

**RAKUKULTUURI TINGIMUSTE MÕJU RAKKUDE ELUMUSELE,  
STRESSITOLERANTSILE JA NRF2 AKTIIVSUSELE**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Marie Põlluaed, 206748LAAB  
Juhendaja: Rutt Taba, doktorant-nooremteadur,  
Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituut  
Kaasjuhendaja: Anton Terasmaa, vanemteadur,  
Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituut  
Õppekava: Rakenduskeemia ja geenitehnoloogia

## Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Marie Põlluaed  
/allkirjastatud digitaalselt/  
29.05.2023

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.  
Juhendaja: Rutt Taba  
/allkirjastatud digitaalselt/  
29.05.2023

Töö on lubatud kaitsmisele.  
Kaitsmiskomisjoni esimees: Indrek Koppel  
[allkiri ja kuupäev]



# **THE EFFECT OF CELL CULTURE CONDITIONS ON CELL VIABILITY, STRESS TOLERANCE AND NRF2 RESPONSE**

Bachelor thesis

Student: Marie Põlluaed, 206748LAAB

Supervisor: Rutt Taba, doctoral student-junior researcher,  
National Institute of Chemical Physics and Biophysics

Co-supervisor: Anton Terasmaa, senior researcher,  
National Institute of Chemical Physics and Biophysics

Study program: Applied Chemistry and Gene Technology

# Sisukord

Lühendid.....	7
Sissejuhatus.....	8
1. Kirjanduse ülevaade .....	9
1.1 Söötmed rakukultuuris .....	9
1.1.2 Söötme koostise mõju rakkudele.....	9
1.2 Hapnikutase rakukultuuris .....	11
1.3 Oksüdatiivse stressi eest kaitsev transkriptsioonifaktor NRF2 .....	12
1.1.2 Rakukultuuri tingimuste mõju NRF2 aktiivsusele.....	14
1.4 Rakkude stressorid .....	15
1.4.1 Vesinikperoksiid .....	15
1.4.2 Erastiin.....	16
1.4.3 RSL3 .....	16
1.4.4 Rotenoon.....	16
2. Meetodid.....	17
2.1 Rakkude kultiveerimine.....	17
2.2 Rakkude ettevalmistus katseteks .....	18
2.3 NRF2 raja aktiivsuse hindamine .....	18
2.4 Rakkude elujõulisuse hindamine MTT-ga .....	18
2.5 Andmete analüüs .....	18
3. Tulemused.....	19
3.1 Vesinikperoksiidi mõju rakkude elumusele.....	19
3.2 Erastiini mõju rakkude elumusele .....	20
3.3 RSL3 mõju rakkude elumusele .....	21
3.4 Rotenooni mõju rakkude elumusele .....	23
3.5 Rakustressorite mõju HepG2ARE rakkude elumusele ja NRF2 aktiivsusele .....	24
3.5.1 Vesinikperoksiidi mõju .....	24
3.5.2 Erastiini mõju.....	25
3.5.3 RSL3 mõju.....	25
3.5.4 Rotenooni mõju.....	25
Arutelu.....	27
Kokkuvõte.....	29
Kasutatud kirjandus.....	30
Lisad.....	35
Lisa 1. Molaarmasside teisendused logaritmilisse skaalasse.....	35

## Annotatsioon

Rakukultuur on olnud teadustööde ja prekliiniliste uuringute lahutamatu osa juba aastakümneid. Muutused rakkude metaboolsetes protsessides ja antioksidantsetes radades on tihti just mitmete haiguste põhjustajaks, mistõttu on oluline neid radu mõista. Tuumafaktor erütroid 2-ga seotud faktor 2 (NRF2) on üks peamisi antioksidantsete kaitsemehhanismide regulaatoreid ning ühtlasi oluline potentsiaalne terapeutiline sihtmärk. Traditsiooniliselt kasvatakse rakke inkubaatorites, kus hapnikusisaldus on 18–19%, samas kui inimese kudedes on hapnikku 2–6%. Lisaks on levinud söötmete (nt *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)) koostis oluliselt erinev inimese vereplasma koostisest. Sellised mittefüsioloogilised tingimused põhjustavad muutusi rakkude metabolismis ja antioksidantsetes vastustes ning moonutavad rakukultuuri uuringutest saadavaid tulemusi, mistõttu peaks rakkude kasvatamine toimuma võimalikult *in vivo* lähedastes tingimustes. Töö eesmärk oli hinnata rakkude elumust ja NRF2 aktiivsust vastusena erineva toimemehhanismiga stressoritele traditsioonilises DMEM ning füsioloogilises Plasmax söötmes erinevate hapniku tasemete juures (19% ja 5%). Töö tulemustest selgus, et rakkude elumus ja antioksidantne vastus sõltuvad nii söötimest kui ka hapnikust. Eri tingimustes kasvatatud rakkude käitumine vastuseks erinevatele stressoritele ei ole ennustatav ning seetõttu on oluline rakukultuuri tingimustele tähelepanu pöörata. Eriti oluline on seda teha teadustöodes, mille eesmärk on uurida rakkude metabolismi, antioksidantseid vastuseid, hapnikust sõltuvaid radu ning töötada välja uusi ravimeid.

## Abstract

Cell culture has been an important part of research and preclinical studies for decades. Alterations in cell metabolic processes and antioxidant pathways are often at the root of many diseases, so it is important to understand these pathways in detail. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) is one of the main regulators of antioxidant pathways and a potential therapeutic target for many diseases. Traditionally, cells are grown in incubators where the oxygen tension is approximately 18–19%, whereas oxygen tensions to which human tissues are exposed are far lower (2–6%). In addition, the composition of commonly used cell culture media such as Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) is significantly different from the composition of human blood plasma. Such non-physiological conditions cause changes in cell metabolism and antioxidant pathways and skew results obtained from cell culture studies. Therefore, cells should be cultured in conditions as close as possible to *in vivo*. This study aimed to evaluate cell viability and NRF2 activity in response to different cellular stressors in classic cell media DMEM and physiological media Plasmix at different oxygen levels (19% and 5%). The results of this work revealed that cell survival and antioxidant response are dependent on both the media and oxygen. The impact of cell culture conditions on cell biology is not predictable and therefore it is important to pay attention to finding proper cultivation conditions. It is especially important in research that aims to study cell metabolism, antioxidant responses, oxygen-dependent pathways, and develop new drugs.

## Lühendid

ARE – antioksidantidele vastav element

ATCC – *American Type Culture Collection*

BLVRA – biliverdiini reduktaas A

BLVRB – biliverdiini reduktaas B

CUL3 – *Cullin3*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMEM/F12 – DMEM söötme ja Ham's F12 söötme 1:1 segu, sisaldab lisakomponente (tsink, hüpoksaantiin, tümidiin, putrestsiin)

DMSO – dimetüülsulfoksiid

DPBS – Dulbecco fosfaatpuhverdatud soolalahus

EDTA – etüleendiamiintetraatseethape

FBS – veise loote seerum

G6PD – glükoos-6-fosfaatdehüdrogenaas

GAPDH – glütseeraldehüüd-3-fosfaadi dehüdrogenaas

GCL – glutamaat-tsüsteiinligaas

GPX4 – glutatioonperoksüdaas 4

GR – glutatiooni reduktaas

GSH – glutatioon

GSSG – glutatioondisulfiid

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – vesinikperoksiid

HIF-1 $\alpha$  – hüpoksiast indutseeritud faktor 1 $\alpha$

HMOX1 – heemoksügenaas 1, geen

HO-1 – heemoksügenaas-1, ensüüm

HPLM – *Human Plasma Like Medium*, inimese plasma taoline sööde

KEAP1 – Kelchi-sarnane ECH-ga seotud valk 1

MEF – hiire embrüonaalsed fibroblastid

MTT – 3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid

NADH – nikotiinamiidadeniindinukleotiidi redutseeritud vorm

NADPH – nikotiinamiidadeniindinukleotiidfosfaadi redutseeritud vorm

NQO1 – NAD(P)H kinoon dehüdrogenaas

NRF2 – tuumafaktor erütroid 2-ga seotud faktor 2

PGD – fosfoglükonaatdehüdrogenaas

PPP – pentoosfosfaadi rada

PUFA – polüküllastamata rasvhapped

RNS – reaktiivsed lämmastiku ühendid

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid

RSL3 – onkogeense RAS-i selektiivne letaalne ühend ((1S,3R)-2-(2-kloroatsetüül)-2,3,4,9-tetrahydro-1-[4-(metoksükarbonüül)fenüül]-1H-pürido[3,4-b]indool-3-karboksülaad)

SMAF – väike muskuloaponeurootilise fibrosarkoomi valk

VDAC – mitokondriaalsed pingest sõltuvad aniooni kanalid

xC<sup>-</sup> süsteem – tsüstiini/glutamaadi antiporter süsteem

## Sissejuhatus

Rakukultuur on pikka aega olnud teaduse lahutumatu osa ning mänginud olulist rolli nii teadustöodes kui ka prekliinilistes uuringutes, tuues kaasa mitmeid läbimurdelisi avastusi. Muutused rakkude metabolismis on mitmete haiguste põhjustajaks, mistõttu on oluline neid radu detailideni mõista. Rakkude kasvatamine peaks seega toimuma võimalikult *in vivo* sarnastes tingimustes. Traditsiooniliselt on rakke kasvatatud inkubaatorites, kus hapnikusisaldus on 18–19%, samas kui enamikus inimese kudedes on hapnikusisaldus vaid 2–6%. Ka klassikalised enimkasutatavad söötmed sisaldavad kordades rohkem toitaineid, kui rakkudele tegelikult organismis kättesaadav on. Sellised ebaloomulikud tingimused põhjustavad muutusi rakkude metabolismis, mille tõttu võivad mitmed protsessid rakkudes olla moonutatud või veel tundmatud ning see raskendab efektiivsete ravivõimaluste leidmist mitmetele haigustele. Paljud haigused on seotud rakkude antioksidantsete kaitsemehhanismidega, üks peamisi transkriptsioonifaktoreid, mis seda rakkudes reguleerib on tuumafaktor erütroid 2-ga seotud faktor 2 (NRF2). Lisaks on NRF2 tugevalt seotud ferroptoosiga – rauast sõltuva rakusurmamehhanismiga –, millel on samuti oluline roll mitmete haiguste kujunemisel.

Juhtides tähelepanu rakukultuuri tingimuste olulisusele kirjeldatakse antud töö teoreetilises osas söötmete koostiste ja hapniku taseme mõju rakkude metabolismile. Lisaks kirjeldatakse NRF2 antioksidantse kaitsemehhanismi olemust ning selle sõltuvust rakukultuuri tingimustest. Töö eksperimentaalses osas hinnati traditsioonilises DMEM söötmes ja füsioloogilises Plasmax söötmes ning erinevate hapnikutasemetega (19% ja 5%) juures kasvatatud rakkude elumust kasutades MTT meetodit. Rakkudes stressi indutseerimiseks kasutati erineva toimemehhanismiga ühendeid. Lisaks vaadeldi NRF2 aktiivsust lutsiferaasi meetodil samade stressorite mõjul.

Söötme ja hapniku mõju hindamiseks rakkude elumusele ja stressivastusele kasutati erineva metaboolse profiiliga rakke ning erinevaid rakustressi indutseerivaid ühendeid. Roti neuronaalne B35 rakuliin on valdavalt oksüdatiivne, lagundades glükoosi peamiselt pentoosfosfaadirajas ning kasutades püruvaati Krebsi tsükli. Roti astrotsüütne C6 rakuliin on seevastu valdavalt glükolüütiline. Selles rakuliinis hoiustatakse enamus glükoosist rakkudes glükogeenina või lagundatakse glükolüüsis, millest saadud püruvaat konverteeritakse peamiselt laktaadiks. Lisaks kasutati NRF2 raja aktiivsuse hindamiseks inimese maksavähi HepG2ARE rakuliini, mille genoomi on integreeritud jaanimardikast pärinev lutsiferaasi geen, mida kontrollib ARE element geeni promotori alas ning mis on NRF2-st sõltuv. Erinevate stressoritena kasutati oksüdatiivset stressi põhjustavat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ferroptoosi indutseerivaid erastiini ja RSL3 ning mitokondriaalse kompleks I inhibiitorit rotenooni.

Töö eesmärkideks oli hinnata rakkude elumust ja NRF2 aktiivsust vastusena erinevatele stressoritele nii traditsioonilises kui ka füsioloogilises söötmes erinevate hapniku tasemetega juures.



# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Söötmed rakukultuuris

Rakkude kasvatamine kultuuris on teaduses ja meditsiinis olnud olulisel kohal juba 1950ndatest, aidates aastakümnete jooksul paremini mõista rakubioloogiat ning leida ravimeid erinevatele haigustele. Selleks, et rakukultuuri uuringutest saadud tulemused ka *in vivo* relevantseks oleksid, on oluline rakke kasvatada võimalikult füsioloogilistes tingimustes. Paraku kasvatatakse rakke praegu enamasti tingimustes, mis rakkude loomulikku keskkonda ei meenuta.

Rakukultuuris kasutatavate söötmete põhilise koostise formuleeris esimesena Harry Eagle juba 1955. aastal. Tema tööde algne eesmärk oli kindlaks teha milliseid metaboliite teatud rakutüübid kasvuks vajavad, mitte luua üks kindel sööde. Sellest hoolimata avaldas ta oma töös täpse söötme koostise, mis oli optimaalne teatud rakuliinide kultiveerimiseks.<sup>1</sup> Neli aastat hiljem tegid R. Dulbecco ja G. Freeman Eagle'i esialgsest söötimest oma variandi, lisades sinna neljakordse koguse aminohappeid ja vitamiine<sup>2</sup>. See sööde on tänapäevalgi laialdaselt tuntud ja kasutatud *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) nime all. Söötmeid koostades on pigem mõeldud sellele, et rakke saaks kasvatada võimalikult pikaajaliselt ning vähendada kordi, kui tuleb söödet vahetada<sup>3,4</sup>, kui sellele, et rakud oleksid võimalikult *in vivo* lähedastes tingimustes. Seetõttu on paljude toitainete sisaldus nendes söötmetes väga erinev kontsentratsioonidest, mis on imetajate veres<sup>5</sup>. Viimaste uuringute valguses, mis näitavad, et söötme koostisel on oluline mõju erinevatele rakuliste protsessidele ja metabolismile<sup>6-8</sup>, on välja töötatud kaks uut söödet, milles toitainete ja mikroelementide koostis on sarnane inimese plasmale: *Human Plasma-Like Medium* (HPLM)<sup>8</sup> ja Plasmax<sup>9</sup>.

Rinnavähi rakkude kasvatamisel füsioloogilises Plasmax söötmes ja toitainete rikkas DMEM-F12 söötmes on näidatud, et Plasmaxis kasvatatud rakkude metaboolne sarnanevus palju enam *in vivo* tuumorite metaboolsele profiilile, kui DMEM-is kasvatatud rakkude puhul. Lisaks ilmnes, et mittefüsioloogilised toitainete kontsentratsioonid moonutavad vähirakkude metabolismi ning loovad rakkudes kunstlikke fenotüüpe.<sup>9,10</sup> Rakkude kasvatamisel füsioloogilises söötmes on leitud ka, et rakud on tundlikumad erinevatele toksilistele ühenditele, mis juhib taaskord tähelepanu keskkonna olulisusele, näiteks uudsete ravimite tõhususe uuringutes<sup>6,11</sup>. Lisaks on juba paari aasta jooksul rakukultuuri uuringutes tehtud uusi avastusi, mis on just ilmnunud füsioloogilist söödet kasutades<sup>8,12</sup>.

### 1.1.2 Söötme koostise mõju rakkudele

Üks suurimaid erinevusi nn klassikaliste söötmete ja füsioloogiliste söötmete vahel on glükoosi kontsentratsioon. DMEM-is on glükoosi 25 mM<sup>5</sup>, mida on viis korda rohkem kui terve inimese veres (Plasmaxis on glükoosi kontsentratsioon 5,6 mM) (joonis 1). Liigne glükoos käivitab rakkudes kaskaadi erinevaid reaktsioone, mis normaalse glükoosi taseme juures rakkudes ei toimu. Mida rohkem on keskkonnas glükoosi, seda aktiivsemalt peab rakkudes toimuma glükolüüs ning Krebsi tsükkel, mis viib suurenenud nikotiinamiidadeniindinukleotiidi redutseeritud vormi (NADH) tootmiseni, mis omakorda võib viia reaktiivsete hapniku ühendite (ROS) ületootmiseni ning viia rakud oksüdatiivsesse stressi<sup>13,14</sup>. Reaktiivsed hapniku ühendid võivad vähendada osade glükolüütiliste ensüümide aktiivsust<sup>15</sup>, näiteks glütseeraldehüüd-3-fosfaatdehüdrogenaasi

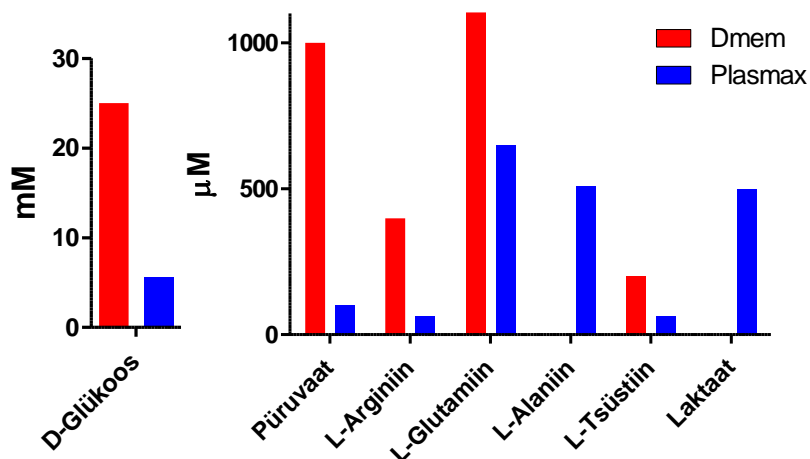
(GAPDH), mis katalüüsib glükolüüsi kuuendat reaktsiooni<sup>13</sup>. Kui GAPDH on ROS-ide ja NADH tasemete tõusu poolt inhibeeritud, siis väheneb glükoosi lagundamine glükolüüsi ja Krebsi tsükli kaudu. Liigne glükoos tuleb seega lagundada kasutades alternatiivseid radu, mis muidu on glükoosi metabolismis pigem vähe tähtsad. Neid radu on ühtlasi seostatud ROS-ide tootmisega ning oksüdatiivse stressi suurenemisega.<sup>13</sup> Vastuseks oksüdatiivsele stressile on rakud võimelised glükoosi metabolismi ümber suunama pentoosfosfaadiratta (PPP)<sup>16</sup>, milles toodetud nikotiinamiidadeniindinukleotiidfosfaadi redutseeritud vormil (NADPH) on oluline roll rakulises kaitses oksüdatiivse stressi vastu<sup>17</sup>. NADPH-st sõltub muuhulgas glutatioondisulfiidi (GSSG) redutseerimine glutatiooniks (GSH), mis redutseerib reaktiivseid hapniku ühendeid ja seeläbi vähendab oksüdatiivset stressi<sup>18</sup>. Samas on mitmed uuringud näidanud, et kõrge glükoosi tase inhibeerib PPP esimest ensüümi glükoos-6-fosfaatdehüdrogenaasi (G6PD)<sup>19–21</sup>, järelikult ei saa efektiivselt toimida PPP-st sõltuv ROS-ide vastane kaitsemehhanism ning oksüdatiivne stress rakkudes suureneb.

Söötme mõju glükolüüsile aga ei pruugi olla nii ühene, näiteks on leitud, et klassikalise söötme asendamine Plasmaxiga vähendab glükolüüsi aktiivsust HeLa ja Vero E6 rakkudes, aga tõstab kopsuvähirakkudes A549<sup>11</sup>, mis tuleneb rakkude erinevast metabolismist. See näitab, et erinevad rakud reageerivad söötme koostisele erinevalt. Siiani on kõrget glükoosi taset söötmetes õigustatud sellega, et vältida glükoosi ammendumist rakkude kasvatamisel mitme päeva jooksul ning et paljudes kasvajakududes toimub glükolüüs suurema aktiivsusega kui normaalsetes rakkudes<sup>7</sup>.

Teine oluline söötme komponent on rakkude poolt lisaenergiaallikana kasutatav püruvaat, mida DMEM sisaldab 10 korda rohkem kui Plasmax (vastavalt 1000  $\mu\text{M}$  ja 100  $\mu\text{M}$ , joonis 1)<sup>5,22</sup>. Püruvaat aitab kaitsta rakke vesinikperoksiidi ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) eest, mis võib tekkida osade söötme komponentide, nagu polüfenoolid ja askorbiinhape, oksüdeerumisest. On näidatud, et erinevad oksüdeerivad ühendid on püruvaati sisaldavas söötmes vähem toksilised ning püruvaat vähendab oksüdatiivset stressi, luues seega artefakte, eriti uuringutes, mis vaatlevad oksüdatiivset stressi.<sup>22</sup> Lisaks on viimastel aastatel selgunud, et kõrge püruvaadi kontsentratsioon DMEM-is põhjustab hüpoksiast indutseeritud faktor  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ) stabilisatsiooni, mis võib viia rakkudes pseudohüpoksilise seisundi tekkimiseni isegi normaalse hapnikutaseme juures ning järgnevate hüpoksiaga seotud geenide avaldumiseni. Seevastu rakkude kultiveerimine füsioloogilises söötmes aitab rakkudes pseudohüpoksilist seisundit vältida.<sup>9</sup>

Ka mõnede aminohapete liig klassikalistes söötmetes (joonis 1) paneb rakkudes toimuma protsessid, mis päriselt organismis aset ei leia. Näiteks on näidatud, et kõrge arginiini kontsentratsioon DMEM-is põhjustab ühe urea tsükli reaktsiooni ümberpöördumise. Kui normaalselt toodetakse rakkudes argininosuktsinaadist arginiini ja fumaraati, siis DMEM-is kasvatatud rakkudes hakkas see reaktsioon toimima vastupidiselt, mis viis kõrge argininosuktsinaadi tasemeni. Mõjutatud on ka aminohapete omastamine ja vabastamine ning metabolism – mida enam on rakkudel võimalik aminohappeid kätte saada, seda rohkem neid ka tarbitakse ja/või sekreteeritakse. Näiteks glutamiini, mida on Plasmaxis kolm korda vähem kui DMEM-F12-s, tarbiti Plasmaxis ka vähem. Samasalaniini, mida Plasmaxis sisaldab kümme korda rohkem, tarbiti Plasmaxis, kuid sekreteeriti DMEM-F12-s kasvatatud rakkudes.<sup>9</sup> Liigne tsüstiini (tsüsteiini derivaat) kontsentratsioon söötmes võib aga põhjustada mõnede vähirakkude muutumist sõltuvaks glutamiini metabolismist, mis muidu kasvajatele omane ei ole<sup>10</sup>.

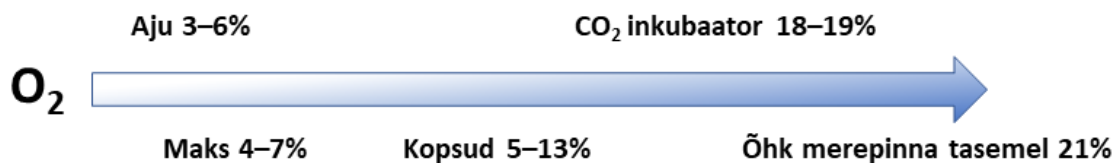
Füsioloogilistesse söötmetesse (Plasmax ja HPLM) on lisatud ka laktaati (joonis 1), mida enamus teisi söötmeid ei sisalda<sup>5</sup>. Ajalooliselt on laktaati peetud lihtsalt anaeroobse metabolismi jääkproduktiks, kuid nüüdseks on teada, et laktaati toodetakse ja kasutatakse pidevalt mitmete rakkude poolt ka hapnikurikas keskkonnas<sup>23</sup>. Eriti oluline on see ajus, kus astrotsüüdid toodavad glükoosist peamiselt laktaati, mida neuronid energiaallikana kasutavad<sup>24</sup>, ka *in vitro* uuringutes on näidatud, et neuronid eelistavad glükoosile pigem laktaati<sup>25,26</sup>. Seega on neuronalsed rakud rakukultuuris laktaadi puuduse tõttu sunnitud oma metabolismi muutma.



Joonis 1. Näiteid söötme komponentide erinevatest kontsentratsioonidest DMEM-is ja Plasmaxis.

## 1.2 Hapnikutase rakukultuuris

Teine sageli ignoreeritav parameeter rakkude kasvatamisel on hapniku sisaldus inkubaatoris. Enamasti kasvatatakse rakke 5% CO<sub>2</sub> ja 18–19% O<sub>2</sub> juures, millele kirjanduses tihti viidatakse kui normoksiale<sup>7,27</sup>, samas on enamikus inimese kudedes hapnikusisaldused vahemikus 2%–6% (osarõhud normaalrõhu (101,3 kPa) suhtes, 2–6 kPa), kõrgeim on see vaid kopsudes (kuni 13%) (joonis 2)<sup>28</sup>. Põhjused, miks rakke sellistes hüperoksilistes tingimustes kasvatatakse, on lihtsad: esiteks on raskusi rakkude kultiveerimiseks sobivate hapniku tasemete kindlaks määramisel; teiseks on tehnoloogiad, mis aitaksid säilitada füsioloogilisi hapniku tasemeid laboris, raskesti kättesaadavad<sup>28</sup> ning kolmandaks, kõrge hapnikutasemega tagatakse, et mitokondriaalne hingamine rakukultuuris ei ole limiteeritud hapniku kättesaadavuse poolt<sup>29</sup>. Kui rakke kasvatatakse mittefüsioloogiliste hapnikutasemete juures, tuleb olla teadlik ka võimalikest hapniku mõjudest rakkudele. Näiteks võib kõrge hapnikutase stimuleerida mitmeid hapnikku tarbivaid ensüüme (NADPH oksüdaas, monoamiini oksüdaas jt) tootma rohkem reaktiivseid hapniku ja lämmastiku ühendeid (ROS/RNS), millede ületootmine viib rakud oksüdatiivsesse stressi ning mõjutab ka teisi ROS/RNS-ide poolt reguleeritud radu<sup>29</sup>. Lisaks on näidatud, et hüperoksilistes tingimustes on rakkudes aktiveeritud oksüdatiivse stressi eest kaitsvad ja redokstasakaalu säilitavad mehhanismid, mis näitab, et rakud on pidevas oksüdatiivse stressi seisundis<sup>30</sup>.



**Joonis 2.** Näiteid kudede hapnikusaldustest võrreldes inkubaatori ja merepinna hapnikusaldustega. Hapnikusaldus väljendatuna protsentides näitab osarõhku normaalrõhu suhtes, milleks on 100% (101,3 kPa).

Ühed tuntumad „hapniku sensorid“ rakkudes on transkriptsioonifaktorid hüpoksiast indutseeritud faktorite (HIF) perekonnast. Neist enim uuritud on HIF-1 $\alpha$ , mis reguleerib rakkude vastust hüpoksiiale ning vahendab mitmeid füsioloogilisi ja rakulisi mehhanisme, et aidata rakkudel kohaneda hapnikuvaese keskkonnaga<sup>31</sup>. HIF-id reguleerivad ka mitmeid ROS/RNS tootvaid ensüüme<sup>29</sup>. Kui rakus on normaalne hapnikutase, siis suurem osa HIF-1 $\alpha$ -t lagundatakse proteasoomide poolt, kui aga hapnikutase langeb, siis HIF-1 $\alpha$  liigub tuuma, millele järgneb sihtmärkgeenide ekspressioon. HIF-1 $\alpha$  kontrollib mitmeid geene, mis aitavad hüpoksilistes tingimustes metabolismi kallutada anaeroobse glükolüüsi poole, inhibeerides Krebsi tsükli ning vähendades mitokondrite hapniku kasutamist vältimaks ROS-ide teket.<sup>31</sup> Lisaks arvatakse HIF-1 $\alpha$ -l olevat suur roll kasvaja progressioonis, invasiivsuses ja metastaseerumises<sup>31</sup>, mis muudab selle valgu eriti huvipakkuvaks vähiuuringutes. On leitud, et HIF-1 $\alpha$  ekspressioon suureneb füsioloogiliste hapniku tasemete (< 6% O<sub>2</sub>) juures eksponentsiaalselt<sup>32</sup>, seega on selge, et HIF-1 $\alpha$ -t ja selle normaalset regulatsiooni on raske uurida hüperoksilistes tingimustes.

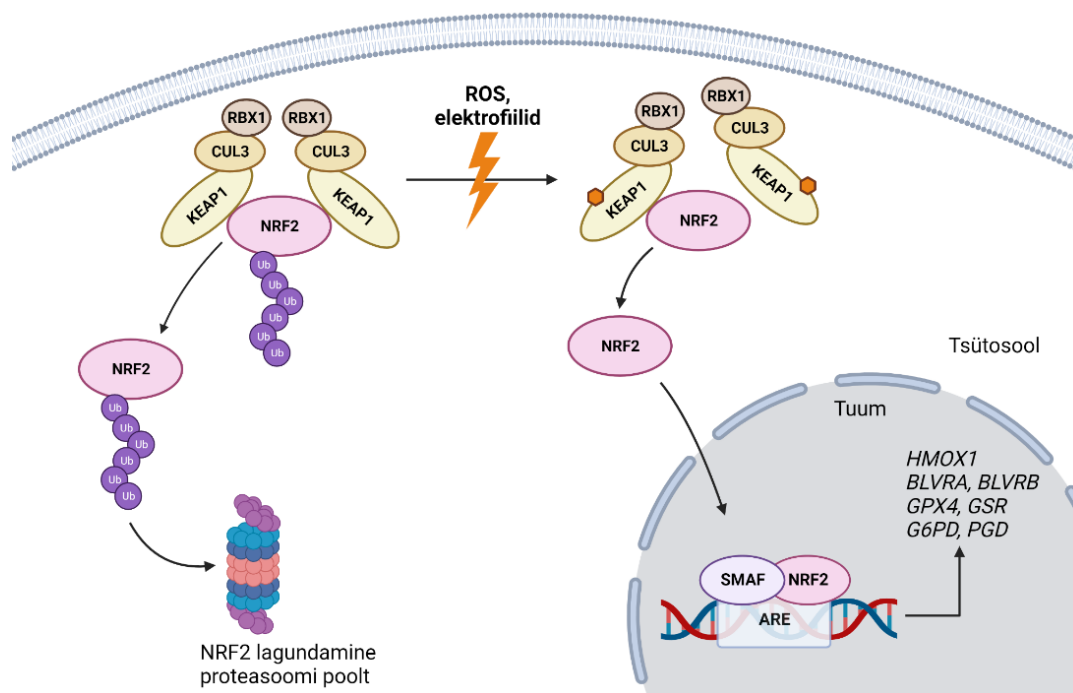
Ühes hiljutises artiklis võrreldi 19%-lises hapnikus ning 5%-lises hapnikus kasvatatud erinevate rakuliinide geeniekspressiooni ning selgus, et hapniku tase mõjutas nendes tuhandeid geene<sup>33</sup>. Üldiselt oli diferentsiaalselt ekspresseerunud geene 5% hapniku juures rohkem. Igas rakuliinis olid hapniku poolt mõjutatud erinevad bioloogilised protsessid, mis näitab, et hapniku mõju on väga rakutüübi spetsiifiline. Näiteks kahest inimese eesnäärme adenokartsinoomi rakuliinist LNCaP ja PC-3 rakkudest leiti vastavalt 2126 ning 1461 diferentsiaalselt ekspresseerunud geeni, millest kattuvaid geene oli ainult 5%. Lisaks leiti, et enamus geene, mis olid hapniku poolt mõjutatud, on seotud vähibioloogiaga.<sup>33</sup>

### 1.3 Oksüdatiivse stressi eest kaitsev transkriptsioonifaktor NRF2

Aeroobse metabolismi või ksenobiootikumide tulemusena toodetakse organismis pidevalt reaktiivseid hapniku ühendeid<sup>34</sup>, mille taseme kontrollimine rakkudes on väga oluline. Liiga palju ROS-e või antioksidantsete kaitsemehhanismide puudulik toimimine suurendab rakkudes oksüdatiivset stressi, mis mängib olulist rolli vananemises ja paljude haiguste, näiteks vähi, kardiovaskulaarsete haiguste, diabeedi ja neurodegeneratiivsete haiguste tekkes<sup>35</sup>.

Redokstasakaalu säilitamiseks on rakkudes mitmeid antioksidantseid kaitsemehhanisme, millest üks olulisemaid on transkriptsioonifaktor NRF2. Normaalses olukorras ubikvitüleeritakse NRF2 tsütoplasmas Kelchi-sarnase ECH-ga seotud valgu 1 (KEAP1), Cullin3 (CUL3) ning RING box 1 (RBX1) kompleksi poolt, misjärel NRF2 lagundatakse proteasoomide poolt<sup>36</sup>. Stressiolukorras

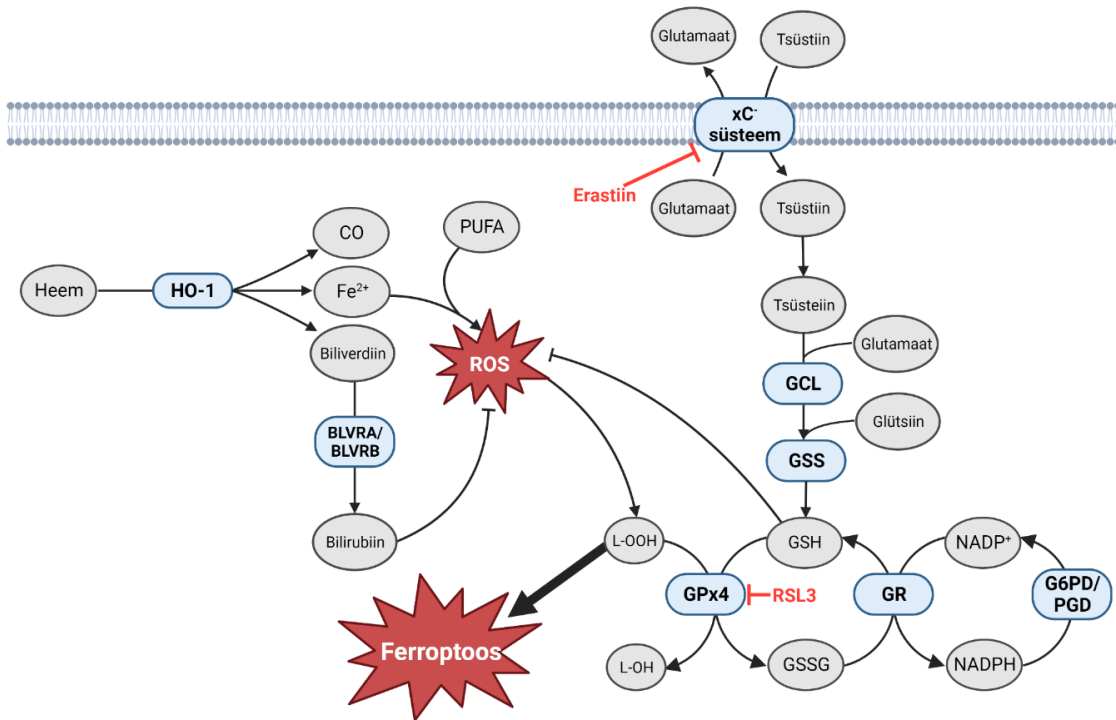
modifitseerivad elektrofiilid või ROS-id KEAP1 tsüsteiini jääke, mis inaktiveerivad KEAP1, viies NRF2 stabilisatsioonini<sup>36</sup>. Seejärel liigub NRF2 tuuma, kus ta dimeriseerub väikese muskuloaponeurootilise fibrosarkoomi valguga (SMAF), seondub antioksidantidele vastavale elemendile (ARE)<sup>37</sup> ning indutseerib üle 250 geeni<sup>38</sup> (joonis 3). Lisaks antioksidantsele kaitsele reguleerivad NRF2 sihtmärkgeenid ka näiteks ravimite metabolismi, põletikuvastast kaitset<sup>39</sup>, DNA parandamist<sup>40</sup> ja apoptoosi ärahoidmist<sup>41</sup>, mis muudab NRF2 oluliseks terapeutiliseks sihtmärgiks<sup>42</sup>.



**Joonis 3.** NRF2 regulatsioon rakkudes. Normaalses olukorras on NRF2 tsütosoolis seotud KEAP1-CUL3-RBX1 kompleksiga, mis tagab NRF2 ubikitüleerimise ja lagundamise proteasoomide poolt. Stressiolukorras modifitseerivad ROS-id või elektrofiilid KEAP1 tsüsteiini jääke, mille tagajärjel NRF2 dissotsieerub KEAP1 küljest ning stabiilne NRF2 liigub tuuma. NRF2 dimeriseerub tuumas SMAF valguga ja seondub ARE elemendile, indutseerides nii sadu erinevaid geene (joonisel toodud näiteks *HMOX1*, *BLVRA*, *BLVRB*, *GPX4*, *GSR*, *G6PD*, *PGD*). Joonis koostatud kasutades rakendust BioRender.

NRF2 on tugevalt seotud ferroptosisiga, hiljuti kirjeldatud rakusurmamehhanismiga, kus toimub rauast sõltuv lipiidide peroksüdatsioon<sup>43,44</sup> ning mida seostatakse paljude erinevate haigustega (näiteks vähi, südame, neeru ja neurodegeneratiivsete haigustega)<sup>45</sup>. Mitmed valgud ja ensüümid, mis aitavad vältida lipiidide peroksüdatsiooni, on reguleeritud NRF2 poolt. Näiteks osalevad NRF2 poolt reguleeritud geenid heemi sünteesis ja lagundamises, tagades nii raua tasakaalu rakkudes. Üks olulisemaid on heemoksügenaas-1 (*HMOX1*) geeni poolt kodeeritav ensüüm heemoksügenaas-1 (HO-1), mis katalüüsib NADPH juuresolekul heemi lagundamist raua ionideks ( $\text{Fe}^{2+}$ ), süsinikoksiidiks (CO) ja biliverdiiniks, mis konverteeritakse kiiresti bilirubiiniks biliverdiini reduktaas A (BLVRA) või biliverdiini reduktaas B (BLVRB) poolt (joonis 4).<sup>46</sup> Kõiki neidprodukte on seostatud antiapoptootiliste, põletikuvastaste või antioksidantsete protsessidega<sup>47-49</sup>, lisaks on näidatud, et bilirubiin kaitseb ka lipiidide peroksüdatsiooni eest<sup>50</sup>. Samas võivad vabad rauaioonid  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga reageerides moodustada tugevaid oksüdeerivaid ühendeid, mis reageerivad polüküllastamata rasvhapetega (PUFA) membraanides, viies nii rakud hapniku mõjul ferroptosisi<sup>51</sup> (joonis 4).

NRF2 osaleb ka GSH, teise olulise antioksidantse kaitsemehhanismi, sünteesi ja metabolismiga seotud geenide regulatsioonis<sup>51</sup>. Rakk omandab tsüstiini rakuvälisest keskkonnast läbi tsüstiini/glutamaadi antiporter süsteemi (x<sup>c</sup> süsteem). Tsüstiin redutseeritakse raku sees tsüsteiiniks, millele lisatakse seejärel glutamaat-tsüsteiinligaasi (GCL) poolt L-glutamaat ning glutatioonsüntetaasi (GSS) poolt glütsiini, et toota GSH-d. Glutatiooni kasutab näiteks GPX4, mis redutseerib lipiidperoksiide lipiidalkoholideks ning oksüdeerib GSH GSSG-ks. GSSG redutseeritakse tagasi GSH-ks glutatiooni reduktaasi (GR) abil – see reaktsioon vajab NADPH-d, mida toodetakse pentoosfosfaadirajas ensüümide G6PD ja fosfoglükonaatdehüdrogenaasi (PGD) poolt (joonis 4). Kui GPX4 või x<sup>c</sup> süsteem on inhibeeritud, siis hakkavad raku kuhjuma lipiidperoksiidid, mis viivad ferroptoosini.<sup>51,52</sup>



**Joonis 4.** Antioksidantsed kaitsemehhanismid raku. Sinisega ja paksus kirjas olevad elemendid on reguleeritud NRF2 poolt. Punasega on näidatud ühendid, mis indutseerivad rakustressi ja võivad põhjustada rakkudes ferroptoosi. NRF2 reguleerib rakkudes mitmeid ensüüme, mis aitavad kaitsta rakke ROS-ide, lipiidide peroksüdatsiooni ja ferroptoosi eest. NRF2 reguleerib heemi lagundamises osalevat ensüümi HO-1, mille produkte seostatakse antioksidantsete protsessidega. Samas võib heemi lagunemisel tekkinud Fe<sup>2+</sup> reageerida PUFA-de ja ROS-idega, mis viib lipiidide peroksüdatsioonini ning nende kuhjumisel ferroptoosini. ROS-ide ja lipiidperoksiidide neutraliseerimiseks on rakkudes ka teine GSH-l põhinev antioksidantne kaitsemehhanism. Rakk omandab tsüstiini läbi x<sup>c</sup> antiporter süsteemi. Seejärel redutseeritakse tsüstiin tsüsteiiniks, millele järgneb glutamaadi ja glütsiini lisamine vastavalt GCL-i ja GSS-i poolt. Tekkinud GSH-d kasutab GPX4 lipiidperoksiidide redutseerimiseks. Seejuures tekkinud GSSG redutseeritakse taas GSH-ks GR-i poolt, mis vajab toimimiseks pentoosfosfaadiraja ensüümide poolt toodetud NADPH-d. Joonis koostatud kasutades rakendust BioRender.

### 1.1.2 Rakukultuuri tingimuste mõju NRF2 aktiivsusele

Hapnikutase mõjutab rakkudes paljusid erinevaid protsesse. Hüperoksilist keskkonda on üleüldiselt seostatud suurenenud ROS-ide tootmisega raku, mistõttu on tõenäoline ka NRF2 taseme tõus sellistes tingimustes, mis on leidnud kinnitust ka tehtud tööde poolt. Näiteks on kirjeldatud, et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

lisamine indutseeris 5% O<sub>2</sub> juures kasvatatud hiire embrüonaalsetes fibroblastides (MEF) esimese tunni jooksul kiire tuumasise Nrf2 tõusu, mis hiljem langes tagasi basaaltasemele. Samas kui hüperoksilistes tingimustes (40% hapniku juures) oli Nrf2 basaalne tase nii tsütosoolis kui ka tuumas juba kõrgemal ning ei muutunud peale H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lisamist.<sup>53</sup> See näitab, et rakkude kasvatamine hüperoksilistes tingimustes tekitab oksüdatiivset stressi ja aktiveerib vastavad kaitsemehhanismid ning uue stressi tekkel ei suuda rakud enam sellele reageerida. Arvatakse, et NRF2 kroonilisel tõusul ja sealt tuleneval vastusel on ülempiir, mille kättesaamisel, seda enam ületada ei saa.<sup>53</sup> Sarnast efekti on nähtud ka varasemas töös inimese primaarsete endoteeli rakkudega<sup>54</sup>. Ka hiire primaarsetes kasvajakudedes on näidatud, et tavapärasel hapnikus oli rakkudes suurenenud Nrf2 tase ja vähenenud Keap1 tase võrreldes kasvajakudega füsioloogilise hapniku (3%) juures<sup>55</sup>. Lisaks on mitmete NRF2 sihtmärkide, nagu HO-1, NAD(P)H kinoon dehüdrogenaas (NQO1), tioredoksiini reduktaas-1, tase erinevates rakutüüpides hüperoksilistes tingimustes ülesreguleeritud<sup>53,56,57</sup>.

Siiani ei ole tehtud väga palju töid, mis näitaksid, kuidas söötme koostis mõjutab NRF2 taset ja aktivatsiooni. On leitud, et glükoos suurendab kontsentratsioon-sõltuvalt NRF2 transkriptsiooni aktiivsust ning NQO1 ja HMOX1 ekspressiooni inimese primaarsetes endoteeli rakkudes<sup>58</sup>, inimese hepatotsüütides<sup>59</sup> ning hiire primaarsetes kardiomyotsüütides<sup>60</sup>. Lisaks näidati ühes värskelt ilmunud publikatsioonis, et L-tsüstiin tõstab erinevates rakuliinides NRF2 taset, kusjuures selline toime avaldus juba 100 µM L-tsüstiini juures. DMEM sisaldab L-tsüstiini kaks korda rohkem – 200 µM – seega piisab DMEM-is sisalduvast kogusest NRF2 aktivatsiooniks.<sup>61</sup>

## 1.4 Rakkude stressorid

Rakkudele võivad stressi tekitada väga paljud erinevad tegurid ning rakkude vastus erinevatele stressoritele ei ole ühesugune. Järgnevalt kirjeldatakse mõnda sellistest stressoritest: vesinikperoksiidi kui oksüdatiivse stressi tekitajat; erastiini kui xC<sup>-</sup> süsteemi inhibeerijat; RSL3 kui GPX4 inhibeerijat ning rotenooni kui mitokondri esimese kompleksi inhibeerijat.

### 1.4.1 Vesinikperoksiid

Vesinikperoksiid on üks reaktiivsetest hapniku ühendidest, mida rakud ise ka normaalse metabolismi tulemusena toodavad. Üldiselt seostatakse H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-d (ja teisi ROS-e) rakkude kahjustamise ja oksüdatiivse stressiga, mistõttu välditakse ROS-ide kuhjumist rakus kas ensümaatilisel (dismutaasid, katalaasid ja peroksüdaasid) või mitteensümaatilisel (vitamiinid A, C ja E, uraat, bilirubiin)<sup>62</sup>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toimib rakkudes ka signaalmolekulina vahendades näiteks rakkude diferentseerumist, proliferatsiooni, metabolismi, elumust ning immuunvastust<sup>63</sup>. Pedaegsurmav vesinikperoksiidi kontsentratsioon tekitab rakkudes oksüdatiivse stressi, mille kahjustuste vältimiseks indutseeritakse proliferueeruvates rakkudes ajutine rakutsükli arest. Selle ajal käivitatakse rakus kaitsemehhanismid: DNA kaitstakse histoonidega, vähendatakse energia tarbimist, aktiveeritakse kaitsvad valgud ning parandatakse DNA-d. Kui vesinikperoksiidist tingitud oksüdatiivne stress on liiga tugev, siis rakud ei suuda enam ennast kaitsta ning surevad apoptootiliselt või nekrootiliselt.<sup>64</sup>

Vesinikperoksiidil on näidatud rakkudele kontsentratsioon-sõltuvat mõju. Näiteks SH-SY5Y rakkude mõjutamisel 0,1 mM, 0,2 mM ja 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga kirjeldati 24 h möödudes elumuse vähenemist

vastavalt 27%, 38% ning 45% ulatuses<sup>65</sup>. Samas hiire primaarsete astrotsüütide töötlemisel vesinikperoksiidiga 24 tundi näidati kontsentratsioonide 0,1 mM ja 0,2 mM juures palju väiksemat elumuse langust (vastavalt 5% ja 10%), kuid 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lisamisel langes elumus juba 45%<sup>66</sup>.

#### 1.4.2 Erastiin

Erastiin inhibeerib rakkudes xC<sup>-</sup> süsteemi, mistõttu ei saa läbi rakumembraani enam transportida tsüstiini ega glutamaati ning toimida ei saa tsüstiinist sõltuv GSH süntees (joonis 4)<sup>43</sup>. GSH aitab kaitsta rakke ROS-ide eest läbi glutatiooniperoksüdaasi 4 (GPX4) ning kui see rada ei saa aktiivselt toimida, siis kuhjuvad rakus lipiidperoksiidid, mis lõpuks viivad oksüdatiivsete kahjustuste ja ferroptoosini<sup>45</sup>.

Erastiinil on kirjeldatud soolevähi rakkudele HT-29 doos-sõltuv mõju, märkimisväärne mõju ilmnes alles peale 48 h inkubeerimist erastiiniga, näiteks 10 µM erastiin 24 h tunni jooksul rakkude elumusele erilist mõju ei avaldanud, samas 48 h möödudes oli surnud 40% rakkudest<sup>67</sup>. Ühes töös võrreldi hiire primaarseid kortikaalneuroneid ning dopaminergilisi neuroblastoomi rakke SH-SY5Y ning selgus, et erastiin mõjutab primaarseid neuroneid alles peale 48 h inkubeerimist ning kontsentratsioonis 50 µM, samas kui SH-SY5Y rakud surid juba 24 h inkubatsioonil 10 µM erastiiniga<sup>68</sup>. HeLa rakkude puhul on näidatud, et 5 µM erastiiniga jäi alles alla 25% rakkudest<sup>69</sup>.

#### 1.4.3 RSL3

Sama teadlaste rühm, kes leidsid erastiini, tuvastasid ka teise ferroptoosi indutseeriva ühendi: RSL3 ehk onkogeense RAS-selektiivse letaalse ühendi<sup>70</sup>. RSL3 inhibeerib GPX4, mistõttu hakkavad rakus kuhjuma lipiidised peroksiidid ning viivad raku ferroptoosi<sup>71</sup> (joonis 4). HeLa rakkude mõjutamisel 5 µM RSL3-ga näidati rakkude elumuse langust 75% ulatuses<sup>69</sup>. Samas inimese glioomi rakkude puhul vähenes elumus 4 µM juures vaid 25% ulatuses<sup>72</sup>.

#### 1.4.4 Rotenoon

Rotenoon on looduslikult esinev ühend, mida kasutatakse insektsiidina ja ihtüotsiidina. Teaduses kasutatakse rotenooni aga näiteks Parkinsoni tõve *in vivo* modelleerimiseks<sup>73</sup>. Rotenoon on mitokondriaalse hingamisahela I kompleksi inhibiitor, mis indutseerib mitokondrites ROS-ide tootmise ning järgneva apoptoosi<sup>74</sup>.

Varasemalt on näidatud, et 50 µM rotenoon vähendab HepG2 rakkude elumust 30% võrra ning 100 µM 42% võrra<sup>75</sup>. SH-SY5Y rakkude mõjutamisel 50 µM rotenooniga leiti, et 24 h jooksul elujõuliste rakkude hulk vähenes 60% ning 48 h möödudes 90%<sup>76</sup>.

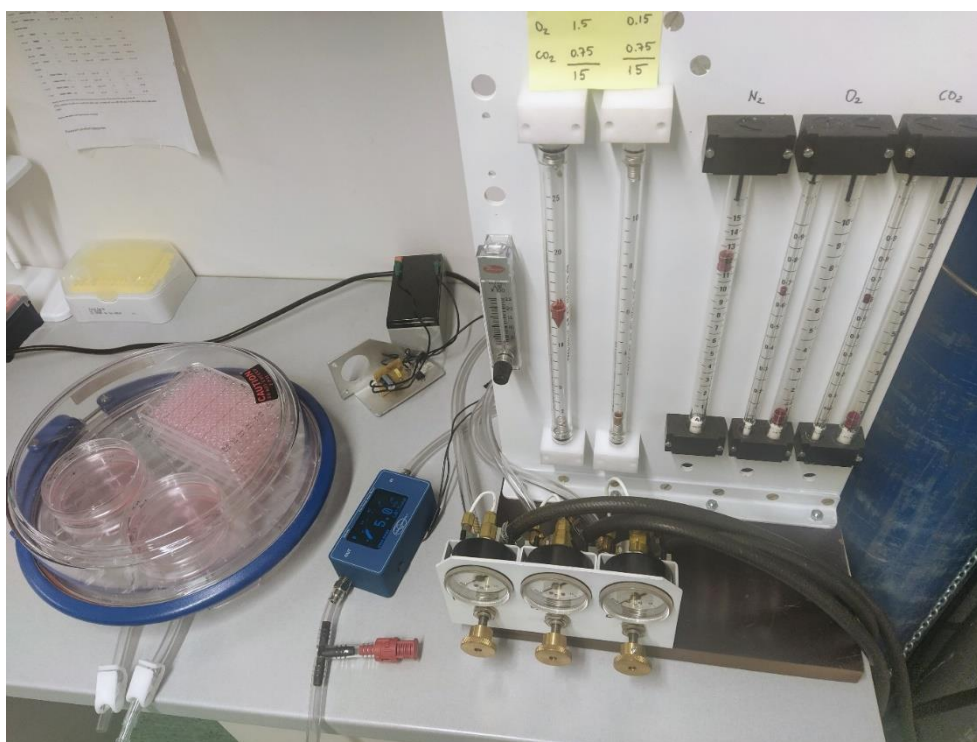


## 2. Meetodid

### 2.1 Rakkude kultiveerimine

Antud töös kasutati HepG2ARE inimese maksavähi (BPS Bioscience, kat. nr. 60513), B35 roti neuroblastoomi (*American Type Culture Collection* (ATCC), kat. nr. CRL-2754) ja C6 roti glioomi rakuliine (ATCC, kat. nr. CCL-107). Rakke kasvatati 100 mm diameetriga Petri tassidel neljas erinevas konditsioonis: kahes erinevas söötmes ning kahes erinevas hapniku kontsentratsioonis. Rakkude kasvatamiseks kasutati kõrge glükoosisaldusega (4,5 g/l) DMEM söödet (Corning®, kat. nr. 10-013-CV), millele lisati 10% veise loote seerumit (FBS, Capricorn, kat. nr. FBS-12A) ja 1x penitsilliini ja streptomütsiini lahust (Capricorn, kat. nr PS-B) ning madala glükoosisaldusega (1 g/l) füsioloogilist söödet Plasmax™ (CancerTools, kat. nr. 156371), mis sisaldas lisaks 2,5% FBS-i ja 1x penitsilliini ja streptomütsiini.

Lisaks söötmete erinevusele kasvatati rakke ka kahe erineva hapniku kontsentratsiooni juures. Selleks hoiti pooli tasse tavapärasel 5% CO<sub>2</sub> inkubaatoris, kus O<sub>2</sub> sisaldus oli ligikaudu 19%, ja teisi tasse hüpoksia kambris, kus O<sub>2</sub> sisaldus oli 5%. Madalama O<sub>2</sub> taseme saavutamiseks kasutati gaaside segamise seadet, kus hüpoksia kambrisse voolutati 2 minuti jooksul 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> ja 5% CO<sub>2</sub>. Kambrites vajaliku hapniku kontsentratsiooni saavutamist kontrolliti O<sub>2</sub> anduri abil (joonis 5). Rakke kasvatati nendes tingimustes vähemalt 2 nädalat enne järgnevate katsete tegemist.



Joonis 5. Hüpoksia kamber, O<sub>2</sub> kontsentratsiooni andur ja gaaside segamise seade.

## 2.2 Rakkude ettevalmistus katseteks

Rakke kasvatati tassil konfluentsuseni 80-100%, eemaldati sööde ning pesti 5 ml 1x Dulbecco fosfaatpuhverdatud soolalahusega (DPBS, Corning®, kat. nr. 21-031-CV) ühe korra (B35 rakud) või kaks korda (C6 ja HepG2ARE rakud). Tegemist on kinnituvate rakkudega, mistõttu kasutati rakkude tassi küljest lahti saamiseks 1 ml 1x trüpsiin-EDTA lahust DPBS-is (Capricorn, kat. nr. TRY-1B10). Seejärel trüpsiin inhibeeriti söötmega ning rakud koguti 15 ml Falcon tuubidesse. Rakud loeti ning saadud tulemust võeti arvesse sobiva rakkude kontsentratsiooniga lahuste tegemiseks, mida katsete jaoks kasutati.

## 2.3 NRF2 aktiivsuse hindamine

NRF2 aktiivsuse määramiseks külvati HepG2ARE rakud spetsiaalsele luminesentsi mõõtmiseks kasutatavale valgete seintega 96-well plaadile (Greiner, kat. nr. 655098). Igasse well'i pipeteeriti 50 µl rakulahust (40 000 rakku) ning rakkudel lasti kinnituda kaks tundi. Seejärel pipeteeriti rakkudele peale 50 µl erinevate kemikaalide lahuseid DMEM-is või Plasmaxis. Kasutati erinevaid raku stressi indutseerivaid ühendeid: rotenooni (Sigma-Aldrich, kat. nr. R8875), erastiini (MedChemExpress, kat. nr. HY-15763), RSL3 (MedChemExpress, kat. nr. HY-100218A), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (AppliChem, kat. nr. A1134,0250) ning kontrollina vastavat söödet. Rakke inkubeeriti 37°C juures 24 h.

Vastavalt tootja juhistele<sup>77</sup> valmistati D-lutsiferiini (PerkinElmer, kat. nr. 122799) lahused DMEM-is ja Plasmax-is kontsentratsiooniga 150 µg/ml. Rakkudelt eemaldati sööde ning lisati 100 µl D-lutsiferiini lahust. Rakke inkubeeriti 10 minutit 37°C juures, misjärel mõõdeti bioluminesentsi tugevust kasutades plaadilugejat FluOStarOmega (BMG LABTECH, Saksamaa).

## 2.4 Rakkude elujõulisuse hindamine MTT-ga

MTT (3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid) katse viidi läbi kõikide rakuliinidega (C6, B35, HepG2ARE), kasutades samu kemikaale nagu NRF2 aktiivsuse hindamisel. Rakud kanti 96-well plaadile (TPP, kat. nr. 92196) (50 µl/well) ning rakkudel lasti kinnituda kaks tundi. C6 ja B35 rakud külvati kontsentratsioonis 10 000 rakku/well, HepG2ARE rakud 40 000 rakku/well. Seejärel lisati rakkudele 50 µl kemikaalilahust vastavas söötmes. 24 h või 48 h möödudes lisati igasse well'i 10 µl MTT lahust (5 mg/ml 1x DPBS-is) (Thermo Scientific, kat. nr. 158990050) ning inkubeeriti 37°C juures kolm tundi. Seejärel pipeteeriti well'idesse 150 µl DMSO-t (Fisher Chemical™, kat. nr. D/4120/PB17) ning inkubeeriti 37°C juures 30 minutit. Järgnevalt mõõdeti lahuste absorptsiooni lainepikkustel 570 nm ja 630 nm kasutades plaadilugejat FluOStarOmega.

## 2.5 Andmete analüüs

Nii MTT kui NRF2 aktiivsuse mõõtmisel teostati katsed kolmes paralleelis iga tingimuse kohta. Igat katset korrati 3 korda. Saadud tulemused sisestati MS Excelisse. MTT katse puhul lahutati 570 nm väärtustest 630 nm väärtused (nn taust või müra). Nii NRF2 aktiivsuse kui rakkude elujõulisuse katse tulemused normaliseeriti kontrollide suhtes. Normaliseeritud tulemusi analüüsiti kasutades programme GraphPad Prism 5.02 ja Statistica 7. Andmeanalüüsiks kasutati multivariantset ANOVA meetodit ja Tukey *post hoc* testi.

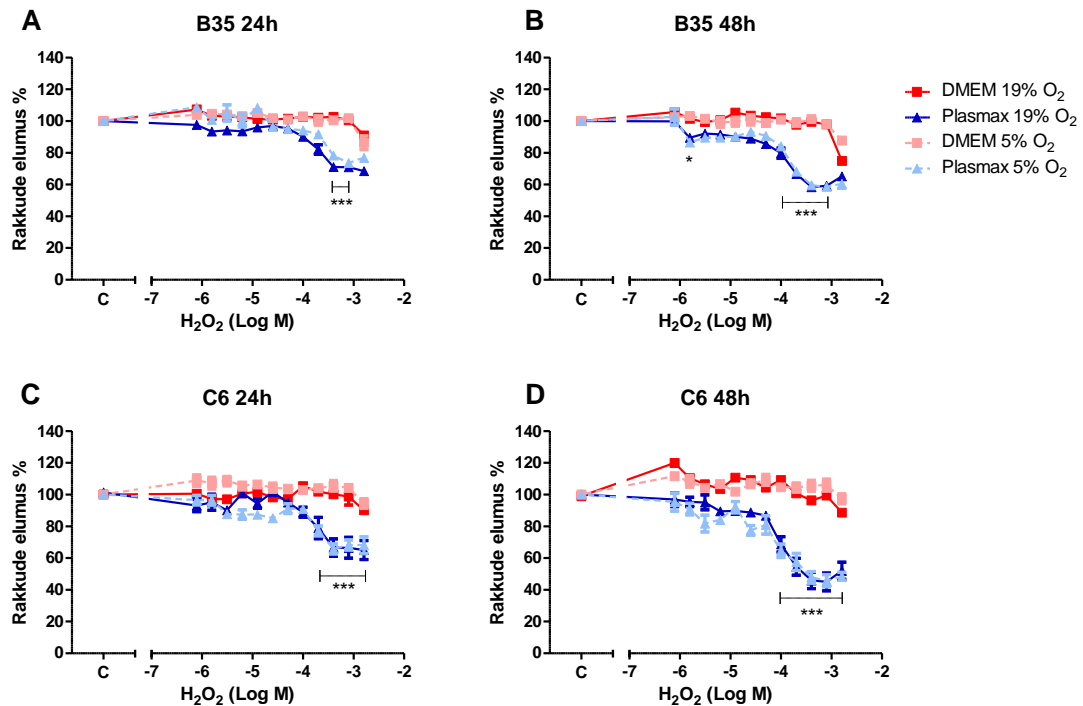
### 3. Tulemused

#### 3.1 Vesinikperoksiidi mõju rakkude elumusele

Vesinikperoksiid on rakumetabolismi tavaline kõrvaproduct, kuid liigsetes kogustes põhjustab see rakkudes oksüdatiivset stressi ning võib viia rakusurma. B35 ja C6 rakke töödeldi vesinikperoksiidiga kontsentratsioonides 0,78  $\mu\text{M}$  kuni 1600  $\mu\text{M}$  ning mõõdeti rakkude elumust 24 h ja 48 h möödudes (joonis 6). DMEM-is kasvatatud neuronaalsed B35 rakud olid  $\text{H}_2\text{O}_2$ -le oluliselt vastupidavamad kui Plasmaxis inkubeeritud rakud ning selline söötme efekt oli enam märgatav 48 h möödudes (mitmefaktorilise dispersioonanalüüsi (ANOVA) tulemus 24 h  $F(1, 406) = 350$ ,  $p < 0,0001$  ja 48 h  $F(1, 415) = 892,9$ ,  $p < 0,0001$ ). Näiteks kontsentratsioonil 400  $\mu\text{M}$  (joonisel esitatud logaritmilises skaalas, kontsentratsioonide ja logaritmid teised on lisas 1A) vähenes Plasmaxis 24 h möödudes rakkude elumus 29% ja 48 h möödudes 40%, samas kui DMEM-is rakkude elumus ei muutunud.

24 h töötuse järel ilmselt ilmnes tavahapnikus (19%  $\text{O}_2$ ) inkubeeritud B35 rakkudes (joonis 6A) söötmete erinev efekt  $\text{H}_2\text{O}_2$  kontsentratsioonidel 100  $\mu\text{M}$  (Tukey *post hoc* test, DMEM 19%  $\text{O}_2$  võrreldes Plasmaxis 19%  $\text{O}_2$   $p < 0,01$ ) ning 200  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ , 800  $\mu\text{M}$ , 1600  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ). Samas kui 5%-lises hapnikus oli oluline söötme efekt kontsentratsioonidel 400  $\mu\text{M}$  ja 800  $\mu\text{M}$  (DMEM 5%  $\text{O}_2$  võrreldes Plasmaxis 5%  $\text{O}_2$   $p < 0,0001$ ). 48 h ajapunktis (joonis 6B) leiti 19%-lises hapnikus inkubeeritud rakkude elumuse oluline muutus erinevate söötmete kasutamisel juba 1,56  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  juures (DMEM 19%  $\text{O}_2$  võrreldes Plasmaxis 19%  $\text{O}_2$   $p < 0,05$ ). See efekt suurenes  $\text{H}_2\text{O}_2$  kõrgematel kontsentratsioonidel: 12,5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ), 25  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ), 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ , 800  $\mu\text{M}$  (DMEM 19%  $\text{O}_2$  võrreldes Plasmaxis 19%  $\text{O}_2$   $p < 0,001$ ). Ka 5%-lises hapnikus avaldus oluline söötme efekt juba  $\text{H}_2\text{O}_2$  kontsentratsioonil 1,56  $\mu\text{M}$  (DMEM 5%  $\text{O}_2$  võrreldes Plasmaxis 5%  $\text{O}_2$   $p < 0,001$ ) ning suurenes veelgi kontsentratsioonide 100  $\mu\text{M}$  kuni 1600  $\mu\text{M}$  juures ( $p < 0,0001$ ).

Sarnaselt B35 rakkudele avaldus ka C6 glioblastoomi rakuliinis  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga töötlemisel söötme efekt, kus Plasmaxis kasvatatud rakkude elumus oli oluliselt madalam kui DMEM-i kasutamisel (24 h  $F(1, 406) = 31,2$ ,  $p < 0,0001$  ja 48 h  $F(1, 415) = 892,9$ ,  $p < 0,0001$ ). Näiteks kontsentratsioonil 400  $\mu\text{M}$  vähenes Plasmaxis 24 h jooksul rakkude elumus 35% ning 48 h jooksul 52% (joonis 6C-D), samas kui DMEM-is elumus eriti ei muutunud. Võrreldes erinevates söötmetes ja 19% hapnikus kasvatatud rakkude tundlikkust 24 h möödumisel, vähenes Plasmaxis rakkude elumus oluliselt alates 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $p < 0,001$ ), sellist toimet aga DMEM-is kasvatatud rakkude puhul ei olnud. 5% hapniku juures olid Plasmaxis söötmes kasvatatud rakud  $\text{H}_2\text{O}_2$ -le tundlikumad juba kontsentratsioonil 3,13  $\mu\text{M}$  (võrreldes DMEM 5%  $\text{O}_2$   $p < 0,01$ ). Füsioloogilises söötmes mõjutasid rakkude elumust enim kontsentratsioonid 200  $\mu\text{M}$  kuni 1600  $\mu\text{M}$  (Plasmaxis 5%  $\text{O}_2$  võrreldes DMEM 19%  $\text{O}_2$   $p < 0,001$ ; DMEM 5%  $\text{O}_2$   $p < 0,001$ ). 48 h pärast  $\text{H}_2\text{O}_2$  lisamist avaldus 19% hapnikus ja DMEM-is kasvatatud rakkude suurenenud vastupidavus juba kontsentratsioonil 0,78  $\mu\text{M}$  (DMEM 19%  $\text{O}_2$  võrreldes Plasmaxis 19%  $\text{O}_2$   $p < 0,05$ ). Samu tingimusi võrreldes erines rakkude elumus oluliselt ka kontsentratsioonide 12,5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) ning 100  $\mu\text{M}$  kuni 1600  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ) juures. 5%-lises hapnikus olid Plasmaxis kasvatatud rakud  $\text{H}_2\text{O}_2$ -le oluliselt tundlikumad kui DMEM-is kontsentratsioonide 3,13  $\mu\text{M}$  ja 6,25  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) ning 25  $\mu\text{M}$  kuni 1600  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ) juures.



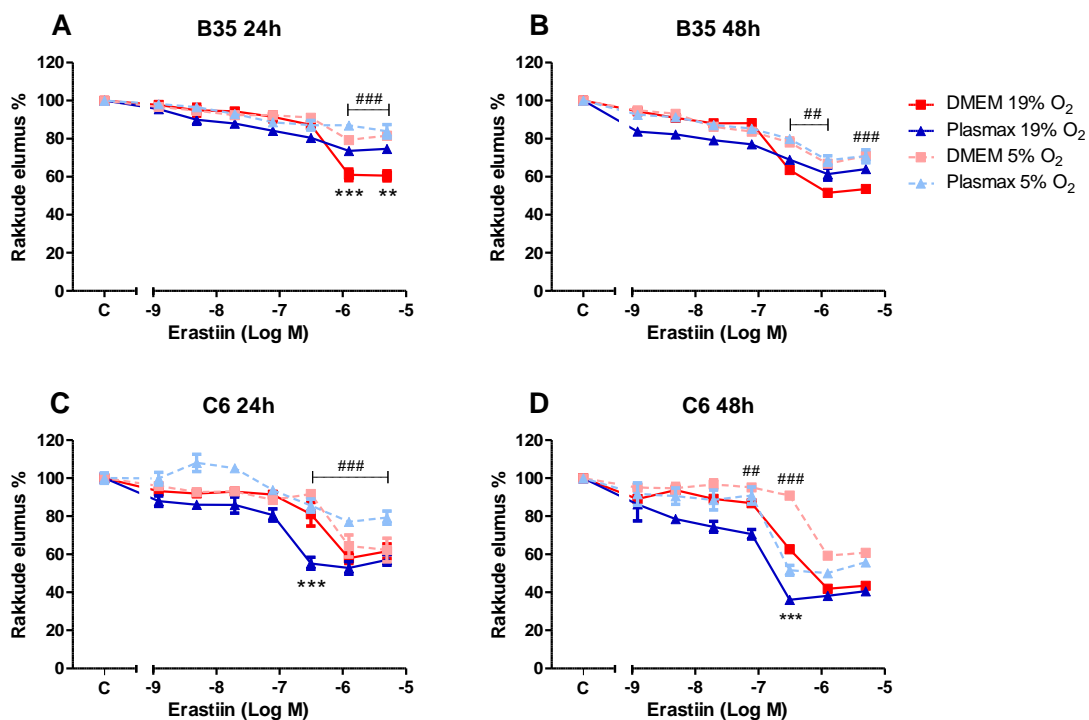
**Joonis 6.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toime B35 ja C6 rakkude elumusele. Rakkude elumust mõõdeti MTT meetodiga 24 h ja 48 h pärast H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lisamist rakkudele. **A.** B35 rakud, 24 h. Söötme mõju  $F(1, 406) = 31,2$ ,  $p < 0,0001$ . **B.** B35 rakud, 48 h. Söötme mõju  $F(1, 415) = 892,9$ ,  $p < 0,0001$ . **C.** C6 rakud, 24 h. Söötme mõju  $F(1, 400) = 322,31$ ,  $p < 0,0001$ . **D.** C6 rakud, 48 h. Söötme mõju  $F(1, 388) = 797,25$ ,  $p < 0,0001$ . \*\*\* $p < 0,001$  võrreldes DMEM-i ja Plasmixit. Andmed on esitatud kui keskmine  $\pm$  SEM,  $n = 9$ .

### 3.2 Erastiini mõju rakkude elumusele

Erastiini toimele hakkavad rakkudes kuhjuma lipiidsed radikaalid, mis võivad viia rakkude ferroptoosi ehk rauast sõltuvasse rakusurma. Erastiini toime uurimiseks erinevates rakukultuuri tingimustes töödeldi B35 ja C6 rakke 0,001  $\mu$ M kuni 5  $\mu$ M erastiiniga ning mõõdeti rakkude elumust 24 ja 48 tunni möödudes (joonis 7). Klassikalisel meetodil (DMEM, 19% O<sub>2</sub>) kasvatatud B35 rakud on nii 24 h kui ka 48 h ajapunktides erastiini toimele oluliselt tundlikumad, kui füsioloogilises söötmes või madalal hapniku kontsentratsioonil kasvatatud B35 rakud. Näiteks DMEM-is kasvatatud rakkude puhul langes elumus kontsentratsioonil 1,25  $\mu$ M (kontsentratsioonide ja logaritmid teisendused on lisas 1B) 19% O<sub>2</sub> juures 24 h jooksul 40% ning 48 h jooksul 50%, samas kui 5% O<sub>2</sub> juures langes elumus vastavalt 13% ja 32% (joonis 7A-B). Hapniku mõju oli statistiliselt oluline mõlemas ajapunktis (24 h  $F(1, 218) = 67,2$ ,  $p < 0,0001$  ja 48 h  $F(1, 229) = 60,64$ ,  $p < 0,0001$ ). Kui 24 h möödudes avaldus erinevus DMEM 19% O<sub>2</sub> ja teiste tingimuste vahel kõrgematel erastiini kontsentratsioonidel (5  $\mu$ M ja 1,25  $\mu$ M) (DMEM 19% O<sub>2</sub> võrreldes DMEM 5% O<sub>2</sub>  $p < 0,0001$ ; Plasmix 19% O<sub>2</sub>  $p < 0,01$ ; Plasmix 5% O<sub>2</sub>  $p < 0,0001$ ), siis 48 h ajapunktis oli erinevate tingimuste efekt näha juba alates kontsentratsioonist 0,3  $\mu$ M (DMEM 19% O<sub>2</sub> võrreldes DMEM 5% O<sub>2</sub>  $p < 0,001$  (5  $\mu$ M erastiin),  $p < 0,01$  (0,3  $\mu$ M ja 1,25  $\mu$ M erastiin); Plasmix 5% O<sub>2</sub>  $p < 0,0001$ ).

C6 rakuliinis oli erastiini toime elumusele kõige suurem Plasmixis ja 19%-lises hapnikus inkubeeritud rakkudel (24 h  $F(1, 233) = 86,71$ ,  $p < 0,0001$  (hapnik) ja 48 h  $F(1, 215) = 70,97$ ,  $p < 0,0001$  (sööde),  $F(1, 215) = 94,77$ ,  $p < 0,0001$  (hapnik)). 24 h ajapunktis avaldus suurim erinevus

erinevates tingimustes kasvatatud C6 rakkude elumuse vahel 0,3  $\mu\text{M}$  erastiini kontsentratsioonil (Plasmax 19%  $\text{O}_2$  võrreldes Plasmax 5%  $\text{O}_2$   $p < 0,0001$ ; DMEM 5%  $\text{O}_2$   $p < 0,0001$ , DMEM 19%  $\text{O}_2$   $p < 0,0001$ ), kus 19%-lises hapnikus ja Plasmaxis kasvatatud rakkude elumus langes 45%, kuid teistes tingimustes maksimaalselt 20% (joonis 7C). Kui DMEM-is kasvatatud C6 rakkude elumus oli mõlemas hapnikus sarnane, siis Plasmaxis inkubeeritud rakkudel avaldus lisaks ka hapniku efekt, kus 5%-lises hapnikus kasvatatud rakud olid erastiinile vähem tundlikud kui 19%  $\text{O}_2$  juures (erastiini kontsentratsioonid 0,005  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$ , 1,25  $\mu\text{M}$  ja 5  $\mu\text{M}$   $p < 0,001$ ; 0,02  $\mu\text{M}$   $p < 0,01$ ). Ka 48 h katses oli suurim erinevus näha 0,3  $\mu\text{M}$  erastiini kontsentratsiooni juures, kus tavahapnikus ning Plasmaxis kasvatatud rakud olid erastiinile tundlikumad kui DMEM-is inkubeeritud rakud nii 19% kui ka 5%  $\text{O}_2$  juures ( $p < 0,0001$ ), ühtlasi olid 5%  $\text{O}_2$  DMEM rakud erastiini toimele kõige vastupidavamad (joonis 7D). Seejuures langes 19%  $\text{O}_2$  Plasmax rakkude elumus 64% ning DMEM-is 19%-lises ja 5%-lises hapnikus vastavalt 37% ja 9%. Erinevalt DMEM-ist oli füsioloogilises söötmes hapniku efekt nähtav juba väiksemal erastiini kontsentratsioonil, kus 0,078  $\mu\text{M}$  erastiini lisamisel olid 19%-lises hapnikus inkubeeritud rakud tundlikumad ( $p < 0,01$ ).



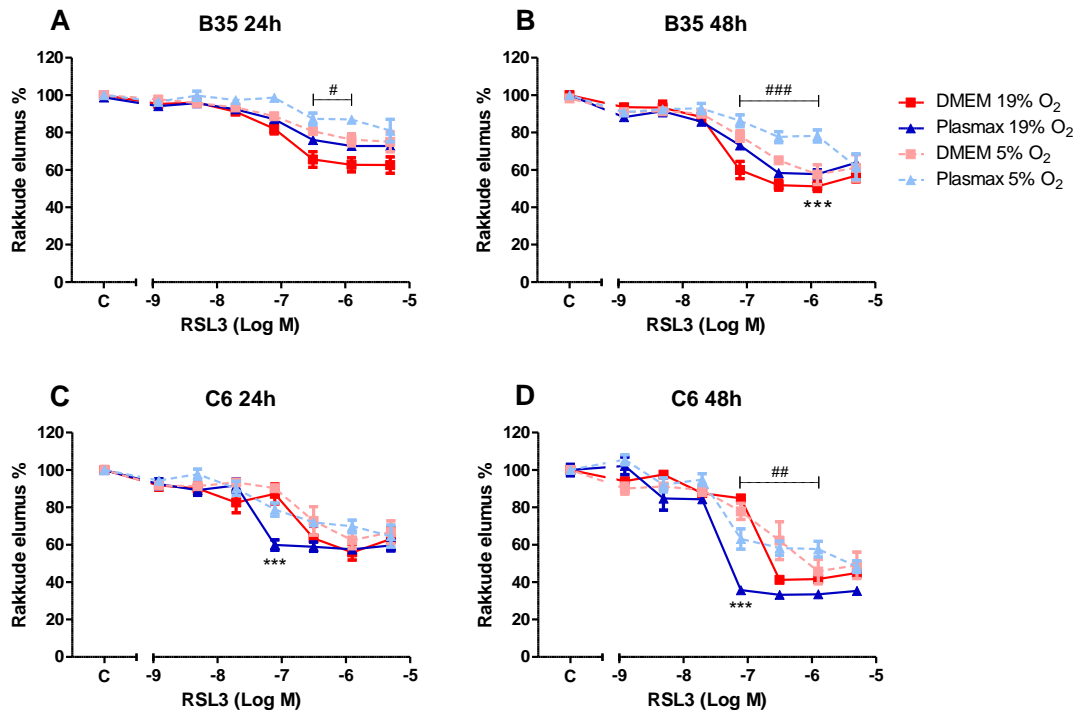
**Joonis 7.** Erastiini toime B35 ja C6 rakkude elumusele. Rakkude elumust mõõdeti MTT meetodiga 24 h ja 48 h pärast erastiini lisamist rakkudele. **A.** B35 rakud, 24 h. Hapniku mõju  $F(1, 218) = 67,2$ ,  $p < 0,0001$ . **B.** B35 rakud, 48 h. Hapniku mõju  $F(1, 229) = 60,64$ ,  $p < 0,0001$ . **C.** C6 rakud, 24 h. Hapniku mõju  $F(1, 233) = 86,71$ ,  $p < 0,0001$ ; söötme ja  $\text{O}_2$  interaktsioon  $F(1, 233) = 51,58$ ,  $p < 0,0001$ . **D.** C6 rakud, 48 h. Söötme mõju  $F(1, 215) = 70,97$ ,  $p < 0,0001$ ; hapniku mõju  $F(1, 215) = 94,77$ ,  $p < 0,0001$ . \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  võrreldes DMEM-i ja Plasmaxit; ### $p < 0,001$ , ## $p < 0,01$  võrreldes 19% ja 5% hapnikku. Andmed on esitatud kui keskmine  $\pm$  SEM,  $n = 9$ .

### 3.3 RSL3 mõju rakkude elumusele

RSL3 on teine ühend peale erastiini, mis põhjustab rakkudes lipiidsete peroksiidide kuhjumist ning sellele järgnevat ferroptoosi. B35 ja C6 rakke töödeldi RSL3-ga kontsentratsioonides 0,001  $\mu\text{M}$  kuni

5  $\mu\text{M}$  24 h ja 48 h, misjärel mõõdeti rakkude elumust kahes ajapunktis (joonis 8). B35 rakkude puhul olid RSL3 toimele kõige tundlikumad 19%-lises hapnikus ja DMEM-is kasvatatud rakud (24 h  $F(1, 221) = 29,11$ ,  $p < 0,0001$  (sööde),  $F(1, 221) = 63,54$ ,  $p < 0,0001$  (hapnik) ja 48 h  $F(1, 244) = 16,4$ ,  $p < 0,0001$  (sööde),  $F(1, 244) = 32,22$ ,  $p < 0,0001$  (hapnik)). 24 h möödudes olulist söötme efekti ei olnud (joonis 8A). Hapniku mõju avaldus DMEM-is kontsentratsioonide 0,3  $\mu\text{M}$  ja 1,25  $\mu\text{M}$  juures (kontsentratsioonide ja logaritmide teisendused on lisas 1B), kus 19%-lises hapnikus kasvanud rakud olid RSL3-le oluliselt tundlikumad kui 5%  $\text{O}_2$  juures kasvanud rakud ( $p < 0,05$ ). RSL3 kontsentratsioonides 0,078  $\mu\text{M}$  kuni 5  $\mu\text{M}$  olid DMEM-is ja 19%  $\text{O}_2$  juures rakud oluliselt tundlikumad kui 5%-lises  $\text{O}_2$ -s ja Plasmaxis inkubeeritud rakud ( $p < 0,01$ ). Füsioloogilises söötmes avaldus 1,25  $\mu\text{M}$  RSL3 juures samuti oluline hapniku efekt, kus 19%-lises hapnikus olid rakud tundlikumad kui 5% hapniku juures ( $p < 0,01$ ). RSL3 mõju oli tugevam 48 h möödudes (joonis 8B), kus näiteks kontsentratsioonil 1,25  $\mu\text{M}$  langes DMEM-is inkubeeritud rakkude elumus tavahapnikus 49% ning 5%-lises hapnikus 42%, samas kui 24 h jooksul langes elumus vastavalt 37% ning 24%. 48 h ajapunktis ilmses kontsentratsioonil 1,25  $\mu\text{M}$  söötme efekt 5%-lises hapnikus inkubeeritud rakkudes, kus DMEM-is kasvatatud rakud olid RSL3-le palju enam tundlikumad kui Plasmaxis ( $p < 0,001$ ). Võrreldes 24 h ajapunktiga, avaldus DMEM-is oluline hapniku mõju väiksema kontsentratsiooni juures, kus 0,078  $\mu\text{M}$  RSL3 lisamisel olid kõrgema hapnikutaseme juures B35 rakud tundlikumad ( $p < 0,01$ ). Samas Plasmaxis oli hapniku oluline mõju avaldunud kontsentratsioonide 0,3  $\mu\text{M}$  ja 1,25  $\mu\text{M}$  juures, kus hüperoksilistes tingimustes olid rakud samuti tundlikumad ( $p < 0,0001$ ). Kontsentratsioonidel 0,078  $\mu\text{M}$  kuni 1,25  $\mu\text{M}$  ilmses oluline erinevus ka siis, kui muudeti nii hapnikutaset kui ka söödet. Nimelt olid Plasmaxis 5%  $\text{O}_2$  rakud palju vastupidavamad RSL3-le kui DMEM 19%  $\text{O}_2$  kasvatatud rakud ( $p < 0,0001$ ).

RSL3 toime C6 rakkudele erines B35 rakkude vastusest sellele stressorile – kõige tundlikumad olid Plasmaxis ja 19%-lises hapnikus kasvatatud rakud (24 h  $F(1, 217) = 17,95$ ,  $p < 0,0001$  (hapnik) ja 48 h  $F(1, 227) = 30,6$ ,  $p < 0,0001$  (hapnik)). Mõlemas ajapunktis avaldus oluline söötme mõju RSL3 kontsentratsioonil 0,078  $\mu\text{M}$ , kus 19%-lises  $\text{O}_2$ -s ja füsioloogilises söötmes olid rakud oluliselt tundlikumad kui teistes tingimustes kasvatatud rakud (24 h  $p < 0,001$  ja 48 h  $p < 0,0001$ ; joonis 8C-D). Lisaks avaldus Plasmaxis 48 h ajapunktis kontsentratsioonidel 0,3  $\mu\text{M}$  ja 1,25  $\mu\text{M}$  oluline hapniku efekt, kus RSL3-le olid vastupidavamad kõrges hapnikus inkubeeritud rakud ( $p < 0,01$ ). 48 h ajapunktis oli RSL3 toime rakkudele enam väljendunud: näiteks kontsentratsioonil 0,078  $\mu\text{M}$  langes füsioloogilises söötmes 19%-lises hapnikus kasvatatud rakkude elumus 40% ning 5%-lises hapnikus 21%, samas kui 48 h jooksul langes elumus nendes tingimustes vastavalt 64% ja 36%.



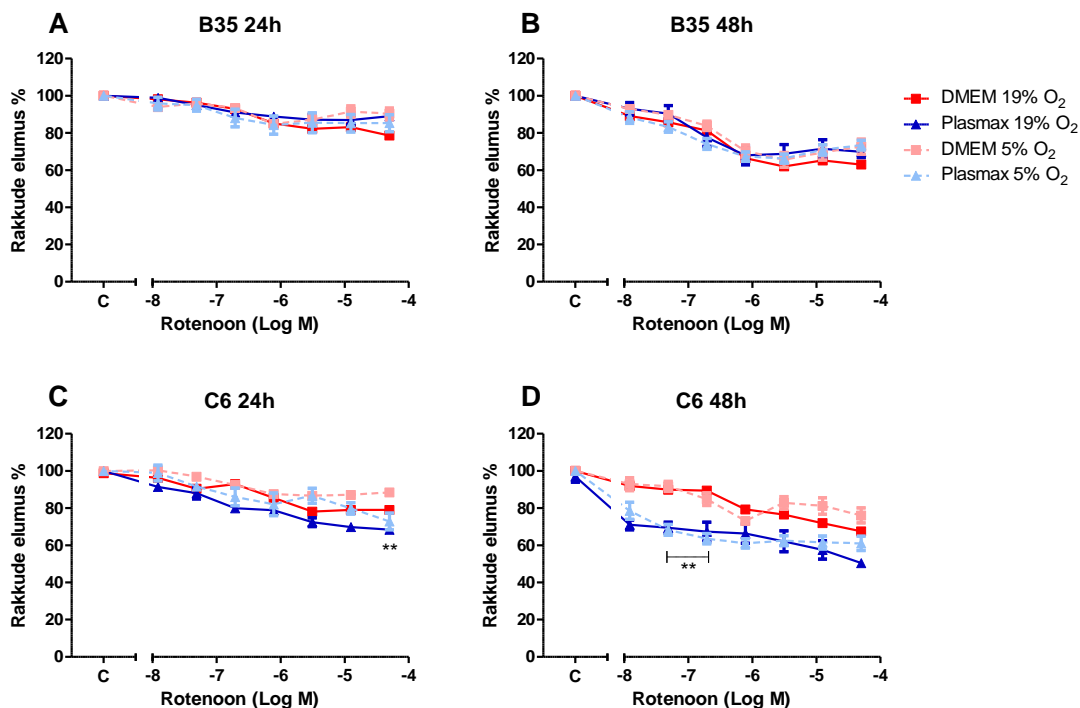
**Joonis 8.** RSL3 toime B35 ja C6 rakkude elumusele. Rakkude elumust mõõdeti MTT meetodiga 24 h ja 48 h pärast RSL3 lisamist rakkudele. **A.** B35 rakud, 24 h. Söötme mõju  $F(1, 221) = 29,11$ ,  $p < 0,0001$ ; hapniku mõju  $F(1, 221) = 63,54$ ,  $p < 0,0001$ . **B.** B35 rakud, 48 h. Söötme mõju  $F(1, 244) = 16,4$ ,  $p < 0,0001$ ; hapniku mõju  $F(1, 244) = 32,22$ ,  $p < 0,0001$ . **C.** C6 rakud, 24 h. Hapniku mõju  $F(1, 217) = 17,95$ ,  $p < 0,0001$ . **D.** C6 rakud, 48 h. Söötme mõju  $F(1, 227) = 9,31$ ,  $p < 0,01$ ; hapniku mõju  $F(1, 227) = 30,6$ ,  $p < 0,0001$ ; söötme ja O<sub>2</sub> interaktsioon  $F(1, 227) = 18,8$ ,  $p < 0,0001$ . \*\*\* $p < 0,001$  võrreldes DMEM-i ja Plasmaxit. ### $p < 0,001$ , ## $p < 0,01$ , # $p < 0,05$  võrreldes 19% ja 5% hapnikku. Andmed on esitatud kui keskmine  $\pm$  SEM,  $n = 9$ .

### 3.4 Rotenooni mõju rakkude elumusele

Rotenoon inhibeerib mitokondrites hingamisahela I kompleksi ning suurendab rakkudes ROS-ide teket, mille tagajärjel rakud surevad apoptootiliselt. Rotenooni mõju uurimiseks erinevates tingimustes lisati B35 ja C6 rakkudele 0,012  $\mu$ M kuni 50  $\mu$ M rotenooni ning inkubeeriti 24 h ja 48 h, mille möödudes mõõdeti rakkude elumust (joonis 9). Rotenooni mõju B35 rakkude elumusele ei erinenud üheski tingimuses nii 24 tunni kui ka 48 tunni möödudes. Rotenooni kontsentratsioonist sõltuv mõju rakkude elumusele väljendus 48 h ajapunktis (joonis 9B). Näiteks kontsentratsioonidel 0,049  $\mu$ M ja 3,13  $\mu$ M (kontsentratsioonide ja logaritmid teisendused on lisas 1C) mõjutas rotenoon traditsioonilistes tingimustes kasvatatud B35 rakkude elumust 24 h jooksul vastavalt 5% ja 18%, kuid 48 h jooksul vastavalt 17% ja 38%.

C6 rakuliini puhul olid DMEM söötmes kasvanud rakud rotenooni toimele vastupidavamad, kui Plasmaxis inkubeeritud rakud (24 h  $F(1, 216) = 39,85$ ,  $p < 0,0001$  (sööde),  $F(1, 216) = 36,19$ ,  $p < 0,0001$  (hapnik) ja 48 h  $F(1, 234) = 178,0$ ,  $p < 0,0001$  (sööde)). 24 h ajapunktis oli oluline söötmete vaheline erinevus 5%-lises hapnikus kõige kõrgemas rotenooni kontsentratsioonis (50  $\mu$ M), kus Plasmaxis kasvatatud rakud olid tundlikumad kui DMEM-is ( $p < 0,01$ ; joonis 9C). C6 rakkudes oli tingimuste vaheline erinevus enam väljendunud 48 h pärast rotenooni lisamist, kus Plasmaxis kasvatatud rakud olid sõltumata hapnikust rotenoonile tundlikumad (joonis 9D). 19% hapniku puhul olid suurimad erinevused söötmete vahel kontsentratsioonide 0,012  $\mu$ M, 0,049  $\mu$ M, 0,195  $\mu$ M ( $p <$

0,01) ning 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) juures. Näiteks 0,012  $\mu\text{M}$  kuni 0,195  $\mu\text{M}$  rotenooni lisamisel oli tavahapnikus inkubeeritud rakkude elumus Plasmaxis 20% väiksem kui DMEM-is. 5% hapniku puhul ilmnis oluline söötmete vaheline erinevus kontsentratsioonide 0,049  $\mu\text{M}$ , 0,195  $\mu\text{M}$ , 3,13  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ) ning 12,5  $\mu\text{M}$  juures ( $p < 0,05$ ).



**Joonis 9.** Rotenooni toime B35 ja C6 rakkude elumusele. Rakkude elumust mõõdeti MTT meetodiga 24 h ja 48 h pärast rotenooni lisamist rakkudele. **A.** B35 rakud, 24 h. **B.** B35 rakud, 48 h. **C.** C6 rakud, 24 h. Söötme mõju ( $F(1, 216) = 39,85$ ,  $p < 0,0001$ ); hapniku mõju  $F(1, 216) = 36,19$ ,  $p < 0,0001$ . **D.** C6 rakud, 48 h. Söötme mõju  $F(1, 234) = 178,0$ ,  $p < 0,0001$ . **\*\*** $p < 0,01$  võrreldes DMEM-i ja Plasmixit. Andmed on esitatud kui keskmine  $\pm$  SEM,  $n = 9$ .

### 3.5 Rakustressorite mõju HepG2ARE rakkude elumusele ja NRF2 aktiivsusele

NRF2 on oluline komponent rakkude antioksidantsetes kaitsemehhanismides ning on seotud ferroptoosiga. Antud töös uuriti seetõttu NRF2 aktiivsust vastusena ferroptoosi ja oksüdatiivset stressi tekitavatele ühenditele HepG2ARE rakuliinis.

#### 3.5.1 Vesinikperoksiidi mõju

Vesinikperoksiidi mõju uurimiseks HepG2ARE rakkude elumusele ja NRF2 aktiivsusele erinevates rakukultuuri tingimustes mõjutati rakke 1  $\mu\text{M}$  kuni 4000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga ning mõõdeti nende rakkude elumust ja NRF2 aktiivsust 24 h möödudes. Vesinikperoksiidile olid kõige tundlikumad 5%-lises hapnikus ja Plasmaxis kasvatatud rakud ( $F(1, 484) = 30,61$ ,  $p < 0,0001$  (sööde)), näiteks kontsentratsioonil 4000  $\mu\text{M}$  (kontsentratsioonide ja logaritmid teisendused on lisas 1D) vähenes nende rakkude elumus 42% (joonis 10A). Võrreldes teiste tingimustega olid Plasmix 5%  $\text{O}_2$  rakud oluliselt tundlikumad  $\text{H}_2\text{O}_2$ -le kontsentratsioonides 1000  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) ja 2000  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ). Lisaks oli füsioloogilises söötmes kontsentratsioonide 1000  $\mu\text{M}$  kuni 4000  $\mu\text{M}$  juures hapniku efekt, kus madalamas hapnikus inkubeeritud rakud olid tundlikumad kui 19%-lises hapnikus ( $p < 0,05$ ).



Sõltumata hapnikust oli DMEM söötmes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mõjul NRF2 tugevamalt aktiveeritud kui Plasmaxis söötmes ( $F(1, 536) = 10,5, p < 0,01$ ). Kahe kõige kõrgema H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsiooni juures (2000 µM ja 4000 µM) NRF2 aktiivsus DMEM-is tõusis järsult, samas kui Plasmaxis hakkas aktiivsus langema (joonis 10B).

### 3.5.2 Erastiini mõju

Erastiini mõju uurimiseks töödeldi HepG2ARE rakke 0,02 µM kuni 10 µM erastiiniga ning 24 h möödudes mõõdeti rakkude elumust ja NRF2 aktiivsust. 19% hapniku juures olid HepG2ARE rakud erastiinile vastupidavamad, kui 5% hapniku juures inkubeeritud rakud ( $F(1, 158) = 7,92, p < 0,01$ ). Erastiini eri kontsentratsioonide juures olulisi söötme ega hapniku efekte ei olnud (joonis 10C).

NRF2 oli aktiivsem 19% O<sub>2</sub> ja Plasmaxis inkubeeritud rakkudes ( $F(1, 253) = 7,57, p < 0,01$  (sööde),  $F(1, 253) = 22,07, p < 0,0001$  (hapnik)). Kontsentratsioonil 1,25 µM (kontsentratsioonide ja logaritmid teised on lisas 1B) oli füsioloogilises söötmes oluline hapniku mõju, kus 19% O<sub>2</sub> juures inkubeeritud rakkudes oli NRF2 tugevamalt aktiveeritud kui 5% O<sub>2</sub> juures ( $p < 0,01$ ). Oluline erinevus oli ka Plasmaxis 19% O<sub>2</sub> ja DMEM 5% O<sub>2</sub> kasvatatud rakkude vahel, kus Plasmaxis oli NRF2 aktiivsem kontsentratsioonidel 1,25 µM ( $p < 0,01$ ) ning 5 µM ( $p < 0,05$ ; joonis 10D).

### 3.5.3 RSL3 mõju

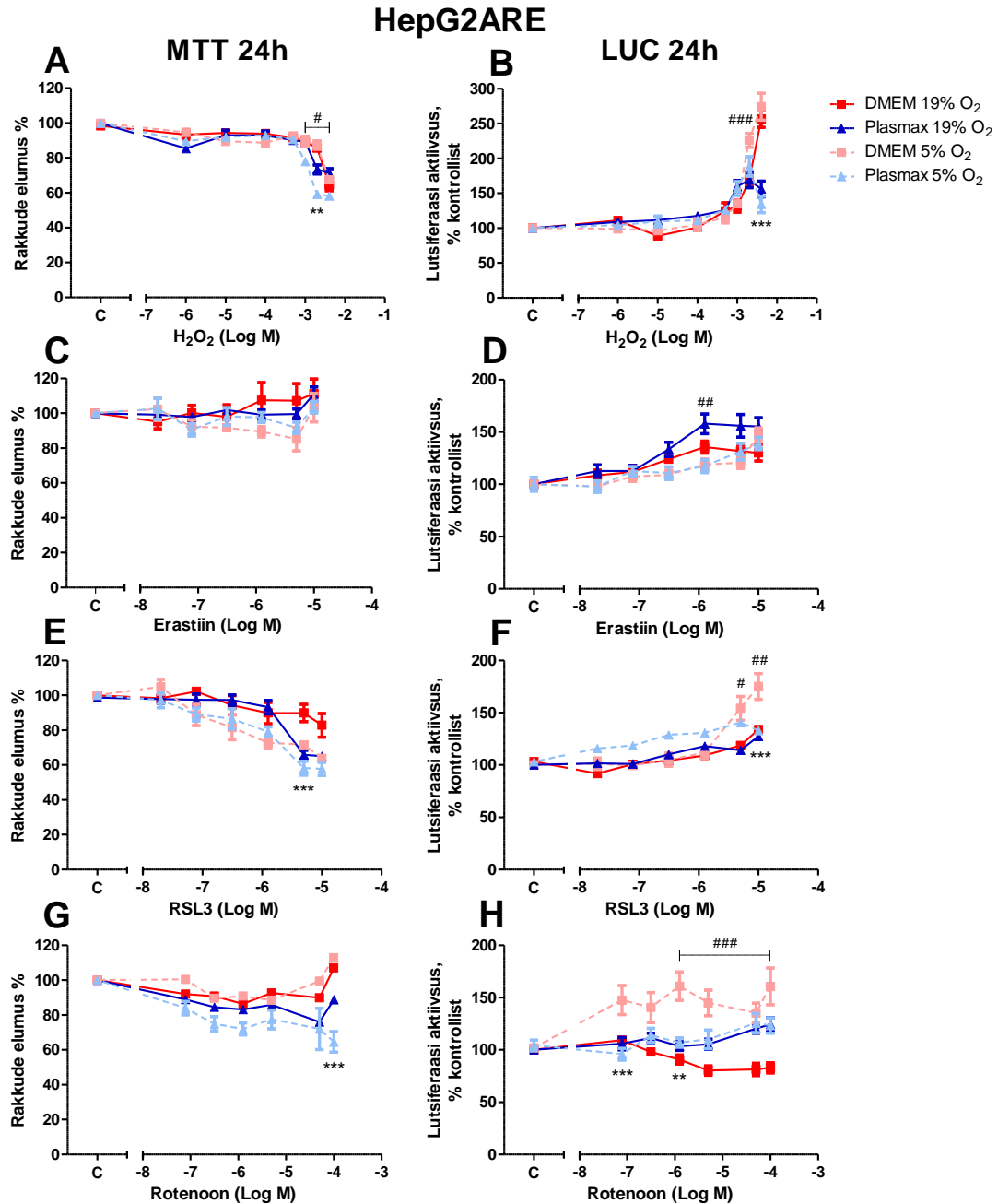
HepG2ARE rakke mõjutati RSL3-ga kontsentratsioonides 0,02 µM kuni 10 µM ning 24 h möödudes mõõdeti rakkude elumust ja NRF2 aktiivsust. Kõige vastupidavamad olid RSL3-le 19%-lises hapnikus ja DMEM-is kasvatatud rakud ( $F(1, 165) = 6,84, p < 0,01$  (sööde),  $F(1, 165) = 30,07, p < 0,0001$  (hapnik)). Suurim erinevus ilmnes 5 µM RSL3 lisamisel (kontsentratsioonide ja logaritmid teised on lisas 1B), kus traditsioonilistes tingimustes kasvatatud rakud olid RSL3-le vastupidavamad kui füsioloogilises söötmes nii 19% kui ka 5% hapniku juures inkubeeritud rakud ( $p < 0,001$ ). Näiteks oli selle kontsentratsiooni juures Plasmaxis kasvatatud rakkude elumus vähemalt 24% väiksem kui DMEM-is (joonis 10E).

NRF2 oli tugevamalt aktiveeritud HepG2ARE rakkudes, mida kasvatati 5%-lises hapnikus ( $F(1, 267) = 27,31, p < 0,0001$ ). Kahes kõige kõrgemas RSL3 kontsentratsioonis (5 µM ja 10 µM) oli madalas hapnikus ja DMEM-is kasvatatud rakkude NRF2 aktivatsioon tugevam kui 19% O<sub>2</sub> juures nii DMEM-is kui ka Plasmaxis ( $p < 0,05$  (5 µM),  $p < 0,01$  (10 µM)). 5%-lises O<sub>2</sub>-s ja Plasmaxis inkubeeritud rakkude NRF2 aktiivsus hakkas aga 10 µM RSL3 juures langema (joonis 10F).

### 3.5.4 Rotenooni mõju

HepG2ARE rakkude elumuse ja NRF2 aktiivsuse määramiseks töödeldi rakke rotenooniga kontsentratsioonides 0,078 µM kuni 100 µM ning mõõtmised teostati 24 h pärast rotenooni lisamist. Rotenoonile olid kõige vastupidavamad DMEM-is kasvatatud rakud ( $F(1, 169) = 40,08, p < 0,0001$ ). Oluline söötme efekt rakkude elumusele avaldus rotenooni kõige kõrgema kontsentratsiooni juures (100 µM, kontsentratsioonide ja logaritmid teised on lisas 1E), kus 5%-lises O<sub>2</sub>-s ja Plasmaxis kasvatatud rakud olid tundlikumad kui DMEM 19% O<sub>2</sub> ( $p < 0,001$ ) ja DMEM 5% O<sub>2</sub> ( $p < 0,0001$ ) juures (joonis 10G).

Kõige tugevam NRF2 aktivatsioon oli 5% hapniku juures ja DMEM-is kasvatatud rakkudes ( $F(1, 271) = 4,0, p < 0,05$  (sööde);  $F(1, 271) = 74,57, p < 0,0001$  (hapnik)). Samas DMEM-is ja 19%-lises  $O_2$ -s inkubeeritud rakkudes hakkas NRF2 aktiivsus alates  $0,3 \mu\text{M}$  rotenooni lisamisest langema. Plasmax söötmes oli NRF2 aktivatsioon ühesugune ning DMEM 5%  $O_2$  rakkudest oluliselt madalam kontsentratsioonide  $0,078 \mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) ning  $1,25 \mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ) juures (joonis 10H).



**Joonis 10.** Erinevate stressorite toime HepG2ARE rakkude elumusele ja NRF2 aktiivsusele. Rakkude elumust mõõdeti MTT meetodiga ning NRF2 aktiivsust lutsiferaasi meetodiga (LUC) 24 h pärast stressori lisamist rakkudele. **A.** MTT,  $H_2O_2$ . Söötme mõju  $F(1, 484) = 30,61, p < 0,0001$ ; hapniku mõju  $F(1, 484) = 9,63, p < 0,01$ . **B.** LUC,  $H_2O_2$ . Söötme mõju  $F(1, 536) = 10,5, p < 0,01$ ; hapniku mõju  $F(1, 536) = 22,07, p < 0,0001$ . **C.** MTT, erastiin. Hapniku mõju  $F(1, 158) = 7,92, p < 0,01$ . **D.** LUC, erastiin. Söötme mõju  $F(1, 253) = 7,57, p < 0,01$ ; hapniku mõju  $F(1, 253) = 22,07, p < 0,0001$ . **E.** MTT, RSL3. Söötme mõju  $F(1, 165) = 6,84, p < 0,01$ ; hapniku mõju  $F(1, 165) = 30,07, p < 0,0001$ . **F.** LUC, RSL3. Hapniku mõju  $F(1, 267) = 27,31, p < 0,0001$ . **G.** MTT, rotenoon. Söötme mõju  $F(1, 169) = 40,08, p < 0,0001$ . **H.** LUC, rotenoon. Söötme mõju  $F(1, 271) = 4,0, p < 0,05$ ; hapniku mõju  $F(1, 271) = 74,57, p < 0,0001$ . \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  võrreldes DMEM-i ja Plasmaxit. ### $p < 0,001$ , ## $p < 0,01$ , # $p < 0,05$  võrreldes 19% ja 5% hapnikku. Andmed on esitatud kui keskmine  $\pm$  SEM,  $n = 9$ .

## Arutelu

Rakukultuuri tingimustel on oluline mõju rakkude metabolismile ja antioksidantsetele radadele. Kasutades erineva metaboolse profiiliga rakke, näidati antud töös rakukultuuri tingimuste erinevat mõju rakkude elumusele vastuseks erinevatele rakustressi indutseerivatele ühenditele. Lisaks hinnati stressorite mõju NRF2 aktiivsusele erinevates tingimustes. NRF2 on oluline rakkude antioksidantsetes kaitsemehhanismides ning on ühtlasi seotud ferroptoosiga. Nii NRF2 kui ka ferroptoos on seotud mitmete haigustega, millele ravi leidmine võib peituda just nende mehhanismide põhjalikul uurimisel. Selleks tuleb tähelepanu pöörata rakkude kasvatamise tingimustele ning püüda võimalikult palju imiteerida *in vivo* keskkonda.

Rakkudes oksüdatiivset stressi indutseeriv vesinikperoksiid põhjustab kõrgetes kontsentratsioonides rakusurma. Varasemates töödes on leitud, et  $H_2O_2$  vähendab rakkude elumust<sup>65,66</sup> ning tõstab NRF2 taset ja aktiivsust<sup>78,79</sup>. Käesolevas töös ilmnes, et  $H_2O_2$  mõju rakkude elumusele avaldus enim füsioloogilises söötmes ning NRF2 aktiivsus suurenes DMEM-is kasvatatud HepG2ARE rakkudes hüppeliselt. DMEM-is kasvatatud rakkude suurenenud vastupidavus  $H_2O_2$ -le ja NRF2 aktiivsuse tõus võib olla seotud söötme koostisega. Näiteks võib DMEM-is olev kõrge kontsentratsioon L-tsütiin tõsta rakkudes NRF2 taset<sup>61</sup>, mis aitab kaitsta rakke oksüdatiivse stressi eest. Samuti võib rohke püruvaat DMEM-is neutraliseerida vesinikperoksiidi kahjulikku mõju rakkudele<sup>22</sup>. Oluline mõju NRF2 aktivatsioonile võib olla ka teistel söötme komponentidel, näiteks glükoosi kõrge kontsentratsioonil<sup>59</sup>.

Antud töös näidati, et rakkude vastus ferroptoosi indutseerivatele ühenditele erastiinile ja RSL3-le sõltub rakukultuuri tingimustest. Kui B35 rakkude puhul olid erastiinile ja RSL3-le kõige tundlikumad tavapärastes tingimustes (DMEM, 19%  $O_2$ ) inkubeeritud rakud, siis C6 rakkude elumus oli enam mõjutatud 19%-lises hapnikus ja füsioloogilises söötmes kasvatamisel. Selline erinevus võib olla põhjustatud nende rakkude erinevast metabolismist, B35 rakud on oksüdatiivsed ja C6 rakud glükolüütilised, ning teisiti reguleeritud antioksidantsetest vastustest sõltuvalt tingimustest. Varasemalt on samuti näidatud söötme mõju rakkude metabolismile, kus Plasmaxis või DMEM-is kasvatatud HeLa ja A549 rakkudes olid aktiivsed erinevad metabolismirajad sõltuvalt rakutüübist<sup>11</sup>. Erinevalt B35 ja C6 rakkudest, erastiin HepG2ARE rakkude elumusele olulist mõju ei avaldanud. Siiski oli 19%-lises hapnikus kasvatatud rakkude elumus veidi parem, mille põhjustajaks võib olla NRF2 suurem aktiivsus. RSL3 mõju oli nendes rakkudes erastiiniga võrreldes tugevam. Selle põhjuseks võib olla, et xC<sup>-</sup> süsteemi inhibitsioonil (erastiin) rakud leiavad alternatiivse raja, et end ferroptoosi eest kaitsta, kuid GPX4 inhibeerimisel (RSL3) ei suudeta lipiidperoksiidide kuhjumist vältida ning järgneb rakusurm. RSL3-le olid tundlikumad 5%-lises hapnikus inkubeeritud rakud, samas oli neis rakkudes NRF2 aktiivsus suurem. Võimalik, et NRF2 aktivatsioonist ei piisa nende rakkude eluspüsimiseks.

Mitokondriaalse hingamisahela kompleks I inhibiitor rotenoon suurendab rakkudes oksüdatiivset stressi. B35 rakkude elumus langes rotenooni kontsentratsiooni suurenedes kõikides tingimustes sarnaselt. C6 rakkude puhul aga olid füsioloogilises söötmes kasvatatud rakud rotenooni toimele tundlikumad kui DMEM-is. Glükolüütilised C6 rakud konverteerivad püruvaadi eelistatult laktaadiks ning mitokondriaalse hingamise osatähtsus on väiksem. Seega võib DMEM-is kompleks I olla C6 rakkude elutegevuseks vähetahtis, kuna vajalik energia saadakse glükolüüsist. Samuti võib DMEM kaitsta rakke ROS-ide eest läbi kõrge püruvaadi kontsentratsiooni ning NRF2 aktivatsiooni. See-eest

Plasmaxis, kus toitaineid on vähem, võib kompleks I energia saamiseks muutuda olulisemaks. Rotenooni mõju B35 ja C6 rakkudele on vastuoluline: oksüdatiivsete B35 rakkude metabolism sõltub rohkem mitokondritest, seega võiksid need rakud olla rotenooni toimele tundlikumad kui C6 rakud. Täpsete põhjuste välja selgitamine, millised mehhanismid nendes rakkudes rotenooni toimel aktiveeruvad vajavad veel uurimist. Sarnaselt C6 rakkudele, olid HepG2ARE rakud rotenoonile vastupidavamad DMEM-is. NRF2 oli DMEM 5% O<sub>2</sub> rakkudes tugevalt aktiveeritud, samas kui Plasmaxis olulist muutust ei olnud ning DMEM 19% O<sub>2</sub> rakkudes NRF2 aktiivsus rotenooni lisades vähenes. See on kooskõlas varasemate uuringutega, kus 19%-lises hapnikus ning DMEM-is kasvatatud SH-SY5Y rakkudes NRF2 valgus tase rotenooni mõjul langes<sup>80</sup>. Põhjused, miks NRF2 aktiivsus suureneb just madalama ning langeb kõrgema hapnikutaseme juures, vajavad edasist uurimist.

Antud töö tulemustest järeldub, et rakkude elumus ja antioksüdantne vastus sõltuvad nii hapnikust kui ka söötme koostisest. Seega kasvatades eri rakutüüpe ühesugustes tingimustes ei saa järeldada, et rakud käituvad nendes ühtemoodi. Rakkude keeruline ja mitmekesine metabolism on tugevalt mõjutatud rakke ümbritsevast keskkonnast, mistõttu vajab nende mehhanismide uurimine sobivaid tingimusi. Eriti oluline on rakukultuuri tingimustele tähelepanu pöörata teadustöodes, mis tegelevad rakkude antioksüdantse vastuse, metabolismi või hapnik-sõltuvate radade uurimisega ning samuti uute ravimite välja töötamisel. Põhjuste leidmine, miks rakkude vastus stressoritele eri tingimustes on erinev, vajab edasist uurimist. Kasuks tuleb ka erinevates tingimustes kasvatatud rakkude geeni ekspressioonide võrdlemine *in vivo* kudedega, et leida antud rakutüübi jaoks sobivaimad kultiveerimistingimused.

## Kokkuvõte

Rakke on traditsiooniliselt kasvatatud tingimustes, mis *in vivo* keskkonda ei meenuta, näiteks levinud sööde DMEM sisaldab oluliselt rohkem toitaineid, kui on rakkudele organismis kättesaadav. Lisaks kasvatatakse rakke hüperoksilistes tingimustes (19% O<sub>2</sub>), kus hapnikutase on kordades suurem inimese kudede hapnikutasemetest. Nii söötme koostisel kui ka hapnikutasemel on oluline mõju rakkude metabolismile ja antioksidantsetele vastustele. Muutused nendes radades on mitmete haiguste põhjustajaks, mistõttu peaks nende uurimiseks rakkude kasvatamine toimuma võimalikult füsioloogilistes tingimustes. Antud töö eesmärk oli hinnata rakkude elumust ja antioksidantset kaitset reguleeriva transkriptsioonifaktori NRF2 aktiivsust vastusena erinevatele stressoritele traditsioonilises ning füsioloogilises söötmes erinevate hapniku tasemetega (19% ja 5%) juures.

Töö tulemustest selgus, et rakkude elumus ja antioksidantne vastus sõltuvad nii hapnikust kui ka söötme koostisest. Lisaks oli erinevate rakutüüpide vastus stressoritele eri tingimustes erinev. Ühe näitena oli kõikide töös kasutatud rakuliinide vastus ferroptoosi indutseerivale ühendile erastiin erinev, kus B35 rakud olid kõige tundlikumad DMEM-is, C6 rakud füsioloogilises söötmes Plasmax ning HepG2ARE rakkude elumusele erastiin suurt mõju ei avaldanud. Füsioloogilises söötmes aktiveeriti NRF2 madalama erastiini kontsentratsiooni juures kui teistes tingimustes.

Laboratoorses uuringutes on seega oluline tähelepanu pöörata rakkude kasvatamise tingimustele, et saadud tulemused ühtiksid ka päriselt rakkudes toimivate protsessidega. Rakke ümbritsev keskkond avaldab väga olulist mõju rakkude komplekssele ainevahetusele, mistõttu on sobivaimate tingimuste leidmine äärmiselt vajalik. Rakukultuuri tingimustel on eriti oluline mõju teadustöodes, mis tegelevad rakkudes antioksidantsete vastuste, metabolismi ja hapnik-sõltuvate protsesside uurimisega ning uute ravimite väljatöötamisega.

Antud töö keskendus erinevate kultiveerimistingimuste mõju kirjeldamisele, hinnates selleks rakkude elumust (B35, C6 ja HepG2ARE rakkudes) ning NRF2 aktivatsiooni HepG2ARE rakuliinis. Edasise uurimistööna tuleks leida, kuidas täpsemalt toimib rakkudes vastus stressoritele erinevates tingimustes ja erinevates rakuliinides ning millest on põhjustatud leitud erisused rakulises vastuses. B35 ja C6 rakkudes peaks määrama NRF2 aktiivsust ning kõigis kolmes rakuliinis leidma NRF2 valgu ja NRF2 poolt reguleeritavate ensüümide (näiteks HO-1) tasemed ja aktiivsused. Samuti võiks uurida rakkudes glutatiooni taset erinevates tingimustes. Võimalusel võiks teostada ka RNA sekveneerimist, et näha milliste geenide ekspressioonid on eri tingimustes kasvatatud rakkudes muutunud ning võrrelda saadud andmeid *in vivo* andmetega, et välja selgitada kõige sobivamad tingimused antud rakuliinide kasvatamiseks.

## Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajat Rutt Taba ja kaasjuhendajat Anton Terasmaad, kes igal kohtumisel julgustasid ja motiveerisid ning oma ideedega aitasid sellel tööl teoks saada. Soovin tänada ka teisi KBFI keemilise bioloogia labori töötajaid, tänu kellele oli alati hea meel tööle tulla. Lisaks tänan oma perekonda ja sõpru, kes stressirohkel ajal aitasid pea selgena hoida.

Antud töö finantseeriti KBFI Institutsionaalsest uurimistoetusest.

## Kasutatud kirjandus

- 1 Eagle H. Nutrition Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture. *Science* 1955; **122**: 501–504.
- 2 Dulbecco R, Freeman G. Plaque Production by the Polyoma Virus. *Virology* 1959; **8**: 396–397.
- 3 Eagle H. Amino Acid Metabolism in Mammalian Cell Cultures. *Science* 1959; **130**: 432–437.
- 4 Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol.* 2017; **16**: 99–117.
- 5 Ackermann T, Tardito S. Cell Culture Medium Formulation and Its Implications in Cancer Metabolism. *Trends Cancer.* 2019; **5**: 329–332.
- 6 Gui DY, Sullivan LB, Luengo A, Hosios AM, Bush LN, Gitego N *et al.* Environment Dictates Dependence on Mitochondrial Complex I for NAD<sup>+</sup> and Aspartate Production and Determines Cancer Cell Sensitivity to Metformin. *Cell Metab* 2016; **24**: 716–727.
- 7 Moradi F, Moffatt C, Stuart JA. The effect of oxygen and micronutrient composition of cell growth media on cancer cell bioenergetics and mitochondrial networks. *Biomolecules* 2021; **11**.
- 8 Cantor JR, Abu-Remaileh M, Kanarek N, Freinkman E, Gao X, Louissaint A *et al.* Physiologic Medium Rewires Cellular Metabolism and Reveals Uric Acid as an Endogenous Inhibitor of UMP Synthase. *Cell* 2017; **169**: 258-272.e17.
- 9 Voorde J Vande, Ackermann T, Pfetzer N, Sumpton D, Mackay G, Kalna G *et al.* Improving the metabolic fidelity of cancer models with a physiological cell culture medium. *Science Advanced* 2019; **5**.
- 10 Muir A, Danai L V, Gui DY, Waingarten CY, Lewis CA, Vander Heiden MG. Environmental cystine drives glutamine anaplerosis and sensitizes cancer cells to glutaminase inhibition. 2017.
- 11 Golikov M V., Karpenko IL, Lipatova A V., Ivanova ON, Fedyakina IT, Larichev VF *et al.* Cultivation of cells in a physiological plasmax medium increases mitochondrial respiratory capacity and reduces replication levels of RNA viruses. *Antioxidants* 2022; **11**.
- 12 Torres-Quesada O, Doerrier C, Strich S, Gnaiger E, Stefan E. Physiological Cell Culture Media Tune Mitochondrial Bioenergetics and Drug Sensitivity in Cancer Cell Models. *Cancers (Basel)* 2022; **14**.
- 13 Yan LJ. Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. *J Diabetes Res.* 2014; **2014**.
- 14 Yu T, Robotham JL, Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *PNAS* 2006; **103**: 2653–2658.
- 15 Bhardwaj V, He J. Reactive oxygen species, metabolic plasticity, and drug resistance in cancer. *Int J Mol Sci.* 2020; **21**.
- 16 Ralser M, Wamelink MM, Kowald A, Gerisch B, Heeren G, Struys EA *et al.* Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *J Biol* 2007; **6**.
- 17 Ruwende C, Hill A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. *J Mol Med* 1998; **76**: 581–588.
- 18 Mullarky E, Cantley LC. Diverting Glycolysis to Combat Oxidative Stress. *Innovative Medicine* 2015; : 3–23.

- 19 Zang Z, Apse K, Pang J, Stanton RC. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase via cAMP in aortic endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 2000; **275**: 40042–40047.
- 20 Asahina T, Kashiwagi A, Nishio Y, Ikebuchi M, Harada N, Tanaka Y *et al.* Impaired Activation of Glucose Oxidation and NADPH Supply in Human Endothelial Cells Exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in High-Glucose Medium. *Diabetes* 1995; **44**: 520–526.
- 21 Zhang Z, Liew CW, Handy DE, Zhang Y, Leopold JA, Hu J *et al.* High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and  $\beta$ -cell apoptosis. *The FASEB Journal* 2010; **24**: 1497–1505.
- 22 Babich H, Liebling EJ, Burger RF, Zuckerbraun HL, Schuck AG. Choice of DMEM, formulated with or without pyruvate, plays an important role in assessing the in vitro cytotoxicity of oxidants and prooxidant nutraceuticals. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2009; **45**: 226–233.
- 23 Brooks GA. The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell Metab* 2018; **27**: 757–785.
- 24 Mächler P, Wyss MT, Elsayed M, Stobart J, Gutierrez R, Von Faber-Castell A *et al.* In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons. *Cell Metab* 2016; **23**: 94–102.
- 25 Itoh Y, Esaki T, Shimoji K, Cook M, Law MJ, Kaufman E *et al.* Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 4879.
- 26 Bouzier-Sore AK, Voisin P, Bouchaud V, Bezancon E, Franconi JM, Pellerin L. Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study. *Eur J Neurosci* 2006; **24**: 1687–1694.
- 27 Alva R, Gardner GL, Liang P, Stuart JA. Supraphysiological Oxygen Levels in Mammalian Cell Culture: Current State and Future Perspectives. *Cells*. 2022; **11**.
- 28 Keeley TP, Mann GE. Defining Physiological Normoxia for Improved Translation of Cell Physiology to Animal Models and Humans. *Physiol Rev* 2019; **99**: 161–234.
- 29 Stuart JA, Fonseca J, Moradi F, Cunningham C, Seliman B, Worsfold CR *et al.* How supraphysiological oxygen levels in standard cell culture affect oxygen-consuming reactions. *Oxid Med Cell Longev* 2018.
- 30 Ferguson DCJ, Smerdon GR, Harries LW, Dodd NJF, Murphy MP, Curnow A *et al.* Altered cellular redox homeostasis and redox responses under standard oxygen cell culture conditions versus physioxia. *Free Radic Biol Med* 2018; **126**: 322–333.
- 31 Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 $\alpha$ . *Cell Death Differ* 2008; **15**: 621–627.
- 32 Jiang B, Semenza GL, Bauer C, Mart HH, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am J Physiol* 1996; **40**: C1172–C1180.
- 33 Alva R, Moradi F, Liang P, Stuart JA. Culture of Cancer Cells at Physiological Oxygen Levels Affects Gene Expression in a Cell-Type Specific Manner. *Biomolecules* 2022; **12**.
- 34 Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 2012; **24**: 981–990.
- 35 Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39**: 44–84.
- 36 Yamamoto M, Kensler T, Motohashi H. The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. *Physiol Rev* 2018; : 1169–1203.

- 37 Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y *et al.* An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **236**: 313–322.
- 38 Dodson M, Rojo De La Vega M, Cholanians AB, Schmidlin CJ, Chapman E, Zhang DD. Modulating NRF2 in Disease: Timing Is Everything. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2019; **59**: 555–75.
- 39 Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013; **53**: 401–426.
- 40 Jayakumar S, Pal D, Sandur SK. Nrf2 facilitates repair of radiation induced DNA damage through homologous recombination repair pathway in a ROS independent manner in cancer cells. *Mutat Res* 2015; **779**: 33–45.
- 41 Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2012; **287**: 9873–9886.
- 42 Cuadrado A, Rojo AI, Wells G, Hayes JD, Cousin SP, Rumsey WL *et al.* Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2019; **18**: 295–317.
- 43 Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE *et al.* Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012; **149**: 1060–1072.
- 44 Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell Biol* 2016; **26**: 165–176.
- 45 Li J, Cao F, Yin H liang, Huang Z jian, Lin Z tao, Mao N *et al.* Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis* 2020; **11**.
- 46 Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016; **73**: 3221–3247.
- 47 He M, Nitti M, Piras S, Furfaro AL, Traverso N, Pronzato MA *et al.* Heme oxygenase-1-derived bilirubin protects endothelial cells against high glucose-induced damage. *Free Radic Biol Med* 2015; **89**: 91–98.
- 48 Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F *et al.* Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *Journal of Biological Chemistry* 1992; **267**: 18148–18153.
- 49 Ryter SW, Choi AMK. Targeting Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide for Therapeutic Modulation of Inflammation. *Transl Res* 2016; **167**: 7.
- 50 Sedlak TW, Saleh M, Higginson DS, Paul BD, Juluri KR, Snyder SH. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 5171–5176.
- 51 Dodson M, Castro-Portuguez R, Zhang DD. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. *Redox Biol* 2019; **23**.
- 52 Abdalkader M, Lampinen R, Kanninen KM, Malm TM, Liddell JR. Targeting Nrf2 to suppress ferroptosis and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration. *Front Neurosci* 2018; **12**.
- 53 Pomatto LCD, Sun PY, Yu K, Gullapalli S, Bwiza CP, Sisliyan C *et al.* Limitations to adaptive homeostasis in an hyperoxia-induced model of accelerated ageing. *Redox Biol* 2019; **24**.



- 54 Chapple SJ, Keeley TP, Mastronicola D, Arno M, Vizcay-Barrena G, Fleck R *et al.* Bach1 differentially regulates distinct Nrf2-dependent genes in human venous and coronary artery endothelial cells adapted to physiological oxygen levels. *Free Radic Biol Med* 2016; **92**: 152–162.
- 55 Kumar B, Adebayo AK, Prasad M, Capitano ML, Wang R, Bhat-Nakshatri P *et al.* Tumor collection/processing under physioxia uncovers highly relevant signaling networks and drug sensitivity. *Sci Adv* 2022; **8**: 3375.
- 56 El Alami M, Viña-Almunia J, Gambini J, Mas-Bargues C, Siow RCM, Peñarrocha M *et al.* Activation of p38, p21, and NRF-2 mediates decreased proliferation of human dental pulp stem cells cultured under 21% O<sub>2</sub>. *Stem Cell Reports* 2014; **3**: 566–573.
- 57 Timpano S, Guild BD, Specker EJ, Melanson G, Medeiros PJ, Sproul SLJ *et al.* Physioxic human cell culture improves viability, metabolism, and mitochondrial morphology while reducing DNA damage. *The FASEB Journal* 2019; **33**: 5716–5728.
- 58 Ungvari Z, Bailey-Downs L, Gautam T, Jimenez R, Losonczy G, Zhang C *et al.* Adaptive induction of NF-E2-related factor-2-driven antioxidant genes in endothelial cells in response to hyperglycemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; **300**: 1133–1140.
- 59 Wang X, Wang Z, Liu JZ, Hu JX, Chen HL, Li WL *et al.* Double antioxidant activities of rosiglitazone against high glucose-induced oxidative stress in hepatocyte. *Toxicology in Vitro* 2011; **25**: 839–847.
- 60 He X, Kan H, Cai L, Ma Q. Nrf2 is critical in defense against high glucose-induced oxidative damage in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2009; **46**: 47–58.
- 61 Dai W, Chen QM. Fresh Medium or L-Cystine as an Effective Nrf2 Inducer for Cytoprotection in Cell Culture. *Cells* 2023; **12**: 291.
- 62 Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**.
- 63 Di Marzo N, Chisci E, Giovannoni R. The Role of Hydrogen Peroxide in Redox-Dependent Signaling: Homeostatic and Pathological Responses in Mammalian Cells. *Cells* 2018; **7**.
- 64 Barnouin K, Dubuisson ML, Child ES, De Mattos SF, Glassford J, Medema RH *et al.* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression. *Journal of Biological Chemistry* 2002; **277**: 13761–13770.
- 65 Chetsawang B, Chetsawang J, Govitrapong P. Hydrogen peroxide toxicity induces Ras signaling in human neuroblastoma SH-SY5Y cultured cells. *J Biomed Biotechnol* 2010; **2010**.
- 66 Bi J, Jiang B, Liu JH, Lei C, Zhang XL, An LJ. Protective effects of catalpol against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in astrocytes primary cultures. *Neurosci Lett* 2008; **442**: 224–227.
- 67 Huo H, Zhou Z, Qin J, Liu W, Wang B, Gu Y. Erastin Disrupts Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) and Induces Apoptotic Death of Colorectal Cancer Cells. *PLoS One* 2016; **11**: e0154605.
- 68 Zhang Y, Fan BY, Pang YL, Shen WY, Wang X, Zhao CX *et al.* Neuroprotective effect of deferoxamine on erastin-induced ferroptosis in primary cortical neurons. *Neural Regen Res* 2020; **15**: 1539.
- 69 Gryzik M, Asperti M, Denardo A, Arosio P, Poli M. NCOA4-mediated ferritinophagy promotes ferroptosis induced by erastin, but not by RSL3 in HeLa cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2021; **1868**.

- 70 Yang WS, Stockwell BR. Synthetic Lethal Screening Identifies Compounds Activating Iron-Dependent, Nonapoptotic Cell Death in Oncogenic-RAS-Harboring Cancer Cells. *Chem Biol* 2008; **15**: 234.
- 71 Yang WS, Sriramaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS *et al.* Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4. *Cell* 2014; **156**: 317.
- 72 Wang X, Lu S, He C, Wang C, Wang L, Piao M *et al.* RSL3 induced autophagic death in glioma cells via causing glycolysis dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 2019; **518**: 590–597.
- 73 Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov A V., Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson’s disease. *Nature Neuroscience* 2000; **3**: 1301–1306.
- 74 Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA *et al.* Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Journal of Biological Chemistry* 2003; **278**: 8516–8525.
- 75 Siddiqui MA, Ahmad J, Farshori NN, Saquib Q, Jahan S, Kashyap MP *et al.* Rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in human liver HepG2 cells. *Mol Cell Biochem* 2013; **384**: 59–69.
- 76 Fitzgerald JC, Ugun-Klusek A, Allen G, De Girolamo LA, Hargreaves I, Ufer C *et al.* Monoamine oxidase-A knockdown in human neuroblastoma cells reveals protection against mitochondrial toxins. *FASEB Journal* 2014; **28**: 218–229.
- 77 PerkinElmer. Preparation of IVISbrite™ D-Luciferin for In Vitro and In Vivo Bioluminescent Assays.
- 78 Paek A, Jose E, March-Steinman W, Wilson B, Shanks L. Temporal Coordination of the Transcription Factor Response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. *Nature Portfolio* 2023. doi:10.21203/rs.3.rs-2791121/v1.
- 79 Covas G, Marinho HS, Cyrne L, Antunes F. Activation of Nrf2 by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: De novo synthesis versus nuclear translocation. *Methods Enzymol* 2013; **528**: 157–171.
- 80 Katila N, Bhurtel S, Park PH, Choi DY. Metformin attenuates rotenone-induced oxidative stress and mitochondrial damage via the AKT/Nrf2 pathway. *Neurochem Int* 2021; **148**.

## Lisad

### Lisa 1. Molaarmasside teisendused logaritmilisse skaalasse

**Lisa 1A.** B35 ja C6 rakkudele lisatud H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsioonide teisendused logaritmilisteks.

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)	log (M)
1600 μM	-2,8
800 μM	-3,1
400 μM	-3,4
200 μM	-3,7
100 μM	-4
50 μM	-4,3
25 μM	-4,6
12,5 μM	-4,9
6,25 μM	-5,2
3,13 μM	-5,5
1,56 μM	-5,8
0,78 μM	-6,1

**Lisa 1B.** B35, C6 ja HepG2ARE rakkudele lisatud erastiini ja RSL3 kontsentratsioonide teisendused logaritmilisteks.

Erastiin, RSL3 (μM)	log(M)
10 μM	-5
5 μM	-5,3
1,25 μM	-5,9
0,3 μM	-6,5
0,078 μM	-7,1
0,02 μM	-7,7
0,005 μM	-8,3
0,001 μM	-8,9

**Lisa 1C.** B35 ja C6 rakkudele lisatud rotenooni kontsentratsioonide teisendused logaritmilisteks.

Rotenoon (μM)	log (M)
50 μM	-4,3
12,5 μM	-4,9
3,13 μM	-5,5
0,78 μM	-6,1
0,195 μM	-6,7
0,049 μM	-7,3
0,012 μM	-7,9

**Lisa 1D.** HepG2ARE rakkudele lisatud H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsioonide teisendused logaritmilisteks.

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)	log (M)
4000 μM	-2,4
2000 μM	-2,7
1000 μM	-3
500 μM	-3,3
100 μM	-4
10 μM	-5
1 μM	-6

**Lisa 1E.** HepG2ARE rakkudele lisatud rotenooni kontsentratsioonide teisendused logaritmilisteks

Rotenoon (μM)	log (M)
100 μM	-4
50 μM	-4,3
5 μM	-5,3
1,25 μM	-5,9
0,3 μM	-6,5
0,078 μM	-7,1

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks<sup>1</sup>**

Mina Marie Põlluaed

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Rakukultuuri tingimuste mõju rakkude elumusele, stressitolerantsile ja NRF2 aktiivsusele“,

mille juhendaja on Rutt Taba,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

---

29.05.2023

---

<sup>1</sup> Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingu tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.