

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

**Nahka sisenevad peptiidid 2D ja 3D rakukultuuris**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Anett Puskar

Juhendaja PhD Kaido Kurrikoff

TARTU 2018

## **Infoleht**

### **Nahka sisenevad peptiidid 2D ja 3D rakukultuuris**

Nahka sisenevate peptiidide puhul on tegemist rakku sisenevate peptiidide alamklassiga, mis on võimelised suurendama erinevate lastmolekulide transporti nahka.

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli kasutades tahke faasi peptiidisünteesi strateegiat sünteesida kaks nahka sisenevat peptiidi, SPACE (*skin penetrating and cell entering*, nahka läbiv ja rakku sisenev) ja SPEH (*skin penetration enhancer heptapeptide*, naha läbitavust suurendav heptapeptiid) ning hinnata nende ja R8 (kaheksast arginiinist koosnev peptiid) sisenemist nii 2D kui ka 3D rakukultuuris. Antud peptiidide hindamiseks 3D rakukultuuris alustati rekonstrueeritud epidermise mudeli protokolliga väljatöötamisega. Olulisematest tulemustest leidsime, et kõik peptiidid olid võimelised rakku sisenema 2D inimese primaarsete keratinotsüütide rakukultuuris ja ei omanud olulist toksilist efekti rakkude metabolismile. 3D rakukultuuris peptiidi sisenemist ei olnud võimalik hinnata ja töös esitatud protokoll vajab veel optimeerimist.

Märksõnad: nahka sisenev peptiid, tahke faasi peptiidisüntees, rekonstrueeritud epidermis

CERCS kood: B210 Histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid

### **Cell penetrating peptides in 2D and 3D cell culture**

Skin penetrating peptides are a subclass of cell-penetrating peptides capable of enhancing transdermal transport for compounds that would otherwise be unable to penetrate the skin in sufficient amounts.

The aim of this bachelor's thesis was to synthesise two skin penetrating peptides using the solid-phase peptide synthesis strategy, SPACE (skin penetrating and cell entering) and SPEH (skin penetration enhancing heptapeptide) and to evaluate the penetration efficiency of them and R8 (a peptide composing of eight arginine residues) in 2D and 3D cell culture. Development of a protocol for growing a reconstructed epidermis model was begun in order to study the penetration efficacy of the peptides in 3D cell culture. All aforementioned peptides were capable of penetrating human primary keratinocytes in 2D cell culture without having a toxic effect on the cell's metabolism. It was not possible to evaluate the penetration efficacy of said peptides in a 3D cell culture model as the protocol still needs optimisation.

Keywords: skin penetrating peptide, solid phase peptide synthesis, reconstructed epidermis

CERCS code: B210 Histology, cytochemistry, histochemistry, tissue culture

## Sisukord

Infoleht .....	2
Sisukord.....	3
Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus .....	7
1. Kirjanduse ülevaade .....	8
1.1 Epidermise struktuur.....	8
1.2 Ainete transport läbi epidermise .....	10
1.3 Nahakaudse transpordi võimendajad .....	11
1.4 Rakku sisenevad peptiidid .....	12
1.4.1 Nahka sisenevad peptiidid ja töös kasutatud peptiidid.....	13
1.5 Mitmekihilised 3D rakukultuurid .....	14
1.5.1 Rekonstrueeritud epidermise mudel – inimese epidermise ekvivalent .....	15
2. Eksperimentaalne osa .....	17
2.1 Töö eesmärgid.....	17
2.2 Materjalid ja meetodika .....	17
2.2.1 Töös kasutatud peptiidid .....	17
2.2.2 Töös kasutatud peptiidide süntees.....	18
2.2.3 Rakkude kultiveerimine .....	20
2.2.4 3D rekonstrueeritud epidermise mudeli ettevalmistamine ja kasvatamine.....	22
2.2.5 Peptiidi sisenemise hindamine .....	23
2.2.6 Rakkude elumuse hindamine .....	24
2.3 Tulemused ja arutelu.....	26
2.3.1 Peptiidide süntees.....	26
2.3.2 Peptiidi sisenemise hindamine 2D rakukultuuris .....	26
2.3.3 Rekonstrueeritud epidermise moodustumine .....	28
2.3.4 Peptiidi sisenemise visualiseerimine 3D epidermise ekvivalendis .....	29
2.3.5 Rakkude elumuse määramine.....	30
Kokkuvõte .....	33

Summary.....	34
Tänuõnad.....	35
Kasutatud kirjandus .....	36
Lisad .....	41
Lihtlitsents .....	42

## Kasutatud lühendid

2D	2-dimensionaalne rakukultuur, ühekihiline rakukultuur
3D	3-dimensionaalne rakukultuur, mitmekihiline ja/või diferentseerunud rakkudega rakukultuur
CPP	<i>cell-penetrating peptide</i> , rakku sisenev peptiid
DAPI	4',6-diamidino-2-fenüülindool, fluorestseeruv värv, mis märgistab A-T rikkad piirkonnad DNAs
DCM	diklorometaan
DIC	N,N'-diisopropüülkarbodiimid
DIEA	N,N-diisopropüületüülamiin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i> , koekultuuris rakkude kasvatamiseks kasutatav sööde
DMF	N,N-dimetüülformamiid
DMSO	dimetüülsulfoksiid
EDTA	etüleendiamiintetraädikhape
FAM	5(6)-karboksüfluorestiin, fluorestseeruv märgis sünteesitud peptiidil
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , veise loote seerum
Fmoc	9-fluoroenüülmetüüloksükarbonüül rühm, kaitserühm aminohappel
HBTU	O-bensotriasool-N,N,N',N'- tetrametüülurooniumheksafluorofosfaat
HOBt	1-hüdroksübensotriasool
MALDI-TOF MS	<i>matrix assisted lazer desorption ionization time-of-flight</i> , maatriksi assisteeritud laserdesorptsioon-ionisatsioon lennuaja mass-spektromeeter
MBHA	4-metüülbenshüdrüülamiin
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i> , hiire embrüonaalsed fibroblastid
MTS	tetrasooliumsool
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , fosfaatpuhverdatud füsioloogiline lahus

R8	kaheksast arginiinist koosnev peptiid
RFU	<i>relative fluorescence unit</i> , relatiivne fluorestsentsühik
siRNA	<i>small interfering RNA</i> , lühike interfereeriv RNA
SPACE	<i>skin penetrating and cell entering</i> , nahka läbiv ja rakku sisenev peptiid
SPEH	<i>skin penetration enhancer heptapeptide</i> , naha läbitavust suurendav heptapeptiid
TIS	triisopropüülsilaan

## Sissejuhatus

Tänapäeval on nahakaudne ravimitransport muutumas järjest perspektiivikamaks meetodiks. Nahk on inimese suurim organ ja pakub väga suurt pindala potentsiaalseks ravimimanustamiseks. Kutaansel manustamisviisil on mitmeid eelised teiste viiside ees nagu mugavus, vähene invasiivsus, pikemaajalise doseerimise võimalus ja ravimi biosaadavuse säilimine. Selle suurimaks piiranguks on naha pindmise kihi vähene või täielikult puuduv läbimine. Normaalsetel tingimustel on naha pindmist kihti võimelised läbima väikesed hüdrofoobsed molekulid, mis jäävad alla 500 Da ja on piisavalt rasvlahustuvad (Yano jt., 1986). Paljude ravimite omadused aga ei ühti eelmainituga ja seetõttu on nahakaudse manustamisviisi rakendatavuse suurendamiseks vajalikud nahakaudse transpordi võimendajad, mis saavad soodustada erinevate ravimite jõudmist läbi naha. Võimendajate puhul on oluline, et need oleks potentsiaalselt nahka mitteärritavad ja et neid oleks võimalik kerge kasutada. Üheks selliseks nahakaudse transpordi võimendajaks on nahka sisenevad peptiidid. Antud peptiidid kuuluvad rakku sisenevate peptiidide alamklassi ja nende puhul on näidatud nende võime transportida erinevaid molekule läbi naha.

Nahakaudse transpordi puhul on ainete jaoks kõige raskemini ületatavaks barjääriks epidermise kõige pindmine kiht ehk sarvkiht. Epidermise mudelit koos sarvkihiga on võimalik kasvatada inimese primaarsetest keratinotsüütidest. Antud mitmekihiline 3-dimensionaalne (3D) mudel omab *in vivo* nahale sarnast morfoloogiat ja sealsed rakud toodavad korrektseid ekspressioonimarkereid (Poumay jt., 2004). Erinevate 3D kultuuride kasutamine on oluline saamaks relevantsemat infot kui seda võimaldavad lihtsamad 2-dimensionaalses (2D) rakukultuuris läbiviidud katsed. Nende kasutamisega on võimalik vältida või vähendada valede järelduste tegemist erinevate ainete efektiivsuse ja toksilise efekti kohta.

Käesoleva töö eesmärgiks oli sünteesida kaks varasemalt publitseeritud nahka sisenevat peptiidi SPACE (*skin penetrating and cell entering*, nahka läbiv ja rakku sisenev) ja SPEH (*skin penetration enhancer heptapeptide*, naha läbitavust suurendav heptapeptiid) kasutades tahke faasi peptiidisünteesi strateegiat ning iseloomustada eelmainitud peptiidide ja R8 (8 arginiinist koosnev peptiid) rakku sisenemist 2D inimese keratinotsüütide kultuuris ja peptiidide efekti rakkude elumusele. Lisaks sellele alustati 3D rekonstrueeritud epidermise mudeli väljatöötamist, eesmärgiga hinnata töös kasutatud peptiidide epidermise läbimise efektiivsust. Antud bakalaureusetöökäsi vajalikud katsed teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse biotehnoloogia laboris.

## 1. Kirjanduse ülevaade

Nahk on inimese kõige suurem organ. Keskmisel täiskasvanul võib selle pindala ulatuda kuni 2 m<sup>2</sup>-ini (Hwa jt., 2011). See on esmane barjäär keha ja keskkonna vahel, mis pakub kaitset erinevate kemikaalide, mikroorganismide, UV kiirguse ja mehhaaniliste vigastuste eest (Huang jt., 2005). Lisaks on naha sügavamates kihtides ligipääs veresoontele, mis varustavad nahka toitainetega. Nii naha suurt pinda kui ka võimalikku ligipääsu veresoonekonnale oleks võimalik kasutada ravimite manustamiseks.

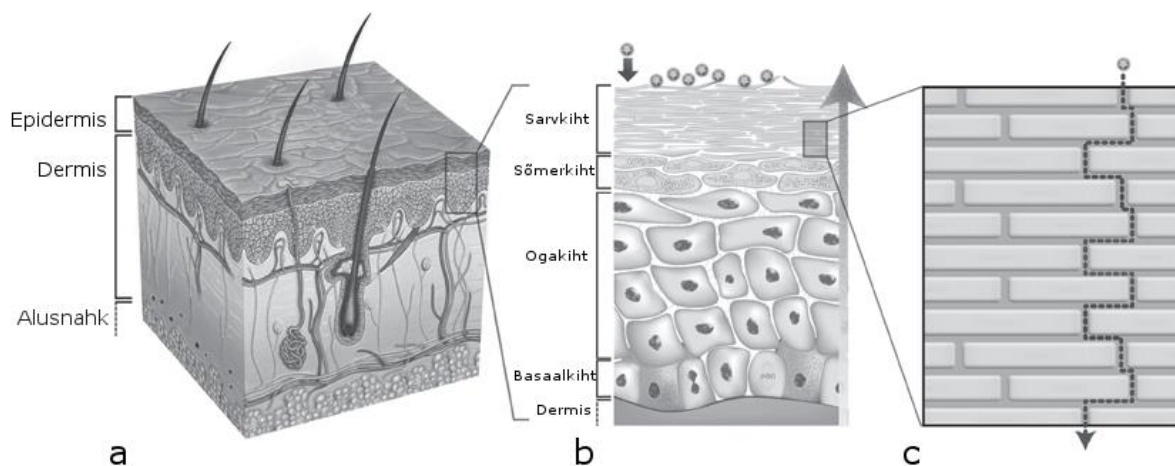
Nahakaudse ravimi manustamisviisi puhul on tegemist mugava mitteinvasiivse meetodiga. See ei põhjustaks patsientidele valu, nagu seda võib teha süstimine ning see väldiks ka liigse ärevuse põhjustamist. Lisaks sellele saab võrreldes veenikaudse manustamisega ennetada või vähendada ka süsteemset toksilisust, kuna on võimalik vältida osade kudede kokkupuudet ravimiga täielikult või osaliselt. Võrreldes suukaudse ravimi manustamisega on kutaanse manustamisviisi eeliseks ravimi lagundamise vältimine esmases maksapassaažis (Prausnit ja Langer, 2008). Väga suureks eeliseks on ka võimalus manustada ravimit pikema aja jooksul ning vajadusel saab manustamise koheselt lõpetada (Wiedersberg ja Guy, 2014). Palju on haiguseid, mis saaks leevendust kutaanses ravist ja mida oleks mugavam ravida lokaalselt, nagu näiteks atoopiline dermatiit ja psoriaas. Tulenevalt eelmainitud eelistest on tänapäeval nahakaudse ravimi manustamise viis muutunud järjest enam perspektiivsemaks meetodiks.

Hetkel on kõige suurem probleem nahakaudse ravimi transpordi puhul enamuse ravimite kas vähene biosaadavus või ei ole selline manustamisviis teatud ühendite puhul praegu võimalik (Prausnit ja Langer, 2008). See loob vajaduse uute meetodite väljatöötamise järele, mis võimaldaksid erinevate ravimite nahka transporti piisavates kogustes ilma negatiivsete kõrvalmõjudeta nii patsiendile kui ka ravimi aktiivsusele.

### 1.1 Epidermise struktuur

Nahk koosneb kolmest põhilisest kihist: epidermis, dermis ja alusnahk (joonis 1 a). Naha erinevatest osadest on kõige olulisem roll transdermaalse transpordi takistamisel epidermisel. Tegemist on kuni 120 µm paksuse avaskulaarse kihiga, mis koosneb erinevates diferentseerumise järkudes olevatest keratinotsüütidest (Bouwstra jt., 2003). Keratinotsüüdid on väljasuunatult diferentseeruvad valgurikkad rakud, mis koosnevad põhiliselt keratiinist ja keratohüaliinist (Hwa jt., 2011). Epidermis jaguneb omakorda neljaks kihiks: basaalkiht, ogakiht, sõmerkiht ja sarvkiht (joonis 1 b). Basaalkihis asuvad paljunevad keratinotsüüdid ja neis olevad keratiinifilamendid asuvad rakkude tsütosoolis, risti naha pinnaga, ogakihis on keratiinifilamendid paigutatunud tuuma ümber, ulatudes perifeersetesse desmosoomidesse (Hwa

jt., 2011). Sõmerkihis olevates keratinotsüütides esinevad keratohüaliini sõmerad, mis koosnevad profilagriinist (Hwa jt., 2011). Sarvkihi moodustavad terminaalset diferentseerunud tuumata keratinotsüüdid ja nende vahelised lipiidikihid (Bouwstra jt., 2003).

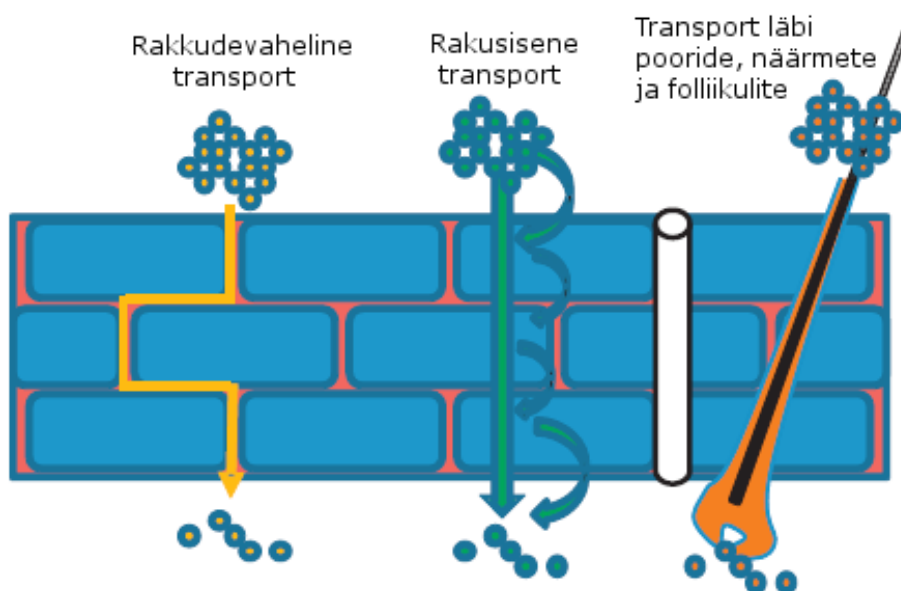


**Joonis 1.** Naha struktuur (a), kus on eraldi välja toodud epidermise kihid (b) ja telliskiviseina mudel naha sarvkihist (c). Punktis c on helehalliga kujutatud terminaalset diferentseerunud keratinotsüüdid ja tumehalliga nende vahelised lipiidikihid. Punktirjoonega on näidatud rakkudevaheline võimalik transpordirada. (Smeden ja Bouwstra, 2016)

Kõige raskemini ületatav barjäär erinevatele ainetele transdermaalse transpordi puhul on naha sarvkiht (ld *stratum corneum*). See on epidermise kõige välimisem, väliskeskkonnaga kokkupuutuv kiht, mille paksus on 10 kuni 20  $\mu\text{m}$  (Bouwstra jt., 2003) ja selle pH jääb 5 ning 6 vahele (Pouillot jt., 2008). Kuigi sarvkiht moodustab umbes 10% kogu nahast, siis vastutab see peaaegu täielikult naha kui barjääri talitluse eest (Pouillot jt., 2008). Sarvkihi struktuuri on kirjeldatud telliskiviseina mudeli alusel (joonis 1 punkt c) mille järgi terminaalset diferentseerunud keratinotsüüdid kujutavad telliskive ja nende vahelised lipiidikihid mörti (Barry, 2001). Rakkudevahelises lipiidikihtides esinevad keramiidid, rasvhapped, kolesterooli ja kolesterooliestrid (Barry, 2001). Sarvkihis olevad keratinotsüüdid on surnud ehk mittepaljunevad ja moodustavad tihedalt pakitult üksteise peal olevaid veevaeseid kihte, mida võib inimese puhul kokku olla keskmiselt kuni 25 (Smeden ja Bouwstra, 2016). Tavatingimustel on naha sarvkihti võimelised läbima vaid alla 500 Da jäävad väikesed hüdrofoobsed molekulid, mis on hästi rasvlahustuvad (Yano jt., 1986).

## 1.2 Ainete transport läbi epidermise

Eristatakse kolme põhilist transpordimehhanismi läbi sarvkihi: 1) kas läbi rakkudevaheliste lipiidmaatriksi, 2) läbi keratinotsüütide või 3) karvafolliikulite ja nendega seotud rasva- ning higinäärmete kaudu (Barry, 2001). Eelmainitud transpordirajad on kujutatud joonisel 2. Transport läbi keratinotsüütide võimaldab hüdrofiilsete või polaarsete osakeste ning rakkudevaheline transpordirada lipofiilsete ja mittepolaarsete osakeste difusiooni läbi sarvkihi (Alkilani jt., 2015). Varasemalt on arvatud, et sarvkihi läbimise jaoks ei ole oluline transport läbi karvfolliikulite ning rasva- ja higinäärmete kaudu, kuna need moodustavad naha pindalast väikese osa, umbes 0,1% (Barry, 2001). Seevastu on leitud, et hoolimata väikesest kasutatavast pindalast on transport läbi antud raja oluline just väiksema läbitungimisvõimega ja kõrgema molekulmassiga ainete puhul (Knorr jt., 2009).



**Joonis 2.** Võimalikud transpordirajad läbi sarvkihi. Sinisega on kujutatud terminaalset diferentseerunud keratinotsüüdid ja roosaga nendevahelised lipiidkihid. (Lane, 2013)

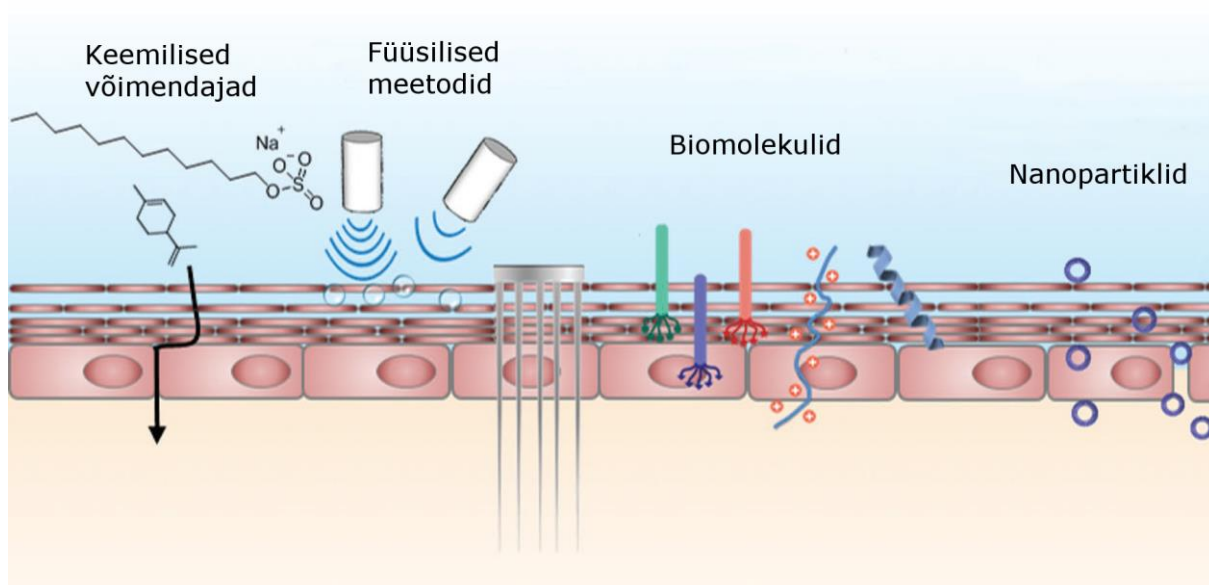
Peale sarvkihi läbimist ei ole võimalik ülejäänud epidermises kasutada transporti lipiidkihtide kaudu. Epidermise alumistest kihtides on keratinotsüüdid metaboolselt aktiivsed ja selle läbimiseks on vajalik aine difusioon otse läbi keratinotsüütide rakumembraani ja tsütosooli (Hwa jt., 2011). Kui nahakaudset transporti kasutades on eesmärgiks süsteemne ravi, siis peab ravim läbima terve epidermise, et jõuda dermisesse ja pääseda ligi sealolevatele veresoontele (Kretsos ja Kasting, 2007). Samas pole dermisesse transport lokaalsete nahaprobleemide puhul alati vajalik. Näiteks kui eesmärgiks on psoriaasi ravi, siis oleks vajalik

transportida ravimit vaid epidermise alumistesse kihtidesse, kus on paljunevad ja metaboolselt aktiivsed keratinotsüüdid (Brown jt., 2006).

Kõige selle juures on oluline eristada dermaalset ning transdermaalset transporti. Dermaalse transpordi puhul on tegemist molekulide transpordiga epidermise erinevatesse kihtidesse, transdermaalse transpordi puhul aga molekulid läbivad epidermise ja jõuavad dermisesse.

### 1.3 Nahakaudse transpordi võimendajad

Nahakaudse transpordi võimendusmeetodeid saab jagada erinevatesse klassidesse: keemilised võimendajad, füüsilised meetodid, biomolekulid ja nanopartiklid (joonis 3).



**Joonis 3.** Ülevaade nahakaudse transpordi võimendusmeetoditest. (Yang jt., 2017)

Füüsiliste võimendajate alla kuuluvad näiteks sonoforees, iontoforees ja elektroporatsioon (Münch jt., 2017). Eelmainitud võimendusviisid võivad vajada spetsiifilist varustust, mis teeb sellise meetodi kasutamise kalliks. Sealhulgas ei ole võimalik patsiendil manustada ravimit iseseisvalt ja eeldab protseduuri läbiviimist koolitatud inimese poolt. Lisaks sellele on füüsiliste võimendusmeetodite üheks suurimaks puuduseks võimalus töödelda vaid väikest pinda korraga. Füüsiliste võimendajate alla kuuluvad ka mikronõelad, mille puhul on tegemist väga väikeste nõeltega varustatud plaastritega. Neid oleks võimalik patsiendil ise paigaldada, kuid mikronõelad võivad murduda ja nahka jääda ning seetõttu põhjustada põletikku (Desai jt., 2010). Kuigi leidub kommertsiaalselt kasutusel olevaid füüsikalisi transpordi võimendajaid (Yang jt., 2017) esineb neil siiski puudujääke ja tihtipeale ei ole need

ka kommertsiaalselt edukad (Watkinson jt., 2016). Seetõttu on suurenenud huvi lihtsamate ning mugavamate nahakaudse transpordi võimendajate uurimiseks.

Keemiliste nahakaudse transpordi võimendajate hulka kuuluvad näiteks erinevad alkoholid, surfaktandid, rasvhapped, terpeenid ja amiidid (Münch jt., 2017). Nende eeliseks on võimalus töödelda suurt pinda korraga ja neid on lihtne iseseisvalt administreerida. Puuduseks on, et teatud keemilised ühendid nagu alkohol ja surfaktandid võivad nahal põhjustada ärritust (Prausnit ja Langer, 2008). Just nahale ärrituse põhjustamine on kõige suuremaks puuduseks keemiliste ühendite kasutamisel nahakaudse transpordi võimendamise eesmärkidel.

Nanopartikliteks loetakse nanosuuruses defineeritud osakesi. Nende suurimaks puuduseks on aga vähene passiivne difusioon nahka mittemodifitseeritud partiklite puhul (Yang jt., 2017). Nende transport toimub arvatavasti läbi nahas olevate pooride ja avauste (Lane, 2013), kuid neid iseloomustab vähene nahka sisenemine.

Biomolekulide alla kuuluvad lühikesed peptiidid, mis on võimelised suurendama ainete nahakaudset transporti ilma nahale ärritust põhjustamata (Karande jt., 2005). Antud peptiidid kuuluvad rakku sisenevate peptiidide (*cell-penetrating peptide*, CPP) alamklassi ja neid nimetatakse nahka sisenevateks peptiidideks. Nende eeliseks eelmainitud nahakaudse transpordi võimendamise meetodite ees on nende lokaalne efekt ja kõrvalise koe mitte kahjustamine ning lisaks sellele on antud peptiidid kohandatavad vastavalt vajadusele (Yang jt., 2017). Seetõttu võib peptiide pidada headeks võimalikeks transdermaalse ja dermaalse transpordi võimendajateks.

#### **1.4 Rakku sisenevad peptiidid**

CPP-d on lühikesed katioonsed ja/või amfipaatsed peptiidid, mille pikkus jääb alla 40 aminohappe (Langel, 2015). Neid kasutatakse kui võimalikke vektoreid ravimtranspordiks, kuna CPP-d on võimelised rakku sisse viima erinevaid lastmolekule. Rakku sisenevate peptiidide sünteesiks kasutatakse tavapäraselt tahke faasi peptiidsünteesi.

Tahke faasi peptiidsüntees põhineb Bruce Merrifieldi poolt välja töötatud meetodikal. Tahkele kandjale kinnitatakse vahelüli kaudu kovalentselt aminohape, mida on seejärel võimalik pikendada lisades sellele ühekaupa aminohappeid. See võimaldab sammukaupa kontrollida peptiidi sünteesi ja vajadusel saab teha erinevaid modifikatsioone sünteesi käigus. Antud töös kasutati fluorenüülmetüüloksükarbonüül rühma (Fmoc) tahke faasi peptiidsünteesi strateegiat, kus aminohapete N-terminaalne aminorühm on kaitstud Fmoc rühma poolt.

### 1.4.1 Nahka sisenevad peptiidid ja töös kasutatud peptiidid

Nahka sisenevad peptiidid on CPP-de alamklassi kuuluvad peptiidid, mille puhul on näidatud nende võime läbida naha sarvkihti. Enamasti on nahka sisenevad peptiidid lühikesed, nende pikkus jääb tavaliselt 7 kui 12 aminohappe vahele. Lisaks sellele leidub nahka sisenevate peptiidide hulgas rohkelt ka tsüklilisi peptiide. Arvatakse, et tsüklilised peptiidid omavad tänu oma täpsemalt piiritletud sekundaarstruktuurile suuremat afiinsust sihtmärkvalkude suhtes võrreldes sama järjestusega lineaarsete peptiididega (Roxin ja Zheng, 2012).

Nahka sisenevaid peptiide on kasutatud viimaks nahka erinevaid lastmolekule nagu lühikest interfereerivat RNA-d (siRNA) (Hsu ja Mitagotri, 2011), hüaluroonhapet (Chen jt., 2014), aga ka valke (Kim jt., 2018). Lastmolekule on võimalik viia nahka sidudes lasti peptiidi külge kovalentselt (Gennari jt., 2016) või mittekovalentselt manustades ainet koos peptiidiga (Chen jt., 2015). Lisaks sellele on näidatud, et nahka on ka võimalik viia peptiididega moodustatud nanopartikleid (Desai jt., 2010).

Nahka sisenevate peptiidide sarvkihi läbimise mehhanisme pole palju uuritud. Kuid on näidatud, et teatud peptiidide nahka sisenemisel muutvad sarvkihis olevate valkude sekundaarstruktuurid. Need põhjustavad valkude  $\alpha$ -heeliksiite osakaalu suurenemise ja sellevõrra vähendavad valkude teiste sekundaarstruktuuride, näiteks  $\beta$ -lehtede, osakaalu (Kumar jt., 2015, Gennari jt., 2016). Eelmainitud sekundaarstruktuuride osakaalu muutus võimaldab sarvkihis olevatel valkude struktuuridel lõdveneda ja selle kaudu on võimalik nahakaudse transpordi efektiivsuse suurenemine (Kumar jt., 2015). On leitud nahka sisenevaid peptiide, mis ei oma efekti sarvkihis olevatele lipiidkihtidele ja seetõttu võib järeldada, et nende puhul on sarvkihi läbimiseks olulisim transpordirada läbi keratinotsüütide (Kumar jt., 2015). Seevastu on leitud ka peptiide, mis omavad mõju sarvkihis olevale lipiidkihile, põhjustades selle muutumist voolavamaks (Gennari jt., 2016). Nahka sisenevate peptiidide puhul ei pruugi olla ainult üks mehhanism sarvkihi läbimisel ega ka kindel transpordirada, kuid selle täpsem määratlemine vajab veel täiendavat uurimist. Lisaks sellele oleks vaja ka uurida, kui olulist rolli mängib peptiidide puhul transport läbi karvafolliikulite ja nahas olevate avauste kaudu sarvkihi ületamisel.

Efektiivsed transdermaalse transpordi võimendajad peaksid omama afiinsust nii keratinotsüütides oleva keratiini kui ka transporditava aine suhtes (Menegatti jt., 2016). Hetkeseisuga on ainukene seos peptiidi omaduste ja nahka sisenemise efektiivsuse vahel leitud peptiidi keratiini sidumise afiinsuse korral (Kumar jt., 2015). Nahka sisenevad peptiidid, mis omavad suuremat afiinsust nahas oleva keratiini suhtes, peaksid paremini võimaldama lastmolekulide transporti nahas. Seevastu on oluline ka arvestada, et nahka sisenevad peptiidid

ei omaks liiga tugevat afiinsust keratiini suhtes, kuna seetõttu ei pruugi need olla võimelised ületama tervet sarvkihti.

Antud bakalaureusetöös kasutati kolme juba varem publitseeritud nahka sisenevat peptiidi: SPACE (*skin penetrating and cell entering*, nahka läbiv ja rakku sisenev), SPEH (*skin penetration enhancer heptapeptide*, naha läbitavust suurendav heptapeptiid) ja polüarginiin (antud töö kontekstis kaheksast arginiinist koosnev peptiid R8). On näidatud, et SPACE peptiid on võimeline transfekteerima rakke inimese fibroblastide ja keratinotsüütide rakukultuuris (Hsu ja Mitragotri, 2011) ning seda on kasutatud viimaks sea epidermisse tsüklosporiin A-d (Chen jt., 2015). Lisaks sellele on näidatud, et SPACE peptiidiga on võimalik sea nahka viia peptiidi-fosfolipiid süsteemis hüaluroonhapet (Chen jt., 2014) ning siRNA-d (Chen jt., 2014). SPEH on võimeline viima inimese epidermise lõikudesse peptiidiga konjugeeritud fraksioneerimata hepariini (Gennari jt., 2016). Polüarginiini on kasutatud viimaks hiire nahka tsüklosporiin A-d, mis oli peptiidiga konjugeeritud pH sõltuva siduja abil (Rothbard jt., 2000). Kõigi eelmainitud peptiidide puhul on iseloomustatud ka nende vähest tsütotoksisust.

### **1.5 Mitmekihilised 3D rakukultuurid**

Mitmed autorid on näidanud, et lihtsates kahe-dimensionaalsetes (2D) rakukultuurides saadud tulemused ei kandu hästi üle *in vivo* loomkatsete tulemustesse. Ühekihilise rakukultuuri puudusteks on näiteks rakkudevahelise ja raku-maatriksivahelise signaliseerimise puudumine (Breslin ja O'Driscoll, 2013). See võib aga viia võimalike terapeutiliste ainete testimisel valede järeldusteni ning hiljem *in vivo* katsetes on võimalik, et ilmneb aine liigne toksilisus või vähene efektiivsus (Breslin ja O'Driscoll, 2013). Selle vältimiseks on vajalikud mudelid, mis võimaldaks kultuurides kasvatataval bioloogilistel objektidel modelleerida *in vivo* kudesid. Nende abil saaks lihtsamal süsteemis uurida erinevaid haigusseisundeid ja terapeutiliste ainete efekti ilma vajamata tervet organismi. Üheks selliseks võimaluseks on kolme-dimensionaalsete (3D) kultuuride kasutamine, mis aitavad parandada rakupõhiste hinnangute bioloogilist asjakohasust (Pampaloni jt., 2007). 3D mudelite puhul on tegemist kõige rohkem *in vivo* kudet matkivate rakupõhiste analüüsimeetoditega ravimiarenduses (Breslin ja O'Driscoll, 2013).

Mitmekihiliste 3D rakukultuuride puhul on tegemist mudelitega, mis imiteerivad *in vivo* uuritavate objektide morfoloogiat ja omadusi. Neid saab üldiselt jaotada kaheks: toespõhised ja -vabad. Ilma toeseta saab moodustada agregatsiooni või rippuva tilga meetodi kaudu sfääre, mida on võimalik kasutada näiteks tuumorite mudelina (Pampaloni jt., 2007). Seevastu saab läbilaskva toese peal rekonstrueerida erinevaid koetüüpe näiteks luukude, kõhre, nahka või ainult epidermist (Brajša jt., 2016, Pampaloni jt., 2007).

3D mudeleid kasvatatakse tihtipeale primaarsetest rakkudest. Tegemist on doonori koest isoleeritud rakkudega, mis omavad vastavalt doonorile ja koele iseloomulikke diferentseerunud fenotüüpi (Jennings, 2015). Kuna tegemist on mitte immortaliseeritud rakkudega, on nende kasutamise puhul oluline rakkude passaaži number, mis iseloomustab kaudselt, kui palju on antud rakud paljunenud. Primaarrakkude omadused on ajas muutuvad, näiteks võivad toimuda olulised transkriptsioonilised muutused juba rakkude paljundamise alguses (Januszyk jt., 2015). Seetõttu on vajalik teha katseid sama populatsiooni rakkudega, millel on sama ja eelistatavalt võimalikult väike passaažiarv.

Primaarrakkude eeliseks juba väljakujunenud rakuliinide ees on nende sarnasus *in vivo* koele ja seetõttu eelistatakse neid kasutada teatud tingimustel, näiteks nagu mitmekihiliste rakukultuuride kasvatamisel. Primaarrakkudel on välja kujunenud koele omane fenotüüp ja kuna tegemist ei ole lõputult paljunevate rakkudega, ei toimu ka mutatsioonide kuhjumist (Jennings, 2015). Inimese naha ekvivalendi 3D kultuuri ei ole võimalik kasvatada immortaliseeritud inimese keratinotsüütidest (HaCaT), kuna antud rakud ei moodusta kudet *in vivo* nahale sarnase morfoloogiaga ja ei tooda vastavalt piisavalt ja õiges suhtes rasvhappeid ning keramiide (Boelsma jt., 1999). Kuigi primaarrakkudega on võimalik saada *in vivo* koele sarnasemaid mudeleid, mis võimaldavad paremini hinnata näiteks ravimi toksilisust, on siiski nende kasvatamine ja standardiseerimine raskendatud (Jennings, 2015).

### **1.5.1 Rekonstrueeritud epidermise mudel – inimese epidermise ekvivalent**

Inimese epidermise modelleerimiseks *in vitro* on võimalik kasutada 3D rekonstrueeritud epidermise mudelit. Selle jaoks kasvatatakse inimese primaarsetest keratinotsüütidest membraani peal defineeritud keskkonnas ja söötmes inimese epidermise ekvivalent. See on võimalik mudel testimaks erinevaid terapeutilisi molekule ilma looma või inimese epidermist vajamata. Sealhulgas oleks seda mudelit võimalik kasutada hindamiseks nahka sisenevaid peptiide kui nahakaudse transpordi võimendajaid.

Rekonstrueeritud epidermise mudeli puhul kasvatatud epidermise ekvivalent omab vastavaid füsioloogilisi struktuure nagu leidub *in vivo* nahas. Elektronmikroskoopiaga on näidatud, et rekonstrueeritud epidermises esinevad samad kihid ja korrektne ultrastruktuur nagu tegelikus nahas: basaalkiht, ogakiht koos desmosoomidega ühendatud rakkudega, sõmerkiht vastavate keratohüaliini sõmeratega ning sarvkiht (Poumay jt., 2004). Lisaks sellele on iseloomustatud keratinotsüütide diferentseerumise astet vaadeldes erinevaid nende poolt toodetud markereid ja nende lokaliseerimise koost. Immunohistokeemiliselt on näidatud keratinotsüütide diferentseerumise markerite nagu keratiin 10-e, keratiin 14-e, involucriini ja filagriini ekspressiooni ja füsioloogiliselt korrektset paiknemist 3D rekonstrueeritud mudelis

(Poumay jt., 2004). Iseloomustatud on ka rekonstrueeritud epidermise lipiidikoostlust. Kõiki vajalikke sarvkihi lipiide ja keramiide sünteesitakse, kuid siiski võib esineda nende osakaalude erinevust võrreldes *in vivo* nahaga (Ponec jt., 2001).

Epidermise rekonstrueerimiseks 3D kultuuris on mitmeid võimalusi, kuid mudeli põhisammud on erinevate meetodite puhul samad. Kõigepealt kasvatatakse kaevudesse sisestatud poorsete membraanide peal söötmesse sukeldatult keratinotsüüte, et moodustuks membraani peal ühekihiline rakumass, mis kinnituvad integriinide abil mehaanilisele toesele (Poumay ja Coquette, 2007). Poorsed membraanid on kaetud maatriksiga, tavaliselt on selleks kasutatud laminiini, kollageeni või fibronektiini (Robert jt., 1997). Tehismembraanide katmine valguga on vajalik keratinotsüütide adhesiooni suurendamiseks ja täielikult vedelikku sukeldatud membraanile kinnitunud keratinotsüütide kiht annab aluse rekonstrueeritud epidermise basaalkihile. Peale rakkude kinnitumist läbilaskvale membraanile kasvatatakse keratinotsüüte poolkuivas kultuuris, kus rakud saavad pealtpoolt õhuga kokku puutuda, imiteerides *in vivo* tingimusi. Õhuga kokkupuude on vajalik mitmekihilise kultuuri moodustumiseks ja keratinotsüütide terminaalsetks diferentseerumiseks (Rosdy ja Clauss, 1990). Nii täielikult sukeldatult kui poolkuiva kultuuri puhul kasutatakse erinevate komponentidega söötmeid, mis võimaldavad kontrollida keratinotsüütide diferentseerumist. Näiteks vitamiin C on vajalik poolkuivas kultuuri faasis, et moodustuks rekonstrueeritud epidermise mudelis õige lipiidikoostise ja keramiidi profiil (Ponec jt., 1997). Epidermaalse kasvufaktori olemasolu söötmes võimaldab sarvkihil kasvada paksemaks, kuid ei ole hädavajalik selle moodustumiseks nagu on keratinotsüütide kasvatamine poolkuivas kultuuris (Ponec jt., 1997). Ülejäänud komponendid söötmes on vajalikud inimese primaarsete keratinotsüütide kasvu toetamiseks ja kiirendamiseks.

Inimese primaarsetest keratinotsüütidest on võimalik kasvatada inimese epidermise struktuuri ja koostist imiteeriv rekonstrueeritud epidermis. Selle kasvatamiseks on vajalik keratinotsüütide diferentseerumise kontrollimine ja suunamine, kasutades erinevaid söötmelemente ja muutes kasvutingimusi. Valmiskasvatatud epidermise ekvivalent on heaks katsetusobjektiks hindamaks täpsemini erinevate molekulide võimalikku toksilisust ja efektiivsust enne suundumist *in vivo* katsetesse ja see lähenemine on asunud asendama loomkatseid (Poumay ja Coquette, 2007)

## 2. Eksperimentaalne osa

### 2.1 Töö eesmärgid

Antud bakalaureusetöö eesmärkideks on:

- Sünteesida kaks nahka sisenevat peptiidi, SPACE ja SPEH, kasutades Fmoc tahke faasi peptiidsünteesi meetodit
- Iseloomustada töös kasutatud nahka sisenevate peptiidide sisenemist inimese primaarsete keratinotsüütide 2D rakukultuuris
- Hinnata töös kasutatud nahka sisenevate peptiidide mõju inimese primaarsete keratinotsüütide elumusele 2D rakukultuuris
- Alustada 3D rekonstrueeritud epidermise mudeli väljatöötamisega
- Hinnata töös kasutatud nahka sisenevate peptiidide epidermise läbimise efektiivsust 3D rekonstrueeritud epidermise mudelis

### 2.2 Materjalid ja meetodika

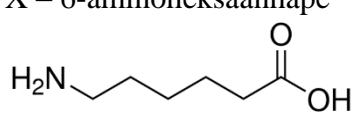
#### 2.2.1 Töös kasutatud peptiidid

Töös kasutatud peptiidide järjestused on kujutatud tabelis 1 ja struktuurid joonisel 4. SPACE ja SPEH sünteesiti autori poolt antud bakalaureusetöö raames ning peptiid R8 sünteesiti Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse biotehnoloogia labori poolt.

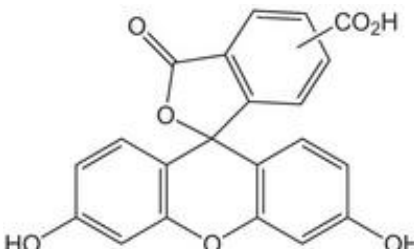
**Tabel 1.** Töös kasutatud nahka sisenevad peptiidid ja nende järjestused. FAM on lisatud peptiidi N-terminaalse aminohappe aminorühma külge.

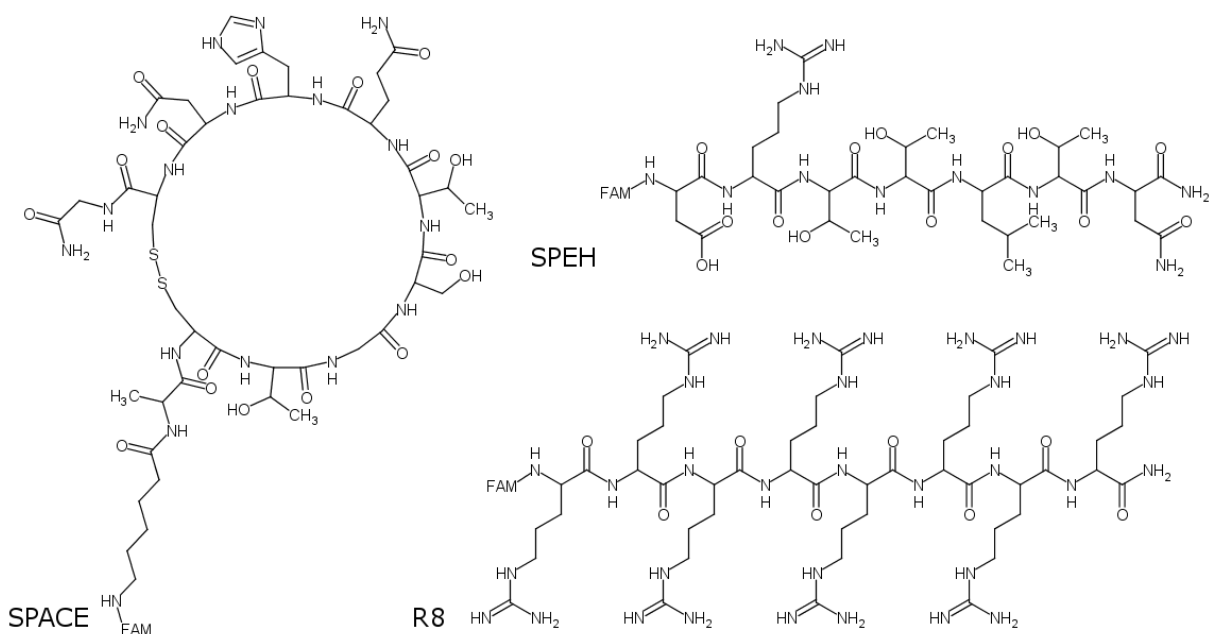
Peptiid	Järjestus	Viide
SPACE	FAM-XA $\dot{C}$ TGSTQHQC $\dot{G}$ -NH <sub>2</sub>	Hsu ja Mitragotri, 2011
SPEH	FAM-DRTTLTN-NH <sub>2</sub>	Gennari jt., 2016
R8	FAM-RRRRRRRR-NH <sub>2</sub>	Rothbard jt., 2000

X – 6-aminoheksaanhape



FAM – 5(6)-karboksüfluorestsiiin





**Joonis 4.** Töös kasutatud peptiidide struktuurid.

### 2.2.2 Töös kasutatud peptiidide süntees

Antud töös kasutatud peptiididest sünteesis töö autor SPEH-i ja tsüklilise SPACE-i. Mõlemad peptiidid sünteesiti Fmoc tahke faasi peptiidisünteesi meetodit kasutades, SPEH käsitsi ja SPACE peptiidisüntesaatoriga (Biotage<sup>®</sup> Initiator+ Alstra<sup>™</sup>). Tahke faasi peptiidisünteesi põhimõte on välja toodud lisas 1.

Süntees toimus käsitsi 0,1 ja masinat kasutades 0,125 mmol skaalas, aminohappeid võeti vastavalt nelja- või viiekordses ülehulgas vaigu funktsionaalrühmade kohta. Peptiidide sünteesi alustatakse tahke faasi peptiidisünteesi puhul C-terminusest ja see kulgeb N-terminuse suunas. Käsitsi sünteesi puhul kasutati tahke kandjana 244 mg Rink-amiid 4-metüülbenshüdrüülamiin (MBHA) vaiku ja automatiseeritud peptiidisünteesi puhul 278 mg Rink-amiid ChemMatrix<sup>®</sup> vaiku. Rink-amiid MBHA vaigule olid funktsionaalrühmadega vahelülid kinnitunud 0,41 mmol/g ja Rink-amiid ChemMatrix<sup>®</sup> vaigu puhul 0,45 mmol/g kandja kohta.

Enne sünteesi algust lasti vaigul punduda 20 minutit diklorometaanis (DCM). Liidetavad aminohapped aktiveeriti kasutades neljakordses ülehulgas 1-hüdroksübensotriasooli (HOBt) ja O-bensotriasool-N,N,N',N'- tetrametüülurooniumheksafluorofosfaati (HBTU) ning kaheksakordses ülehulgas N,N-diisopropüületüülamiini (DIEA) lahustatuna N,N-dimetüülformamiidis (DMF). Fmoc kaitserühmade eemaldamiseks kasutati 20% piperidiini lahust DMF-is.

Käsitsi sünteesimise käigus teostati peale iga aminohappe lisamist Kaiseri (ninhüdrüüni) test hindamaks aminohappe lisamise edukust. Antud test põhineb ninhüdrüüni reageerimisel

vabade aminorühmadega, mis võimaldab visuaalselt hinnata reaktsiooni kulgemise edukust kuumutades väikest kogust vaiku paari tilga lahus A (segu kaaliumtsüaniidist, püridiinist, fenoolist ja etanoolist) ja B-ga (5% nihüdriini lahus etanoolis) (Kaiser jt., 1970). Negatiivse tulemuse korral, kui puuduvad vabad aminorühmad, jääb lahus kollaseks, kuid positiivse tulemuse puhul värvub lahus siniseks. Positiivse tulemuse korral korrati aminohappe lisamist sünteesitavale peptiidile ja peale seda teostati vajadusel vabade aminorühmade blokeerimine, inkubeerides vaigul olevat peptiidi 20 minutit 10% atsetanhüdriidi, 5% DIEA ja 6% HOBt-i lahusega DCM-is.

Mõlemale valmis peptiidile lisati peale sünteesi käsitsi N-terminaalsesse otsa FAM. Kuna SPACE-i puhul on tegemist tsüklilise peptiidiga, otsustati teha selle algsesse järjestusse modifikatsioon ja lisati aminoheksaanhappe jääk eraldamiseks peptiidi järjestust N-terminaalsest fluorofoorist. Modifikatsiooni eesmärgiks oli võimaliku steerilise inhibitsiooni vältimine fluorestsentsmärgise poolt tsüsteiinide vahelise disulfiidsilla moodustumisel. See tuleneb sellest, et FAM-i puhul on tegemist mahuka aromaatses ühendiga, mis võib steeriliselt takistada peptiidi vajaliku struktuuri omandamist disulfiidsilla moodustumise ajal. SPEH puhul on aga tegemist lineaarse peptiidiga, millele ei ole vaja teha sünteesijärgseid modifikatsioone ja seetõttu ei peatud vajalikuks algsesse järjestusse muutuste tegemist. FAM-i lisamiseks peptiidile inkubeeriti vaigu külge kinnitunud peptiide 24 tundi 2 µM 5(6)-karboksüfluoretsiini lahusega DMF-is, kuhu oli lisatud 33% dimetüülsulfoksiidi (DMSO). FAM-i aktiveerimiseks kasutati 6% N,N'-diisopropüülkarbodiimiidi (DIC) ja 14% DIEA lahust HOBt-is.

Peale FAM-i lisamist moodustati lineaarsest SPACE peptiidist tsükliline peptiid. Tsüklilisus saavutati üle disulfiidsilla, mis moodustati järjestuses olevate tsüsteiinide vahele. Peptiidi sünteesil kasutati tsüsteiini, mille tiolgrupil on atsetaminometüül kaitserühm. Tioolgrupi kaitserühma kasutamine on oluline vältimaks tiolrühma oksüdeerimist, ehk elektronide kaotamist, lahuses leiduva hapniku tõttu ja seetõttu võimaldab see õiges konformatsiooni peptiidi saagikuse suurenemise (Wang jt., 2006). Tioolgrupi kaitserühmad eemalduvad disulfiidsilla moodustumisel töödeldes lineaarset peptiidi oksüdeeriva reagentiga. SPACE-is moodustati disulfiidsild C<sup>2</sup> ja C<sup>10</sup> vahel kasutades talium(III)trifluoroatsetaati. Lineaarset FAM märgistatud SPACE peptiidi inkubeeriti 30 minutit talium(III)trifluoroatsetaadi lahusega DMF-is (Page jt., 2007). Talium(III)trifluoroatsetaati võeti 1,2 kordses ülehulgas peptiidi sünteesi skaala suhtes.

Viimaks lõigati valmis FAM märgisega peptiidid tahke kandja pealt lahti ja eemaldati kõrvalahelate kaitserühmad kasutades 95% trifluoroäädikhappe (TFA), 2,5% triisopropüülsilaani (TIS) ja 2,5% vee segu. Antud lahust inkubeeriti koos vaigul oleva peptiidiga 3 tundi. Peptiidi eraldamiseks vaigust filtreeriti segu läbi süstla ja saadud filtraat pesti

1 ml TFA-ga, mis aurustati vaakumi all. Peale TFA eemaldamist lisati lahusele 40 ml jääkülma eetrit ja saadud lahust tsentrifugiti 2253 g 4°C juures 5 minutit (rootor 12071). Eeter eemaldati ja järelejäänud supernatant lahustati uuesti eetris ning tsentrifugiti. Eetripesu korrati kokku 3 korda, et ekstraheerida lahustunud kõrvalised orgaanilised ühendid. Peale kolmandat pesu supernatant lahustati väheses koguses vees ja saadud lahus külmutati -80°C juures kuni jäätumiseni. Peale seda lüofiliseeriti peptiidi vesilahus üleöö.

Peptiide puhastati pöördfaas-vedelikkromatograafiaga kasutades C-4 kolonni ja atsetonitriili gradienti vees, kuhu oli lisatud 0,1% TFA-d. Fraktsioonid korjati käsitsi ja nende õigsust maatriksi assisteeritud laserdesorptsioon-ionisatsioon lennuaja (MALDI-TOF) mass-spektromeetriga, maatriksiks kasutati  $\alpha$ -tsüaano-4-hüdrosükaneelhapet (MALDI-TOF mass-spektromeetria analüüsi teostas molekulaarse biotehnoloogia labori teadur Piret Arukuusk).

Seejärel lahustati puhastatud peptiidid vees ning valmistati 1 mM lähtelahused, mida säilitati -20°C juures, või säilitati peptiid pulbrina.

## **2.2.3 Rakkude kultiveerimine**

### **2.2.3.1 Hiire embrüonaalsete fibroblastide kasvatamine ja inaktiveerimine**

Kahe-päevaste hiirte embrüotest eraldatud fibroblaste (MEF) (fibroblastid pärinesid Sulev Kuuse käest ja töö autor kasutas juba varasemalt eraldatud rakke) kasvatati *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) söötmes, kuhu oli lisatud 10% veise loote seerumit (FBS), 1% asendatavaid aminohappeid, 100 U/ml penitsilliini ja 100 mg/ml streptomütsiini (edaspidi fibroblastide sööde). Rakke hoiti 37°C 5% CO<sub>2</sub> juures ja lahjendati iga 2-3 päeva järel, et vältida rakkude kasvamist üle 90% kasvuplaadi täituvuse ehk konfluentsuse.

MEF-ide inaktivatsioonil põhineti Conneri poolt publitseeritud protokollil, mida modifitseeriti sobitumaks antud eksperimendiga. MEF-ide inaktiveerimiseks kasutati rakke, mis olid saavutanud 90% konfluentsuse. Rakkude paljunemise pidurdamiseks kasutati mitomütsiin C-d. Tegemist on antibiootikumiga, mis loob kovalentsed ristsillad komplementaarsete DNA ahelate vahel (Szybalski ja Iyver, 1964). Antibiootikumist tuleneva DNA kahjustuse tõttu ei ole inaktiveeritud rakud võimelised enam paljunema, kuid säilitavad oma metaboolse aktiivsuse.

Inaktiveeritud MEF-ide saamiseks pesti rakke kõigepealt fosfaatpuhverdatud füsioloogilise lahusega (PBS) ja seejärel inkubeeriti neid 2-3 tundi fibroblastide söötmega, kuhu oli lisatud 10 µg/ml mitomütsiin C-d. Peale inkubatsiooni mitomütsiin C lahusega söötmes pesti inaktiveeritud MEF-e kaks korda PBS-iga ja külmutati edasiseks kasutamiseks. Fibroblaste külmutati 3 miljonit rakku krüoviaali kohta FBS-is, kuhu oli lisatud 20% DMSO-

d. Väike kogus inaktiveeritud rakke külvati fibroblastide söötmes ning neid jälgiti mitme päeva jooksul veendumaks, et rakud on kaotanud oma võime jaguneda.

### **2.2.3.2 Inimese primaarsete keratinotsüütide amplifikatsioon**

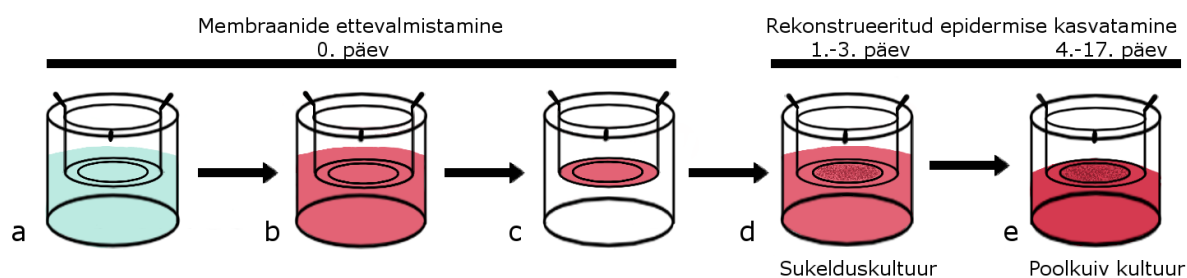
Inimese primaarsete keratinotsüütide (edaspidi keratinotsüüdid) (passaaž 2, CELLnTEC) kasvatamiseks kasutati DMEM söödet, kuhu oli lisatud 5% FBS-i, 100 U/ml penitsilliini, 100 mg/ml streptomüsiini ning vajalikke kasvufaktoreid ja lisandeid (edaspidi 2D keratinotsüütide sööde). 2D keratinotsüütide söötmele lisati 5µg/ml inimese rekombinantset insuliini, 180 µM adeniin hüdrokloriidi, 10 ng/ml epidermaalset kasvufaktorit, 0,4 µg/ml hüdrokortisooni, 1 µM isoproterenooli, 5 µg/ml inimese transferiini ja 2 nM trijoodtüroniini (modifitseeritud Barreca jt., 1992, Orenberg ja Wilkinson, 1982). 24 tundi enne keratinotsüütide külvamist rakkude paljundamise jaoks külvati eelnevalt väljatoodud keratinotsüütide söötmes 100 mm petri tassile 3 miljonit inaktiveeritud MEF-i (vaata punkti 2.2.3.1). Järgmisel päeval külvati samale tassile inaktiveeritud rakkude peale passaaž 2 keratinotsüüdid. Rakke inkubeeriti 37°C 5% CO<sub>2</sub> juures ning söödet vahetati ülepäeva. Keratinotsüüte kasvatati inaktiveeritud MEF-ide kihi peal, mis võimaldab keratinotsüütidel paremini kinnituda petri tassile ja ka kiiremini kasvada. See tuleneb inaktiveeritud fibroblastide võimest toota kollageeni, laminiini ja fibronektiini (Alitalo jt., 1982).

Alternatiivina eelnevale meetodile kasvatati osade katsete jaoks keratinotsüüte ilma inaktiveeritud MEF-ideta. CELLnTEC'i inimese primaarseid epidermaalseid keratinotsüüte (*Human Epidermal Keratinocyte Progenitors, pooled*, inimese epidermaalsete keratinotsüütide eellasrakud, segatud) kasvatati kasutades kommertsiaalset CnT-Prime epiteelkultuuri söödet. Rakkude kasvatamisel jälgiti tootja poolt välja antud protokolliga primaarsete epidermaalsete keratinotsüütide kasvatamiseks 2D rakukultuuris. Kommertsiaalse söötmega kasvatatud keratinotsüütide kasutamisel katsetes vahetati CnT-Prime sööde eelnevalt defineeritud 2D keratinotsüütide söötme vastu ja katsed toimusid täpselt samadel tingimustel nagu inaktiveeritud MEF-idega kasvatatud keratinotsüütidega teostatud katsed.

Kui keratinotsüüdid olid saavutanud 80-90% konfluentsuse, eemaldati vajadusel plaadilt inaktiveeritud MEF-id pestes petri tassi kiirelt kümme korda PBS-iga. Peale seda inkubeeriti keratinotsüüte petri tassilt lahti saamiseks 5-7 minutit 0,25% trüpsiin- etüleendiamiintetraädikhape (EDTA) lahusega PBS-is. Saadud passaaž 3 keratinotsüüdid loendati ja külvati edasi eksperimentide tegemiseks või kasutati 3D rakukultuuri alustamiseks. Antud töös viidi kõik katsed läbi passaaž 4 rakkudega. Rakukultuure kasvatati ja inkubeeriti iga katse jaoks 37°C ja 5% CO<sub>2</sub> juures inkubaatoris.

## 2.2.4 3D rekonstrueeritud epidermise mudeli ettevalmistamine ja kasvatamine

3D rekonstrueeritud epidermise mudeli kasvatamise protokollile ülesehitamisel põhineti varem publitseeritud protokollidele (Barreca jt., 1992, Orenberg ja Wilkinson, 1982, Poumay jt., 2004). Antud meetodeid optimeeriti vastamaks labori tingimustele, kus antud bakalaureusetöö sooritati. Kogu protsessi rekonstrueeritud epidermise moodustamise jaoks alates membraanide ettevalmistamisest kuni rakkude kasvatamiseni on kujutatud joonisel 5.



**Joonis 5.** Ülevaade 3D rekonstrueeritud epidermise mudeli ettevalmistamisest ja kasvatamisest. Punktis a on kujutatud membraanide inkubatsioon antibiootikumilahusega, punktis b söötmega ja punktis c fibronektiiniga. Punkt d iseloomustab sukelduskultuuri ja punkt e poolkuiva kultuuri.

Inimese rekonstrueeritud epidermise kasvatamiseks primaarsetest keratinotsüütidest kasutati ThinCert™ (Greiner Bio-One) 24 kaevulise plaadi kaevudesse sisestatavaid membraane, poorisuurusega 0,4 µm. 24 tundi enne keratinotsüütide külvamist valmistati ette membraanid. Esmalt inkubeeriti kaevudesse sisestatud membraane nende puhastamiseks ja märgamiseks antibiootikumi lahusega ja seejärel söötmega. Kõigepealt inkubeeriti membraane 1-2 tundi 4°C juures PBS lahusega, kuhu oli lisatud 100 U/ml penitsilliini ja 100 mg/ml streptomütsiini (joonis 5, punkt a). Peale seda eelmainitud lahus eemaldati ja membraanid sukeldati 1-2 tunniks 4°C juures DMEM söötmesse, mis sisaldas 25% Ham's F-12 L-glutamiiniga, 100 U/ml penitsilliini ja 100 mg/ml streptomütsiini (joonis 5, punkt b). Pärast DMEM söötme eemaldamist pipeteeriti igale kaevu sisestatud membraanile 50 µl 50 µg/ml fibronektiini lahust PBS-is ja inkubeeriti membraane üleöö 4°C juures (joonis 5, punkt c).

Järgneval päeval eemaldati üleliigne fibronektiin membraanidelt. Seejärel lisati igasse kaevu ja neisse sisestatud membraanidele sukeldussööde. See koosnes DMEM sööttest, mis sisaldas 22% Ham's F-12 L-glutamiiniga, 10% FBS-i, 1% asendatavaid aminohappeid, 100 U/ml penitsilliini, 100 mg/ml streptomütsiini ning vajalikke kasvufaktoreid ja lisandeid.

Sukeldussöötmele lisati 5 µg/ml inimese rekombinantset insuliini, 180 µM adeniin hüdrokloriidi, 10 ng/ml epidermaalset kasvufaktorit, 0,4 µg/ml hüdrokortisooni, 1 µM isoproterenooli, 5 µg/ml inimese transferiini ja 2 nM trijoodtüroniini. Igale kaevus olevale membraanile külvati 200 tuhat keratinotsüüti sukeldussöötmes. Membraanidel olevaid keratinotsüüte hoiti 3 päeva täielikult söötmesse sukeldatult ja söödet vahetati igapäevaselt (joonis 5, punkt d). Selline kasvatamisviis võimaldab keratinotsüütidel kinnituda membraani külge ja moodustada selle peale ühekihilise rakukihi.

Peale rakkude kasvatamist 3 päeva täielikult söötmesse sukeldatult alustati 4. päeval keratinotsüütide kasvatamist poolkuivas kultuuris (joonis 5, punkt e). Sel puhul kasutati rakkude kasvatamiseks poolkuiva faasi söödet, mis sisaldas DMEM-is 22% Ham's F-12 L-glutamiiniga, 10% FBS-i, 1% asendatavaid aminohappeid, 100 U/ml penitsilliini, 100 mg/ml streptomütsiini ning vajalikke kasvufaktoreid ja lisandeid. Poolkuiva kultuuri söötmele lisati 5 µg/ml inimese rekombinantset insuliini, 10 ng/ml epidermaalset kasvufaktorit, 0,4 µg/ml hüdrokortisooni ja 96 µg/ml vitamiin C-d. Antud söödet ei lisatud enam kaevu sisestatud membraanide ülemisse ruumi, vaid ainult nende alla. Seejuures jälgiti, et söötmenivoo oleks võrdne sisestatud membraani põhjaga. Selline kasvatusviis võimaldab rakkude pealispinnal õhuga kokku puutuda. Õhuga kokkupuude on vajalik rekonstrueeritud epidermise puhul sarvkihi arenemiseks (Rosdy ja Clauss, 1990). Lisaks sellele saavad membraani peal kasvavad keratinotsüüdid läbi membraanis olevate pooride kaudu kokku puutuda kaevus oleva söötmega. Rakke kasvatati poolkuivas faasis 14 päeva ning söödet vahetati igapäevaselt. Rakke hoiti kogu rekonstrueeritud epidermise mudeli kasvatamise ajal 37°C ja 5% CO<sub>2</sub> juures.

### **2.2.5 Peptiidi sisenemise hindamine**

Peptiidi sisenemist inimese primaarsetesse keratinotsüütidesse vaadeldi nii 2D kui ka 3D kultuuris. 2D rakukultuuris hinnati peptiidi sisenemist rakkudesse kasutades fluoromeetrit ja fluorestsentsmärgisega peptiidi. Selle jaoks külvati eelnevalt želatiniseeritud 48-kaevulisele plaadile 30 tuhat keratinotsüüti kaevu kohta. Rakkudel lasti kasvada 24 tundi 2D keratinotsüütide söötmes 37°C ja 5% CO<sub>2</sub> juures. Vana sööde vahetati uue vastu ning seejärel lisati rakkudele 2 µM peptiidi lahust 2D keratinotsüütide söötmes ning hoiti seda peal vastavalt 1, 4, 6 ja 24 tundi. Kaevudes oleva lahuse ruumala oli rakkude peptiidilahusega inkubeerimise ajal 235 µl. Seejärel eemaldati sööde, lüüsi rakud 0,1% Triton X-100 lahusega PBS-is ja hinnati rakulüsaadi fluorestsentsintensiivsust kasutades BioTek Synergy™ Mx mikroplaadilugejat. Tehti kolm mõõtmist bioloogilistest replikaatidest ja saadud tulemused esitati graafikul suhtena töötlemata rakkude suhtes kasutades GraphPad Prism 6 programmi.

Lisaks eelnevale hinnati peptiidi sisenemist 2D rakukultuuris keratinotsüütidesse kasutades konfokaalmikroskoopiat. Selle jaoks külvati eelnevalt želatiniseeritud Nunc™-Tek™ 8-kambrilistele alusklaasidele igasse kambrisse 50 tuhat keratinotsüüti ja kasvatati rakke 2D keratinotsüütide söötmes eelnevalt väljatoodud tingimustel 72 tundi. Seejärel vahetati kaevudes sööde ja lisati peptiidid, nii et igas kaevus oli lõpuks 250 µl 2 µM peptiidilahust 2D keratinotsüütide söötmes. Peale rakkude inkubeerimist vastavalt 1, 4, 6 ja 24 tundi eemaldati peptiidilahused ja lisati igasse kaevu 240 µl värsket 2D keratinotsüütide söödet. Vahetult enne tulemuste visualiseerimist lisati rakkudele 10 µl 20-kordset Hoechst 3342-e (edaspidi Hoechst) lahjendust vees, Hoechst'i lõppkontsentratsiooniks kambris oli 20 µg/ml. Peptiidi sisenemise hindamiseks kasutati konfokaalmikroskoopi Zeiss LSM710 (filtrid 492-584, 425-493). Hoechst'i signaali jälgimiseks kasutati 405 nm laserit ning peptiidi küljes oleva FAM signaali jälgimiseks kasutati 488 nm laserit. Hoechst'i ergastuskiirguse lainepikkus on 350 nm ja emissioonikiirguse lainepikkus on 461 nm. FAM-i ergastuskiirguse lainepikkus on 494 nm ja emissioonikiirguse lainepikkus on 518 nm.

Peptiidi rakkudesse sisenemise hindamiseks inimese 3D rekonstrueeritud epidermise kultuuris kasvatati valmis 3D kultuur nagu kirjeldatud punktis 2.2.4. Peale 3D kultuuri valmiskasvatamist lisati membraanidel olevatele rekonstrueeritud epidermistele kas 100 µl 2 µM peptiidi lahust 5% glükoosi vesilahuses, 5% glükoosi vesilahust või jäeti kultuur kontrolliks töötlemata. 24 tunni möödudes eemaldati membraanidele jäänud lahused ning rakukultuuri analüüsiti edasi külmlõikude abil. Selleks sisestati membraani peal olev rekonstrueeritud epidermise protokoll järgides kasvanud rakukultuur Shandon™ Cryomatrix™ sisestamismaatriksisse. Sisestatud kultuurist tehti krüotoomiga 10 µm paksused lõigud (külmlõigud tehti Anu Kõiveere poolt, töö autor valmistas koed ette lõikamiseks ja teostas iseseisvalt lõikamisjärgsed protsetuurid). Antud külmlõigud fikseeriti 4% paraformaldehüüdi lahusega PBS-is, pesti PBS-iga ja seejärel sulundati VECTASHIELD® HardSet Mounting Medium'iga, kuhu oli lisatud 4',6-diamidino-2-fenüülindooli (DAPI). Fikseeritud kude vaadeldi konfokaalmikroskoobiga Zeiss LSM710 (filtrid 492-584, 596-672 ja 425-493). DAPI signaali jälgimiseks kasutati 405 nm laserit ja FAM signaali jälgimiseks 488 nm laserit. DAPI ergastuskiirguse lainepikkus on 358 nm ja emissioonikiirguse lainepikkus on 461 nm.

## **2.2.6 Rakkude elumuse hindamine**

Peptiidide võimaliku toksilisuse iseloomustamiseks kasutati The CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay MTS meetodit. Tegu on kolorimeetrilise meetodiga, mis põhineb rakkude elutegevuse toimel tetrasooliumi soola redutseerimisel formasaaniks. Mõõtes spektrofotomeetriliselt analüüsi käigus tekkinud formasaani neelduvust,

on võimalik hinnata rakkude metaboolse aktiivsuse kaudu kaudselt testitava aine mõju rakkude elumusele.

Peptiidide toksilisuse hindamiseks jaoks külvati eelnevalt želatiniseeritud 96 kaevulisse plaati 10 tuhat keratinotsüüti kaevu kohta ja lasti neil kasvada 2D keratinotsüütide söötmes 48 tundi. Enne peptiidi lisamist rakkudele vahetati vana sööde värske 2D keratinotsüütide söötme vastu. Söödet lisati nii palju, et peale peptiidi lisamist oleks söötme ruumala 100 µl. Toksilisust hinnati peptiidi kontsentratsioonidel 0,5-10 µM. Rakke inkubeeriti peptiidiseguga 24 tundi, positiivse kontrolli jaoks töödeldi rakke 0,01% Triton X-100 lahusega söötmes. Peale rakkude inkubatsiooni peptiidi või kontrolliga, eemaldati lahused ja lisati igasse kaevu 80 µl värsket 2D keratinotsüütide söödet, 20 µl MTS reagenti ning inkubeeriti 2 tundi.

Rakkude elumuse hindamiseks mõõdeti MTS reagentiga inkubatsioonil tekkinud kromogeeni absorptsiooni lainepikkusel 490 nm Tecan Sunrise mikroplaadi lugejaga. Sooritati 4 mõõtmist bioloogilistest replikaatidest. Rakkude elumus normaliseeriti tausta (sööde ja MTS reagent) suhtes, mittetöödeldud rakkude elumus defineeriti 100% ja positiivne kontroll 0% ning tulemused esitati protsentuaalselt graafikul kasutades GraphPad Prism 6 programmi.

## **2.3 Tulemused ja arutelu**

### **2.3.1 Peptiidide süntees**

Antud bakalaureusetöö käigus sünteesiti 2 peptiidi tuginedes eelnevalt publitseeritud järjestustele: SPACE ja SPEH (tabel 1). Nende puhul on varasemalt näidatud, et antud peptiidid on transdermaalse transpordi võimendajad (vaata punkti 1.4.1).

Sünteesi käigus lisati peptiididele N-terminaalsesse otsa fluorestseeruv FAM märgis. FAM lisati peptiididele, et oleks võimalik kvantifitseerida ja visualiseerida peptiidi sisenemist rakku. Fluorofoori lisamisel peptiidile on vajalik arvestada, et see võib muuta peptiidi omadusi võrreldes märketa peptiidiga. Näiteks on varasemalt näidatud, et märke lisamine võib viia peptiidi transfektsiooniefektiivsuse muutumiseni ning ka võimaliku toksilise efekti suurenemiseni peptiidiga töödeldud rakkudele (Birch jt., 2017). Sellest hoolimata on fluorofooride kasutamine bioloogiliste molekulide elussüsteemides jälgimiseks ja kvantifitseerimiseks väga levinud meetod. Üheks võimaluseks eelnimetatud fluoromärke võimalike mõjude hindamiseks on teostada lisakontrolle ilma märketa peptiidiga.

Käsitsi sünteesi puhul saadi 113 mg SPEH peptiidi, millest puhastati pöördfaas-vedelikkromatograafiat kasutades 2 mg ja ülejäänud puhastamata peptiid säilitati pulbrina -20°C juures. Automatiseeritud sünteesi puhul saadi 326 mg SPACE peptiidi, millest puhastati pöördfaas-vedelikkromatograafiat kasutades 3 mg ja ülejäänud puhastamata peptiid säilitati pulbrina -20°C juures.

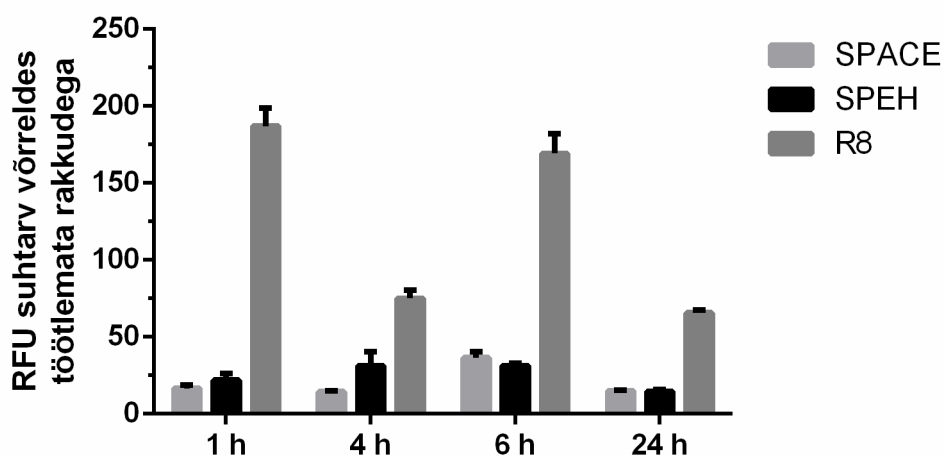
### **2.3.2 Peptiidi sisenemise hindamine 2D rakukultuuris**

Fluoromärgisega peptiidi sisenemist 2D keratinotsüütide rakukultuuris hinnati väikeses kontsentratsioonis eri ajapunktidel. Väikese kontsentratsiooni kasutamine on oluline kliinilises kontekstis vältimaks võimalikku toksilisust või ärritust. Peptiidi sisenemise hindamiseks kasutati nii kvantitatiivset lähenemist, mõõtes rakulüsaadi fluorestsentsintensiivsust, kui kvalitatiivset hindamist konfokaalmikroskoopiat kasutades. Erinevad ajapunktid valiti uurimaks peptiidi sisenemist ja akumulatsiooni rakkudesse ajas. Lisaks sellele sooviti leida ajapunkt, mil peptiidi sisenemine oleks maksimaalne.

Peptiidilahusega inkubeeritud rakkude fluorestsentsintensiivsus on kujutatud joonisel 6. Kõige efektiivsem peptiidi rakkudesse sisenemisel oli R8. 1 tund peptiidiga inkubeeritud rakkude fluorestsentsintensiivsus oli 187 korda suurem võrreldes töötlemata rakkudega. Lisaks sellele saavutas R8 maksimaalse rakku sisenemise 1 tunni vältel. Joonisel 6 on näha, et SPACE ja SPEH rakku sisenemine efektiivsus on võrdväärsed, SPACE saavutab maksimaalse sisenemise 4 tunni jooksul ja SPEH 6 tunni jooksul. Võrreldes töötlemata rakkudega oli

peptiidiga töödeldud rakkude fluorestsentsintensiivsus SPEH puhul 4 tunni pärast 31 korda ja SPACE puhul 6 tunni järel 36 korda suurem.

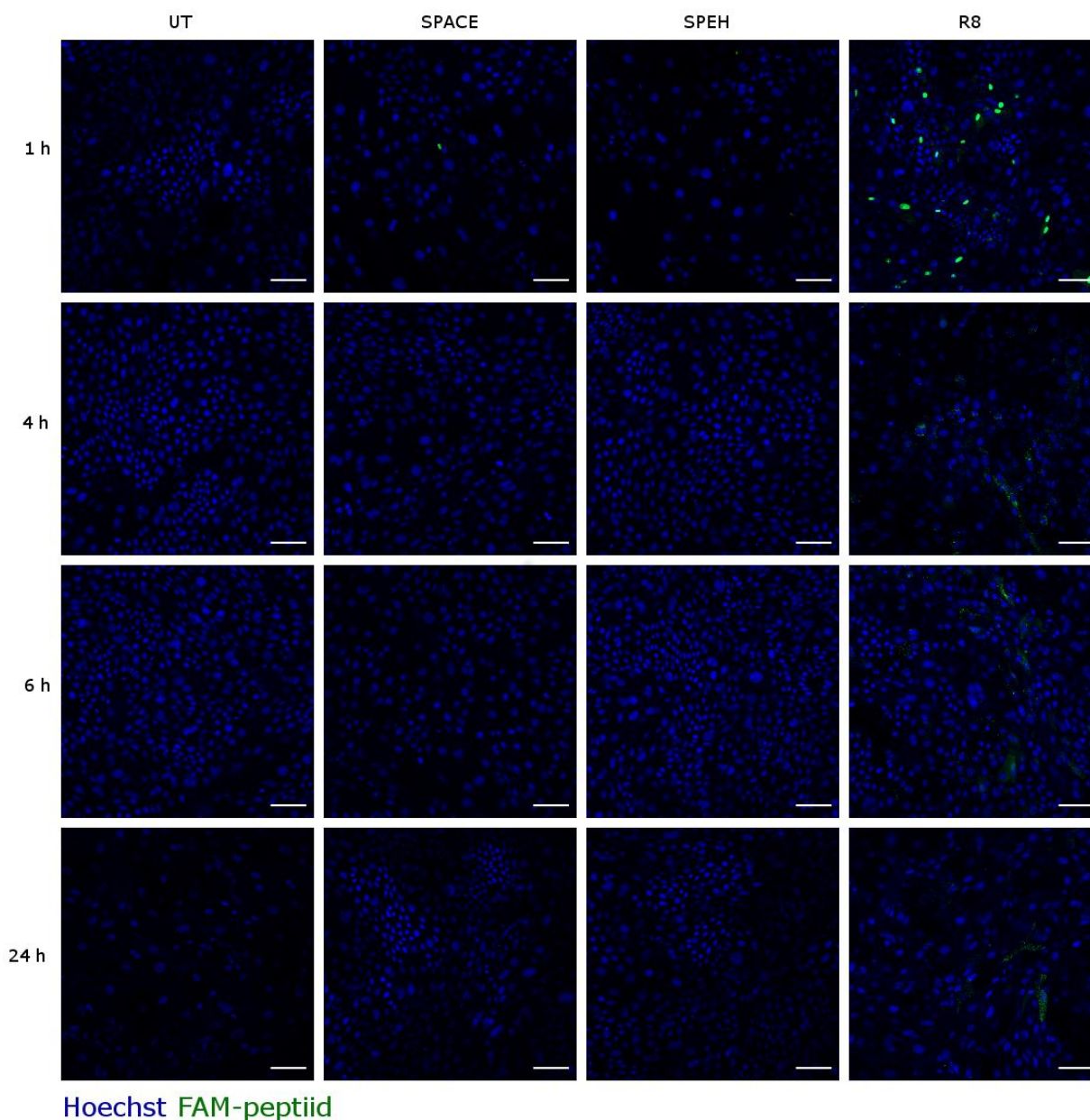
24 tunnise inkubatsiooni järel on kõikide peptiidide sisaldus rakkudes väiksem võrreldes lühema inkubatsiooniajaga saavutatud peptiidi sisenemise maksimumist. Kõige märgatavam on see efekt R8 puhul, kus fluorestsentsintensiivsus 24 tunnise inkubatsiooni korral peaaegu kolm korda madalam võrreldes 1 tunnise inkubatsiooniga. SPEH ja SPACE puhul on 24 tunnise inkubatsiooniajaga fluorestsentsintensiivsus võrreldav 1 tunnise inkubatsiooniga.



**Joonis 6.** Peptiidi sisenemine passaaž 4 keratinotsüütides. Rakke inkubeeriti 2  $\mu$ M FAM märgistatud peptiidi lahusega erinevatel ajapunktidel ja seejärel mõõdeti rakulüsaatide relatiivset fluorestsentsintensiivsust (RFU). Tulemused on esitatud suhtena mittetöödeldud rakkude suhtes. Variatiivsus on esitatud kolme bioloogilise replikaadi keskmise kaudu ning veariba kujutab standardviga.

Lisaks rakulüsaadi fluorestsentsintensiivsuse mõõtmisele iseloomustati peptiidi sisenemist keratinotsüütidesse, kasutades konfokaalmikroskoopiat, mille tulemused on näha joonisel 7. SPACE ja SPEH puhul on raku oleva peptiidi fluorestsentsi intensiivsus madalam kui R8 puhul. Pikematel ajapunktidel pole peptiidi võimalik SPACE ja SPEH proovides visualiseerida. See võib tuleneda sellest, et konfokaalmikroskoopia ei ole nii tundlik kui on fluorimeeter kuid ka fluorestsentsmärgise lagunemisest. Fotolt on selgelt võimalik eristada, et R8 keratinotsüütidesse sisenemise efektiivsus on suurem kui teiste töös kasutatud peptiidide puhul, mis läheb kokku ka joonisel 7 kujutatud tulemustega. 1-tunnise inkubatsiooni puhul lokaliseerub R8 rakutuumades, kuid pikema inkubatsiooni ajal on näha peptiidi tsütoplasmas. SPACE ja SPEH lokaliseerumise kohta rakkudes järeltõlgete teha ei saa.

Madalam fluoresentsintensiivsus pikemal ajapunktil või selle puudumine võib tuleneda peptiidi kogunemisest endosoomidesse, kus pikema aja vältel pH languse tõttu fluoresentsisignaal väheneb fluorofoori lagunemise tõttu (Arukuusk jt., 2013).



**Joonis 7.** Peptiidi sisenemine passaaž 4 keratinotsüütides. Rakke inkubeeriti 2  $\mu$ M FAM märgistatud peptiidi lahusega erinevatel ajapunktidel. Kasutati FAM märgisega peptiide ja raku tuumad värviti Hoechst'iga. Mõõtjoon vastab 100  $\mu$ m.

### 2.3.3 Rekonstrueeritud epidermise moodustumine

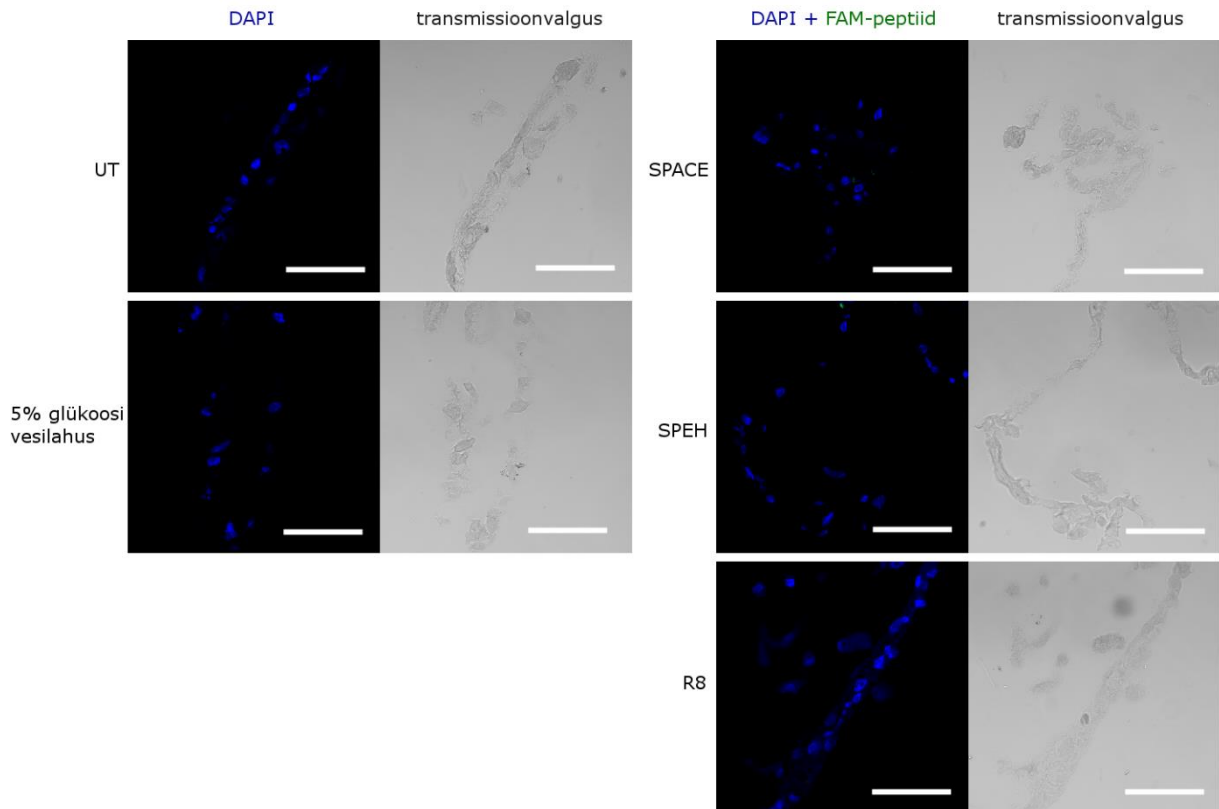
Rekonstrueeritud epidermise saamiseks kasvatati passaaž 4 inimese primaarsetest keratinotsüütidest punktis 2.2.4 välja toodud meetodi põhjal kultuur. Keratinotsüüte kasvatati kõigepealt täielikult söötmesse sukeldatult ja seejärel poolkuivas kultuuris. See imiteerib *in vivo*

naha pealmiste keratinotsüütide kihtide kokkupuutumist õhuga ja võimaldab 3D kultuuris sarvkihi laadse moodustise tekkimist. On näidatud, et õhuga kokkupuude on vajalik inimese keratinotsüütide terminaalseks diferentseerumiseks rekonstrueeritud epidermise kultuuris (Rosdy ja Clauss, 1990). Katseplaan nägi ette, et peale kultuuri valmimist töödeldi kasvatatud 3D kultuure FAM märgisega peptiidiga, et hinnata selle sisenemist. Peale töötlust peptiidiga tehti kultuurist külmlõigud, mis fikseeriti ja analüüsiti.

Fikseeritud külmlõikude mikroskoopilisel vaatlemisel ei olnud võimalik näha mitmekihilist rakukultuuri, kus keratinotsüüdid oleksid üksteisega kontaktis olnud ja moodustanud tervikliku kihi. Meie oletuste kohaselt oli probleemiks 3D kultuuri kasvatamise jaoks kasutatud membraani mehaanilis-füüsikalised omadused, kuna rekonstrueeritud epidermise kasvatamise ajal oli kultuuris visuaalselt näha membraani peal kasvavat rakukihti. Lõikamise käigus aga materjal purunes ning mikroskoopia jaoks kogutud materjalist soovitud mitmekihilist kultuuri visualiseerida ei õnnestunud. Mitmekihilise rakukultuuri lõhkumine võis tuleneda membraani mittesobimisest külmlõikude meetodiga, kuigi membraanide tootja instruksioonide kohaselt peaksid membraanid olema külmlõikude jaoks sobivad. Külmlõikamise käigus aga ilmnes, et membraani ja rakumassi osad rebenesid, hoolimata erinevatest proovitud krüotoomi temperatuuritingimustest. Maatriks võib külmunult olla liialt rabe või vastupidi, mitte pakkuda rakkudele külmunult piisavalt tuge, mistõttu lõikamisel läheb kasvatatud mitmekihiline rakukultuuri struktuur katki. Välistada võib fikseerimistehnika, kuna mitmed proovitud variandid (töötlemata rakukultuure fikseeriti  $-20^{\circ}\text{C}$  metanooliga, atsetooniga, kuumutamise ja fosfaatpuhverdatud 4% formaldehüüdi lahusega) andsid sama tulemuse. Lisaks eelnevale ei saanud mitmekihilise rakukultuuri saamise põhjuseks olla töötlus peptiidiga, kuna töö käigus ei saavutatud mitmekihilisust ka töötlemata 3D kultuuride puhul. Seega vajab antud töös kasutatud protokoll 3D rekonstrueeritud epidermise kasvatamiseks veel edasist arendamist ja täiustamist.

### **2.3.4 Peptiidi sisenemise visualiseerimine 3D epidermise ekvivalendis**

Nagu on näha joonisel 8, ei olnud võimalik kasutada 3D rekonstrueeritud epidermise mudelit hindamaks peptiidi sisenemist epidermise mudelis. Mitmekihiline struktuur ei säilinud ja peale fikseerimist jäid alusklaasile enamasti vaid otse rekonstrueeritud epidermise kasvatamiseks kasutatud membraaniga kontaktis olevad rakud. Seevastu on näha keratinotsüütide tuumad, mille põhjal võib järeldada, et membraani peal olid kasvavad keratinotsüüdid ikkagi elus. Antud tulemused viitavad sellele, et enne külmlõikude tegemist võis kasvatatud kultuur olla mitmekihiline, mis aga purunes punktis 2.3.3 toodud võimalikele põhjustele.

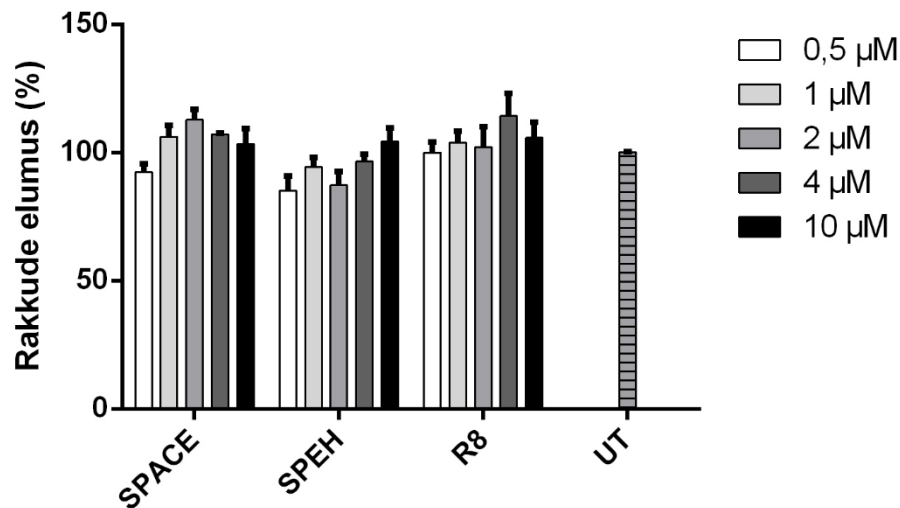


**Joonis 8.** Konfokaalmikroskoobiga tehtud fotod 3D rekonstrueeritud epidermise mudelist peale 24-tunnist töötlust 2  $\mu\text{M}$  peptiidilahusega 5% glükoosi vesilahuses. Kontrolliks oli töötlemata (UT, *untreated*) rekonstrueeritud epidermis ja 5% glükoosi vesilahusega. Rakutuomad on värvitud DAPI-ga, peptiidid on FAM märgisega. Mõõtjoon kujutab 100  $\mu\text{m}$ .

### 2.3.5 Rakkude elumuse määramine

Tulevaste transdermaalsete ja dermaalsete transpordi võimendajate leidmiseks on väga oluline nende vähene toksilisus rakkudele *in vitro*. Kui uuritavat peptiidi iseloomustab juba suur toksilisus rakukultuuris, ei ole seda võimalik kasutada *in vivo* katsetes.

Peptiidide toksilisuse hindamiseks passadž 4 keratinotsüütides kasutati MTS analüüsi, mis põhineb rakkude metaboolse aktiivsuse hindamisel. Toksilisust hinnati peptiidi kontsentratsioonidel 0,5-10  $\mu\text{M}$ . Rakke inkubeeriti peptiidilahjendustega 24 tundi ja MTS analüüs teostati kohe peale peptiiditöötlust. Keratinotsüütide elumus on kujutatud joonisel 9. Ükski kasutatud nahka sisenevates peptiidest ei mõjutanud keratinotsüütide elumust oluliselt, isegi kõige kõrgematel peptiidi kontsentratsioonidel. Saadud tulemused on kooskõlas antud peptiidide kohta varasemalt leitud tulemustega, mis on näidanud, et tegemist on vähetoksiliste peptiididega.



**Joonis 9.** Passaž 4 keratinotsüütide elumus peale 24 tundi inkubatsiooni erinevate peptiididega 2D keratinotsüütide söötmes, positiivse kontrollina töödeldi rakke 0,01% Triton X-100 lahusega. Elumuse määramiseks on kasutatud MTS analüüsi, teostati 4 mõõtmist bioloogilistest replikaatidest. Saadud tulemused on normaliseeritud töötlemata rakkude (100%) ja positiivse kontrolli (0%) suhtes, veariba kujutab standardviga.

SPACE peptiidi puhul on näidatud, et see ei oma olulist toksilisust inimese keratinotsüütidele ka kontsentratsioonil kuni 8,3 mM (Chen jt., 2014). Lisaks sellele on SPEH puhul varasemalt näidatud, et see ei ole rakkudele oluliselt toksiline kontsentratsioonidel kuni 1,5 mM (Gennari jt., 2016). Seehulgas ei ole ka polüarginiini puhul iseloomustatud toksilisust hiirtele peptiidi kutaansel manustamisel (Rothbard jt., 2000).

Lisaks eelevalle on SPACE puhul näidatud, et epidermissesse siseneb ainult väike fraktsioon (Chen jt., 2015). Võib eeldada, et ka teiste peptiidide puhul ei ole kogu peptiid võimeline korruga epidermissesse sisenema. Seetõttu võib oletada, et rekonstrueeritud epidermise kultuuris peaks töös kasutatud peptiidide toksilisus olema veel väiksem kui MTS hinnangu puhul, mis kinnitab eelnevat väidet, et 3D rekonstrueeritud epidermise mudeli mitte töötamise põhjuseks ei saanud olla peptiidide toksilisus.

Töö käigus sünteesitud peptiidid SPACE ja SPEH olid koos R8-ga võimelised rakkudesse sisenema 2D keratinotsüütide rakukultuuris. Lisaks sellele ei omanud need 2D rakukultuuris keratinotsüütide elumusele olulist efekti ja tegemist on antud töös kasutatud kontsentratsioonil rakkudele mittetoksiliste peptiididega. Antud peptiidide võime siseneda keratinotsüütidesse ja nende vähene efekt rakkude elumusele on varasemalt tõestatud ja antud bakalaureusetöö tulemused kinnitavad neid andmeid.

Siiski ei pruugi *in vitro* toksilisuse hinnangud olla piisavad andmaks infot tegeliku toksilisuse kohta *in vivo* (Kurrikoff jt., 2016). Sellepärast on vaja lisaks lihtsalt 2D rakukultuuris toksilisuse hindamiseks jälgida ka peptiidide efekti 3D kultuuris. Peptiidide mõju hindamine rekonstrueeritud epidermise mudelis oleks võimalik lisasamm välistamaks edaspidistes katsetes peptiide, mis võivad omada *in vivo* toksilisust nahakultuuris.

Töös kasutatud peptiidide epidermise läbimise efektiivsust ei olnud võimalik hinnata 3D rekonstrueeritud epidermise rakukultuuris ja seega vajab antud mudeli kasvatamiseks väljatöötatud protokoll veel optimeerimist. Üheks võimaluseks oleks teise tootja membraanide proovimine, kuna antud töös kasutatud membraanid ei pruugi olla sobivad külmlõikude tegemiseks. Lisaks sellele võib proovida epidermise ekvivalenti kasvatada väiksema passaažinumbriga keratinotsüütidest, kuna primaarrakkude omadused võivad muutuda märgatavalt juba paseerimise alguses (Januszyk jt., 2015). Mida madalam on passaažinumber, seda sarnasemad on rakud *in vivo* koes leiduvatele rakkudele, ja seda suurem on võimalus, et need on säilitanud vajalikud füsioloogilised ja fenotüübilised omadused. Rakkude paremaks kinnitumiseks membraanile võib kasutada selle katmiseks ka erinevaid valke või inaktiveeritud MEF-e, mille peale hiljem keratinotsüüdid külvata.

Kõik töös kasutatud peptiidid olid võimelised keratinotsüütidesse sisenema ning järgnevalt oleks vaja iseloomustada nende efektiivsus rakku lastmolekulide transportimisel. Oluline oleks antud peptiide hinnata ka 3D rekonstrueeritud epidermise kultuuris, kuna see võimaldaks saada rohkem infot nende rakku sisenemise ja lastmolekulide transpordi efektiivsuse kohta ilma täiendavaid loomkatseid vajamata. 2D ja 3D kultuuri ühendamine oleks heaks sõelmeetodiks võimalike nahka sisenevate peptiidide tuvastamiseks enne *in vivo* katseid.

## **Kokkuvõte**

Efektiivsete nahakaudse transpordi võimendajate leidmine oleks oluline suurendamaks kutaanse ravimi manustamisviisi kasutamispotentsiaali. Selle jaoks on võimalik kasutada nahka sisenevaid peptiide, mis ei põhjusta nahale ärritust ning mis ei ole toksilised.

Antud töö eesmärgiks oli sünteesida kaks peptiidi, SPACE ja SPEH, mille järjestused pärinesid varasemalt publitseeritud artiklitest ning mille puhul on näitatud, et tegemist on nahka sisenevate peptiididega. Lisaks sellele hinnati katseliselt eelmainitud peptiidide ja R8 sisenemist 2D inimese primaarsete keratinotsüütide rakukultuuris ja võrreldi antud peptiidide efekti rakkude elumusele kasutades kontrollina töötlemata rakke. Lisaks eelmainitule sooviti iseloomustada antud peptiidide sisenemist inimese 3D rekonstrueeritud mudeliks. Selle jaoks alustati vastava 3D rakukultuuri kasvatamiseks protokolliga väljatöötamisega.

Kõik töös kasutatud peptiidid olid võimelised sisenema 2D rakukultuuris keratinotsüütidesse. Kõige efektiivsemalt tegi seda R8 ning SPACE ja SPEH olid rakku võimelised sisenema väiksema efektiivsusega kui R8, kuid nende sisenemise efektiivsus oli omavahel võrreldav. Töö käigus leiti, et antud peptiidid ei omanud olulist toksilist efekti keratinotsüütidele 2D rakukultuuris, mis on vastavuses juba varasemalt publitseeritud tulemustega.

Peptiidide epidermise läbimise efektiivsust ei olnud võimalik hinnata 3D rekonstrueeritud epidermise kultuuris, kuna mitmekihilist kultuuri ei olnud võimalik mikroskopeerimisel detekteerida. Seetõttu on vajalik rekonstrueeritud epidermise kasvatamiseks kasutatud protokolliga veel optimeerida. Peptiidide testimine mitmekihilises kultuuris annaks täiendavat infot nende epidermisesse sisenemise edukuse ja võimaliku toksilisuse kohta.

## **Skin penetrating peptides in 2D and 3D cell culture**

Anett Puskar

### **Summary**

In order to improve cutaneous drug delivery it is important to find efficient and safe dermal transport enhancers. One such possibility is the usage of skin penetrating peptides, which are capable of enhancing drug delivery into the skin without causing irritation nor toxicity.

One of the aims of this bachelor's work was to synthesise two already published and recognised skin penetrating peptides, SPACE and SPEH. In addition, the cell penetrating efficacy and cytotoxicity of aforementioned peptides and R8 was assessed in 2D human primary keratinocyte culture. Furthermore, one of the aims was to assess the penetration effectiveness of the peptides used in this work in a 3D reconstructed epidermis model. In order to do that, developing a protocol to grow 3D reconstructed epidermis was begun.

All of the peptides used in this bachelor's thesis were able to penetrate into keratinocytes in 2D cell culture. The most effective of all peptides was R8 and while SPACE and SPEH were not as effective but their cell penetration efficacy was comparable. In addition, it was shown that all of the peptides lacked any major toxic effect on the cells in 2D cell culture, which is in accordance with previously published results about the used peptides.

It was not possible to assess the penetration efficacy of the peptides in the 3D reconstructed epidermis model as we were not successful in obtaining a multilayer culture for visualisation. Thus, it is necessary to optimise the protocol used as it is important to test the peptides in a 3D reconstructed epidermis model to obtain more information about their epidermis penetration efficacy and possible toxicity.

## **Tänuõnad**

Soovin tänada oma juhendajat Kaido Kurrikoffi, kes süstis minusse positiivsust alati, kui ma olin oma katsetega hädas, suunava, toetava ning väga meisterliku juhendamise eest. Lisaks tänan Piret Arukuuske ja Ly Pärnastet, kes aitasid mind kirjutamise protsessis ja igapäevase laboritööga. Soovin tänada professor Ülo Langelit edasiviivate nõuannete eest. Lisaks tänan ka kõiki praeguseid ja endiseid laborikaaslasi, eriti Siim Uhtjärve, kes olid alati valmis nõu ja jõuga mind aitama.

## **Kasutatud kirjandus**

Alitalo, K., Kuismanen, E., Myllylä, R., Kiistala, U., Asko-Seljavaara, S., and Vaheri, A. (1982). Extracellular matrix proteins of human epidermal keratinocytes and feeder 3T3 cells. *J. Cell Biol.* 94, 497–505.

Alkilani, A.Z., McCrudden, M.T.C., and Donnelly, R.F. (2015). Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the Stratum Corneum. *Pharmaceutics* 7, 438–470.

Arukuusk, P., Pärnaste, L., Margus, H., Eriksson, N.K.J., Vasconcelos, L., Padari, K., Pooga, M., and Langel, Ü. (2013). Differential Endosomal Pathways for Radically Modified Peptide Vectors. *Bioconjugate Chem.* 24, 1721–1732.

Barreca, A., Luca, M. de, Monte, P.D., Bondanza, S., Damonte, G., Cariola, G., Marco, E. di, Giordano, G., Cancedda, R., and Minuto, F. (1992). In vitro paracrine regulation of human keratinocyte growth by fibroblast-derived insulin-like growth factors. *J. Cell. Physiol.* 151, 262–268.

Barry, B.W. (2001). Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 14, 101–114.

Birch, D., Christensen, M.V., Staerk, D., Franzyk, H., and Nielsen, H.M. (2017). Fluorophore labeling of a cell-penetrating peptide induces differential effects on its cellular distribution and affects cell viability. *Biochim. Biophys. Acta* 1859, 2483–2494.

Boelsma, E., Verhoeven, M.C.H., and Ponec, M. (1999). Reconstruction of a Human Skin Equivalent Using a Spontaneously Transformed Keratinocyte Cell Line (HaCaT). *J. Invest. Dermatol.* 112, 489–498.

Bouwstra, J.A., Honeywell-Nguyen, P.L., Gooris, G.S., and Ponec, M. (2003). Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog. Lipid Res.* 42, 1–36.

Brajša, K., Trzun, M., Zlatar, I., and Jelić, D. (2016). Three-dimensional cell cultures as a new tool in drug discovery. *Period. Biol.* 118, 59–65.

Breslin, S., and O'Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov. Today* 18, 240–249.

Brown, M.B., Martin, G.P., Jones, S.A., and Akomeah, F.K. (2006). Dermal and transdermal

drug delivery systems: current and future prospects. *Drug Deliv.* 13, 175–187.

Chen, M., Gupta, V., Anselmo, A.C., Muraski, J.A., and Mitragotri, S. (2014). Topical delivery of hyaluronic acid into skin using SPACE-peptide carriers. *J. Control. Release* 173, 67–74.

Chen, M., Zakrewsky, M., Gupta, V., Anselmo, A.C., Slee, D.H., Muraski, J.A., and Mitragotri, S. (2014). Topical delivery of siRNA into skin using SPACE-peptide carriers. *J. Control. Release* 179, 33–41.

Chen, M., Kumar, S., Anselmo, A.C., Gupta, V., Slee, D.H., Muraski, J.A., and Mitragotri, S. (2015). Topical delivery of Cyclosporine A into the skin using SPACE-peptide. *J. Control. Release* 199, 190–197.

Conner, D.A. (2000). Mouse Embryo Fibroblast (MEF) Feeder Cell Preparation. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 51, 23.2.1-23.2.7.

Desai, P., Patlolla, R.R., and Singh, M. (2010). Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. *Mol. Membr. Biol.* 27, 247–259.

Gennari, C.G.M., Franzè, S., Pellegrino, S., Corsini, E., Vistoli, G., Montanari, L., Minghetti, P., and Cilurzo, F. (2016). Skin Penetrating Peptide as a Tool to Enhance the Permeation of Heparin through Human Epidermis. *Biomacromolecules* 17, 46–55.

Hsu, T., and Mitragotri, S. (2011). Delivery of siRNA and other macromolecules into skin and cells using a peptide enhancer. *PNAS* 108, 15816–15821.

Huang, X., Tanojo, H., Lenn, J., Deng, C.H., and Krochmal, L. (2005). A novel foam vehicle for delivery of topical corticosteroids. *J. Am. Acad. Dermatol.* 53, S26-38.

Hwa, C., Bauer, E.A., and Cohen, D.E. (2011). Skin biology. *Dermatol. Ther.* 24, 464–470.

Januszyk, M., Rennert, R.C., Sorkin, M., Maan, Z.N., Wong, L.K., Whittam, A.J., Whitmore, A., Duscher, D., and Gurtner, G.C. (2015). Evaluating the Effect of Cell Culture on Gene Expression in Primary Tissue Samples Using Microfluidic-Based Single Cell Transcriptional Analysis. *Microarrays* 4, 540–550.

Jennings, P. (2015). “The future of in vitro toxicology.” *Toxicology in Vitro* 29, 1217–1221.

Kaiser, E., Colecott, R.L., Bossinger, C.D., and Cook, P.I. (1970). Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* 34, 595–

598.

Karande, P., Jain, A., Ergun, K., Kispersky, V., and Mitragotri, S. (2005). Design principles of chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 4688–4693.

Kim, W.-J., Koo, J.-H., Cho, H.-J., ... Choi, J.-M. (2018). Protein tyrosine phosphatase conjugated with a novel transdermal delivery peptide, astrotactin 1–derived peptide recombinant protein tyrosine phosphatase (AP-rPTP), alleviates both atopic dermatitis–like and psoriasis-like dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 137–151.

Knorr, F., Lademann, J., Patzelt, A., Sterry, W., Blume-Peytavi, U., and Vogt, A. (2009). Follicular transport route--research progress and future perspectives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71, 173–180.

Kretsos, K., and Kasting, G.B. (2007). A geometrical model of dermal capillary clearance. *Math. Biosci.* 208, 430–453.

Kumar, S., Zakrewsky, M., Chen, M., Menegatti, S., Muraski, J.A., and Mitragotri, S. (2015). Peptides as skin penetration enhancers: mechanisms of action. *J. Control. Release* 199, 168–178.

Kurrikoff, K., Gestin, M., and Langel, Ü. (2016). Recent in vivo advances in cell-penetrating peptide-assisted drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 13, 373–387.

Lane, M.E. (2013). Skin penetration enhancers. *Int. J. Pharm.* 447, 12–21.

Langel, Ü. (2015). *Cell-penetrating peptides: Methods and Protocols*. 2nd ed., Humana Press, New York.

Menegatti, S., Zakrewsky, M., Kumar, S., De Oliveira, J. S., Muraski, J. A., and Mitragotri, S. (2016). De Novo Design of Skin-Penetrating Peptides for Enhanced Transdermal Delivery of Peptide Drugs. *Adv. Healthc. Mater.* 5, 602–609.

Merrifield, R.B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149–2154.

Münch, S., Wohlrab, J., and Neubert, R.H.H. (2017). Dermal and transdermal delivery of pharmaceutically relevant macromolecules. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 119, 235–242.

Orenberg, E.K., and Wilkinson, D.I. (1982). Effect of  $\beta$ -adrenergic receptor blockade or

refractoriness induced by isoproterenol on growth of keratinocytes in vitro. *Br. J. Dermatol.* 107, 119–124.

Page, K., Hood, C.A., Patel, H., Fuentes, G., Menakuru, M., and Park, J.H. (2007). Fast Fmoc synthesis of hAmylin1-37 with pseudoproline assisted on-resin disulfide formation. *J. Pept. Sci.* 13, 833–838.

Pampaloni, F., Reynaud, E.G., and Stelzer, E.H.K. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 839–845.

Ponec, M., Gibbs, S., Weerheim, A., Kempenaar, J., Mulder, A., and Mommaas, A.M. (1997). Epidermal growth factor and temperature regulate keratinocyte differentiation. *Arch. Dermatol. Res.* 289, 317–326.

Ponec, M., Weerheim, A., Kempenaar, J., Mulder, A., Gooris, G.S., Bouwstra, J., and Mieke Mommaas, A. (1997). The Formation of Competent Barrier Lipids in Reconstructed Human Epidermis Requires the Presence of Vitamin C. *J. Investig. Dermatol.* 109, 348–355.

Ponec, M., Gibbs, S., Pilgram, G., Boelsma, E., Koerten, H., Bouwstra, J., and Mommaas, M. (2001). Barrier Function in Reconstructed Epidermis and Its Resemblance to Native Human Skin. *SPP* 14, 63–71.

Pouillot, A., Dayan, N., Polla, A.S., Polla, L.L., and Polla, B.S. (2008). The stratum corneum: a double paradox. *J. Cosmet. Dermatol.* 7, 143–148.

Poumay, Y., and Coquette, A. (2007). Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research. *Arch. Dermatol. Res.* 298, 361–369.

Poumay, Y., Dupont, F., Marcoux, S., Leclercq-Smekens, M., Hérin, M., and Coquette, A. (2004). A simple reconstructed human epidermis: Preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Arch. Dermatol. Res.* 296, 203–211.

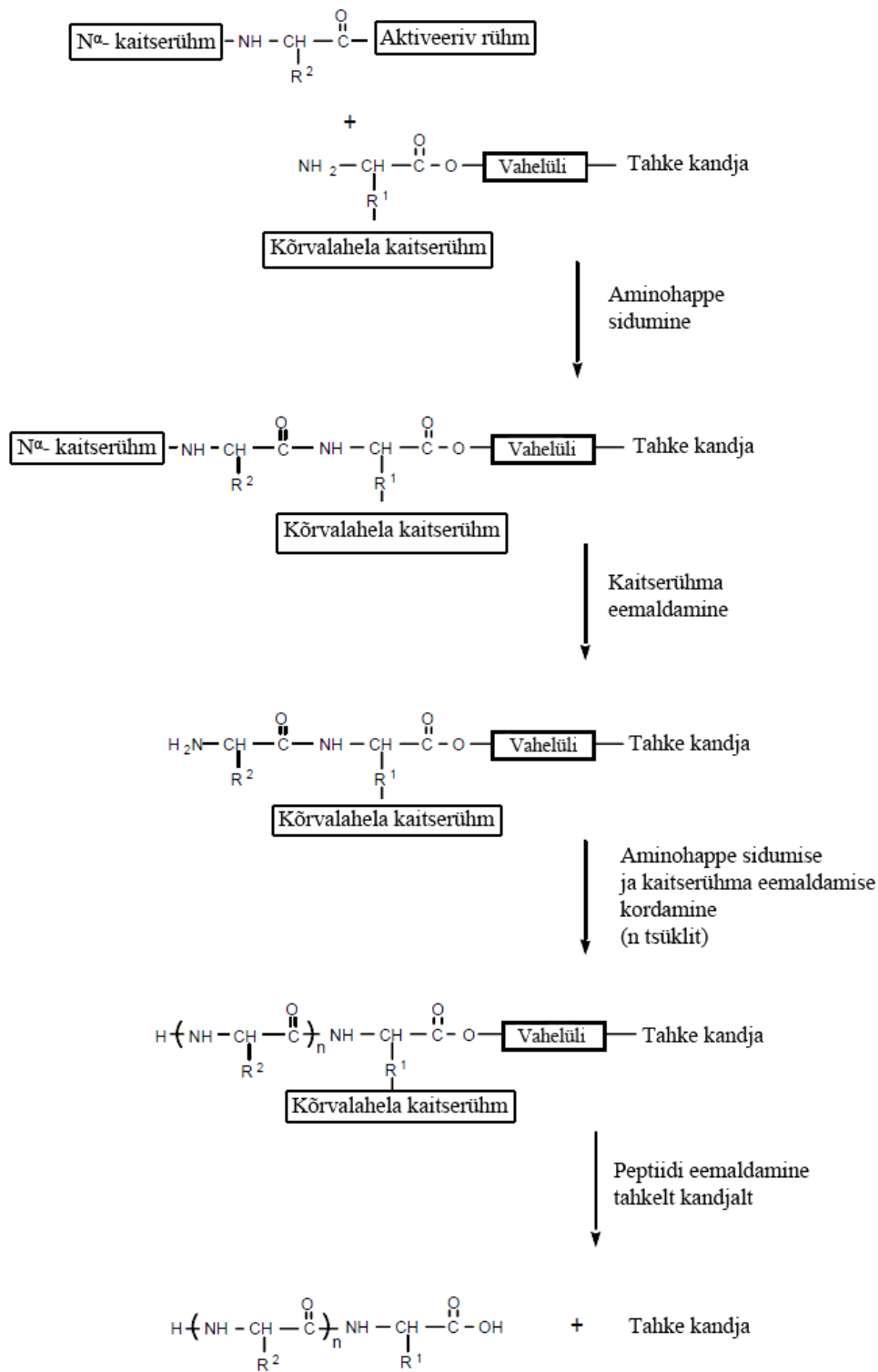
Prausnitz, M.R., and Langer, R. (2008). Transdermal drug delivery. *Nat. Biotechnol.* 26, 1261–1268.

Robert, M., Dusser, I., Muriel, M.P., Noël-Hudson, M.S., Aubery, M., and Wepierre, J. (1997). Barrier function of reconstructed epidermis at the air-liquid interface: influence of dermal cells and extracellular components. *Skin Pharmacol.* 10, 247–260.

- Rosdy, M., and Clauss, L.-C. (1990). Terminal Epidermal Differentiation of Human Keratinocytes Grown in Chemically Defined Medium on Inert Filter Substrates at the Air-Liquid Interface. *J. Investig. Dermatol.* 95, 409–414.
- Rothbard, J.B., Garlington, S., Lin, Q., Kirschberg, T., Kreider, E., McGrane, P.L., Wender, P.A., and Khavari, P.A. (2000). Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nat. Med.* 6, 1253–1257.
- Roxin, Á., and Zheng, G. (2012). Flexible or fixed: a comparative review of linear and cyclic cancer-targeting peptides. *Future Med. Chem.* 4, 1601–1618.
- Smeden, J. van, and Bouwstra, J.A. (2016). Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. *Skin Barrier Function* 49, 8–26.
- Szybalski, W., and Iyer, V.N. (1964). Crosslinking of DNA by enzymatically or chemically activated mitomycins and porfiromycins, bifunctionally “alkylating” antibiotics. *Fed. Proc.* 23, 946–957.
- Wang, X.-Y., Wang, Q., Huang, X.-Y., Wang, T. and Yu, X.-Q. (2006). Synthesis of small cyclic peptides containing disulfide bonds. *Arkivoc* 11, 148-154.
- Watkinson, A.C., Kearney, M.-C., Quinn, H.L., Courtenay, A.J., and Donnelly, R.F. (2016). Future of the transdermal drug delivery market – have we barely touched the surface? *Expert Opin. Drug Deliv.* 13, 523–532.
- Wiedersberg, S., and Guy, R.H. (2014). Transdermal drug delivery: 30+ years of war and still fighting! *J. Control. Release* 190, 150–156.
- Yang, R., Wei, T., Goldberg, H., Wang, W., Cullion, K., and Kohane, D.S. (2017). Getting Drugs Across Biological Barriers. *Adv. Mater.* 29, 1606596.
- Yano, T., Nakagawa, A., Tsuji, M., and Noda, K. (1986). Skin permeability of various non-steroidal anti-inflammatory drugs in man. *Life Sci.* 39, 1043–1050.

## Lisad

### Lisa 1. Ülevaade tahke faasi peptiidsünteesist



## **Lihtlitsents**

Mina, Anett Puskar,

(sünnikuupäev 07.09.1995)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Nahka sisenevad peptiidid 2D ja 3D rakukultuuris“, mille juhendaja on Kaido Kurrikoff, PhD,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **12.01.2021** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2018