

Opsporen van ziektemerkers in biofluids door middel van NMR spectroscopie

Peter REDANT

promotor :

Prof. dr. Joannes GELAN, dr. Peter
ADRIAENSENS

co-promotor :

Prof. dr. Marie VANDERSTEEN

Inhoudstafel

Inhoudstafel.....	I
Lijst met gebruikte afkortingen.....	1
Voorwoord.....	2
Samenvatting.....	3
Hoofdstuk 1: Inleiding.....	4
1.1 Immunologie, etiologie en pathogenese van multiple sclerose.....	4
1.2 Experimentele autoimmune encephalomyelitis (EAE).....	5
1.3 Metabonómica.....	6
1.4 Metaboliëveranderingen bij MS.....	7
1.4.1 Hersenmetaboliëten.....	7
1.4.2 Urinaire metaboliëten.....	10
1.5 Onderzoeksopzet.....	10
Hoofdstuk 2: Principe NMR spectroscopie.....	12
2.1 Het hoofdmagneetveld B_0 en de stoorzender B_1	12
2.2 Relaxatie.....	14
2.2.1 Longitudinale relaxatie.....	14
2.2.2 Transversale relaxatie.....	15
2.3 Chemische shift.....	16
2.4 J-koppeling.....	16
2.5 Uitzicht NMR spectrum.....	17
Hoofdstuk 3: Optimalisatie staalbereiding en NMR parameters.....	18
3.1 pH urine.....	18
3.2 Concentratie urinestalen.....	19
3.3 Staalvoorbereiding.....	20
3.4 Wegwerken brede basislijn.....	20
3.4.1 Centrifugatie.....	21
3.4.2 Filtratie.....	21
3.4.3 Ionensterkte en uitzouting.....	22
3.4.4 Zure hydrolyse.....	22
3.4.5 Fase scheiding.....	22

3.4.6 Protonuitwisseling met D ₂ O	22
3.4.7 Resultaten en conclusie	23
3.5 ¹ H NMR.....	23
Hoofdstuk 4: Opsporen ziektemerkers	24
4.1 Materiaal en methoden	24
4.1.1 Staalname	24
4.1.2 Stockoplossing van interne referentie in D ₂ O	26
4.1.3 ¹ H NMR.....	26
4.1.4 Spectrale analyse	26
4.2 Resultaten	28
4.2.1 Chemische shift van metabolieten in urine	28
4.2.2 Ziektemerkers in urine	28
4.3 Discussie en toekomstperspectieven	39
5. Conclusie.....	41
Referenties.....	42
Bijlage	46

Lijst met gebruikte afkortingen

a.u.:	Arbitraire eenheid
CFA:	Complete Freund's adjuvant
Cho:	Choline
Cn:	Creatinine
Cr:	Creatine
D ₂ O:	Gedeutereerd water (¹ H in water is vervangen door deuterium, ² H)
EAE:	Experimentele autoimmune encephalomyelitis
Gln:	Glutamine
Glt:	Glutamaat
GPC:	Glycerofosfocholine
Hz:	Herz
¹ H-NMR:	Proton nucleaire magnetisch resonantie
IFN- γ :	Interferon γ
IL:	Interleukine
Ino:	Inositol
MBP:	Myelin basic protein
MS:	Multiple sclerose
NAA:	N-acetyl aspartaat
NO:	Stikstof oxide
PC:	Fosfocholine
PP:	Primair progressief
ppm:	Parts per million (chemische shift δ)
RR:	Relapsing remitting
SP:	Secundair progressief
TGF- β :	Transforming growth factor β
TNF- α :	Tumor necrosis factor α
TSP:	3-trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionaat
δ :	Chemische shift in ppm (parts per million)

Voorwoord

Vooreerst zou ik mijn promotoren dr. Peter Adriaensens en Prof. dr. Jan Gelan en co-promotor Prof. Dr Marjan Vandersteen willen bedanken die mij de kans boden deze stage te volbrengen.

Hierbij wil ik dr. Peter Adriaensens en dra. Evi Theunissen oprecht bedanken voor de begeleiding en het geduld dat vaak nodig was tijdens mijn stage. Verder bedank ik ook dr. Liesbet Storme en wens haar veel geluk toe met haar dochter Nette.

Verder bedank ik dr. Frank Vandenabeele die het mogelijk maakte om urinestalen van MS patiënten te verzamelen. Hierbij wil ik dan ook de personen vermelden die mij urinestalen bezorgden, in het bijzonder de patiënten zelf en de gezonde controles.

Ook dien ik Kurt Baeten te vermelden voor zijn onmisbare hulp die ik kreeg tijdens het induceren van EAE in ratten en het klinisch scoren van deze dieren.

Als laatste zou ik mijn vrienden, vriendin en ouders willen vermelden voor de nodige ondersteuning, waar het nodig was.

Samenvatting

Inleiding: Multiple sclerose (MS) is een autoimmune inflammatoire aandoening van het centrale zenuwstelsel. Waarschijnlijk speelt een afwijkend immuunsysteem een centrale rol in het ziekteproces. Via het diermodel EAE is het mogelijk om onderzoek te doen naar de oorzaken en mechanismen van MS. Door middel van *in vivo* ^1H -NMR spectroscopie van hersenen zijn reeds verschillen in metaboliëten beschreven tussen gezonde en zieke individuen. Analyse van *biofluids*, zoals urine, met ^1H -NMR spectroscopie heeft tegenover *in vivo* metingen voordelen zoals de eenvoudige en niet-invasieve staalname. In dit werkstuk zal getracht worden om ziektemerkers voor MS op te sporen met behulp van ^1H -NMR spectroscopie van humane urine en urine van EAE ratten.

Materiaal en methoden: Urinestalen van MS patiënten werden vergeleken met urinestalen van gezonde controles. Tevens werden veranderingen in urinestalen in functie van het ziekteverloop bij EAE ratten onderzocht. Na de nodige staalbereiding gebeurde de analyse met ^1H -NMR spectroscopie waarna vervolgens de bekomen data werd verwerkt ter opsporing van ziektemerkers.

Resultaten: Op top van de ziekte werden bij EAE ratten, in vergelijking met gezonde ratten, verschillen gevonden voor glutamaat/glutamine, creatine, choline, phenylacetyl glycine, α -ketoglutaraat, leucine en/of valine, dimethylamine, glycine en citraat.

Bij MS patiënten werden verschillende waarden voor creatinine, creatine, leucine en/of valine, citraat en inositol gevonden in vergelijking met gezonde personen.

Conclusie: Via ^1H -NMR spectroscopische analyse van urine lijkt het mogelijk om verschillen in welbepaalde metaboliëten te detecteren tussen gezonde en zieke (EAE, MS) individuen. Deze bieden opportuniteiten als diagnosemerkers en kunnen mogelijk ook bijdragen aan het ontrafelen van het ziektemechanisme. Het bevestigen van deze potentiële merkers aan de hand van een grotere populatieset lijkt daarom zeker opportuun.

Hoofdstuk 1: Inleiding

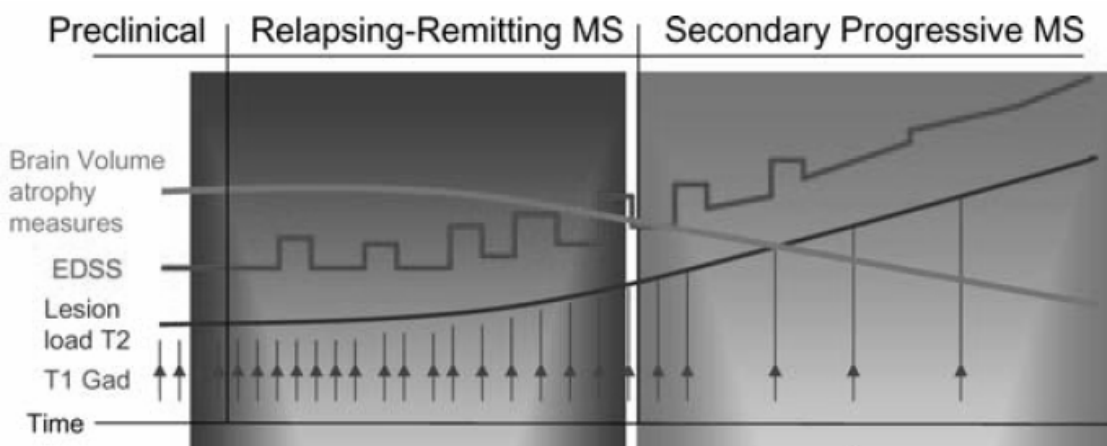
1.1 Immunologie, etiologie en pathogenese van multiple sclerose

Multiple Sclerose (MS) is een autoimmune aandoening van het centrale zenuwstelsel, gekarakteriseerd door chronisch inflammatie, demyelinisering en gliose. Typerend voor deze ziekte zijn de zogenaamde MS lesies. In *post-mortem* hersenweefsel zijn deze plaques duidelijk zichtbaar als afgebakende gebieden van demyelinisatie in de witte hersenmassa, al dan niet gepaard gaande met axonale schade. Met uitzondering van trauma's is MS de meest voorkomende oorzaak van neurologische afwijkingen bij jonge volwassenen. Kenmerkende symptomen zijn onder andere verlammingen, zwakheid, gevoelsverlies, tintelingen en optische neuritis [1]. De eerste tekenen van deze aandoening manifesteren zich meestal tussen de ouderdom van 20 en 40 jaar. Deze ziekte komt beduidend meer voor bij vrouwen dan bij mannen [2].

Een afwijkend immuunsysteem speelt vermoedelijk een centrale rol in de pathogenese van deze ziekte. Myeline reactieve T-cellen worden perifeer geactiveerd door vreemde (mogelijk virale) epitopen of lichaamseigen antigenen. Eens geactiveerd kunnen deze T cellen doorheen de bloed-hersen-barrière migreren waardoor ze de mogelijkheid bezitten om in het centrale zenuwstelsel binnen te dringen. Eenmaal in het centrale zenuwstelsel kunnen deze cellen gereactiveerd worden door neurologische antigenen zoals *myelin basic protein* (MBP). Vervolgens secreteren deze gereactiveerde T-cellen pro-inflammatoire cytokines zoals IFN- γ en interleukine 2 (IL-2). Deze cytokines spelen een rol bij de destructie van de myelineschede.

In de literatuur wordt een onderscheid gemaakt tussen vier verschillende pathologische patronen bij MS: (i) T-cell en macrofaag gemedieerde demyelinisatie; (ii) antilichaam gemedieerde demyelinisatie waarbij complement geactiveerd wordt; (iii) distale oligodendrogliopathie en oligodendrociet apoptose; (iv) primaire oligodendrociet degeneratie. De eerste twee patronen veronderstellen dat het de myeline zelf is die in eerste instantie beschadigd wordt waar het bij de laatste twee patronen het de oligodendrociet in weze is die beschadigd wordt. In een laatste fase van de ziekte kan naast demyelinisatie ook axonale schade optreden [3].

Algemeen wordt een onderscheid gemaakt in twee vormen van MS. De meest frequente vorm (85% - 90%) is de *relapsing-remitting* (RR)-MS. De meeste van deze patiënten evolueren later naar een secundaire progressieve vorm (SP-MS) (zie figuur 1). Een klein aantal patiënten (10%-15%) bevindt zich onmiddellijk in een primair progressieve vorm (PP-MS). Welke factoren juist instaan voor de verschillende ziekteverlopen zijn nog niet gekend. De opsporing van markers, die in staat stellen om MS tijdig te kunnen diagnostiseren, is belangrijk voor het starten van passende therapieën zoals toediening van anti-inflammatoire en immunomodulatoire medicaties [2].



Figuur 1. Schematische voorstelling van de klinische evolutie van MS.

EDSS: expanded disability scale scores, deze schaal geeft een waarde van 0 tot 10 aan de mate van handicap ten gevolge van MS. T1 gad: frequentie van inflammatoire events, gedetecteerd in MRI opnames (T1 lesies met contrast stof). Lesion load T2: aantal T2 lesies die algemene weefselschade aangeven. Brain volume atrophy measures: hersenvolume[2].

1.2 Experimentele autoimmune encephalomyelitis (EAE)

Experimentele autoimmune encephalomyelitis (EAE) in de rat is een acute vorm van paralyse waarvan de meeste dieren spontaan herstellen. Dit diermodel vertoont grote gelijkenis met de inflammatie die optreedt bij MS. EAE kan geïnduceerd worden door de ratten te immuniseren met *myelin basic protein* (MBP) of andere myeline eiwitten in combinatie met *complete Freund's adjuvant* (CFA). De ziekte wordt gekarakteriseerd door mononucleaire celfiltratie in het ruggenmerg, de hersenstam en het cerebellum. Demyelinisatie is zeer ongewoon. Encephalitogene CD4⁺ T-cellen blijken aanwezig te zijn 5 dagen na immunisatie. Op dag 7 zorgt geproduceerd IFN- γ dat deze T-cellen doorheen de bloed-hersen-barrière migreren. Eens hier aangekomen recrutereren ze macrofagen, microglia-cellen en T-cellen. Deze zetten onder andere NO, TNF- α en componenten van de stollingscascade vrij. Het gevolg hiervan is het ontstaan van oedeem dat samen met veranderingen in de bloed-hersen-barrière

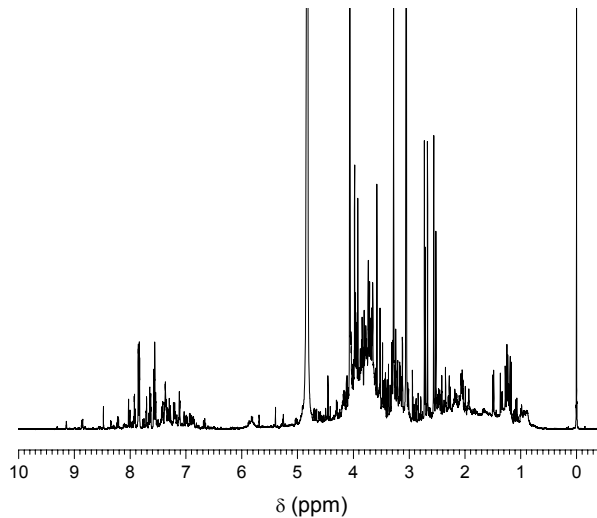
hoogstwaarschijnlijk voor de verlamingsverschijnselen zorgt. Het genezingsproces kan gereguleerd worden door suppressor cellen die TGF- β secreteren. Dit TGF- β is immers in staat om de werking van welbepaalde pro-inflammatoire cytokines af te remmen [4].

1.3 Metabonomica

Een opkomende techniek die het mogelijk maakt om biologische processen beter te begrijpen is de techniek van de metabonomica. De metabonomica houdt zich bezig met de kwantitatieve beschrijving van laagmoleculaire endogene metabolieten, aanwezig in biologische stalen zoals urine, plasma, weefsel [5], bloed, cerebrospinaal vocht en gal. Meestal wordt hiervoor gebruik gemaakt van lichaamsvloeistoffen. Metabolieten in lichaamsvloeistoffen zijn meestal in dynamisch evenwicht met de metabolieten in de cel en weefsels. Abnormale cellulaire processen in cellen zullen zich dan ook reflecteren in afwijkende metabolietconcentraties in deze lichaamsvloeistoffen. Urine lijkt hiervoor zeer geschikt aangezien een staal niet invasief en vrij eenvoudig te verkrijgen is [6]. Waarentegen bloed enkel een *snapshot* laat zien van het metabolisme, laat urine metabole veranderingen zien over een langer tijdsinterval. Metabolietconcentraties in het bloed worden binnen nauwe grenzen gehouden in tegenstelling tot metabolieten in urine die geconcentreerd kunnen voorkomen [7]. De nier speelt een belangrijke rol in de lichaamshomeostase door de eliminatie van afvalproducten. De variatie van componenten in de urine is een reflectie van de verschillende biochemische processen in de nier en de rest van het lichaam. Analyse van urine (urinalyse) kan daarom diagnostisch van zeer groot belang zijn. In urine zitten componenten zoals organische zuren en basen, eenvoudige suikers, polysachariden, heterocyclische componenten, polyolen, laag moleculaire proteïnen en polypeptiden. Ook anorganische componenten zoals Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- , SO_4^{2-} en fosfaten worden in de urine aangetroffen.

Hoge resolutie ^1H nucleaire magnetische resonantie (NMR) spectroscopie (NMRS) is een zeer geschikte methode voor de analyse van organische componenten in lichaamsvloeistoffen zoals urine. Deze uiterst snelle manier van analyseren vergt weinig staalvoorbereiding. Ook is het niet nodig om reeds een voorselectie te maken van welbepaalde componenten en kan er in één keer op een heel gamma van metabolieten gescreend worden. Er kan als het ware een metaboliet *fingerprint* (zie figuur 2) van een individu gemaakt worden. NMR spectroscopische analyses zijn tevens niet destructief en vergen maar een lage hoeveelheid staal [6]. De te onderzoeken metabolieten moeten echter wel waterstofatomen bevatten, aangezien het deze protonen zijn die voor het detecteerbaar signaal zorgen. Een van voornaamste problemen die opduiken bij NMR spectroscopische analyses van

lichaamsvloeistoffen zijn overlappings tussen pieken en de aanwezigheid van een breed achtergrondsignaal. Het spreekt dan ook voor zich dat de spectra van urine van zeer complexe aard zijn.



Figuur 2. Klassieke NMR spectroscopische opname van urine van een gezonde proefpersoon

1.4 Metabolietveranderingen bij MS

1.4.1 Hersenmetabolieten

Door middel van gelocaliseerde *in vivo* NMR spectroscopie van humane hersenen is het mogelijk om metabolieten te detecteren zoals **creatine** (Cr) **N-acetyl aspartaat** (NAA), **choline** (Cho) (zie figuur 3). Tevens is het mogelijk om andere componenten waar te nemen zoals **myo-inositol**, **glutamaat** en **glutamine** [8].

De piek van **creatine** (3,05 ppm) blijkt afkomstig van creatine zelf als van fosfocreatine. Deze laatste twee metabolieten zijn belangrijk in de energie homeostase. Deze piek wordt vaak gebruikt als referentie waardoor metaboliethoeveelheden vaak uitgedrukt worden in een ratio met de piekhoogte of piekoppervlakte van de creatinepiek in de noemer. Wel dient opgemerkt te worden dat ofschoon creatine vaak als referentie gebruikt wordt, er melding [9, 10] gemaakt wordt van veranderingen in creatine hoeveelheden in hersenen. Veranderingen uitdrukken ten opzichte van creatine kan dus een fout beeld scheppen van metabolietveranderingen in hersenen.

Het aminozuurderivaat NAA blijkt enkel aanwezig te zijn in neuronen en axonen van mature hersenen [8, 11, 12] en O-2A progenitorcellen [12]. Deze laatste zijn progenitorcellen van oligodendrocyten [13]. Waarschijnlijk fungeert NAA als een watertransporter waarbij door

elke molecule 32 watermoleculen uit de neuronen tegen de watergradiënt in getransporteerd worden. Op deze wijze speelt NAA dus een rol in osmoregulatie. Buiten het neuron wordt NAA gedeacetyleerd door enzymen in oligodendrocyten zoals amidohydrolase II. Afwezigheid van deze deacetylerende enzymen kan zich uiten in de ziekte van Canavan, gekenmerkt door verhoogde hoeveelheden NAA in de hersenen. Het aspartaat kan opnieuw in een neuron gebracht worden waarna het na acetylering tot NAA in het neuron opnieuw dienst doet als transporter voor watermoleculen [11].

Mogelijk speelt NAA ook een rol in proteïne synthese en metabolisme van neurotransmitters zoals aspartaat en N-acetyl glutamaat [14].

Gezien zijn functie in neuronen wordt NAA beschouwd als een merker voor axonale integriteit in MS [11, 14]. Een studie toont aan dat er een verband bestaat tussen de klinische score en de NAA:creatine ratio in welbepaalde gebieden in hersenen van *relapsing-remitting* patiënten [12]. Hier dient opgemerkt te worden dat deze verandering in NAA:creatine eerder te wijten kan zijn aan een daling van creatine dan een stijging van NAA. Een andere studie vond een verlaging van NAA in normale witte stof van MS patiënten door de absolute hoeveelheid van NAA te bepalen (dus niet ten opzichte van creatine). Ook in deze studie [9] werd een verband aangetoond tussen de verandering van NAA en de EDSS schaal. Een andere studie wijst dan weer op een vermindering in NAA in acute lesies t.o.v. chronische lesies en normaal-lijkende witte stof [15].

Het **choline** signaal blijkt afkomstig van glycerofosfocholine (GPC), fosfocholine (PC) en vrij choline [8]. PC is een precursor van de fosfolipiden fosfatidylcholine en sfgomyeline. Deze fosfolipiden zitten ingebouwd in cel- en myelinemembranen in het centrale zenuwstelsel. GPC is daarentegen een afbraakproduct van fosfatidylcholine. Er werd reeds een stijging in de choline:creatine ratio vastgesteld in MS patiënten [16]. Ook hier dient opgemerkt te worden dat deze verandering in choline:creatinine eerder te wijten kan zijn aan een daling van creatine dan een stijging van choline. Een andere studie wijst op hogere hoeveelheden choline in acute MS lesies dan in chronische lesies [15]. Algemeen wordt choline als een merker voor demyelinisatie aanschouwd [17].

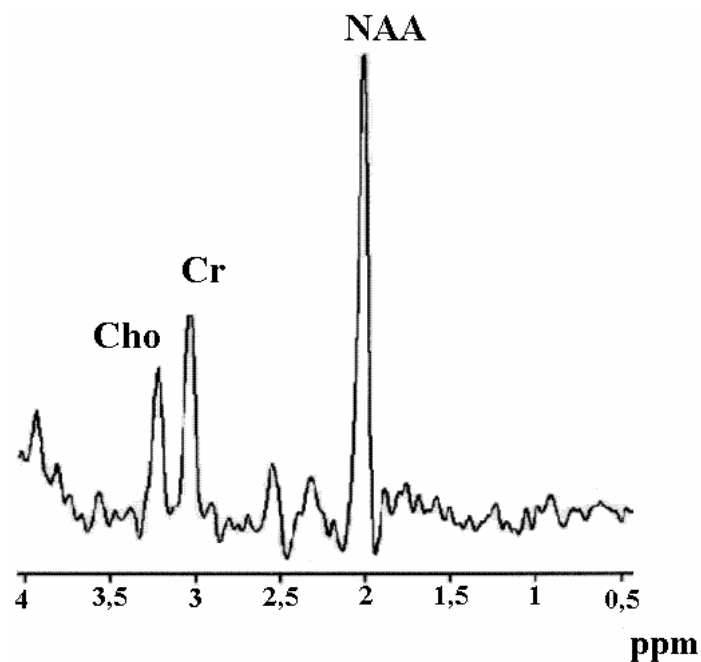
In normale humane hersenen is **lactaat** moeilijk te detecteren aangezien de concentraties vaak onder de detectielimiet zitten. Verhoogde concentraties aan lactaat worden meestal gevonden in toestanden van een ontregeld energiemetabolisme. Zo wordt onder andere een verhoging aangetroffen bij ischemie en hersentumoren [8]. Ook is reeds een verhoogd lactaat signaal beschreven in MS lesies, positief voor gadolinium (Gd) [18]. Een andere studie toont een

stijging van lactaat in acute MS lesies. Deze stijging zou te wijten zijn aan de metabole activiteit van de inflammatoire cellen [10].

Myo-inositol wordt beschouwd als een merker voor gliale activiteit. Er werd een verhoogde *myo*inositol concentratie aangetroffen in acute MS lesies [15]. Over de ware functie van deze component is voorlopig nog veel onduidelijkheid.

Samen met lactaat zijn er nog veranderingen in inositol gerapporteerd in MS-patiënten in vergelijking met gezonde personen [16].

Glutamaat en **glutamine** zijn zichtbaar als één gemeenschappelijke piek in het NMR spectrum. Glutamaat wordt door neuronen in de synaptische spleet vrijgezet als neurotransmitter. Om neurotoxiciteit te voorkomen internaliseren astrocyten de glutamaat nadien en zetten het terug vrij in de vorm van glutamine. Het is dit glutamine wat dan door de neuronen opnieuw wordt opgenomen om dan nadat het omgezet is naar glutamaat opnieuw dienst te doen als neurotransmitter. Er werden reeds verhoogde glutamaat concentraties aangetroffen in acute lesies en normaal-lijkende witte stof van MS patiënten [15].



Figuur 3. Proton NMR spectroscopische opname met een echartijd van 136 milliseconden van normaal hersenweefsel. De pieken van N-acetyl aspartaat (NAA), choline (Cho) en creatine (Cr) zijn duidelijk zichtbaar [19].

1.4.2 Urinaire metabolieten

Er zijn aanwijzingen in de literatuur dat EAE, geïnduceerd in de primate *Callithrix jacchus*, geassocieerd is met metabolietveranderingen in urine. In deze studie werden apen geïmmuniseerd met humaan myeline. Hierbij viel vooral op dat deze apen, wanneer ze volop klinische symptomen vertoonden van EAE, meer NAA, choline, inositol en neopterine in de urine vertoonden. Deze laatste component wordt beschouwd als een merker voor inflammatie. Ook werd in deze studie een sterke aanwijzing gevonden dat er ook verschillen aanwezig zijn in urinaire metabolieten van MS patiënten ten opzichte van gezonde personen en patiënten met andere neurologische aandoeningen [17].

Een andere studie toont aan dat het mogelijk is om inflammatie, geïnduceerd in de hersenen, op te sporen in urine. In deze studie werden bij ratten adenovirussen die enerzijds TNF- α en anderzijds IL1- β tot expressie brengen ingebracht in de hersenen. Hierdoor werd een lokale inflammatoire reactie in de hersenen bewerkstelligd. Injectie van een welbepaald adenovirus bracht een specifiek type ontsteking tot ontwikkeling. Hierbij werd niet alleen een verschil gevonden tussen een rat met herseninflammatie en een naïeve rat maar werden in de urine zelfs verschillen aangetoond tussen de verschillende types ontstekingen onderling. De IL1- β groep vertoonde een verhoogde hoeveelheid leucine, isoleucine, valine, n-butyraat en glucose waarentegen de TNF- α groep verhoogde hoeveelheden citraat, 2-oxoglutaraat en succinaat vertoonde [7].

1.5 Onderzoeksopzet

Eerder werd reeds aangehaald dat spectroscopie van hersenweefsel verschillen aantoonde in welbepaalde organische metabolieten tussen MS patiënten en gezonde individuen. Nadelen aan deze methode zijn onder andere de lage reproduceerbaarheid van de resultaten, de lage resolutie en de lage detectielimiet. Ook wordt er met dit type spectroscopie zeer lokaal gekeken naar metabolietconcentraties. Tevens bestaat er in de literatuur geen éénduidig standpunt omtrent metabolietconcentraties bij MS patiënten ten opzichte van niet-MS personen. NMR spectroscopie van lichaamsvloeistoffen, meer bepaald urine, kan hier misschien uitweg bieden. Het voordeel aan deze techniek is onder andere de hogere resolutie en gevoeligheid die verkregen kan worden. In tegenstelling tot hersenbiopten zijn urinestalen bovendien veel eenvoudiger te verkrijgen. Waar bij *in vivo* spectroscopie zeer lokaal gekeken wordt naar eventueel primaire oorzaken van MS, kan bij NMR spectroscopische analyse van

urine meer systemisch gezocht worden naar secundaire gebeurtenissen bij MS. Dit vergroot de kans op het vinden van geschikte merkers die in staat stellen MS vroegtijdiger te diagnostiseren. Door toevoeging van een interne standaard aan urine is het tevens mogelijk om stalen onderling eenvoudiger te vergelijken en het gebruik van het veelgebruikte creatine ^1H NMR signaal (3,05 ppm) als interne referentie kritisch te evalueren.

Eerst werd een optimale urine staalvoorbereiding en ^1H NMR spectroscopische analyse op punt gesteld. Vervolgens werd getracht om de brede resonantiepieken die zorgen voor een breed achtergrondsignaal in het ^1H NMR spectrum van urine te elimineren.

Na deze optimalisatie werd getracht om eventuele ziektemerkers voor MS op te sporen door zeer systematisch de urine van gezonde en zieke individuen te vergelijken. Hierbij worden alle stalen onder dezelfde omstandigheden bereid (zelfde pH waarde, concentratie buffer,...) en geanalyseerd onder identieke opname condities (zelfde pulssequentie, preparatietijd, acquisitietijd, interne referentie,...).

Vooreerst zullen verschillen in urinaire metabolieten gezocht worden, gebruik makende van het EAE ratmodel van MS. Deze manier van onderzoek stelt ons in staat om zeer gecontroleerd variatie tussen zieke en gezonde individuen op te sporen. De dieren krijgen onder andere namelijk dezelfde voeding en zijn niet onderhevig aan medicatiegebruik.

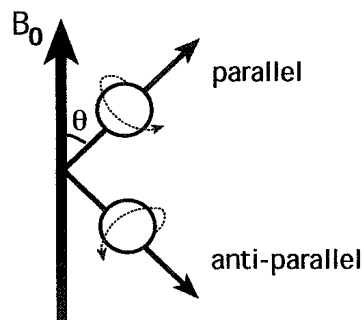
Als uiteindelijk doel zal ook getracht worden om afwijkende metabolietprofielen aan te tonen in urinestalen van MS-patiënten ten opzichte van gezonde personen.

Hoofdstuk 2: Principe NMR spectroscopie

^1H NMR spectroscopie bestudeert magnetische eigenschappen van kernen van waterstofatomen, ingebouwd in moleculen.

2.1 Het hoofdmagneetveld B_0 en de stoorzender B_1

Net zoals electronen beschikken ook protonen en neutronen over een *spin*. Anders gezegd zijn dit ook *spin* $\frac{1}{2}$ deeltjes. Het kernspinkwantumgetal I van een kern, is een maat voor de vectoriële som van deze *spins* van de neutronen en protonen in de kern. Hierbij is het mogelijk dat 2 protonen en 2 neutronen elkaars *spin* neutraliseren. I beschrijft dus de som van de niet-geneutraliseerde neutronspins en protonspins. Het zijn nu kernen met een $I \neq 0$ die NMR gevoelig zijn. Voorbeelden hiervan zijn onder andere ^1H ($I=1/2$) en ^{13}C ($I=1/2$). Zulke kernen kunnen beschouwd worden als kleine magneetjes met een kernmagnetisch dipoolmoment $\vec{\mu}$. Brengt men een $I=1/2$ kern met zijn magnetisch moment in een sterk en homogeen uitwendig magnetisch veld B_0 , dan kan de kern energetisch gezien in twee toestanden voorkomen: een lage energietoestand (*spin-up* of α -toestand) waarbij μ_z parallel is aan B_0 en een hoge energietoestand (*spin-down* of β -toestand) waarbij μ_z antiparallel is aan B_0 (zie figuur 4).



Figuur 4. Verschillende energietoestanden van de $I=1/2$ kern onder invloed van een uitwendig magnetisch veld B_0 .

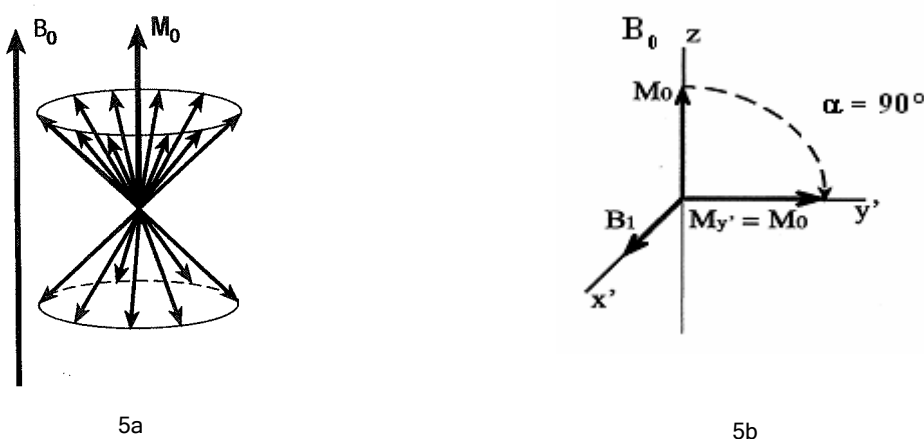
Onder invloed van B_0 , gericht langs bijvoorbeeld de Z -as, beschrijft een kernvector eigenlijk een cirkelvormige beweging rond B_0 die de oppervlakte van een kegel beschrijft. De frequentie van deze tolbeweging, de Larmorfrequentie, kan als volgt beschreven worden:

$$\omega_L = \gamma B_0 \text{ of } \nu_L = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

Hierbij is γ de gyromagnetische constante eigen aan het ^1H atoom. Tussen de twee energieniveaus kunnen spinovergangen geïnduceerd worden door instraling met electromagnetisch straling van de geschikte frequentie. Er moet aan de zogenaamde resonantievoorwaarde voldaan zijn:

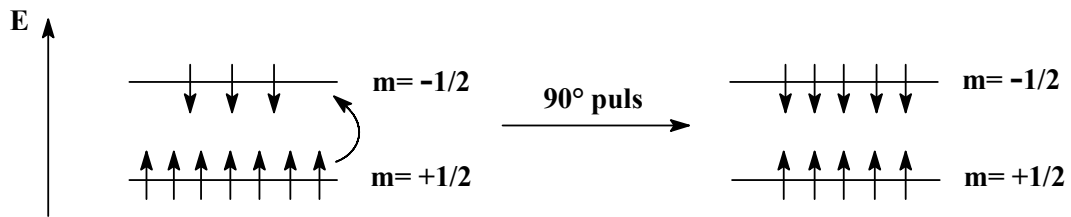
$$E = h\nu = h\nu_L = h \frac{\gamma B_0}{2\pi} = \Delta E$$

Hierbij is h de constante van Planck en ΔE het energieverschil tussen de twee energietoestanden. De spinovergangen kunnen geïnduceerd worden door middel van een radiozender B_1 die korte maar krachtige radiofrequente pulsen met $\nu = \nu_L$ uitzendt. Voor supergeleidende magneten van 4,7 en 11,75 Tesla zijn de bijpassende resonantiefrequenties van protonen respectievelijk 200 en 500 MHz. Macroscopisch gezien zullen de afzonderlijke μ -vectoren zich statistisch verdelen over twee kegelhelften. Hierbij zijn de vectoren in de richting van B_0 lichtjes in de meerderheid ($n \uparrow > n \downarrow$). De vectoriële som van al deze kleine μ -vectoren resulteert in een netto Z-magnetisatie, georiënteerd volgens de Z-as en voorgesteld door de magnetisatievector M_0 . Deze vector heeft dezelfde richting en zin als vector B_0 . (zie figuur 5a).



Figuur 5. a Statistische verdeling van de μ -vectoren over twee kegelhelften. b Situatie na een 90° puls.

De hoek α die de vector M_0 maakt tijdens de B_1 puls is afhankelijk van de duur en de sterkte van de radiopuls B_1 . Bij een 90° puls ($\alpha=90^\circ$) komt de vector M_0 in het X-Y vlak terecht. De Z-component wordt nu 0 waarentegen de Y-component een maximale waarde M_0 bereikt (zie figuur 5b). Na een 90° puls is het aantal μ -vectoren gelijk verdeeld over de twee energietoestanden (zie figuur 6) en is $M_Z=0$ en $M_Y=M_0$.



Figuur 6. Bezetting van de energieniveaus na een 90° puls.

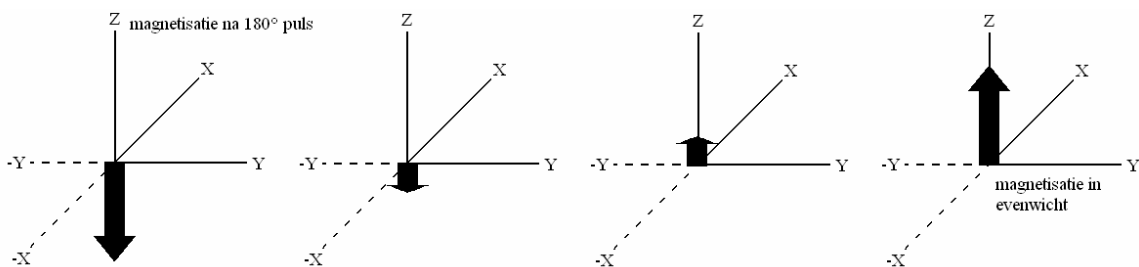
Bij een 180° puls is de Z-component maximaal negatief ($-M_0$) waarentegen de Y component dan weer 0 is. Het is de X-Y magnetisatie die detecteerbaar is tijdens de detectiefase door een detector, opgesteld langs de Y-as.

2.2 Relaxatie

Na verstoring van het evenwicht door de B_1 zal de evenwichtssituatie zich herstellen door relaxatie. Men onderscheidt voornamelijk twee relaxatieprocessen: longitudinale relaxatie en transversale relaxatie.

2.2.1 Longitudinale relaxatie

Deze relaxatie beschrijft het exponentieel heringroeien van de Z-component van de magnetisatie vector tijdens het herstel (zie figuur 7). Deze relaxatie wordt ook de *spin-rooster* relaxatie genoemd aangezien de opgeslagen energiequanta aan de omgeving, het rooster, worden afgegeven. Het proces kan beschreven worden als een exponentiële functie. De snelheid waarmee dit herstel gebeurt wordt uitgedrukt door middel van de T_1 relaxatietijd.



Figuur 7. Longitudinale relaxatie.

Na verloop van tijd wanneer de magnetisatie volledig gerelaxeerd is heeft de Z-component opnieuw zijn maximale waarde $M_Z=M_0$ bereikt.

bepaling van de T_1 relaxatietijd: Inversion recovery experiment

De pulssequentie, in dit experiment gebruikt, begint met een 180° puls die gevolgd wordt door een variabele wachttijd (τ) gedurende welke het systeem gedeeltelijk relaxeert. De ingroei na deze 180° puls kan mathematisch als volgt beschreven worden:

$$M_z = M_0(1 - 2e^{-\tau/T_1})$$

Na de variabele wachttijd τ zorgt een 90° puls voor de detectie van het signaal door de magnetisatievector in het X-Y vlak te brengen. Het experiment wordt herhaald voor variabele τ -waarden. De pulssequentie kan als volgt beschreven worden:

preparatietijd - 180° - τ - 90° - detectie

Hierbij is de preparatietijd een wachttijd waardoor het hele systeem tot relaxatie kan komen. De wachttijd T_d van een experiment is best $5 \times T_1$. Hierdoor is men zeker dat het systeem volledig gerelaxeerd is alvorens met een nieuwe pulssequentie gestart wordt [20].

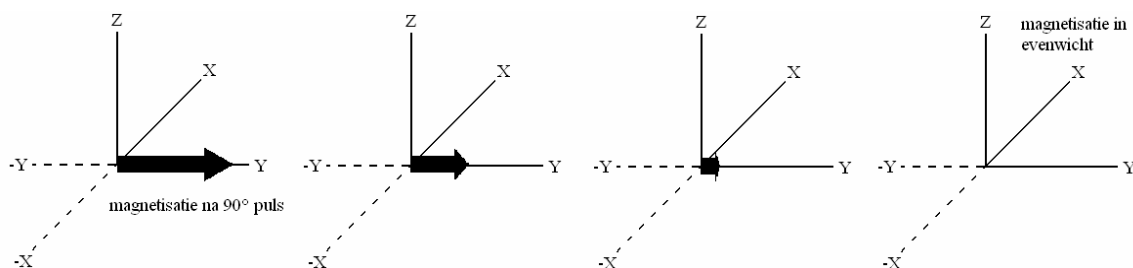
2.2.2 Transversale relaxatie

Deze relaxatie beschrijft het exponentieel inkrimpen van de Y-as magnetisatie na een 90° puls (zie figuur 8). Na de verstoring van het evenwicht zal de M_Y -component immers afnemen. Deze vorm van relaxatie wordt de *spin-spin* relaxatie genoemd omdat de energiequanta uitgewisseld worden tussen naburige kernmagneetjes. Mathematisch kan deze relaxatie als volgt beschreven worden:

$$M_Y = M_0 e^{-t/T_2}$$

Hierin is T_2 de tijd waarin de Y-component met een factor e afneemt.

Deze relaxatie, de T_2 relaxatie, verloopt efficiënter wanneer de kerndeeltjes minder beweeglijk zijn. T_2 is altijd kleiner of gelijk aan T_1 .



Figuur 8. Transversale relaxatie.

Na verloop van tijd, wanneer de magnetisatie volledig gerelaxeerd is heeft de Y-component opnieuw de waarde 0 bereikt.

bepaling van T_2 relaxatietijd: Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) experiment

De pulssequentie in dit experiment begint met een 90° puls. Hierbij komt de vector M_0 langs de Y-as te liggen. Door veldinhomogeniteiten op verschillende plaatsen in het sample en T_2 relaxatie zal de magnetisatievector uitwaaiëren. Het uitwaaiëren als gevolg van veldinhomogeniteiten kan geneutraliseerd worden door het toedienen van een 180° puls na een wachttijd τ . De detectie van het echosignaal, enkel afgezwakt door T_2 relaxatie, gebeurt na nog eens een wachttijd τ gewacht te hebben. De volledige sequentie ziet er als volgt uit:

$$\text{Preparatietijd-}90^\circ - (\tau - 180^\circ - \tau)_n - \text{detectie}$$

Toename van het aantal ‘spin-echo’ cycli gaat gepaard met een verlenging van de variabele τ in de voorgaande formule [20].

2.3 Chemische shift

Wanneer een atoom in een magnetisch veld gebracht wordt, zorgen de locale (isotrope) en naburige (anisotrope) elektronenbewegingen voor kleine veranderingen in het door de kern aangevoelde magnetisch veld. Het effectief veld (B_{eff}) zal dus verschillend zijn van B_0 .

$$B_{\text{eff}} = B_0(1 - \sigma)$$

Hierin is σ de dimensieloze magnetische afschermingsconstante. Daar B_{eff} verschillend is voor verschillende elektronenomgevingen zullen ook de resonantiefrequenties verschillend zijn. Dit resulteert in de zogenaamde chemische verschuiving of *chemical shift*. Meer precies is de chemische shift van een kern het genormeerde verschil tussen de resonantiefrequentie van de kern en een standaard. De chemische *shift* wordt weergegeven in de grootte ppm (parts per million). De chemische *shift* is dus meer bepaald een maat voor de chemische omgeving rond een kern.

2.4 J-koppeling

Twee kernen met een verschillende chemische omgeving (niet-equivalente kernen) kunnen zorgen voor het fenomeen van de *spin-spin* koppeling of J-koppeling. Het mechanisme verloopt via de bindingselectronen (vandaar ook de naam scalaire koppeling) en treedt meestal op voor protonen die door twee (2J of geminale koppeling) of drie (3J of vicinale koppeling) bindingen van elkaar gescheiden zijn. Het is dit fenomeen dat instaat voor het verschijnen van singuletten, doubletten, tripletten,... in het proton spectrum.

2.5 Uitzicht NMR spectrum

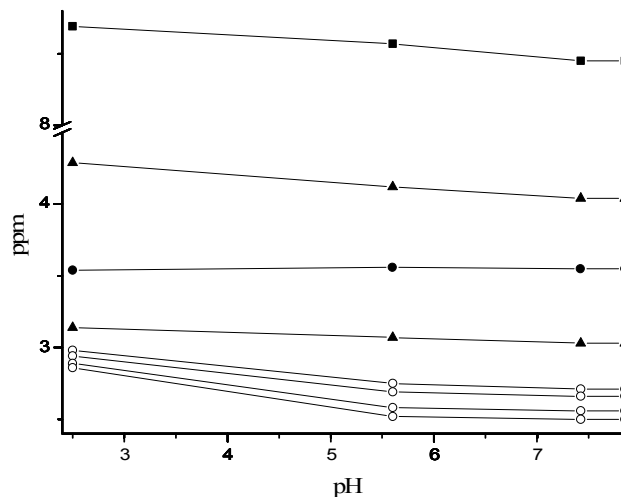
NMR spectra worden doorgaans weergegeven in plots waarbij de signaalintensiteit uitgezet wordt in functie van de frequentie (ppm) (zie figuur 2). Door de integratiewaarde of piekhoogte van deze resonantiepieken te berekenen kan informatie betreffende metabolietconcentraties bekomen worden. De oppervlakte of hoogte van elke piek wordt immers bepaald door de hoeveelheid waterstofkernen die met deze welbepaalde frequentie resoneren.

Structurele informatie kan bekomen worden uit parameters, gemeten in NMR spectra, zoals de chemische *shift* (δ in ppm), *spin-spin* koppelingspatronen, koppelingsconstanten (J in Hz) en signaal intensiteiten [21].

Hoofdstuk 3: Optimalisatie staalbereiding en NMR parameters

3.1 pH urine

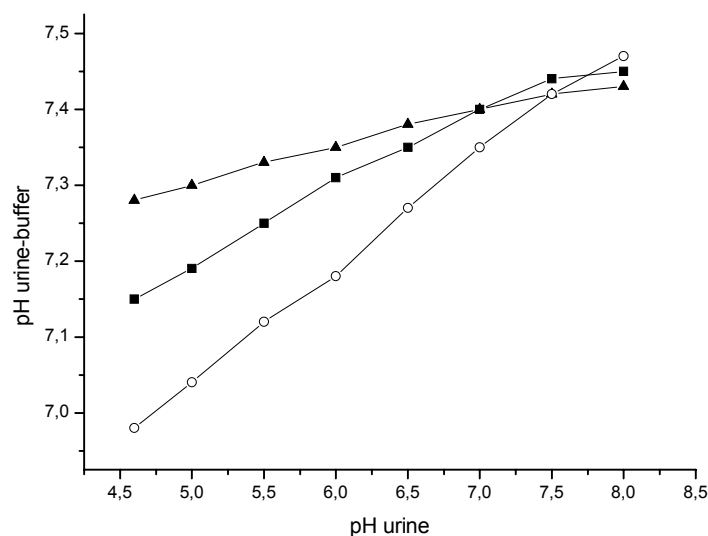
De normale fysiologische pH van urine varieert van 5 tot 8. De chemische verschuiving van meerdere metaboliëten blijkt echter pH afhankelijk te zijn [6]. Uit figuur 9 blijkt inderdaad dat resonanties van bijvoorbeeld histidine, creatine, creatinine en citraat lichte shiftverschuivingen ondergaan in functie van de pH.



Figuur 9. Chemische shift in functie van pH.

Resonanties van histidine (■), creatine en creatinine (▲), glycine (●) en citraat (○) werden bepaald in urinestalen die met 1M NaOH of 1M HCl naar verschillende pH waarden werden gebracht.

Om verschillen in chemische shift van resonanties tussen verschillende urinestalen uit te sluiten werd besloten om pH-verschillen tussen stalen onderling te beperken door toevoeging van fosfaatbuffer (0,2 M $\text{Na}_2\text{HP0}_4$ / 0,04 M $\text{NaH}_2\text{P0}_4$, pH 7,4 [17]). De capaciteit van deze buffer werd bepaald door een reeks urinestalen te maken in functie van de pH. Elk staal van deze reeks werd gebufferd in een urine/buffer verhouding van 1/3, 1/2 en 1/1. De pH van deze urine-buffer verhoudingen werd gemeten en uitgezet in een grafiek (zie figuur 10).



Figuur 10. Buffercapaciteit fosfaatbuffer.

De pH waarden werden bepaald voor een reeks urinestalen, variërend in pH, die gebufferd werden in een urine/buffer verhouding van 1/3(▲), 1/2(■) en 1/1(○).

Uit figuur 10 blijkt enerzijds dat toevoeging van fosfaatbuffer in een urine/buffer verhouding van 1/3 ervoor zorgt dat de pH waarde het minst afwijkt van pH 7,4. De chemische *shift* van welbepaalde componenten is zeer pH gevoelig. Daarom werd geopteerd om de urine vooreerst op pH 7,4 te stellen met 1M NaOH of 1M HCl en deze nadien te bufferen door toevoeging van fosfaatbuffer in een urine/buffer verhouding van 1/1. Vermits de pH toch eerst op +/- 7,4 diende gebracht te worden, werd geopteerd voor de urine/buffer verhouding van 1/1 om zo het te lyofiliseren volume te beperken (zie ook 3.4.3)

3.2 Concentratie urinestalen

Om de hoeveelheid water in de stalen, die de NMR spectroscopische analyses bemoeilijkt, te beperken, worden alle stalen gelyofiliseerd en opnieuw opgelost in het protonvrije oplosmiddel D₂O. Het is mogelijk om via het oplossen van verschillende hoeveelheden lyofilisaat in D₂O de concentratie aan urinaire metabolieten te verhogen of te verlagen. De bandbreedte op halve hoogte ($\Delta\nu_{1/2}$) van het NMR-signaal is afhankelijk van de moleculaire beweeglijkheid (T_2 relaxatietijd) zodat een te hoge metabolietconcentratie een negatief effect kan hebben op de resolutie. Daarom werd gezocht naar de metabolietconcentraties met de meest optimale resolutie en signaal-ruis verhouding. Lyofilisaten werden zo opgelost in D₂O dat een verhouding urine/D₂O van 2/1, 1/1 en 1/2 werd bekomen. Een gulden middenweg waarbij de beste signaal-ruis verhouding in combinatie met de beste resolutie werd bekomen bestond erin om de oorspronkelijke hoeveelheid metabolieten te behouden. Dit wil zeggen dat

alle lyofilisaten gebruikt in deze studie afkomstig zijn van oplossingen bestaande uit 1ml urine en 1 ml buffer en daarna voor NMR analyse werden heropgelost in 1ml D₂O. Op deze wijze is het later ook eenvoudiger om bepaalde componenten eventueel correct te kwantificeren.

3.3 Staalvoorbereiding

Samenvattend werden de urinestalen dus als volgt bereid:

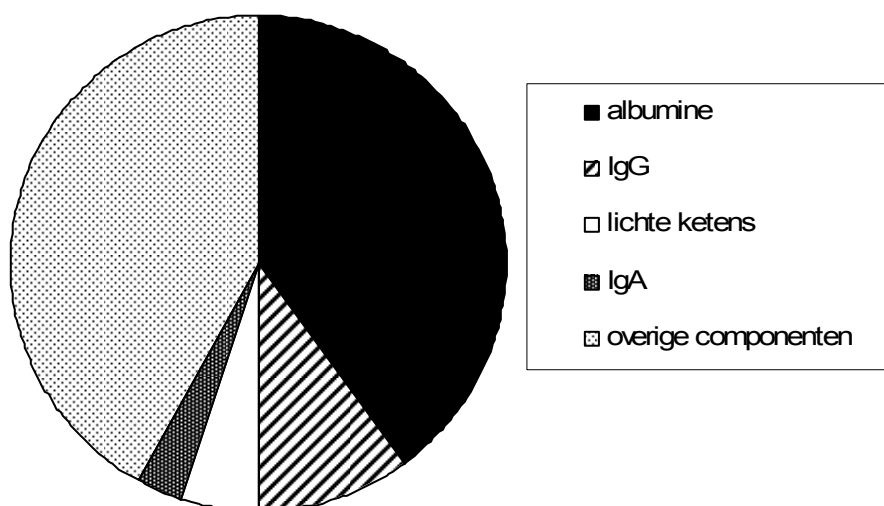
-De pH van urine werd door middel van 1M NaOH of 1M HCl naar **pH +/- 7,4** gebracht waarna deze gebufferd werd door toevoeging van **fosfaatbuffer** (0,2 M Na₂HP0₄ / 0,04 M NaH₂P0₄, pH 7,4 en 4°C [17]) in een urine/buffer verhouding van 1/1.

-De stalen werden na invriezen met vloeibare stikstof overnacht **gelyofiliseerd**. Na lyofilisatie werden de stalen ingevroren bij -80°C tot verdere verwerking.

-De lyofilisaten werden nadien **heropgelost in 1ml stockoplossing** (interne standaard in D₂O: zie 4.1.2) waarbij de oorspronkelijke concentratie urinaire metabolieten behouden bleef. Het geheel werd overgebracht in een 5mm NMR buisje en geanalyseerd met behulp van **¹H NMR spectroscopie** op een 400 MHz (9,4 Tesla) spectrometer.

3.4 Wegwerken brede basislijn

Uit figuur 2 blijkt overduidelijk dat de basislijn van klassieke ¹H-NMR spectra van urine een breed achtergrondsignaal vertoont. Dit is het meest uitgesproken in de regio van 3 tot 4 ppm. ¹H NMR spectra van serum of plasma stalen tonen tevens deze brede achtergrond die in dit geval toegeschreven wordt aan proteïnen zoals onder andere albumine. Door de geringe mobiliteit in de oplossing hebben deze macromoleculen immers een korte T₂ relaxatietijd [5, 22]. In fysiologisch normale urine wordt per dag echter maar tussen 50 en 150 mg proteïne aangetroffen (zie figuur 11) [23].



Figuur 11. Samenstelling van proteïnen in normale humane urine [23].

Verondersteld wordt dat deze proteïnen in $^1\text{H-NMR}$ spectra van humane urine ook voor de brede basislijn zorgen. Om dit te verifiëren werd getracht om de macromoleculen en grotere componenten uit de urinestalen te verwijderen door fysicochemische manipulaties.

3.4.1 Centrifugatie

Via centrifugatie werd getracht om componenten zoals celmateriaal te verwijderen. Voor dit experiment werd een bereid urinestaal (gebufferd in een urine/buffer verhouding van 1/1) volgens een beschikbaar protocol [24] gecentrifugeerd met een Eppendorf centrifuge 5810. De vloeistof boven de pellet werd afgenomen en verder verwerkt zoals hiervoor beschreven (lyofiliseren en opnieuw oplossen in 1ml D_2O) voor analyse.

3.4.2 Filtratie

Via filtratie met filters met een *cut-off* van respectievelijk 5000 en 1000 Da zouden proteïnen zoals albumine (MW=69000 Da [25]) zeker uit de urinestalen moeten verdwijnen.

Een bereid urinestaal werd gefiltreerd met behulp van *ultrafree[®] MC PLLC centrifugal filters* met een *cut-off* van 5000 Da. Stalen werden gedurende 40 minuten aan 12000 rpm gecentrifugeerd in een Eppendorf centrifuge 5415. Het filtraat werd onmiddellijk verwerkt zoals hierboven beschreven.

Een tweede bereid urinestaal werd gefiltreerd door gebruik te maken van een *macrosep[®] centrifugal device* met een *cut-off* van 1000 Da. Het geheel werd gedurende 90 minuten

gecentrifugeerd met een eppendorf centrifuge 5810 zoals voorgeschreven. Het filtraat werd vervolgens verwerkt zoals hierboven aangehaald.

3.4.3 Ionensterkte en uitzouting

Om na te gaan of de zouten, afkomstig uit de buffer, niet zorgen voor het brede achtergrondsignaal, ten gevolge van ionensterkte of uitzouting van eiwitten, werden stalen bereid met toenemende zoutconcentratie. Hiertoe werden oplossingen bereid met urine/buffer = 1/1, 1/2 en 1/3. Tijdens dit experiment werd geen associatie gevonden tussen concentratie bufferzouten en het brede achtergrondsignaal.

3.4.4 Zure hydrolyse

Zure hydrolyse maakt het mogelijk om peptidebindingen tussen aminozuren in eiwitten te verbreken. Op deze manier worden proteïnen in kleinere fragmenten geknipt. Zuivere, onbereide urine werd aangezuurd met 6 N HCl tot een pH waarde van 1. Dit aangezuurd staal werd hierna gedurende 3 uur gekookt in een oliebad. Door het gebruik van een koeler werd voorkomen dat water uit de urine kon verdampen. Na afkoeling tot kamertemperatuur werd de gehydrolyseerde urine gebufferd en verder verwerkt zoals reeds eerder beschreven.

3.4.5 Fase scheiding

Zoals boven beschreven werden de lyofilisaten steeds opnieuw opgelost in 1 ml D₂O. Hierna werd, zoals later meer in detail beschreven, de oplossing overgebracht in een NMR-buisje voor ¹H-NMR spectroscopische analyse. Er werd regelmatig fase-scheiding waargenomen: een meer troebele fase met daarbovenop een meer heldere fase. Om na te gaan of de troebele fase gecorreleerd was met het breed achtergrondsignaal werd de heldere bovenstaande fase afgenomen en terug aangelengd met D₂O tot een volume van 1ml.

3.4.6 Protonuitwisseling met D₂O

Waterstofatomen in NH of OH groepen kunnen uitwisselen met andere protonen. Indien deze uitwisseling langzaam is op de NMR-tijdschaal kan dit tot merkbare bandverbreding leiden. Het wisselen van waterstof voor een deuterium atoom kan er misschien voor zorgen dat de achtergrondverbreding verdwijnt. Een zuiver urinestaal werd daarom 2x verdund met D₂O en nadien glyofiliseerd. Het lyofilisaat werd nogmaals 2x heropgelost in D₂O en overnacht

gelyofiliseerd. Door bovengenoemde handeling uit te voeren werd getracht om zoveel mogelijk protonen uit te wisselen met deuterium atomen.

3.4.7 Resultaten en conclusie

Geen van bovenstaande fysicochemische manipulaties lieten echter een merkbare verbetering van het breed achtergrondsignaal merken. Dit betekent dat de achtergrond hoogstwaarschijnlijk niet afkomstig is van eiwitten of andere macromoleculaire componenten. Om trage protonuitwisselingsprocessen volledig uit te schakelen zou het protonuitwisselingsexperiment (zie 3.4.6) eventueel kunnen herhaald worden onder zuurkatalyse.

3.5 ^1H NMR

Aangezien bovenbeschreven fysicochemische manipulaties geen verbetering in het brede achtergrondsignaal lieten merken werd besloten om het probleem van de brede basislijn te benaderen vanuit de ^1H -NMR opname zelf. Verwarming tot 60°C van het staal tijdens de acquisitie toont geen verbetering van het brede achtergrondsignaal. Door te verwarmen werd gehoopt dat de mobiliteit van grotere componenten met een korte T_2 relaxatietijd zou verhogen. Hierdoor wordt de T_2 relaxatietijd immers verhoogd. Gebruik van een *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (CPMG) pulssequentie (lichtjes T_2 gewogen opname waardoor de componenten met korte T_2 relaxatietijd weggerelaxeerd zijn) laat ook geen merkbare verbetering van het brede achtergrondsignaal merken. Gebruik van *J-resolved* ^1H -NMR spectroscopie daarentegen zorgt wel voor duidelijke afname van de brede achtergrond (zie bijlage 1). Niettegenstaande op deze manier spectra bekomen worden die vrij zijn van achtergrond, blijft het ten gronde verklaren moeilijk omdat de origine van de bandverbreding onduidelijk blijft.

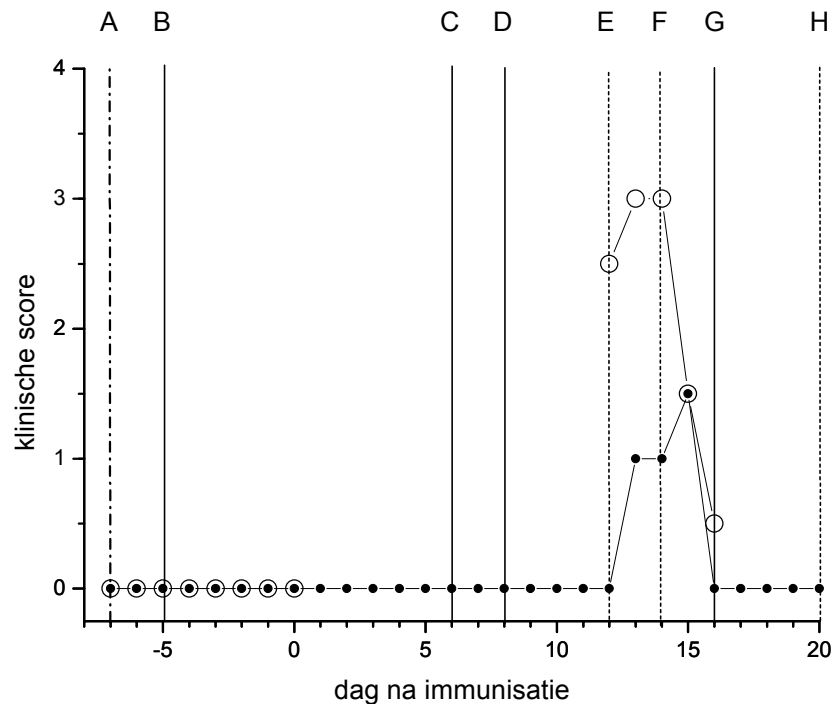
Hoofdstuk 4: Opsporen ziektemerkers

4.1 Materiaal en methoden

4.1.1 Staalname

Urine ratten

Twee vrouwelijke Lewis ratten van 8 weken oud werden geïmmuniseerd met MBP volgens een reeds vooraf gepubliceerd immunisatieprotocol [26, 27]. Kortweg beschreven werden de dieren eerst verlamd door intra-peritoneale toediening van 75 µl nembutal (natriumpentobarbital, CEVA sante animale) per 100 gram lichaamsgewicht. Nadien werd per rat 200 µl MBP-mix (10% MBP, 12,5% microbacterium, 17,5% PBS, 60% CFA) subcutaan toegediend, verspreid over de twee voetzolen. Vanaf het punt van immunisatie werden de ratten dagelijks gewogen. Tijdens het ziekteverloop werden de ratten klinisch gescoord. Afhankelijk van hun ziekte-toestand werden volgende scores toegekend: gezond = 0, staartverlamming = 1, achterpootverlamming = 2-3, volledige verlamming = 4. De ratten werden op welbepaalde tijdstippen (zie figuur 12) in een metabole kooi geplaatst. Dit type kooi laat toe om urine te verzamelen, gescheiden van eventuele faeces. De urine werd opgevangen in een ijs-gekoeld reservoir, dit om bacteriegroei in de urine tegen te gaan. Er werd geopteerd om de ratten 's nachts in de metabole kooi te plaatsen aangezien deze dieren vooral 's nachts actief zijn en dan beduidend meer urineren in vergelijking met overdag. Na verzamelen werd de urine onmiddellijk gebufferd en verder verwerkt zoals reeds eerder beschreven.



Figuur 12. Staalname urine EAE ratten. ♀ Lewis ratten werden op tijdstip 0 geïmmuniseerd met MBP ter inducering van EAE. Op welbepaalde tijdstippen werden de ratten in een metabole kooi geplaatst waardoor collectie van urine (A→H) kon gebeuren. ○ = score rat 1, ● = score rat 2. Verticale volle lijn: afnamepunt urine rat 2, verticale gepunte lijn: afnamepunt urine rat 1 en 2, verticale half-volle lijn: afnamepunt rat 1.

Urine van humane controle patiënten

Aan 5 mannelijke vrijwilligers met een gemiddelde leeftijd van 21 jaar werd gevraagd om 3 dagen in de week een willekeurig urinestaal af te nemen. Deze personen vertoonden geen symptomen van multiple sclerose. De urine van deze personen werd onmiddellijk naar een pH waarde van 7,4 gebracht door toevoeging van 1M NaOH of 1M HCl en gebufferd. Deze bereide stalen werden uitverdeeld in volumes van 1ml, ingevroren met vloeibare stikstof en bewaard bij -80° tot verdere verwerking. Van elke persoon werd vervolgens een urinepool gemaakt door van elke afname 1 ml te ontdooien en samen te voegen. Dit poolen werd gedaan om dag-tot-dag variatie in urinaire componenten uit te middelen. De pool van elke persoon werd opnieuw ingevroren met vloeibare stikstof, gelyofiliseerd en verder verwerkt zoals reeds eerder beschreven.

Urine van MS patiënten

Aan 8 patiënten waar de diagnose van MS werd gesteld werd gevraagd om gedurende één week een aantal urinestalen af te nemen. De patiënten vertoonden variabele symptomen variërend van lichte tot zeer ernstige symptomen. Van 3 patiënten werden 2 afnames gedaan.

Voor de andere 5 patiënten werden 3 afnames genoteerd. De stalen werden op dezelfde manier verwerkt als beschreven bij de gezonde controle urinestalen.

4.1.2 Stockoplossing van interne referentie in D₂O

Zoals reeds eerder vermeld werden gelyofiliseerde stalen heropgelost in 1ml D₂O met hieraan een interne standaard toegevoegd. Om alle stalen te voorzien van exact dezelfde concentratie aan interne referentie, werd voldoende stockoplossing 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionaat (TSP, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) aangemaakt met een concentratie van 0,0058 M. Het NMR signaal van deze standaard werd tevens op 0 ppm gezet.

4.1.3 ¹H NMR

De ¹H-NMR spectra werden opgenomen in een 5 mm NMR buisje op een 400 MHz Varian Inova spectrometer (9,4 Tesla) uitgerust met een moderne proton probe. De temperatuur werd constant gehouden op 23°C. Spectra werden opgenomen met een spectraal bereik (sw) van 4 kHz, een pulslengte (pw) van 6 μs, acquisitietijd (at) van 5 s, 120 accumulaties en een filterband (fb) van 4 kHz. Een preparatietijd van 12,5 s werd gerespecteerd tussen opeenvolgende accumulaties. Het resterende protonsignaal van in D₂O (99,5 % gedeutereerd) aanwezig H₂O en HOD werd onderdrukt door selectieve homonucleaire protonontkoppeling. Hiertoe werd tijdens de preparatieperiode met de decoupler selectief (met laag vermogen) ingestraald op dit signaal.

4.1.4 Spectrale analyse

Aangezien de complexiteit van deze spectra groot is, werd geopteerd om verschillen in urinaire metabolieten tussen zieke individuen en gezonde controles via twee verschillende invalshoeken op te sporen.

Een eerste manier bestond erin om de signalen afkomstig van NAA, glutamine, glutamaat, choline, inositol en neopterine altijd op te nemen in de datamatrix. De chemische shiften van deze componenten zijn reeds beschreven in de literatuur.

Een tweede manier bestond erin om actief op zoek te gaan naar verhoogde of verlaagde metabolietsignalen. De methodologie wordt hieronder beschreven:

Humane urines

In de verschillende spectra werd eerst het signaal van de interne TSP standaard (0 ppm) op dezelfde verticale hoogte gezet. Vervolgens werden de piekhoogtes van alle signalen gestockeerd in een *ascii file*. Een volgende stap bestond erin om van elk spectrum de totale integraalwaarde te berekenen, exclusief resterend water en de TSP piek. Deze integralen werden uitgedrukt ten opzichte van een constante integraalwaarde voor de TSP piek. Om te corrigeren voor concentratieverschillen tussen de urinestalen onderling werd geopteerd om alle piekhoogtes, vervat in de *ascii file* exclusief de TSP piek, te delen door deze integraalwaarde.

Vervolgens werd een gemiddeld controle spectrum gecreëerd van de 5 controle spectra door van elke piekhoogte het gemiddelde te berekenen (zie bijlage 2). Dit gemiddeld spectrum werd vervolgens van de 8 spectra van de MS patiënten gemiddeld afgetrokken. Signalen die in intensiteit verschillen tussen MS patiënten en het gemiddeld controle spectrum kunnen op deze wijze visueel eenvoudig gekarakteriseerd worden (zie bijlage 3). Uit deze verschil-spectra werden enkel de pieken geselecteerd waarvan de intensiteit 10x hoger of lager was dan de achtergrondruis. Vervolgens werden enkel signalen geselecteerd die in minimum 3 verschil-spectra verschil vertoonden.

Een volgende stap bestond erin om de piekintensiteiten van de geselecteerde signalen te meten in de oorspronkelijke spectra (TSP op éézelfde hoogte) van de MS patiënten en de gezonde controles. Als laatste stap werden deze piekintensiteiten gecorrigeerd voor concentratieverschillen aan de hand van hoger vermelde integratiewaarden. Voor de 5 controles werd vervolgens het gemiddelde en de standaarddeviatie bepaald. Voor de MS patiënten werden de intensiteiten uitgezet in *plots* die aangeven of de intensiteiten buiten een intensiteitsinterval vallen, bepaald door het gemiddelde $\pm 2x$ de standaarddeviatie van de pieken van de gezonde controles. Eventuele MS merkers zouden op deze wijze aangetoond kunnen worden.

Rat urines

Op de wijze zoals hierboven reeds beschreven werden de twee spectra bekomen van urine voor immunisatie (rat 1 en rat 2) verwerkt tot een gemiddeld controle spectrum. Dit gemiddeld spectrum werd afgetrokken van de spectra bekomen uit urine op top van de ziekte (zie Figuur 12, F). Verschillen in intensiteit tussen gezonde ratten en ratten, op top van de ziekte, kunnen op deze manier eenvoudig gevisualiseerd worden. Enkel signalen die bij beide ratten afwijkend waren ten opzichte van het controlespectrum werden verder behandeld. Een

volgende stap bestond erin om de piekintensiteiten van deze gebieden nader te bepalen in de oorspronkelijke spectra (TSP op éénzelfde verticale waarde en correctie voor concentratieverschillen) voor alle urine afnames (zie figuur 12, A-H). De intensiteiten van de geselecteerde pieken werden uitgezet in grafieken die aangegeven of de intensiteiten buiten het controle-interval (gemiddelde $\pm 2x$ standaarddeviatie) vallen. Deze manier van voorstellen stelt ons in staat om na te gaan welke pieken veranderen in functie van de tijd. Eventuele markers voor het ziekteverloop kunnen op deze manier opgemerkt worden.

4.2 Resultaten

4.2.1 Chemische shift van metabolieten in urine

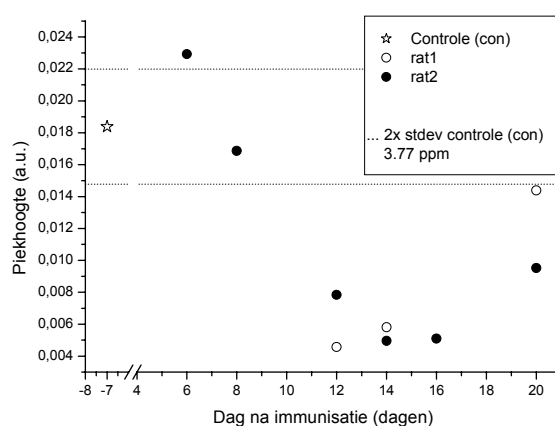
Ofschoon klassieke ^1H NMR opnames van humane urine en urine van ratten (zie bijlage 4) vrij complex van aard zijn, is het toch mogelijk om via reeds bekende chemische *shiften* pieken toe te wijzen aan welbepaalde metabolieten (zie bijlage 5).

4.2.2 Ziektemarkers in urine

Zoals reeds eerder beschreven, werd geopteerd om verschillen in urinaire metabolieten tussen zieke individuen en gezonde controles via twee verschillende invalshoeken op te sporen. Een eerste manier bestond erin om de signalen afkomstig van de markers NAA, glutamine, glutamaat, choline, inositol en neopterine altijd op te nemen in de datamatrix. Een tweede manier bestond erin om actief op zoek te gaan naar verhoogde of verlaagde metabolietsignalen.

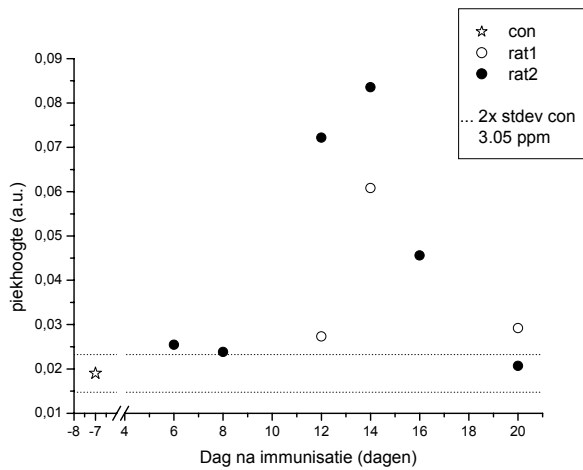
4.2.2.1 Merkers in urine van ratten

Voor **glutamaat/glutamine** (glt/gln) werden in functie van het ziekteverloop verlaagde piekintensiteiten gevonden op posities 2,39 ppm en 3,77 ppm (zie figuur 13). De daling bereikt voor rat 2 een minimum op dag 14, waar het dier volop klinische symptomen van EAE vertoonden (zie figuur 12), om dan nadien terug te stijgen, ongeveer gelijklopend met het herstel van het dier. Het glutamaat signaal op positie 2,05 ppm, dat samenvalt met een NAA signaal, vertoonde tevens een dalende trend in functie van het ziekteverloop (figuur niet weergegeven).

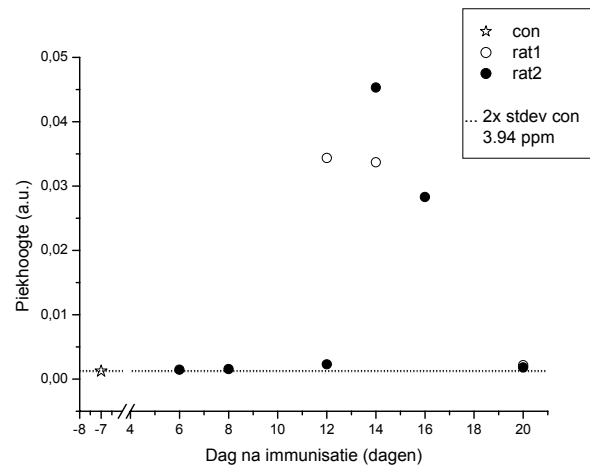


Figuur 13. Glutamaat/glutamine op 3,77 ppm.

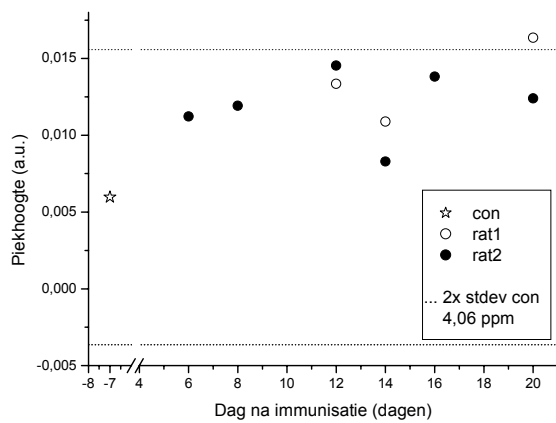
De **creatine/creatinine** (cr/cn) piek op 3,05 ppm kent na immunisatie initieel een stijgend en nadien een dalend verloop met een top op dag 14. De stijging van deze piek, op top van de ziekte, kan verklaard worden door een verhoogde hoeveelheid creatine in de urine van ratten, aangezien de creatinepiek op 3,94 ppm een gelijkend patroon vertoont en de creatininepiek op 4,06 ppm vrij stabiel blijft binnen de grenzen van de controle waarden (zie figuur 14).



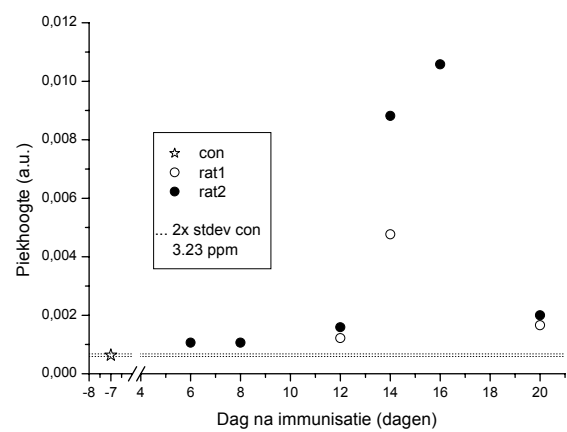
A



B



C



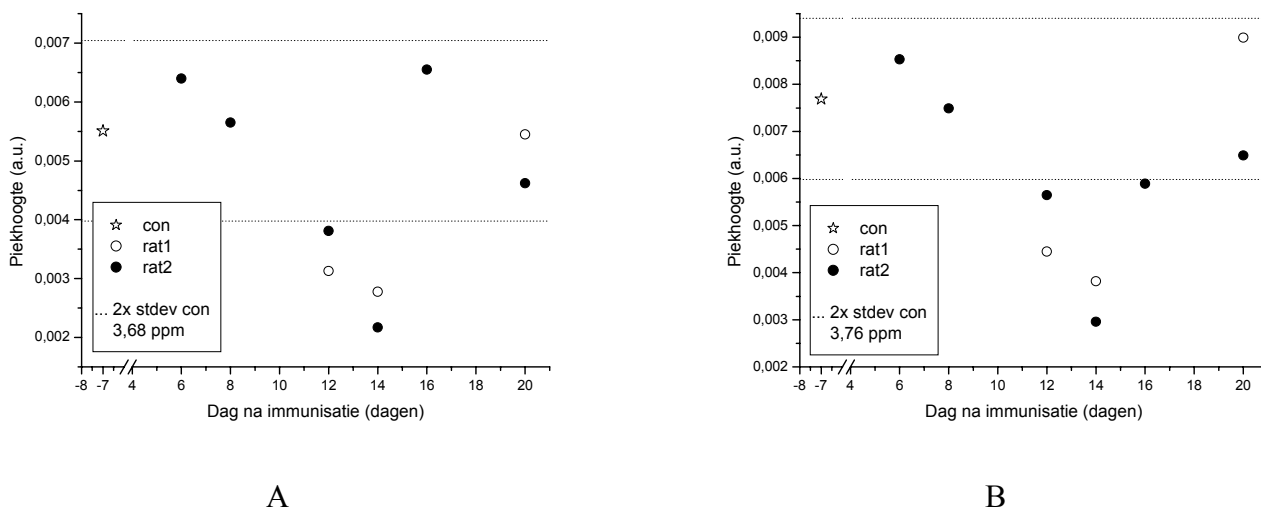
D

Figuur 14. Piek creatine/creatinine op 3,05 ppm (A), piek creatine + choline op 3,94 ppm (B), piek creatinine op 4,06 ppm (C) en piek choline op 3,23 ppm (D).

De intensiteit van de creatinepiek op 3,94 ppm blijkt echter sterker gestegen te zijn ten opzichte van de controle dan de creatinepiek op 3,05 ppm. Dit kan verklaard worden door een stijging van **choline** dat eveneens op 3,94 ppm een signaal heeft. De piek van choline op 3,23 ppm is tevens verhoogd en vertoont een sterk gelijk patroon met een maximum voor rat 2 op dag 16 na immunisatie wanneer klinische symptomen van EAE duidelijk zichtbaar zijn (zie figuur 14).

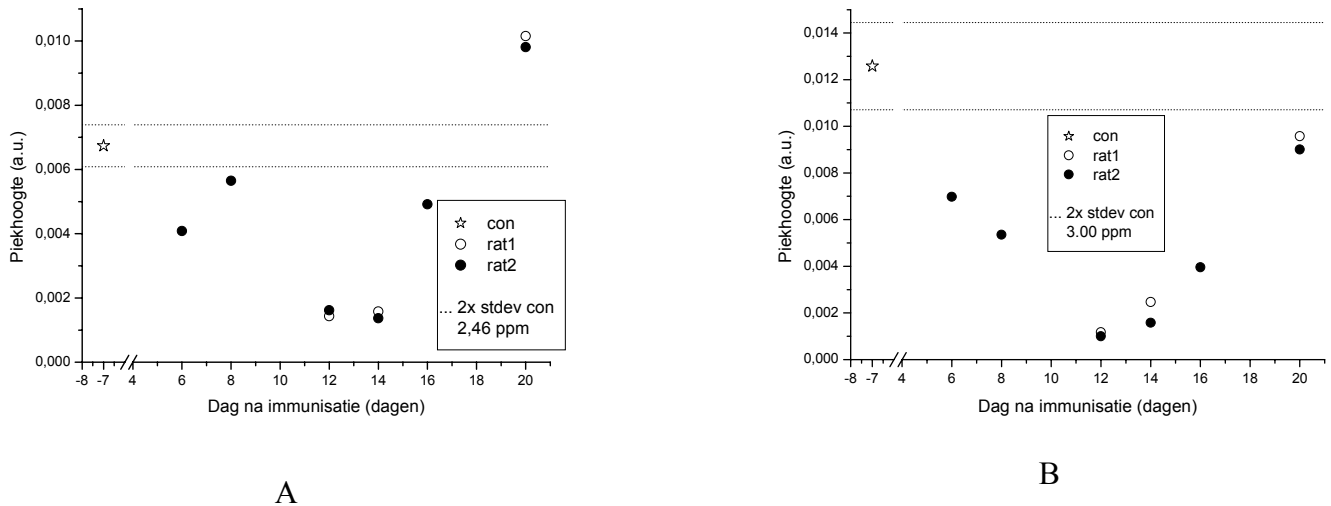
4.2.2.2 Geselecteerde pieken op basis van verschilspectra ratten

De pieken van **phenylacetylglycine** op positie 3,68 ppm en 3,76 ppm vertonen beide hetzelfde dalende patroon met de laagste intensiteiten op dag 12 en 14 na immunisatie (zie figuur 15).



Figuur 15. Phenylacetylglycine op 3,68 ppm (A) en 3,76 ppm (B).

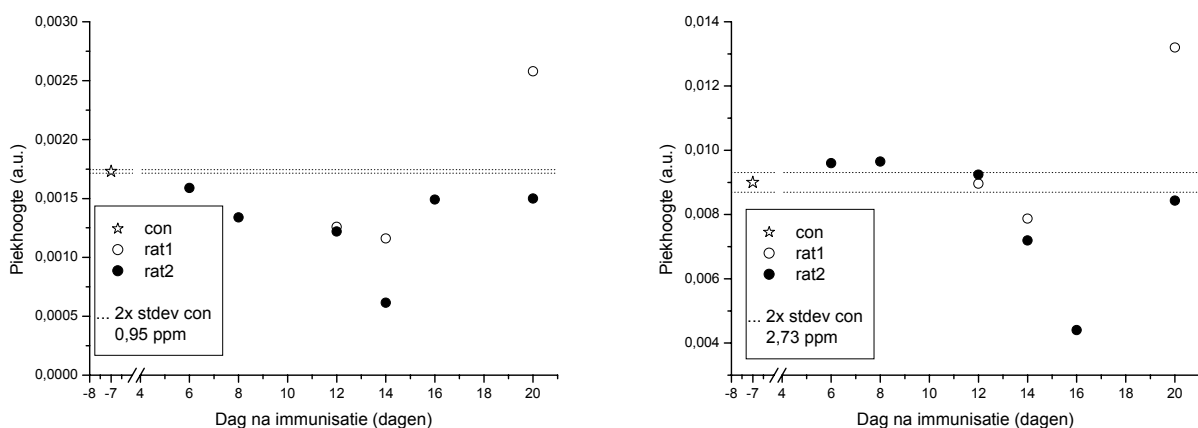
De twee tripletten van **α -ketoglutaraat** op posities 2,46 ppm en 3,00 ppm vertonen een dalende trend met de laagste intensiteiten tussen 12 en 14 dagen na immunisatie (zie figuur 16). Op dag 20, wanneer de ratten klinisch hersteld lijken, vallen de piekintensiteiten nog steeds buiten het normale concentratie interval.



Figuur 16. α -ketoglutaraat op 2,46 ppm (A) en 3,00 ppm (B).

Het doublet op 0,95 ppm, dat toe te schrijven kan zijn aan zowel **leucine** als **valine**, vertoont een dalend patroon met de meest uitgesproken daling wanneer beide ratten volop symptomen van EAE vertonen. Wanneer beide ratten dan weer herstellen, keert de intensiteit van dit doublet weer naar quasi de normale waarden (zie figuur 17a).

Dimethylamine op 2,73 ppm vertoont een gelijkaardig patroon waarbij beide ratten een minimum vertonen op het tijdstip dat ze symptomen van EAE vertonen (zie figuur 17b).

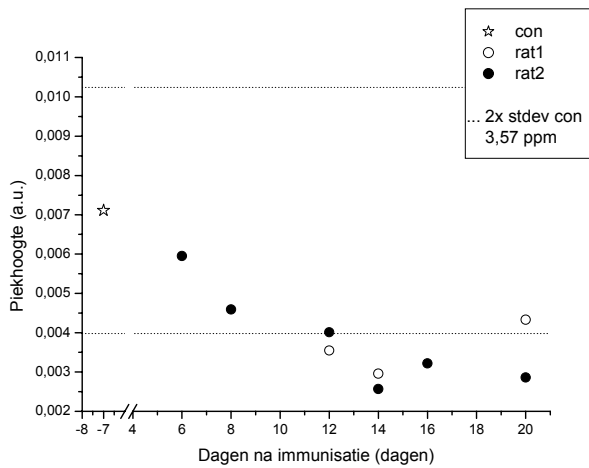


Figuur 17a. Doublet van valine en/of leucine op 0,95 ppm.

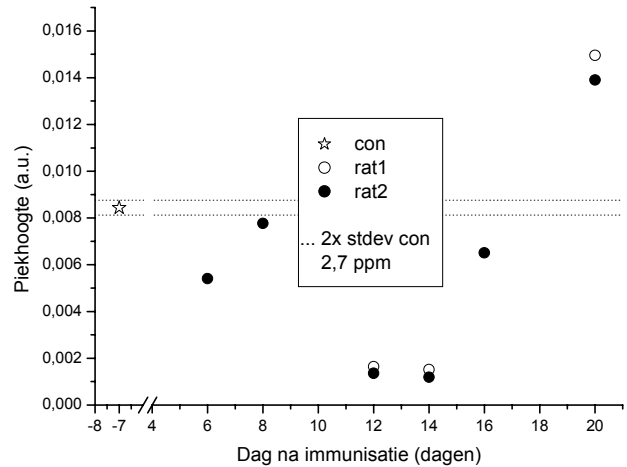
Figuur 17b. Dimethylamine op 2,73 ppm.

Ook het singulet op 3,57 ppm van **glycine** lijkt te dalen na immunisatie (zie figuur 18a).

Een duidelijke tendens valt ook te bespeuren voor de pieken van **citraat**, waarvan deze op 2,7 ppm weergegeven is in figuur 18b. Hier vertonen beide ratten ook een maximale daling van citraat op het tijdstip dat ze maximaal ziek zijn. Na herstel keren de intensiteiten terug naar waarden die zelfs lichtjes hoger liggen dan voor de controle.



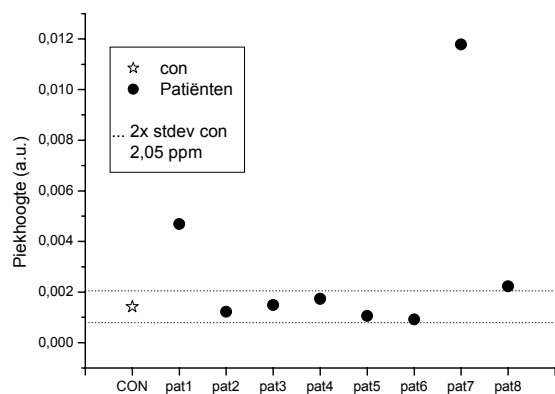
Figuur 18a. Glycine op 3,57 ppm.



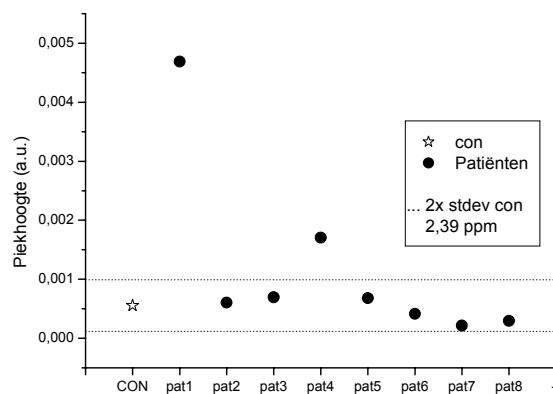
Figuur 18b. Citraat op 2,7 ppm.

4.2.2.3 Merkers in humane urine

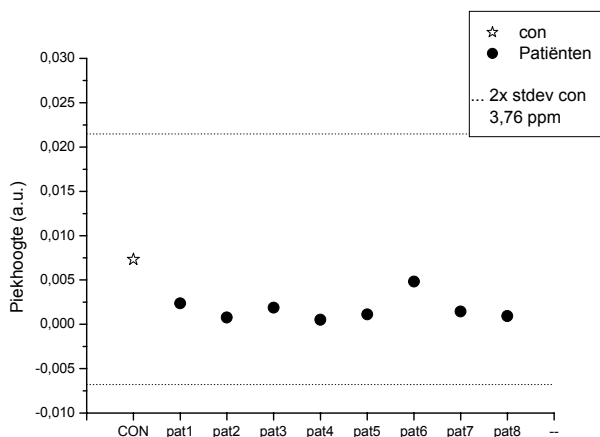
Op enkele uitzonderingen na vertonen de pieken voor **glutamaat** op 2,05 ppm en **glutamine** op 2,39 ppm geen merkbare verandering in vergelijking met de controles. Dit wordt nogmaals bevestigd door de glutamaat/glutamine piek op 3,76 ppm (zie figuur 19).



A



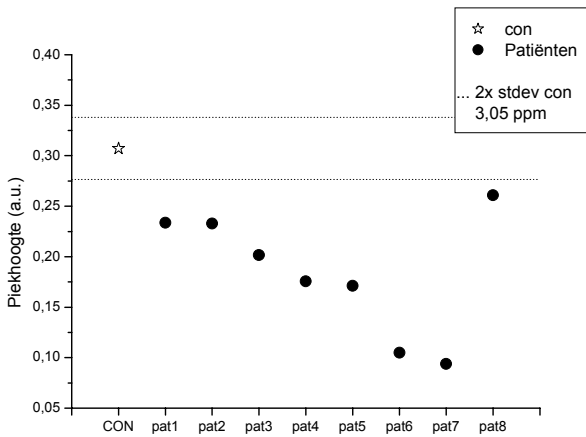
B



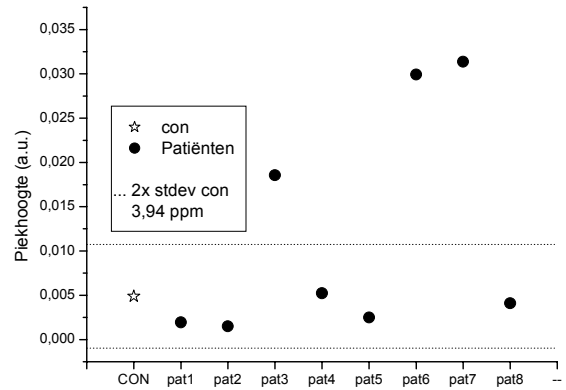
C

Figuur 19. Glutamaat op 2,05 ppm (A), glutamine op 2,39 ppm (B) en glutamaat/glutamine op 3,76 ppm (C).

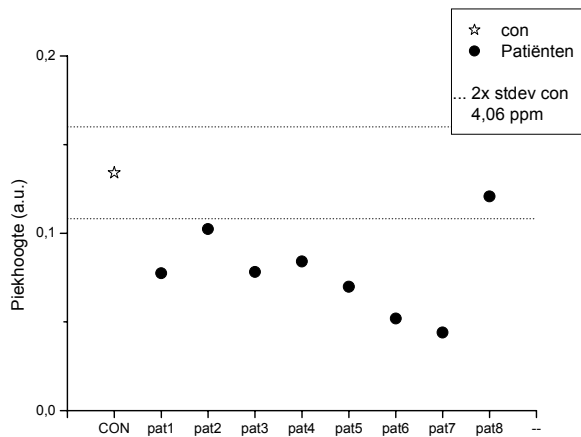
De **creatine/creatinine** piek op 3,05 ppm blijkt bij MS patiënten systematisch verlaagd te zijn ten opzichte van de controle. De daling in intensiteit van deze piek valt te verklaren door een verlaagde hoeveelheid creatinine in urine van MS patiënten, aangezien de creatininepiek op 4,06 ppm hetzelfde gedrag vertoont (zie figuur 20). De hoeveelheid creatine blijkt bij enkel bij 3 patiënten verhoogd te zijn daar de intensiteit van de creatine piek op 3,94 voor deze patiënten hoger lag dan bij de controle (zie figuur 20).



A



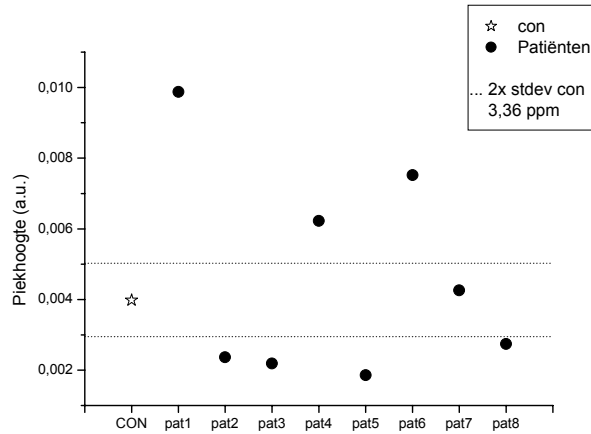
B



C

Figuur 20. Creatine/creatinine op 3,05 ppm (A), creatine op 3,94 ppm (B) en creatinine op 4,06 ppm (C).

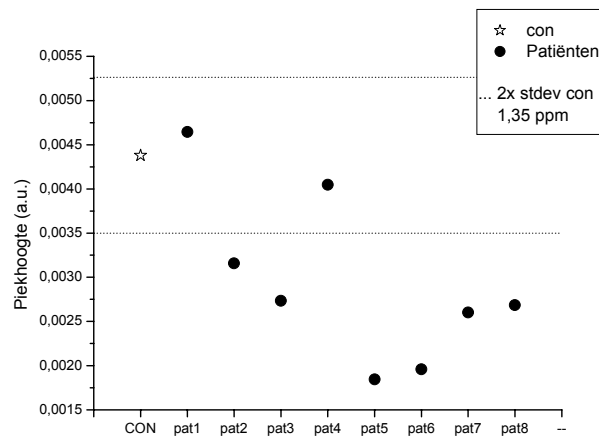
De piek op 3,36 ppm, toe te schrijven aan **inositol**, is bij de MS patiënten duidelijk afwijkend van deze van gezonde personen. Een duidelijk verhoogde of verlaagde trend valt echter niet te bespeuren (zie figuur 21).



Figuur 21. Inositol op 3,36 ppm.

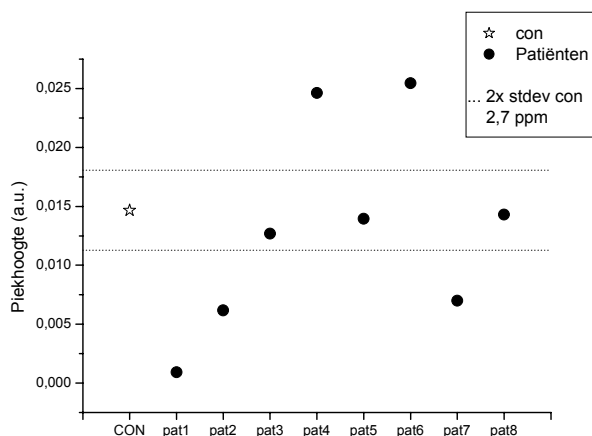
4.2.2.4 Geselecteerde pieken op basis van humane verschillspectra

Een piek op 1,35 ppm, waarvan de herkomst voorlopig nog onbekend is, toont voor het merendeel zeer duidelijk verlaagde waarden in vergelijking met de controles (zie figuur 22).



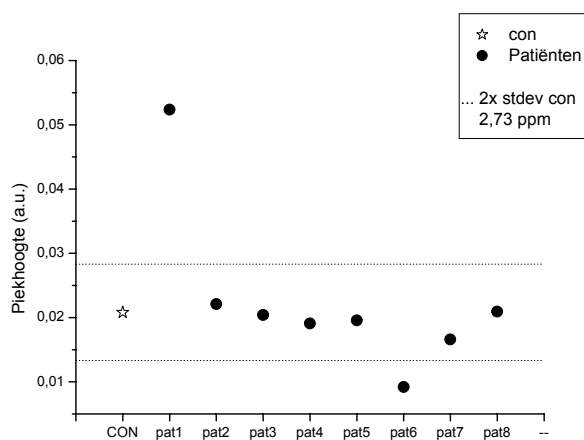
Figuur 22. Onbekende piek op 1,35 ppm.

De **citraat**piek op 2,7 ppm vertoont bij de MS-patiënten, in vergelijking met de controlestalen, een duidelijke verandering. Een duidelijke verhoogde of verlaagde trend valt echter niet te bespeuren (zie figuur 23).



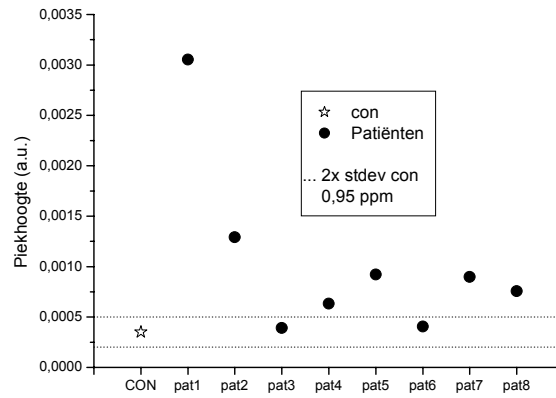
Figuur 23. Citraat op 2,7 ppm.

De piek van **dimethylamine** op 2,73 ppm blijft met uitzondering van patiënt 1 binnen het normale controle-interval (zie figuur 24).



Figuur 24. Dimethylamine op 2,73 ppm.

Het doublet op 0,95 ppm dat toe te schrijven kan zijn aan zowel **leucine** als **valine** blijkt in vergelijking met gezonde personen dikwijls verhoogd te zijn bij de MS patiënten (zie figuur 25).



Figuur 25. Leucine en valine op 0,95 ppm.

4.3 Discussie en toekomstperspectieven

Zoals reeds eerder in dit werk beschreven, is urine een interessante bron voor het opsporen van ziektemerkers. Met behulp van kwantitatieve $^1\text{H-NMR}$ spectroscopie is het mogelijk om concentraties van metabolieten in vloeistoffen te bepalen. Deze techniek is dus uiterst geschikt voor het opsporen van deze ziektemerkers in urine. Waar in dit onderzoek gebleken is dat bepaalde componenten weinig variëren zijn er toch metabolieten gevonden die wel blijken te verschillen tussen gezonde en zieke individuen. In dit werk werden enkele metabolieten beschreven die in functie van het ziekteverloop in EAE ratten veranderingen ondergaan. In dit rattenmodel is het mogelijk om variatie betreffende geslacht, ouderdom, voeding, levensstijl, medicatie, tijd van staalname,... beperkt te houden. Standardisatie van deze variabelen is belangrijk wanneer eventuele merkers geëvalueerd worden. Niet tegenstaande bij deze dieren de meeste metabolietconcentraties terugkeren naar een normale waarde bij klinisch herstel (dag 20), zijn er toch enkele metabolieten waarvoor dit, op basis van deze preliminaire gegevens, niet lijkt op te gaan. In deze verkennende studie blijken er duidelijk verschillen in metabolietconcentraties te bestaan tussen urinestalen van gezonde personen en zieke individuen. Deze verschillen bieden opportuniteiten als diagnosemerkers en kunnen mogelijk ook bijdragen aan het ontrafelen van het ziektemechanisme bij MS. Het bevestigen van deze potentiële merkers aan de hand van een grotere datamatrix lijkt daarom zeker opportuun.

Zoals in het begin van dit werk reeds aangehaald werd, staat het gebruik van de creatine/creatinine piek op 3,05 ppm als interne referentie ter discussie. Door toevoeging van de interne standaard (TSP) is het mogelijk om het gebruik van deze creatine/creatinine piek als interne referentie kritisch te evalueren. Uit figuur 20A blijkt duidelijk dat de intensiteit van deze piek bij MS patiënten tot drie keer lager kan liggen in vergelijking met gezonde personen. Het gebruik van deze piek als referentie dient dus met de nodige omzichtigheid te gebeuren. In dit werk werd een procedure op punt gesteld die toelaat om zonder gebruik te maken van de creatine/creatinine piek op 3,05 ppm systematisch metabolieten in urinestalen van EAE ratten en MS patiënten te bestuderen.

In de huidige dataset werden duidelijke verschillen gevonden voor glutamaat en glutamine (daling) in urine van ratten en inositol (variabel) in humane urine ten opzichte van de

controle. Voor NAA en neopterine werd, ten opzichte van de controles, noch voor humaan en noch voor ratten een merkbaar verschil gevonden in de urine.

Voor alle MS patiënten werd een beduidende daling van de concentratie aan creatinine waargenomen. Dit is in tegenstelling met de hoeveelheid creatine, die met uitzondering van 3 MS patiënten waarvoor een sterke verhoging waargenomen werd, een normale waarde vertoont (zie figuur 20).

Op het toppunt van de ziekte vertoonde urine van EAE ratten in vergelijking met de controle een verhoogde hoeveelheid creatine. Niet tegenstaande de waarden van creatinine binnen het controle-interval vallen, lijkt toch een verhoging ten opzichte van de controles aanwezig te zijn. Dit zou geverifieerd moeten worden door het gebruik van een grotere populatie controles (zie figuur 14).

Het blijft echter de vraag of creatine en creatinine geschikt zouden zijn als secundaire merkers voor de vroegtijdige diagnose van MS. Creatine wordt in de lever gesynthetiseerd en via de bloedbaan naar de spieren getransporteerd. Hier speelt gefosforyleerde creatine een cruciale rol in de energiehuishouding. Fosfocreatine wordt immers omgezet naar creatine waarbij de vrijgekomen fosfaatgroep gedoneerd wordt aan ADP zodat er bij een intense inspanning initieel voldoende ATP beschikbaar is. In de spieren wordt de fosfocreatine niet enzymatisch omgezet in creatinine en aan een constante *rate* vrijgezet in de bloedbaan. Hierdoor wordt creatinine gezien als een maat voor spiermassa. Creatinine wordt door de nieren geëxcreteerd via de urine. Hierdoor varieert de urinaire creatinine tussen personen met een verschillende spiermassa. Mannen excreteren bijvoorbeeld meer creatinine dan vrouwen [28]. Gezien de link van creatinine met de hoeveelheid spiermassa en het relatief eenvoudig kunnen kwantificeren ervan in urine met behulp van ^1H NMR, kan deze methode eventueel aangewend worden bij het evalueren van fysiotherapie. Een reeds eerder aangehaald voordeel van deze techniek is dat urine zeer eenvoudig te verkrijgen is.

In dit werk zijn er sterke aanwijzingen voor een verhoogde hoeveelheid choline in urine van EAE ratten (zie figuur 14D) . Eerder werd reeds een verhoogde hoeveelheid hiervan gevonden in urine van EAE apen [17]. Van choline is geweten dat het een functie heeft bij het behoud van de membraanintegriteit. In klinisch gelocaliseerde *in vivo* spectroscopie van de hersenen wordt een verhoogde hoeveelheid choline beschouwd als een merker voor verhoogde membraanombouw ten gevolge van demyelinisatie, remyelinisatie en ontsteking

[10, 29]. Aldus is het misschien mogelijk om via urinaire cholinebepaling inflammatie in de hersenen na te gaan.

Ook werden in dit werk argumenten aangehaald voor een verhoogde hoeveelheid valine en/of leucine in urine van MS patiënten (zie figuur 25). In de literatuur was hiervan reeds een stijging beschreven in urine van ratten met een inflammatoire aandoening [7].

Specifiek voor de urine van EAE ratten wordt op de top van de ziekte een verlaging van Phenylacetylglycine, α -ketoglutaraat, dimethylamine en citraat vastgesteld. Specifiek voor humane urine werd een verlaging vastgesteld voor een tot nog toe onbekend signaal op 1,35 ppm.

5. Conclusie

In dit werk werd in het kader van MS een methode geoptimaliseerd voor $^1\text{H-NMR}$ spectroscopisch onderzoek van urine en aangewend om via systematische data-analyse, ziektemerkers te identificeren. Deze kunnen potentieel bijdragen aan het vroegtijdig opsporen van MS of helpen bij de ontrafeling van de MS pathologie. In deze studie werd gebruik gemaakt van het acuut EAE ratmodel en werden tevens urines van MS patiënten vergeleken met deze van gezonde controles. Er werd voor meerdere metabolieten een duidelijk verschil gevonden tussen zieke en gezonde individuen (creatine, creatinine,...). Via het gebruik van een grotere datamatrix dienen deze verschillen bevestigd te worden zodat dan later met behulp van de biochemische achtergrond van deze componenten het mechanisme van MS eventueel ontrafeld kan worden. Metabolieten die gekoppeld zijn aan de ziekte-toestand van de MS patiënt (*relapsing/remitting*) kunnen opgespoord worden door van patiënten meerdere stalen in functie van de tijd af te nemen.

Referenties

1. Isselbacher K, Braunwald E., Wilson J, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL. Multiple Sclerosis and other demyelinating diseases: IN: Harrison's Principles of internal medicine. New York: Mc Graw Hill. 1994: p. 2287-2294.
2. Sospedra M, Muraro R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*, 2005. 23: p. 683-747.
3. Neuhaus O, Stuve O, Archelos JJ, Hartung HP. Putative mechanisms of action of statins in multiple sclerosis--comparison to interferon-beta and glatiramer acetate. *J Neurol Sci*, 2005 233(1-2): p. 173-7.
4. Swanborg RH. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T-cell immunology and autoreactivity. *Immunol Rev*, 2001 184: p. 129-35.
5. Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Morgan SR, Nash AF, A 1H NMR-based metabonomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects. *J Pharm Biomed Anal*, 2003. 33(5): p. 1103-15.
6. Lindon JC, Nicholson J, Holmes E, Everett JR, *Metabonomics: Metabolic Processes Studied by NMR Spectroscopy of Biofluids. Concepts in Magnetic Resonance*. 2000. 12(5): p. 289-320.
7. Griffin JL, Anthony D, Campbell SJ, Gauldie J, Pitossi F, Styles P, Sibson NR, Study of cytokine induced neuropathology by high resolution proton NMR spectroscopy of rat urine. *FEBS Lett*, 2004. 568(1-3): p. 49-54.
8. Barker PB. Fundamentals of clinical MRS: IN: *Weekend Educational Courses: MR spectroscopy*. Honolulu: International Society for Magnetic Resonance in Medicine. 2002. p. 168-170.
9. Sarchielli P, Presciutti O., Pelliccioli GP, Tarducci R, Gobbi G, Chiarini P, Alberti A, Vicinanza F, Gallai V. Absolute quantification of brain metabolites by proton magnetic resonance spectroscopy in normal-appearing white matter of multiple sclerosis patients. *Brain*, 1999. 122 (Pt 3): p. 513-21.
10. De Stefano N, Bartolozzi M, Guidi L, Stromillo ML, Federico A, Magnetic resonance spectroscopy as a measure of brain damage in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 2005. 233(1-2): p. 203-8.

11. Teunissen CE, D.C., Polman C, Biological markers in CSF and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 2005. 4(1): p. 32-41.
12. De Stefano N, M.P., Fu L, Narayanan S, Stanley J, Francis GS, Antel JP, Arnold DL, Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. *Brain*, 1998. 121 (Pt 8): p. 1469-77.
13. van der Maazen RW, V.I., Kleiboer BJ, van der Kogel AJ, Repopulation of O-2A progenitor cells after irradiation of the adult rat optic nerve analyzed by an in vitro clonogenic assay. *Radiat Res*, 1992. 132(1): p. 82-6.
14. Bjartmar C, K.G., Mork S, Rudick R, Trapp BD, Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*, 2000. 48(6): p. 893-901.
15. Srinivasan R, S.N., Hurd R, Nelson S, Pelletier D. , Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T. *Brain*, 2005. 128(Pt 5): p. 1016-25.
16. TL, R., Proton MR spectroscopy in multiple sclerosis: value in establishing diagnosis, monitoring progression, and evaluating therapy. *AJR Am J Roentgenol*, 1991. 157(5): p. 1073-8.
17. 't Hart BA, V.J., Spijksma G, Brok HP, Polman C, van der Greef J, 1H-NMR spectroscopy combined with pattern recognition analysis reveals characteristic chemical patterns in urines of MS patients and non-human primates with MS-like disease. *J Neurol Sci*, 2003. 212(1-2): p. 21-30.
18. Simone IL, T.C., Federico F, Liguori M, Lucivero V, Giannini P, Carrara D, Bellacosa A, Livrea P, Axonal damage in multiple sclerosis plaques: a combined magnetic resonance imaging and 1H-magnetic resonance spectroscopy study. *J Neurol Sci*, 2001. 182(2): p. 143-50.
19. Ramin SL, T.W., Spotti AR, Proton magnetic resonance spectroscopy: clinical applications in patients with brain lesions. *Sao Paulo Med J*, 2003. 121(6): p. 254-9.
20. PF, F., Phenomenology and Experimental considerations: IN: NMR relaxation. 2002.
21. TW, F., Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Prog. NMR spectrosc*, 1996. 28(2): p. 161-219.
22. Lindon JC, N.J., Holmes E, Antti H, Bollard ME, Keun H, Beckonert O, Ebbels TM, Reily MD, Robertson D, Stevens GJ, Luke P, Breau AP, Cantor GH, Bible RH, Niederhauser U, Senn H, Schlotterbeck G, Sidelmann UG, Laursen SM, Tymiak A,

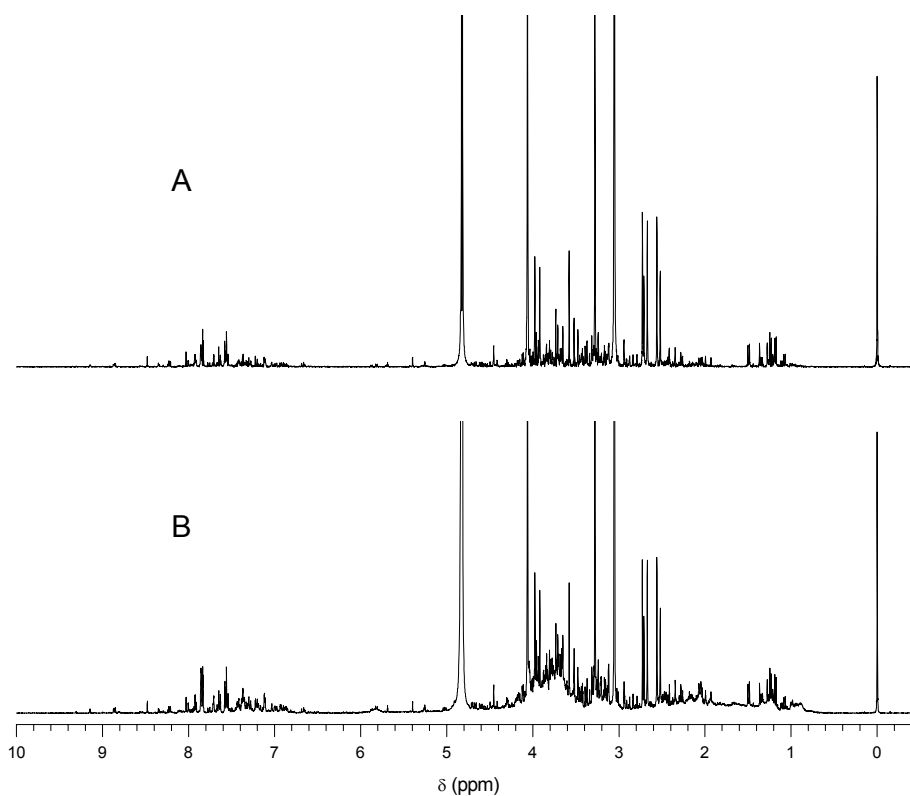
- Car BD, Lehman-McKeeman L, Colet JM, Loukaci A, Thomas C, Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003. 187(3): p. 137-46.
23. Dorhout Mees EJ, R.J., Boer P, Oei HY, Simatupang TA, Observations on edema formation in the nephrotic syndrome in adults with minimal lesions. *Am J Med*, 1979. 67: p. 378-384.
 24. http://www.vysis.com/UrineSampleProcessing_30548.asp
 25. Boldt J, S.S., Plasma substitutes *Minerva Anestesiol*. *Minerva Anestesiol*, 2005. 71(12): p. 741-58.
 26. Vandembark AA, G.T., Offner H., A myelin basic protein-specific T lymphocyte line that mediates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 1985. 135(1): p. 223-8.
 27. Ben-Nun A, W.H., Cohen IR, The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol*, 1981. 11(3): p. 195-9.
 28. Stead LM, B.J., Brosnan ME, Vance DE, Jacobs RL, Is it time to reevaluate methyl balance in humans? *Am J Clin Nutr*, 2006. 83(1): p. 5-10.
 29. PA., N., Magnetic resonance spectroscopy in the monitoring of multiple sclerosis. *J Neuroimaging*, 2005. 15(4 Suppl): p. 46S-57S.
 30. Neild GH, F.P., Lindon JC, Holmes EC, Nicholson JK., Uroscopy in the 21st century: high-field NMR spectroscopy. *Nephrol Dial Transplant*, 1997. 12(3): p. 404-17.
 31. Wang Y, H.E., Nicholson JK, Cloarec O, Chollet J, Tanner M, Singer BH, Utzinger J., Metabonomic investigations in mice infected with *Schistosoma mansoni*: an approach for biomarker identification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(34): p. 12676-81.
 32. Engelke UF, L.-v.S.M., de Jong JG, Leroy JG, Morava E, Smeitink JA, Wevers RA, N-acetylated metabolites in urine: proton nuclear magnetic resonance spectroscopic study on patients with inborn errors of metabolism. *Clin Chem*, 2004. 50(1): p. 58-66.
 33. Garrod S, H.E., Connor SC, Connelly JC, Spraul M, Nicholson JK, Holmes E, High-resolution (1)H NMR and magic angle spinning NMR spectroscopic investigation of the biochemical effects of 2-bromoethanamine in intact renal and hepatic tissue. *Magn Reson Med*, 2001. 45(5): p. 781-90.
 34. Feng J, L.X., Pei F, Chen X, Li S, Nie Y., 1H NMR analysis for metabolites in serum and urine from rats administrated chronically with La(NO₃)₃. *Anal Biochem*, 2002. 301(1): p. 1-7.

35. Bales JR, H.D., Howe I, Nicholson JK, Sadler PJ, Use of high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine. Clin Chem, 1984. 30(3): p. 426-32.

Bijlage

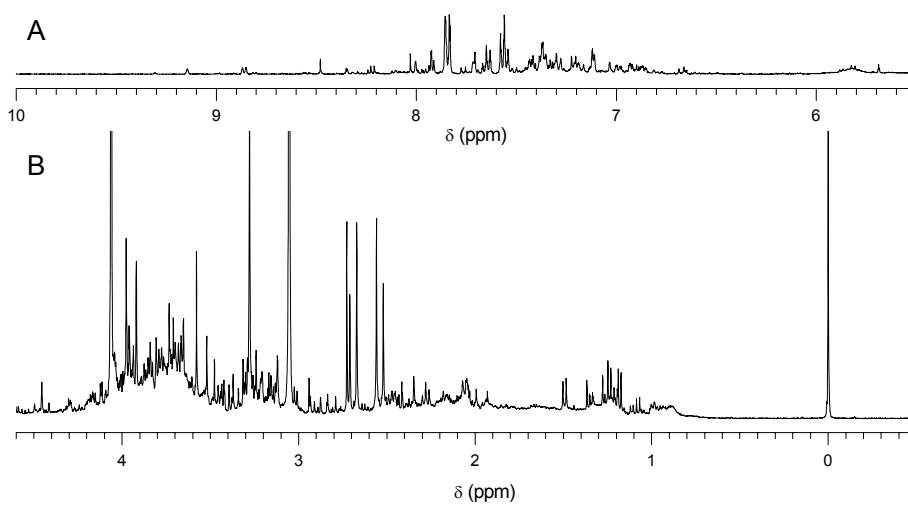
Bijlage 1. Eliminatie breed achtergrondsignaal.

Een bereid urinestaal werd na oplossen in D₂O ¹H-NMR spectroscopisch geanalyseerd met een *2D J-resolved* ¹H NMR pulssequentie (A) en een klassieke opname (B).



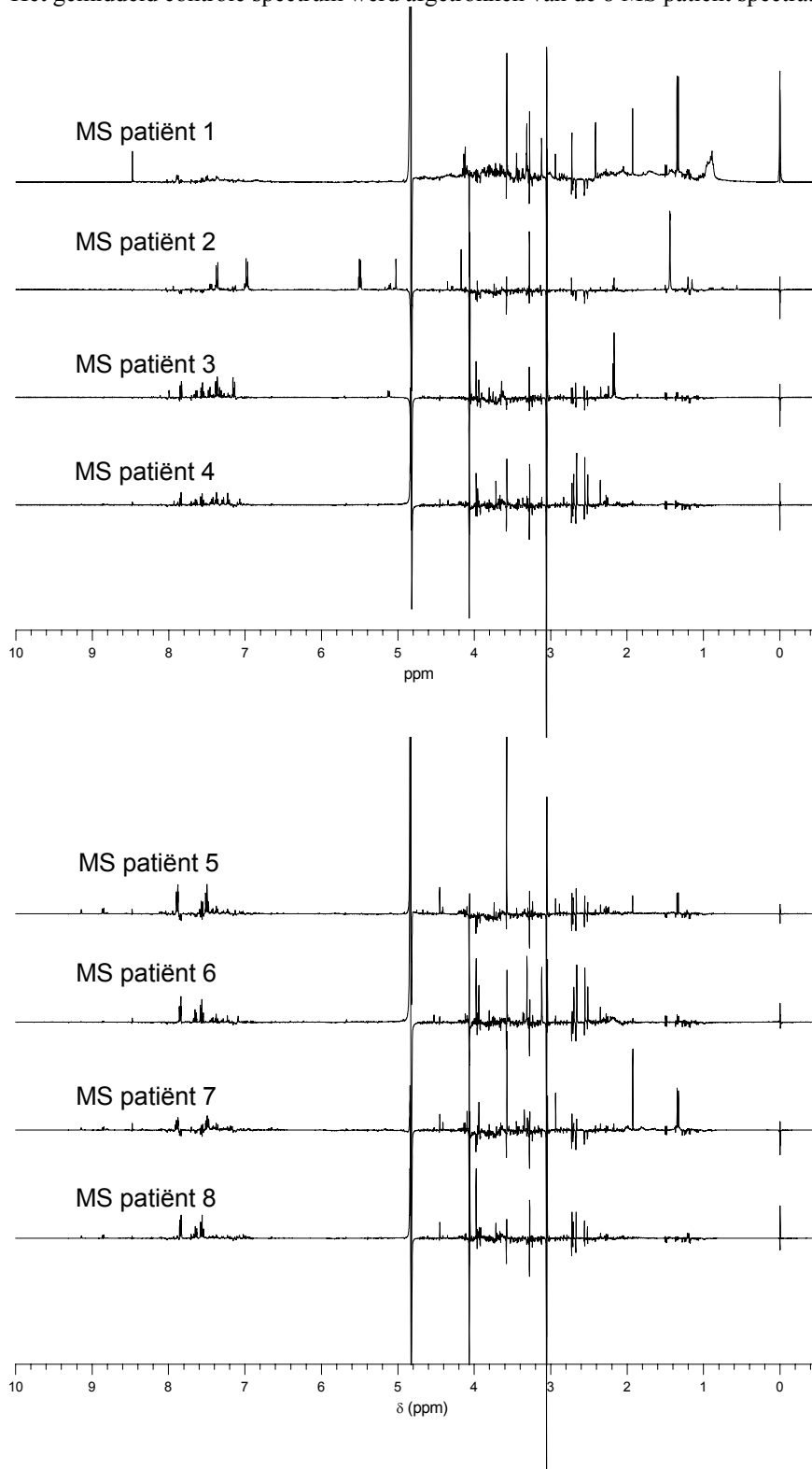
Bijlage 2. Humaan gemiddeld controle spectrum.

De gezonde controle spectra werden verwerkt tot een gemiddeld controle spectrum. A: aromatische regio, B: alifatische regio.



Bijlage 3. Verschil spectra MS-controle.

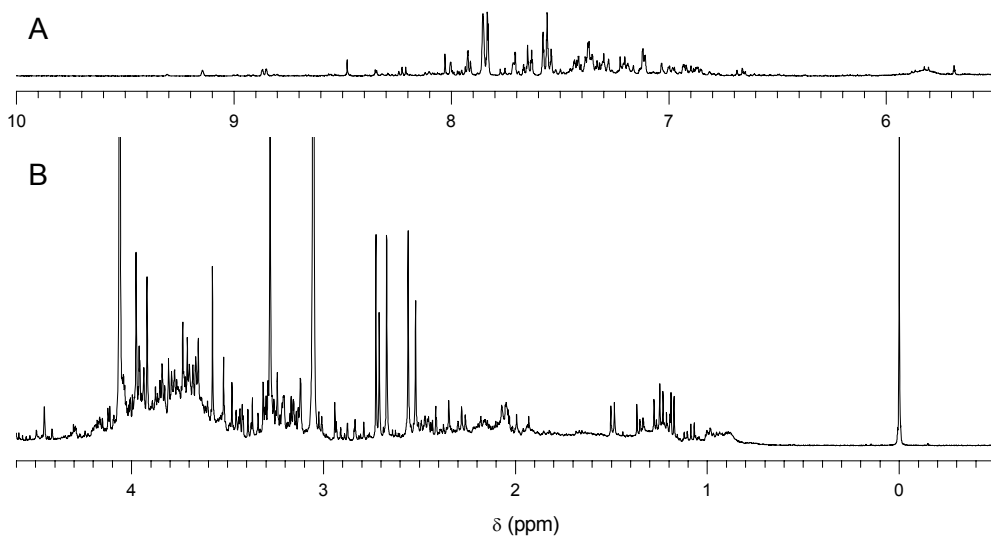
Het gemiddeld controle spectrum werd afgetrokken van de 8 MS patiënt spectra.



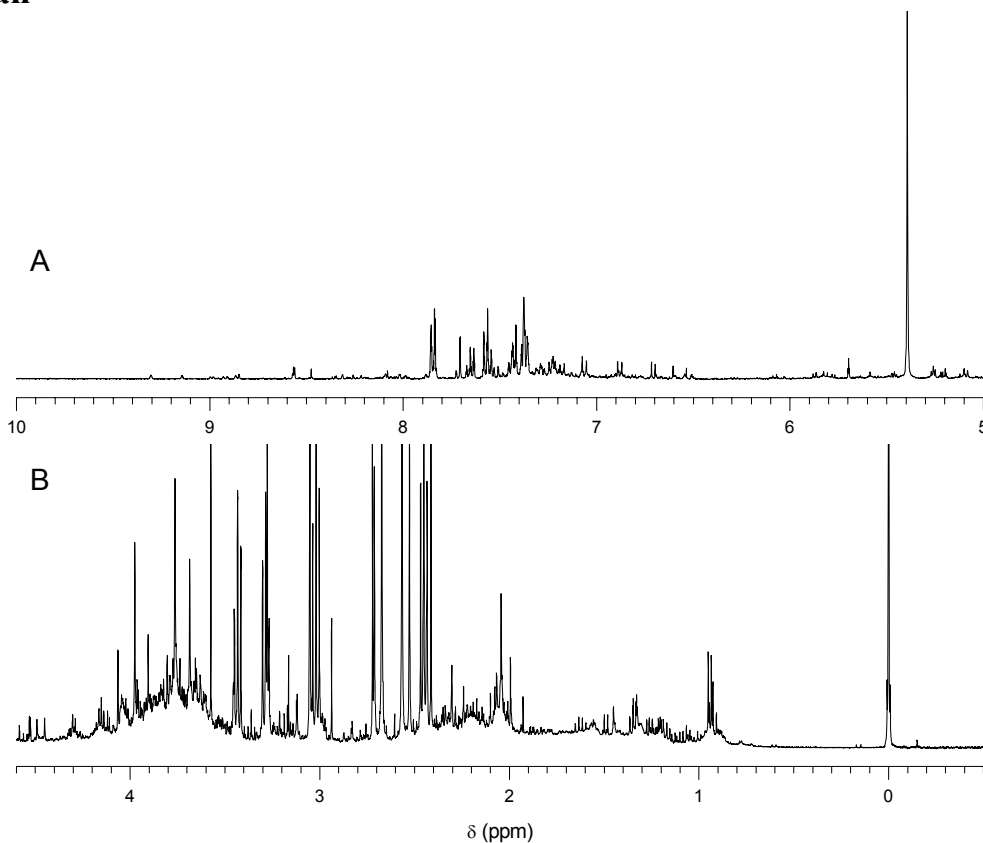
Bijlage 4. ^1H NMR spectrum van urine.

Bereide urine werd na lyofiliseren heropgelost in D_2O met de interne standaard TSP (0 ppm) en geanalyseerd door middel van een 400MHz klassieke ^1H NMR opname.

A: aromatische regio B: alifatische regio



humaan



rat

Bijlage 5. Tabel chemische shiften.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	urine rat	urine muis (pH 7,4)	urine humaan	extracten (pH 7,4)	urine humaan (pH 2,5)	extracten ratten nier	urine rat	urine primate + humaan (pH +/- 7,4)	urine humaan (pH 5,6)	extracten hersenen
α-glucose				5,24 (d)		5,23 (d)				
						3,92 (m)				
				3,86						
				3,79		3,81 (m)				
				3,73						
				3,54		3,55 (t)				
α-ketoglutaat				3,44						
				3,42		3,42 (m)				
				3 (t)			3,02 (t)		3,02 (t)	
				2,44 (t)			2,46 (t)		2,46 (t)	
acetaat		1,92		1,92 (s)		1,92 (s)				
	1,2 (s)									
acetoacetaat				2,61 (s)						
									2,34	
alanine				3,77 (q)		3,77(q)				
		1,48	1,47	1,47 (d)		1,47 (d)	1,48 (d)		1,48 (d)	
	1,525 (d)									
allantoïne aspartaat							5,39 (s)			
				4,39 (dd)						
						3,89 (dd)				
				3,14 (dd)						
								2,95		
						2,8 (dd)				
β-alanine						2,69 (dd)				
		3,32						2,05		
				3,18 (t)						
				2,56 (t)						
β-glucose		2,32								
				4,64 (d)						
						4,61 (d)				
						3,92 (m)				
				3,86						
				3,49						
				3,47 (dd)		3,47 (dd)				
betaine				3,4 (dd)		3,41 (dd)				
				3,26 (t)		3,27 (t)				
						3,89 (s)				
						3,26 (s)				
butyraat		1,56								
		0,88								

indoxyyl sulfaat								7,69 (d)	
								7,49 (d)	
								7,35 (s)	
								7,29 (dd)	
								7,19 (dd)	
isoleucine								3,65 (m)	
								1,96 (m)	
								0,99 (d)	
								0,91 (t)	
lactaat			4,11 (q)		4,13 (q)	4,12 (q)			
	1,35 (d)	1,35			1,33 (d)			1,34 (d)	
leucine			1,32 (d)						1,3
			3,69 (t)		3,7 (t)				
			1,72 (m)						
			1,69 (m)		1,7 (m)				
					1,66 (m)				
lysine			0,96 (d)		0,96 (d)				
			0,94 (d)		0,94 (d)				
			3,74 (t)		3,75 (t)				
			3,01 (t)		3,02 (t)				
	1,975		1,89 (m)		1,9 (m)				
	1,75		1,69 (m)		1,7 (m)				
			1,45 (m)		1,47 (m)				
malonaat	3,16								
<i>myo</i> -inositol								4,1	
			4,07 (t)		4,06 (t)				
			3,61 (t)		3,62 (t)			3,6	
			3,54 (dd)		3,53 (dd)				
								3,36	
			3,29 (t)		3,28 (t)			3,28	
N-acetyl aspartaat								3,25	
			4,38 (dd)						
			2,67 (dd)						
			2,48 (dd)					2,51	
neopterine			2,01 (s)	2,03 (m)				2,05	2
								5,2	
								4,7	
								4,6	
								4,44	
2 oxoglutaraat								4,34	
	3,1 (t)	3							
	2,5 (t)								
2 oxoisocaproaat		2,46							
		2,64							
2 oxoisovaleraat		0,92							
		1,12							
P-Cresol glucuronide		7,08							
		7,04							
		3,88							
		3,84							
phenylacetyl glycine		7,36							
		3,76							
		3,68							

phenylalanine			7,4 (m)		7,4 (m)	7,42 (m)			
		7,35				7,35 (m)			
			7,31 (m)		7,32 (m)				
			3,98 (dd)		3,98 (dd)				
			3,26 (dd)		3,26 (dd)				
proline			3,13 (dd)		3,13 (dd)				
			4,14 (t)		4,15 (t)				
			3,40 (t)						
					3,36 (t)				
			3,33 (t)						
propionaat			2,36 (m)		2,36 (m)				
			2,08 (m)		2,08 (m)				
			2,01 (m)		2,01 (m)				
			2,4 (q)						
		2,16							
pyruvaat			1,18 (t)						
		1,04							
		2,36	2,37 (s)						
sarcosine			3,6 (s)						
			2,73 (s)						
sorbitol					3,82 (q)				
					3,77 (t)				
					3,66 (d)				
succinaat	2,45 (s)								
		2,44				2,43 (s)			
taurine			2,39 (s)						
	3,5 (t)								
		3,44	3,44		3,42 (t)	3,43 (t)			
		3,4		3,41 (t)					
		3,35 (t)							
threonine							3,31		
		3,28		3,26 (t)	3,26 (t)	3,28 (t)	3,26		
		3,24	3,25						
					4,26 (q)				
				4,25 (m)					
trimethylamine-N-oxide			3,58 (d)		3,59 (d)				
			1,32 (d)		1,32 (d)				
			3,44 (s)						
	3,3 (s)					3,3 (s)			
			3,25		3,26 (s)				
trimethyl amine tryptophan	2,88								
	7,71		7,73 (d)						
	7,52		7,54 (d)						
			7,31(s)						
	7,28		7,28 (t)						
	7,24		7,2 (t)						
			4,05 (dd)						
			3,48 (dd)						
			3,31 (dd)						
			7,18 (d)		7,17(d)				
tyrosine			6,88 (d)		6,87 (d)	6,89 (m)			
					3,97 (dd)				
			3,93 (dd)						
			3,15 (dd)		3,14 (dd)				
			3,05 (dd)		3,06 (dd)				

uracil					7,72 (d)				
					5,82 (d)				
urea						5,8			
valine			3,61 (d)		3,61 (d)				
			2,27 (m)		2,28 (m)				
	1,05 (dd)		1,04 (d)		1,02 (d)				
			0,99 (d)		0,97 (d)				
vetten					2,79 (m)				
					1,27 (m)				
					0,87 (m)				

Singlet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q), multiplet (m) doublet van doubletten (dd)

Bronnen: 1 [30], 2 [31], 3 [5], 4 [21], 5 [32], 6 [33], 7 [34], 8 [17], 9 [35], 10 [10]

Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen en uw akkoord te verlenen.

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

Opsporen van ziektemerkers in biofluids door middel van NMR spectroscopie

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2006**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt houdt in dat ik/wij als auteur de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij kan reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

U bevestigt dat de eindverhandeling uw origineel werk is, en dat u het recht heeft om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. U verklaart tevens dat de eindverhandeling, naar uw weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

U verklaart tevens dat u voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen hebt verkregen zodat u deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal u als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze licentie

Ik ga akkoord,

Peter REDANT

Datum: