

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

Ave Auser

**Hüpotermia mõju antioksidatiivse süsteemi induktsioonile**

Magistritöö (40 EAP)

Biomeditsiin

Juhendajad MSc Kattri-Liis Eskla

PhD Hendrik Luuk

Kaasjuhendaja PhD Raivo Raid

TARTU 2017

## INFOLEHT

### Hüpotermia mõju antioksidatiivse süsteemi induktsioonile

Kliinikus on kehatemperatuuri suunatud juhtimine kasutusel eelkõige kesknärvisüsteemi hüpoksilis-isheemilise kahjustuse leevendamiseks. Praktika näitab, et hüpotermial on võime kaitsta kudesid hapnikupuuduse eest, mis kaasneb erinevate südame ja veresoonkonna haigustega. See-eest on molekulaarsed mehhanismid hüpotermia protektiivse efekti taga ebaselged. Käesolev töö näitab, et hüpotermial on võime mõjutada antioksidatiivset süsteemi kolmel tasandil. Esimesel tasandil aktiveerib hüpotermia transkriptsioonifaktorit NRF2, mis omakorda tõstab antioksidatiivses süsteemis oluliste geenide ekspressiooni. Lisaks suurendab hüpotermia ka glutatiooni taset.

**Märksõnad:** terapeutiline hüpotermia, isheemia-reperfusioon kahjustus, hüpoksia, oksüdatiivne stress, antioksidatiivne süsteem

**CERCS kood:** B470 Füsioloogia

### The effects of hypothermia on the induction of the antioxidant system

#### Abstract

Lowering body temperature has been used to alleviate hypoxic-ischemic damage caused by stroke or cardiac arrest. Hypothermia is considered as one of the most promising therapeutic modalities for the treatment of ischemic stroke, however, the molecular mechanisms behind its protective effects are yet to be found. Current study presents evidence that hypothermia is capable of affecting antioxidant system on three levels: 1) by activating transcription factor NRF2, 2) increasing the expression of genes important in antioxidant system and 3) elevating the levels of antioxidant glutathione.

**Keywords:** therapeutic hypothermia, ischemia-reperfusion injury, hypoxia, oxidative stress, antioxidant system

**CERCS code:** B470 Physiology

## SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	7
1.1. Isheemia-reperfusioon ja hüpothermia .....	7
1.2. Oksüdatiivne stress ja antioksidantide mõju.....	8
1.3. NRF2-ARE signaalirada .....	10
1.4. Glutatiooni süsteem .....	12
1.5. Tiredoksiini süsteem .....	13
1.6. Sulfiredoksiini süsteem.....	14
1.7. NQO1.....	15
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	17
2.1. Töö eesmärgid .....	17
2.2. Materjal ja meetodika.....	17
2.2.1. Rakkude kasvatamine.....	17
2.2.2. Rakkude inkubeerimine.....	17
2.2.3. Valgulüsaadi valmistamine .....	18
2.2.4. Valgu kontsentratsiooni määramine.....	18
2.2.5. Firefly lutsiferaasi reporter katsed.....	19
2.2.6. RNA eraldamine ja cDNA süntees.....	19
2.2.7. Kvantitatiivne reaalaaja qPCR.....	20
2.2.8. Glutatiooni määramine .....	21
2.3. Tulemused ja arutelu .....	23
KOKKUVÕTE .....	29
SUMMARY .....	30
TÄNUSÕNAD .....	32
KIRJANDUSE LOETELU.....	33
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	39
LIHTLITSENTS.....	40

## KASUTATUD LÜHENDID

ARE – antioksidatiivse vastuse element (*antioxidant response element*)

BCA – bitsiinoniniinhape (*bicinchoninic acid*)

CAT – katalaas (*catalase*)

CIRBP – külmatundlik RNA-d siduv valk (*cold-inducible RNA-binding protein*)

CUL3 – cul3-põhinev E3 ligaas (*cullin 3-based E3 ligase*)

DMSO – dimetüülsulfoksiid (*dimethyl sulfoxide*)

DTNB – 5,5'-ditio-bis-2-nitrobensoehape ehk Ellmani reagent (*5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)*)

FTH – ferritiini raske ahel (*ferritin heavy chain*)

FTL – ferritiini kerge ahel (*ferritin light chain*)

G6PD – glükoos-6-fosfaadi dehüdrogenaas (*glucose-6-phosphate dehydrogenase*)

GCL – glutamaat-tsüsteiin ligaas (*glutamate-cysteine ligase*)

GCLC – GCL katalüütiline subühik (*glutamate-cysteine ligase catalytic subunit*)

GCLM – GCL kompleksi modifitseeriv subühik (*glutamate-cysteine ligase modifier subunit*)

GPx/ GSH-PX – glutatiooni peroksidaas (*glutathione peroxidase*)

GS – glutatiooni süntetaas (*glutathione synthetase*)

GSH – glutatiooni redutseeritud (aktiivne) vorm (*glutathione*)

GSR – glutatiooni reduktaas (*glutathione reductase*)

GSSG – glutatiooni disulfiid, oksüdeeritud (inaktiivne) GSH vorm (*glutathione disulfide*)

HeLa – inimese emakakaela kasvaja rakuliin

HepG2-ARE – inimese hepatotsellulaarse kartsinoomi rakuliin, mis ekspresseerib ARE saiti lutsiferaasi geeni ees

HMOX1 – heemi oksügenaas (*heme oxygenase 1*)

HPRT – hüpoksantiin fosforibosüül-transferaas (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase*)

IDH1 – isotsitraadi dehüdrogenaas (*isocitrate dehydrogenase 1*)

KEAP1 – *Kelch*-taoline ECH-ga seotud valk 1 (*Kelch Like ECH Associated Protein 1*)

KNS – kesknärvisüsteem

ME1 – malaadi ensüüm 1 (*malic enzyme 1*)

NQO1 – NAD(P)H kinooni oksidoreduktaas (*NAD(P)H quinone oxidoreductase 1*)

NRF2/ NFE2L2 – (*Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2*)

PGD – fosfoglütseraadi dehüdrogenaas (*phosphoglycerate dehydrogenase*)

PRDX – peroksiredoksiin (*peroxiredoxin*)  
ROS – reaktiivsed hapnikuühendid (*reactive oxygen species*)  
SOD – superoksiid dismutaas (*superoxide dismutase*)  
Srx – sulfiredoksiin (*sulfiredoxin*)  
SRXN1 – sulfiredoksiin-1 (*sulfiredoxin-1*)  
tBHQ – tertsaarne butüülhüdrokinoon (*tert-Butylhydroquinone*)  
TNB – 5-tio-2-nitrobensoehape (*2-nitro-5-thiobenzoic acid*)  
Trx/ TXN – tioredoksiin (*thioredoxin*)  
TRXR1/ TXNRD1 – tioredoksiini reduktaas (*thioredoxin reductase 1*)  
XCT – tsüsteiin/glutamaat transporter (*cystine/glutamate transporter*)

## SISSEJUHATUS

Kehatemperatuuri langetamine kaitseb organismi hüpoksilis-isheemilise seisundi korral, mida võib põhjustada ajukahjustus (Barone jt., 1997; Colbourne jt., 1997; Ginsberg jt., 1992; Maher ja Hachinski, 1993), südame seiskumine (Bernard jt., 2002; Gluckman jt., 2005; Shankaran jt., 2005; The Hypothermia ..., 2002) ja hüpoksilis-isheemiline entsefalopaatia vastsündinul (Azzopardi jt., 2014; Wagner jt., 1999). Uuringud nii loomudelites, kui ka patsientidel on näidanud, et mõni tund pärast rasket isheemiat või vereringe seiskumist algatatud mõõdukas hüpotermia vähendab neuronite surma ja parandab tegevusvõime taastumist (Bernard jt., 2002; Kawai jt., 2000; Miyazawa jt., 2003; Yanamoto jt., 2001). Samas ei paku hüpotermia kaitset kõigile patsientidele. Kui südame seiskumise (Dell'anna jt., 2014; Holzer jt., 2005) ja neonataalse hüpoksia (Silveira ja Procianoy, 2015) korral on hüpotermial võime kaitsa kudet isheemilise kahjustuse vastu, siis südameinfarkti (O'Neill ja Dixon, 2004; O'Neill jt., 2005; Tissier jt., 2010) korral on näidanud protektiivset toimet ainult üksikud kliinilised uuringud. Vähemalt osaliselt on kliiniliste uuringute negatiivsete tulemuste põhjuseks puudulikud teadmised hüpotermia toimemehhanismidest. Vaatamata sellele, et terapeutilist hüpotermiat on laborites laiaulatuslikult uuritud, keskendub enamik töid selle efektiivsuse ja rakendamise uurimisele loomudelites. Hetkel käimasolevad kliinilised uuringud üritavad välja selgitada, kuidas saada hüpotermiast maksimaalset kasu. Hüpotermial on küll võime vähendada hapniku tarbimist (Gupta jt., 2002) ning metabolismi (Yenari jt., 2004), kuid isheemia-reperfusiooni kahjustuse ravi seisukohalt on oluline mõista hüpotermia terapeutilise toime eest vasutatavaid molekulaarseid mehhanisme. See aitaks luua ravimeid, mille sihtmärgiks on terapeutiliselt olulised signaalirajad ning mis võimaldavad vältida temperatuuri langetamisega seotud kõrvaltoimeid.

Magistritöö eesmärk oli välja selgitada, mil määral suurendab hüpotermia rakusisest antioksidatiivset potentsiaali, millele viitab hiljutine töö (Ilmjärv jt., 2014). Selleks eksponeerisime rakke hüpotermiale (32 °C) ja mõõtsime biokeemiliste meetoditega glutatiooni taset, NRF2 raja aktivatsiooni kasutades lutsiferaasi reportersüsteemi ning sellest allavoolu jäävate antioksidatiivses süsteemis oluliste geenide ekspressiooni. Katsed viidi läbi Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi füsioloogia osakonnas.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Isheemia-reperfusioon ja hüpotermia

Kehatemperatuuri langetamist ravi eesmärgil kasutasid juba iidset egiptlased, kreeklased ja roomlased (Polderman, 2004). Esimene teaduslik artikkel sel teemal avaldati 1945. aastal, kui hüpotermiat kasutati raske ajutrauma ravis (Fay, 1945). Uuringud nii katseloomade kui patsientidega näitavad, et paar tundi peale raskekujulist isheemiat või vereringe seiskumist rakendatud mõõdukas hüpotermia vähendab efektiivselt sellele järgnevat närvirakkude surma ja võimaldab tegevusvõime kiiremat taastumist (Bernard jt., 2002; Kawai jt., 2000; Miyazawa jt., 2003; Yanamoto jt., 2001).

Insult on maailmas sageduselt teine surma põhjustaja ning suurim invaliidsuse tekitaja<sup>1</sup>. Ligikaudu 90% insultidest on isheemilised. Isheemiline insult tekib ajuveresoone sulgumise tagajärjel, mille tulemusena verevarustus selles piirkonnas väheneb. Suur hapniku ja glükoosi nõudlus muudab aju tundlikuks hüpoksilis-isheemilisele kahjustusele, kuna verevarustusega väheneb vajalike toitainete ja hapniku kättesaadavus. Aju glükoosivarud ja seetõttu ka adenosiintrifosfaadi (ATP) varud ammenduvad kolm minutit pärast isheemiat (Beauchamp ja Bryan, 1998).

Peaaju isheemia korral on elektronide liikumine hapnikule häiritud, kuna seda on vähe, mistõttu mitokondri hingamisahela kompleksid III ja IV ei pumpa enam prootoneid (Chen jt., 2003). Verevoolu taastamine isheemilises ajus on hädavajalik, et taastada elektronide liikumine hapnikule ning ATP produktsioon. Samas tekib reperfusiooni tulemusena hapniku üleküllus, mis suurendab vabade radikaalide teket (Kalogeris jt., 2012). See viib omakorda reaktiivsete hapnikuosakeste (ROS) kuhjumiseni, mis tekitab oksüdatiivset stressi. ROS-id on reaktiivsed molekulid, mis kõrges kontsentratsioonis võivad kahjustada erinevaid raku struktuure – süsivesikuid, nukleiinhappeid, lipiide ja valke ning muuta nende funktsioone (Lo jt., 2005). Kesknärvisüsteem (KNS) sisaldab vaid mõõdukas koguses endogeenseid antioksidante ja antioksidatiivseid ensüüme, mis aitavad rakul elimineerida ROS-e ning nende hulk väheneb kiirelt isheemia-reperfusiooni vigastuse tagajärjel. See muudab aju eriti tundlikuks ROS-ide kahjulikule mõjule. Seega võib reperfusioon põhjustada rohkem rakukahjustust kui hapniku- ja toitainetepuudus.

---

<sup>1</sup> Maailma Terviseorganisatsiooni (WHO) lehekülj: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>

Insuldi ravis on eriti olulised neli ja pool atakijärgset tundi. See on ajaaken, mille jooksul on patsiendile võimalik teha trombolüütilist ravi, mis võib inimese päasta raskest puudest või surmast. Kahjuks saab väga vähe patsiente selle ajaakna sees ravi, mistõttu on oluline uurida neuroprotektante. Kliinikus on kehatemperatuuri langetamine kasutusel erinevate südame ja veresoonkonna haiguste hüpoksilis-isheemilise kahjustuse leevendamiseks (Luscombe ja Andrzejowski, 2006). Hüpotermia aeglustab ainevahetust organismis ja verevoolu ajus, mille tulemusena väheneb aju hapniku tarbimine ja glükoosi ainevahetus 5% iga langetatud kraadi (°C) kohta (Yenari jt., 2008).

Kerge (32–35 °C) ja mõõduka (28–32 °C) hüpotermia kaitsvat toimet on näidatud ka südameataki (Arrich jt., 2016), hüpoksilis-isheemilise entsefalopaatia (Shankaran jt., 2005) ja traumaatilise ajukahjustuse korral (Zhi jt., 2003). Sügavat hüpotermiat (< 28 °C) kasutatakse kaasasündinud südamehaiguste, aordikaare ja intrakraniaalsete aneurüsmide operatiivses ravis (Mackensen jt., 2009). Hüpotermia rakendamine sõltub nii kliinilisest taustast, kui ka vigastuse tüübist ja ulatusest (Polderman ja Herold, 2009). Isheemia ja reperfusioon on ajatundlikud protsessid (Lee jt., 1999; White jt., 2000), mistõttu on ka hüpotermia ravi alustamine ajast sõltuv. Varasemate uuringutega on püütud välja selgitada hüpotermia sügavust (Duncker jt., 1996; Hamamoto jt., 2009; Kim jt., 2015; Tissier jt., 2010), kestvust (Colbourne jt., 1999; Steinberg, 2001; Yenari jt., 2008), kehasoojendamise seotud aspekte (De Georgia jt., 2004; Georgiadis jt., 2002; Polderman jt., 2002; Schwab jt., 1998) ning kuidas vähendada kehatemperatuuri langetamisega kaasnevat kõrvalmõjusid (Meloni jt., 2008; Schubert, 1995). Terapeutiline hüpotermia on üks lootustandavamid akuutse isheemilise insuldi ravimeetodeid (Lee jt., 2017), kuid selle protektiivse efekti taga olevad molekulaarsed mehhanismid ei ole veel teada. Varasemad tööd näitavad, et hüpotermia vähendab vabade radikaalide produktsiooni, tõstab antioksidatiivset kaitset ning vähendab oksüdatiivse stressiga kaasnevat rakusurma (Gong jt., 2012; Hua jt., 2010; Lu jt., 2014).

Terapeutiliselt oluliste molekulaarsete mehhanismide tuvastamine on äärmiselt oluline, kuna see võimaldab uute farmakoloogiliste meetodite väljatöötamist ning vähendab hüpotermiaga kaasnevat kõrvalmõjusid.

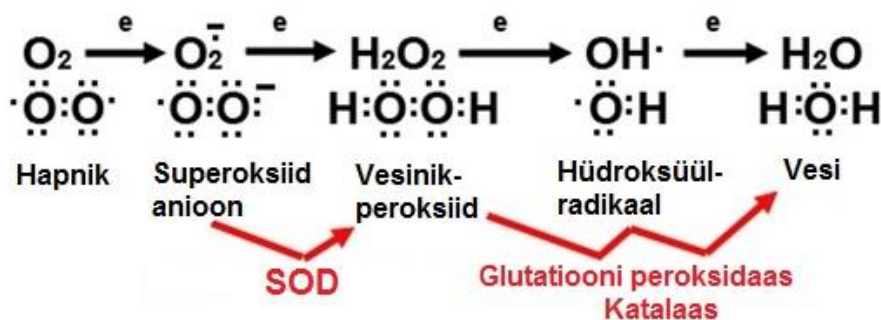
## **1.2. Oksüdatiivne stress ja antioksidantide mõju**

Oksüdatiivne stress on olukord organismis, kus oksüdantide ja antioksidantide tasakaal on häiritud ja ülekaalus on oksüdatiivsed stressorid. Sõltuvalt kontsentratsioonist käituvad ROS-id organismis kahte moodi – väikeses koguses on neil kaitseroll ja suures hulgas tekitavad nad

kahju (Valko jt., 2004). ROS-id aitavad säilitada redokstasakaalu ja reguleerivad paljusid metaboolseid ning rakulisi protsesse. Patoloogiliste seisundite korral, nagu isheemia-reperfusioon, on aga antioksidatiivsed süsteemid ülekoormatud ja reaktiivsed hapnikuühendid kahjustavad erinevaid raku struktuure.

ROS-e toodetakse molekulaarsest hapnikust tavalise raku metabolismi käigus ja neid võib jaotada kahte gruppi: vabad radikaalid ja mitteradikaalsed osakesed. Molekulid, mis sisaldavad ühte või rohkemat paardumata elektroni ja annavad seega molekulile reaktiivsuse, nimetatakse vabadeks radikaalideks. Kui kaks vaba radikaali jagavad oma paardumata elektrone, siis moodustuvad mitteradikaalsed ühendid (Birben jt., 2012).

Kolm põhilist füsioloogiliselt olulist ROS-i on superoksiid anioon ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), hüdroksüülradikaal ( $\bullet\text{OH}$ ) ja vesinikperoksiid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Superoksiid anioon ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) tekib molekulaarsele hapnikule ühe elektroni lisandumisel (Miller jt., 1990) (joonis 1). Superoksiid aniooni toodetakse peamiselt mitokondris, mis on ka ATP tekkimise kohaks. Tavaliselt transportitakse elektronid läbi elektrontransportahela, mille käigus tekib hapnikust vesi, kuid umbes 1-3% elektrone lekib süsteemist välja ja nendest moodustub superoksiid. Superoksiid muudetakse superoksiidi dismutaasi (SOD) abil vesinikperoksiidiks ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Vesinikperoksiid difundeerub kergesti läbi plasmamembraani ja võib reageerida superoksiid aniooniga ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), mille tulemusena tekib hüdroksüülradikaal ( $\bullet\text{OH}$ ) (joonis 1).  $\bullet\text{OH}$  on kõige reaktiivsem ROS ja võib kahjustada igat tüüpi makromolekule (Liochev ja Fridovich, 2002).



**Joonis 1.** Reaktiivsete hapnikuühendite teke ja eemaldamine (Aiyengar jt., 2017 järgi).

Selleks, et aeroobse metabolismi poolt tekitatud oksüdatiivse stressiga toime tulla, on imetajate rakkudes arenenud laialtlevinud antioksidatiivne kaitsesüsteem. Reaktiivsete hapniku- ja lämmastikuühendite mõju tasakaalustavad ensümaatilised ja mitte-ensümaatilised antioksidandid, mis on tavaliselt piisavalt efektiivsed, et hoida ära ROS-ide kahjulik toime.

Hea antioksidant peab olema võimeline: 1) spetsiifiliselt kahjutuks tegema vabu radikaale; 2) kelaatuma redoksmetallidega; 3) interakteeruma teiste antioksidantidega ja olema võimeline

neid taastootma; 4) omama positiivset mõju geeniekspressioonile; 5) olema kergesti omastatav; 6) olema kudedes ja kehavedelikes füsioloogiliselt olulises kontsentratsioonis; 7) toimima nii vesikeskkonnas kui ka membraanides (Valko jt., 2006).

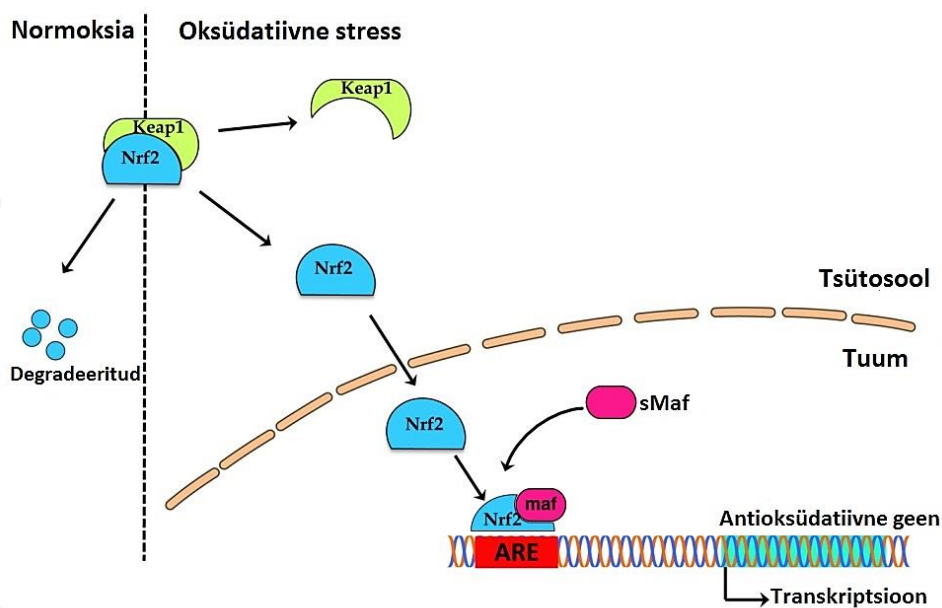
Kui antioksidant neutraliseerib vaba radikaali, siis ta ise oksüdeerub. Seega tuleb antioksidantide varusid kehas pidevalt täiendada (Birben jt., 2012). Isheemia-reperfusiooni kahjustuse korral on aga tasakaal reaktiivsete hapnikuosakeste ja antioksidantide vahel häiritud ning ülekaalus on oksüdatiivset stressi tekitavad ühendid. Hüpotermial on võime kaitsta rakku isheemilise seisundi korral. Käesoleva töö eesmärk oligi tuvastada, mil määral mõjutab hüpotermia rakusisest antioksidatiivset potentsiaali. Kuna olulisemateks antioksidantideks peetakse glutatiooni, tioredoksiini ja sulfiredoksiini süsteeme, siis olid need siinse töö peamiseks uurimisobjektideks. Lisaks kasutasime NRF2 seostumismotiive sisaldava promotori kontrolli all olevat lutsiferaasi konstrukti, et hinnata NRF2 aktiivsust rakus.

### 1.3. NRF2-ARE signaalirada

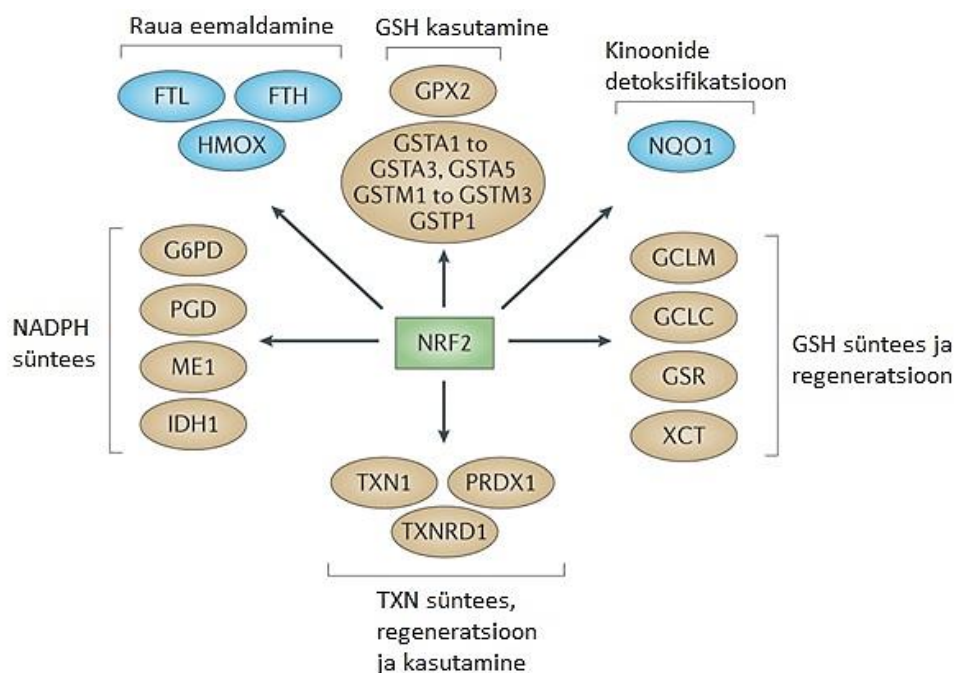
NRF2 (ingl *Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2*) on transkriptsioonifaktor, mis seostub mitmete antioksidantide ja faas II ensüümide geenide promotoralas ARE (ingl *antioxidant response element*) regiooniga (Itoh jt., 1999). Faas II ensüümid viivad läbi ksenobiootiliste ühendite detoksifikatsiooni teist etappi (Rushmore ja Kong, 2002).

Transkriptsioonifaktori NRF2 kontrolli all olevad antioksidatiivsete ensüümide süsteemid on seotud redokssüsteemide regulatsiooniga [superoksiid dismutaas (SOD), katalaas (CAT), sulfiredoksiin (Srx), tioredoksiin (Trx), peroksiredoksiin (Prdx) süsteem], glutatiooni sünteesi ja metabolismiga [glutatiooni peroksidaas (GPx)], kinoonide ümbertöötusega [NAD(P)H kinooni oksidoreduktaas (NQO1)] ja raua homoöstaasiga [heemi oksügenaas 1 (HMOX1), Ferritiin].

NRF2 sisaldab 6 tugevalt konserveerunud NRF2-ECH homologset (Neh) domeeni. Tsütoplasmaatiline valk KEAP1 (ingl *Kelch Like ECH Associated Protein 1*) seondub NRF2-ga Neh2 domeeni kaudu (Itoh jt., 1999). KEAP1 ühendab NRF2 valku CUL3-ga (ingl *culin 3-based E3 ligase*). Tavatingimustes NRF2 ubiquitineeritakse ja lagundatakse ubiquitiin-proteosoom süsteemi poolt (Kobayashi jt., 2004). Reaktiivsed hapnikuosakesed modifitseerivad KEAP1 olulisi tsüsteiini jääke, mille tulemusena katkeb side NRF2 ja KEAP1 vahel ning NRF2 liigub tuuma (Canning jt., 2015). Seal seondub ta MAF valkudega, mis suurendavad ARE-t sisaldavate geenide transkriptsiooni efektiivsust (Kataoka jt., 1994; Motohashi jt., 1997) (joonis 2).



**Joonis 2.** NRF2 signaaliraja aktivatsioon oksüdatiivse stressi tingimustes (Bhatia jt., 2013 järgi).



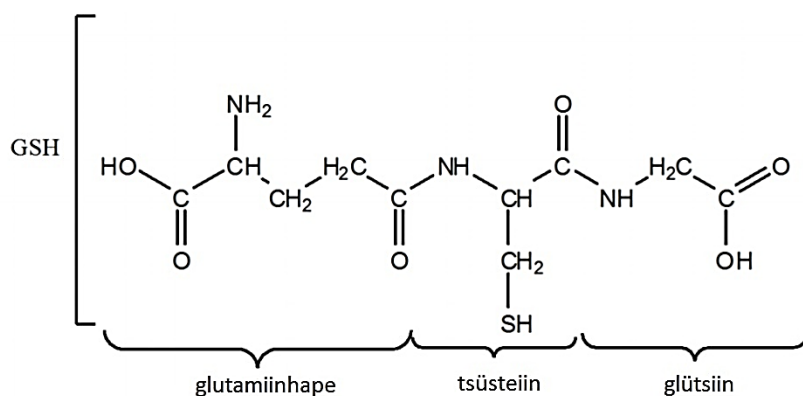
Nature Reviews | Drug Discovery

**Joonis 3.** NRF2 kontrolli all olevad antioksidatiivsed signaalirajad: 1) glutatiooni (GSH) süntees ja regeneratsioon, mida reguleerivad glutamaat-tsüsteiin ligaasi kompleksi modifitseeriv subühik (GCLM), GCL katalüütiline subühik (GCLC), tsüsteiin/glutamaat transporter (XCT) ja glutatiooni reduktaas (GSR); 2) GSH kasutamine, mida reguleerivad glutatiooni S-transferaasid (GSTA1, GSTA2, GSTA3, GSTA5, GSTM1, GSTM2, GSTM3 ja GSTP1) ja glutatiooni peroksidaas (GPX2); 3) tioredoksiini süntees, regeneratsioon ja kasutamine, mis on reguleeritud tioredoksiini (TXN1), tioredoksiini reduktaasi (TXNRD1) ja peroksiredoksiin1 (PRDX1) poolt; 4) NADPH tootmine, mida kontrollib glükoos-6-fosfaadi dehüdrogenaas (G6PD), fosfoglutseraadi dehüdrogenaas (PGD), malaadi ensüüm 1 (ME1) ja isotsitraadi dehüdrogenaas (IDH1). GSH ja TXN kasutavad NADPH-d, et end

taastoota pärast seda, kui nad on reaktiivsete hapnikuühendite (ROS-ide) poolt redutseeritud. Kõigil neljal antioksidatiivsete geenide rühmal, mille ekspressiooni kontrollib NRF2, on üksteist täiendavad ja kattuvad funktsioonid. Lisaks kontrollib NRF2 veel selliseid antioksidante, nagu NAD(P)H:kinooni oksidoreduktaas 1 (NQO1), ja ensüüme, mis on seotud raua eemaldamisega [heemi oksügenaas (HMOX1), ferritiini raske ahel (FTH) ja ferritiini kerge ahel (FTL)]. Lisaks aktiveerib NRF2 ka *Srxn1* (sulfredoksiin 1) ekspressiooni (Hartikainen jt., 2012) ning kontrollib geene, millel puudub antioksidatiivne funktsioon ja pole siinsel joonisel välja toodud (Gorrini jt., 2013 järgi).

#### 1.4. Glutatiooni süsteem

Glutatiooni (GSH) süsteem on üks kahest tiool-sõltuvast antioksidatiivsest süsteemist imetajate rakkudes, mis eemaldab erinevaid ROS-e glutatioon peroksidaasi abil (Brigelius-Flohe, 1999; Papp jt., 2007).



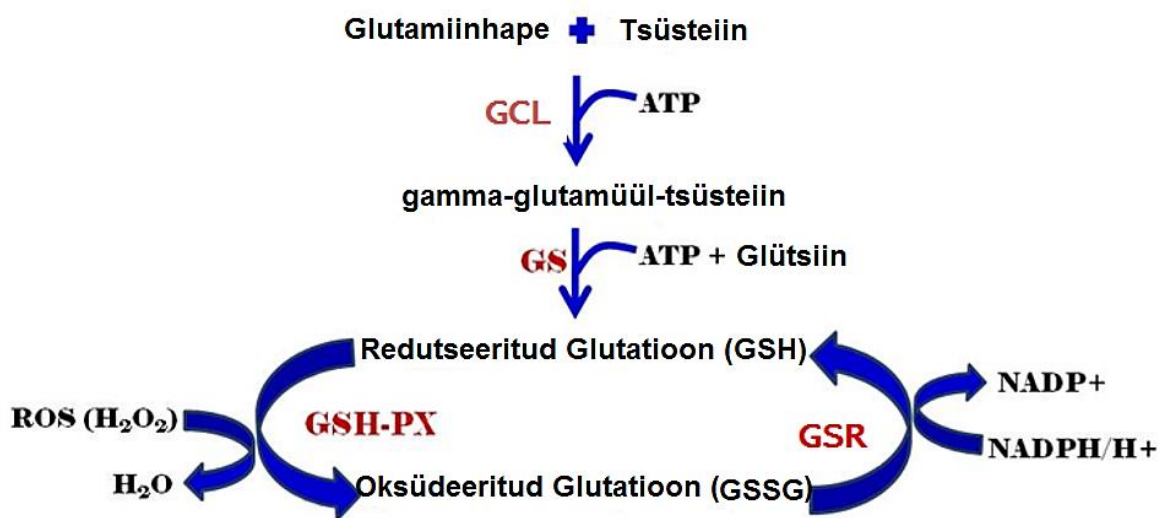
**Joonis 4.** Glutatiooni (GSH) redutseeritud vormi aminohappeline koostis<sup>2</sup>.

GSH on tripeptiid, mis koosneb glutamiinhapest, tsüsteiinist ja glütsiinist (Glu-Cys-Gly) (joonis 4) ning on glutatiooni redutseeritud (aktiivne) vorm. Glutatiooni disulfiid (GSSG) on oksüdeeritud (inaktiivne) GSH vorm. GSH tsüsteiini tiolrühm on võimeline loovutama prootoni ja elektroni ROS-ile. Elektroni loovutades muutub GSH ise reaktiivseks, kuid reageerib teise reaktiivse GSH-ga moodustades GSSG. Glutatiooni reduktaas (GSR) redutseerib oksüdeeritud GSSG tagasi oma redutseeritud GSH vormi, kasutades elektronide doonorina NADPH-d (Watson jt., 2003) (joonis 5).

GSH vastutab suure osa raku redoks-homoöstaasi eest ja GSH : GSSG suhet kasutatakse raku redoks-staatusel väljeldamiseks (Meister, 1994). Puhkeolekus rakus on GSH : GSSG suhe redutseerunud oleku kasuks, et kaitsta rakku oksüdatiivse stressi eest. See tähendab, et tsütosoolis ja mitokondris on GSH : GSSG suhe > 10 : 1 (Montero ja Jassem, 2011). Oksüdatiivse stressi korral võib intratsellulaarne GSH : GSSG langeda kuni 1 : 1 (Chai jt.,

<sup>2</sup> Joonis Intechopen leheküljelt: <https://www.intechopen.com/source/html/17260/media/image5.png>

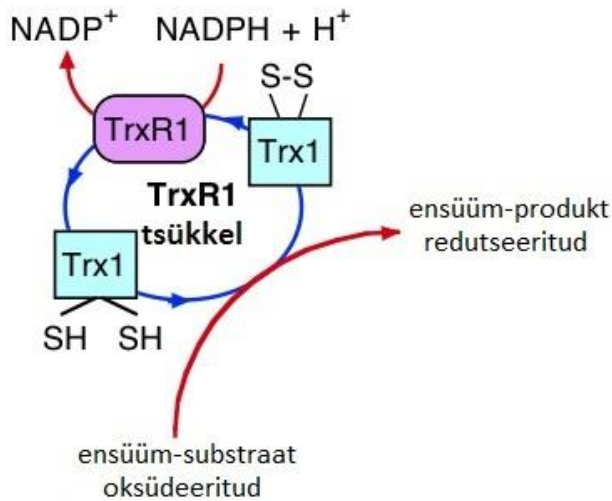
1994). Isheemia-reperfusioon korral on glutatiooni hulk kudedes ammendunud ning see on nii oksüdatiivse stressi põhjus kui ka tagajärg. GSH taseme taastamine pärast isheemiat aitaks rakul toime tulla reperfusioonist tuleneva oksüdatiivse kahjustusega (Won jt., 2015).



**Joonis 5.** GSH tootmine läbi kahe erineva mehhanismi: *de novo* süntees ja taastootmine GSSG-st. Intratsellulaarse GSH tasakaalu säilitamiseks taastoodetakse glutatiooni GSSG-st ja transporditakse rakku ekstratsellulaarset GSH-d. Tsütosoolne GSH süntees leiab aset kahe ATP-sõltuva reaktsiooni abil, mida katalüüsivad glutamaat-tsüsteiin ligaas (GCL) ja glutatiooni süntetaas (GS). Glutatiooni disulfiidi (GSSG) redutseerimine glutatiooni reduktaasi (GSR) poolt regenereerib GSH-d. GSSG redutseerimine toimub NADPH arvelt, mida toodetakse pentoosfosfaadi rajal (PPP) glükoosi oksüdatsioonil. Glutatiooni peroksidaas (GSH-PX) redutseerib vesinikperoksiidi ( $H_2O_2$ ) veeks ( $H_2O$ ) (Guilford ja Hope, 2014 järgi).

### 1.5. Tioredoksiini süsteem

Tioredoksiini (Trx) süsteem koosneb NADPH-st, tioredoksiini reduktaasist (TrxR1) ja tioredoksiinist ning on põhiline disulfiid reduktaasne süsteem. Tioredoksiin võib esineda kahes vormis: redutseeritult (SH – tiool) ja oksüdeeritult (S-S – disulfiid). Trx süsteem varustab elektronidega suurt hulka ensüüme, on oluline DNA sünteesis ning kaitseb oksüdatiivse stressi eest (Holmgren, 1985). TrxR1 redutseerib ja aktiveerib tioredoksiini. Trx redutseerib omakorda valkude oksüdeerunud tsüsteiini jääke (joonis 6). Trx-i poolt tekitatud redutseeriv keskkond on vajalik redokstundlike transkriptsioonifaktorite (nt p53 ja NF- $\kappa$ B) seondumiseks DNA-ga (Hayashi jt., 1993; Ueno jt., 1999). Tioredoksiin seondub ROS-idega enne, kui need suudavad rakke kahjustada ja kaitseb seega rakke oksüdatiivse stressi eest.



**Joonis 6.** Tsütosoolse tioredoksiini reduktaasi tsükel. Tioredoksiini reduktaas (TrxR1) redutseerib disulfiidse (oksüdeerunud) tioredoksiini (Trx1) ditiioolsesse vormi. Redutseerunud Trx1 on põhiline valk-disulfiid reduktaas ja paljudele ensümaatilistele reaktsioonidele vahetu elektronide allikas. Reaktsiooni tulemusena Trx1 oksüdeerub ja läheb üle disulfiidsesse vormi ning tagasi tioredoksiin reduktaasi tsüklisse läbi TrxR1-i (Arnér, 2009; Holmgren ja Björnstedt, 1995 järgi).

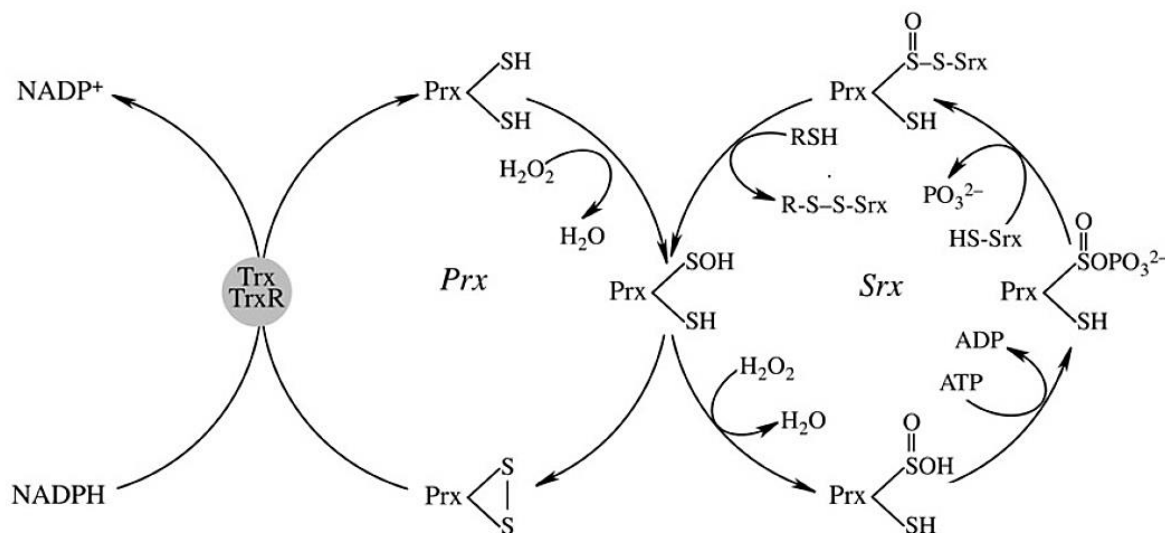
Trx ja GSH süsteemidel on mitmeid sarnaseid funktsioone ja enamikul juhtudel töötavad nad paralleelselt. GSH suudab redutseerida oksüdeerunud Trx-i *in vivo*, viidates GSH-ile, kui TrxR-i asendusvõimalusele, mis annab Trx-ile elektrone (Du jt., 2012). Samas võib ka tioredoksiini süsteem olla alternatiiviks oksüdeerunud GSH redutseerimisel (Tan jt., 2010).

## 1.6. Sulfiredoksiini süsteem

Sulfiredoksiinide (Srx) peamine funktsioon on parandada hüperoksüdeerunud peroksiredoksiine (Prxs) ja neid reaktiveerida (Rhee jt., 2007). Normaalingimustes asub sulfiredoksiin tsütosoolis, kuid oksüdatiivse stressi korral transporditakse ta mitokondrisse (Noh jt., 2009).

Srx põhjustab peroksiredoksiini ensüümi tsüsteiini sulfiinhappe ( $-SO_2H$ ) osa redutseerumist tagasi oma stabiilsesse tiololekusse (Cys-SH) (joonis 7). Reaktsiooniks on vajalik ATP ja magneesium, mida sulfiredoksiin kasutab ensüümi parandamiseks. Kuna peroksiredoksiinide inaktivatsioon on põhjustatud suurenenud ROS-ide tasemest, siis  $H_2O_2$  käitub kui intratsellulaarne raku signaalmolekul. Selle tulemusena aktiveeritakse sulfiredoksiin, mis avaldab mõju peroksiredoksiinidele, et neutraliseerida vesinikperoksiidi molekule ja vähendada oksüdatiivset stressi (Bozonet jt., 2005).

Sulfiredoksiin osaleb ka valkude deglutatisseerimises (Findlay jt., 2005). Glutatisatsioon käigus moodustub valgu tsüsteiini jääkide ja glutatiooni vahele disulfiidside. See valkude pöörduv post-translatsiooniline modifitseerimine on äärmiselt oluline raku signalisatsioon ja kaitseb pöördumatute modifikatsioonide eest oksüdatiivse stressi korral. Kui keskkond muutub redutseerivamaks, toimub deglutatisatsioon, mille käigus eemaldatakse valgu küljest glutatiooni molekul (Findlay jt., 2006).



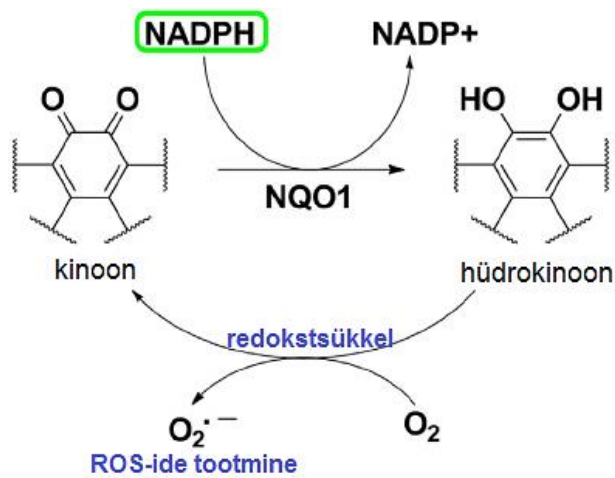
**Joonis 7.** Mitokondri peroksiredoksiin-sulfiredoksiin süsteem hüperoksüdeerunud peroksiredoksiinide stabiilse oleku taastamiseks. Peroksidaatiline tsüsteiin,  $C_P-SH$ , oksüdeerub  $H_2O_2$  toimel  $C_P-SOH$ -ks, mis reageerib omakorda homodimeeri teise subühiku lahustuva tsüsteiiniga  $C_R-SH$  ja moodustab molekulidevahelise disulfiidi (-S-S-). Trx redutseerib disulfiidi ja saab samal ajal  $NADP^+$ -lt tioredoksiini reduktaasi (TrxR) abil redutseerivaid ekvivalente.  $C_P-SOH$ , mida toodetakse katalüüsi käigus vaheühendina, oksüdeerub mõnikord edasi  $C_P-SO_2H$ -ks ja see inaktiveerib peroksidaasi. Ensüümi reaktivatsiooniks on vajalik  $C_P-SO_2H$  osa redutseerida. Seda reaktsiooni katalüüsib sulfiredoksiin (Srx) ATP abil (Yin jt., 2012 ja Rhee jt., 2007 järgi).

## 1.7. NQO1

NQO1 (ingl *NAD(P)H quinone oxidoreductase 1*) on antioksidatiivne ensüüm, mis osaleb endogeenseteltokinoonidelt kahe elektroni ülekandes, kasutades ko-faktorina NADH-d või NADPH-d (Iyanagi ja Yamazaki, 1970) (joonis 8). Kinoonid on stabiilsed, membraanides difundeeruvad mobiilsed elektronide ja prootonite kandjad. NQO1 hoiab ära elektrofiilseteokinoonide osalemise reaktsioonides, mis võivad tekitada sulfhüdrüülide vähenemist või üheelektronilisi redutseerumisi. See tekitab redokstsükli tulemusena semikinoone ja mitmeid reaktiivseid hapniku vaheühendeid (Dinkova-Kostova ja Talalay, 2010).

Lisaks osaleb NQO1 E-vitamiini metabolismis ja regeneratsioonis (Siegel jt., 1997). Mitmed väikesed molekulid, nagu tertsiarne butüülhüdrokinoon (tBHQ), sulforafaan, antioksidandid ja  $H_2O_2$  aktiveerivad ARE kaudu NQO1-te (Li ja Jaiswal, 1994). NQO1 on kõrgelt

ekspresseeritud kudedes, mis vajavad suurel hulgal antioksidatiivset kaitset, sealhulgas ka kesknärvisüsteemis (Siegel ja Ross, 2000).



**Joonis 8.** NQO1 vahendatud kinoonide metabolism. NQO1 katalüüsib kinoonide detoksifikatsiooni, kasutades elektronide doonorina NAD(P)H-d (Bian jt., 2014 järgi).

## **2. EKSPERIMENTAALOSA**

### **2.1. Töö eesmärgid**

Käesoleva magistr töö eesmärgid olid järgmised:

1. Hinnata hüpotermia mõju antioksidatiivses süsteemis oluliste geenide ekspressioonile ja glutatiooni tasemele.
2. Saada infot hüpotermia ja olulise antioksidatiivse süsteemi transkriptsioonifaktori NRF2 vahel.

### **2.2. Materjal ja meetodika**

#### **2.2.1. Rakkude kasvatamine**

HeLa (inimese emakakaela kasvaja rakuliin) (CCL-2, ATCC) ning HepG2-ARE (inimese hepatotsellulaarse kartsinoomi rakuliin, mis ekspresseerib ARE saiti lutsiferaasi geeni ees) (60513, BPS Bioscience) rakkude kasvatamiseks kasutati madala glükoosisaldusega MEM söödet (MEM-STA, Capricorn Scientific), millele oli lisatud 10%-list veise loote seerumit (2050-1, PAN Biotech), 1 mM naatriumpüruvaati (NPY-B, Capricorn Scientific), 1x asendamatuid aminohappeid (NEAA-B, Capricorn Scientific) ning 1x penitsilliini ja streptomütsiini segu (2007, Smart Media). Rakke kasvatati inkubaatoris 37 °C ja 5%-lise CO<sub>2</sub> sisalduse juures. Rakkude ümberkylvamiseks aspireeriti rakkudelt sööde ning pesti 5 ml steriilse 1x PBS-iga (2002, Smart Media). Rakkudele pipeteeriti 1 ml trüpsiinilahust (25200056, Gibco, Thermo Fisher Scientific) ning tass asetati 5 minutiks koekultuuri inkubaatorisse 37 °C juurde. Kui rakud ümardusid ja hakkasid tassi põhja küljest lahti tulema, siis lisati tassile seerumiga MEM söödet ning suspendeeriti rakud. Rakususpensioon kanti 15 ml tuubi ning tsentrifugeeriti 5 min 200 x g 20 °C juures. Rakupelletilt aspireeriti sööde, rakud resuspendeeriti uue söötmega sobivas koguses ning külvati 10 cm Petri tassile.

#### **2.2.2. Rakkude inkubeerimine**

HepG2-ARE rakkude inkubeerimiseks oksidatiivset stressi moduleerivate ainetega külvati 12-kaevulise plaadi igasse kaevu 80 000 rakku/ml. Rakke inkubeeriti üleöö 37 °C ja 5% CO<sub>2</sub> juures. Järgmisel päeval lisati tert-BHQ (lõpp-kontsentratsioon 150 µM), DL-Sulforafaan

(lõpp-kontsentratsioon 3  $\mu\text{M}$ ) või antioksidant N-atsetüültsüsteiin (lõpp-kontsentratsioon 8 mM). Rakke inkubeeriti 8 tundi normotermias (37 °C) või hüpotermias (32 °C).

Tert-BHQ (112941, Sigma) ja DL-Sulforafaan (S4441, Sigma) lahustati DMSO-s (A3672,0100; PanReac AppliChem) lõpp-kontsentratsiooniga 0,01 – 0,1%. N-atsetüültsüsteiin (A9165, Sigma) lahustati PBS-is.

Selleks, et uurida transkriptsioonifaktori NRF2 aktiivsuse muutust ajas külvati 6-kaevulise plaadi igasse kaevu 400 000 rakku/2 ml. Rakke inkubeeriti üleöö 37 °C ja 5% CO<sub>2</sub> juures. Järgmisel päeval inkubeeriti rakke 37 °C või 32 °C juures vastavalt 2, 8 või 24 tundi.

### **2.2.3. Valgulüsaadi valmistamine**

Valgulüsaadi valmistamiseks pesti rakke 1x PBS-iga ning lisati 1x lüüsipuhvrit (E1941, Promega). 12-kaevuga plaadil oli puhvri kogus ühes kaevus 100  $\mu\text{l}$  ning 6-kaevuga plaadil 300  $\mu\text{l}$ . Plaate loksutati toatemperatuuril 15 min, valgulüsaadid koguti 1,5 ml eppendorfi tuubidesse ning tsentrifugeeriti 4 °C juures 12 000 x g 30 sekundit. Valgulüsaadid säilitati edasiseks analüüsiks –80 °C juures.

### **2.2.4. Valgu kontsentratsiooni määramine**

Valgu kontsentratsiooni määramiseks kasutati kommertsiaalsed testkomplekti, mis baseerub BCA meetodil (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific). Valgulüsaate lahjendati 2 korda 1x lüüsipuhvriga (E1941, Promega). Standardina kasutati veise seerumi albumiini 2 mg/ml, millest valmistati standardlahused lahjendustega 0–1,5 mg/ml.

BCA meetod põhineb värvusreaktsioonil aluselises keskkonnas. Reaktsiooni käigus reageerivad valgu peptiidsidemed vaseioonidega ning selle tulemusena redutseeritakse Cu<sup>2+</sup> ioonid Cu<sup>1+</sup> ioonideks. Redutseeritud Cu<sup>2+</sup> hulk on proportsionaalne valgu hulgaga lahuses. Vase katiooni (Cu<sup>1+</sup>) tuvasamiseks kasutatakse bitsiinhoniniinhapet (BCA) sisaldavat reagenti. Kahe BCA molekuli kelatatsiooni käigus ühe vase iooniga muutub lahuse värvus lillaks ning värvuse intensiivsus on proportsionaalne valgu hulgaga lahuses<sup>3</sup>.

Valgu kontsentratsioon detekteeriti ja kvantifitseeriti spektrofotomeetriliselt 562 nm lainepikkuse juures.

---

<sup>3</sup> Thermo Scientific Pierce™ BCA Protein Assay Kit'i infoleht:  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225>

### 2.2.5. Firefly lutsiferaasi reporter katsed

Firefly lutsiferaasi kasutatakse laialdaselt transkriptsioonifaktorite aktiivsuse hindamiseks ja kvantifitseerimiseks, kuna imetaja rakkudes puudub endogeenne lutsiferaasi aktiivsus. Firefly lutsiferaas analüüsib ATP-st sõltuvat D-lutsiferiini oksüdeerumist oksülutsiferiiniks, kiirates valgust 560 nm juures. Reaktsiooni käigus eralduv valguse intensiivsus on proportsionaalne lutsiferaasi ensüümi molekulide hulgaga reaktsioonisegus<sup>4</sup>.

HepG2-ARE rakkudest saadud valgulisfaatidega teostati Firefly lutsiferaasi reporter katse (30003-2, Biotium). 96 kaevuga plaadi ühes kaevus oli rakulüsaadi kogus 20 µl ning automatiseeritud jaotur pihustas igale proovile peale 100 µl lutsiferaasi töölahust. Selleks lahustati D-lutsiferiin Firefly lutsiferaasi puhvris lõpp-kontsentratsiooniga 0,2 mg/ml. Luminomeeter programmeeriti 10-sekundilise lugemiseelse viivitusega, millele järgnes 5-sekundiline mõõtmisperiood. Luminestsents kvantifitseeriti VICTOR Multilabel Plate Reader-i abil (PerkinElmer). Katseid korrati kolm korda.

### 2.2.6. RNA eraldamine ja cDNA süntees

Antioksidatiivses süsteemis oluliste geenide ekspressiooni uuriti nii HeLa kui HepG2-ARE rakuliinis. HepG2-ARE rakud külvati 6-kaevulisele plaadile tihedusega 400 000 rakku/2 ml ühes kaevus. HeLa rakud külvati 10 cm tassile tihedusega  $1 \times 10^6$  rakku /10 ml.

Järgmisel päeval inkubeeriti rakke 32 °C või 37 °C juures. HeLa rakke inkubeeriti 24 tundi. HepG2-ARE rakke inkubeeriti vastavalt 4, 8 või 24 tundi, et jälgida geeniekspressiooni muutust ajas. Peale inkubatsiooni pesti rakke 1x PBS-iga ning 6-kaevulise plaadi igasse kaevu lisati 300 µl ning 10 cm Petri tassile 500 µl Trizole'i (15596026, Thermo Fisher Scientific).

Suspensioon koguti 1,5 ml Eppendorfi tuubi ja inkubeeriti 5 min toatemperatuuril. 500 µl Trizole'i kohta lisati 100 µl kloroformi, inkubeeriti 3 min pärast kergelt segamist toatemperatuuril ning tsentrifuugiti 12 000 x g, 15 min 4 °C juures. Pealmine läbipaistev kiht eraldati uude 1,5 ml Eppendorfi tuubi, lisati 250 µl isopropüül alkoholi, segati, inkubeeriti 10 min toatemperatuuril ning tsentrifuugiti 12 000 x g, 10 min 4 °C juures. Supernatant eemaldati ning sade jäeti põhja.

RNA-d pesti 1 ml 75% etanooliga ning tsentrifuugiti 7500 x g, 5 min 4 °C juures. Etanool eemaldati ning RNA-l lasti toatemperatuuril kuivada 5–10 min. RNA-le lisati 50 µl mQ vett,

---

<sup>4</sup> Biotium Firefly Luciferase Assay Kit'i infoleht: <https://biotium.com/wp-content/uploads/2013/07/PI-30003.pdf>

suspendeeriti ning inkubeeriti 10 min 55 °C juures. RNA kontsentratsioon mõõdeti NanoDrop spektrofotomeetriga ning proove säilitati –80 °C juures.

cDNA sünteesimiseks kasutati SuperScript™ III pöördtranskriptaasi (18080044, Thermo Fisher Scientific) ja heksameerseid oligonukleotiide (LGC Biosearch Technologies või N8080127, Invitrogen). 20 µl reaktsioonisegu kohta võeti 1 µg RNA-d, 1 µl (50 µM) heksameerseid oligonukleotiide ja 1 µl dNTP-d (10 mM). RNA denatureerimiseks hoiti proove 5 min 65 °C juures ning heksameeride seondumiseks inkubeeriti tuube 1 min jääl. cDNA sünteesiks lisati proovidele 4 µl 5x First-Strand Buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3 toatemperatuuril), 375 mM KCl, 15 mM MgCl], 1 µl 0,1 M DTT, 1,25 µl mQ vett ja 0,75 µl SuperScript™ III pöördtranskriptaasi (200 U/µl). Proove inkubeeriti 60 min 50 °C juures ning pöördtranskriptaasi inhibeerimiseks hoiti proove 15 min 70 °C juures. cDNA-d säilitati –20 °C juures.

### 2.2.7. Kvantitatiivne reaalaaja qPCR

Antioksidatiivses süsteemis oluliste transkriptide tasemete määramiseks kasutati reaalaaja qPCR-i. Reaktsioonid viidi läbi TaqMan Gene Expression Master Mix reagentiga (4369016, Thermo Fisher Scientific). Reaktsiooni maht oli 10 µl, kus cDNA lõpp-koguseks oli 200 ng. Kõik reaktsioonid viidi läbi neljas korduses, et vähendada protseduuri läbiviimisest tulenevat variatiivsust. Katset viidi läbi üks kord.

HeLa rakkudes mõõdeti geeniekspressioon TaqMan sondidega: GCLC (Hs00155249\_m1), TRXR1 (Hs00917067\_m1), GSS (Hs00609286\_m1), SRXN1 (Hs00607800\_m1), NQO1 (Hs01045993\_g1), CIRBP (Hs00989762\_g1), HPRT (Hs02800695\_m1) (Thermo Fisher Scientific). HepG2 rakkudes kasutati tabelis 1 välja toodud primereid ja sonde (LGC Biosearch Technologies). Referentsgeen oli HPRT. qPCR viidi läbi QuantStudio 12K Flex Software v.1.2.2 Real-Time PCR System ja QuantStudio 12K Flex Software v.1.2.2 tarkvara abil.

**Tabel 1.** HepG2 rakkude PCR analüüsil kasutatud primerid ja sondid.

Geen	Forward praimer (5' 3')	Reverse praimer (5' 3')	Sond (5' 3')	Sondi märgis	Sondi kustutaja
<b>CIRBP</b>	GCCATGGCATCAGATGAAGGC	CTGTCTTTCACAACCACCACTTC	CGCTGGAGCAGGTCTTC	FAM	BHQPlus
<b>GCLC</b>	CCAGATACCTTTATGATCAGTTGGC	CCGAGTTCTATCATCTACAGATGCAG	ATTGTTATGGCTTTGAGTGCTGCATCTCC	FAM	BHQ1
<b>TRXR1</b>	ATTGAGCAGAGAGATTTCTCATTGC	ACTCCAAAGCGACATAGGATGC	ATCTTTTCTCCTTGCCCTTACTGCCCG	FAM	BHQ1
<b>HPRT</b>	GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG	AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG	TTTACCAGCAAGCTTGGCACCCTTGA	CAL Fluor Gold 540	BHQ1

### 2.2.8. Glutatiooni määramine

HeLa rakke kasvatati 37 °C ja 5%-lise CO<sub>2</sub> juures, kuni rakukultuurid olid 60–70% konfluentsed. Hüpotermia katse jaoks inkubeeriti rakke 24 tundi 32 °C juures. Rakkude (15 x 10<sup>6</sup>) eelmadamiseks tassilt kasutati kummimiilitsat. Rakususpensioon tsentrifuugiti 960 x g 20 °C juures jääkülmas PBS-is.

Edasise töötuse jaoks hoiti rakke jääl. Rakkudele lisati 100 µl 1x MES puhvrit, rakud resuspendeeriti ning sonikeeriti jäävannis 10 min Diagenode'i Bioruptor ultrahelisonikaatoriga (täisvõimsusel, 50% *on*/ 50% *off*). Valgulüsaadid tsentrifuugiti 15 min 15 000 x g 4 °C juures. Analüüsimiseks eraldati 100 µl ja valgukontsentratsiooni mõõtmiseks 20 µl valguproovi. Valkude sadestamiseks kasutati 100 µl 0,4 M metafosforhapet (vahekorras 1 : 1), segati vorteksi abil ja inkubeeriti 5 min toatemperatuuril.

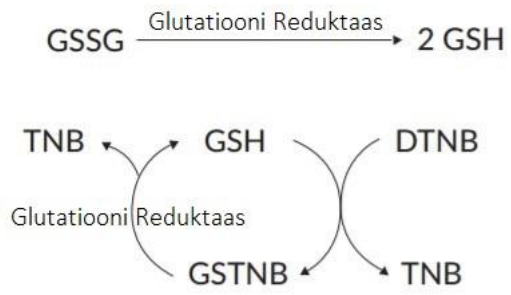
Järgnevalt tsentrifuugiti 5 min 5000 x g 4 °C juures. Saadud supernatandist võeti 150 µl ning säilitati –80 °C juures. GSH mõõtmiseks lahjendati proove 5 korda MES puhvris ja GSSG mõõtmiseks proove ei lahjendatud. Glutatiooni tasemete kvantifitseerimiseks kasutati Glutathione Assay Kit'i (703002, Cayman Chemical) vastavalt tootja poolt välja töötatud protokollile. Katset korrati kaks korda.

Kirjeldatud meetod kasutab glutatiooni ning glutatioon disulfiidi mõõtmiseks glutatiooni reduktaasil põhinevat reaktsiooni. GSH tiolgrupp reageerib DTNB-ga (5,5'-ditio-*bis*-2-nitrobensoehape ehk Ellmani reagent) ning tekib kollane 5-tio-2-nitrobensoehape (TNB). Samaaegselt tekib ka disulfiid GSTNB (GSH ja TNB vaheprodukt), mis redutseeritakse glutatiooni reduktaasi poolt. Selle reaktsiooni käigus tekivad GSH ja TNB (joonis 9). TNB hulk on proportsionaalne GSH kontsentratsiooniga proovis. TNB neeldumist mõõdetakse 405 nm juures, mille järgi saab arvutada täpse GSH hulga proovis<sup>5</sup>.

GSH oksüdeerub kergesti disulfiid dimeeriks (GSSG). GSSG-d toodetakse hüdroperoksiidide redutseerimisprotsessis glutatioon peroksüdaasi poolt. Glutatiooni reduktaas redutseerib GSSG GSH-ks ja bioloogilistes süsteemides esineb ennekõike just glutatiooni redutseerunud vorm (GSH). Kuna Cayman GSH Assay Kit baseerub glutatiooni reduktaasil, siis mõõdetakse nii GSH-i, kui ka GSSG-d ning nende hulk väljendab totaalset glutatiooni kontsentratsiooni<sup>5</sup>.

---

<sup>5</sup> Cayman Chemical Glutathione Assay Kit'i infoleht: <https://www.caymanchem.com/pdfs/703002.pdf>



**Joonis 9.** GSH ümbertöötus<sup>6</sup>.

<sup>6</sup> Cayman Chemical Glutathione Assay Kit'i infoleht: <https://www.caymanchem.com/pdfs/703002.pdf>

### 2.3. Tulemused ja arutelu

Reaktiivsete hapnikuosakeste produktsioon hüpoksia-reperfusiooni korral on üks hüpoksilise kahjustuse peamistest põhjustest (Burwell jt., 2009; Eltzschig ja Eckle, 2011; Murphy ja Steenbergen, 2008; Yellon ja Hausenloy, 2007), mistõttu uurisime, kas hüpotermia aktiveerib antioksidatiivset süsteemi.

Kuna NRF2 reguleerib antioksidatiivses süsteemis oluliste geenide ekspressiooni, siis mõõtsime nende ekspressiooni hüpotermia tingimuses. Rakuliinis HeLa tehtud katsed näitavad, et hüpotermial (24 h, 32 °C) on võime ülesreguleerida GCLC ( $p$ -väärtus 0,0079), TRXR1 ( $p$ -väärtus 0,0079) ja SRXN1 ( $p$ -väärtus 0,0317) ekspressiooni. Samas GSS ( $p$ -väärtus 0,6905) ja NQO1 ( $p$ -väärtus 0,0952) geenide ekspressioonid ei ole temperatuurist sõltuvad (joonis 10 A-E).

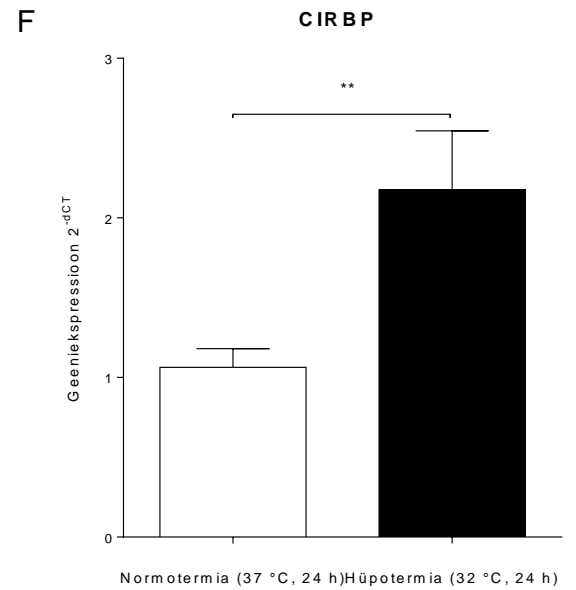
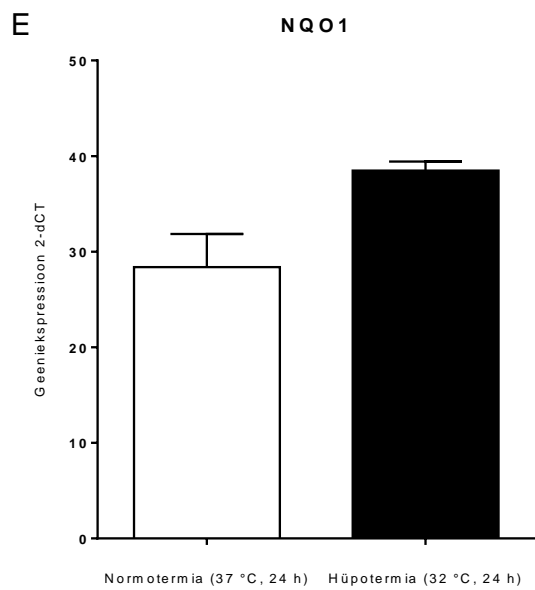
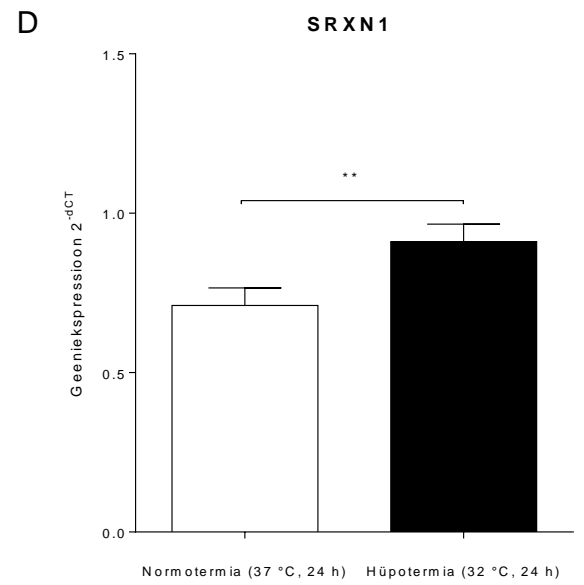
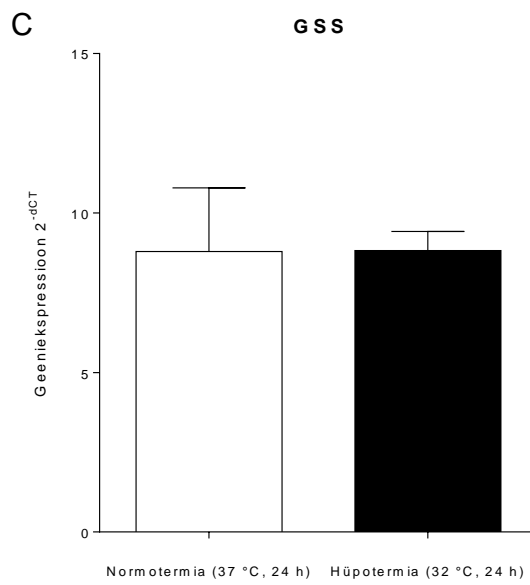
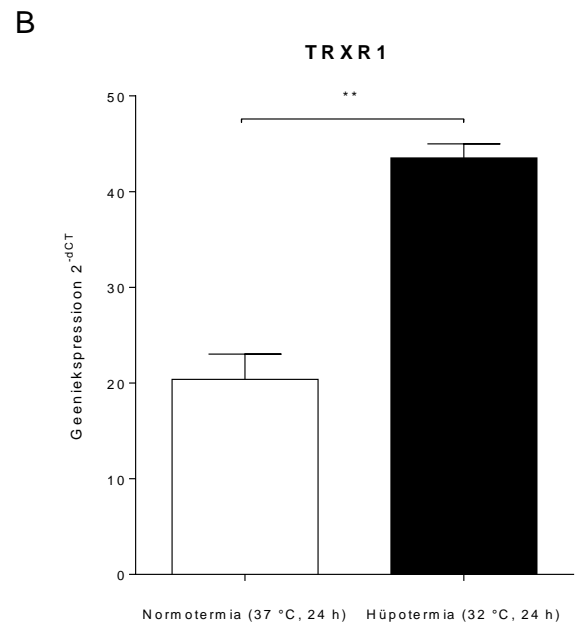
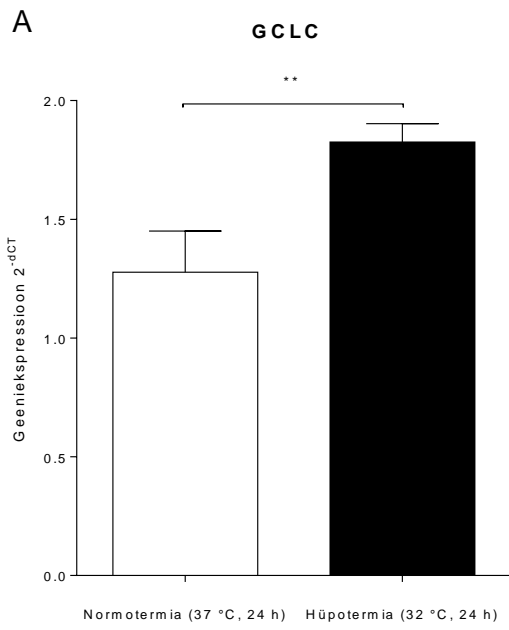
Selleks et välja selgitada, kas glutatiooni süsteemiga seotud geenide induktsioon võib üle kanduda ka terapeutiliselt olulisteks biokeemilisteks muutusteks, mõõtsime glutatiooni kui põhilise intratsellulaarse antioksidandi taset rakkudes. Glutatiooni reduktaasil põhinev ensüümaatilise analüüs näitas, et hüpotermia suurendab rakusisest totaalset glutatiooni muutmata oksüdeeritud glutatiooni taset (joonis 11 A-B).

Kooskõlas HeLa rakkudest saadud tulemustega näitavad katsed HepG2 rakuliinis, et hüpotermia tõstab kahe peamise antioksidatiivses süsteemis olulise geeni ekspressiooni – GCLC ja TRXR1 – 8 tundi peale hüpotermiat ning nende baastase taastub 24 tundi hiljem (joonis 12 B-C).

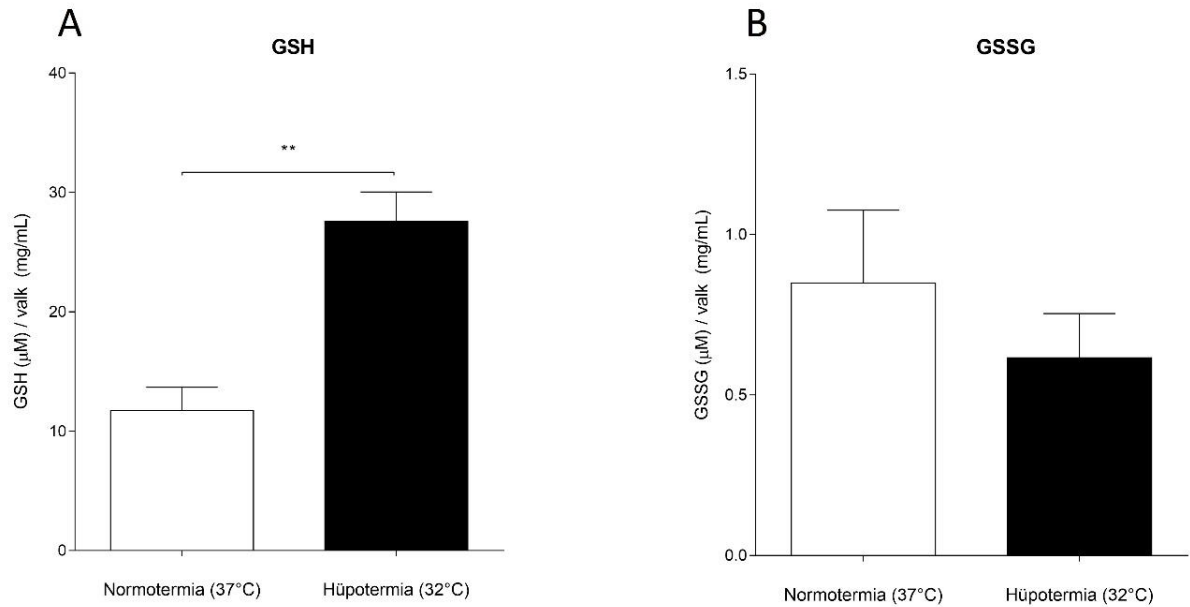
Kuna need geenid on NRF2 kontrolli all, siis kasutasime antioksidatiivse süsteemi induktsiooni ja transkriptsioonifaktor NRF2 aktivatsiooni seose uurimiseks ARE lutsiferaasi reporterit.

Saadud tulemused näitavad, et hüpotermia tõstab NRF2 reporteri aktiivsust 8 tundi peale hüpotermiat ning saavutab 24 tunni möödudes uuesti normotermilise taseme (joonis 12 A). See korreleerub positiivselt antioksidatiivse süsteemi geenide ekspressioonidünaamikaga (joonis 12 B-C).

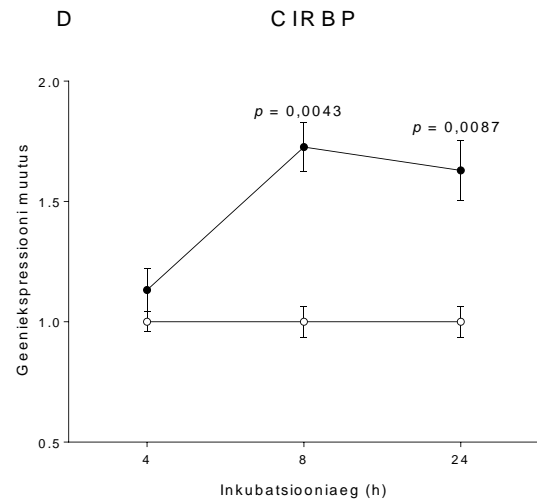
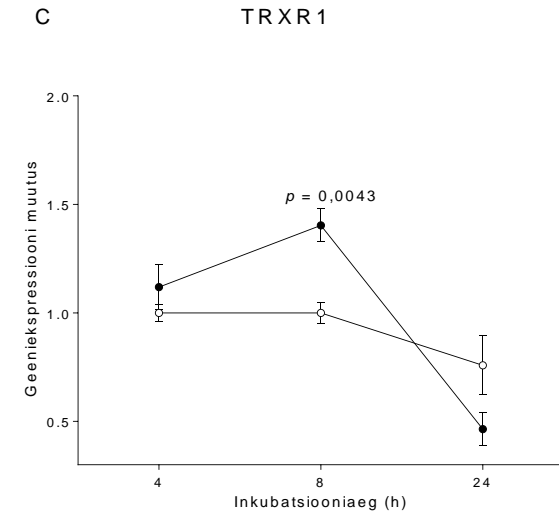
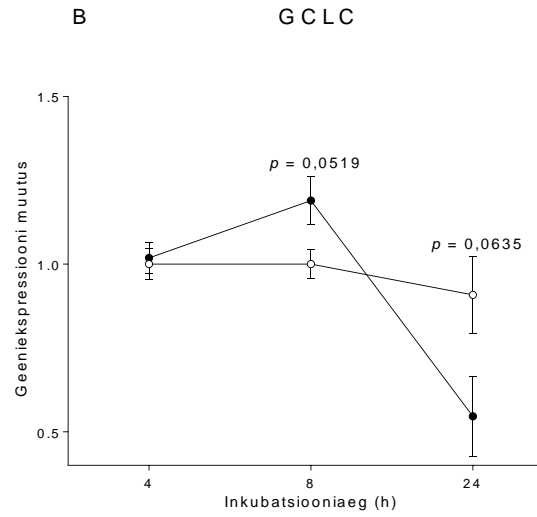
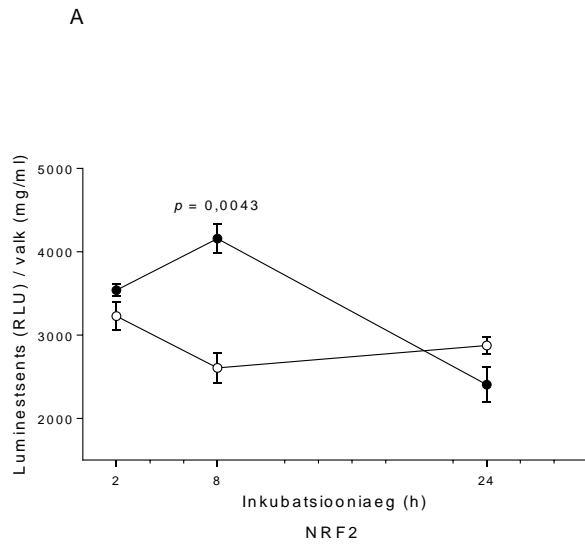
Reportersüsteemi täpsust kontrollisime reaktiivsete hapnikuosakeste indutseerijate tert-BHQ ja DL-Sulforafaaniga, mis tõstavad NRF2 aktiivsust normotermias. Samas antioksidant N-atsetüülsüsteiin langetab seda. Hüpotermia aktiveerib NRF2 sama tugevalt kui tert-BHQ ja DL-Sulforafaan ning selle efekti blokeerib N-atsetüülsüsteiin (joonis 12 E).



**Joonis 10.** Antioksidatiivses süsteemis oluliste geenide (A) GCLC, (B) TRXR1, (C) GSS, (D) SRXN1, (E) NQO1 ekspressioon HeLa rakkudes normotermias (37 °C, 24 h) ja hüpotermias (32 °C, 24 h). (F) CIRBP geeni ekspressiooni kasutati hüpotermilise efekti positiivse kontrollina. Joonistel on näidatud mõõtmiste keskmised (n = 5–6). Statistiline analüüs viidi läbi Mann-Whitney U-testiga. \*\*,  $p < 0,01$ .

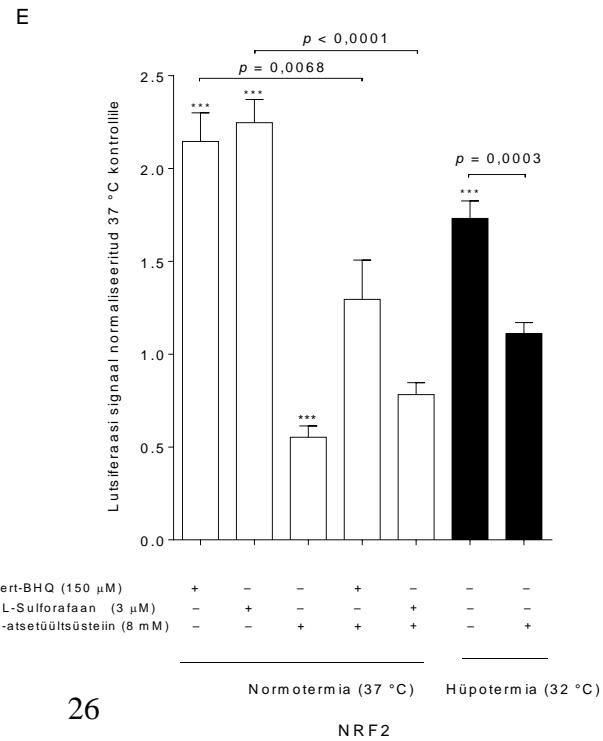


**Joonis 11.** Hüpotermia mõju totaalsele GSH-le ja redutseeritud GSSG-le HeLa rakkudes. Joonisel on näidatud mõõtmiste keskmised (n = 5–6). Statistiline analüüs viidi läbi Mann-Whitney U-testiga. \*\*,  $p < 0$ ,



○ Normotermia (37 °C)

● Hüpotermia (32 °C)



**Joonis 12.** (A) NRF2 lutsiferaasi reporteri aktiivsus HepG2 rakkudes hüpothermias. Graafikul on toodud mõõtmiste keskmised ( $n = 5-6$ ). (B) GCLC (C) TRXR1 ja (D) CIRBP geeniekspressiooni ajaseeriad HepG2-ARE rakkudes normotermias ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ja hüpothermias ( $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). CIRBP on kasutatud positiivse kontrollina ning graafikutel on näidatud mõõtmiste keskmised ( $n = 4-5$ ). (E) NRF2 lutsiferaasi reporteri aktiivsus HepG2 rakkudes vastusena hüpothermiale ja oksüdatiivset stressi tekitavatele ainetele. NRF2 aktiivsus on normaliseeritud kontrollile  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures. Reaktiivseid hapnikuühendeid indutseerivaid aineid tert-BHQ ( $150\text{ }\mu\text{M}$ ), DL-Sulforafaan ( $3\text{ }\mu\text{M}$ ) ja antioksidanti N-atsetüülsüsteiini ( $8\text{ mM}$ ) kasutati positiivsete kontrollidena. Graafikul on toodud mõõtmiste keskmised kolmest sõltumatust katses ( $n = 10-12$ ). Rakke inkubeeriti 8 tundi. Statistiline analüüs viidi läbi Mann-Whitney U-testiga. \*\*,  $p < 0,01$  võrreldes vastava ajapunkti kontrolliga normotermias. \*\*\*,  $p < 0,0001$  võrreldes vastava kontrolliga  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures.

Vaatamata sellele, et isheemilise kahjustuse uurimiseks kasutatakse laialdaselt pigem loomudele, ei paku need piisavalt võimalusi terapeutilise hüpothermia mehhanismide väljaselgitamiseks. Väga keeruline on eristada, millised rakule stressi tekitavad ühendid on seotud toitainete vaeguse, hapniku puuduse, immuunvastuse ja hüpothermiaga. NRF2 on transkriptsioonifaktor, mis aitab rakul toime tulla oksüdatiivse stressiga (Vomhof-DeKrey, 2012). Seepärast uuritigi magistritöös, kas hüpothermia üksi on efekt NRF2 signaalirajale.

Varasemad tööd on näidanud, et hüpothermia suurendab NRF2 valgu ekspressiooni *in vivo* (Gong jt., 2012; Wu jt., 2015) ja see ühtib suurenenud antioksidatiivse ensüümi MnSOD aktiivsusega (Gong jt., 2012). Siinse uurimuse raames läbiviidud eksperimendid demonstreerivad, et hüpothermia suudab ülesreguleerida NRF2 sihtmärkgeene, mis on olulised glutatiooni, tioredoksiini ja sulfiredoksiini süsteemides. NRF2 aktiivsuse ajaline dünaamika näitab, et NRF2 aktiveerub mõne tunni jooksul pärast hüpothermiat, misjärel hakkab järk-järgult langema, kuni saavutab uuesti algtaseme 24 tundi peale hüpothermia initsiatsiooni.

Reperfusiooni tagajärjel toodavad rakud suurel hulgal vabu radikaale, mistõttu on raku antioksidatiivsed kaitsemehhanismid ülekoormatud. Väikeses koguses on reaktiivsed hapniku- ja lämmastikuühendid signaalmolekulideks, kuid suures koguses kahjustavad nad biomolekule ja organelle. Võiks arvata, et hüpothermia on rakule stressisignaali, põhjustades seega antioksidatiivsete radade aktivatsiooni. Varasemates uuringutes on aga näidanud, et sügav hüpothermia ( $< 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) võib ROS-ide tootmist suurendada, kuid mõõdukas hüpothermia ( $32\text{ }^{\circ}\text{C} - 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) hoopis vähendab nende hulka (Camara jt, 2004; Gong jt, 2012; Yenari ja Han, 2012). Glutatiooni süsteem on üks olulisemaid antioksidatiivseid kaitse süsteeme rakkudes, hoides ära vabade radikaalide akumulierumise (Exner jt., 2000). Siinse töö tulemusena saab väita, et hüpothermia tõstab totaalse glutatiooni taset, kuid ei muuda redutseeritud glutatiooni hulka. See kinnitab taaskord, et hüpothermia tõstab antioksidatiivset potentsiaali, kuid ei tekita oksüdatiivset stressi.

Varasemalt ei ole hüpotermia efekti nii mitmetasandiliselt uuritud. Antud magistr töö tulemused kaardistavad kolmel eri tasandil hüpotermiast tingitud antioksidatiivse süsteemi aktivatsiooni, alustades 1) transkriptsioonifaktor NRF2-st, 2) minnes üle geeniekspressioonile (NRF2 sihtmärkgeenid) ja lõpetades 3) antioksidandiga (glutatioon). Töö tulemused võivad aidata selgitada, millise mehhanismi kaudu avalduvad hüpotermia kaitsvad efektid. NRF2 aktivatsioon hüpotermias võib kaitsta reperfusiooni ajal ROS-ide tekke eest ning seeläbi vähendada kahjustust organismile.

## KOKKUVÕTE

Magistritöö eesmärk oli kindlaks teha, kas hüpothermia suudab aktiveerida antioksidatiivses süsteemis olulisi gene ja suurendada glutatiooni taset. Lisaks tahtsime saada infot hüpothermia ja antioksidatiivse süsteemi transkriptsioonifaktori NRF2 vahel.

Isheemia-reperfusion ja sellele järgnev koekahjustus mõjutavad mehhanisme, mis tegelevad reaktiivste hapnikuühendite elimineerimisega. Terapeutiline hüpothermia on üks võimalikest ravimeetoditest isheemilise kahjustuse vähendamiseks. Hüpothermia mõju raku stressivastusele on väga vähe uuritud ja hüpothermia poolt pakutav kaitse ei pruugi tuleneda ainult tema võimest alandada metabolismi.

Transkriptsioonifaktor NRF2 on oksüdantide ja antioksidantite vahelise tasakaalu regulatsioonis kesksel kohal. Töö tulemused näitavad, et hüpothermia suurendab rakkudes antioksidatiivset potentsiaali reguleerides üles NRF2 aktiivuse, antioksidatiivses süsteemis oluliste geenide ekspressiooni ning tõstes glutatiooni taset. See võib aidata luua uusi kliinilisi meetodeid isheemia-reperfusioni kahjustuse raviks.

## **The effects of hypothermia on the induction of the antioxidative system**

Ave Auser

### **SUMMARY**

Therapeutic hypothermia is used to treat ischemia reperfusion injury caused by cardiac arrest, stroke and neonatal hypoxia. The relatively high oxygen and glucose demand makes the brain extremely vulnerable to hypoxic-ischemic damage (Talma *et al.*, 2016). Which in turn, induces neuronal damage by mitochondrial dysfunction and oxidative injury, ER stress, neuronal excitotoxicity, and a neuroinflammatory response (Sanderson *et al.*, 2013).

Prolonged moderate cerebral hypothermia initiated within a few hours after severe ischemia can reduce subsequent neuronal death and improve behavioral recovery (Bernard *et al.*, 2002; Miyazawa *et al.*, 2003; Yanamoto *et al.*, 2001). The neuroprotective role of hypothermia is also well established in experimental animal models (Dietrich *et al.*, 2009; Kawai *et al.*, 2000). Although clinical trials and animal studies help to improve hypothermia treatment, there is relatively little knowledge on why hypothermia provides any protection at all, apart from inducing metabolic depression (Yenari *et al.*, 2004). From a research standpoint, finding molecular mechanisms behind the therapeutic effect of cooling is of paramount importance, as it will pave the way for making drugs targeting therapeutically relevant pathways without the confounding effects associated with body cooling.

The aim of the current Master's thesis was to examine the effect of hypothermia on the expression of important antioxidant system genes and on glutathione levels. Also, to gain information between hypothermia and an important antioxidative transcription factor NRF2.

Production of reactive oxygen species during hypoxia-reperfusion has been suggested as a possible mechanism of hypoxic injury (Burwell *et al.*, 2009; Eltzhig and Eckle, 2011; Murphy and Steenbergen, 2008; Yellon and Hausenloy, 2007). We investigated whether hypothermia could activate the antioxidant system, which could prevent the damaging effects of ROS.

In previous studies, it has been shown that hypothermia increases NRF2 protein expression *in vivo* (Gong *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2015) that was consistent with increased antioxidant enzyme manganese superoxide dismutase (MnSOD) activity (Gong *et al.*, 2012). Low temperatures also attenuate oxidative stress due to ischemia reperfusion injury by reducing free radical production (Alva *et al.*, 2010; Camara *et al.*, 2004; Diestel *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2009). We showed

that hypothermia can up-regulate both NRF2 as well as its targets and increase the level of total glutathione while not raising the levels of oxidized glutathione. Temporal dynamics of NRF2 activity showed rapid activation within a few hours from the onset of hypothermia followed by a gradual decline to baseline by 24 h.

To our knowledge, this is the first study to report evidence that hypothermia effect can translate into the activation of the antioxidant system on three levels of the hierarchy from 1) transcription factor (NRF2) to 2) gene expression (NRF2 target genes) to 3) antioxidant (glutathione).

## **TÄNUSÕNAD**

Täna oma tublisid juhendajaid Kattri-Liis Esklat ja Hendrik Luuki suure abivalmiduse, kannatlikkuse, õpetamise ja põneva teemavaliku eest.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Aiyengar, T.A., Chiranjeevi, P. and Rani, H.S. (2017). Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Breast Cancer, Nitric Oxide Synthase - Simple Enzyme-Complex Roles, Dr. Seyed Soheil Saeedi Saravi (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/67493.
- Alva, N., Carbonell, T., Palomeque, J. (2010). Hypothermic protection in an acute hypoxia model in rats: Acid-base and oxidant/antioxidant profiles. *Resuscitation*, 81 (5): 609–16.
- Arnér, E.S. (2009). Focus on mammalian thioredoxin reductases – important selenoproteins with versatile functions. *Biochim Biophys Acta*, 1790 (6): 495–526.
- Arrich, J., Holzer, M., Havel, C., Müllner, M., Herkner, H. (2016). Hypothermia for neuroprotection in adults after cardiopulmonary resuscitation. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2: CD004128.
- Azzopardi, D., Strohm, B., Marlow, N., Brocklehurst, P., Deierl, A., Eddama, O., Goodwin, J., Halliday, H. L., Juszczak, Ed., Kapellou, O., Levene, M., Linsell, L., Omar, O., Thoresen, M., Tusor, N., Whitelaw, A., Edwards, A. D. (2014). Effects of hypothermia for perinatal asphyxia on childhood outcomes. *N Engl J Med*, 371 (2): 140–149.
- Barone, F.C., Feuerstein, G.Z., White, R.F. (1997). Brain cooling during transient focal ischemia provides complete neuroprotection. *Neurosci Biobehav Rev*, 21: 31–44.
- Beauchamp, N., Bryan, R. (1998). Acute cerebral ischemic infarction: a pathophysiologic review and radiologic perspective. *AJR*, 171: 73–84.
- Bernard, S.A., Gray, T.W., Buist, M.D., Jones, B.M., Silvester, W., Gutteridge, G., Smith, K. (2002). Treatment of comatose survivors of out-of hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med*, 346: 557–563.
- Bhatia, M., Karlenius, T. C., Di Trapani G., and Tonissen, K. F. (2013). The Interaction Between Redox and Hypoxic Signalling Pathways in the Dynamic Oxygen Environment of Cancer Cells, *Carcinogenesis*, Dr. Kathryn Tonissen (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/55185.
- Bian, J., Deng, B., Xu, L., Xu, X., Wang, N., Hu, T., Yao, Z., Du, J., Yang, L., Lei, Y., Li, X., Sun, H., Zhang, X., You, Q. (2014). 2-Substituted 3-methylnaphtho[1,2-b]furan-4,5-diones as novel L-shaped ortho-quinone substrates for NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 82C: 56–67.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5 (1): 9–19.
- Bozonet, S.M., Findlay, V.J., Day, A.M., Cameron, J., Veal, E.A., Morgan, B.A. (2005). Oxidation of a eukaryotic 2 Cys peroxiredoxin is a molecular switch controlling the transcriptional response to increasing levels of hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 23319–23327.
- Brigelius-Flohe, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med*, 27: 951–965.
- Burwell, L. S., Nadtochiy, S. M. & Brookes, P. S. (2009). Cardioprotection by metabolic shut-down and gradual wake-up. *J. Mol. Cell. Cardiol*, 46: 804–810.
- Camara, A.K., Riess, M.L., Kevin, L.G., Novalija, E., Stowe, D.F. (2004). Hypothermia augments reactive oxygen species detected in the guinea pig isolated perfused heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286 (4): H1289–H1299.
- Canning, P., Sorrell, F. J., & Bullock, A. N. (2015). Structural basis of Keap1 interactions with NRF2. *Free Radical Biology & Medicine*, 88(Pt B), 101–107.
- Chai, Y.C., Ashraf, S.S., Rokutan, K., Johnston, Jr R.B., Thomas, J.A. (1994). S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys*, 310: 273–281.

- Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., Lesnefsky, E.J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem*, 278 (38): 36027–36031.
- Colbourne, F., Li, H., Buchan, A.M. (1999). Indefatigable CA1 sector neuroprotection with mild hypothermia induced 6 hours after severe forebrain ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, 19: 742–749.
- Colbourne, F., Sutherland, G., Corbett, D. (1997). Postischemic hypothermia: a critical appraisal with implications for clinical treatment. *Mol Neurobiol*, 14: 171–201.
- De Georgia, M.A., Krieger, D.W., Abou-Chebl, A., Devlin, T.G., Jauss, M., Davis, S.M., Koroshetz, W.J., Rordorf, G., Warach, S. (2004). Cooling for Acute Ischemic Brain Damage (COOLAID). A feasibility trial of endovascular cooling. *Neurology*, 63 (2): 312–317.
- Dell'anna, A.M., Scolletta, S., Donadello, K., Taccone, F.S. (2014). Early neuroprotection after cardiac arrest. *Curr Opin Crit Care*, 20 (3): 250–258.
- Diestel, A., Drescher, C., Miera, O., Berger, F., Schmitt, K.R. (2011). Hypothermia protects H9c2 cardiomyocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced apoptosis. *Cryobiology*, 62 (1): 53–61.
- Dietrich, W. D., Atkins, C. M., & Bramlett, H. M. (2009). Protection in Animal Models of Brain and Spinal Cord Injury with Mild to Moderate Hypothermia. *Journal of Neurotrauma*, 26 (3): 301–312.
- Dinkova-Kostova, A. T., & Talalay, P. (2010). NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501 (1): 116–123.
- Du, Y., Zhang, H., Lu, J., Holmgren, A. (2012). Glutathione and glutaredoxin act as a backup of human thioredoxin reductase 1 to reduce thioredoxin 1 preventing cell death by aurothioglucose. *J. Biol.Chem*, 287: 38210–38219.
- Duncker, D.J., Klassen, C.L., Ishibashi, Y., Herrlinger, S.H., Pavek, T.J., Bache, R.J. (1996). Effect of temperature on myocardial infarction in swine. *Am J Physiol*, 270 (4 Pt 2): H1189–199.
- Eltzschig, H. K. & Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature Med*, 17: 1391–1401.
- Exner, R., Wessner, B., Manhart, N., Roth, E. (2000). Therapeutic potential of glutathione. *Wien Klin Wochenschr*, 112 (14): 610–616.
- Fay, T. (1945). Observations on generalized refrigeration in cases of severe cerebral trauma. *Assoc Res Nerv Ment Dis Proc*, 24, 611–619.
- Findlay, V.J., Tapiero, H., Townsend, D.M. (2005). Sulfiredoxin: a potential therapeutic agent? *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 59: 374–379.
- Findlay, V.J., Townsend, D.M., Morris, T.E., Fraser, J.P., He, L., Tew, K.D. (2006). A novel role for human sulfiredoxin in the reversal of glutathionylation. *Cancer Research*, 66: 6800–6806.
- Georgiadis, D., Schwarz, S., Aschoff, A., Schwab, S. (2002). Hemicraniectomy and moderate hypothermia in patients with severe ischemic stroke. *Stroke*, 33(6): 1584–1588.
- Ginsberg, M.D., Sternau, L.L., Globus, M.Y.-T., Dietrich, W.D., Busto, R. (1992). Therapeutic modulation of brain temperature: relevance to ischemic brain injury. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 4: 189–225.
- Gluckman, P.D., Wyatt, J.S., Azzopardi, D., Ballard, R., Edwards, A.D., Ferriero, D.M., Polin, R.A., Robertson, C.M., Thoresen, M., Whitelaw, A., Gunn, A.J. (2005). Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet*, 365 (9460): 663–70.
- Gong, P., Li, C.S., Hua, R., Zhao, H., Tang, Z.R., Mei, X., Zhang, M.Y., Cui, J. (2012). Mild hypothermia attenuates mitochondrial oxidative stress by protecting respiratory enzymes and upregulating MnSOD in a pig model of cardiac arrest. *PLoS One*, 7 (4): e35313.

- Gorrini, C., Harris, I.S., Mak, T.W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12: 931–947.
- Guilford, F.T., Hope, J. (2014). Deficient Glutathione in the Pathophysiology of Mycotoxin-Related Illness. *Toxins*, 6 (2): 608–623.
- Gupta, A.K., Al-Rawi, P.G., Hutchinson, P.J., Kirkpatrick, P.J. (2002). Effect of hypothermia on brain tissue oxygenation in patients with severe head injury. *Br J Anaesth*, 88 (2): 188–192.
- Hamamoto, H., Sakamoto, H., Leshnower, B.G., Parish, L.M., Kanemoto, S., Hinmon, R., Plappert, T., Miyamoto, S., St John-Sutton, M.G., Gorman, J.H. 3rd, Gorman, R.C. (2009). Very mild hypothermia during ischemia and reperfusion improves postinfarction ventricular remodeling. *Ann Thorac Surg*, 87: 172.
- Hartikainen, J.M., Tengstrom, M., Kosma, V.M., Kinnula, V.L., Mannermaa, A., Soini, Y. (2012). Genetic polymorphisms and protein expression of NRF2 and Sulfiredoxin predict survival outcomes in breast cancer. *Cancer Research*. 72 (21): 5537–5546.
- Hayashi, T., Ueno, Y., Okamoto, T: (1993). Oxidoreductive regulation of nuclear factor kappa B. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin. *J Biol Chem*, 268: 11380–11388.
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.*, 54: 237–271.
- Holmgren, A., Björnstedt, M. (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol*, 252: 199–208.
- Holzer, M., Bernard, S.A., Hachimi-Idrissi, S., Roine, R.O., Sterz, F., Müllner, M., Collaborative Group on Induced Hypothermia for Neuroprotection After Cardiac Arrest. (2005). Hypothermia for neuroprotection after cardiac arrest: systematic review and individual patient data meta-analysis. *Crit Care Med*, 33 (2): 414–418.
- Hua, Y., Hisano, K., Morimoto, Y. (2010). Effect of mild and moderate hypothermia on hypoxic injury in nearly pure neuronal culture. *J. Anesth*, 24 (5): 726–732.
- Huang, C.H., Chen, H.W., Tsai, M.S., Hsu, C.Y., Peng, R.H., Wang, T.D., Chang, W.T., Chen, W.J. (2009). Antiapoptotic cardioprotective effect of hypothermia treatment against oxidative stress injuries. *Acad Emerg Med*, 16 (9): 872–880.
- Ilmjärvi, S., Hundahl, C. A., Reimets, R., Nüitsoo, M., Kolde, R., Vilo, J., Vasar, E., Luuk, H. (2014). Estimating differential expression from multiple indicators. *Nucleic Acids Research*, 42 (8): e72. <https://doi.org/10.1093/nar/gku158>.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., & Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by NRF2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & Development*, 13 (1): 76–86.
- Iyanagi, T., Yamazaki, I. (1970). One-electron-transfer reactions in biochemical systems. V. Difference in the mechanism of quinone reduction by the NADH dehydrogenase and the NAD(P)H dehydrogenase (DT-diaphorase). *Biochim Biophys Acta*, 216: 282–94.
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 298: 229–317.
- Kataoka, K., Noda, M., & Nishizawa, M. (1994). Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun. *Molecular and Cellular Biology*, 14 (1): 700–712.
- Kawai N, Okauchi M, Morisaki K, Nagao S. (2000). Effects of delayed intraischemic and postischemic hypothermia on a focal model of transient cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 31: 1982–1989.
- Kim, C.Y., Bae, M.H., Kim, N.K., Yang, Y.A., Kim, K.Y., Lee, J.H., Eun, J.S., Cho, Y. (2015). Case of recurrent ventricular fibrillations with osborn wave developed during therapeutic hypothermia. *Korean Circ*, J45: 81.

- Kobayashi, A., Kang, M.I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., Yamamoto, M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of NRF2. *Mol Cell Biol*, 24: 7130–9.
- Lee, J. H., Zhang, J., & Yu, S. P. (2017). Neuroprotective mechanisms and translational potential of therapeutic hypothermia in the treatment of ischemic stroke. *Neural Regeneration Research*, 12 (3): 341–350.
- Lee, J.M., Zipfel, G.J., Choi, D.W. (1999). The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 399: A7–A14.
- Li, Y., Jaiswal, A.K. (1994). Human antioxidant-response-element-mediated regulation of type 1 NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene expression. Effect of sulfhydryl modifying agents. *Eur J Biochem*, 226: 31–39.
- Liochev, S.I., Fridovich, I. (2002). The Haber-Weiss cycled 70 years later: an alternative view. *Redox Rep*, 7: 55–57.
- Lo, E., Moskowitz, M., Jacobs, T. (2005). Exciting, radical, suicidal: how brain cells die after stroke. *Stroke*, 36: 189–192.
- Lu, J., Qian, H.Y., Liu, L.J., ... Zhu, C.L. (2014). Mild hypothermia alleviates excessive autophagy and mitophagy in a rat model of asphyxial cardiac arrest. *Neurol. Sci*, 35 (11): 1691–1699.
- Luscombe, M., Andrzejowski, J.C. (2006). Clinical applications of induced hypothermia. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain*, 6 (1): 23–27.
- Mackensen, G.B., McDonagh, D.L., Warner, D.S. (2009). Perioperative hypothermia: use and therapeutic implications. *J. Neurotrauma*, 26 (3): 342–358.
- Maher, J., Hachinski, V. (1993). Hypothermia as a potential treatment for cerebral ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 5: 277–300.
- Meister, A. (1994). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem*, 269: 9397e9400.
- Meloni, B.P., Mastaglia, F.L., Knuckey, N.W. (2008). Therapeutic applications of hypothermia in cerebral ischaemia. *TherAdvNeurolDisord*, 1 (2): 12–35.
- Miller, D.M., Buettner, G.R., Aust, S.D. (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med*, 8: 95–108.
- Miyazawa, T., Tamura, A., Fukui, S., Hossmann, K. A. (2003). Effect of mild hypothermia on focal cerebral ischemia. Review of experimental studies. *Neurol Res*, 25: 457–464.
- Montero, A.J., Jassem, J. (2011). Cellular redox pathways as a therapeutic target in the treatment of cancer. *Drugs* 71: 1385–1396.
- Motohashi, H., Shavit, J. A., Igarashi, K., Yamamoto, M., & Engel, J. D. (1997). The world according to Maf. *Nucleic Acids Research*, 25 (15): 2953–2959.
- Murphy, E. & Steenbergen, C. (2008). Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol. Rev*, 88: 581–609.
- Noh, Y.H., Baek, J.Y., Jeong, W., Rhee, S.G., Chang, T.S. (2009). Sulfiredoxin translocation into mitochondria plays a crucial role in reducing hyperoxidized peroxiredoxin III. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 8470–8477.
- O'Neill, W.W., Dixon, S.R. (2004). The year in interventional cardiology. *J Am Coll Cardiol*, 43: 875.
- O'Neill, W.W., Dixon, S.R., Grines, C.L. (2005). The year in interventional cardiology. *J Am Coll Cardiol*, 45: 1117.
- Papp, L.V., Lu, J., Holmgren, A., Khanna, K.K. (2007). From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid. Redox Signal.*, 9: 775–806.
- Polderman, K.H. (2004). Application of therapeutic hypothermia in the ICU: Opportunities and pitfalls of a promising treatment modality. *Intensive Care Med*, 30: 556–575.

- Polderman, K.H., Herold, I. (2009). Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: practical considerations, side effects, and cooling methods. *Crit Care Med*, 37 (3): 1101–1120.
- Polderman, K.H., Tjong Tjin Joe, R., Peerdeman, S.M., Vandertop, W.P., Girbes, A.R.J. (2002). Effects of artificially induced hypothermia on intracranial pressure and outcome in patients with severe traumatic head injury. *Intensive Care Med*, 28 (11): 1563–1567.
- Rhee, S.G., Jeong, W., Chang, T.S., Woo, H.A. (2007). Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance. *Kidney Int Suppl*, (106): S3–8.
- Rushmore, T.H., Kong, A.N. (2002). Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab*, 3 (5): 481–90.
- Sanderson, T.H., Reynolds, C.A., Kumar, R., Przyklenk, K., Huttemann, M. (2013). Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Mol Neurobiol*, 47 (1): 9–23.
- Schubert, A. (1995). Side effects of mild hypothermia. *J. Neurosurg. Anesthesiol*, 7 (2): 139–147.
- Schwab, S., Schwarz, S., Spranger, M., Keller, E., Bertram, M., Hacke, W. (1998). Moderate hypothermia in the treatment of patients with severe middle cerebral artery infarction. *Stroke*, 29 (12): 2461–2466.
- Shankaran, S., Laptook, A.R., Ehrenkranz, R.A., Tyson, J.E., McDonald, S.A., Donovan, E.F., Fanaroff, A.A., Poole, W.K., Wright, L.L., Higgins, R.D., Finer, N.N., Carlo, W.A., Duara, S., Oh, W., Cotten, C.M., Stevenson, D.K., Stoll, B.J., Lemons, J.A., Guillet, R., Jobe, A.H; National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. (2005). Whole-body hypothermia for neonates with hypoxicischemic encephalopathy. *N Engl J Med*, 353 (15): 1574–84.
- Siegel, D., Bolton, E.M., Burr, J.A., Liebler, D.C., Ross, D. (1997). The reduction of alpha-tocopherolquinone by human NAD(P)H: quinone oxidoreductase: the role of alpha-tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant. *Mol Pharmacol*, 52: 300–5.
- Siegel, D., Ross, D. (2000). Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues. *Free Radic Biol Med*, 29: 246–53.
- Silveira, R.C., Procianoy, R.S. (2015). Hypothermia therapy for newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *J Pediatr (Rio J)*, 91(6 Suppl 1): S78–83.
- Steinberg GK. (2001). Delayed induction and long-term effects of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: neurological outcome and infarct size. *J. Neurosurg*. 94, 90–96.
- Zhi, D., Zhang, S., Lin, X. (2003). Study on therapeutic mechanism and clinical effect of mild hypothermia in patients with severe head injury. *Surg Neuro*, 59: 381–385.
- Talma, N., Kok, W.F., de Veij Mestdagh, C.F., Shanbhag, N.C., Bouma, H.R., Henning, R.H. (2016). Neuroprotective hypothermia – Why keep your head cool during ischemia and reperfusion. *Biochim Biophys Acta*, 1860(11 Pt A): 2521–2528.
- Tan, S.X., Greetham, D., Raeth, S., Grant, C.M., Dawes, I.W., Perrone, G.G. (2010). The thioredoxin-thioredoxin reductase system can function in vivo as an alternative system to reduce oxidized glutathione in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 285: 6118–6126.
- The Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group. (2002). Mild therapeutic hypothermia to improve neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med*, 346: 549–556.
- Tissier, R., Chenoune, M., Ghaleh, B., Cohen, M.V., Downey, J.M., Berdeaux, A. (2010). The small chill: mild hypothermia for cardioprotection? *Cardiovasc Res*, 88: 406–414.
- Ueno, M., Masutani, H., Arai, R.J., Yamauchi, A., Hirota, K., Sakai, T., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Yodoi, J., Nikaido, T. (1999). Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *J Biol Chem*, 274: 35809–35815.

- Wagner, C.L., Eicher, D.J., Katikaneni, L.D., Barbosa, E., Holden, K.R. (1999). The use of hypothermia: a role in the treatment of neonatal asphyxia? *Pediatr Neurol*, 21: 429–443.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol. Cell. Biochem*, 266: 37–56.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160 (1): 1–40.
- Watson, W. H., Chen, Y., Jones, D. P. (2003). Redox state of glutathione and thioredoxin in differentiation and apoptosis. *BioFactors*, 17: 307–314.
- White, B.C., Sullivan, J.M., DeGracia, D.J., O’Neil, B.J., Neumar, R.W., Grossman, L.I., Rafols, J.A., Krause, G.S. (2000). Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci*, 179: 1–33.
- Vomhof-Dekrey, E.E., Picklo, M.J. Sr. (2012). The NRF2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. *J Nutr Biochem*, 23 (10): 1201–1206.
- Won, S. J., Kim, J.-E., Cittolin-Santos, G. F., & Swanson, R. A. (2015). Assessment at the Single-Cell Level Identifies Neuronal Glutathione Depletion As Both a Cause and Effect of Ischemia-Reperfusion Oxidative Stress. *The Journal of Neuroscience*, 35(18): 7143–7152.
- Wu, Z.Y. (2015). Role of NRF2 signal pathway in rats with deep hypothermia ischemia/reperfusion injury undergoing remote postconditioning. *Genet Mol Res*, 14 (1): 492–499.
- Yanamoto, H., Nagata, I., Niitsu, Y., Zhang, Z., Xue, J.H., Sakai, N., Kikuchi, H. (2001). Prolonged mild hypothermia therapy protects the brain against permanent focal ischemia. *Stroke*, 32: 232–239.
- Yellon, D. M. & Hausenloy, D. J. (2007). Myocardial reperfusion injury. *N. Engl. J. Med*, 357: 1121–1135.
- Yenari, M., Kitagawa, K., Lyden, P., & Perez-Pinzon, M. (2008). Metabolic Downregulation: A Key to Successful Neuroprotection? *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 39 (10): 2910–2917.
- Yenari, M., Wijman, C., Steinberg, G. (2004). Effects of hypothermia on cerebral metabolism, blood flow and autoregulation. In: Mayer, S., Sessler, D., editors. *Hypothermia in Neurocritical Care*. Marcel Dekker, Inc; New York: pp. 141–178.
- Yenari, M.A., Han, H.S. (2012). Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci*, 13 (4): 267–78.
- Yin, F., Sancheti, H., & Cadenas, E. (2012). Mitochondrial Thiols in the Regulation of Cell Death Pathways. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17 (12): 1714–1727.

## KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Maailma Terviseorganisatsiooni (WHO) lehekülg:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> (28.05.2017)

Joonis Intechopen leheküljelt:

<https://www.intechopen.com/source/html/17260/media/image5.png> (28.05.2017)

Biotium Firefly Luciferase Assay Kit'i infoleht:

<https://biotium.com/wp-content/uploads/2013/07/PI-30003.pdf> (28.05.2017)

Thermo Scientific Pierce™ BCA Protein Assay Kit'i infoleht:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225> (28.05.2017)

Cayman Chemical Glutathione Assay Kit'i infoleht:

<https://www.caymanchem.com/pdfs/703002.pdf> (28.05.2017)

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Ave Auser

(sünnikuupäev: 26.10.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Hüpotermia mõju antioksidatiivse süsteemi induktsioonile

mille juhendajad on Katri-Liis Eskla, Hendrik Luuk ja Raivo Raid,

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 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, 31.05.2017