

University of Groningen

Free radical detection in living cells with relaxometry

Hamoh, Thamir

DOI:
[10.33612/diss.180852826](https://doi.org/10.33612/diss.180852826)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2021

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Hamoh, T. (2021). *Free radical detection in living cells with relaxometry*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.180852826>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

SAMENVATTING

Voor een aantal ziektes is het bekend dat ze veroorzaakt worden door een overproductie van vrije radicalen in cellen. Een aantal van deze ziektes zijn infertiliteit, kanker, hart- en vaatziekten, Alzheimer en nog veel meer. Daarnaast is er de theorie van vrije radicalen en veroudering, deze theorie beweert dat veroudering wordt veroorzaakt door een opbouw van schade veroorzaakt door de vrije radicalen [1]. Dit onderwerp heeft recentelijk een grote reputatie gekregen door de discussies over of antioxidanten, die voorkomen in zowel voedsel als supplementen, de vrije radicalen neutraliseren. Omdat vrije radicalen een rol hebben in bijna elke ziekte is het belangrijk om middelen te hebben die geoptimaliseerd zijn om de waarden van vrije radicalen in een biologische omgeving te meten.

In dit onderzoek stellen we voor om fluorescerende nanodiamanten (FNDs) te gebruiken als een biosensor om de waarde van vrije radicalen te meten. FNDs hebben een defect die NV-centers heten, deze lijken een veelbelovende methode te zijn voor het detecteren van vrije radicalen. Dit komt doordat deze defecten een magnetisch signaal kunnen omzetten naar een optisch signaal. Diamant magnetometrie combineert de voordelen van fluorescerende kleurstoffen en magnetisch resonantie methodes. In dit onderzoek gebruiken we een specifieke vorm van magnetometrie, namelijk de T1 meting. Deze metingen zijn specifiek gericht op het meten van spin ruis en is daarom perfect voor het meten van vrije radicalen.

In **Hoofdstuk 1** wordt er een generieke introductie voor het veld en het onderwerp van dit proefschrift gegeven. Als eerste introduceerde ik de productie van vrije radicalen, de rol die ze hebben en de schade die ze veroorzaken wanneer er te veel wordt geproduceerd. Daarna introduceer ik kort andere methodes om vrije radicalen te detecteren, zowel direct als indirect, en hun voordelen en beperkingen. Daarna volgt er een introductie over diamant magnetometrie en fluorescerende nanodiamanten als een nieuwe manier om vrije radicalen te detecteren in een biologische omgeving. Als laatste wordt het doel van dit proefschrift en het onderwerp besproken.

Hoofdstuk 2 gaat over wat er gebeurt met de nanodiamanten wanneer ze in aanraking komen met cellen. We hebben gekozen voor gist cellen als een model om te onderzoeken wat er gebeurt met de FNDs tijdens cel deling. Omdat gist cellen maar een beperkt aantal delingen kunnen ondergaan is dit een manier om veroudering te bewerkstelligen. Om deze processen te onderzoeken met diamant

magnetometrie, is het belangrijk om te weten wat er gebeurt met de FNDs tijdens de cel deling. Er zijn vier mogelijkheden waar de FND kan eindigen na de cel deling. Ze kunnen achterblijven in de moeder cel, verplaatsen naar de dochter, uitgescheiden worden of verdelen over zowel moeder als dochter. We observeerde dat in de meeste gevallen de deeltjes aanwezig zijn in zowel moeder als dochter cellen, of uitgescheiden zijn. Het is belangrijk om mee te delen dat de initiële positie van het deeltje effect heeft op waar hij zal eindigen. Als voorbeeld, wanneer een deeltje vlak bij de nucleus wordt gevonden, is de kans groot dat hij bij de moeder blijft. In het geval dat het deeltje vlak bij het membraan wordt gevonden is de kans het grootst dat hij of naar de dochter gaat of wordt uitgescheiden.

In **Hoofdstuk 3** proberen we de mogelijkheid om te richten op een doel te bereiken, dit is belangrijk om accurate informatie te krijgen over de productie van vrije radicalen op specifieke locaties. We hebben de oppervlakte van de FNDs aangepast met nuclear pore complex (NPC) antilichamen die specifiek zijn voor gist cellen. We vergelijken de kale-FNDs met de FNDs-antilichamen. We observeren dat FNDs-antilichamen meer doelgericht zijn. In deze groep werd 70% van de deeltjes na 24 uur gevonden bij de nucleus. Het is belangrijk om mee te delen dat bij langere incubatie tijden, de doelgerichtheid beter wordt.

Een toepassing van diamant magnetometrie was beschreven in **Hoofdstuk 4**. We onderzochten de effecten van schuifspanning op de productie van vrije radicalen in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). We stelden de cellen bloot aan verschillende schuifspanningen en vonden dat, wanneer de cellen blootgesteld werden aan 2 dyne/cm², de productie van NO* hoger wordt en dat dit gemeten kan worden met veranderingen van de T1 waardes. Bij 20 dyne/cm² de NO* waardes zijn lager, terwijl bij 10 dyne/cm² de waardes gelijk blijven. We hebben ook onderzocht wat er gebeurt als de stroomsnelheid elke 30 minuten langzaam verhoogd wordt gedurende 4 uur. Door gebruik te maken van T1 metingen, hebben we gevonden dat er na verloop van tijd meer productie van vrije radicalen plaats vind.

In **Hoofdstuk 5** onderzochten we het capacitation proces van zwijnen sperma. We gebruikten diamant magnetometrie om de productie van vrije radicalen te meten tijdens dit proces. We maten de waardes van vrije radicalen die aanwezig waren op het acrosoom voordat capacitation plaats vond. Daarna stimuleerden we de cellen om te capaciteren door gebruik te maken van capacitating media. Als eerste gebruikte we nanodiamanten die met stikstof beëindigd waren om te kijken of deze gevoeliger waren voor de vrije radicalen. We vonden dat kale-FNDs gevoeliger zijn dan de NH₂-FNDs. Ten tweede, hebben we T1 metingen achter

elkaar aan gedaan om de productie van vrije radicalen na verloop van tijd te evalueren.

Daarnaast hebben we verschillende reagentia gebruikt om de productie van vrije radicalen te stimuleren of blokkeren in het acrosoom of de mitochondria. We vonden dat, als we de vrije radicalen productie blokkeerde in het acrosoom (NOX5), de T1 waardes onveranderd bleven. Bovendien, zodra we de productie van de mitochondria stopte, zagen we de T1 waardes significant daalde. Als resultaat, bevestigden we onze hypothese dat we de productie van vrije radicalen kunnen meten van lokale organellen en dat NOX5 een belangrijke rol speelt bij capacitation. Als laatste stimuleerden we de productie van vrije radicalen en zagen, zoals verwacht, een daling in de T1 waardes.

In **Hoofdstuk 6** praatte we over hoe we de methode commercieel kunnen valoriseren en we bespreken de voor- en nadelen van de methode. Bovendien exploiteren we mogelijke markten die we kunnen benaderen.

Als laatste, in **Hoofdstuk 7** bespreken we kort de mogelijke toekomstige toepassingen en richtingen voor diamant magnetometrie. We maken ook een suggestie voor ontwikkeling die toegepast kan worden om de methode te verbeteren om betere sensitiviteit en accuratere resultaten te bereiken.