

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Kristi Reispass

**Hüpotermia mõju antioksüdatiivsele süsteemile**

Bakalaureusetöö

Juhendajad  
Hendrik Luuk  
Kersti Lilleväli

TARTU 2014

## SISUKORD

SISUKORD .....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Terapeutiline hüpotermia.....	6
1.2. Hüpotermia mõju geeniekspressioonile .....	8
1.2.1. <i>Nrf2</i> kontrollitavad signaalrajad .....	9
1.2.2. Glutamaat-tsüsteiin ligaas (GCL).....	10
1.2.3. NAD(P)H dehüdrogenaasi kinoon 1 (NQO1) .....	10
1.2.4. Sulfredoksiin 1 ( <i>Srxn1</i> ).....	11
1.2.5. Tioredoksiini reduktaas 1 ( <i>Trxnrd1</i> ) .....	11
1.2.6. Glutatiooni süntetaas ( <i>Gss</i> ).....	11
1.2.7. Külmatundlik mRNA-d siduv valk ( <i>Cirbp</i> ).....	12
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	13
2.1. Töö eesmärgid .....	13
2.2. Materjal ja meetodika.....	13
2.2.1. Peamine rakukultuur hüpotermia mudelina.....	13
2.2.2. Mikrokiibi eksperiment .....	13
2.2.3. Kvantitatiivne reaalaaja PCR .....	13
2.2.4. Glutatioonitasemete määramine .....	14
2.2.5. Statistiline analüüs.....	15
2.3. Tulemused .....	15
2.3.1. Mikrokiibi analüüs.....	15
2.3.2. Geeniekspressiooni analüüs kvantitatiivse reaalaaja PCRiga .....	16
2.3.1. Glutatiooni mõõtmise tulemused.....	19
2.3.2. Glutatiooni mõõtmiste statistiline analüüs .....	20
2.4. Arutelu.....	20

Kokkuvõte .....	22
The effects of hypothermia to antioxidative system.....	23
SUMMARY .....	23
Tänuavaldused .....	24
Kasutatud kirjandus .....	24
Kasutatud veebiaadressid .....	29
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks .....	30

## KASUTATUD LÜHENDID

AMPA –  $\alpha$ -amino-3-hüdroksüül-5-metüül-4-isoksasool-propionaat

AP – *alkaline phosphatase* (aluseline fosfataas)

Cirbp – *cold-inducible RNA binding protein*

DTNB – 5,5'-ditio-bis-2-(nitrobensoehape) ehk Ellmani regent

FBS – *fetal bovine serum* (veise looteseerum)

GluR2 – glutamaadi retseptor 2

GSH – glutatioon

GSSG – glutatioon disulfiid

HRP – *horse radish peroxidase* (märarõika peroksidaas)

KNS – kesknärvisüsteem

TH – terapeutiline hüpotermia

TNB – 5-tio-2-nitrobensoehape

## SISSEJUHATUS

Kehatemperatuuri langetamist ravi eesmärgil (terapeutiline hüpotermia) kasutatakse eelkõige kesknärvisüsteemi hüpoksilis-isheemiliste kahjustuste leevendamiseks. Ka mitmed uurimused näitavad, et loomudelites vähendab hüpotermia ajuinsuldi järgseid esmaseid kahjustusi ja hoiab ära sekundaarseid. Hüpotermia vähendab ajus ainevahetust, verevarustust, hapniku ja glükoosi tarbimist. Samuti väheneb vabade radikaalide tootmine, apoptoosi ja põletikureaktsioonid. Lisaks soodustab ta uute neuronite teket, angiogeneesi, sünaptoogeneesi. Hüpotermial on võime kaitsta rakku isheemilise seisundi korral, kuid selle protektiivse efekti taga olevad molekulaarsed mehhanismid ei ole veel teada. Hüpotermia terapeutilise toime eest vastutavate molekulaarsete mehhanismide uurimine võib aidata mõista faktoreid, mis pakuvad neuroprotektiivset kaitset (Yenari jt., 2012).

Käesoleva töö eesmärk on uurida, kas hüpotermia mõjutab antioksidatiivset süsteemi ning sellega seotud geenide ekspressiooni. Selleks, et paremini mõista hüpotermia spetsiifilist geeniekspressiooni vastus teostati mikrokiibi eksperiment. Lisaks määrasime hüpotermia (32C) ja normotermia (37kraadi) tingimustes glutatiooni tasemed hiire embrüonaalsetes fibroblastides ning qPCR meetodiga mõõtsime glutatiooni ning tioredoksiini sünteesiradades oluliste geenide ekspressiooni tasemed. Katsed viidi läbi Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditiini instituudis.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Terapeutiline hüpotermia

Kehatemperatuuri langetamine kudede säilitamise eesmärgil pole uudne idee. Madalamate temperatuuride kaitsvale toimele viitavad ka faktid, et siirdamiseks kasutatavate elundite külmutamine võimaldab pikendada elundite transpordiks kuluvat aega ning külma kliimaga aladel leidub rohkelt hästi säilunud eluvorme. Hüpotermia kaitsvat toimet on uuritud juba mõnda aega. Busto jt. (1987) näitasid, et isegi väikesed, kliiniliselt rakendatavad kehatemperatuuri langetamised vähendavad efektiivselt isheemiae järgnevat närvirakkude surma. Terapeutiline jahutamine omab kaitsvat rolli hüpoksilis-isheemiliste seisundite puhul nagu südameseiskumise tagajärjel tekkinud anoksiline ajukahjustus (Bernard jt., 2002) ja vastsündinu hüpoksilis-isheemiline entsefalopaatia (Gluckman jt., 2005; Shankaran jt., 2005). Lisaks on hüpotermia terapeutilist mõju näidatud ka aju ja seljaaju traumade puhul (Dietrich ja Bramlett, 2010; Dietrich jt., 2009). Hüpotermial on tähtis osa ka *suspended animation* rakendustes, mis aeglustavad või seiskavad te ainevahetusprotsesse põhjustamata surma.

Hüpotermia neuroprotektiivse toime seisukohalt on kõige rohkem uuritud fokaalse ja globaalse ajuisheemia loommudeleid. Globaalse ajukahjustuse mudelid üritavad imiteerida südameseiskumise tagajärjel tekkinud ajukahjustusi, fokaalse ajuisheemia mudelites üritatakse luua insulti meenutavat ajukahjustust. Fokaalse ajuisheemia mudelid saab jaotada veel püsiva oklusiooni mudeliteks, kus veresoon jääb blokeerituks (mis kehtib enamike kliiniliste insultide puhul), ja ajutise oklusiooni mudeliteks, kus veresoon avatakse uuesti peale teatud ajaperioodi. Suurem osa laboratoorsetest hüpotermiauuringutest kasutavad väikeseid närilisi, kelle külmutamiseks kasutatakse jahutavat tekki või pritsides uinutatud looma karvastikule vett või alkoholi. Ärkvel ja vabalt liikuvate loomade jahutamist ühest päevast pikemate perioodide jooksul on võimalik saavutada automaatsete vihmutussüsteemide ja ventilaatoritega (Colbourne jt., 1996).

Terapeutiline hüpotermia on kehatemperatuuri langetamine kindlale temperatuurile teatud ajaks ning peale vajaliku toime saavutamist kontrollitud kiirusel keha normaaltemperatuuri taastamine. Patsiendid jahutatakse võimalikult kiiresti 32-34 °C-ni 12-24 tunniks ning seejärel soojendatakse normaalse kehatemperatuurini kiirusega 0,1-0,25 °C/h. Uuringud näitavad, et väikesed langused aju temperatuuris (30-34 °C alandatud normaalselt 36-38 °C kehatemperatuurilt) on sama kaitsvad kui oluliselt madalamad temperatuurid, mis jäävad alla 25 °C (van der Worp jt., 2007; Krieger ja Yenari, 2004). Kehatemperatuuri langetamist mõjutavad ka selle algusaeg ning kestvus - mida kiiremini alustada jahutamisprotsessiga, seda

suurem on võimalus terveneda. Näriliste jahutamine on inimestega võrreldes lihtne, kuid inimeste suurem kehamass ja mitmed kaasuvad haigused pikendavad jahutamisele kuluvat aega ja muudavad selle raskemini vastuvõetavaks (Yenari jt., 2008). Sageli pole kliinilistes olukordades võimalik alustada jahutamist kohe. Lisaks põhjustab kehatemperatuuri alandamine lihasvärinaid, mis vähendavad jahutamise efektiivsust. Temperatuuril alla 35 °C võivad tekkida hüübimishäired (hüübimist soodustavate ensüümide toime on aeglustunud ning esineb trombotsüütide düsfunktsioon) ning halvendeb leukotsüütide funktsioon. Hüpotermia kestvus rohkem kui 24 tundi suurendab infektsiooni tekke riski (Perbet jt., 2011). Lisaks vähendab hüpotermia südame erutusjuhtivust ning võib tekitada arütmiaid ja põhjustada insuliinresistentsust, mis viib hüperglükeemiani. Seetõttu võivad patsiendid vajada suurtes kogustes insuliini hüpotermia säilitusfaasis, mistõttu on soojendusfaasis oht hüperglükeemia tekkeks (Polderman ja Herold, 2009; Cueni-Villoz jt., 2011). Terapeutiline hüpotermia kutsub esile ka külmadiureesi, mis võib viia hüpovolemia ja elektrolüütide häireteni (Polderman jt., 2001). Hüpotermia aeglustab mitmete ravimite metabolismi ning eritumist. Seetõttu võib mõne ravimi toimeaeg olla tunduvalt pikem kui normotermia korral (van den Broek jt., 2010). Seega on hüpotermia terapeutilise toime eest vastutavate molekulaarsete mehhanismide tuvastamine äärmiselt oluline.

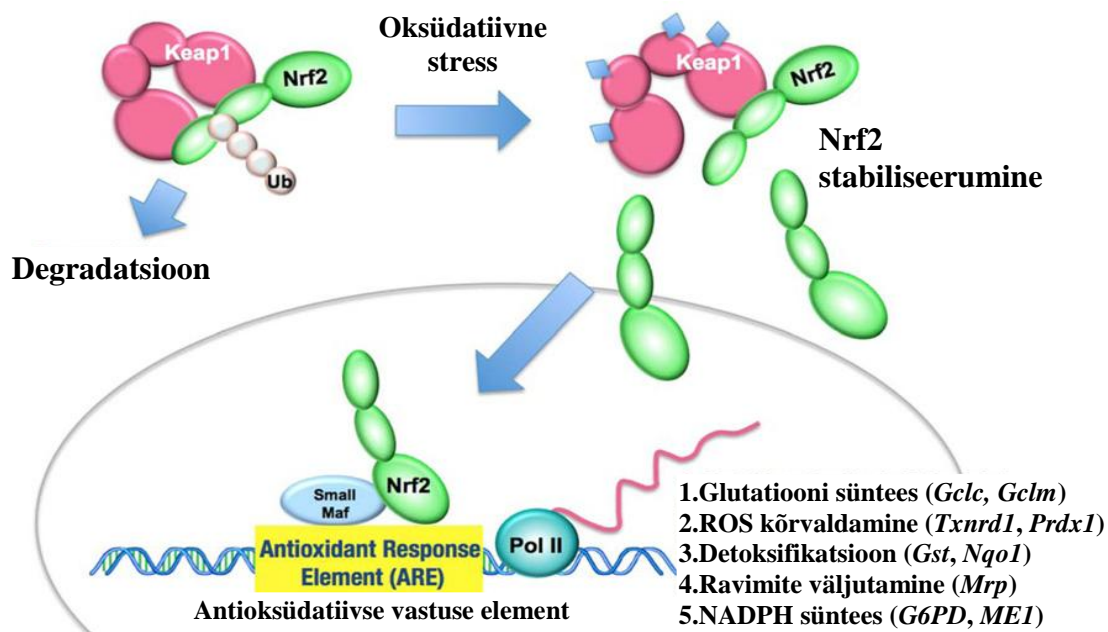
Aju on kõrge metaboolse aktiivusega, kuid ta ei ole võimeline talletama suures koguses energiat. Vereringe seiskumine isheemilise insuldi korral viib hapniku, ATP ning glükoosi puuduseni, mille tulemusena rakk ei ole võimeline normaalselt funktsioneerima. Reperfusiooni (verevoolu taastamine kahjustatud piirkonda) tulemusena tekib koes hapniku liigtootmine, mis omakorda põhjustab massiivset ATP produktsiooni. See suurendab vabade radikaalide teket, mis viib oksüdatiivse stressini neuronites. Temperatuuri alandamine vähendab aju hapnikutarbimist ja glükoosi metabolismi umbes 5% 1 °C kohta (Yenari jt., 2004). Hüpotermia säilitab ATP-d ja stabiliseerib koe pH-d. Jahutamine säilitab aju ainevahetuslikke varusid ja vähendab laktaadi tootmist ja atsidoosi tekkimist. Terapeutilise hüpotermia neuroprotektiivne toime on seotud ka apoptoosi ning põletikureaktsioonide vähendamisega. Jahutamise mõju aju vereringele pole nii otsene. Hüpotermia vähendab vigastuse puudumisel ajus vererõhku (Erecinska jt., 2003). Isheemia korral on vererõhk märgatavalt madalam veresoonte sulgumise tõttu, kuid reperfusiooni tõttu tekib hüpertermia ehk liigveresus. Hüpotermia pärsib kohest hüpertermiat ja hoiab ära sellele järgnevat tüsistusi (Yenari jt., 2004).

Terapeutiline jahutamine on järjekindlalt näidanud pidurdavat mõju eksitotoksiliste aminohapete, näiteks glutamaadi, kuhjumisele või vabanemisele. Seda võib seostada jahutamise ATP-d säilitava efektiga kudedes. ATP on vajalik ioongradiendi hoidmiseks ja kui kontsentratsioonid on häiritud, mis juhtub isheemia puhul, tekib kaltsiumi sissevool rakku ja see viib glutamaadi suurenenud vabanemiseni. (Lee jt., 1999). Hüpotermia võib ennetada eksitotoksilisuse tagajärgi kaltsiumi sissevoolu piiramisega AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hüdroksüül-5-metüül-4-isoksasool-propionaadi) kanalite kaudu. Glutamaadi retseptor 2 (GluR2) alaiühik AMPA retseptoris piirab arvatavasti kaltsiumi sissevoolu ja selle allaregulatsioon isheemia ajal (Colbourne jt., 2003) võib viia kaltsiumi liigse sisenemiseni. Ühes uuringus näidati, et globaalse ajuisheemia mudelis summutab hüpotermia isheemiast tingitud GluR2 allaregulatsiooni (Colbourne jt., 2003).

## 1.2. Hüpotermia mõju geeniekspressioonile

Käesoleva uuringu raames on oluline, et rakukultuuris indutseerib hüpotermia (32 °C) antioksidatiivse süsteemiga seotud geenide transkriptsiooni (Ilmjärv jt., 2014), mis lõi hüpoteesi antioksidatiivse potentsiaali tõstmisest kui ühest võimalikust hüpotermia terapeutilisest efektist. Organismidel on keeruline antioksidatiivsete metaboliitide ja ensüümide võrgustik, mis töötab DNA, valkude ja lipiidide oksidatiivsete kahjustuste takistamiseks (Sies, 1997; Vertuani jt., 2004). Antioksidatiivsed süsteemid kas takistavad reaktiivsete ühendite tekkimist või eemaldavad need enne raku eluks vajalike komponentide kahjustumist (Davies, 1995; Sies, 1997). Antioksidatiivsete süsteemide ülesanne pole oksidatiivsete ühendite täielik eemaldamine, vaid nende hoidmine optimaalsel tasemel (Rhee, 2006).





**Joonis 1. Nrf2-Keap1 signaalirada ja mõjutatavad geenid**  
[https://www.frontiersin.org/files/Articles/35319/fonc-02-00200-HTML/image\\_m/fonc-02-00200-g001.jpg](https://www.frontiersin.org/files/Articles/35319/fonc-02-00200-HTML/image_m/fonc-02-00200-g001.jpg)

Nrf2-Keap1 signaalirada on oluline, et rakud tuleksid toime oksüdatiivse stressiga. Normaalses olukorras on transkriptsioonifaktor Nrf2 seotud Keap1-ga, mis hoiab teda tsütoplasmas ja suunab degradatsiooni (Itoh jt., 1999). Oksüdatiivse stressi korral Nrf2 ei degradeerita, vaid ta siseneb tuuma ja seostub DNA promootoriga, mille tulemusena käivitatakse antioksidatiivsete geenide transkriptsioon ja nende ekspressiooni hoitakse pidevalt kõrgel tasemel (Wakabayashi jt., 2003).

### 1.2.1. Nrf2 kontrollitavad signaalrajad

Esimene on glutatiooni (GSH) tootmine ja taastamine, mida reguleerivad *Gclm* (glutamaat-tsüsteiin ligaasi kompleksi modifitseerimissubühik), *Gclc* (GCL katalüütiline subühik), *Xct* (tsüstiin/glutamaat transporter) ja *Gsr* (glutatiooni reduktaas). Teiseks on GSH kasutamine, mida reguleerivad glutatiooni S-transferaasid (*Gsta1*, *Gsta2*, *Gsta3*, *Gsta5*, *Gstm1*, *Gstm2*, *Gstm3* ja *Gstp1*) ja *Gpx2* (glutatiooni peroksidaas 2). Kolmandaks on TXN (tioredoksiini) tootmine, taastamine ja kasutamine, mida reguleerivad *Txn1*, *Txnrd1* (tioredoksiini reduktaas 1) ja *Prdx1* (peroksiredoksiin 1). Neljas on NADPH tootmine, mida kontrollib *G6pd* (glükoos-6-fosfaadi dehüdrogenaas), *Phgdh* (fosfoglütseraadi dehüdrogenaas), *Me1* (malaadi ensüüm 1) ja *Idh1l* (isotsitraadi dehüdrogenaas 1). Nii GSH kui TXN kasutavad reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) redutseerimise järel NADPH-d iseenda taastootmiseks. Need neli gruppi antioksidantide gene, mille ekspressiooni tõstab *Nrf2*, toimivad üksteist täiendavalt. Lisaks reguleerib *Nrf2* ka selliseid antioksidante nagu *Nqo1* (NAD(P)H kinooni oksidoreduktaas 1) ja rauda siduvaid ensüüme nagu *Hmox1* (heemi oksügenaas), *Fth* ja *Ftl*

(ferritiini raske ja kerge ahel) (Gorrini jt., 2013), samuti aktiveerib *Nrf2 Srxn1* (sulfredoksiin 1) ekspressiooni (Hartikainen jt., 2012). Kuna olulisemateks antioksidantideks peetakse glutatiooni ja tioredoksiini süsteeme, siis on need süsteemid peamiseks uurimisobjektiks.

### 1.2.2. Glutamaat-tsüstein ligaas (GCL)

GCL on ensüüm, mis koosneb kahest osast: modifitseerivast (GCLM) ja katalüütilisest subühikust (GCLC), mõlemad sisaldavad promootorites antioksidatiivse vastuse elemente (ARE-sid) (Rushworth jt., 2006; Thimmulappa jt., 2007). GCL katalüüsib esimest sammu glutatiooni sünteesiks. GCLC on põhiline glutatiooni sünteesi kiirust piirav ensüüm. Glutatioon on tiolne tripeptiid ning üks olulisemaid antioksidante rakus. Glutatioon on põhiline endogeenne antioksidant, mis osaleb vahetult vabade radikaalide ja reaktiivsete hapnikuühendite neutralisatsioonil, säilitab rakus redutseerivat keskkonda ning võtab osa eksogeensete antioksidantide nagu vitamiin C ja E aktiivsete vormide säilitamisel (Scholz jt., 1989). Glutatioonis sisalduvad tiolrühmad aitavad elektrondonorina redutseerida tsütoplasma valkude disulfiidsidemeid tsüsteiinideks. Reaktsiooni tulemusena läheb glutatioon üle oksüdeeritud vormi, reageerib teise läheduses oleva oksüdeeritud glutatiooniga ja moodustub glutatioon disulfiid (GSSG). See reaktsioon on võimalik täna glutatiooni suhteliselt kõrgele tasemele rakkudes (maksas kuni 5 mM). Oksüdeeritud vormist võimaldab tagasi redutseerida glutatiooni reduktaasiga, kasutades NADPH-d elektrondonorina (Couto jt., 2013). Rakus sisalduva redutseeritud glutatiooni ja oksüdeeritud glutatiooni suhet kasutatakse tihti toksilise vastuse iseloomustamiseks rakkudes (Pastore jt., 2003).

### 1.2.3. NAD(P)H dehüdrogenaasi kinoon 1 (NQO1)

*Nqo1* kuulub NAD(P)H dehüdrogenaaside perekonda ja kodeerib tsütoplasmaatilist FAD-siduvat reduktaasi, mis moodustab homodimeere ja redutseerib kinooni hüdrokinoonideks, kaitstes rakke reaktiivsete hapnikuühendite, oksidatiivse stressi ja neoplaasia eest (Jaiswal, 2000). *Nqo1* katalüütilised omadused avastati juba 1958. aastal (Ernster ja Navazio). *Nqo1* kasutab kas NADH-d või NADPH-d redutseeriva kofaktorina (Ernster, 1967). Kõik hüdrokinoonid pole stabiilsed ja mõnel juhul aitab *Nqo1* saada aktiivsemat produkti. Ebastabiilsed hüdrokinoonid võivad reageerida molekulaarse hapnikuga, mis moodustab semikinoone ja genereerib reaktiivseid hapnikuühendeid (Cadenas, 1995). Lisaks oksidatiivse stressi põhjustamisele võib kinoni redutseerimisel tekkida ühend, mis on võimeline alküülilima nukleofiilseid saite, sh DNAd. Seda protsessi nimetatakse bioreduktiivseks alküülimiseks ja selle põhjal on uuritud *Nqo1*-põhjal disainitud kasvajakavastaseid agente. Geeniekspressiooni muutuseid on täheldatud paljudes kasvajates ja seda seostatakse ka Alzheimeri tõvega (Raina jt., 1999).

#### 1.2.4. Sulfredoksiin 1 (*Srxn1*)

Sulfredoksiin 1 on seotud raku oksüdeerimis-redutseerimisprotsesside tasakaalustamisega ja oksüdatiivse stressi vähendajana. Hüperoksidatsioon, mida põhjustab vesinikperoksiidi ja teiste vabade radikaalide kuhjumine, inaktiveerib peroksiredoksiine ja toimib seeläbi molekulaarne lülitina (Rhee jt., 2007). Sulfredoksiin asub põhiliselt tsütoplasmas, kuid oksüdatiivse stressi ajal suunatakse ta mitokondritesse (Noh jt., 2009). Peroksiredoksiini fosforüleeritakse kas otse ATP gamma-fosfaadi ülekandumisel peroksiredoksiini molekulile või sulfredoksiini käitumisel fosforüleeritud vahendajana (Jönsson, 2008). Peroksiredoksiinid võivad esineda dimeeride, dekameeride ja suure molekulmassiga kompleksidena, suurimat aktiivsust näitavad viimased kaks vormi. *Srxn1* vaigistamine vähendab nii rakusisese superoksiidi dismutaasi (SOD) kui ja glutatiooni taset (Zhou jt., 2015). Sulfredoksiin 1 võib mõjutada ka tumorigeneesi ja kasvajate arengut. Sulfredoksiin 1 tase on ebatavaliselt kõrge nii naha, kopsu, kui käärsoolevähi kasvajarakkudes (Wei jt., 2008). Samas ei tundu see olevat arenguks hädavajalik, sest *Srxn1*-puudulikud hiired on elujõulised ja normaalsed (Planson jt., 2011).

#### 1.2.5. Tioredoksiini reduktaas 1 (*Trxnrd1*)

See geen kodeerib valku, mis redutseerib tioredoksiine ja ka muid substraate ning mängib rolli seleeni metabolismis ja kaitses oksüdatiivse stressi vastu. Tioredoksiin, tioredoksiini reduktaas ja NADPG modustavad tioredoksiini süsteemi, mis on sarnane nii arhedes kui inimeses. Tioredoksiinid on põhilised valkude disulfiireduktaasid, nad võivad käituda elektrondonorina ribonukleotiidreduktaasidele, tioredoksiini peroksidaasidele (peroksiredoksiinidele) kui metioniin-sulfoksiid reduktaasile (Holmgren, 1985). Tioredoksiini isovormid esinevad paljudes organismides ja mitokondrites on eraldi tioredoksiinsüsteem (Miranda-Vizuete jt., 1999). Tioredoksiini reduktaas on laia substraadispetsiifilisusega dimeerne flavoproteiin, mis redutseerib ka vesinikperoksiide, vitamiin C-d või seleniiti. Kõik imetajate tioredoksiini reduktaasi isosüümid on homoloogsed glutatiooni reduktaasiga. Subühikutes sisaldub selenotsüteiini jääk, mis on vajalik katalüütiliseks aktiivsuseks.

#### 1.2.6. Glutatiooni süntetaas (*Gss*)

Glutatiooni süntetaas osaleb gamma-glutamüüli tsükliis, mis toimib suuremas osas rakkudes. Tsükliis toimuvad reaktsioonid on vajalikud glutatiooni sünteesiks. Glutatiooni süntetaas katalüüsib glutatiooni ATP-sõltuvat sünteesi gamma-glutamüültsüsteiinist (gamma-Glu-Cys) ja glütsiinist. Üleekspressioon võib viia lausa kahekordse glutatiooni taseme tõusuni. Ka

gamma-glutamiinsüstein võib vajaduse korral käituda antioksidandina, kuid täielikult glutatiooni asendada ei suuda (Grant jt., 1997).

### **1.2.7. Külmatundlik mRNA-d siduv valk (Cirbp)**

Cirbp mängib tähtsat rolli genotoksilise stressi vastuses, stabiliseerides raku ellujäämiseks vajalikke geenitranskripte. Cirbp käitub transkriptsiooni aktivaatorina ja näib mängivat tähtsat rolli rakujagunemise mahasurumisel külma tõttu. Seondub stressivastuse poolt mõjutatud RPA2 ja TXN transkriptidega. Käitub ka translatsioonilise repressorina. Üleekspresseerituna soodustab stressigraanulite tekkimist.

## **2. EKSPERIMENTAALOSA**

### **2.1. Töö eesmärgid**

Töö eesmärk oli tuvastada, kas ja mil määral mõjutab hüpotermia rakusisest antiosküdatiivset potentsiaali. Selleks hindasime hüpotermia mõju glutatiooni tasemele ning antiokküdatiivses süsteemis oluliste geenide ekspressioonile.

### **2.2. Materjal ja metoodika**

#### **2.2.1. Peamine rakukultuur hüpotermia mudelina**

Umbes 1 miljon primaarset hiire embrüonaalset fibroblasti (Millipore) külvati 100mm kultuurtassidele ja kasvatati DMEM (kõrge glükoosisisaldusega 4.5 g/l, lisandina 10% FBS ja L-glutamiin, PAA) söötmel normaalses tingimustes (õhuhapnik, 5% CO<sup>2</sup>, 37 °C) 60-70% konfluentsuseni. Hüpotermia testimiseks langetati temperatuur rakukultuuri inkubaatoris 32 °C-ni, kontrollrakud kasvasid 37 °C juures. Teise rakuliinina kasutati kvantitatiivse reaalaja PCRis Nrf2 knockout hiire embrüonaalseid fibroblaste, mida kasutatakse tihti oksküdatiivse stressi uuringutes.

#### **2.2.2. Mikrokiibi eksperiment**

Hiire embrüonaalsete fibroplastidega tassid jagati kolmesteks gruppideks, gruppe inkubeeriti 32 °C juures teatud perioodi (0, 0.5, 1, 2, 4, 8 või 18 h). RNA eraldati Trizoliga (Life) ja grupi kolm proovi ühildati. Proovidest tehti geeniekspressiooni profiilid Mouse Gene 1.0 ST kiibile (Affymetrix) tootja protokoll järgi. RNA amplifitseeriti ja märgistati Ambion WT Expression Kitiga (Applied Biosystems) tootja juhendi järgi. Sisendina kasutati 250 ng RNAd. Märgistatud proovid hübridiseeriti Mouse Gene 1.0 ST Genechip kiibile (Affymetrix). Kiibid pesti ja värviti fükoerütriin-konjugeeritud streptavidiiniga (SAPE) Affymetrix Fluidics Station 450 abil ja kiibid skaneeriti Affymetrix Genearray 3000 skanneriga, tekitades fluorestsentspildid Affymetrix Genechip protokoll järgi. Genechip Command Console (AGCC, Affymetrix) tarkvara abiga saadi CEL failid.

#### **2.2.3. Kvantitatiivne reaalaja PCR**

Kvantitatiivse reaalaja PCR-i eksperimendis kasutati viit bioloogilist replikaati ühe grupi kohta. Hiire embrüonaalseid fibroblaste kasvatati vastavalt 24h 37°C (normotermia) või 32°C (kerge hüpotermia) juures. Totaal-RNA eraldati rakkudest Trizoliga (Invitrogen) tootja protokoll järgi. Üheaaheline cDNA sünteesiti juhuslike heksameeridega (Invitrogen) ja SuperScript™ III pöördtranskriptaasi (Invitrogen). Tabelis 1 on näha kasutatud Taqman assayd (Applied Biosystems). qPCR reaktsioonid jooksutati ABI PRISM 7900HT Fast Real-

Time PCR System seadmetel ja tulemused kvantifitseeriti ABI PRISM 7900 SDS 2.2.2 tarkvaraga.

**Tabel 1. Kvantitatiivse reaalaaja PCRi Taqman assayd**

Geeni sümbol	Assay ID
<i>Cirbp</i>	Mm00483336_g1
<i>Nqo1</i>	Mm01253561_m1
<i>Gss</i>	Mm00515065_m1
<i>Txnrd1</i>	Mm00443675_m1
<i>Gclc</i>	Mm00802655_m1
<i>Srxn1</i>	Mm00769566_m1
<i>Ywhaz</i>	Mm01158416_g1 (sisemine standard)

#### 2.2.4. Glutatioonitasemete määramine

Glutatiooni tasemete määramiseks hüpotermia ja normotermia tingimustes (24h) kasutati hiire embrüonaalseid fibroblaste. Mõlemas grupis oli viis bioloogilist replikaati. Rakkude eemaldamiseks substraadilt kasutati kummimiilitsat ning rakud tsentrifugeeriti (960g toatemperatuuril) põhja jääkülmas PBS-is. Valgulüsaadi valmistamiseks kasutati 1x MES puhvrit. Rakke sonikeeriti 10min Diagenode'i Bioruptor ultrahelisonikaatoriga, misjärel tsentrifugeeriti valgulüsaati 15min 15 000g 4 °C juures. Valkude sadestamiseks kasutati 100 µl 0.4 M metafosforhapet ning tsentrifugeeriti 5min 5000g 4 °C juures.

Glutatiooni tasemete määramiseks kasutati Cayman chemicals Glutathione Assay Kit'i vastavalt tootja poolt välja töötatud protokollile. Antud kit kasutab glutatiooni ning glutatioon disulfiidi mõõtmiseks glutatiooni reduktaasil põhinevat reaktsiooni. GSH tiolgrupp reageerib DTNB-ga (5,5'-ditio-bis-2-nitrobensoehape ehk Ellmani reagent) reaktsioonisegus, kollane 5-tio-2-nitrobensoehape (TNB). TNB neeldumist mõõdeti 405nm juures.

Standardlahuste neeldumiste (Tabel3 alusel tehti GSH kontsentratsiooni standardkõver MEF rakkudele (Joonis 4). Kuna neeldumised olid tehtud kahes korduses, siis võeti tulemuste keskmised ja kõigist neeldumisväärtustest lahutati standardlahus A neeldumine, mis andis lõppneeldumisväärtuse ehk proovidelt eemaldati taust.

Üldise valgu kontsentratsiooni määramiseks tehti samuti neeldumiskõver, kuid 700 nm juures. Proovide neeldumisväärtuste ja standardkõverate võrrandite järgi leiti proovide kontsentratsioonid. Seejärel korrigeeriti nii GSH kui valgu kontsentratsioonid lahjenduste suhtes (GSH 5x ja valk 10x) ning arvutati GSH kontsentratsiooni suhe valgu kontsentratsiooni kohta. Glutatiooni kontsentratsioonide võrdlemiseks tehti karp-vurrud diagrammid (Joonis 5).

### 2.2.5. Statistiline analüüs

Kiip analüüsi DEMI-ga kasutades Kendalli astak-korrelatsiooni testi, leiti nii p-väärtus kui FDR-väärtus, mis on selle katse puhul täpsem statistilist olulisust määrav arv kui p-väärtus.

Kvantitatiivse PCRi tulemuste võrdlemiseks kasutati mitteparameetrilist Wilcoxon testi. P-väärtus alla 0.05 loeti statistiliselt oluliseks.

Glutatiooni taseme võrdlemiseks normotermia ja hüpotermia tingimustes kasutati mitteparameetrilist Wilcoxon testi ja tunnuse normaaljaotust eeldavat t-testi. P-väärtus alla 0.05 loeti statistiliselt oluliseks.

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. Mikrokiibi analüüs

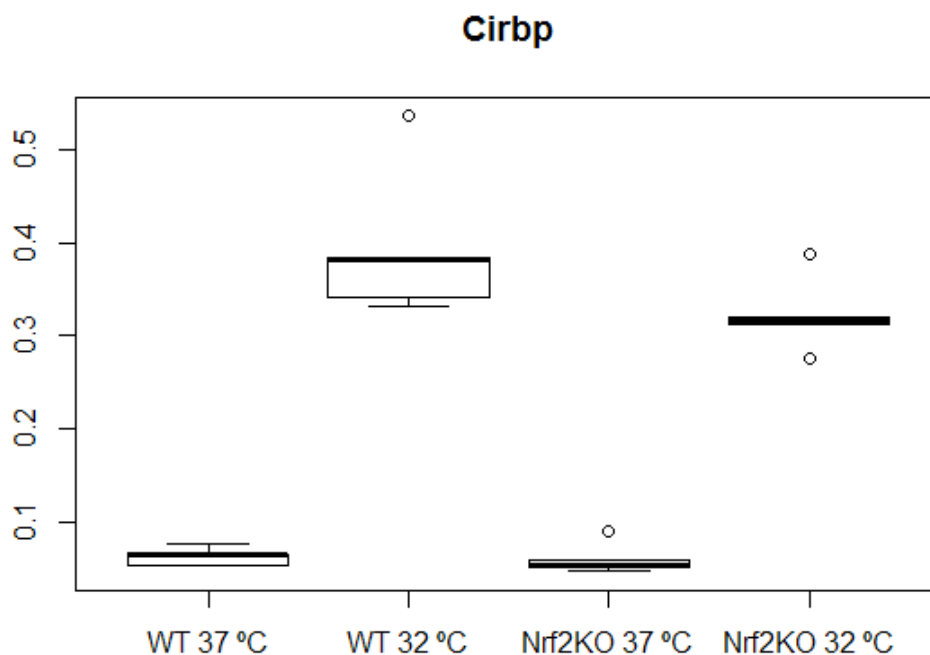
Viie peamise hüpotermia tingimustes ülesreguleeritud geeni hulgast leidsime *Cirbp*-i, mis on tuntud hüpotermiatundlik geen (Fujita, 1999; Nishiyama jt., 1997). Lisaks tuvastasime mitmeid antioksidatiivsete süsteemidega seotud gene, mis tunduvad hüpotermia poolt üles reguleeritud.

**Tabel 2. Hüpotermia kestvuse pikenemisel pidevalt tõusnud ekspressioonitasemega geenid ja nendega seotud antioksidatiivsed süsteemid**

Geeni ID	Geeni sümbol	P-väärtus	FDR-väärtus	Süsteem
ENSMUSG0000003849	<i>Nqo1</i>	9.04E-35	4.72E-30	Kinooni detoksifikatsioon
ENSMUSG00000045193	<i>Cirbp</i>	1.30E-29	1.13E-25	
ENSMUSG00000032802	<i>Srxn1</i>	1.23E-19	2.14E-16	Glutatioon
ENSMUSG00000027610	<i>Gss</i>	1.08E-13	4.75E-11	Glutatioon
ENSMUSG00000020250	<i>Txnrd1</i>	4.29E-11	9.83E-09	Tioredotsiin
ENSMUSG00000032350	<i>Gclc</i>	4.29E-11	9.83E-09	Glutatioon
ENSMUSG0000000811	<i>Txnrd3</i>	9.85E-09	1.19E-06	Tioredotsiin

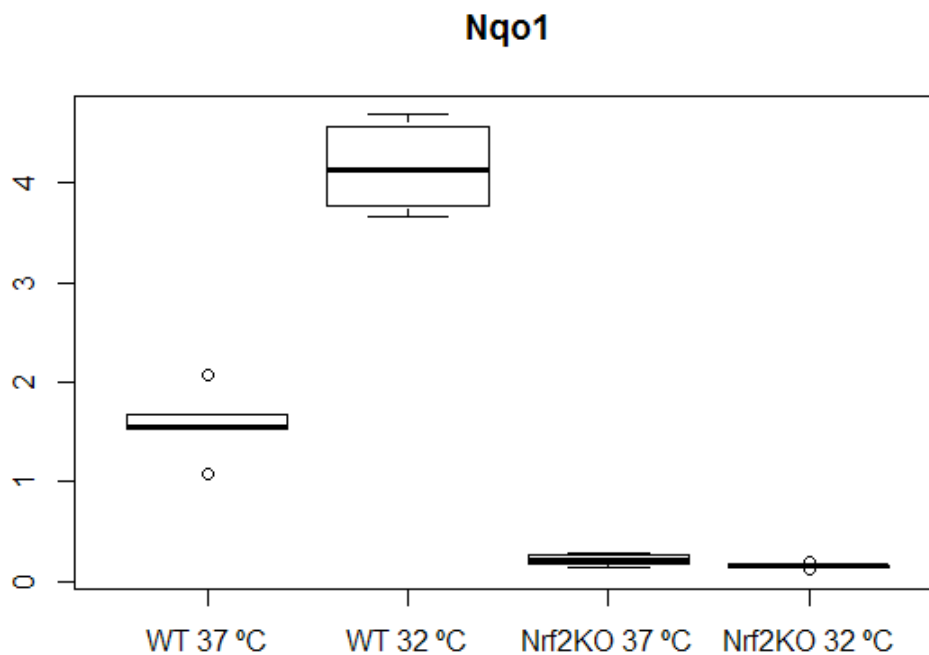
*Nqo1* – NAD(P)H dehidrogenaasi kinoon 1; *Srxn1* – sulfiredoksiin 1; *Gss* – glutatiooni süntetaas; *Txnrd1* – tioredoksiini reduktaas 1; *Gclc* – glutamaat-tsüsteiin ligaasi katalüütiline subühik; *Txnrd3* – tioredoksiini reduktaas 3

### 2.3.2. Geeniekspressiooni analüüs kvantitatiivse reaalaaja PCRiga



**Joonis 2.** *Cirbp* ekspressioonitasemed MEF wt ja Nrf2KO rakkudes normotermias ja hüpotermias

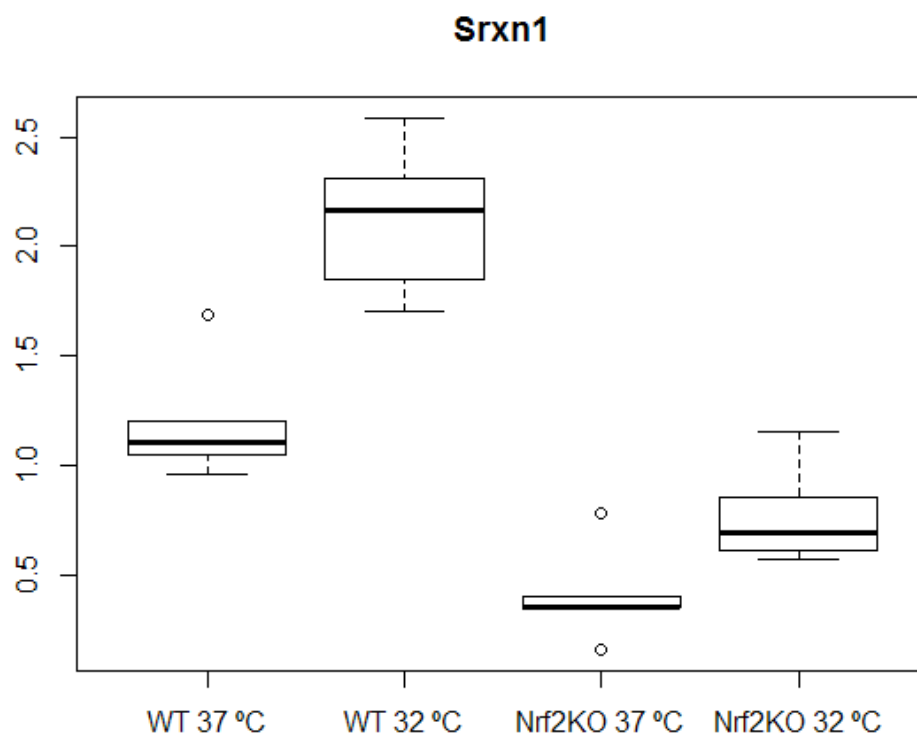
Nii metsiktüüpi (WT) embrüonaalsetes fibroblastides (p-väärtus 0.007937) kui ka Nrf2-puudulikkusega fibroblastides (Nrf2KO) (p-väärtus 0.007937) oli *Cirbp* ekspressioonitase hüpotermia tingimustes tõusnud. *Cirbp* tase tundub ühtlane wt ja Nrf2KO rakkudes, mis näitab, et Nrf2 ekspressioon *Cirbp* ei mõjuta.



**Joonis 3.** *Nqo1* ekspressioonitasemed MEF wt ja Nrf2KO rakkudes normotermias ja hüpotermias

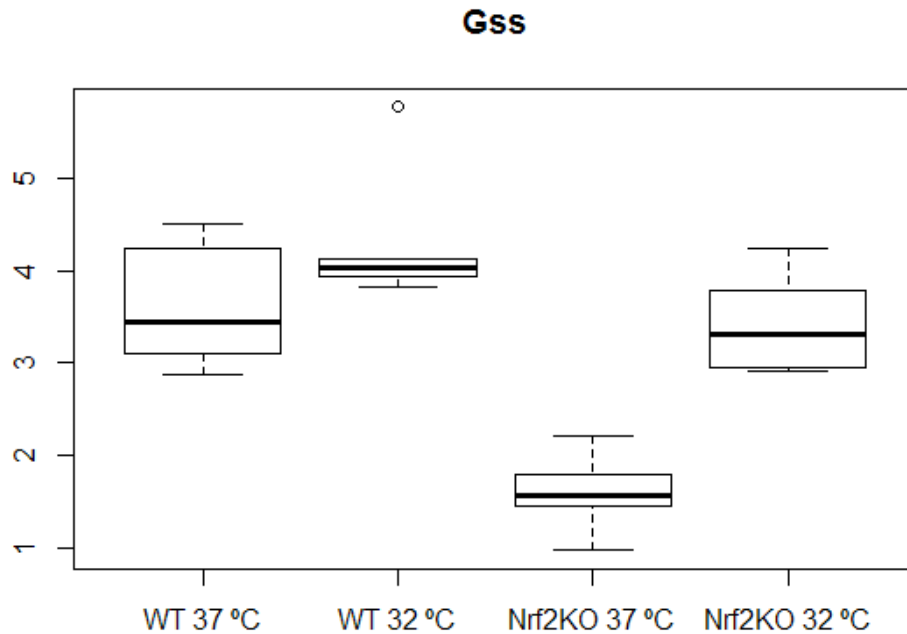


*Nqo1* ekspressioonitase on metsiktüüpi embrüonaalsetes fibroblastides (WT) hüpoteermia tingimustes tõusnud (p-väärtus 0.007937), kuid Nrf2-puudulikkusega embrüonaalsetes fibroblastides (Nrf2KO) statistilist erinevust märgata ei olnud (p-väärtus 0.09524). Samas on näha, et Nrf2 puudulikes rakkudes on *Nqo1* ekspressioon metsiktüüpi rakkudega võrreldes ühtlaselt madal.



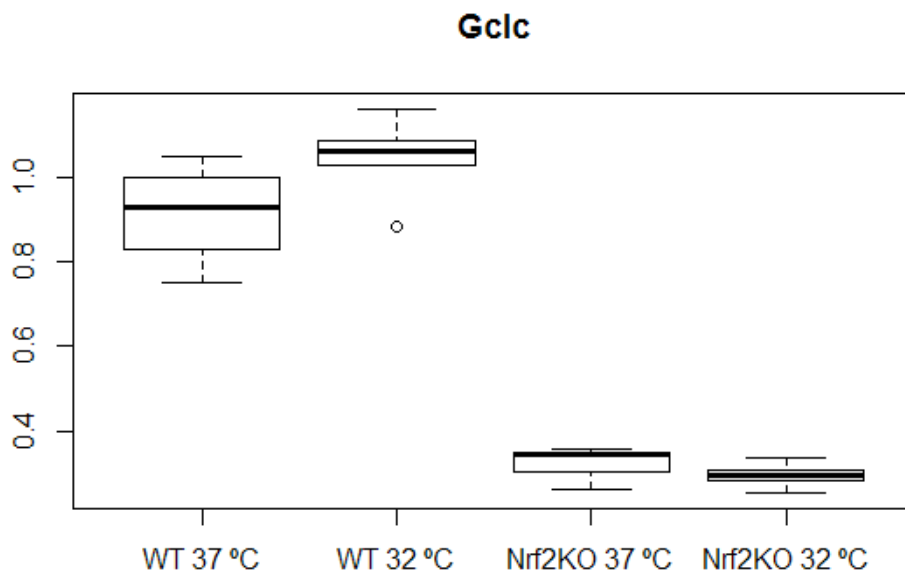
**Joonis 4.** *Srxn1* ekspressioonitasemed MEF wt ja Nrf2KO rakkudes normotermias ja hüpoteermias.

*Srxn1* on hüpoteermias rohkem ekspresseeritud nii metsiktüüpi (WT) (p-väärtus 0.007937) kui mõõdukalt ka Nrf2 puudulikkusega (Nrf2KO) rakkudes (p-väärtus 0.05556). Üldiselt on *Srxn1* tase Nrf2KO rakkudes võrreldes WT-ga langenud.



**Joonis 5.** *Gss* ekspressioonitasemed MEF wt ja Nrf2KO rakkudes normotermias ja hüpotermias.

*Gss* ekspressioonitasemed metsiktüüpi (WT) rakkudes statistilist erinevust ei näidanud (p-väärtus 0.4206), kuid Nrf2 puudulikes rakkudes (Nrf2KO) on näha statistiliselt eristatavat ekspressioonitaseme tõusu (p-väärtus 0.007937). *Gss* üldine ekspressioonitase on Nrf2KO rakkudes langenud võrreldes wt rakkudega.



**Joonis 6.** *Gclc* ekspressioonitasemed MEF wt ja Nrf2KO rakkudes normotermias ja hüpotermias.

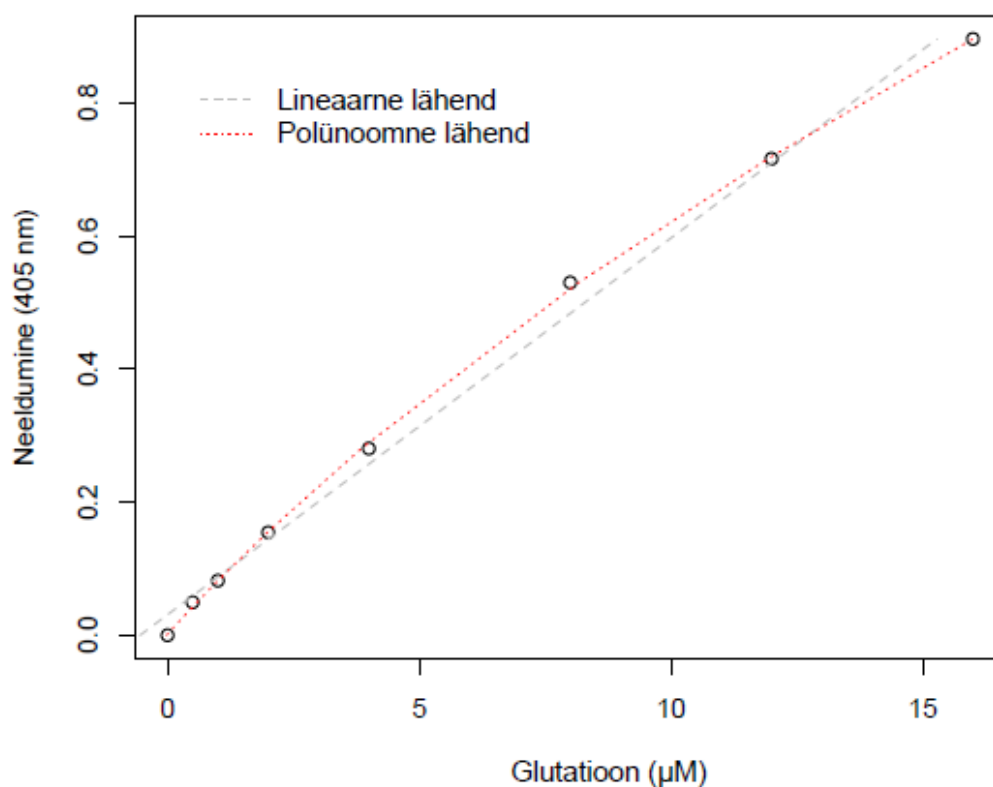
Hüpotermiatase ei tundu *Gclc* ekspressioonitaset mõjutavat ei metsiktüüpi (WT) (p-väärtus 0.09524) ega Nrf2-puudulikes (Nrf2KO) fibroblastides (p-väärtus 0.2222), samas on *Gclc* üldine tase Nrf2KO rakkudes langenud.

### 2.3.1. Glutatiooni mõõtmise tulemused

Tabel 3. GSH standardi neeldumised, nende keskmised ja nullkontsentratsiooni vastu lähtestatud keskmised MEF rakkude jaoks.

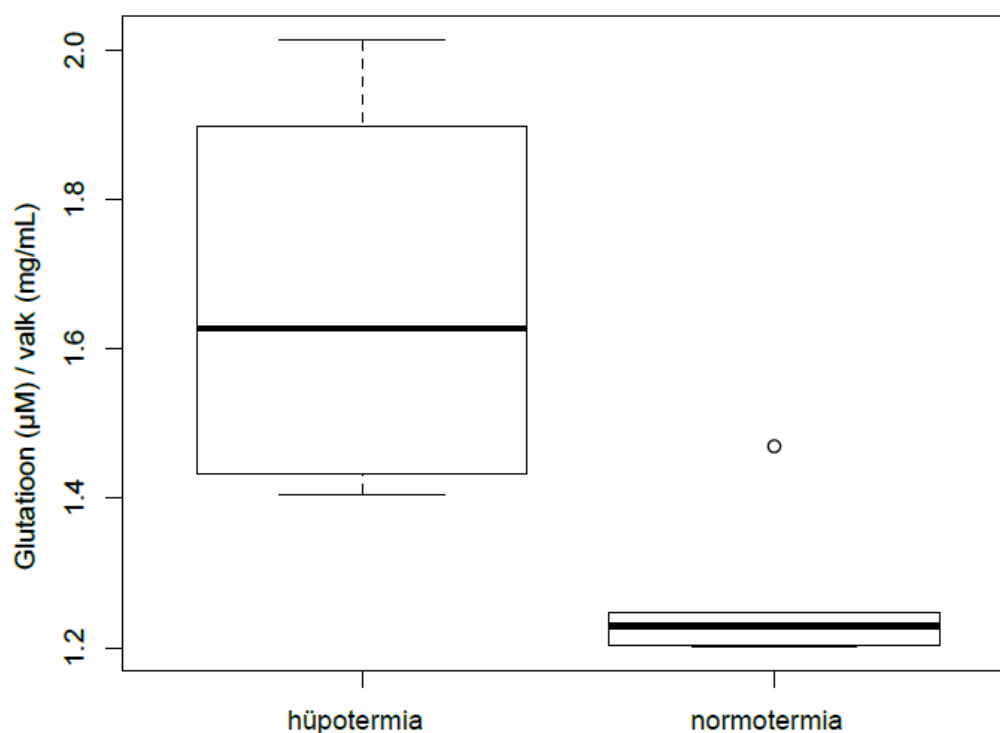
GSH ( $\mu\text{M}$ )	$A_{405}$	Keskmine	Nullitud keskmine
0	0,231	0,229	0,23
0,5	0,277	0,282	0,2795
1	0,312	0,312	0,312
2	0,383	0,386	0,3845
4	0,513	0,508	0,5105
8	0,767	0,753	0,76
12	0,947	0,945	0,946
16	1,124	1,128	1,126

#### Glutatiooni standard (embrüonaalsed fibroblastid)



Joonis 7. MEF rakkude glutatiooni mõõtmise standardkõver. On näha peaaegu lineaarne seos glutatiooni kontsentratsiooni ja neeldumise vahel 405 nm juures.

## Glutatioon embrüonaalsetes fibroblastides



Joonis 8. Glutatiooni kontsentratsiooni suhe valgu kontsentratsiooniga MEF rakkudes.

### 2.3.2. Glutatiooni mõõtmiste statistiline analüüs

Testimine andis olulise statistilise erinevuse nii Wilcoxon kui t-testiga. MEF rakkudel oli Wilcoxon testiga p-väärtus 0.0303 ja t-testiga 0.01298

### 2.4. Arutelu

Käesolevas töös leidsime, et rakukultuuris indutseerib hüpotermia (32 °C) hüpotermiatundlikku *Cirbp* geeni ning *Nrf2*-märklaudgeenide (*Nqo1*, *Srxn1*, *Gss*, *Txnrd1*, *Gclc*) transkriptsiooni.

Kvantitatiivse PCRi tulemused näitasid samuti hüpotermia seost *Cirbp*i ekspresioonitaseme tõusuga nii metsiktüüpi kui *Nrf2*-puudulikes rakkudes. *Cirbp*i üldine ekspresioonitase püsis samaväärne nii WT kui *Nrf2*KO rakkudes, seega on näha, et *Nrf2* glutatiooni ekspressiooni ei mõjuta.

*Nqo1* ekspresioonitase oli hüpotermia mõjul tõusnud metsiktüüpi rakkudes, *Nrf2*-puudulikes rakkudes ei suudetud tuvastada statistilist olulist erinevust. Väga hästi on näha *Nrf2* mõju *Nqo1* ekspresioonile, sest *Nrf2*-puudulikes rakkudes on ekspresioonitase oluliselt madalam kui metsiktüüpi fibroblastides.

Srxn1 ekspressioonitase oli hüpothermia tingimustes tõusnud nii metsiktüüpi rakkudes kui ka Nrf2-puudulikes rakkudes. On näha Nrf2 mõju üldisele Srxn1 ekspressioonitasemele, mis on Nrf2-puudulikes rakkudes madalam kui metsiktüüpi rakkudes.

Gss ekspressioonitase metsiktüüpi rakkudes hüpothermia mõjul ei muutunud, kuid Nrf2-puudulikes rakkudes oli näha ekspressiooni tõusu. Samas oli Nrf2-puudulikes rakkudes Gss ekspressioonitase siiski madalam kui metsiktüüpi rakkudes. Tundub, et Nrf2 indutseerib ekspressioonitaset, kuid ainult teatud piirini. Samas miski peale Nrf2 mõjutab selle ekspressiooni, kuna muidu ei tohiks Nrf2-puudulikes rakkudes olla näha ekspressioonitase tõusu.

Gclc ekspressioonitase ei tundu olevat mõjutatud hüpothermiast, samas on selgelt näha Nrf2 mõju, sest Nrf2-puudulikes rakkudes on ekspressioonitasemed palju madalamad kui metsiktüüpi rakkudes.

Samuti ilmnes hiire embrüonaalsetes fibroblastides hüpothermia tingimustes (32 °C) suurem glutatiooni redutseeritud vormi (GSH) tase, mis näitab, et antioksidatiivne süsteem toimib.

## Kokkuvõte

Terapeutiline hüpothermia on ravimeetod, mida kasutatakse spetsiifilise kehatemperatuuri saamiseks ja säilitamiseks teatud ajavahemikul, et parandada tervisenäitajaid (Peberdy jt., 2010). Arvatakse, et terapeutiline hüpothermia kaitseb ajuvigastuste eest, vähendades aju hapnikuvajadust, alandades neurotransmitterite (nt glutamaadi) tootmist ja vähendades vabade radikaalide hulka. TH rakendamine peale südameseiskumisest elustamist suurendab hilisemat ellujäämisvõimalust ja parandab ajufunktsioone (Arrich jt., 2012).

Selle töö eesmärkideks oli leida, kas ja kuidas hüpothermia mõjutab rakusisest antioksidatiivset potentsiaali. Leidsime, et hüpothermia tõstab nii *Cirbpi* kui ka mitme *Nrf2* märklaudgeeni (*Nqo1* ja *Srxn1*) ekspressioonitaset. *Nrf2* *Cirbpi* ekspressioonitaset ei mõjutanud, kuid *Nqo1*, *Srxn1*, *Gclc* ja *Gssi* puhul oli näha, et vähenenud *Nrf2* tase vähendas ka nende geenid ekspressioonitaset.

Kindlasti on tegelik pilt palju laiem ja keerulisem, seega tuleks teha palju rohkem teste erinevate geenide ja geeniproduktide uurimiseks, et saada parem ülevaade rakus toimuvast hüpothermia tingimustes. Eriti tähtis oleks välja selgitada, kuidas toimib neuroprotektiivne võime ajurakkudes.

## The effects of hypothermia on the antioxidative system

Kristi Reispass

### SUMMARY

Hypothermia is a situation where the body core temperature falls below 35.0 °C (95.0 °F). Targeted temperature management (TTM) previously known as therapeutic hypothermia or protective hypothermia is active treatment that tries to achieve and maintain a specific body temperature in a person for a specific duration of time in an effort to improve health outcomes (Peberdy *et al.*, 2010). This is done in an attempt to reduce the risk of tissue injury from lack of blood flow (Bernard *et al.*, 2002). Periods of poor blood flow may be due to cardiac arrest or the blockage of an artery by a clot as in the case of a stroke.

Targeted temperature management is thought to prevent brain injury by several methods including decreasing the brain's oxygen demand, reducing the production of neurotransmitters like glutamate, as well as reducing free radicals that might damage the brain. The lowering of body temperature may be accomplished by many means including the use of cooling blankets, cooling helmets, cooling catheters, ice packs and ice water lavage.

Targeted temperature management improves survival and brain function following resuscitation from cardiac arrest (Arrich *et al.*, 2012). Evidence supports its use following certain types of cardiac arrest in which an individual does not regain consciousness (Peberdy *et al.*, 2010). Targeted temperature management following traumatic brain injury has shown mixed results with some studies showing benefits in survival and brain function while other show no clear benefit (Sydenham *et al.*, 2009). While associated with some complications, these are generally mild (Xiao *et al.*, 2012).

The goal of this study was to find out if and how hypothermia affects intracellular antioxidative potential. We found that hypothermia upregulates *Cirbp* and also several *Nrf2*-induced genes such as *Nqo1* and *Srxn1*. *Nrf2* had no effect on *Cirbp* expression, but *Nqo1*, *Srxn1*, *Gss* and *Gclc* all showed that reduced levels of *Nrf2* also reduced the expression of those genes.

## Tänuavaldused

Sooviksin tänada Hendrikut ja Kattri-Liisi, et nende kannatus minuga ei katkenud.

## Kasutatud kirjandus

Arrich, J; Holzer, M; Havel, C; Müllner, M; Herkner, H (2012). Hypothermia for neuroprotection in adults after cardiopulmonary resuscitation. *The Cochrane database of systematic reviews*. 9

Bernard, S.A., *et al.* (2002). Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia.. *N. Engl. J. Med.* 346, 557-563.

Busto, R. *et al.* (1987). Small differences in inraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 7, 729–738

Cadenas, E. (1995) . Antioxidant and prooxidant functions of DT-diaphorase in quinone metabolism, *Biochem. Pharmacol.* 49 127–140

Colbourne, F., Grooms, S. Y., Zukin, R. S., Buchan, A. M. & Bennett, M. V. (2003). Hypothermia rescues hippocampal CA1 neurons and attenuates down-regulation of the AMPA receptor GluR2 subunit after forebrain ischemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 2906–2910

Colbourne, F., Sutherland, G. R. & Auer, R. N. (1996). An automated system for regulating brain temperature in awake and freely moving rodents. *J. Neurosci. Methods* 67, 185–190

Couto, N., Malys, N., Gaskell, S., Barber, J. (2013). Partition and Turnover of Glutathione Reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: a Proteomic Approach. *Journal of Proteome Research* 12 (6): 2885–94

Cueni-Villoz, N., Devigili, A., Delodder, F., Cianferoni, S., Feihl, F., Rossetti, A.O., *et al.* (2011). Increased blood glucose variability during therapeutic hypothermia and outcome after cardiac arrest. *Oddo Crit Care Med.* 39(10), 2225-31

Davies KJ (1995). "Oxidative stress: the paradox of aerobic life". *Biochemical Society Symposium* 61: 1–31.

Dietrich, W. D., Atkins, C. M. & Bramlett, (2009). H. M. Protection in animal models of brain and spinal cord injury with mild to moderate hypothermia. *J. Neurotrauma* 26, 301–312

Dietrich, W. D., Bramlett, H. M. (2010). The evidence for hypothermia as a neuroprotectant in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 7, 43–50



- Erecinska, M., Thoresen, M. & Silver, I. A. (2003). Effects of hypothermia on energy metabolism in mammalian central nervous system. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 513–530
- Ernster, L. Navazio, F. (1958). Soluble diaphorase in animal tissues, *Acta Chem. Scand.* 12 595–602.
- Ernster, L. (1967). DT-diaphorase, *Methods Enzymol.* 10 309–317
- Fujita, J. (1999) Cold shock response in mammalian cells. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 1:243–255.
- Gluckman, P. D. *et al.* (2005). Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* 365, 663–670
- Gorrini C, Harris IS, Mak TW (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery* 12, 931-47.
- Grant, C. M., MacIver, F. H., Dawes, I. W. (1997) Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide  $\gamma$ -glutamylcysteine. *Mol. Biol. Cell* 8,1699-1707
- Hartikainen JM, Tengstrom M, Kosma VM, Kinnula VL, Mannermaa A, Soini Y. Genetic polymorphisms and protein expression of NRF2 and Sulfiredoxin predict survival outcomes in breast cancer. *Cancer Research.* 2012
- Holmgren, A. (1985) Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 237 271.
- Ilmjärvi, S. *et al.* (2014) Estimating differential expression from multiple indicators. *Nucl. Acids Res.* 1–15
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., *et al.* (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13, 76–86.
- Jaiswal AK. Regulation of genes encoding NAD(P)H: quinoneoxidoreductases. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29(3-4):254-62
- Jönsson T.J., Tsang A.W., Lowther W.T., Furdai C.M. (2008). Identification of intact protein thiosulfinate intermediate in the reduction of cysteine sulfinic acid in peroxiredoxin by human sulfiredoxin. *Journal of Biological Chemistry.* ;283:22890–22894
- Krieger, D. W., Yenari, M. A. (2004). Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: what do laboratory studies teach us? *Stroke* 35, 1482–1489
- Lee, J. M., Zipfel, G. J. & Choi, D. W. (1999). The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 399, A7–A14

Miranda-Vizuete, A., Damdimopoulos, A.E., Pedrajas, J.R., Gustafsson, J.A., Spyrou, G. (1999) Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization. *Eur. J. Biochem.* 261, 405–412.

Nishiyama, H., Itoh, K., Kaneko, Y., Kishishita, M., Yoshida, O., and Fujita, J. 1997. A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth. *The Journal of cell biology* 137:899–908.

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

Peberdy, MA; Callaway, CW; Neumar, RW; Geocadin, RG; Zimmerman, JL; Donnino, M; Gabrielli, A; Silvers, SM; Zaritsky, AL; Merchant, R; Vanden Hoek, TL; Kronick, SL; American Heart, Association (2010). Part 9: post-cardiac arrest care: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 122 (18 Suppl 3): S768–86

Perbet S, Mongardon N, Dumas F, Bruel C, Lemiale V, Mourvillier B, *et al.* (2011). Earlyonset pneumonia after cardiac arrest: characteristics, risk factors and influence on prognosis. *Am J Respir Crit Care Med* 184(9):1048-54

Planson AG, Palais G, Abbas K, Gerard M, Couvelard L, Delaunay A, Baulande S, Drapier JC, Toledano MB. (2011). Sulfiredoxin protects mice from lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *Antioxid Redox Signal.* 11, 2071-80

Polderman KH, 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):1101-20

Polderman KH, Peerdeman SM, Girbes AR. (2001). Hypophosphatemia and hypomagnesemia induced by cooling in patients with severe head injury. *J Neurosurg* 94(5), 697-705

Raina, A.K, Templeton, D.J., Perry, G. Smith, M.A. (1999). Quinone reductase (NQO1), a sensitive redox indicator, is increased in Alzheimer's disease. *Redox Report*, 4(1-2), 23-27.

Rhee SG (2006). "Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling". *Science* 312 (5782): 1882–3.

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 International: Supplement.* 72, S3–S8

Rushworth, S.A, Ogborne, R.M, Charalambos, C.A, O'Connell, M.A. (2006). Role of protein kinase cdelta in curcumin-induced antioxidant responseelement-mediated gene expression in humanmonocytes. *BiochemBiophys Res Commun.* 341(4), 1007-165.

Scholz, RW, Graham KS, Gumprich E. Reddy CC. (1989). "Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the protection against membrane lipid peroxidation". *Ann NY Acad Sci* 570, 514–7

Shankaran, S. *et al.* (2005). Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N. Engl. J. Med.* 353, 1574–1584

Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology.* 82 (2), 291–5.

Sydenham, E; Roberts I; Alderson P. (2009). "Hypothermia for traumatic head injury.". *Cochrane Database of Systematic Reviews*

Thimmulappa RK, Fuchs RJ, Malhotra D, Scollick C, Traore K, Bream JH et al. Preclinical evaluation of targeting the nrf2 pathway by triterpenoids (cddo-im and cddo-me) for protection from lps-induced inflammatory response and reactive oxygen species in human peripheral blood mononuclear cells and neutrophils. *Antioxid. Redox Sign.*2007;9(11):1963-70

van den Broek MP, Groenendaal F, Egberts AC, Rademaker CM. (2010). Effects of hypothermia on pharmacokinetics and pharmacodynamics: a systematic review of preclinical and clinical studies. *Clin Pharmacokinet.* 49(5), 277-94

van der Worp, H. B., Sena, E. S., Donnan, G. A., Howells, D. W. & Macleod, M. R. (2007). Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Brain.* 130, 3063–3074

Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview". *Current Pharmaceutical Design* 10 (14): 1677–94.

Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., et al. (2003). Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat. Genet.* 35, 238–245.

Wei Q, Jiang H, Matthews CP, Colburn NH. (2008). Sulfiredoxin is an AP-1 target gene that is required for transformation and shows elevated expression in human skin malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(50), 19738-43

Xiao, G.; Guo, Q.; Shu, M.; Xie, X.; Deng, J.; Zhu, Y.; Wan, C. (2012). "Safety profile and outcome of mild therapeutic hypothermia in patients following cardiac arrest: Systematic review and meta-analysis". *Emergency Medicine Journal* 30 (2): 91–100

Yenari, M., Kitagawa, K., Lyden, P. & Perez-Pinzon, M. (2008). Metabolic downregulation: a key to successful neuroprotection? *Stroke*. 39, 2910–2917

Yenari, M., Wijman, C. & Steinberg, G. (2004). *Hypothermia in Neurocritical Care*. 141–178

Yenari, M.A. and Han, H.S. (2012). Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nature Reviews*, 267-278.

Zhou, Y., Duan, S., Zhou, Y., Yu, S., Wu, J., Wu, X., Zhao, J., Zhao, Y. (2015). Sulfiredoxin-1 Attenuates Oxidative Stress via Nrf2/ARE Pathway and 2-Cys Prdxs After Oxygen-Glucose Deprivation in Astrocytes. *Journal of Molecular Neuroscience* 55(4), 941-950

## Kasutatud veebiaadressid

1. <http://www.kiirabi.ee/index.php?tid=RlsgYLLKjZlag8iJXXHXdKfoaORiTjppLLjU6>
2. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q14011>

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

Mina, Kristi Reisspass (sünnikuupäev: 27.11.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „**Hüpothermia mõju antioksidatiivsele süsteemile**“ mille juhendajad on Hendrik Luuk ja Kersti Lilleväli
  - 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, 25.05.2015