In vivo spin trapping van vrije radicalen ten gevolge van LPS-instillatie in de longen van muizen

Kimberly Vanhees

promotor : dr. J.J. BRIEDE

Eindverhandeling voorgedragen tot het bekomen van de graad Master in de biomedische wetenschappen klinische en moleculaire wetenschappen



INHOUDSOPGAVE

LIJST M	IET AFKORTINGEN	Ι
VOORW	VOORD	Π
SAMEN	VATTING	III
1. INI	LEIDING	- 1 -
1.1.	Lipopolysaccharide	- 3 -
1.2.	Electron spin resonantie spectroscopie	- 5 -
1.3.	Spin trap	- 7 -
1.4.	Spin label	- 8 -
1.5.	In vivo spin trapping	- 10 -
1.6.	Onderzoeksdoel	- 11 -
2. MA	TERIALEN EN METHODEN	- 13 -
2.1.	Behandeling van de muizen	- 13 -
2.2.	Orgaan verwerking	- 13 -
2.3.	Fosfaatbepaling	- 14 -
2.4.	Malondialdehyde bepaling	- 16 -
2.5.	Electron spin resonantie meting	- 16 -
2.6.	Uitwerking ESR spectra	- 17 -
3. RE	SULTATEN	- 18 -
3.1.	Fosfaatbepaling	- 18 -
3.2.	Positieve controle	- 19 -
3.3.	Invrieseffect op geproduceerde zuurstofradicalen	- 22 -
3.4.	In vivo spin trapping	- 25 -

	3.5. Vitamine C signaal	- 26 -
	3.6. Malondialdehyde bepaling	- 30 -
	3.6.1. Malondialdehyde bepaling met butanol extractie	- 30 -
	3.6.2. Malondialdehyde bepaling zonder butanol extractie	- 32 -
4.	DISCUSSIE	- 34 -
RE	FERENTIES	

BIJLAGE 1

BIJLAGE 2

BIJLAGE 3

LIJST MET AFKORTINGEN

4-HNE = 4-hydroxy-2-nonenal **8-OHdG** = 8-hydroxydeoxyguanosine **AMC-PROXYL** = acetoxymethyl ester carboxy-PROXYL **amino-TEMPONE** = 4-amino-TEMPONE carboxy-TEMPO = 4-carboxy-TEMPO **CAT-1** = 4-trimethylammonium-**TEMPO-1 CmP** = 3-carbamoyl-PROXYL CP = carboxy-PROXYL**DBNBS** = 3,5-dibromo-4nitrosobenzeensulfonaat **DMPO** = 5,5-dimethyl-1-pyrroline-Noxide **DNA** = desoxyribonucleïnezuur **EPR** = electron paramagnetic resonance **ESR** = electron spin resonance **GTP-binding proteïne** = guanine trifosfaat-binding proteïne hfs-constante = hyperfijnstructuurconstante **hTrx-1** = humaan thioredoxin-1 **IKK** = $I\kappa B$ kinase **IL** = interleukine **i.p.** = intraperitoneaal **i.t.** = intratracheaal **i.v.** = intraveneus

LBP = LPS-binding protein

LPS = lipopolysaccharide MC-PROXYL = methoxycarbonyl-PROXYL **MDA** = malondialdehyde **MEKK** = mitogen-activated protein kinase erk kinase kinase **MNP** = 2-methyl-2-nitrosopropaan **MPO** = myeloperoxidase NAD(P)H oxidase = nicotinamide adenine dinucleotide (fosfaat) oxidase $NF-\kappa B$ = nuclear factor- κB **NIK** = NF- κ B–inducible kinase **PBN** = fenyl-tert-butyl nitrone **POBN** = α -(4-pyridyl-1-oxide)-N-tertbutylnitrone **PROXYL** = 2, 2, 5, 5tetramethylpyrrolidin-1-yloxy **Rac** = Rho-related C3 botulinum toxin substraat **ROS** = reactieve zuurstof soorten **SOD** = superoxide dismutase **TEMPO** = 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl **TEMPOL** = 4-hydroxy-TEMPO TEMPONE = 4-0x0-TEMPO**TLR** = Toll-like receptoren **TNF-** α = tumor necrosis factor α **TRADD** = TNF receptor death domain **TRAF** = TNF receptor-associated factor

VOORWOORD

Bij het schrijven van mijn thesis kijk ik terug naar een zeer fijne periode. Ik heb tijdens mijn stageperiode veel bijgeleerd, maar ik heb ook veel fijne mensen leren kennen.

Om te beginnen wil ik graag de universiteit Maastricht, meer bepaald de afdeling gezondheidsrisico analyse en toxicologie, en mijn begeleider Dr. Ir. Briedé bedanken voor het leveren van deze stageplaats. Ik wil mijn begeleider verder ook bedanken omdat hij mij altijd heeft geholpen als ik iets niet wist of kon en omdat hij me zeer goed begeleid heeft doorheen mijn afstudeerstage. Ook wil ik hem graag bedanken voor het nalezen van mijn thesis en het beoordelen ervan. Vervolgens wil ik ook graag mijn tweede beoordelaar, Dr. Knaapen, bedanken voor het beoordelen van mijn thesis alsook voor het leveren van de muizen voor mijn onderzoek.

Ik wil ook graag analyst Pachen bedanken omdat zij mij geholpen heeft de techniek voor de fosfaatbepaling aan te leren en dan natuurlijk ook doctoraatstudente Haegens, van de afdeling pulmonologie aan de universiteit Maastricht, voor het uitvoeren van de intratracheale instillatie en de dissectie op mijn muizen.

Ik wil ook graag alle andere leden van de afdeling gezondheidsrisico analyse en toxicologie bedanken voor hun hulp in het laboratorium.

Natuurlijk wil ik ook de andere stagiaires bedanken omdat ook zij altijd voor mij klaarstonden om mij te helpen of vragen te beantwoorden. En ik dank hen natuurlijk ook voor de gezellige sfeer die er in ons 'kot' was. Dit heeft mijn stageperiode veel makkelijker en aangenamer gemaakt.

En als laatste zou ik heel graag mijn ouders, zus en vriend willen bedanken omdat ze altijd klaarstonden voor mij en me altijd gesteund hebben. Hun vertrouwen in mij heeft mij enorm geholpen.

SAMENVATTING

Oxidatieve stress speelt een belangrijke rol in verschillende ziekteprocessen. De gevormde vrije zuurstofradicalen die tijdens dit proces gevormd worden, kunnen reacties aangaan met onder andere proteïnen, DNA en lipiden. Deze vrije zuurstofradicalen kunnen opgespoord worden door middel van electron spin resonantie (ESR) spectroscopie. Maar omdat deze zuurstofradicalen slechts een korte levensduur hebben, wordt gebruik gemaakt van een spin trap, welk in het proefdier gebracht wordt, om zo een radicaal-adduct te vormen dat gedurende een langere periode stabiel en meetbaar is. In dit geval spreekt men van *in vivo* spin trapping.

Het doel van deze studie is om na te gaan of de toegepaste *in vivo* spin trapping techniek, die gebruik maakt van de spin trap POBN, geschikt is voor het detecteren van vrije zuurstofradicalen geproduceerd in reactie op LPS. Bovendien wordt ook nagegaan welke soorten vrije radicalen geproduceerd worden.

Aan de hand van een positieve controle experiment wordt bepaald dat wanneer er vrije zuurstofradicalen geproduceerd worden in reactie op LPS, deze ook door middel van de spin trap POBN een ESR signaal opleveren. Bovendien wordt door dit experiment ook aangetoond dat de gevormde zuurstofradicalen niet het resultaat zijn van ex vivo productie. Dus dit experiment toont aan dat de toegepaste in vivo spin trapping methode werkt. Het invries effect op het ESR signaal wordt ook nagegaan en dit heeft als uitkomst dat er geen effect is. Voor de eigenlijke in vivo spin trapping studie worden 4 muizen gebruikt, waarvan twee een i.t. instillatie met LPS en de twee overige een i.t. instillatie met fysiologische zoutoplossing ondergaan. Vervolgens ondergaan ze een i.p. injectie met de spin trap POBN, waarna ze opgeofferd worden. Verschillende organen worden opgewerkt en het bekomen fosfolipide extract wordt vervolgens gebruikt voor een ESR meting, fosfaatbepaling en malondialdehyde bepaling. Deze experimenten leveren geen POBN-signaal op, zowel niet in de controle muizen als in de LPS-behandelde muizen. Er wordt wel een vitamine C signaal in de lever en milt extracten van alle muizen teruggevonden. Dit signaal is het hoogst voor de LPS-behandelde muizen. De MDA bepaling laat ook zien dat de meeste lipide peroxidatie heeft opgetreden in de milt van de LPS-behandelde muizen.

1. INLEIDING

Oxidatieve stress kan ernstige gevolgen hebben voor de gezondheid en speelt een belangrijke rol in verschillende ziekteprocessen, onder andere diabetes, atherosclerose, pulmonaire aandoeningen, cardiovasculaire aandoeningen, et cetera.

Oxidatieve stress kan gezien worden als een imbalantie tussen de productie van reactieve zuurstof soorten (ROS) en antioxidanten, waarbij de balans overhelt naar de kant van ROS [1].

In de long zijn er meerdere bronnen van inflammatie, onder andere luchtverontreinigingpartikels zoals sigarettenrook, diesel, kwarts, asbest, et cetera, maar ook virale en bacteriële infecties, wat kan leiden tot de vrijzetting van lipopolysaccharide (LPS).

ROS kunnen via 2 routes gevormd worden, namelijk direct door het partikel zelf (acellulair), wat afhangt van de fysisch-chemische kenmerken van het partikeloppervlak, of indirect doordat het partikel de vorming van cellulaire oxidanten stimuleert. In deze laatste route zijn de macrofagen en neutrofielen verantwoordelijk voor de oxidatieve uitbarsting van radicalen, waardoor er een toename in zuurstof verbruik optreedt.

Ontstekingsprocessen in de long worden gekenmerkt door een influx van neutrofielen in de luchtwegen. Deze neutrofielen zijn een grote bron van ROS. De aantrekking van neutrofielen, als gevolg van inhalatie van ontstekingsagenten, is afhankelijk van een cytokinennetwerk. Residente alveolaire macrofagen schakelen het grootste deel van de binnendringende micro-organismen of partikels uit. Maar wanneer de macrofagen overspoeld worden door intrinsieke ontstekingsactiviteit van pathogenen, zullen zij een reeks van cytokinen en chemokinen vrijzetten, waardoor een ontstekingsreactie op gang wordt gezet. Neutrofielen worden hierdoor aangetrokken naar de plaats van de ontsteking en laten daar een waaier aan ROS vrij, onder andere superoxide anion, hydroxyl radicaal, waterstofperoxide, et cetera, die de indringende pathogenen doodt.

De verschillende oxidanten die gevormd worden door neutrofielen zijn het resultaat van de werking van verschillende enzymen die verschillende reacties catalyseren. De belangrijkste enzymen betrokken bij deze reacties zijn NAD(P)H oxidase, superoxide dismutase (SOD) en myeloperoxidase (MPO). De geproduceerde vrije radicalen kunnen op verschillende manieren celschade induceren. Ze reageren namelijk met DNA, lipiden en proteïnen.

ROS-geïnduceerde DNA schade kan het gevolg zijn van oxidatie, nitratie, depurinatie, methylatie en deaminatie. De reactiviteit van diverse ROS ten opzichte van DNA verschilt. Superoxide en waterstofperoxide reageren niet met DNA, in tegenstelling tot het hydroxyl radicaal dat het meest reactief is met DNA. Dit laatste radicaal kan namelijk een reactie aangaan met elk van de vier basen. De best bestudeerde DNA lesie veroorzaakt door een hydroxyl radicaal aanval is het 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), wat geproduceerd wordt door hydroxylatie van de C-8 positie van het guanine derivaat van het DNA [2]. Daarom dat het DNA adduct 8-OHdG gezien wordt als een oxidatieve stress marker, dat de hoeveelheid oxidatieve schade en dus ook de hoeveelheid gevormde radicalen, weergeeft [3]. Maar ROS kan ook DNA-streng breuken veroorzaken doordat de vrije radicalen de DNA suiker-fosfaat ruggengraat aanvallen. Deze breuken kunnen enkelstrengige of dubbelstrengige breuken zijn [2].

Om DNA schade te beperken, bevatten cellen verschillende herstel enzymen. Het herstel van oxidatieve DNA lesies, zoals onder andere 8-OHdG, gebeurt door middel van het base excision repair pathway [1]. Hoewel DNA herstel pathways bestaan, kunnen onjuiste herstellingen plaatsvinden, waardoor mutaties en transformaties ontstaan. Deze mutaties kunnen een enkel gen, een groep genen of een geheel chromosoom inhouden. Dit kan leiden tot het ontstaan van kanker [3].

Als ROS reageren met de fosfolipiden in celmembranen kan dit leiden tot lipide peroxidatie. Dit komt omdat de dubbele bindingen van de poly-onverzadigde lipiden kwetsbaar zijn voor ROS. De fosfolipiden-radicaal interactie levert peroxides op, die ook onstabiel en reactief zijn [4-5]. Deze peroxides veroorzaken proteïne oxidatie, verlies of verzwakking van celmembraan structuur en functie, en de vorming van aldehyde producten [3, 5]. Aldehyden zijn, in vergelijking met vrije radicalen, stabiel en kunnen door celmembranen heen gaan om zo op een afstand proteïnen en DNA aan te vallen. De belangrijkste aldehyden zijn isoprostaan, 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)en malondialdehyde (MDA). Isoprostanen worden gevormd door de lipide peroxidatie van arachidonzuur. Ze veroorzaken constrictie van glad spierweefsel, ze zijn mitogeen en moduleren de functie van bloedplaatjes. 4-HNE is een zeer reactief diffuseerbaar eindproduct van lipide peroxidatie en reguleert verschillende cellulaire gebeurtenissen die betrokken zijn bij proliferatie, apoptose en activatie van signaalpathways. 4-HNE heeft bovendien een grote affiniteit voor cysteïne, histidine en lysine resten, waardoor het de functie van proteïnen kan veranderen en direct proteïne-adducten kan vormen [6]. MDA (figuur 1) is ook een product van lipiden peroxidatie. Het gaat reacties aan met DNA waardoor het mutaties kan veroorzaken. MDA wordt ook in vele onderzoeken gebruikt als marker voor oxidatieve stress [7].



Figuur 1: Structuur van malondialdehyde (MDA) [8].

ROS beschadigt proteïnen direct of indirect via lipide peroxidatie. Het doet dit door de sulfhydryl-gemediëerde proteïne cross-linking te promoten. Dit resulteert in een verhoogde graad van degradatie en daling in enzymatische activiteit van deze proteïnen [4-5]. ROS kan ook direct zorgen voor de fragmentatie van polypeptiden [4].

1.1. Lipopolysaccharide

LPS is een component van het buitenste membraan van de celwand van Gramnegatieve bacteriën. LPS is een groot molecule dat bestaat uit een geacetyleerd diglucosamine hoofdgroep (lipide A) dat gebonden is aan een keten van telkens herhaalde disacchariden (Figuur 2).

De lipide A structuur levert de biologische functie, namelijk behoud van de structurele integriteit en bescherming tegen diverse chemische aanvallen, terwijl de polysaccharide staart de antigenische effecten teweegbrengt. LPS is ook een endotoxine en komt vrij bij de lysis van een bacterie. Ze zijn verantwoordelijk voor de systemische effecten van Gram-negatieve infecties.

Als de longen worden blootgesteld aan LPS veroorzaakt dit longschade. Dit komt doordat het LPS-binding protein (LBP), een glycoproteïne geproduceerd door de lever, bindt aan de lipid A regio van LPS om zo het LBP-LPS complex te vormen. Dit LBP-LPS complex bindt hierna met een specifieke receptor, namelijk CD14, dat gelegen is op monocyten, macrofagen en neutrofielen. Het LBP-LPS-CD14 complex activeert Toll-like receptoren (TLR4), die ook gelegen zijn op macrofagen en neutrofielen [9-16].



Figuur 2: Structuur van lipopolysaccharide (LPS) [17].

Dit leidt tot een verhoogd level van Rac1, wat een klein GTP-binding proteïne is. Dit op zijn beurt leidt tot de activatie van NADPH oxidase. NADPH oxidase veroorzaakt de productie van een reactief, vrij radicaal, namelijk superoxide, doordat het electronen van NADPH, dat gelegen is in de cel, over het membraan heen naar een zuurstof molecule brengt [9-10, 12, 14].

Dit superoxide veroorzaakt, door een tot nu toe nog niet gekend mechanisme, de activatie van serine/threonine kinase (IKK). Deze bestaat uit twee catalytische subunits (IKK α en IKK β) en een regulatorisch proteïne (IKK γ). IKK α en IKK β fosforyleren het I κ B proteïne, wat hierna geübiquitineerd en gedegradeerd wordt. Als I κ B niet gefosforyleerd is, inhibeert het NF- κ B, waardoor deze inactief blijft. Als I κ B gefosforyleerd wordt, wordt NF- κ B actief en begeeft het zich naar de nucleus waar het de transcriptie van genen, die DNA-binding sites voor NF- κ B hebben, activeert. Hierdoor ontstaat de expressie van tumor necrosis factor α (TNF- α) (Figuur 3) [10, 16,18].

TNF- α veroorzaakt de productie van interleukine-6 (IL-6) en interleukine-8 (IL-8), wat leidt tot de aantrekking van neutrofielen en macrofagen. Deze neutrofielen en macrofagen bezitten NADPH oxidase activiteit, waardoor er opnieuw reactieve zuurstof

soorten gevormd worden. Deze reactieve zuurstoffen activeren dan weer NF- κ B wat weer leidt tot de productie van TNF- α [13-14].

TNF- α zelf bindt ook aan zijn receptor en trekt TNF receptor death domain (TRADD) aan. TRADD bindt aan TNF receptor-associated factor 2 (TRAF-2), dat op zijn beurt NF- κ B–inducible kinase (NIK) aantrekt. NIK/MEKK1 fosforyleert IKK α en IKK β . Deze fosforyleren op hun beurt I κ B, wat leidt tot de activatie van NF- κ B en TNF- α . Dit kan gezien worden als een positieve feedback [19].

De reactieve zuurstof soorten worden geproduceerd om de indringende bacteriën te doden. Deze bacteriën worden gevangen door macrofagen. Hierdoor komt er opnieuw LPS vrij, waardoor er een positieve feedback systeem ontstaat [13-14].



Figuur 3: Schematisch model voor de LPS-gemediëerde NF-кВ activatie [12].

1.2. Electron spin resonantie spectroscopie

Door gebruik te maken van de electron spin resonance (ESR) spectroscopie, ook wel electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopie genoemd, kan de hoeveelheid en het type radicaal bepaald worden. ESR is een vorm van magnetische resonantie spectroscopie en kan vrije radicalen meten doordat deze een ongepaard electron bezitten. Dit is energetisch ongunstig, waardoor ze zeer reactief zijn en snel bindingen met andere moleculen, bijvoorbeeld DNA, proteïnen, membranen, et cetera, aangaan. Op deze wijze kunnen ze schade veroorzaken. Dit noemt men oxidatieve schade en dit treedt op tijdens oxidatieve stress.

Een ongepaard electron heeft een spin van $+ \frac{1}{2}$ of $-\frac{1}{2}$ en gedraagt zich als een kleine magneet. Als het blootgesteld wordt aan een extern magnetisch veld, kan het zich parallel of antiparallel ten opzichte van het veld opstellen. Dus het electron kan zich in twee mogelijke energietoestanden bevinden. De electronen die zich antiparallel ten opzichte van het extern veld richten, bevinden zich in een hogere energietoestand dan de electronen die zich parallel aan het extern veld hebben gericht. Hierdoor ontstaat er een energieverschil (ΔE). Als electromagnetische radiatie (microgolven) met een constante frequentie (9,5 x 10^9 c/s) ingezonden wordt, wordt het geabsorbeerd door de ongepaarde electronen. Deze microgolven worden in het klystron opgewekt en worden via een golfpijp naar de cavity gebracht. De cavity is de ruimte tussen de polen van de magneet, waarin het monster wordt aangebracht. Deze electromagnetische radiatie zorgt ervoor dat een aantal electronen van een lager naar een hoger energieniveau gaan. Men spreekt hier van energie absorptie oftewel van resonantie. Hierdoor wordt het ESR spectrum (eerste afgeleide van het absorptie spectrum) verkregen. Niet enkel ongepaarde electronen gedragen zich als kleine magneten, ook bepaalde atomaire nuclei, onder andere de stikstof- en waterstofkern, vertonen deze eigenschap. Ze kunnen zich ook ten opzichte van een extern magnetisch veld parallel of antiparallel oriënteren. De interactie tussen een ongepaard electron en een proton wordt de hyperfijnstructuur genoemd. De afstand tussen twee pieken wordt de hfs-constante genoemd.

De waterstofkern heeft een spin van ¹/₂ en kan parallel of antiparallel georiënteerd zijn ten opzichte van een extern magnetisch veld. Dit heeft ook een invloed op het energieniveau van het ongepaard electron. Als het magnetisch moment van het proton parallel gaat staan wordt het effectieve magneetveld ter plaatse van het ongepaard electron iets groter en als het antiparallel gaat staan iets kleiner. Het energieniveau van het ongepaard electron wordt dus opgesplitst door interactie met het naburige proton. Het verkregen ESR spectrum bestaat uit twee pieken van dezelfde intensiteit (Figuur 4A). De stikstofkern heeft een spin van 1 en het magnetisch moment kan zich op drie manieren instellen ten opzichte van het uitwendige magneetveld. Dit geeft aanleiding tot een hyperfijnstructuur die bestaat uit drie pieken van dezelfde intensiteit en die even ver van elkaar liggen (Figuur 4B).

Deze hyperfijnstructuur staat de identificatie van de structuur van het gebied rond het ongepaard electron toe. Op deze wijze kan achterhaald worden welke reactieve zuurstof soorten er geproduceerd worden [20].



Figuur 4: A) ESR spectrum van een radicaal-adduct, waarbij het vrije radicaal gelegen is nabij een waterstofatoom. B) ESR spectrum van een radicaal-adduct, waarbij het vrije radicaal gelegen is nabij een stikstofatoom [20].

1.3. <u>Spin trap</u>

Aangezien vrije radicalen een korte levensduur hebben van enkele nanoseconden tot milliseconden, maakt men gebruik van spin traps. Spin traps zijn diamagnetische reagens die de vrije radicalen vangen en zo een radicaal-adduct, wat stabiel is, vormen [21-24]. De detectie van een vrij radicaal is enkel mogelijk als de concentratie van de spin trap en van het vrij radicaal hoog genoeg is en als de spin trapping snel genoeg plaatsvindt. De blijvende spin adducts verzamelen zich totdat de detectielimiet van de ESR spectrometer overschreden wordt en een signaal geregistreerd kan worden [24-25]. De typische spin traps zijn nitroso-samenstellingen en nitronen, waarmee de reactieve radicalen zullen reageren om een nitroxyl (aminoxyl of nitroxide) spin adduct te vormen.

Nitroxyl spin adducts zijn relatief stabiele radicalen door de resonantie stabilisatie van hun ongepaard electron dat gelegen is tussen het zuurstof- en stikstofatoom van de aminoxyl functiegroep in de monomere vorm [21, 25].

De voordelen van nitroso-samenstellingen als spin trap is dat het nitrosostikstofatoom direct reageert met het vrije radicaal. Het nadeel is dat ze thermisch en fotochemisch instabiel zijn. Bovendien hebben ze ook de neiging om dimerisatie te ondergaan. De meest gebruikte nitroso-samenstellingen zijn 2-methyl-2-nitrosopropaan (MNP), 3,5-dibromo-4-nitrosobenzenesulfonaat (DBNBS) en 2,4,6-tri-tertbutyltetramethylnitrosobenzeen (nitrosodureen) [25].

De nitronen hebben als voordeel dat ze hydrofiel, licht ongevoelig, weinig toxisch en stabiel zijn, wat leidt tot reproduceerbare resultaten. Ze zijn ook minder gevoelig voor zuurstof- of waterdamp in vergelijking met de nitroso-spin traps. Ze zijn oplosbaar in een groot aantal solventen bij hoge concentraties. De meest gebruikte nitronen zijn fenyl-tertbutyl nitrone (PBN), 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) en α -(4-pyridyl-1oxide)-N-tert-butylnitrone (POBN) (Figuur 5). POBN vangt en toont zuurstof radicalen. Het heeft ook als voordeel dat het meer hydrofiel is dan PBN en dat het door celmembranen heen kan migreren [24-25].



Figuur 5: Structuur van de spin trap (α -(4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butylnitrone) POBN [26].

1.4. Spin label

ESR spectroscopie kan ook gebruikt worden om na te gaan hoeveel oxidatieve zuurstofradicalen er *in vivo* gevormd worden. Om dit te bepalen maakt men gebruik van spin labels [27]. Spin labels zijn paramagnetische labels met een ongepaard electron. Ze worden ook wel stabiele vrije radicalen genoemd [23, 28-29]. De meest gebruikte spin labels zijn nitroxyl spin labels. Deze kunnen opgedeeld worden in drie categorieën naargelang hun basis structuur, namelijk 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO); 2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine-1-oxyl (PROXYL) en 4,4-dimethyl-oxazolidine-3-oxyl (Doxyl). De fysische kenmerken verschillen tussen de categorieën, waardoor de ene spin label meer wateroplosbaar en membraan permeabel is dan de andere [30].

De TEMPO-derivaten bevatten ieder een zes-ring in hun structuur. De meest bekende TEMPO-derivaten zijn 4-hydroxy-TEMPO (TEMPOL), 4-oxo-TEMPO (TEMPONE), amino-TEMPO, carboxy-TEMPO en 4-trimethylammonium-TEMPO-1 (CAT-1). Carboxy-TEMPO en CAT-1 zijn hydrofiele spin labels en gaan dus niet door membranen heen waardoor ze niet door cellen worden opgenomen of gemetaboliseerd [31]. De stabiliteit van TEMPO is het gevolg van de sterische protectie afkomstig van de vier methyl groepen die gelegen zijn naast de nitroxyl groep. Enkel amino-TEMPO blijft instabiel [23, 28-29].

De PROXYL groep bestaat uit onder andere 3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl (CmP) (figuur 6), carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine-1-oxyl (CP). Deze PROXYL-derivaten hebben allemaal een vijf-ring in hun structuur. CmP en CP zijn hydrofiele spin labels, waardoor ze makkelijk oplossen in onder andere bloed. Ze kunnen echter niet door membranen heen gaan. CP kan wel door anion transporters cellen in getransporteerd worden [31]. Er zijn nog geen spin labels beschikbaar die de bloedbrein barrière kunnen doorkruisen. Hierdoor is onderzoek naar oxidatieve stress in de hersenen beperkt. Maar er wordt wel onderzoek uitgevoerd naar mogelijke kandidaat spin labels. Vooral de acetoxymethyl ester van carboxy-PROXYL (AMC-PROXYL) lijkt geschikt voor dit type onderzoek omdat het de bloed-brein barrière doorkruist en gemetaboliseerd wordt in de hersenen tot een hydrofiel metaboliet, waardoor het lang achterblijft in de hersenen [30].



Figuur 6: Structuur van de spin label (3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine-1-oxyl) CmP [32].

Deze spin labels kunnen gedetecteerd worden door middel van ESR spectroscopie. *In vivo* reageren deze nitroxyl spin labels met vrije radicalen. Dit heeft tot gevolg dat nonparamagnetische hydroxylamines gevormd worden. Deze worden niet gedetecteerd door middel van ESR spectroscopie. Dus de afname van ESR signaal intensiteit van deze nitroxyl spin labels, wat men de spin clearence rate (figuur 7) noemt, geeft de hoeveelheid vrije radicalen, die *in vivo* gevormd zijn, weer [27, 30].

Toediening van kalium ijzercyanide kan het signaal weer doen verschijnen doordat het leidt tot de oxidatie van hydroxylamine naar nitroxide. Dit levert dan weer een meetbaar ESR signaal op. Dit wijst erop dat de verwijdering van nitroxyl spin labels het gevolg is van de reductie van één electron [33].

Experimenten met spin labels worden, net zoals experimenten met spin traps, voornamelijk uitgevoerd op muizen en ratten. Deze dieren worden ook blootgesteld aan een substantie of trauma wat ervoor zorgt dat er vrije radicalen geproduceerd worden. Hierna wordt vervolgens een geschikte spin label intraveneus geïnjecteerd. De verkregen stalen, dit kunnen organen, bloed, urine, et cetera zijn, worden na eventuele verwerking vervolgens doormeten door middel van ESR spectroscopie. Deze metingen leveren een spin clearence rate (figuur 7) op, wat de hoeveelheid vrije radicalen die *in vivo* gevormd zijn, weergeeft [27, 30, 33].



Figuur 7: Clearance curve van carbamoyl-PROXYL [33].

Een belangrijk verschil tussen spin labeling en spin trapping, is het feit dat spin labeling enkel iets zegt over de hoeveelheid radicaal die geproduceerd wordt en over de snelheid waarmee het geproduceerd wordt. Welk type radicaal er geproduceerd wordt, kan enkel achterhaald worden door middel van spin trapping. Spin trapping is dus een specifiekere techniek dan spin labeling.

1.5. In vivo spin trapping

Er zijn verschillende manieren om met betrekking van ESR spectroscopie radicalen in proefdieren te meten.

In vitro spin trapping houdt in dat zowel de productie van vrije radicalen als het aanbrengen van een spin trap buiten het proefdier gebeurt. In dit geval werkt men met bijvoorbeeld bloed of cellen van een proefdier die men blootstelt aan een bepaalde stof wat leidt tot de productie van vrije radicalen. Hierna brengt men een spin trap aan, die deze radicalen dan kan gaan vangen.

Ex vivo spin trapping houdt in dat de productie van vrije radicalen gebeurt in een levend proefdier, maar dat de spin trap naderhand pas toegevoegd wordt aan een staal van het proefdier, dat al dan niet opgeofferd werd. Deze staal kan bloed of een orgaan van het proefdier zijn.

In vivo spin trapping houdt in dat de spin trap in een levend proefdier wordt aangebracht en dat de productie van vrije radicalen ook plaatsvindt in dit levend proefdier. De spin trap, POBN, of de spin label, CmP, zijn het meest geschikt voor *in vivo* spin trapping van zuurstofradicalen [34].

1.6. Onderzoeksdoel

Het doel van mijn stage was om na te gaan hoeveel radicalen en welk soort radicaal er gevormd werd door middel van *in vivo* spin trapping. Dit werd gedaan om de invloed van oxidatieve stress te bepalen. Dit is van belang omdat oxidatieve stress een grote rol speelt in meerdere ziektes.

Als eerste werd een positieve controle uitgevoerd. Dit werd gedaan om na te gaan of er inderdaad een signaal gevormd werd dat gemeten kon worden door middel van ESR spectroscopie. Vervolgens werd gekeken hoelang dit signaal behouden kon worden indien de stalen ingevroren werden. Hierna werd overgegaan op het eigenlijke *in vivo* spin trapping experiment. In dit experiment werd gebruik gemaakt van vier muizen, waarvan er twee een intratracheale (i.t.) LPS instillatie en de twee overige een i.t. instillatie met fysiologisch zoutoplossing, als controle, ondergingen. Vervolgens kregen deze vier muizen een intraperitoneale (i.p.) injectie met POBN en werden ze opgeofferd.

Verschillende organen werden verwijderd en ingevroren. Enkel de longen werden direct verwerkt om zo de fosfolipiden te isoleren. Dit extract werd dan gebruikt om na te gaan hoeveel en welk type radicaal er gevormd was. Om dit te bepalen, werd gebruik gemaakt van ESR spectroscopie.

Er werd vervolgens ook gekeken naar de hoeveelheid lipide peroxidatie, aangezien dit ook aangeeft hoeveel oxidatieve stress, en dus ook hoeveel radicaal productie, er heeft plaatsgevonden. Dit werd gedaan door middel van een malondialdehyde bepaling, omdat malondialdehyde een eindproduct is van lipide peroxidatie.

Van het resultaat uit deze experimenten werd verwacht dat de muizen die blootgesteld waren aan LPS een groter ESR signaal teweeg zouden brengen, omdat LPS verantwoordelijk is voor de vorming van vrije radicalen. Er werd ook verwacht dat deze LPS-behandelde muizen een hogere MDA concentratie hadden, omdat er meer celschade geïnduceerd werd.

2. <u>MATERIALEN EN METHODEN</u>

In dit onderzoek werd nagegaan welk soort vrije radicaal en ook de hoeveelheid radicaal die geproduceerd werd in reactie op LPS. Om dit te verwezenlijken, werden muizen behandeld met LPS en POBN, waarna hun organen opgewerkt werden om zo een fosfolipiden extract te verkrijgen van ieder orgaan. Dit extract werd vervolgens gebruikt voor het uitvoeren van een ESR meting en om de fosfolipide en MDA concentratie te bepalen.

2.1. Behandeling van de muizen

Vier volwassen mannelijke muizen met een gewicht van ± 20 g werden gebruikt voor het *in vivo* spin trapping experiment. Twee muizen kregen LPS toegediend en de twee andere muizen dienden als controle. De controle muizen kregen 300 µl 0,9% fysiologische zoutoplossing door middel van i.t. instillatie aangebracht in de longen, terwijl de andere muizen 300 µl LPS, opgelost in 0,9% fysiologische zoutoplossing (100 µg/ muis in 300 µl volume), ontvingen. 23 uur nadat LPS en de fysiologische zoutoplossing waren toegediend, ontving iedere muis een i.p. injectie met de spin trap POBN (6 mmol/ kg) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dat opgelost was in 0,9% fysiologische zoutoplossing. 24 uur na de i.t. instillatie van LPS of fysiologische zoutoplossing, werden de muizen geanesthetiseerd door een i.p. injectie van pentobarbital (30 mg/ kg). Hierna werden de muizen gedood door middel van doodbloeden. Vervolgens werden de target organen, namelijk de longen, lever, hart, milt en nieren verwijderd en afgespoeld met fysiologische zoutoplossing. De target organen werden direct verwerkt en gemeten door middel van ESR spectroscopie of ze werden direct ingevroren en opgeslagen in een -80 °C diepvries.

2.2. Orgaan verwerking

Voor de verwerking van de ingevroren organen werd ter voorbereiding natriumsulfaat (Na_2SO_4) kolommen gemaakt. Dit werd gedaan door uit het filterpapier een klein cirkeltje te snijden dat overgebracht werd naar de hals van een glazen pasteurpipet. Hierna werd er 0,5 g Na_2SO_4 (Merck, Darmstadt, Duitsland) overgebracht

naar de pasteurpipet. Er werd ter voorbereiding ook een 2:1 chloroform:methanol (Merck) oplossing en een 2,2`-dipridyl (Sigma) oplossing (opgelost in 2:1 chloroform:methanol) (30 mM) gemaakt.

Alvorens er begonnen werd, werden alle glazen buisjes afgespoeld met 2:1 chloroform:methanol.

De organen van de muizen werden samen met vijzel en stamper in vloeibaar stikstof geplaatst. Vervolgens werd de vijzel uit de vloeibare stikstof gehaald, samen met één orgaan. Het orgaan werd overgebracht in de vijzel en de stamper werd uit het vloeibaar stikstof gehaald en hierop geplaatst. Hierna werd er drie keer met een hamer op de stamper geslagen, waarna de stamper enkele malen gedraaid werd. Dit proces werd herhaald tot het orgaan was omgezet tot poeder. Dit poeder werd hierna overgebracht naar een glazen buisje en op ijs gezet. Deze gehele procedure werd voor ieder orgaan herhaald.

Aan ieder glazen buisje werd vervolgens 0,5 ml 2:1 chloroform:methanol; 0,125 ml 2,2`-dipridyl (30 mM) en 0,5 ml MQ aan toegevoegd. Dit geheel werd geschud en vervolgens werd er nog eens 4 ml 2:1 chloroform:methanol aan toegevoegd. Hierna werden alle stalen gecentrifugeerd (Hettich zentrifugen, GMI Inc, Minnesota, USA) bij 2000 rpm, gedurende 10 minuten.

Na centrifugatie werd de verkregen onderste, witte chloroform laag overgebracht in een nieuw glazen buisje. Dit werd dan weer overgebracht naar de Na_2SO_4 kolommen en zo gefilterd om het extract te ontdoen van water. Onder deze kolommen werden nieuwe glazen buisjes geplaatst om het filtraat in op te vangen. Dit filtraat werd hierna geëvaporeerd met stikstof gas (N_2) om zo een geconcentreerde oplossing te verkrijgen. Hierna werden de stalen geanalyseerd met behulp van ESR spectroscopie of ze werden ingevroren in de -20 °C diepvries.

2.3. Fosfaatbepaling

Ter voorbereiding van de fosfaatbepaling werd ammonium molybdaat (Sigma) oplossing (20,23 mM), ascorbine zuur oplossing (Sigma) (568 mM), 64:1 MQ:salpeterzuur (Merck) oplossing en een stockoplossing kaliumdihydrofosfaat (KH₂PO₄) (Merck) (120 mg) gemaakt. De KH₂PO₄ stockoplossing werd vervolgens ook nog eens 4 keer (30 mg) verdund. Alvorens er begonnen kon worden, werden alle glazen buizen (15 ml) en knikkers afgespoeld met 64:1 MQ:salpeterzuur.

De monsters die op ijs stonden, werden gevortext en geresuspendeerd. Hierna werd 20 μ l van iedere staal overgepipetteerd naar een nieuw glazen buisje. De stalen werden volledig verdampt door middel van N₂. Hierna werd er 0,65 ml perchloorzuur (Merck) aan ieder buisje toegevoegd waarna deze werden afgedekt door middel van een knikker. De stalen werden vervolgens in een verhittingsblok (Stuart Block Heater, United Scientific Equipment Pte Ltd, Singapore) op 180 °C geplaatst en dit gedurende 30 minuten. Ondertussen werd een ijklijn in duplo gemaakt (zie tabel 1). Aan de buizen van de ijklijn werd vervolgens 0,65 ml perchloorzuur aan toegevoegd.

Nadat de buizen van de stalen voldoende waren afgekoeld, werd aan iedere buis 3,3 ml MQ aan toegevoegd. Hierna werd achtereenvolgens 0,5 ml ammonium molybdaat oplossing en 0,5 ml ascorbinezuur oplossing aan alle buizen, deze met de stalen en die van de ijklijn, toegevoegd. Tussen iedere stap in werden de buizen gevortext. Hierna werden de knikkers op de buizen geplaatst en deze werden vervolgens gedurende 5 minuten in een waterbad bij 100 °C geplaatst.

Nadat de buizen waren afgekoeld, werden de knikkers verwijderd en werd de absorptie bepaald door gebruik te maken van een spectrofotometer (DU® 800 UV/Visible Spectrophotometer, Beckman Coulter, CA, USA) bij 800 nm.

MQ (ml)	Stockoplossing PO4 (ml)	Concentratie PO4 (µg)
3,3	0	0
3,2	0,10	3
3,1	0,20	6
3,0	0,30	9
2,9	0,40	12
2,8	0,50	15
2,7	0,60	18

Tabel 1: Pipetteerschema voor de fosfaat ijklijn gebruik makend van een KH_2PO_4 stockoplossing met concentratie 30 mg.

2.4. <u>Malondialdehyde bepaling</u>

Voor de malondialdehyde (MDA) bepaling werd een ijklijn in duplo gemaakt (zie tabel 2) uit een stockoplossing MDA (Sigma) met een concentratie van 15,95 µM. Vervolgens werd 100 µl homogenaat (verkregen na orgaanverwerking, zie 2.2 orgaan verwerking) toegevoegd aan 900 µl TBA-reagens (0,188 g TBA (Sigma); 0,75 g TCA (Sigma); 1,1 ml 37% HCl; aangevuld tot 50 ml met MQ). Dit werd ook gedaan met de standaarden. Vervolgens werden de buizen met knikkers afgedekt, waarna ze gedurende één uur in het verhittingsblok (Stuart Block Heater, United Scientific Equipment Pte Ltd, Singapore) bij 100 °C geplaatst werden. Waar vermeld, werd 500 µl butanol (Merck) toegevoegd aan alle stalen nadat deze waren afgekoeld. Indien aan de stalen butanol werd toegevoegd, werden deze mengsels gedurende 5 minuten gecentrifugeerd (Hettich zentrifugen, GMI Inc, Minnesota, USA) bij 5000 rpm, waarna het supernatant overgepipetteerd werd. De absorptie werd door middel van een spectrofotometer (DU® 800 UV/Visible Spectrophotometer, Beckman Coulter, CA, USA), bij 535 nm, gemeten.

MQ (µl)	Stockoplossing MDA (µl)	MDA concentratie (µM)
1000	0	0
994	6	0,1
987	13	0,2
969	31	0,5
937	63	1
875	125	2
687	313	5
374	626	10

Tabel 2: Pipetteerschema voor de MDA ijklijn gebruik makend van een MDA stockoplossing met concentratie 15,95 μ M.

2.5. <u>Electron spin resonantie meting</u>

Voor het verkrijgen van een ESR spectrum, werden de ingevroren stalen eerst ontdooid en op ijs gezet. Hierna werden ze gevortext en werd het fosfolipide extract opgezogen in een glazen capillair van 100 μ l, dat afgedicht werd door middel van was. Dit capillair werd vervolgens in de ER 4119 high sensitivity cavity geplaatst, waarna het doorgemeten werd. Iedere meting werd uitgevoerd door gebruik te maken van een Bruker EMX 1273 X-band spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Duitsland) die uitgerust was met een 12 kW power supply.

De metingen werden uitgevoerd bij een magnetisch veld van 3490 G, met een scan range van 100 G. De microwave frequentie was 9,858 GHz en de power was 50,410 mW. De modulatie frequentie was 100 kHz en de modulatie amplitude was 1 G. De reciever gain was ingesteld op 2 x 10^5 . Per meting werden er 35 scans uitgevoerd. Iedere scan duurde 20,97 seconden en de tijdsconstante was 40,96 ms.

2.6. Uitwerking ESR spectra

Van de verkregen spectra werd het piek oppervlak, de piek hoogte en de opsplitsingconstante voor het waterstof- en stikstofatoom bepaald. Dit werd gedaan door gebruik te maken van het WinEPR spectrum manipulatie programma.

De gewenste spectra werden ingevoerd in dit programma, waarna als eerste de baseline werd gecorrigeerd. Voor het berekenen van het piek oppervlak, de piek hoogte en de opsplitsingconstante werden altijd als eerste de gewenste pieken geselecteerd. Het verkregen rapport werd gebruikt om het piek oppervlak, de piek hoogte en de opsplitsingconstante te berekenen.

Voor extra uitleg over de werking van dit WinEPR spectrum manipulatie programma, zie bijlage 1. Voor een voorbeeld van de berekeningen, zie bijlage 2.

3. <u>RESULTATEN</u>

De belangrijkste resultaten verkregen bij het uitvoeren van verschillende experimenten, onder andere fosfaatbepaling MDA bepaling, *in vivo* spin trapping en ESR metingen, worden uitgebreid besproken.

3.1. Fosfaatbepaling

Om de hoeveelheid fosfolipiden, die aanwezig zijn in het orgaan extract, te bepalen, werd er een fosfaatbepaling uitgevoerd. Aan de hand van een fosfaat ijklijn kon de fosfolipide concentratie van iedere staal berekend worden. Dit experiment werd uitgevoerd om de extractie-efficiëntie te bepalen.

Figuur 8 toont een fosfaat ijklijn. De vergelijking die verkregen werd bij deze ijklijn, werd gebruikt om de fosfolipide concentratie van verschillende organen te bepalen. De absorptie van de stalen, verkregen via fotospectroscopie, werd ingevuld in de vergelijking voor de y-waarde, waardoor de x-waarde, de fosfolipide concentratie, berekend kon worden.



Figuur 8: Fosfaat ijklijn waarbij ieder punt bepaald wordt uit een ammoniummolybdaat-oplossing door middel van een fostospectrometer bij een golflengte van 800 nm.

3.2. Positieve controle

De positieve controle werd uitgevoerd om na te gaan of er wel degelijk radicalen gevormd werden die konden reageren met POBN en geëxtraheerd werden. Dit werd gedaan om na te gaan of de *in vivo* spin trapping methode die gehanteerd werd, de juiste methode was om radicalen *in vivo* te genereren en te vangen.

Dit experiment bestond uit 3 verschillende condities en er werd telkens gebruik gemaakt van een ingevroren orgaan van een LPS-behandelde muis. Deze organen waren afkomstig van muizen uit een ander experiment, waarbij hetzelfde *in vivo* spin trapping protocol, als in deze studie, werd gebruikt. De eerste conditie hield in dat aan het orgaan extract enkel POBN (100 mM) werd toegevoegd. In de tweede conditie werd H_2O_2 (10 mM) en POBN aan het orgaan extract toegevoegd en in de derde conditie FeSO₄ (10 mM), H_2O_2 en POBN.



Figuur 9a: ESR spectrum van het fosfolipide extract van de nier van een LPS-behandelde muis, waarbij POBN toegevoegd is aan het orgaan extract.

Figuren 9a-9c geven de ESR spectra weer van de drie verschillende condities. Deze spectra lieten duidelijk zien dat bij de combinatie POBN/H₂O₂/FeSO₄ de piek hoogte groot was in vergelijking met de piek hoogte van POBN en de combinatie POBN/H₂O₂. Dit gold ook voor het piek oppervlak. Aangezien de pieken van POBN en de combinatie POBN/H₂O₂ veel kleiner waren dan die van de combinatie POBN/H₂O₂/FeSO₄ en omdat deze pieken niet veel breder waren, was het piek oppervlak van de pieken van POBN en

de combinatie POBN/ H_2O_2 ook kleiner in vergelijking met het piek oppervlak van de combinatie POBN/ H_2O_2 /FeSO₄. Dit wordt ook duidelijk aangetoond in figuur 10.



Figuur 9b: ESR spectrum van het fosfolipide extract van het hart van een LPS-behandelde muis, waarbij H_2O_2 en POBN toegevoegd is aan het orgaan extract.



Figuur 9c: ESR spectrum van het fosfolipide extract van de nier van een LPS-behandelde muis, waarbij $FeSO_4$, H_2O_2 en POBN toegevoegd is aan het orgaan extract.

Uit deze spectra kon besloten worden dat wanneer $FeSO_4$, H_2O_2 en POBN toegevoegd werd aan het orgaan tijdens de opwerking, er een duidelijk POBN signaal gemeten kon worden. De andere twee spectra toonden ook een POBN signaal, maar dit

signaal was kleiner. Maar iedere conditie liet een signaal zien. Dus als er vrije zuurstofradicalen geproduceerd worden, in reactie op LPS, zullen deze ook gemeten worden door middel van ESR spectroscopie. Deze zuurstofradicalen worden niet gevormd tijdens de extractie.



Figuur 10: Signaal sterkte van het piek oppervlak en de piek hoogte van het POBN signaal voor volgende drie condities: 1) orgaan extract + POBN, 2) orgaan extract + H_2O_2 + POBN, 3) orgaan extract + $FeSO_4$ + H_2O_2 + POBN. De signaal sterkte wordt gecompenseerd door de hoeveelheid fosfolipide en dit wordt uitgedrukt in procenten.

Tabel 3 geeft de opsplitsingconstante weer voor het waterstof- en het stikstofatoom. Deze waren voor iedere conditie gelijk. Dit wil zeggen dat in alle drie de condities hetzelfde soort vrije radicaal gevangen werd door de spin trap POBN. De opsplitsingconstanten geven aan dat het een radicaal met een centraal koolstofatoom is.

	POBN	$H_2O_2 + POBN$	FeSO ₄ + H ₂ O ₂ + POBN
$A_{\rm H}(G)$	2,638	2,740	2,525
$A_N(G)$	14,870	14,685	14,895

Tabel 3: Opsplitsing constante voor het waterstof atoom (A_H) en het stikstof atoom (A_N) .

Figuur 11 toont het fosfolipide gehalte van iedere staal. Het fosfolipide gehalte, verkregen uit de organen van de LPS-behandelde muizen, was ongeveer gelijk voor ieder experiment. Dit gold niet voor de stalen van de controle muizen. Hier verschilde het fosfolipide gehalte aanzienlijk tussen de verschillende experimenten, wat erop wijst dat

de orgaan opwerking voor de controle organen niet zo nauwkeurig was uitgevoerd als voor de organen afkomstig van LPS-behandelde muizen.



Figuur 11: Fosfolipide concentratie van de organen van de LPS-behandelde en controle muizen voor de drie condities: 1) orgaan extract + POBN, 2) orgaan extract + H_2O_2 + POBN, 3) orgaan extract + $FeSO_4$ + H_2O_2 + POBN.

3.3. Invrieseffect op geproduceerde zuurstofradicalen

Paragraaf 3.2 liet zien dat indien er POBN-adducten gevormd waren, deze ook door middel van ESR spectroscopie gemeten konden worden. Vervolgens werd nagegaan of deze signalen ook terug te vinden waren als de stalen opgeslagen werden in een -20 °C diepvries. Dus dit invrieseffect werd nagegaan om te bepalen of het gevormde ESR signaal zou afnemen over tijd.

Het orgaan extract werd verkregen door het opwerken van een orgaan, namelijk de nieren van een LPS-behandelde muis uit een ander experiment. In dit experiment werd gebruik gemaakt van hetzelfde *in vivo* spin trapping protocol, als in deze studie. Tijdens de verwerking van dit orgaan werd FeSO₄ (10 mM), H₂O₂ (10 mM) en POBN (100 mM) toegediend aan het orgaan extract. Vervolgens werd het ESR signaal gemeten op 5 verschillende dagen (dag 0 – dag 5 – dag 13 – dag 26 – dag 41).

Figuren 12a en 12b tonen de ESR spectra die verkregen zijn uit het fosfolipide extract van een LPS-behandelde muis, door middel van ESR spectroscopie, gemeten op dag 0 en dag 41. Het signaalpatroon dat terug te vinden was in beide spectra liet duidelijk zien dat de bekomen signalen afkomstig waren van radicaal-adducten, waarbij het radicaal gebonden was aan de spin trap POBN.



Figuur 12a: ESR spectrum van het fosfolipide extract van de nieren van een LPS-behandelde muis op dag 0.



Figuur 12b: ESR spectrum van het fosfolipide extract van de nieren van een LPS-behandelde muis op dag 41.

De spectra lieten duidelijk zien dat er tussen dag 0 en dag 41 bijna geen verschil was in piek hoogte. Ze toonden ook dat het piek oppervlak groter was op dag 41 dan op dag 0, omdat de pieken op dag 41 breder waren. De toename in breedte kan verklaard worden doordat er andere radicaal-adducten gevormd werden over een periode van 41 dagen, waardoor het POBN-signaal iets minder duidelijk werd.

Figuur 13 toont, net zoals de figuren 12a en 12b, aan dat het piek oppervlak toenam over tijd. Het piek oppervlak was na 41 dagen verdubbeld. De piek hoogte nam af na 5 dagen, maar nam daarna toe. Op dag 41 was het verschil met dag 0 verwaarloosbaar.



Figuur 13: Invloed van het invriezen op het piek oppervlak en de piek hoogte van het POBN signaal, waarbij de signaal sterkte gecompenseerd wordt door de hoeveelheid fosfolipide en dit uitgedrukt in procenten.

	Dag 0	Dag 5	Dag 13	Dag 26	Dag 41
$A_{\rm H}(G)$	2,525	2,542	2,542	2,590	2,607
$A_N(G)$	14,895	14,907	14,883	14,907	14,919

Tabel 4: Opsplitsing constante voor het waterstofatoom (A_H) en het stikstofatoom (A_N) .

Tabel 4 toont de verandering in de opsplitsingconstante voor het waterstofatoom (A_H) en het stikstofatoom (A_N) . Zoals de tabel aangeeft, lagen deze waarden bijeen en weken niet van elkaar af over een periode van 41 dagen.

Dit wijst erop dat na een periode van 41 dagen, nog altijd dezelfde radicaaladducten gemeten werden. In het algemeen werd er dus geen ander soort radicaal geproduceerd terwijl de stalen opgeslagen lagen in de -20 °C diepvries.

3.4. In vivo spin trapping

In het *in vivo* spin trapping experiment werden 2 muizen blootgesteld aan LPS (100 μ g/ muis in 300 μ l 0,9% fysiologische zoutoplossing) en twee andere muizen aan 0,9% fysiologische zoutoplossing (300 μ l). Na 23 uur werd de spin trap POBN (6 mmol/ kg) toegediend waarna de muizen werden opgeofferd. De long werd direct opgewerkt. Het hart, de lever, nieren en milt werden ingevroren en op latere tijdstippen opgewerkt.

Figuur 14 toont het ESR spectrum van het fosfolipide extract van de long van een LPS-behandelde muis. Dit ESR spectrum vertoonde geen POBN signaal.



Figuur 14: ESR spectrum van het fosfolipide extract van de long van een LPS-behandendelde muis.

Figuur 15 toont het fosfolipide gehalte in ieder orgaan van elke muis. Deze figuur laat zien dat de longen na opwerking de hoogste fosfolipide concentratie opleverden. Het hart en lever extract hadden de hoogste fosfolipide concentratie in geval van de LPSbehandelde muizen, terwijl de extracten van de nier en de milt de hoogste fosfolipide concentratie opleverden in de controle muizen. De milt had in vergelijking met de andere organen een laag fosfolipide gehalte. Deze figuur toont ook aan dat het ontbreken van een POBN signaal in figuur 14 niet het gevolg was van een foute opwerking van de organen aangezien de fosfolipide concentratie van deze organen vergelijkbaar was met de fosfolipide concentratie van de organen van de positieve controle (figuur 10).



Figuur 15: Fosfolipide concentratie van de LPS-behandelde muizen en de controle muizen (onbehandelde muizen) voor ieder verwerkt orgaan.

3.5. Vitamine C signaal

In paragraaf 3.4 zagen we dat er geen POBN signaal werd teruggevonden in de ESR spectra. De spectra van de milt en de lever toonden wel een ander signaal, namelijk een vitamine C signaal. Om aan te tonen dat dit gevonden signaal wel degelijk een vitamine C signaal was, werd een vitamine C oplossing doorgemeten.



Figuur 16a: ESR spectrum van een vitamine C oplossing (1M). De cirkel geeft de piek veroorzaakt door vitamine C weer.

Figuur 16a toont dit vitamine C signaal. Dit signaal was verkregen door een vitamine C oplossing van 1 M te maken. De cirkel geeft de piek weer die veroorzaakt werd door vitamine C.



Figuur 16b: ESR spectrum van het fosfolipide extract van de milt van een controle muis (M1). De cirkel geeft de piek veroorzaakt door vitamine C weer.



Figuur 16c: ESR spectrum van het fosfolipide extract van een LPS-behandelde muis (M3). De cirkel geeft de piek veroorzaakt door vitamine C weer.

Figuur 16b geeft het ESR spectrum weer van het fosfolipide extract van de milt van een controle muis (M1). In dit spectrum was het vitamine C signaal duidelijk zichtbaar en het wordt aangegeven door middel van een cirkel.

Figuur 16c stelt het ESR spectrum van het fosfolipide extract van de milt van een LPS-behandelde muis (M3) voor. Dit spectrum liet ook weer duidelijk zien dat het vitamine C signaal aanwezig was.

Als beide spectra met elkaar vergeleken werden, zagen we dat het vitamine C signaal in beide spectra gelijk was, dus dat de piek hoogte en het piek oppervlak gelijk was tussen controle en LPS-behandelde muis.

Figuur 17 toont het piek oppervlak en de piek hoogte van verschillende organen, namelijk de long, nier, lever en milt, van zowel controle (M1-M2) als LPS-behandelde (M3-M4) muizen. Enkel de stalen die een vitamine C piek toonden, werden opgenomen in de grafiek.



Figuur 17: Signaal sterkte van het piek oppervlak en de piek hoogte van het vitamine C signaal voor LPSbehandelde muizen (M3-M4) en controle muizen (M1-M2) voor verschillende organen, namelijk long, nier, lever en milt. Wanneer het piek oppervlak niet berekend is, staat dit aangegeven met \blacktriangle . De signaal sterkte wordt gecompenseerd door de hoeveelheid lipide en dit wordt uitgedrukt in procenten.

Deze grafiek laat zien dat vooral het vitamine C signaal van de milt van M4 een zeer groot piek oppervlak en piek hoogte opleverde. De piek hoogte en het piek oppervlak van het vitamine C signaal voor de milt van de overige drie muizen, was lager dan die voor M4, maar groter in vergelijking met de overige stalen. Het piek oppervlak en de piek hoogte van het vitamine C signaal voor de long en de nier van controle en LPSbehandelde muizen was zeer laag en kon in sommige gevallen niet berekend worden, omdat het signaal te laag was. Dit wordt in de grafiek aangegeven met \blacktriangle . De lever leverde zowel voor de controle muizen als voor de LPS-behandelde muizen een laag vitmaine C signaal op. Een opvallend verschil was zichtbaar in de piekhoogte van het vitamine C signaal. Deze was namelijk groter voor de controle muizen.

Figuur 18a en 18b geven specifiek de resultaten van de *in vivo* spin trapping weer voor de lever en milt van de LPS-behandelde en controle muizen. Enkel deze twee organen worden extra besproken omdat in dit geval alle dieren (zowel beide controle muizen als beide LPS-behandelde muizen) een vitamine C signaal opleverden.

Figuur 18a geeft het piek oppervlak van het vitamine C signaal van de milt en de lever weer. We zien dat er tussen de lever en milt wel een verschil was in piek oppervlak, het piek oppervlak van de milt was namelijk groter dan die van de lever. Maar er was geen verschil in piek oppervlak tussen telkens de controle en de LPS-behandelde muizen van ieder orgaan.



Figuur 18a: Signaal sterkte van het piek oppervlak van het vitamine C signaal voor LPS-behandelde muizen (M3-M4) en controle muizen (M1-M2) voor de lever en milt. De signaal sterkte wordt gecompenseerd door de hoeveelheid fosfolipide en dit wordt uitgedrukt in procenten.



Figuur 18b: Signaal sterkte van de piek hoogte van het vitamine C signaal voor LPS-behandelde muizen (M3-M4) en controle muizen (M1-M2) voor de lever en milt. De signaal sterkte wordt gecompenseerd door de hoeveelheid fosfolipide en dit wordt uitgedrukt in procenten.

Figuur 18b geeft de piek hoogte van het vitamine C signaal voor de milt en de lever weer. Hier zagen we dat er geen verschil was in piek hoogte tussen controle en LPSbehandelde muizen voor zowel de lever als de milt. Er was wel een verschil tussen de piek hoogte van de lever en de milt. Deze van de milt was groter dan die van de lever.

3.6. Malondialdehyde bepaling

De MDA bepaling werd uitgevoerd om na te gaan hoeveel schade er was aangericht door ROS na toediening van LPS of fysiologische zoutoplossing, omdat MDA een eindproduct is van lipide peroxidatie. Aangezien deze techniek nog niet op punt was gesteld, werden er verschillende experimenten uitgevoerd om dit te verkrijgen. Eerst werd getracht de MDA concentratie te bepalen na butanol extractie. Aangezien dit een slechte ijklijn opleverde (figuur 19), werd de MDA concentratie bepaald zonder butanol extractie (figuur 21).

3.6.1. Malondialdehyde bepaling met butanol extractie

Om de hoeveelheid MDA, die aanwezig was in de long extracten van LPSbehandelde en controle muizen, te bepalen, werd er een MDA bepaling uitgevoerd waarbij gebruik gemaakt werd van een butanol extractie. Dit leverde een MDA ijklijn op, waarvan figuur 19 een voorbeeld is. De vergelijking die verkregen werd bij de ijklijn, werd gebruikt om de MDA concentratie van de organen te bepalen. De absorptie van de stalen, verkregen via fotospectroscopie, werd ingevuld in de vergelijking voor de ywaarde, waardoor de x-waarde, de MDA concentratie, berekend kon worden. Deze waarden werden vervolgens gecompenseerd voor de hoeveelheid fosfolipide die verkregen werd uit iedere staal.



Figuur 19: Malondialdehyde ijklijn waarbij ieder punt bepaald wordt uit een butanol-oplossing door middel van een fostospectrometer bij een golflengte van 535 nm.



Figuur 20: Malondialdehyde concentratie van de longen van LPS-behandelde muizen (M3-M4) en controle muizen (M1-M2).

Voor de long extracten leverde dit een ijklijn op met de vergelijking y = 0,0422x + 0,0504. Het resultaat van de berekeningen wordt weergegeven in figuur 20. Deze figuur gaf weer dat de MDA concentratie van de long extracten van de LPS-behandelde muizen (M3-M4) laag was in vergelijking met de MDA concentratie van de long extract van M2 (controle muis). Het was echter wel hoger dan de MDA concentratie van het long extract van M1, wat ook een controle muis was. De MDA concentratie van de long extracten van beide LPS-behandelde muizen kwamen overeen, wat niet gezegd kon worden voor de MDA concentratie van de long extracten van de long extracten van de long extracten van beide LPS-behandelde muizen kwamen overeen, wat niet gezegd kon worden voor de MDA concentratie van de long extracten van de long extra

3.6.2. <u>Malondialdehyde bepaling zonder butanol extractie</u>

Zoals beschreven staat in paragraaf 3.6.1 werd ook in dit experiment een MDA ijklijn (figuur 21) opgesteld en aan de hand van de verkregen vergelijking werd de MDA concentratie van het milt extract van LPS-behandelde en controle muizen bepaald. In dit MDA bepalingsexperiment werd geen butanol extractie uitgevoerd.



Figuur 21: Malondialdehyde ijklijn waarbij geen butanol is toegediend tijdens de uitvoering en waarbij ieder punt bepaald wordt uit een water-oplossing door middel van een fostospectrometer bij een golflengte van 535 nm.

Figuur 22 geeft de MDA concentratie van de milt extracten van de LPS-behandelde muizen (M3-M4) en controle muizen (M1-M2) weer. Hier was ook duidelijk te zien dat

de MDA concentratie van het milt extract van M2 (controle muis) het hoogst was. De MDA concentraties van de milt extracten van de LPS-behandelde muizen (M3-M4) was ongeveer gelijk en lag hoger dan die van M1 (controle muis).



Figuur 22: Malondialdehyde concentratie van de milt van LPS-behandelde muizen (M3-M4) en controle muizen (M1-M2).

4. <u>DISCUSSIE</u>

Oxidatieve stress speelt een belangrijke rol in verschillende ziekteprocessen, daarom ook dat het onderzoek naar vrije radicalen een toename in interesse kent. Vroeger was directe detectie van vrije radicalen *in vivo* beperkt omdat de enige beschikbare methode ESR spectroscopie was, wat een lage gevoeligheid heeft voor de reactiviteit van de vrije radicalen en voor de lage concentraties van deze radicalen. Om dit probleem op te lossen, werd er ten eerste gebruik gemaakt van een geschikte spin trap en ten tweede van een geschikte extractie methode [9].

In dit onderzoek werd gebruik gemaakt van de spin trap POBN, omdat deze spin trap zuurstofradicalen vangt. Volgens Liu et al. [35] is de spin trap POBN stabiel *in vivo* en wordt het gelijkmatig verdeeld over de lever en het hart van muizen. De spin trap POBN wordt volgens deze studie ook snel geabsorbeerd na i.p. injectie. Na 1 uur was ongeveer 50% van de spin trap nog aanwezig in de organen om vrije radicalen te vangen. De spin trap POBN werd ook gekozen voor dit onderzoek omdat in de literatuur beschreven staat dat, na blootstelling van proefdieren aan LPS, asbest of luchtverontreinigingpartikels er radicaal-adducten gevonden zijn die gevormd werden door lipide peroxidatie. Dit zijn pentyl of ethyl radicalen die ontstaan uit de decompositie van de hydroperoxide, wat een zuurstofradicaal is [36-38]. In de studie van Linares [37] en in meerdere studies van Kadiiska [36, 38-39] staat ook uitvoerig beschreven dat, indien de spin trap POBN niet wordt toegediend, de gevormde reactieve zuurstofradicalen niet gemeten kunnen worden door middel van ESR spectroscopie, wat erop wijst dat de spin trap POBN een vereiste is voor de detectie van zuurstofradicalen.

Voor de orgaan extractie werd in dit onderzoek gebruik gemaakt van een homogenizerende buffer die de ijzerchelator, 2,2'-dipridyl, bevat. Dit werd gedaan omdat zowel Sato [9] als Kadiiska [36, 39] vermelden in hun studies dat 2,2'-dipridyl de ijzergecatalyseerde vrije radicaal formatie verhindert, waardoor *ex vivo* radicaal productie vermeden wordt.

Om na te gaan of de gekozen orgaan opwerkingsmethode functioneerde, werden eerst controle experimenten uitgevoerd. Wanneer $FeSO_4$, H_2O_2 en POBN toegediend werden aan het orgaan extract leverde dit een hoog signaal op. Waneer enkel POBN of POBN en H_2O_2 werd toegediend, leverde dit een laag signaal op (figuren 9-10). Dit wijst erop dat indien er radicalen geproduceerd worden, deze ook gevangen zullen worden door POBN en dat de opwerkingsmethode voor de organen werkt, zonder dat er *ex vivo* radicaal productie optreedt.

In een volgende stap werd nagaan wat de invloed van invriezen was op het ESR signaal. Dit werd gedaan om na te gaan of de orgaan extracten bewaard konden worden, voor het geval dat ze pas op een later tijdstip doorgemeten konden worden.

Figuren 12 en 13 toonden aan dat de signaal sterkte weinig afnam over tijd als het orgaan extract bewaard bleef bij -20 °C. Dit toont dus aan dat indien de orgaan extracten niet direct na opwerking doorgemeten kunnen worden, toch hetzelfde ESR signaal bekomen wordt.

De opsplitsingconstante voor het waterstof- en stikstofatoom van de POBN radicaal-adducten die verkregen zijn tijdens de positieve controle en de bepaling van het invries effect, komen sterk overeen, namelijk $A_{H}=2,63 \pm 0,11$ G en $A_{N}=14,80 \pm 0,12$ G (tabel 3-4). In de studie van Sato [9], waarin ratten een i.t. instillatie met LPS gevolgd door een i.p. injectie met POBN ondergingen, zijn overeenkomstige opsplitsingconstanten gevonden. Volgens deze studie komen deze opsplitsingconstanten overeen met de opsplitsingconstanten van radicalen die het resultaat zijn van lipide peroxidatie. Dit toont ook aan dat de vrije radicalen, die geproduceerd werden in de FeSO₄/H₂O₂/POBN conditie van de positieve controle, het resultaat zijn van de interactie met fosfolipiden en niet van een onderlinge reactie (tabel 3). Door gebruik te maken van de spin trap database werd nog eens bevestigd dat de bekomen vrije radicalen, radicalen zijn met een centraal koolstofatoom, zoals ook vermeld wordt in een studie van Sato [9] en in één van Lai [40]. In de studies van Sato [9] en Lai [40] werd ook aangegeven dat dit soort radicaal reageerde met de vetzuren arachidonzuur en linolzuur.

Bij de bepaling van het invries effect zagen we dat het ESR signaal breder werd over tijd. Dit kan verklaard worden doordat er meerdere soorten radicalen gevormd werden over tijd, die reageerden met POBN, waardoor er een onderliggend signaal ontstond. Maar dit onderliggend signaal was te zwak om een verandering te veroorzaken in de opsplitsingconstanten. Aangezien de studie van Sato [9] dezelfde orgaan opwerkingsmethode hanteerde en gebruik maakte van dezelfde spin trap, namelijk POBN, wijst dit erop dat onder deze omstandigheden, namelijk blootstelling aan LPS gevolgd door toediening van POBN, eenzelfde soort vrije radicaal geproduceerd wordt en dat in deze *in vivo* spin trapping studie deze radicalen normaal gesproken ook teruggevonden moeten worden.

Vervolgens werd het eigenlijke *in vivo* spin trapping experiment uitgevoerd. Voor dit experiment werden 4 muizen gebruikt, waarvan twee een i.t. instillatie met LPS (100 μ g/ muis in 300 μ l volume) en de twee overige een i.t. instillatie met eenzelfde hoeveelheid fysiologische zoutoplossing ondergingen. Vervolgens ondergingen ze een i.p. injectie met de spin trap POBN (6 mmol/ kg), waarna ze opgeofferd werden. Verschillende organen, onder andere de longen, hart, lever, nieren en milt werden opgewerkt en met het bekomen fosfolipide extract werd vervolgens een ESR meting uitgevoerd.

De ESR spectra van de verschillende organen vertoonden voor zowel de LPSbehandelde als de controle muizen geen POBN signaal (figuur 14). Het ontbreken van een POBN signaal is niet het gevolg van een te lage concentratie radicaal-adducten aangezien de fosfolipide concentratie van de orgaan extracten van deze muizen, zowel de LPS-behandelde als controle muizen, gelijk was aan deze van de orgaan extracten van de LPS-behandelde en controle muizen van de positieve controle (figuur 11, 15). De orgaan extracten van de muizen van de positieve controle (figuur 11, 15). De orgaan op (figuur 9a-9c).

Er zijn verschillende andere studies waarin men ook getracht heeft door middel van *in vivo* spin trapping, met de spin trap POBN, vrije zuurstofradicalen te vangen. In de studie van Sato [9] werden ratten blootgesteld aan LPS door middel van i.t. instillatie. In de studies van Kadiiska [36, 38] werden ratten door middel van een i.t. instillatie blootgesteld aan asbest of aan vliegas afkomstig van olie. De dosis die in deze studies werd toegediend aan de ratten was telkens lager dan de dosis die in deze studie werd toegediend aan de muizen, namelijk 500 μ g/ rat. In alle drie de studies werd vervolgens ook POBN door middel van een i.p. injectie toegediend aan de ratten. Sato et al. [9] gebruikte eenzelfde dosis POBN als in deze studie, terwijl Kadiiska et al. [36, 38] een hogere dosis hanteerde, namelijk 8 mmol/ kg lichaamsgewicht. Deze hogere dosis POBN kan verklaren waarom in de studies van Kadiiska [36, 38] wel een POBN signaal werd teruggevonden, aangezien er meer radicaal-adducten gevormd konden worden. De POBN injectie nam in iedere studie echter plaats op een ander tijdstip in vergelijking met deze studie. In de studie van Sato [9] werd POBN al na 6 uur toegediend, terwijl in deze studie de muizen pas na 23 uur de spin trap POBN toegediend kregen. Het kan zijn dat 23 uur na toediening van LPS het grootste deel van de gevormde lipide radicalen al weggereageerd waren, waardoor de concentratie van de gevormde radicaal-adducten te laag was om geregistreerd te worden door middel van ESR spectroscopie. Kadiiska et al. [36, 38] daarentegen dienden de spin trap POBN pas toe na 24 uur. Bovendien werden in al deze studies enkel de longen opgewerkt, waardoor het effect van blootstelling aan LPS, asbest of vliegas afkomstig van olie op de andere organen buiten de long, niet gekend is.

Niet enkel de behandeling van de proefdieren verschilt, ook de verwerking van de organen verschilt. Zowel in de studie van Sato [9] als in die van Kadiiska [36, 38] werd een homogeniserende buffer gebruikt die bestond uit dezelfde componenten als deze gebruikt in deze studie Het verschil met deze studie zit echter in de verhoudingen van de verschillende componenten. Kadiiska et al. [36, 38] gebruikte een homogeniserende buffer die bestond uit dezelfde componenten als de buffer gebruikt in deze studie, maar waarbij er een grotere hoeveelheid van de ijzerchelator 2,2'-dipridyl werd gebuikt. In de studie van Sato [9] werd een gelijke hoeveelheid 2,2'-dipridyl gebruikt. Bovendien werden de ESR metingen in de studies van Sato [9] en Kadiiska [36, 38] met andere ESR instellingen uitgevoerd.

Zowel in de studie van Sato [9] als in de studies van Kadiiska [36, 38] werden uit de long extracten van de ratten die behandeld werden met LPS, asbest, vliegas afkomstig van olie en POBN een duidelijk ESR signaal, dat bestond uit een POBN spectrum, verkregen. De long extracten van de controle ratten, die in plaats van een i.t. instillatie met LPS, asbest of vliegas afkomstig van olie, een i.t. instillatie met fysiologische zoutoplossing ontvingen, leverden ook een POBN signaal op, maar dit was aanzienlijk lager in vergelijking met de ratten die blootgesteld werden aan LPS, asbest of vliegas afkomstig van olie. Het grootste verschil tussen de studie van Sato [9] en deze studie is de lagere dosis LPS (500 μ g/ rat) die toegediend werd en het verschil in tijdsinterval tussen de toediening van LPS en de spin trap POBN. Het grootste verschil met de studies van Kadiiska [36, 38] is het verschil in hoeveelheid 2,2'-dipridyl die gebruikt werd tijdens de opwerking van de longen en de dosis POBN die toegediend werd aan de ratten. Ondanks deze verschillen hanteren deze drie studies een gelijkaardige methoden, die bovendien gelijkt op de methode gebruikt in dit onderzoek, voor het verkrijgen van radicaal-adducten met de spin trap POBN. Daarom is het merkwaardig dat in dit onderzoek geen POBN signaal teruggevonden werd en dit in geen enkel orgaan.

In dit onderzoek werd wel een vitamine C signaal verkregen uit de extracten van verschillende organen (figuren 16b-16c). Dit signaal werd niet teruggevonden in de bovenvermelde studies van Sato [9] en Kadiiska [36, 38]. Dit vitamine C signaal werd het duidelijkst teruggevonden in de orgaan extracten van de lever en de milt en dit voor zowel de LPS-behandeld als controle muizen (figuur 17). Het vitamine C signaal was het grootst in de milt. De piek hoogte van het vitamine C signaal van de milt van de LPSbehandelde muizen was ook groter dan dat van de controle muizen. Voor de lever werd geen verschil in piek hoogte teruggevonden tussen controle en LPS-behandeld muizen (figuur 18b). Dit geldt ook voor het piek oppervlak (figuur 18a). Het feit dat het teruggevonden vitamine C signaal groter is in de milt kan niet verklaard worden door het feit dat in de milt een grotere hoeveelheid vitamine C beschikbaar is, dat kan optreden als antioxidant, aangezien dit in geen enkele studie is nagegaan. Het is enkel bekend dat de nieren een lage concentratie vitamine C bevatten aangezien vitamine C een wateroplosbaar vitamine is, waardoor het makkelijk uitgescheiden kan worden via urine [41]. Dit wijst er dus waarschijnlijk op dat er in de milt een grotere vrije radicaal productie was in reactie op LPS instillatie en dat vitamine C trachtte deze radicalen onschadelijk te maken. Dit kan echter niet met zekerheid gezegd worden aangezien de vitamine C concentratie in beide organen niet gekend is.

Het vitamine C signaal werd wel teruggevonden in de studie van Dikalova [42] en in een studie van Chamulitrat [43]. In de studie van Dikalova [42] ontvingen ratten natriumformaat en POBN door middel van i.p. injectie terwijl in de studie van Chamulitrat [43] de ratten werden blootgesteld aan LPS door middel van een i.v. injectie, waarna ze 30 minuten later een i.v. injectie met POBN en ethanol ontvingen. In beide studies werden de ratten aan een hogere dosis LPS (0,5 mg/ kg lichaamsgewicht) of natriumformaat (2 g/ kg lichaamsgewicht) blootgesteld, dan de muizen die in dit onderzoek blootgesteld werden aan LPS. Ook de dosis POBN die de ratten ontvingen, was hoger dan in dit onderzoek, namelijk 1,5 g/ kg lichaamsgewicht in de studie van Dikalova [42] en 150 mg/ ml in de studie van Chamulitrat [43]. Vervolgens werd in beide studies op verschillende tijdstippen galsap afgenomen van deze ratten. Dit galsap werd direct opgeslagen in een oplossing bestaande uit 2,2'-dipridyl en bathocuproinedisulfonaatzuur dinatriumzout hydraat. Deze laatste is een koperchelator en verhindert ex vivo formatie van vrije radicalen. De galsappen van de ratten uit de studie van Dikalova [42] leverden een POBN signaal op. Dit ESR spectrum vertoonde een bijkomend klein doublet signaal, wat volgens onder andere Dikalova [42] vaak teruggevonden wordt in galsapstalen. Dit bijkomend signaal werd veroorzaakt door vitamine C. In de studie van Chamulitrat [43] leverden de galsappen van de ratten een ESR spectrum op dat bestond uit een α -hydroxyethyl adduct, wat een ethanol radicaaladduct is, een radicaal-adduct met een centraal koolstofatoom, dit radicaal onstond niet uit ethanol, en een vitamine C radicaal.

Dit toont aan dat in verschillende studies het vitamine C signaal teruggevonden werd, maar dit enkel in galsap, niet in orgaan extracten zoals in dit onderzoek is voorgekomen. Dit is dus de eerste keer dat het vitamine C signaal teruggevonden werd in een orgaan extract. Dit vitamine C signaal wordt het sterkst teruggevonden in de milt van LPS-behandeld muizen.

In de studie van Roginsky [44] wordt vermeld dat het vitamine C radicaal een zeer typerend ESR spectrum oplevert als vitamine C reageert met vrije radicalen. Dit signaal wordt ook makkelijk teruggevonden in biologische weefsels en de intensiteit van het signaal neemt toe wanneer er onder andere intoxicatie met bacteriële endotoxinen, zoals LPS, heeft plaatsgevonden. Dit is volgens Roginsky een algemeen biologisch fenomeen. Bovendien kan het vitamine C signaal al bij zeer lage concentraties (1 x 10^{-8} M) gedetecteerd worden en zelfs tegen de achtergrond van zeer intense en complexe ESR spectra is het vitamine C signaal duidelijk zichtbaar.

Dit toont aan dat het vitamine C signaal dat teruggevonden werd in dit onderzoek niet zo misplaatst is als eerst gedacht werd. Het wijst wel nogeens op het feit dat de spin trap POBN niet reageerde met de gevormde radicalen en dat het gevonden ESR signaal het resultaat is van een biologische reactie.

Vervolgens werd een MDA bepaling uitgevoerd op de extracten van de long en de milt van LPS-behandelde en controle muizen. Dit experiment werd uitgevoerd om na te gaan of er wel degelijk lipide peroxidatie had plaatsgevonden. Dit experiment moest dus de resultaten, bekomen met *in vivo* spin trapping, verduidelijken.

In de literatuur [45-47] werden verschillende methodes gebruikt voor het verkrijgen van de MDA concentratie van monsters. Deze kwamen echter niet overeen, daarom dat in dit onderzoek eerst een aantal experimenten werd uitgevoerd om zo de techniek op punt te stellen. Het belangrijkste wat uit deze experimenten geleerd kon worden, was het feit dat er geen butanol aan de stalen toegediend moest worden.

De MDA concentratie van de long en milt extracten van LPS-behandelde en controle muizen vertonen gelijkenissen. Hoewel de MDA concentratie in de long extracten lager ligt dan deze in de milt extracten, zien we dat in beide organen de MDA concentratie het hoogst is in M2 (controle muis). Hiervoor is geen verklaring. Beide LPS-behandelde muizen hebben gelijke MDA concentraties en dit geldt voor elk orgaan. Bovendien liggen deze waarden hoger dan deze voor M1 (controle muis).

Het verschil in MDA concentratie tussen long en milt extract kan het resultaat zijn van het feit dat de MDA bepaling van de long extracten werd uitgevoerd door middel van een butanol extractie, terwijl dit niet het geval was bij de milt extracten. Het kan ook liggen aan het feit dat er in de milt daadwerkelijk meer lipide peroxidatie is opgetreden, aangezien in de *in vivo* spin trapping experimenten in dit orgaan zowel voor de controle als voor de LPS-behandelde muizen een vitamine C signaal werd teruggevonden. Bovendien was dit vitamine C signaal groter voor de LPS-behandelde muizen, wat overeenkomt met de MDA concentraties. Deze zijn namelijk, met uitzondering van M2 (controle muis), hoger voor de LPS-behandelde muizen dan voor de controle muizen. Er zijn ook verschillende studies waarbij men gebruik maakte van spin labels in plaats van spin traps om zo de hoeveelheid vrije radicalen, die geproduceerd werden, te bepalen.

In de studie van Sano [33] werd de spin label CmP gebruikt om de hoeveelheid oxidatieve stress, die geproduceerd werd tijdens diabetes, te bepalen. Diabetes type 1 werd in deze studie geïnduceerd door de ratten bloot te stellen aan streptozotocin door middel van een i.v. injectie. Streptozotocin is een natuurlijk voorkomend chemische verbinding dat toxisch is voor de insuline-producerende β-cellen van de pancreas. In de studie van Yamada [48] werden de spin labels CmP en MC-PROXYL gebruikt om na te gaan of er vrije radicalen geproduceerd werden in reactie op de carcinogenische substantie diëthylnitrosamine, wat door middel van een i.p. injectie werd toegediend aan de ratten. Deze twee spin labels zijn in dit onderzoek gekozen omdat ze een verschillende membraanpermeabiliteit hebben. In de studie van Kaimul Ahsan [49] werd gebruik gemaakt van de spin label CAT-1 om na te gaan hoeveel reactieve zuurstof soorten er ontstonden in reactie op uitstootpartikels van diesel en wat de rol van thioredoxin-1, een antioxidant, in dit proces was. In deze studie werden controle muizen en hTrx-1transgene muizen, waarbij het humane thioredoxin-1 tot overexpressie gebracht werd, gebruikt. In iedere studie werden de spin labels ingebracht door middel van een i.v. injectie, enkel in de studie van Kaimul Ahsan [49] werd de spin trap door middel van een i.t. instillatie aangebracht. Vervolgens werd de intensiteit van de spin labels bepaald door middel van ESR spectroscopie. In de studie van Sano [33] leverde dit een spin clearence rate op voor het CmP signaal dat groter was in de diabetische ratten dan in de controle ratten, die geen diabetes hadden. Dit wijst erop dat de oxidatieve stress in deze ratten was toegenomen en dat diabetes dus geassocieerd is met een toename in oxidatieve stress. In de studie van Yamada [48] leverde enkel de spin label MC-PROXYL een verschil in spin clearence rate tussen de diëthylnitrosamine-behandelde ratten en de controle ratten. Bovendien werden er enkel vrije radicalen gevormd in het bovenste deel van het abdomen, waarschijnlijk in het leverweefsel. Yamada vermeldt ook dat de vorming van deze vrije radicalen intracellulair was omdat er enkel een significante daling in signaal intensiteit zichtbaar was met de spin label MC-PROXYL en niet met de spin label CmP. Dus ten gevolge van diëthylnitrosamine blootstelling zal er een toename in vrije radicaal productie plaatsvinden, waarschijnlijk in het leverweefsel. De studie van Kaimul Ahsan [49] leverde een ESR spectra op die aantoonden dat het CAT-1 signaal sneller afnam in de controle groep die blootgesteld werd aan de uitstootpartikels van diesel dan in de hTrx-1-transgene muis groep. Dit wijst erop dat hTrx een beschermende rol heeft tegen oxidatieve stress veroorzaakt door de uitstootpartikels van diesel in de longen.

Sano [33] vermeldt ook dat indien er andere nitroxide spin labels zouden bestaan, die specifiek naar bepaalde organen zouden bewegen om daar te reageren met gevormde vrije radicalen, dit nog meer nuttige informatie zou opleveren.

Berliner et al [50] vermeldt dat het meten van zuurstof radicalen, die gevormd zijn in bloed, door middel van spin labels zelden een resultaat oplevert, aangezien het signaal na enkele minuten al verdwenen is.

Deze verschillende *in vivo* spin labeling studies tonen aan dat onderzoek naar reactieve zuurstof soorten ook mogelijk is door gebruik te maken van spin labels in plaats van spin traps. Het toont ook aan dat er diverse spin labels zijn die elk een eigen specificiteit hebben. Nog een voordeel is het feit dat lagere concentraties gebruikt kunnen worden, waardoor het ook minder toxisch is voor het proefdier. Een nadeel dan weer is dat enkel de hoeveelheid radicaal en de snelheid waarmee de radicalen geproduceerd worden bepaald kan worden. Welk soort radicaal gevormd wordt kan niet bepaald worden door gebruik te maken van spin labels, enkel door middel van spin traps.

Uit mijn onderzoek kan geconcludeerd worden dat de opwerkingsmethode, zoals toegepast voor de *in vivo* spin trappings techniek van de organen, juist is, aangezien de positieve controle een groot POBN signaal opleverde en dit signaal afkomstig was van een lipide radicaal. Bovendien toonde de fosfaatbepaling van de positieve controle en van de *in vivo* spin trapping experiment aan dat het ontbreken van een POBN signaal in het *in vivo* spin trapping experiment niet het geval was van een slechte opwerking van de organen, aangezien de fosfaatbepalingen overeen kwamen. Waarom het *in vivo* spin trapping experiment geen POBN signaal opleverde is niet duidelijk, want volgens de onderzoeksgroep van Sato [9] zou dit wel het geval moeten zijn.

Daarom is het misschien beter om een andere techniek uit te proberen, namelijk in plaats van de spin trap POBN te gebruiken, een spin label toe te passen. Aan de hand van de literatuur zou de spin label CAT-1 het meest geschikt zijn voor dit onderzoek omdat dit spin label membraan impermeabel is waardoor het enkel reageert met nitroxyl derivaten, zoals het hydroxyl radicaal, die gevormd worden door het openbarsten van celmembranen [49]. Hierdoor kan men er zeker vanuit gaan dat de geproduceerde radicalen, lipide radicalen zijn. De hoeveelheid radicaal en de snelheid van productie kan zo achterhaald worden. Dit kan meer inzicht leveren in het proces van ROS generatie ten gevolge van LPS blootstelling. Aan de hand hiervan kunnen de bekomen *in vivo* spin trapping resultaten misschien verklaard worden.

REFERENTIES

- 1. Albrecht C, Knaapen AM, Becker A, Hohr D, Haberzettl P, van Schooten FJ, Borm PJ, Schins RP. The crucial role of particle surface reactivity in respirable quartzinduced reactive oxygen/nitrogen species formation and APE/Ref-1 induction in rat lung, Respir Res 2005; 6: 129.
- 2. Knaapen AM, Gungor N, Schins RP, Borm PJ, Van Schooten FJ. Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review, Mutagenesis 2006; 21: 225-236.
- 3. Knaapen AM, Borm PJ, Albrecht C, Schins RP. Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms, Int J Cancer 2004; 109: 799-809.
- 4. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Cell injury, adaptation, and death: IN: Basic Pathology. Saunders, 7th edition 2003; 9-11.
- 5. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies, APMIS 2007; 115: 81-103.
- 6. Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodelling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases, J Biochem Mol Biol 2003; 36: 95-109.
- 7. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress, Nutr Metab Cardiovasc Dis 2005; 15: 316-328.
- 8. <u>http://www.axxora.com/lipid_peroxidation-ALX-280-018/opfa.1.1.ALX-280-018.1140.4.1.html;</u> geraadpleegd april 2007.
- 9. Sato K, Kadiiska MB, Chio AJ, Corbett J, Fann YC, Holland SM, Thurman RG, Mason RP. *In vivo* lipid-derived free radical formation by NADPH oxidase in acute lung injury induced by lipopolysaccharide: a model for ARDS, FASEB J 2002; 16: 1713-1720.
- Greenberg SS, Jie O, Zhao X, Wang JF. Role of PKC and tyrosine kinase in ethanolmediated inhibition of LPS-inducible nitric oxide synthase, ALCOHOL 1998; 16: 167–175.
- 11. Sang H, Wallis GL, Steward CA, Kotake Y. Expression of cytokines and activation of transcription factors in lipopolysaccharide-administered rats and their inhibition by phenyl N-tert-butylnitrone (PBN), Archives of Biochemistry and Biophysics 1999; 363: 341–348.
- 12. Sanlioglu S, Williams CM, Samavati L, Butler NS, Wang G, McCray PB, Ritchie TC, Hunninghake GW, Zandi E, Engelhardt JF. Lipopolysaccharide induces Rac1dependent reactive oxygen species formation and coordinates tumor necrosis factoralpha secretion through IKK regulation of NF-kappaB, J Biol Chem 2001; 276: 30188-30198.
- 13. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Cell injury, adaptation, and death: IN: Basic Pathology. Saunders, 7th edition 2003; 99-100.
- 14. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Pathogens, infection, and innate immunity: IN: Molecular biology of the cell. Garland Science, 4th edition 2002; 1458-1459.
- 15. Nairn R, Helbert M. Innate immunity/ phagocytes: IN: Immunology for medical students. Mosby, 1st edition 2002; 172.

- 16. Nakai K, Kadiiska MB, Jiang JJ, Stadler K, Mason RP. Free radical production requires both inducible nitric oxide synthase and xanthine oxidase in LPS-treated skin, Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 4616-4621.
- 17. <u>http://www.science.siu.edu/microbiology/micr201/chapter4N.html;</u> geraadpleegd februari 2007.
- 18. <u>http://www.emdbiosciences.com/html/CBC/NFKB_NFkappaB_IKB_IKK_Pathway</u> <u>Products.htm;</u> geraadpleegd februari 2007.
- 19. http://www.biocarta.com/pathfiles/h_nfkbPathway.asp; geraadpleegd februari 2007.
- 20. Halliwel B, Gutteridge JMC. Detection of free radicals and other reactive species: trapping and fingerprinting: IN: Free radicals in biology and medicine. Oxford, 3rd edition 1999; 354-355.
- 21. Spin trapping: IN: IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 2nd Edition 1997. http://www.iupac.org/goldbook/S05878.pdf; geraadpleegd maart 2007.
- 22. Rosen GM, Halpern HJ, Brunsting LA, Spencer DP, Strauss KE, Bowman MK, Wechsler AS. Direct measurement of nitroxide pharmacokinetics in isolated hearts situated in a low-frequency electron spin resonance spectrometer: Implications for spin trapping and *in vivo* oxymetry, Proc Natl Acad Sci 1988; 85: 7772-7776.
- 23. Gaffney BJ. Electron spin resonance of biomolecules. Department of Biological Sciences. BIO Unit 1. Tallahassee, USA; 10-14.
- 24. Rhodes CJ. Electron spin resonance: some applications for the biological and environmental sciences, Annu Rep Prog Chem Sect C: Phys Chem 2004; 100: 149-155.
- 25. Rhodes CJ. Chemistry of spin-trapping: IN: Toxicology of the human environment, the critical role of free radicals. Taylor and Francis, 2000; 7-15.
- 26. <u>http://www.axxora.com/spin_traps__spin_labels-ALX-430-091/opfa.1.1.ALX-430-091.1954.4.1.html;</u> geraadpleegd maart 2007.
- 27. Sonta T, Inoguchi T, Tsubouchi H, Sekiguchi N, Kobayashi K, Matsumoto S, Utsumi H, Nawata H. Evidence for contribution of vascular NAD(P)H oxidase to increased oxidative stress in animal models of diabetes and obesity, Free Radic Biol Med 2004; 37: 115-123.
- 28. Gerson F, Huber W. Nitroxyls as spin labels and spin adducts: IN: Electron Spin Resonance Spectroscopy of Organic Radicals, Wiley-VCH 2003; 405-409.
- 29. Aszalos A. Electron spin resonance spectroscopy: IN: Modern Analysis of Antibodies. CRC Press 1986; 27: 183-184.
- 30. Utsumi H, Yamada K. *In vivo* electron spin resonance-computed tomography/nitroxyl probe technique for non-invasive analysis of oxidative injuries, Arch Biochem Biophys 2003; 416: 1-8.
- 31. Okajo A, Matsumoto K, Mitchell JB. Competition of nitroxyl contrast agents as an *in vivo* tissue redox probe: comparison of pharmacokinetics by the bile flow monitoring (BFM) and blood circulating monitoring (BCM) methods using X-band EPR and simulation of decay profiles, Magn Reson Med 2006; 56: 422-431.
- 32. <u>http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/C5151;</u> geraadpleegd mei 2007.
- 33. Sano T, Umeda F, Hashimoto T, Nawata H, Utsumi H. Oxidative stress measurement by *in vivo* electron spin resonance spectroscopy in rats with streptozotocin-induced diabetes, Diabetologia 1998; 41: 1355-1360.

- 34. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* in cell culture: how should you do it and what do the results mean? Brit J Pharmacol 2004; 142: 231–255.
- 35. Liu KJ, Kotake Y, Lee M, Miyake M, Sugden K, Yu Z, Swartz HM. Highperformance liquid chromatography study of the pharmacokinetics of various spin traps for application to *in vivo* spin trapping, Free Radic Biol Med 1999; 27: 82-89.
- 36. Kadiiska MB, Ghio AJ, Mason RP. ESR investigation of the oxidative damage in lungs caused by asbestos and air pollution particles, Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2004; 60: 1371-1377.
- 37. Linares E, Nakao LS, Augusto O, Kadiiska MB. EPR studies of *in vivo* radical production by lipopolysaccharide: potential role of iron mobilized from iron-nitrosyl complexes, Free Radic Biol Med 2003; 34: 766-773.
- 38. Kadiiska MB, Mason RP, Dreher KL, Costa DL, Ghio AJ. *In vivo* evidence of free radical formation in the rat lung after exposure to an emission source air pollution particle, Chem Res Toxicol 1997; 10: 1104-1108.
- 39. Kadiiska MB, Mason RP. Ethylene glycol generates free radical metabolites in rats: an ESR *in vivo* spin trapping investigation, Chem Res Toxicol 2000; 13: 1187-1191.
- 40. Lai CS, Piette LH. Spin-trapping studies of hydroxyl radical production involved in lipid peroxidation, Arch Biochem Biophys 1978; 190: 27-38.
- 41. Boron WF, Boulpaep EL. Metabolism and nutrition: IN: Medical physiology. Saunders, 1st edition 2003; 1226-1227.
- 42. Dikalova AE, Kadiiska MB, Mason RP. An *in vivo* ESR spin-trapping study: free radical generation in rats from formate intoxication--role of the Fenton reaction, Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 13549-13553.
- 43. Chamulitrat W, Carnal J, Reed NM, Spitzer JJ. *In vivo* endotoxin enhances biliary ethanol-dependent free radical generation, Am J Physiol 1998; 274: 653-661.
- 44. Roginsky VA, Stegmann HB. Ascorbyl radical as natural indicator of oxidative stress: quantitative regularities, Free Radic Biol Med 1994; 17: 93-103.
- 45. Wang YM, Peng SQ, Zhou Q, Wang MW, Yan CH, Wang GQ, Yang HY. The oxidative damage of butenolide to isolated erythrocyte membranes, Toxicol In Vitro 2007; 21: 863-869.
- 46. Buege JKA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation, Meth enzymol 1978; 52: 302–301.
- 47. Oxenkrug GF, Requintina PJ. N-acetyldopamine inhibits rat brain lipid peroxidation induced by lipopolysaccharide, Ann N Y Acad Sci 2005; 1053: 394-399.
- 48. Yamada K, Yamamiya I, Utsumi H. *In vivo* detection of free radicals induced by diethylnitrosamine in rat liver tissue, Free Radic Biol Med 2006; 40: 2040-2046.
- 49. Kaimul Ahsan M, Nakamura H, Tanito M, Yamada K, Utsumi H, Yodoi J. Thioredoxin-1 suppresses lung injury and apoptosis induced by diesel exhaust particles (DEP) by scavenging reactive oxygen species and by inhibiting DEP-induced downregulation of Akt, Free Radic Biol Med 2005; 39: 1549-1559.
- 50. Berliner LJ, Khramtsov V, Fujii H, Clanton TL. Unique *in vivo* applications of spin traps, Free Radic Biol Med 2001; 30: 489-499.

<u>BIJLAGE 1</u>

Voor het berekenen van het piek oppervlak, de piek hoogte en de opsplitsingconstante gaat men als volgt te werk. De gewenste spectra worden ingevoerd in het WinEPR spectrum manipulatie programma door in het menu file, load te selecteren. Om de spectra zichtbaar te maken, wordt 1D-processing geselecteerd in het WinEPR system menu. Hierna wordt als eerste de baseline gecorrigeerd, door in het 1Dprocessing menu voor baseline correction te kiezen. Vervolgens wordt het gewenste gebied geselecteerd door in het baseline correction menu define region te selecteren. Hierna wordt opnieuw in hetzelfde menu function en daarna sixth-order geselecteerd. Na substract te selecteren, zal de baseline gecorrigeerd zijn. Vervolgens wordt return geselecteerd, waardoor het 1D-processing menu terug verschijnt.

Om het piek oppervlak te berekenen, wordt in het 1D-processing menu voor integrate region gekozen. Het gewenste gebied wordt geselecteerd door in het integration menu te kiezen voor define integrals. Hierna wordt in hetzelfde menu het integraltype geselecteerd, namelijk double. Door vervolgens integral modification en hierna slope & bias te selecteren kan de integraal juist gesteld worden. Vervolgens wordt in het integration menu report gekozen. Dit rapport wordt gebruikt om het piek oppervlak te bereken door de getallen onder DI op te tellen. Door return te selecteren, verschijnt het 1D-processing menu terug.

Om de piek hoogte te bepalen, wordt in het 1D-processing menu voor peak picking gekozen. Vervolgens wordt in dit menu gekozen voor parameter. In het parameter menu moet voor peak sign, both gekozen worden. Met de MAXI en MI kan gevarieerd worden om enkel de gewenste pieken te berekenen. Vervolgens wordt in het peak picking menu gekozen voor report en aan de hand van dit rapport kan de piek hoogte, maar ook de opsplitsingconstante berekend worden. Door het gemiddelde te nemen van de absolute waarden van de getallen die onder intensity staan, wordt de gemiddelde piek hoogte berekenen. Om de opsplitsingconstante voor het waterstof- en stikstofatoom te berekenen worden de getallen onder value (G) gebruikt. Een voorbeeld berekening van het piek oppervlak, de piek hoogte en de opsplitsingconstante zijn terug te vinden in bijlage 2.

BIJLAGE 2

Rapport Integrate Region

Start (G)	End (G)	DI	DI/N
3469,6188	3476,5591	1,040e+007	2,427e-002
3483,7928	3492,1017	1,531e+007	3,571e-002
3499,4330	3506,7644	1,268e+007	2,958e-002

Tabel 5: Rapport Integrate Region

Berekening piek oppervlak:

(1,040e+007) + (1,531e+007) + (1,268e+007) = 3,839e+007

Rapport Peak Picking

Tabel 6: Rapport Peak Picking

Tuber 0. Ruppon Teak Ti	ening		
Nr.	Data Point	Value (G)	Intensity
1	322	3471,4761	3,354e+004
2	333	3472,5513	-3,527e+004
3	347	3473,9198	3,079e+004
4	359	3475,0929	-3,904e+004
5	473	3486,2366	4,369e+004
6	485	3487,4096	-3,227e+004
7	499	3588,7781	3,780e+004
8	511	3489,9511	-3,660e+004
9	626	3501,1926	3,486e+004
10	638	3502,3656	-2,611e+004
11	652	3503,7341	2,868e+004
12	664	3504,9071	-3,231e+004

Berekening gemiddelde piek hoogte:

- Piek 1: ((3,354e+004) + (3,527e+004) + (3,079e+004) + (3,904e+004))/4= 3,466e+004
- Piek 2: ((4,369e+004) + (3,227e+004) + (3,780e+004) + (3,660e+004))/4
 = 3,759e+004
- Piek 3: ((3,486e+004) + (2,611e+004) + (2,868e+004) + (3,231e+004))/4= 3,049e+004

Gemiddelde piekhoogte: ((3,466e+004) + (3,759e+004) + (3,049e+004))/3
 = 3,425e+004

Berekening opsplitsingconstante:



Figuur 23: POBN-OH signaal.

	Value (G)	Gemiddelde piek-dal value (G)
Piek 1	3471,4761	3472,0137
	3472,5513	
	3473,9198	3474,5064
	3475,0929	
Piek 2	3486,2366	3486,8231
	3487,4096	
	3588,7781	3489,3646
	3489,9511	
Piek 3	3501,1926	3501,7791
	3502,3656	
	3503,7341	3543,206
	3504,9071	

Tabel 7: Gemiddelde piek-dal waarden.

- *Opsplitsingconstante waterstofatoom* (A_h)
 - Piek 1: 3472,0137 3474,5064 = (-) 2,4927
 - Piek 2: 3486,8231 3489,3646 = (-) 2,5415
 - Piek 3: 3501,7791 3504,3206 = (-) 2,5415
 - $\circ \quad A_h: (2,4927 + 2,5415 + 2,5415)/3 = 2,525$
- *Opsplitsingconstante stikstofatoom* (A_n)
 - Piek 1-2: ((3472,0137 3486,8231) + (3474,5064 3489,3646))/2= 14,834
 - Piek 2-3: ((3486,8231 3501,7791) + (3489,3646 3504,3206))/2
 = 14,956
 - \circ A_n: (14,834 + 14,956)/2 = 14,895

BIJLAGE 3

Protocol MDA bepaling

- Alvorens te beginnen wordt volgende stockoplossing gemaakt:
 - malondialdehyde stockoplossing (15,95 mmol/ l) (0,005 g/ ml) die vervolgens 1000 keer verdund wordt. Deze verdunde stockoplossing (15,95 µmol/ ml) wordt gebruikt in onderstaand pipetteerschema.
 - TBA reagens: 0,188 g TBA; 0,75 g TCA en 1,1 ml 37% HCl aangevult tot 50 ml met MQ
- Buisjes wassen met 64:1 MQ:salpeterzuur, knikkers met ethanol en epjes niet.
- Maak ijklijn in epjes volgens onderstaand pipetteer schema:

MQ (µl)	Stockoplossing MDA (µl)	MDA concentratie (µM)
1000	0	0
994	6	0,1
987	13	0,2
969	31	0,5
937	63	1
875	125	2
687	313	5
374	626	10

- Voeg 100 µl homogenaat (verkregen na orgaan verwerking) of standaard toe aan 900 µl TBA-reagens in glazen buisjes (15 ml). Dit gebeurt in de zuurkast. Bedek hierna de buizen met knikkers.
- Plaats buizen gedurende 1 uur in het verhittingsblok bij 100 °C.
- Laat buizen vervolgens afkoelen en vervolgens gedurende 20 minuten staan.
- Meet de absorptie van iedere staal door met behulp van een spectrofotometer bij een absorptie van 535nm.

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, de gevraagde informatie in te vullen (en de overeenkomst te ondertekenen en af te geven).

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling: In vivo spin trapping van vrije radicalen ten gevolge van LPS-instillatie in de longen van muizen Richting: Master in de biomedische wetenschappen

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen** Jaar: 2007 in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik 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 mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Ik ga akkoord,

Kimberly Vanhees

Datum: 18.06.2007