

VÕRU KREUTZWALDI KOOL

KERT RAUDNÕMM

8.A KLASS

## NÕUDEPESUVAHENDI FAIRY MÕJU KERATINOTSÜÜTIDELE

JUHENDAJAD ANA REBANE, KADRI PAULUS

### SISSEJUHATUS

Ühed peamised inimese nahakoes olevatest rakkudest on keratinotsüüdid. Keratinotsüüdid tagavad organismile esmase kaitse väliste keskkonnamõjude, sealhulgas *patogeenide* (kaldkirjas terminite seletused on esitatud peatükis „Kasutatud terminid“), allergeenide ja organismile ohtlike keemiliste ühendite eest. Keratinotsüüdid moodustavad naha kõige välisema kihi, *epidermise*, mis kaitseb kogu organismi (Vikipeedia).

Kui patogeenid või muud kahjustavad ained hakkavad epidermise ülemistesse kihtidesse sisenema, saavad keratinotsüüdid reageerida, tekitades põletikuvastaseid vahendajaid, eriti kemokiine. Kemokiinid on valgud, mis talitlevad leukotsüütide liikumist juhtivate kemotaktiliste mõjuritena. Nad meelitavad *leukotsüüte* sellesse kohta organismis, kus toimub patogeeni või kahjustava aine sissetung (TEA entsüklopeedia, 2013, lk 229).

Siinse uurimuse eesmärk oli saada vastus uurimusküsimusele, kuidas nõudepesuvahend avaldab mõju naharakkudele. Püstitasime hüpoteesi, et mida suurem on nõudepesuvahendi Fairy kontsentratsioon lahuses, seda rohkem tekib rakkudes stressiga seotud geeni IL-8 toodetavat põletikku vahendavat valku (Vikipeedia). Selleks uurisime mikroskoopia abil Fairy mõju keratinotsüütidele, mis kasvasid kas mitmekihilises (3D) kultuuris või ühekihilises (2D) kultuuris. Lisaks mõõtsime Fairy mõju 3D keratinotsüütide kultuuri elektrilisele takistusele ja põletikku vahendava valgu *IL-8 mRNA ekspressioonile*, kasutades *qPCR* analüüsi (Oxford Reference).

# SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	1
KASUTATUD TERMINID.....	3
1. MEETODID.....	5
1.1. Keratinotsüütide (KC) kasvatamine 2D ja 3D kultuurides.....	5
1.1.1. Söötmed ja puhvrid.....	5
1.1.2. KC kultuuri kasvatamise alustamine ehk rakkude ülesvõtmine ja kasvatamine 2D kultuuris.....	5
1.1.3. Rakkude jagamine ja kasvatamine 2D kultuuris.....	6
1.1.4. Rakkude jagamine ja kasvatamine 3D kultuuris.....	6
1.1.5. Mikroskoopia.....	6
1.2. RNA puhastamine koekultuuri rakkudest.....	7
1.3. cDNA süntees.....	7
1.4. qPCR koos EvaGreeni seguga.....	8
2. TULEMUSED.....	9
2.1. Nõudepesuvahendi toime jagunevatele inimese naha keratinotsüütidele 2D kultuuris.....	9
2.2. Nõudepesuvahendi toime keratinotsüütide 3D kultuuris.....	11
3. ARUTELU.....	14
KASUTATUD KIRJANDUS.....	16
LISAD.....	17
Lisa 1. Fairy mõju keratinotsüütidele 2D kultuuris.....	17
Lisa 2. Fairy mõju keratinotsüütidele 2D kultuuris, korduskatse.....	18
Lisa 3. Fairy mõju keratinotsüütidele 3D kultuuris.....	19

## KASUTATUD TERMINID

**Patogeen** – haigustekitaja, tõvestav tegur (Eesti keele seletav sõnaraamat, 2019).

**Epidermis** – marrasknahk, mis sisaldab erinevaid kihte: ogakiht, läikekiht, sõmerkiht, ogakiht, basaalkiht. Marrasknaha all asub dermis ehk pärisnahk. (Epidermis, 2015)

**Leukotsüüt** – valgeverelible (Leukotsüüt, 2017).

**IL-8 mRNA** – ehk interleukiin 8 on stressigeen, mille mRNA taseme järgi on võimalik määrata raku stressi ja seisukorda.

**Ekspressioon** – geeni avaldumine.

**qPCR** – lühend tuleb inglise keelest (*quantitative polymerase chain reaction*) ehk eesti keeles kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon. Kvantitatiivne meetod DNA hulga määramiseks, kus DNA kogust suurendatakse seni, kuni qPCR`i masin suudab seda analüüsida. Et masin suudaks laseri abil analüüsida tekkinud molekulid, lisatakse reaktsioonisegusse DNA kaksikahelate vahele seonduvat värvaine molekuli EvaGreen (Oxford dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, 2019).

**Antibiootikum** – mikroobse päritoluga toimeaine, mis pärsib mikroorganismide elutegevust või surmab nad.

**Antimükootikum** – mikroobse päritoluga toimeaine, mis pärsib seente elutegevust või surmab neid (Eesti keele seletav sõnaraamat, 2019).

**Rekombinantne epiteeli kasvufaktor EGF** – rakusöötmesse lisatav valk, mis keratinotsüütide kasvuks vajalik.

**Laminaar** – steriilsetes tingimustes töötamiseks ette nähtud ringleva õhuga kapp.

**Aspireerima** – välja või ära imema.

**Konfluentsus** – olukord, kus plastiku pind on tihedalt rakkudega kaetud.

**Inkubeerima** – antud juhul koekultuuri soojendada selleks ettenähtud kapis vajaliku temperatuurini.

**24 kannuga plaat** – plaat, mida kasutatakse rakkudega katsete tegemiseks.

**µl** –  $10^{-6}$  liitrit.

**Resuspendeerima** – rakke või osakesi uuesti suspensiooni viima. DNA sadestamist ja resuspendeerimist korratakse kaks korda.

**Qiazol** – vedelik, mida kasutatakse rakkude lüüsimiseks.

**Vortex** – vorteksima (Vortex-segajal segama) (Kelve, 2004, lk 90).

**Osopropanool** – vedel alkohol, mida kasutatakse lahustina ja atsetooni tööstuslikul tootmisel.

**RNA** – RNA on lühend ribonukleiinhappe nimetusest. Tegemist on biopolümeeriga, mille monomeerideks, on nukleotiidid (<https://et.wikipedia.org>). See on üheaahelaline polünukleotiidide jada, mis on omavahel seotud fosfodiestersidemetega (Taskutark, 2019).

**Termotsükler** – ehk PCR-masin on polümeraasi ahelreaktsiooniks vajalik aparaat, mis sisaldab reaktsioonituubide hoidjat ja programmi, mis automatiseerib tuubide kuumutamise kindlal temperatuuril kindlate ajavahemike kaupa. (Polümeraasi ahelreaktsioon, 2017)

**Pöördtranskriptsioon** – Geneetilise informatsiooni ülekanne RNA-lt DNA-le – DNA-süntees RNA järgi, tekib komplementaarne ehk cDNA (Geneetika, 2019).

**cDNA** – inglise keeles complementary DNA ehk komplementaarne DNA üheaahelaline DNA, mis on komplementaarne mRNAga ja mida sünteesitakse pöördtranskriptsiooni abil (Kelve, 2004, lk 34).

**Monomeer** – väikese molekulmassiga keemiline ühend, mis on võimeline liituma endaga identsete molekulidega, moodustades monomeeri lülidest koosnevaid ahelaid, mis on suurema molekulmassiga (Monomeer, 2015).

**Supernatant** – tähistab vedelikku, mis asub pärast kristallimist, sadestamist, tsentrifuugimist või muud protsessi tahke jäägi kohal.

# 1. MEETODID

## 1.1. Keratinotsüütide (KC) kasvatamine 2D ja 3D kultuurides

### 1.1.1. Söötmed ja puhvrid

Töös kasutatud keratinotsüüte kasvatatakse seerumvabas söötmes KC-SFM+, s.o. KC-SFM (Thermo Fisher Scientific) + lisandid: *Antibiootikum/antimükootikum* 1 : 1000 lahjenduses, inimese *rekombinantne epidermaalne kasvufaktor (EGF; epidermal growth factor)* ja veise ajuripatsi ekstrakt (*Bovine Pituitary Extract*) tootja protokoll järgi (Thermo Fisher Scientific). Rakkude pesemiseks kasutatakse steriilset fosfaat-puhverdatud soolalahust (PBS). Steriilne 0,1%-line trüpsiin (Thermo Fisher Scientific) oli lahjendatud PBS-is rakkude tassi küljest lahti võtmiseks. Rakkude neutraliseerimiseks kasutatakse trüpsiini neutraliseerimispuhvrit TN (Thermo Fisher Scientific). 3D kultuuri kasvatamiseks kasutatakse ALI (*air liquid interface*) söödet (1 : 1 suhtes KC-SFM+ ja ilma lisanditeta DMEM) ja rippembraane (23 Well ThinCert™ Cell Culture Inserts) (Greiner Bio-One) (EKSS).

### 1.1.2. KC kultuuri kasvatamise alustamine ehk rakkude ülesvõtmine ja kasvatamine 2D kultuuris

Enne *laminaari* (JOUAN) all tegutsemist kiiritatakse laminaari 10–15 min UV-kiirgusega, et töökeskkonda saastet põhjustavatest mikroorganismidest puhastada. Pipeteerisime 10 ml KC-SFM+ söödet 10 cm diameetriga koekultuuri tassile ja asetatakse selle 10–15 minutiks koekultuuri kappi (Sanyo O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> incubator) sooja, kus oli temperatuur 37 °C ja keskkond 5% CO<sub>2</sub> ja veeauruga küllastatud. Seejärel pipeteerisime 120 ml söödet 15 ml keeratava korgiga tuubi. Võtsime külmutatud rakkude tuubi vedelast lämmastikust ja sulatasime seda käes hoides kiiresti. Pipeteerisime rakususpensiooni söötmesse võimalikult kiiresti, juba enne sulatamise lõppu. Tsentrifugeerisime rakkudega söödet (Eppendorf Centrifuge 5424) 7–10 minutit 300 g (kus g tähistab tsentrifugaaljõudu, umbes 1000 pööret minutis) juures. Võtsime koekultuuri kapist soojendatud söötmega tassi ja asetatakse laminaari alla. *Aspireerisime* söötme tuubis olevatelt rakkudelt, et eemaldada külmutusreagent. Pipeteerisime tassilt söötme rakkudele ja segasime pipetiga üles-alla mõned korrad. Asetasime rakud koekultuuri kappi. Juhul, kui rakud ei läinud jagamisse, vahetasime söödet igal teisel või kolmandal päeval. Jagasime rakke 70–80% *konfluentsuse* juures.

### **1.1.3. Rakkude jagamine ja kasvatamine 2D kultuuris**

Eelsoojendasime vajaliku koguse söödet koekultuuri kapis ja trüpsiini ja neutraliseerimispuhvri toatemperatuuril. Eemaldasime keratinotsüütidelt vana söötme ja pesime rakke 10 ml PBS-iga. Seejärel lisasime tassile 2 ml trüpsiini, *inkubeerisime* umbes 5 min koekultuuri kapis, kontrollisime mikroskoobiga Zeiss Axiovert 40 CFL (Zeiss), kas rakud on trüpsiini mõjul tassi küljest lahti tulnud. Lisasime tassile 2 ml trüpsiini neutraliseerijat (TN) (Thermo Fisher Scientific) ja kogusime rakud 15 ml tuubi. Lisasime tassile 5 ml PBS-i ja pesime tassi kõikide rakkude kogumiseks. Tsentrifugisime rakkudega tuubi (Eppendorf Centrifuge 5424) 7–10 min 300 g 4 °C. Eemaldasime söötme, lisasime 10 ml värsket söödet ja pipeteerisime rakususpensiooni ühtlaseks. Jagasime rakud kasvatamiseks plaatidele, lahjendades suspensiooni (tavaliselt 1:2...1:4 lahjendusel) või katseks 12-kannulistele plaatidele, tavaliselt 1:2...1:4 lahjendusel ehk ca 40 000 rakku kannu kohta.

### **1.1.4. Rakkude jagamine ja kasvatamine 3D kultuuris**

3D kultuuri jaoks kasutasime *24-kannuliste plaatidesse* sobivaid rippmembraane. Jagasime igasse 24 kannuga plaadi kannu 0,5 ml ALI söödet. Pipeteerisime igale rippmembraanile 200  $\mu$ l söödet, inkubeerisime 10 minutit koekultuuri inkubaatoris (Sanyo O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> incubator), mõõtsime algset membraani takistust TER (ingl *trans-epithelial resistance*) (Millicell ERS-2). Samal ajal võtsime rakud tassilt trüpsiini abil lahti nagu punktis 2.1.3. ning *resuspendeerisime* söötmes tihedusel 50 000 rakku 300  $\mu$ l ALI söötmes. Aspireerisime söötme rippmembraanidelt ja jagasime rakud ettevaatlikult pipeteerides 300  $\mu$ l kaupa rippmembraanidele. Mõõtsime iga päev 3D kultuuri takistust TER (Millicell ERS-2) (3–5 kihti rakke). 3D moodustumine (3–5 kihti rakke) võtab aega umbes 5 päeva. Vahetasime ALI söötme nii membraanilt kui ka kannult ülepäeviti. 4.–5. päeval olid rakud katseks valmis.

### **1.1.5. Mikroskoopia**

Rakkude pildistamiseks kasutasime mikroskoopi Zeiss Axiovert 40 CFL (Zeiss) ja sellega ühendatud arvutiprogrammi Axio Vision 4.8.2 (Zeiss). Rakud pildistasime 400-kordse suurendusega objektiiviga.

## 1.2. RNA puhastamine koekultuuri rakkudest

Aspireerisime söötme rakkudelt ja pesime rakke 1 ml PBS-ga. Seejärel aspireerisime PBS-i. Lisasime 500 µl *Qiazoli* (Qiagen) igasse kannu. Qiazol lüüsib rakud. Qiazol on söövitav ja ärritav aine, seetõttu töötasime sellega tömbekapis. Suspendeerisime igat proovi pipetiga paar korda rakkude lüüsimiseks ja segamiseks ning kandsime lüsaadi seejärel 1,5 ml tuubidesse. Lisasime 150 µl kloroformi ja segasime *Vortexi* abil (Scientific Industries Vortex Genie 2, Kelve, 2004, lk 90). Inkubeerisime toatemperatuuril 3 min. Tsentrifugisime (Eppendorf Centrifuge 5424) proovid 10 min 4 °C 10 000 g juures. Pipeteerisime supernatandi, s.o tuubi põhja settinud rakusademe kohal oleva vedeliku (umbes 350 µl) uude 1,5 ml tuubi. Lisasime 350 µl *isopropanooli*, segasime pipetiga lahuse läbi ja kandsime lahuse RNA eraldamise kolonnile. Tsentrifugisime kolonne 1 min 10 000 g. Tõstisime kolonnid tühjadesse 2 ml tuubidesse, lisasime kolonni 700 µl pesulahust A1. Tsentrifugisime kolonni 1 min 10000g. Tõstisime kolonnid uutesse 2 ml tuubidesse, lisasime 200 µl pesulahust ja tsentrifugisime uuesti. Tõstisime kolonnid uutesse 1,5 ml tuubidesse, lisasime 100 µl steriilset vett (MQ). Hoidsime kolonne 3 minutit toatemperatuuril. Tsentrifugisime kolonne 1 min 10 000 g, mille tulemusena liikus puhastatud RNA (mõiste 19), 1,5 ml tuubi. Aetasime tuubid RNA-ga jääle (Taskutark veebileht). Mõõtsime RNA kontsentratsiooni seadmega Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). Säilitasime RNA-d temperatuuril –20 °C külmkapis.

## 1.3. cDNA süntees

RT-qPCR (*reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*) meetodil mRNA hulga analüüsimiseks sünteesisime RNA-le komplementaarse DNA (cDNA). Kasutatud RNA proovid olid keskmiselt kontsentratsiooniga 25 ng/µl. Komplementaarse DNA sünteesi jaoks segasime 96 kannuga plaadil kokku 11,5 µl RNA proovi, 1 µl oligo(dT)<sub>18</sub> praimerit (100 µM) ning 2 µl nukleotiidide segu (dNTP, 10x) (Thermo Scientific, USA) samal ajal plaati jääl hoides. Seejärel kuumutasime plaati 5 minutit 65 °C juures, et vabaneda RNA sekundaarstruktuuridest, ja edasi aetasime plaadi jääle, et oligo-dT saaks RNA polü-A sabale kinnituda. Järgmisena lisasime kannudesse 4 µl RT puhvrit (5x), 1 µl RevertAid pöördtranskriptaasi ning 0,5 µl RNAasi inhibiitorit (Thermo Fisher Scientific). Pärast seda segasime RNA proovidega plaati Vortexil (Scientific Industries Vortex Genie 2) ja tsentrifugisime (Eppendorf Centrifuge 5810). Järgmisena aetasime plaadi Mastercycler®

Nexus termotsüklerisse (termun 20), kus toimus cDNA süntees: 1 tund 42 °C juures, et pöördtranskriptaas sünteesiks RNA-l oleva info põhjal cDNA, siis 10 min 75 °C kraadi juures, et pöördtranskriptaas (Vikipeedia) inhibeerida. Seejärel lahjendasime cDNA veega lõppmahuni 180 µl ning säilitasime temperatuuril –20 °C.

#### 1.4. qPCR koos EvaGreeni seguga

qPCR jaoks ehk saadud cDNA analüüsimiseks kasutasime ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) masinat. Segasime EvaGreeni segu praimeritega ja pipeteerisime selle 384-kannulisse plaati (6,0 µl). Ühe kannu kohta kasutati 1 µl 4 µM kahe qPCRi (*Forward* ja *Reverse*) praimeride (TAG Copenhagen) segu, 2,4 µl 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR segu (Solis Biodyne) ning 2,6 µl MQ vett. Seejärel lisasime kannudesse 6 µl cDNA proovi, katsime plaadi spetsiaalse kilega, segasime Vortexil ja tsentrifuugisime (Eppendorf Centrifuge 5810). Seejärel asetatakse plaadi ViiA™ 7 Real-Time PCR System masinasse, kus toimus reaktsioon: kõigepealt inkubatsioon 15 minutit 95 °C ensüümi aktiveerimiseks ja edasi korrati 40 korda tsükli: 15 sekundit 95 ja 1 minut 60 °C.

Kasutatud praimerid olid IL-8 ja EF1A. Mõõtsime IL-8 geeniekspressiooni ja normaliseerimiseks kasutasime referentsgeenina EF1A (*Elongation factor 1-alpha*). Iga proovi mõõtsime sõltuvalt katsest kahes või kolmes korduses ja saadud lävitsükli Ct (*threshold cycle*) väärtusi analüüsisime  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  meetodil (<https://www.thermofisher.com>), kasutades MS Excelit (Microsoft). Selles meetodis arvutatakse iga geeni suhteline ekspressioon referentsgeeni suhtes ja võetakse arvesse, et qPCRi produkt akumuleerub eksponentsiaalselt.



## 2. TULEMUSED

### 2.1. Nõudepesuvahendi toime jagunevatele inimese naha keratinotsüütidele 2D kultuuris

Katse eesmärk oli uurida, kuidas mõjutab nõudepesuvahend Fairy:

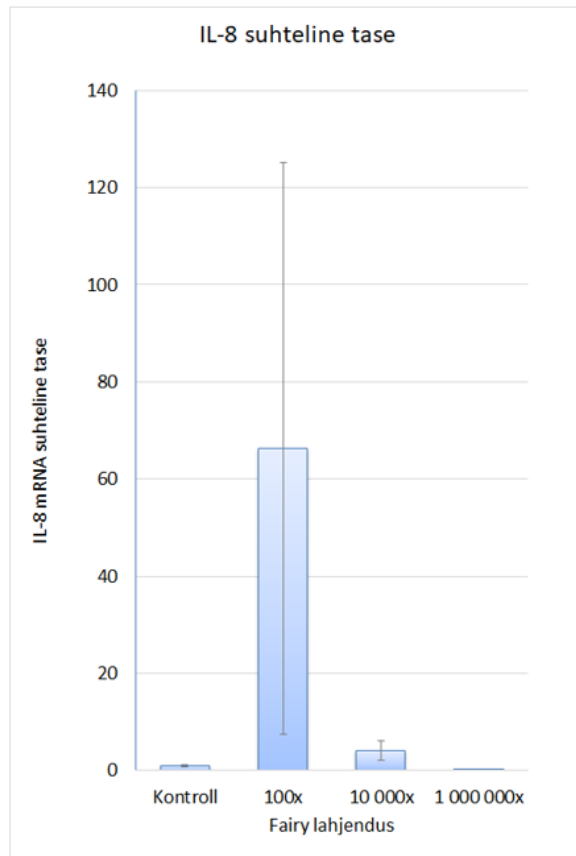
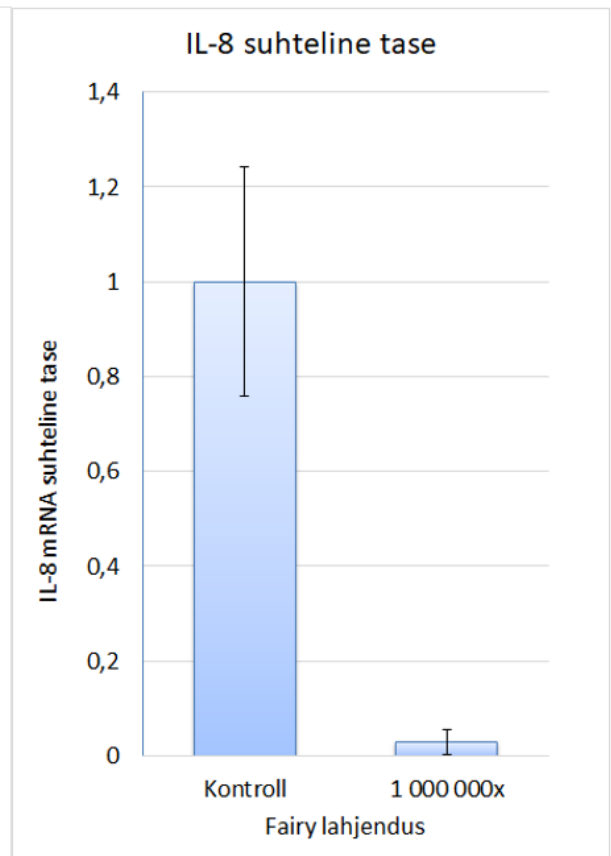
- Rakkude kasvu, jagunemist ja elulemust. Selleks jälgisime rakkude seisukorda ja pildistasime 24 tunni möödudes.
- Rakkude stressiseisundi markergeeni IL-8 ekspressiooni. Selleks eraldasime 24 tundi pärast Fairy lisamist rakkudest RNA, tegime sellest *pöördtranskriptsiooni* abil *cDNA* ja edasi analüüsisime IL-8 ekspressiooni (Geneetika.ee; Kelve, 2004, lk 34). Rakkude tugeva stressi korral IL-8 ekspressioonitase tõuseb (Vikipeedia).

Lisasime rakkudele Fairy vahelahjendusi kasutades. Vahelahjendused olid tehtud PBS-is ja need olid: 1 : 10, 1 : 1000 ja 1 : 100 000. Fairy lõpplahjendused rakusöötmes olid 1 : 100, 1 : 10 000 ja 1 : 1 000 000.

Rakkude seisukorda enne ja pärast erinevate Fairy lahjenduste lisamist on näha lisa 1. Kontrollfotol, mis on tehtud rakukultuurist enne Fairy lisamist, on rakkudega kõik korras. Peale Fairy lisamist on 100-kordses lahjenduses 24h möödudes fotol näha ainult üksikuid surnud rakke. Surnud rakkude üks tunnuseid fotol on see, et rakud on kontrastilt tumedamad ja ümmargusamad. Teised rakud on Fairy mõjul ära lagunened. 10 000-kordse Fairy lahjendusega pildil on 24 h pärast rakkude olukord natuke parem kui 100-kordse lahjendusega Fairy fotol, aga ikkagi palju halvem kui enne Fairy lisamist. Ka 10 000-kordse Fairy lahjendusega fotol on rakud ümmargused, surnud ja kannu põhja küljest lahti tulnud, aga ei ole ära lagunened. 1 000 000-kordsel Fairy lahjendusel pole rakkudele midagi halba juhtunud võrreldes enne Fairy lahjenduse lisamist. Pigem on hoopis rakkude seisukord mõnevõrra parem kui enne Fairy lisamist.

Kuna esimese katse tulemused olid mõnevõrra üllatavad, siis otsustasime katset korrata. Tulemused on toodud lisa 2 ja need on esimese katse tulemustega (lisa 1) väga sarnased. Seega kordus üllatav tulemus, et kui rakukeskkonnas on vähesel määral Fairy, siis mõjub see rakkudele positiivselt.

Lisaks mikroskoopiale analüüsiti Fairy mõju stressigeeni IL-8 mRNA ekspressiooni taset määrates.

**A****B**

Joonis 1. Fairy mõju põletiku markeri IL-8 mRNA ekspressioonile. Paneelil A on näidatud 100-, 10 000- ja 1 000 000-kordse lahjendusega ja paneelil B 1 000 000-kordse lahjendusega Fairy mõju põletiku markeri IL-8 mRNA ekspressioonile. Esitatud on qPCR analüüsi tulemused. Y-teljel on näidatud IL-8 mRNA suhteline tase kontroll-rakkude suhtes (võrdsustatud ühega), kuhu Fairy ei lisatud. X-teljel on näidatud kasutatud Fairy lahendus. Katset tehti kolm korda, iga tingimuse kohta oli igas katses kolm RNA proovi. Veapiirid näitavad standardhälvet.

Joonis 1 näitab IL-8 stressigeeni mRNA hulga sõltuvust lahuses oleva Fairy kontsentratsioonist. Kõige kõrgema Fairy kontsentratsiooniga lahuses on IL-8 mRNA-d kõige rohkem ja kõige madalama kontsentratsiooniga lahuses kõige vähem (joonis 1A). On huvitav, et kõige madalama kontsentratsiooniga Fairy lisamisel oli IL-8 stressigeeni tase madalam isegi kontroll-lahusest, kuhu polnud üldse Fairy lisatud. 1 000 000-kordse lahjendusega Fairy lahuses oli IL-8 mRNA tase sedavõrd madal, et joonise A mõõtkavas pole seda näha. Seega tegime eraldi joonise paneeli, kus (joonisel 1 B), kus on toodud eraldi välja IL-8 mRNA suhteline tase kontrollrakkudes ja rakkudes, kuhu lisasime 1 000

000 korda lahjendatud Fairy. Jooniselt on näha, et kontrollrakkude IL-8 taseme suhe rakkude suhtes, millele lisasime 1 000 000 kordset Fairy lahjendust, on ligikaudu 35-kordne.

## 2.2. Nõudepesuvahendi toime keratinotsüütide 3D kultuuris

Katse eesmärk on teada saada, kuidas mõjutab nõudepesuvahend Fairy:

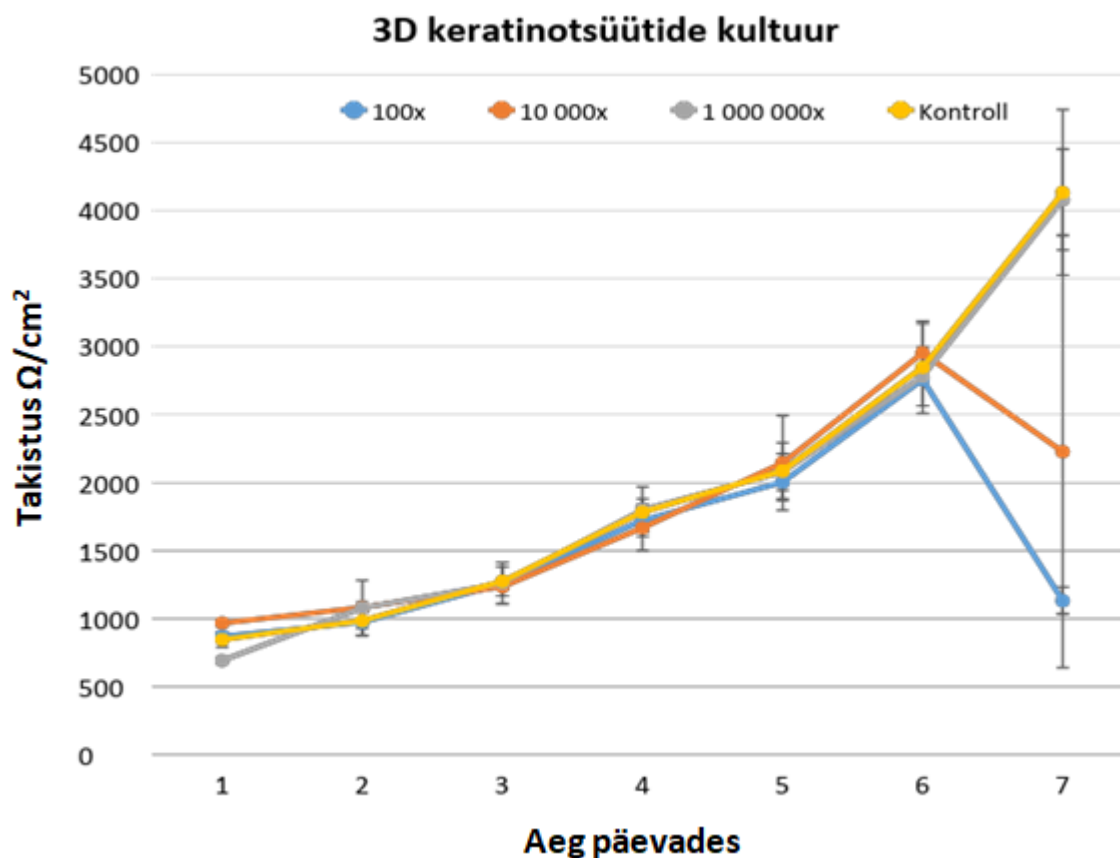
- 3D kultuuri elektrilist takistust. Elektritakistus näitab, kui heas seisukorras rakud on. Mida suurem elektritakistus on 3D rakukultuuris, seda paremas seisukorras rakud on. Selleks et seda teada saada, mõõtsime rakukultuuri elektrilist takistust iga 24 tunni tagant pärast rakkude külvamist.
- Rakkude visuaalset seisukorda. Selleks pildistasime rakukultuuri 24 tunni möödudes pärast nõudepesuvahendi lisamist, et saada paremat ettekujutust, kuidas nõudepesuvahend Fairy mõjutab keratinotsüüte.

Kasutasime varem valmistatud Fairy lahjendusi PBS-is: 1 : 10; 1 : 1000 ja 1 : 100 000, mille pipeteerisime 3D kultuuri ülemisse kambrisse, kus kasvasid rakud. Söötme ruumala ülemises kambris oli 300 µl. Katse sooritati kolmes korduses. Katse plaan on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Katse plaan

Lahjendus	Fairy 1 : 100	1 : 10 000	1 : 1 000 000	Kontroll
<b>Kogus</b>	3,5 µl 1 : 10	3,5 µl 1 : 1000	3,5 µl 1 : 100 000	-
	proovi nr 3 100-kordne lahjendus	proovi nr 5 10 000-kordne lahjendus	proovi nr 1 1 000 000-kordne lahjendus	proovi nr 7 kontroll

	proovi nr 4 100-kordne lahjendus	proovi nr 6 10 000-kordne lahjendus	proovi nr 2 1 000 000-kordne lahjendus	proovi nr 8 kontroll
--	-------------------------------------	--	---	----------------------



Joonis 2. Fairy mõju 3D keratinotsüütide kultuuri elektrilisele takistusele. Y-teljel on näha epiteelirakkude kultuuri elektriline takistus (*transepithelial resistance*) TER,  $\Omega/\text{cm}^2$ ; X-teljel aeg päevades. Mõõtmised on tehtud kolmes korduses. Veapiirid näitavad standardhälvet.

Joonis 2 näitab, et 3D keratinotsüütide kultuuri elektriline takistus (*transepithelial resistance*, TER) suureneb aja jooksul ja saavutab maksimumi 6. päeval pärast rakkude külvamist. Mida suurem on takistus, seda rohkem on ka keratinotsüütide kihte. See tähendab, et sel juhul on ka rakkude seisukord parem ja et rakkudevahelised tiheliidused on terved.

Fairy erinevad lahjendused lisati kuuendal päeval. 24 tundi pärast Fairy lisamist langes TER oluliselt kultuurides, kuhu lisati Fairyt kas 100-kordses lahjenduses või 10 000-kordses lahjenduses. 1 000 000-kordse Fairy lahjenduse korral on TER sarnase väärtusega nagu kontrollrakkude korral.

Lisas 3 on näha 3D keratinotsüütide seisukorda enne ja pärast Fairy erinevate lahjenduste lisamist. Fotod on nende rakkude kohta, millelt mõõtsime ka takistust. Fotel, kus on 100-kordne Fairy lahjendus, on näha surnud rakke, need on musta kogumina. Väljaspool kogumit ei olegi rakke. Ka 10 000-kordse Fairy lahjendusega fotodel on rakkude seisukord halb. Rakud on tulnud kannu küljest lahti ja on tõenäoliselt surnud, kuid olukord on siiski parem 100-kordse Fairy lahjendusega rakkude seisukorrast. 1 000 000-kordse Fairy lahjendusega fotol on rakud sama heas seisukorras kui kontrollrakud. Tulemus sobib kokku takistuste mõõtmiste tulemustega joonisel 2.

### 3. ARUTELU

Uurimisküsimuse „Kuidas nõudepesuvahend avaldab mõju naharakkudele sellega kokkupuutumisel?“ vastuseks saime, et kõige halvem seisukord oli rakkudel, millele lisasime 100 korda lahjendatud Fairy. Natuke parem oli rakkude olukord siis, kui lisasime 10 000 korda lahjendatud Fairy. Kõige parem oli aga rakkude seisukord, kui lisasime neile 1 000 000 korda lahjendatud Fairy. See oli 2D kultuuri puhul isegi kontrollrakkude seisukorrast parem.

Hüpotees, et mida suurem on Fairy kontsentratsioon, seda halvemini end naharakud tunnevad, osutus osaliselt õigeks. Õigeks osutus see osa uurimusest, mis tõestas, et kui lisada rakkudele 100-kordses lahjenduses Fairy, siis nende rakkude seisukord on kõige halvem, sest kõik rakud on surnud ja enamik neist ka tõenäoliselt ära lagunened. Kui lisada rakkudele 10 000-kordse lahjendusega Fairy, siis nende rakkude seisukord on parem nendest rakkudest, millele on lisatud 100-kordset Fairy lahjendust. 10 000 korda lahjendatud Fairyga inkubeeritud rakkude seisukord on parem – enamik rakke on küll muutunud kujuga ja tassi küljest lahti, mistõttu arvame, et need rakud olid surnud, samas ei olnud rakud jõudnud päris ära laguneda. See näitab seda, et rakud on lahjemas Fairy lahuses kauem vastu pidanud. Hüpotees osutus valeks selles osas, et me oletasime, et rakkudele, millele me lisasime 1 000 000-kordset Fairy lahjendust, on halvem seisukord, kui neis rakkudes, millele me üldse ei lisanud Fairy. Tegelikult oli tulemus vastupidine. IL-8 stressigeeni ekspressiooni tase rakkudes oli 1 000 000-kordses Fairy lahjenduses ligikaudu 35 korda väiksem kui kontrollrakkudes. See tulemus pani meid arvama, et selles katses olid kontrollrakud saastunud ehk kokku puutunud neile kahjulike bakterite või viirustega ja need olid rakkude seisukorda halvemaks teinud ning nende stressigeeni taset tõstnud. Tegime korduskatse, sest katse tulemused tundusid meile kummalised. Korduskatse kinnitas, et esimese katse tulemus ei olnudki vale. Ka korduskatses tundsid rakud end 1 000 000 kordses Fairy lahjenduses veidi paremini kui kontroll-lahuses, kus Fairy üldse polnud. Katse näitas sama tulemust, mis esimenegi, aga korduskatses oli kontrollrakkude seisukord siiski natuke parem kui esimeses katses, mis annab ikka alust arvata, et esimese katse kontrollrakud olid saastunud. Uurimuse põhjal saab spekuloida, et väga väikestes kogustes Fairy on rakkudele isegi hea ja langetab olulisel määral IL-8 stressigeeni taset.

Järgmiseks oleks vaja uurida, miks Fairy on rakkudele hea, et nõnda suurel määral IL-8 stressigeeni ekspressiooni taset mõjutab ja kuidas Fairy mõjutab teiste stressigeenide

ekspressiooni taset ning kas siis oleks ka 1 000 000 kordse Fairy lahjendusega rakkudes stressigeenide ekspressiooni tase väiksem kui kontrollrakkudes.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Eesti keele seletav sõnaraamat 2009. Kättesaadav: <http://www.eki.ee/dict/ekss/index.cgi> (9.04.2019).

Geneetika. Kättesaadav: <http://geneetika.ee/lexicon/poordtranskriptsioon/taskutark> (9.04.2019).

Kelve, Mari 2004. Oluliselt täiendatud Inglise-Eesti seletav valiksõnastik molekulaarbioloogia ja seonduvate distsipliinide valdkonnast. Kättesaadav: <http://koolitaja.eenet.ee:57219/Waramu3Web/downloader?resourceId=1-cd9f070f-1ee9-4a90-96c7-3365fe6e2f7b&attachmentId=7189> (9.04.2019).

Oxford dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (2 ed.) 2006. Kättesaadav: <http://www.oxfordreference.com/view/10.1093/acref/9780198529170.001.0001/acref-9780198529170> (9.04.2019).

Taskutark. RNA ja DNA. Kättesaadav: <https://www.taskutark.ee/m/rna-ja-dna/> (9.04.2019).

Tomingas, Ahti 2013. TEA entsüklopeedia. Tallinn: TEA.

Vikipeedia 2015. Epidermis. Kättesaadav: <https://et.wikipedia.org/wiki/Marrasknahk> (9.04.2019).

Vikipeedia 2015. Monomeer. Kättesaadav: <https://et.wikipedia.org/wiki/Monomeer> (9.04.2019).

Vikipeedia 2017. Leukotsüüt. Kättesaadav: <https://et.wikipedia.org/wiki/Leukots%C3%BC%C3%BCt> (9.04.2019).


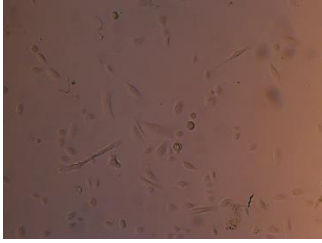
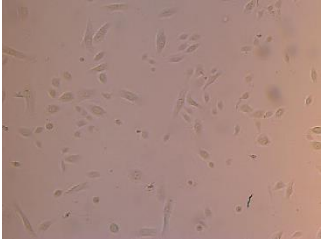
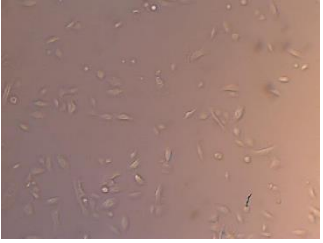
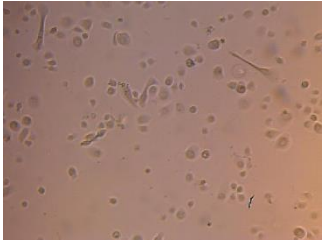
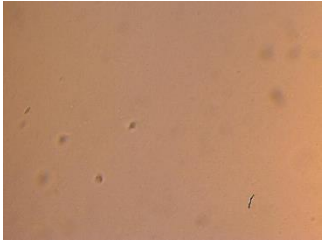
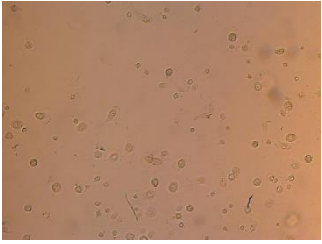
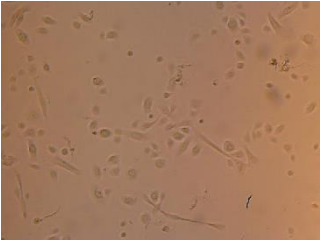
Vikipeedia 2017. Polümeraasi ahelreaktsioon. Kättesaadav: [https://et.wikipedia.org/wiki/Pol%C3%BCmeraasi\\_ahelreaktsioon](https://et.wikipedia.org/wiki/Pol%C3%BCmeraasi_ahelreaktsioon) (9.04.2019).

Vikipeedia 2019. Interleukiin. Kättesaadav: [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Interleukin\\_8](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Interleukin_8) (9.04.2019).

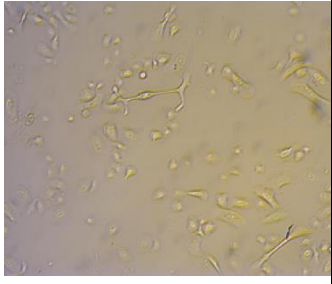
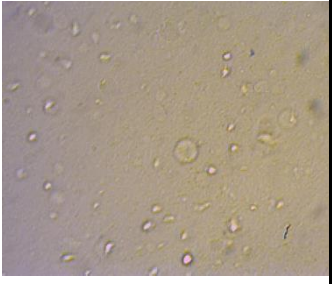
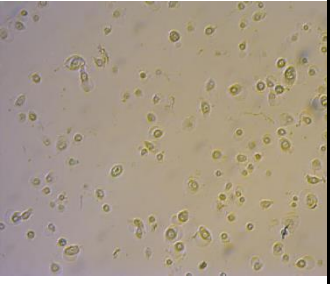



# LISAD

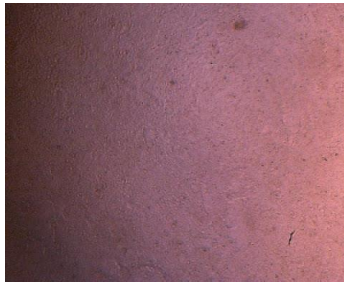
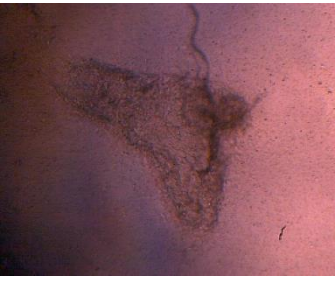


Lisa 1. Fairy mõju keratinotsüütidele 2D kultuuris

	Kontroll	100-kordne	10 000-kordne	1 000 000-kordne
0 tundi				
24 tundi				

**Lisa 2. Fairy mõju keratinotsüütidele 2D kultuuris, korduskatse**

	<b>Kontroll</b>	<b>100-kordne</b>	<b>10 000-kordne</b>	<b>1 000 000-kordne</b>
<b>24 tundi</b>				

Lisa 3. Fairy mõju keratinotsüütidele 3D kultuuris

	Kontroll	100-kordne	10 000-kordne	1 000 000-kordne
0 tundi				
24 tundi	