisikud osteti apteegist, lõhnava kummeli maapealne osa korjati aga Janne Sepa poolt 12. juunil 2016. aastal Tartumaal (joonis 5). Taoline erinevus on põhjustatud sellest, et lõhnava kummeli droogi ei turustata, kuna rahvameditsiinis on jäänud selle kasutamine tagaplaanile ning seega on ka nõudlus olematu.



Joonis 5. Lõhnava kummeli ja teekummeli kuivatatud ja kaalutud droogid. Autori erakogu.

Enne perkolatsiooni tõmmati kuivatatud lõhnava kummeli maapealselt osalt lehed, õisikud ja varretipud ja jäeti alles jämedamad varred, mida perkolatsioonil ei kasutata. Kuna teekummeli droog oli ostes juba õisikute kujul, siis kaalutigi järgmisena mõlemat droogi 10 grammi. Valmistati ette ka perkolatsiooniaparatuur, milleks kasutati jaotuslehtreid, mis kinnitati statiivide külge (joonis 6).

Jaotuslehtrite põhja asetati vatitomp ning seda niisutati 70% piiritusega (solvent ehk lahusti). Mõlemasse jaotuslehtrisse puistati kaalutud droogi ning peale kallati kogu droogi küllastumiseni solventi, antud juhul umbes 50 ml. Mõlemasse lehtrisse asetati droogi peale paraja suurusega filterpaber, mis niisutati samuti solvendiga. Filterpaber fikseeriti kahe klaaspulga abil. Filterpaber on vajalik selleks, et vältida peenestatud droogi üleskerkimist solvendi lisamisel.

Jaotuslehtritesse valati 70 ml solventi ja jaotuslehtrite avaused kaeti hõbepaberiga ning lasti seista ööpäev. Perkolaatoris toimus seejärel matseratsioon, kus ained ekstraheeruvad droogis olevatest purustatud rakkudest välja molekulaarse difusiooni seaduspärasuste alusel. Kui ained ekstraheeruvad kontsentratsioonide tasakaaluni tahkes faasis ehk droogis

ja seda ümbritsevas solvendis ehk vedelas faasis, nimetatakse seda



Joonis 6. Teekummeli perkolatsiooniparatuur koos droogi ja solvendiga. Autori erakogu.

tasakaalumomendiks. Seetõttu ei suurene mingist momendist alates enam ekstraktainete kontsentratsioon sõltumata ekstraktsiooni kestusest. [20, 21]

Perkolaatidel lasti järgmisel päeval tilkuda kogumisnõudesse, võeti kasutusele ka abinõusid solvendi aurustumise vältimiseks. Tilkumistempoks võeti umbes 20 tilka minutis, aja jooksul vähenes tilkumistempo märkimisväärselt ning vastavalt sellele avati kraani.

Perkolaate koguti lõppmahuni 50 ml, seega droogi ja solvendi vahekorraks sai mõlema tinktuuri puhul 1/5. Tinktuure võrreldes võis märgata, et lõhnava kummeli tõmmis on teekummeli omast tumedam. Tõmmised villiti tumedast klaasist pudelikestesse ning hoiti kasutamiseni jahedas (+4 °C) ja pimedas.

3.3.2. Musta pässiku tinktuur



Joonis 7. Musta pässiku perkolatsioon. Autori erakogu.

Must pässikut korjati autori poolt 26. detsembril 2016. aastal Reola lähedal asuvast kaasikust ja kuivatati paari päeva jooksul dehüdraatoris umbes 45 °C juures. Enne kuivatamist lõigati pässik umbes 2 cm suurusteks tükkideks. Kuivatamine oli vajalik selleks, et peatada ensüümide katalüüsitud lagunemisprotsessid, mis said alguse juba antud juhul musta pässikut puu küljest võttes. Sarnaselt kummelite perkolatsioonile kasutati ka pässiku puhul üsna sarnast meetodit. Perkolaatorina kasutati jaotuslehtrit, mis kinnitati statiivile (joonis 7). Jaotuslehter valiti selline, mille põhjas asuks aukudega plastikust ketas. Kettale lõigati peale paraja suurusega filterpaber, mis niisutati solvendiga (70% piiritus), et see liibuks ketta pinnale. Droog peenestati uhmris nuiaga ning sõeluti läbi 5 mm aukudega sõela kogumisnõusse. Ekstraktsioonimeetodite juures on droogi peenusaste oluline, kuna liialt peen droogipulber moodustab solvendiga taignataolise massi, mis takistab perkolaadi liikumist ning milles toimuvad difusiooniprotsessid aeglaselt. Liialt suured osad on aga ebasoovitavad, kuna siis leidub pulbris liialt palju purustamata rakke, mistõttu suureneb tõkestatud difusiooni osatähtsus ning ekstraktsiooniprotsess aeglustub. [20]

Peenestatud ja sõelatud droogi kaaluti 9,4 grammi ning valati perkolaatorisse. Droogile asetati samuti peale paraja suurusega filterpaber, mis kattis droogi täies ulatuses. Seejärel valati perkolaatorisse 120 ml solventi. Jälgida tuli, et solvent moodustaks droogi ja filterpaberi kohale eraldiseisva kihi. Perkolaatori avaus kaeti solvendi aurumise vältimiseks Petri tassiga ning lasti seista ööpäev.

Järgmisel päeval koguti perkolaat kogumisnõusse, mis kaeti fooliumiga solvendi aurustumise vältimiseks. Tilkumistempoks võeti umbes 20 tilka minutis. Koguti 50 ml perkolaati, mis villiti tumedast klaasist nõusse. Kuni kasutamiseni hoiti tõmmist jahedas (+4 °C) ja pimedas kohas.

3.4. Preparaatide tsütotoksilisuse analüüs

Enne preparaate otsese mõju hindamist viiruslaadsetele partiklitele on vajalik teha kindlaks iga preparaadi kontsentratsioon, alates millest hakkab avalduma rakkudele toksiline mõju. Võib kindel olla, et pannes rakud kasvama tinktuuri sisse, mille etanoolisisaldus on 70%, on see rakkudele letaalse mõjuga. Selle etapi eesmärgiks ongi leida preparaatidele selline kontsentratsioon, kus toimeaineid oleks maksimaalselt, samas aga toksiline mõju rakukultuurile oleks minimaalne.

Preparaatide tsütotoksilisust hinnati MTT (3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid) reagenti kasutades. Tegu on kolorimeetrilise analüüsimeetodiga, seega analüüsi tulemused saadakse proovi värvuse intensiivsuse hindamise teel, antud juhul kindlal lainepikkusel optilise tiheduse mõõtmisega spektrofotomeetri abil.

Igasse rakuplaadi rakkudega kannu pipeteeriti 10 µl 5 mg/ml MTT lahust (Sigma Aldrich) ja suspendeeriti proovi. Plaati inkubeeriti pärast MTT lahuse lisamist umbes kolm tundi rakuinkubaatoris kuni rakkudesse moodustusid lillakaspruunid tilgad.

Rakuplaat kallati kraanikausi kohal söötimest tühjaks järsu liigutusega, seejärel kallati kannudesse fosfaat-puhverdatud soolalahust PBS (*Phosphate Buffered Saline*), tühjendati samal viisil ning kuivatati, lüües kannude suudmetega osa vastu salvrätivirna. Igasse auku lisati 8-kanalilise pipetiga 100 µl dimetüülsulfoksiidi ning asetati loksutisse kiirusega 500 pööret minutis 20 minutiks.

Optiline tihedus mõõdeti spektrofotomeetriga Tecan Sunrise lainepikkusel 540 nm. Tulemustest lahutati maha foon, mis mõõdeti kannudest, kus oli 200 µl IMDM söödet ja 10 µl MTT lahust.

3.5. Preparaatide lahjenduste valmistamine ja lisamine rakkudele

Analüüse teostati U2OS rakukultuuril ehk inimese luukasvajarakkudel. Selleks külvati rakukultuur Petri tassilt 96-kannulisele plaadile arvestusega, et kannu kohta oleks 8×10^3 rakku. Loendamist teostati Invitrogen™ Countess rakuloenduriga. Plaati inkubeeriti ööpäev rakuinkubaatoris.

Preparaatidest ja kontroll-lahustest valmistati lahjendused etanooli sisalduse alusel. Preparaatide puhul, mis etanooli ei sisaldanud, võeti aluseks preparaat ise. Kontroll-lahustena kasutati esimesel juhul 70% etanooli, teisel juhul PBS-i.

Katsete käigus saadi teada, et etanoolil kontroll-lahusena on tugev tsütotoksiline mõju juba alates kontsentratsioonist 2%. Sealt tulenevalt võeti etanooli sisaldavate preparaatide suurimaks kontsentratsiooniks 2% ja sellest lähtuvalt tehti viiekordseid lahjendusi. Iga preparaadi kohta tehti neli lahjendust kontsentratsioonides 2%; 0,4%; 0,08%; 0,016%.

Etanooli sisalduse järgi jaotusid preparaadid järgnevalt:

1. 70% etanooli – teekummeli, lõhnava kummeli ja musta pässiku tinktuurid
2. 65% etanooli – purpur-siilkübara tinktuur
3. 63% etanooli – saialille tinktuur
4. 60% etanooli – aasia-kuldjuure tinktuur
5. 9% etanooli – Befungin
6. Ilma etanoolita – Citrosept

Kõiki proove kanti rakuplaadile kolmes korduses. Preparaatide lahjendusi tehti rakkude kasvusöötmesse IMDM. Lahjenduste valmistamisel kasutati realahjenduse meetodikat, mis jätab vähem ruumi pipeteerimisvigadele. Näide realahjenduse meetodikast: oli vaja valmistada teekummeli tinktuurist kõigi nelja lahjenduse lahused. Kõige kõrgema kontsentratsiooniga (2% etanooli järgi) lahuse lõppmahuks võeti 1000 µl, seega söödet 971 µl ja tinktuuri 29 µl. See lahus suspendeeriti ja segati Vortex aparaadil kontsentratsioonide ühtlustamiseks. Järgmiste lahjenduste tuubidesse oli ette tõstetud 800 µl söödet. Esimesest lahjenduse tuubist tõsteti 200 µl lahust teise lahjenduse tuubi. Pärast lahuse segamist tõsteti omakorda kolmanda lahjenduse tuubist 200 µl neljanda lahjenduse tuubi, mille lõppmahuks jäi 1000 µl.

96-kannulise plaadi kannud jagati eelnevalt mõtteliselt kolme võrdsesse ossa ning auguplaadi kaanele märgiti eelnevalt preparaadi asukohale viitav informatsioon. Seejärel aspireeriti plaadi pealt korraga söötmed 12 kannust ja lisati igasse kannu mööda kannu seina vastav lahus. Plaat jäeti inkubaatorisse ööpäevaks.

3.6. Preparaatide viiruslaadsete partiklite elutsüklit inhibeeriva mõju hindamine

3.6.1. Nakatussöötme valmistamine ja rakkude nakatamine

Preparaatide inhibeerivat mõju VLP-de elutsüklile hinnati, kasutades eelnevalt valmistatud viiruslaadseid partikleid U2OS rakkude nakatamiseks. Rakukultuur oli külvatud 24-kannulistele

plaatidele. Esmalt valmistati nn nakatussööde, mis koosnes söötme ja VLP-de segust. Söötmena kasutati seerumvaba IMDM söödet, seda võeti arvestusega 250 µl iga kannu kohta. Nakatussöötmesse lisati ka Polybrene'i, mille lõppkontsentratsiooniks oli 6 µg/ml. Kolmandaks komponendiks nakatussöötmes olid VLP-d. Neid lisati nakatussöötmesse arvestusega 30 cfu iga kannu kohta. Järgmisena valmistati preparaatidest lahjendused, kasutades selleks nakatussöödet. Katse käigus kasutati positiivse kontrollina retroviirusvastast ravimit nevirapiin (lõppkontsentratsioon 1 µM). Infektsiooni toimumise kontrollina lisati vastavasse kannu VLP-dega nakatussöödet. Lahjenduste valmistamisel kasutati realahjenduse meetodit. Valmistatud preparaatide ja VLP-de segusid inkubeeriti enne rakkudele lisamist üks tund 37 °C juures.

Järgmisena jõuti nakatamisfaasi, millele eelnevalt segati kõik nakatussöötmega preparaatide lahjendused läbi, et kindlustada kontsentratsiooni ühtlus tuubides. Seejärel aspireeriti eelkõlbatud rakkudega rakuplaadilt rea kaupa sööde ning lisati igasse auku 150 µl nakatussöötme ja vastava preparaadiga vastavat lahjendust. Nakatusfaasis oli söötme maht võetud minimaalne, et kindlustada viiruslaadsete partiklite kokkupuude rakkudega: suure söötmemahu puhul pääsevad partiklid rakkudele läbi paksu söötmekihi halvemini ligi. Rakuplaate inkubeeriti seejärel tund aega ja iga kümne minuti järel kallutati plaate, et hoida ära rakkude kuivamine.

Inkubeerimise ajal valmistati uued preparaatide lahjendused, seekord aga ilma VLP-deta, selle asemel kasutati 10% seerumiga IMDM söödet. Need lahjendused (1 ml kannu kohta) lisati rakkudele pärast nakatamise faasi, et tõsta rakkudel oleva söötme mahtu ja et ainete kontsentratsioon püsiks sama. Plaate inkubeeriti ööpäev.

3.6.2. *Gaussia* lutsiferaasi mõõtmine rakulüsaatidest

Rakuplaatidelt aspireeriti sööde ning loputati iga kann 500 µl PBS puhvriga. Lüüsimine toimus kommersiaalse lüüsipuhvri abil, mis sisaldas *Gaussia* lutsiferaasi ekspressiooni mõõtmise komplektis (Promega *Gaussia* Luciferase Assay System). Lüüsipuhvrit lisati igasse kannu 100 µl ning inkubeeriti toatemperatuuril 15 minutit aeg-ajalt plaati loksutades. Aukudes olevad lüsaadid tõsteti seejärel ümber 1,5 ml tuubidesse ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugis üks minut täispööretel (17000× g) rakujääkide sadestamiseks. *Gaussia* lutsiferaasi ekspressiooni mõõtmiseks valmistati komplekti kuuluvast lutsiferaasi substraadi kontsentraadist sajakordne lahjendus komplektis oleva puhvriga. Iga proovi kohta arvestati 25 µl valmis substraadi lahust (sealhulgas varu). Mõõtmised teostati Promega Glomax 20/20 luminomeetriga. Selleks paigutati alusele tühjad 1,5 ml tuubid, kuhu tõsteti valmis 20 µl substraati. Ühekaupa lisati tuubi 4 µl vastavat rakulüsaati, segati ja mõõdeti tulemus luminomeetris. Kõikide proovide puhul oli

ajavahemik rakulüsaadi lisamise ja tulemuste mõõtmise vahel sama, et kindlustada tulemuste võrreldavus.

3.6.3. Valgusisalduse mõõtmine rakulüsaatidest Bradfordi meetodil

Valgusisalduse mõõtmine rakulüsaatidest oli vajalik, kuna rakkude arv kõigis plaadi kannudes ei ole paratamatult võrdne. Seetõttu viidi luminomeetriga mõõdetud tulemus vastavusse rakulüsaadi valgusisaldusega, mis peegeldab rakkude arvu vastavas kannuplaadi kannus.



Joonis 8. Rakulüsaadi lahus, kuhu on lisatud Bradford'i lahust, kuid pole veel segatud. Autori erakogu.

Valgusisaldust mõõdeti Bradford'i reagenti (briljantsinise lahus fosforhappe ja metanooli segus) abil, mis värvub vastavalt sellele, kas see on moodustanud kompleksi valguga või mitte. Bradford'i lahus on tavatingimustes tumepunane, kuid suure valgukontsentratsiooniga lahuses muutub see sinakaks (joonis 8). Teadmata valgukontsentratsiooniga proovi (rakulüsaat) valgusneelduvust võrreldakse proovidega, mille valgusisaldus on täpselt teada. Teadaolevate valgusisaldustega proovide neelduvuse väärtustest moodustatakse graafik, mille abil saabki teada tundmatute proovide valgusisalduse. Esmalt valmistati kindlate kontsentratsioonidega valgulahused 1 mg/ml BSA (*Bovine Serum Albumin*, veiseseerumi albumiin) lahusest. BSA lahuste valmistamiseks kasutati destilleeritud vett. Kontsentratsioonid võeti järgmised: 0 µg/ml; 1,25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 5 µg/ml; 7,5 µg/ml; 10 µg/ml; 15 µg/ml ja 20 µg/ml. Lõppruumalaks võeti 800 µl. Uutesse 1,5 ml tuubidesse lisati 795 µl destilleeritud vett ning seejärel 5 µl vastavat rakulüsaati. Igasse BSA lahuse ja rakulüsaadi lahjenduse tuubi lisati 200 µl Bradford'i reagenti (Bio-Rad) ja segati. Seejärel kanti 96-kannu plaadile kõik proovid 200 µl kaupa. Proovide

neelduvust (optilist tihedust) mõõdeti spektrofotomeetriga Tecan Sunrise ja arvutiprogrammiga Magellan lainepikkusel 595 nm.

4. TULEMUSED JA ARUTELU

4.1. Preparaatide tsütotoksilisuse analüüside tulemused

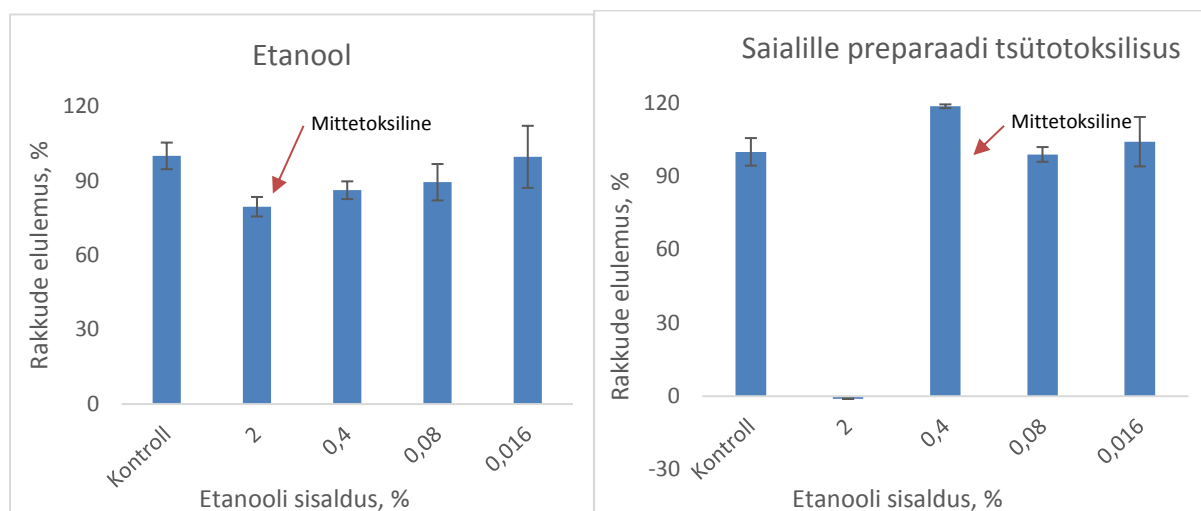
Preparaatide tsütotoksilisuse määramine on esimene analüüs, mis annab aimu preparaadi võimalikust toksilisest toimest, selle abil saab täpsemalt määratleda, millisest kontsentratsioonist alates toksiline mõju kaob. Tsütotoksilisuse hindamine on vajalik, kuna antud uurimuse järgmises etapis, kus uuritakse preparaate mõju viiruspartiklitele, on vajalik, et kõik preparaadid oleksid rakkudele, kuhu partiklid sisenevad, võrdselt mittetoksilised. Vastasel juhul ei saa väita, kas preparaadi toime on VLP-sid inhibeeriv või rakkudele toksiline – viimasel juhul on lutsiferaasi aktiivsus madal vaid selle tõttu, et rakud on surnud.

Toksiline kontsentratsioon on antud juhul selline kontsentratsioon, mis viib alla rakkude elulemus ja tapab neid. Elulemus on näitaja, mis iseloomustab, kui palju elusrakke on preparaadiga töödeldud plaadil võrreldes plaadiga, kuhu pole rakkudele preparaati lisatud. Mittetoksiliseks loetakse sellist aine kontsentratsiooni (preparaadi lahjendust), kus rakkude elulemus pärast töötlust on vähemalt 80% (joonis 9). Maksimaalne mittetsütotoksiline kontsentratsioon sisaldab suurimal hulgal potentsiaalseid toimeaineid. Sellise kontsentratsiooni/lahjenduse leidmine oligi antud katse eesmärgiks.

Maksimaalse mittetsütotoksilise kontsentratsiooni määramiseks valmistati igast preparaadist viis viiekordset lahjendust etanoolisisalduse põhjal. Puhaste ainete puhul kasutatakse kontsentratsiooni väljendamiseks molaarsust. Kuna aga taimsete preparaate puhul on sisalduvaid aineid palju, siis ei saa preparaadi lahjendust molaarsustes väljendada. Antud uurimistöösse sobis etanoolipõhine lahjendussüsteem hästi, kuna tsütotoksilisuse analüüsis määrati eraldi etanooli tsütotoksiline kontsentratsioon. Sel viisil saab jälgida, kas tsütotoksilist efekti põhjustab preparaadis sisalduv etanool või mõni muu preparaadis sisalduv aine. Preparaatide puhul, mis etanooli ei sisaldanud, tehti lahjendused koguruumala põhjal.

Preparaatide tsütotoksilisust hinnati MTT reagendi abil. Kuna MTT on mitokondriaalse suksinaadi dehüdrogenaasi substraat, on see ensüüm aktiivne vaid elujõulistes rakkudes. MTT on reagentina kollakas pigment, mis metaboliseeritakse tavaolukorras raku mitokondrites tumelillaks formasaaniks [22]. Tsütotoksilisust hinnati kolorimeetriliselt, mis tähendab, et hinnatavaks omaduseks on värvus, mille neelduvust määratakse kindlal lainepikkusel. Mida enam lillakaid tilkasid rakud sisaldavad, seda elujõulisemad on rakud ja

sedu väiksem on preparaadi tsütotoksilisus. Analüüsis võrreldi preparaadiga töödeldud rakkude elutegevust kontrolliga ehk selliste rakkudega, kuhu ühtegi preparaati ei lisatud. Iga preparaadi kontsentratsiooni tsütotoksilisus arvutati välja protsentides kontrolli suhtes. Näide sellisest võrdlusest on toodud joonisel 9.



Joonis 9. Erinevate preparaatide tsütotoksilisus U2OS rakuliinile. Elulemusprotsent preparaatidega töödeldud ja töötlemata rakkudes. Vasakul paneelil on näidatud etanooli ja paremal paneelil näitena saialille etanooltõmmiste erinevate kontsentratsioonide (etanooli sisalduse järgi) tsütotoksilisus rakkudele.

Analüüsist selgus, et üksnes etanool on U2OS rakkudele toksiline 2% juures (tabel 3). Seega on ka kõik etanooli sisaldavad preparaadid kindlasti toksilised alates sellest kontsentratsioonist.

Etanoolisisaldusega preparaatide puhul leiti, et maksimaalne mittetoksiline kontsentratsioon on 0,4% (kõikide preparaatide tsütotoksilisuse diagramme vt lisast 2). Siit järeldub ka, et enamasti leidub preparaatides droogist ekstraheerunud aineid, mis avaldavad rakkudele toksilist mõju.

Tabel 3. Preparaatide leitud maksimaalsed mittetsütotoksilised kontsentratsioonid.

Preparaat	Maksimaalne mittetsütotoksiline kontsentratsioon
Etanool	2%
Teekummel	0,4%
Lõhnav kummel	0,4%
Must pässik	0,4%
Saialill	0,4%
Siilkübar	0,4%
Kuldjuur	0,4%
Befungiin	0,000128%
Citrosept	0,016%

Ainus etanoolisisaldusega preparaat, mis mõjus rakkudele tsütotoksiliselt ka väga väikestel kontsentratsioonidel, oli preparaat Befungiin. Befungiin mõjus toksiliselt ka kõige lahjemal kontsentratsioonil, mistõttu arvestati katseväliselt maksimaalseks mittetsütotoksiliseks kontsentratsiooniks sellest järgmine ehk 0,000128% (lisa 2 joonis 13).

Etanoolisisalduseta Citroseptil oli samuti tugev tsütotoksiline toime, mida ei täheldatud enam 0,016% juures (puhta preparaadi lahjendust arvestades).

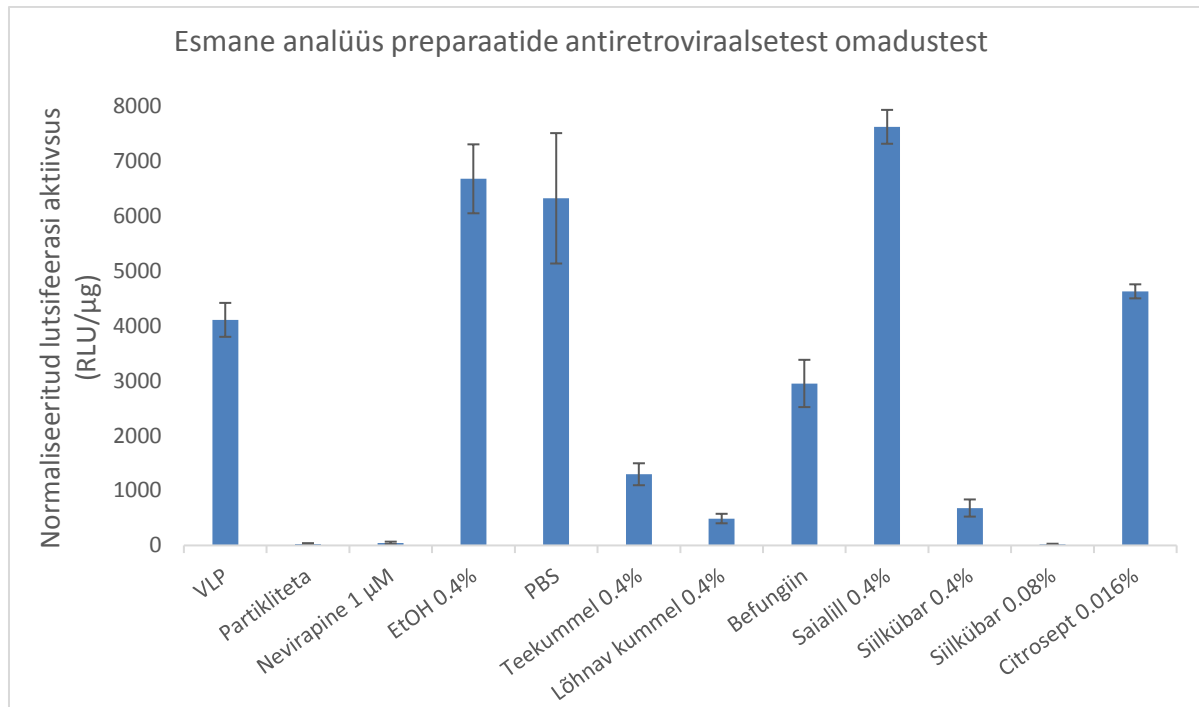
4.2. Preparaatide antiretroviraalse võime hindamine

Preparaatide võimalikku antiretroviraalset toimet uuriti lentiviiruslaadsetel partiklidel. Kõigist preparaatidest valmistati esmalt maksimaalse mittetsütotoksilise kontsentratsiooniga lahjendus. See oli vajalik hindamaks, kas preparaat omab mingisugustki võimet pärssida viiruspartiklite elutegevust. Kui see antiviraalne toime maksimaalsel mittetsütotoksilisel kontsentratsioonil puudus, ei jätkatud mõju uurimisega väiksematel kontsentratsioonidel, kuna see oleks puudunud.

Mõju uurimiseks valmistati preparaatidest lahjendus, võttes lahustiks nn nakatussöötme, mis koosnes IMDM söötimest ja viiruspartiklitest. Viiruspartikleid võeti sellise arvestusega, et ühe 12-kannulise plaadi kannu kohta tekiks 30 kolooniat. See on selline arv, mida antud kannu suuruse juures on veel võimalik kokku lugeda (joonis 3). Üldiselt on viiruspartiklite arv võrdne tekkivate kolooniate arvuga, kuna üks partikkel nakatab kokkuleppeliselt vaid ühe raku.

Preparaatide lahjendused valmistati nakatussöötmesse, et preparaadi toimeainetel oleks võimalus viiruspartiklite nakatusvõimet juba enne rakkudega kokkupuutumist mõjutada.

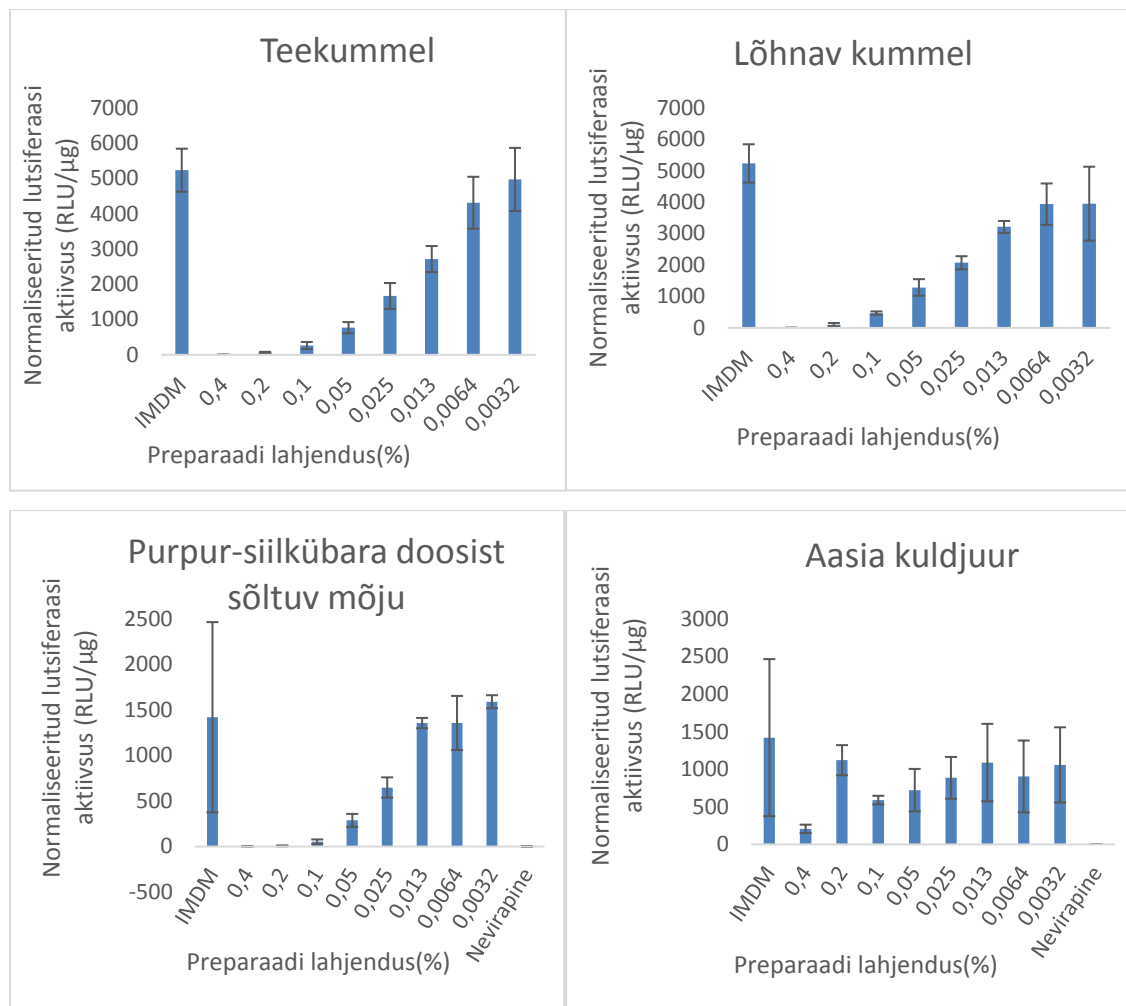
Preparaatide toimet partiklite elutegevust inhibeerida mõõdeti rakulüsaatidest luminomeetri abil, seda võimaldas viiruspartiklite genoomis sisalduv lutsiferaasi ekspresseeriv geen (lisa 1). Mida vähem partiklite elutegevus oli pärsitud, seda rohkemate (kokkuleppeliselt kuni 30) rakkude genoomi on viiruspartiklid võimelised lutsiferaasigeeni integreerima ning seda suurem on ka lutsiferaasi ekspressioon. Lisades rakkudele lutsiferaasi substraati lutsiferiini, tekib lutsiferaasi olemasolul luminestsentsi signaal, mida on võimalik mõõta. Mõõdetud luminestsentsi tulemused normaliseeriti rakulüsaadi koguvalgusisalduse suhtes, mida mõõdeti Bradford'i meetodil (joonis 10).



Joonis 10. Galeeniliste preparaatide mõju lentiviiruslaadsetele partiklitele. Mõõdetud luminestsentsi hulk μg valgu kohta U2OS rakkudest, mis olid nakatatud HIV-1 VLP-dega ja töödeldud uuritavate preparaatidega. Kontrollideks on võetud nakatatud, kuid preparaatidega töötlemata rakud (VLP), nakatamata rakud (partikliteta) ning nevirapiiniga töödeldud ja nakatatud rakud (nevirapiin – 1 μM). Katsesse ei kaasatud hiljem valminud preparaate ehk musta pässiku ja aasia kuldjuure tinktuure.

Esmasest analüüsist selgus, et VLP-de nakatamisele ei oma toimet saialille ja Citrosepti preparaadid (joonis 10). Uurimistöös avaldamata katses järeldus ka omavalmistatud musta pässiku tinktuuri antiviraalse aktiivsuse puudumine. Esmasesse katsesse kaasati ka etanooli kontsentratsioon, et selgitada välja ka etanooli enda võimalik toime partiklitele. Preparaatide esmase antiretroviraalse toime hindamise järel uuriti aktiivsete preparaatide täpsemat doosist sõltuvat mõju partiklitele. Doosist sõltuvat mõju uuriti, kuna tavaliselt määratakse puhaste ainete puhul antiviraalne toime IC50 (*Inhibitory concentration 50*, poolmaksimaalne inhibeeriv kontsentratsioon) näol. IC50 näitab puhta aine puhul aine kontsentratsiooni (väljendatud

molaarsusena), mille juures see omab inhibeerivat efekti poole mõõdetava tunnuse puhul. Kuna aga uuriti preparaate, mis sisaldavad suurel hulgal erinevaid aineid, on molaarsuse määramine tarbetu. Siiski annab antud uurimuses koostatud kahekordsete lahjenduste rida aimu, kuidas muutub preparaadi võime inhibeerida partiklite elutegevust. Ideaalis võiks preparaadi toime olla täheldatav ka väga väikeste kontsentratsioonide juures (joonis 11).



Joonis 11. Lentiviiruslaadsetele partiklitele inhibeerivat toimet avaldanud preparaatide doosist sõltuvad antiviraalsed omadused. Kontrolliks on preparaatidega töötlemata ja VLP-dega nakatatud rakkude lüsaadi lutsiferaasi aktiivsus (luminestsents). Preparaatide lahjendused on antud etanooli sisalduse järgi. Positiivseks kontrolliks on nakatatud ja nevirapiiniga töödeldud rakud. IMDM – VLP-dega nakatatud ja preparaatidega töötlemata rakud.

Preparaate, millel täheldati viiruslaadsete partiklite vastane aktiivsus, oli neli: tee- ja lõhnava kummeli tinktuur, purpur-siilkübara tinktuur ja aasia kuldjuure tinktuur (joonis 10). Neist kolm esimest omasid äärmiselt kõrget antiretroviraalset aktiivsust, mis preparaadi maksimaalsel mittetsütotoksilisel kontsentratsioonil oli võrreldav isegi analüüsis kasutatud kommertsiaalse antiretroviraaliga ehk 1 μM nevirapiiniga (joonis 10).

Kuna mõlema kummeliliigi preparaadi (tinktuuri) antiviraalsed omadused olid sarnased (joonis 11), siis võib arvata et nende koostis ja toimeainete sisaldused on sarnased. Mõnevõrra aktiivsemaks võib siiski pidada lõhnava kummeli tinktuuri, mille aktiivsus ei kadunud ka kaheksanda lahjenduse ehk 0,0032% juures, teekummelil oli see siis võrdne juba negatiivse kontrolliga. Purpur-siilkübara tinktuur oli kummeli tinktuuridest mõnevõrra suurema aktiivsusega, seda just väiksematel kontsentratsioonidel (joonis 11). Aasia kuldjuure tinktuuri aktiivsus oli nelja seast nõrgim, juba maksimaalsel mittetsütotoksilisel kontsentratsioonil oli see kolme aktiivsema preparaadiga võrreldes sadu kordi nõrgem (joonis 11).

4.3. Arutelu

Uurimistöö autor toob välja järgmiste edasiarenduste võimalused: katsed metsiktüüpi viirusega, toimeainete ekstraheerimine ja katsed loomudelitega. Esimeseks edasiarenduse võimaluseks on katse läbiviimine metsiktüüpi HIV-1-ga, mis tagaks lihtsamini tõlgendatavad tulemused, kuna antud uurimuses kasutatud viiruslaadsed partiklid ei ole üks-ühele sarnased metsiktüüpi viirusega. Teiseks edasiarenduse võimaluseks on preparaatide täpsema toime määramine ja seejärel toimeaine ekstraheerimine preparaadist. Toimeta ained tuleks preparaadist eemaldada. Kolmandaks edasiarenduseks on antud uurimuse kui ravimiuuringu viimine raku tasandilt edasi organismi tasandile. Mudelorganismidel oleks uuritavateks aineteks preparaatidest ekstraheeritud puhtad toimeained. Samas ei pruugi mudelorganismil testides enam mõnel raku tasandil aktiivsust näidanud ainel aktiivsust olla, kuna organismis võidakse aine metaboliseerida mitteaktiivsele kujule. Samuti on võimalik, et toimeained omavad organismis raskeid kõrvaltoimeid.

Antud uurimuse piirangutena võib tuua välja kolm aspekti: preparaatide täpsema mõju hindamise puudumine, viiruslaadsete partiklite kasutamine metsiktüüpi viiruste asemel ja VLP-de nakatamisvõime hindamine lutsiferaasi aktiivsuse kaudu. Kuna uurimisobjektiks kasutati viiruslaadseid partikleid ning uuriti lõppkokkuvõttes vaid seda, kui edukalt partiklid ennast peremeesraku genoomi proviiruseks suudavad integreerida, siis jääb teadmata, kuidas preparaat täpsemalt mõjus. Preparaat võis otseselt inhibeerida näiteks pöördtranskriptaasi või muud viiruse ensüümi, kuid samahästi võis ta toimida kaudselt, nt mõjutada peremeesraku enda mehhanisme nagu tuumatransport, transkriptsioon, translatsioon jne. Igal toodud juhul on tulemuseks proviiruse ja seeläbi lutsiferaasi geeni mitteintegreerumine ja/või selle ekspressiooni puudulikkus/puudumine.

Viiruslaadsete partiklite kasutamisega seondub ka asjaolu, et uurimuses kasutatud viiruslaadne partikkel ei ole sama, mis metsiktüüpi HIV-1 partikkel. Uurimuses kasutatud

partiklite membraanvalkudeks ei olnud mitte metsiktüüpi HIV-le omased valgud, vaid need pärinesid hoopis teiselt viiruselt (VSV), et suurendada võimalike nakatatavate peremeesrakkude ringi. Samuti kasutati partiklite valmistamisel vaid kolme HIV-1 geeni. Seetõttu võis näiteks mõni preparaat, mis antud uurimuses tunnistati mitteaktiivseks, osutuda metsiktüüpi HIV-1 vastu tegelikult aktiivseks või vastupidi. Kolmandaks piiranguid loovaks asjaoluks võib lugeda lutsiferaasipõhist viiruslaadsete partiklite elutegevuse hindamist. Nimelt ei pruugi lutsiferaasigeen olla ilmingimata integreerunud peremeesraku kromosoomi, vaid võib kuuluda hoopis rakutuumas oleva nn miniplasmiidi koosseisu, mis võib mõjutada tulemusi.

5. KOKKUVÕTE

HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) kandjateks hinnati 2015. aastal 36,7 miljonit inimest. HIV-1 nakkuse tulemusena kujuneb inimesel lõpuks AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*). HIV-1 ei ole organismist täielikult kõrvaldatav, viirust saab aga efektiivselt kontrolli all hoida HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) abiga.

Uusi antiretroviraale on vaja välja töötada mitmel põhjusel. Esiteks kujuneb HIV-1 viirusel aegamööda välja resistentsus teatud raviainete vastu. Teiseks on mitmetel antiretroviraalidel ebameeldivad/ohhtlikud kõrvaltoimed. Kolmandaks ei ole HAART ravi kõrge hinna tõttu kättesaadav arengumaades, kus HIV kandjate arv on kohati suurim. Looduslikud ühendid saaksid pakkuda lahendust nendele probleemidele.

Antud uurimistöös uuriti valitud taimsete preparaatide võimalikku antiretroviraalset mõju lentiviiruslaadsetele partiklitele (VLP), mis kujutavad endast ohutut HIV-1 põhjal valmistatud *in vitro* katsemudelit.

Viiruspartiklid valmistati Virapower™ Lentiviral Expression Systems komplekti kasutades. Üks osa kasutatud taimsetest preparaatidest valmistati töö autori poolt TÜ farmaatsia instituudis prof Ain Raali juhendamisel, teine osa preparaate varuti apteegist. Enne preparaatide mõju uurimist katsemudelitel uuriti preparaatide tsütotoksilist efekti. Järgnevalt uuriti tinktuuride inhibeerivat toimet VLP-de elutsüklile. Uurimistöö eksperimentaalne osa teostati perioodil 2016 august kuni 2017 mai Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis.

Uurimistöö käigus saadi järgnevad tulemused:

- 1) Valimis olnud kaheksast taimsest preparaadist kolm olid rakukultuuri tasandil võimelised märgatavalt pärssima HIV-1 VLP-de elutegevust. Need olid teekummeli, lõhnava kummeli ja purpur-siilkübara tinktuurid, mis on toime kohati võrdväärset meditsiinis kasutatavate

antiretroviraalidega nagu nevirapiin.

- 2) Teekummeli ja lõhnava kummeli etanooltõmmiste antiretroviraalsed omadused olid väga sarnased. Sellegipoolest on seni rahvameditsiinis ja üldiselt palju rohkem äramärkimist pälvinud teekummel.
- 3) Nii autori valmistatud musta pässiku tinktuur kui käsimüügis olev preparaat Befungin ei avaldanud HIV-1 VLP-dele märgatavat mõju.

Uurimistöö käigus saadud tulemuste põhjal saaks teha mitmeid edasisi uuringuid, nt määrata ja ekstraheerida preparaatidest lentiviiruslaadsetele partiklitele mõju avaldanud toimeained ning uurida nende täpsemat toimemehhanismi.

6. SUMMARY

Inhibiting the life cycle of lentivirus-like particles with liquid galenic formulations

Regardless of the development of technology and medicine, HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus) infection has remained incurable eventually leading to the development of AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome). It can be controlled only with the use of Highly Active Antiretroviral Therapy. Unfortunately, antiretrovirals can cause unpleasant/dangerous adverse effects. Moreover, the treatment is unavailable in developing countries. Also, some HIV strains develop resistance to antiretrovirals. One way to solve the problems is to look for natural antiretroviral substances.

The aim of this work was to analyze the antiretroviral properties of medicinal plant tinctures *in vitro*. HIV-1 based lentivirus-like particles (VLP) prepared with Virapower™ Lentiviral Expression Systems kit were used for testing as a safe experimental system.

For that, eight medicinal plant tinctures were analyzed. Three of them were made by the author at the Institute of Pharmacy of Tartu University under the supervision of prof Ain Raal. Before testing, the cytotoxicity of the tinctures was evaluated using MTT assay. Then, the inhibitory effect of the tinctures on the HIV-1 VLP-s life cycle was investigated.

The results were as follows:

1. Three out of eight tinctures were able to significantly inhibit *in vitro* the life cycle of HIV-1 VLP-s: *Chamomilla recutita*, *Chamomilla suaveolens*, and *Echinacea purpurea*.
2. The antiretroviral properties of *Chamomilla recutita* and *Chamomilla suaveolens* tinctures were similar, in spite of *Chamomilla recutita* being used more intensely in folk medicine.

3. Both the tincture of *Inonotus obliquus* made by the author and the liquid formulation of the same fungi sold under the name Befungin did not have any effect on HIV-1 VLP-s.

Therefore, it was concluded that natural antiretroviral compounds are present in some medicinal plants and they can have a strong inhibiting effect on HIV-1 based VLP-s. Based on the results of this research paper, further experiments could be carried out in order to determine and extract particular compounds that possessed antiretroviral properties.

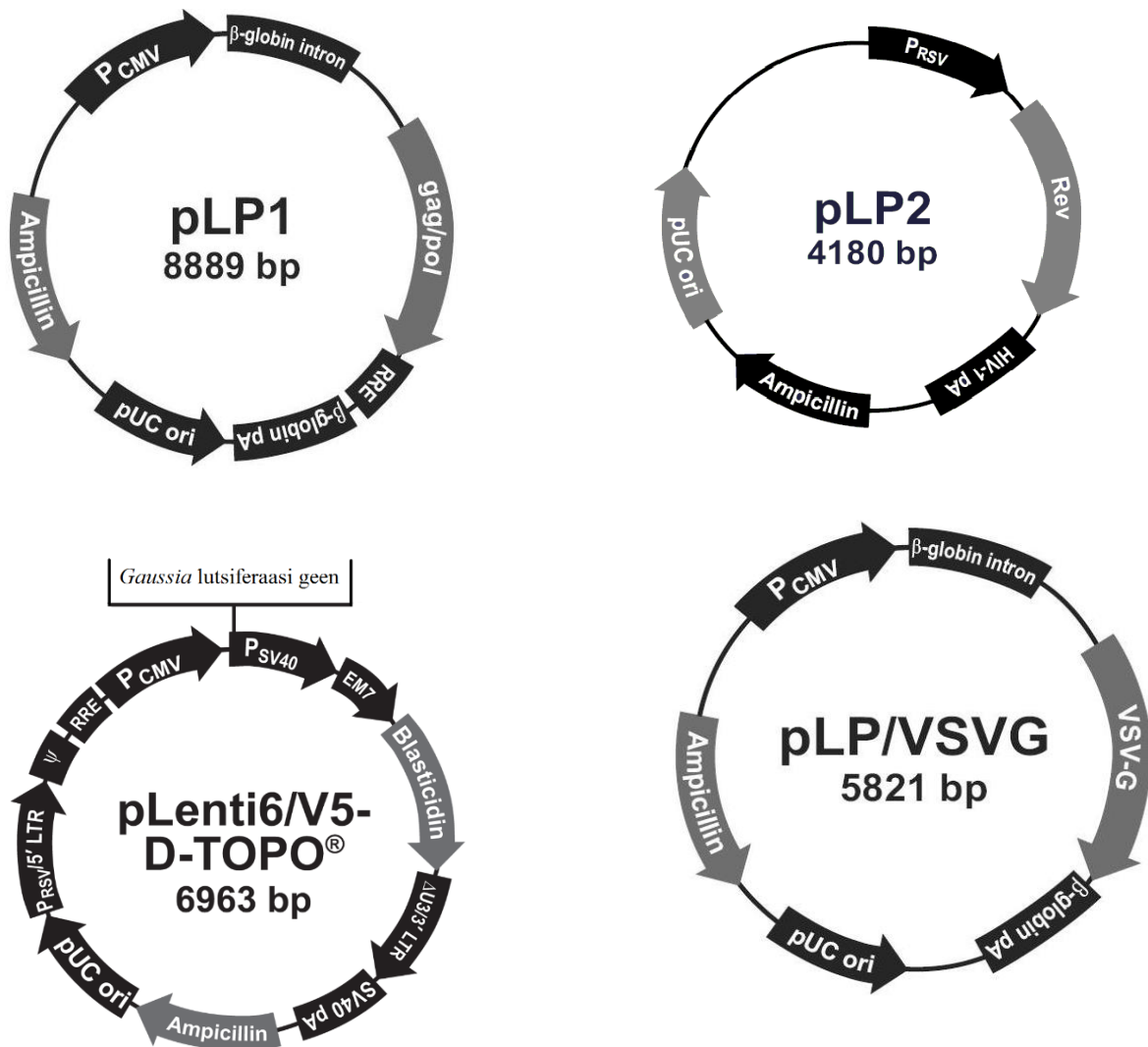
7. KASUTATUD ALLIKATE LOETELU

- [1] Smith, K. A. (2013). Smallpox: Can we still learn from the journey to eradication? New York.
- [2] WHO. (2012). Smallpox. <http://www.who.int/csr/disease/smallpox/en/> (12.06. 2017).
- [3] WHO. (2017). HIV/AIDS. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/> (12.06.2017).
- [4] Adojaan, M., Männik, A., Sikut, R. (2006). HI-viiruse päritolu ja bioloogia. Tulva, I., Öpik, M., Mänd, P. (toim.). *Pärandumise teooria*. Tartu: Sulemees, 68–75.
- [5] Raal, A. (2010). Farmakognoosia. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus.
- [6] Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R., Skalka, A. M. (2004). Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses. Washington: ASM Press.
- [7] Carter, J. B., Saunders, V. A. (2013). Virology. Principles and Applications. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- [8] Acheson, N. H. (2011). Fundamentals of molecular virology. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
- [9] Helfer, M., Koppensteiner, H., Schneider, M., Rebensburg, S., Forcisi, S., Müller, C., Brack-Werner, R. (2014). The Root Extract of the Medicinal Plant *Pelargonium sidoides* Is a Potent HIV-1 Attachment Inhibitor. *Plos ONE*, 9(1), 1–12.
- [10] Jaeger-Greer, M. R., Cates, R. G., Johnson, F. B., Lamnaouer, D., & Ohai, L. (2010). Activity of acetone and methanol extracts from thirty-one medicinal plant species

- against herpes simplex virus types 1 and 2. *Pharmaceutical Biology*, 48(9), 1031–1037.
- [11] Invitrogen™ by life technologies™. (2010). Virapower™ Lentiviral Expression Systems. Lentiviral systems for high-level expression in dividing and non dividing mammalian cells. Carlsbad.
- [12] Li, X., Duan, S., Chu, C., Xu, J., Zeng, G., Lam, A. K., Jiang, L. (2013). Melaleuca alternifolia concentrate inhibits in vitro entry of influenza virus into host cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(8), 9550–9566.
- [13] Raal, A. (2010). Maaailma ravimtaimede entsüklopeedia. Tallinn: Eesti Entsüklopeediakirjastus.
- [14] Befungin – instruction, application reviews. (2017). <http://vitamedd.com/en/pages/1340925> (10.9.2017).
- [15] Vimalanathan, S., Kang, L., Amiguet, V. T., Livesey, J., Arnason, J. T., & Hudson, J. (2005). Echinacea purpurea Aerial Parts Contain Multiple Antiviral Compounds. *Pharmaceutical Biology*, 43(9), 740–745.
- [16] Citrosepti koostis. (2007). <http://citrosept.net/ee/citrosept-structure/> (13.06.2017).
- [17] Bevilacqua, A., Ficelo, S. (2008). Bioactivity of grapefruit seed extract. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34, 495–507.
- [18] 293 [HEK-293] (ATCC® CRL-1573™). (2017). https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1573.aspx?geo_country=ee#generalinformation (12.06.2017).
- [19] Polybrene Infection / Transfection Reagent (2015). <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/tr1003?lang=en®ion=EE> (12.06.2017)
- [20] Veski, P., Paavo, M. (2010). Ekstraktsioonimeetodid. Tinktuurid. Ekstraktid. Uusgaleenilised preparaadid. Tartu.
- [21] Veiderpass, N. (1947). Galeeniline farmaatsia. Tartu: RK Teaduslik Kirjandus.
- [22] Barnabé, M. (2017). Cell viability assays: MTT assay application and protocol. <https://blog.quartzy.com/2017/05/01/cell-viability-assays-mtt-protocol> (24.06.2017).

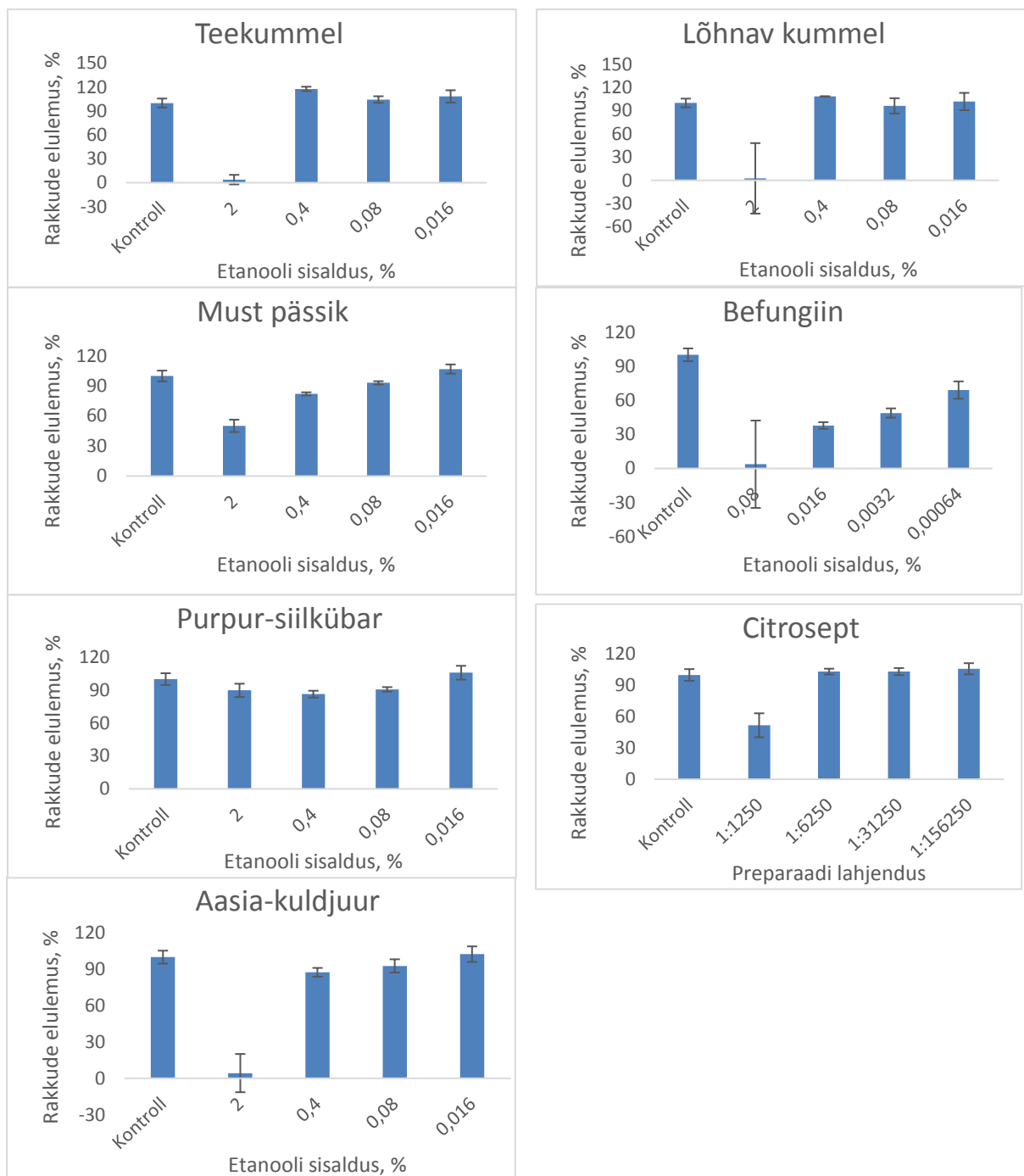
LISAD

Lisa 1. Lentiviirus-laadsete partiklite valmistamiseks kasutatud plasmiidid



Joonis 12. Lentiviiruslaadsete partiklite valmistamiseks kasutatud kolm pakkeplasmidi ja üks ekspressiooniplasmid *Gaussia* lutsiferaasi geeniga. [11]

Lisa 2. Tsütotoksilisuse analüüsi tulemused



Joonis 13. Preparaatidega läbi viidud tsütotoksilisuse analüüsi tulemused U2OS rakukultuuril, normaliseeritud negatiivse kontrolliga (IMDM söötmes kasvatatud U2OS rakud).