



Anvendelsen af et ex vivo H-NMR modelsystem til biokemiske undersøgelser af cerebellare astrocytter

Nissen, Jan

Publication date: 1997

Citation for published version (APA): Nissen, J. (1997). Anvendelsen af et ex vivo H-NMR modelsystem til biokemiske undersøgelser af cerebellare astrocytter.

General rights Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain.
 You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

Take down policy

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

Anvendelsen af et ex vivo ¹H-NMR modelsystem til biokemiske undersøgelser af cerebellare astrocytter.



Ph.D Thesis Jan Nissen

1997

Roskilde Universitetscenter Institut for biologi og kemi

Indholdsfortegnelse.

Indholdsfortegnelse.	1
Forord	5
Forkortelser.	7
Summary	9
Resume	15
1. Introduktion	15
1.1 Indledning	15
1.2 Valg af modelforbindelser.	15
1.3 Gliacellen - et modelsystem	16
1.4 Detoksificerings processer i hjernen.	17
1.4.1 Glutathion - funktion.	18
1.4.2 GSH - optagelse/eksport	19
1.5 NMR teori - kort gennemgang	21
1.5.1 Vand undertrykkelse og spin-echo	21
1.5.2 Shift-/relaksationsreagenser i in vivo/ex vivo NMR eksperimenter.	25
1.5.3 Anvendelse af deuteriumoxid - et paradoks	26
1.6 Anvendelse af NMR spektroskopi i biokemiske studier	27
1.7 Kriterier for anvendelse af <i>in vivo</i> og <i>ex vivo</i> NMR.	29
1.7.1 Koncentration af prøve i NMR rør med cellematrix.	31
2. Materialer og metoder.	32
2.1 Materialer	32
2.2 Præparation af humane erythrocytter.	33
2.3 In Vivo ¹ H-NMR spektroskopi på humane erythrocytter.	33
2.4 Opsætning af en cerebellar astrocyt primær kultur.	34
2.4.1 Behandling af astrocyt kultur og medier før NMR eksperimenter.	36
2.4.2 Ex vivo NMR spektroskopi på cerebellare astrocytter.	37
2.5 Syntese af Dysprosium-ATP komplekset.	37
2.5.1 Syntese og anvendelse af glutathion analogen, glutathion diethylester	38
2.6 Biokemiske målinger på astrocyt kultur.	38
2.6.1 Behandling af celler til bestemmelse af glyceraldehyd 3-phosphat dehydrogenase aktivitet og laktat indhold i overvæsken efter simuleret NMR forsøg.	38
2.6.2 DNA bestemmelse.	39
2.6.3 Laktat bestemmelse.	39
2.6.4 LDH bestemmelse.	40
2.6.5 Glyceraldehyd 3-phosphat dehydrogenase aktivitet.	41

2.6.6 Isolering af mitochondrier fra konfluente carrierbundne astrocytter i primær kultur.	41			
2.6.6.1 Bestemmelse af succinat dehvdrogenase (SDH) aktivitet.				
3. Resultater.	43			
3.1 Biokemiske pilotforsøg	43			
3.2 Diskussion af de biokemiske resultater - bestemmelse af vitalitet				
3.3 ¹ H-NMR på astrocytter	48			
3.3.1 Diskussion - medie/celler.	52			
3.4 Ekstern reference: 1,2,4-BenzenTriCarboxylat.	53			
3.5 Shift-/relaksations reagensets effekt.	55			
3.5.1 Diskussion: Dysprosium kompleksets effekt på forbindelser i NMR røret.	57			
3.5.2 Afvigelse mellem teoretisk og eksperimentelle data.	59			
3.6 Astrocytter tilsat naturligt forekommende forbindelser i anormal koncentration.	60			
3.6.1 Resultat: Pyruvat	60			
3.6.1.1 Diskussion: Pyruvat.	64			
3.6.2 Resultat: Acetaldehyd	65			
3.6.2.1 Diskussion: Acetaldehyd.	69			
3.6.3 Resultat: Fumarat	70			
3.6.3.1 Diskussion: Fumarat	74			
3.6.4 Resultat: D-β-hydroxybutyrat.	76			
3.6.4.1 Diskussion: β-Hydroxybutyrat.	82			
3.6.5 Resultat: L-aspartat	83			
3.6.5.1 Diskussion: L-aspartat.	91			
3.7 NMR forsøg hvor glutathion diethylester (GSH-DEE) er anvendt.	93			
3.7.1 Omdannelse af GSH-DEE i celler	95			
3.7.2 Diskussion - Glutathion diethylester.	96			
3.8 Anvendelse af transpeptidase inhibitoren 6-diazo-5-oxo-L-norleucin i NMR forsøg.	98			
3.8.1 Resultat: 6-diazo-5-oxo-L-norleucin.	98			
3.8.2 Diskussion: 6-diazo-5-oxo-L-norleucin.	101			
3.9 Eksperimenter hvor konjugation af xenobiotika til cellulært glutathion er vist ved NMR forsøg.	104			
3.9.1.1 Resultat: N-ethylmaleimid.	104			
3.9.1.2 Diskussion: N-Ethylmaleimid.	108			
3.9.2 Resultat: 1,2-Epoxybutan.	110			
3.9.2.1 Diskussion: 1,2-Epoxybutan	114			
3.9.3 Resultat: Ethylacrylat	116			
3.9.3.1 Diskussion: Ethylacrylat	123			
4. Samlet diskussion og konklusion.	127			
5. Referencer	130			

Forord.

Dette projekt er udført ved PharmaBiotec Research Center på Roskilde Universitet Center under vejledning af Professor Poul Erik Hansen. Projektets formål har primært været at vise anvendeligheden af et *in vivolex vivo* modelsystem til undersøgelser af hjernecellers metaboliske processer. Det sekundære mål var at udvikle NMR modellen til også at ombefatte medieperfusion af cellerne i NMR røret.

Cerebellare astrocytter blev anvendt som model på grund af denne celletypes mangfoldige funktioner i hjernen. Denne celletype er endvidere let at "håndtere" og giver derfor forholdsvis hurtigt konfluente primærkulturer. Detoksificerings processer i denne celletype er valgt som et eksempel på hvorledes modelsystemet kan benyttes. Der er udelukkende fokuseret på glutathions konjugation med forskellige forbindelser. Andre scavanger systemer og de til glutathion hørende enzymsystemer er negligeret for overskuelighedens skyld.

Åfhandlingen er opdelt således, at der først er et mindre teoretisk afsnit omhandlende astrocytter, hvordan man har anvendt kerne magnetisk resonans spektroskopi (NMR) til at undersøge cellers/organers metabolisme og som afslutning et mindre kapitel om tripeptidet glutathions funktion.

Efter det teoretiske afsnit findes et eksperimentelt kapitel. Dette kapitel omtaler de procedurer, der er anvendt i projektet.

Resultatafsnittet er opdelt i tre afsnit. Første afsnit omhandler de biokemiske pilotforsøg, der er udført før modelsystemet blev taget i anvendelse. Andet afsnit omfatter forsøg med biokemiske forbindelser. Det sidste afsnit omhandler cellens detoksificering af forskellig xenobiotika ved hjælp af en glutathion analog. For at lette overskueligheden er hvert enkelt resultat afsnit efterfuldt af en diskussion af de pågældende resulater. De anvendte resultater repræsenterer et udsnit af det indsamlede materiale. Afhandlingen afsluttes med en samlet konklusion over modellen. a

4

Forkortelser.

γ-GT	γ-Glutamyl transferase (γ-Glutamyl transpeptidase)
(konc.)	Endelig koncentration
ΔT	Tid fra tilsætning af Md/D ₂ O eller PBS/D ₂ O til cellesuspension
ALDH	Aldehyd dehydrogenase
Ast-DMEM	Astrocyt Dulbecco modificeret Eagle medium
AtmO ₂	Atmosfærisk luft
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
BSA	Bovin serum albumin
BTC	1,2,4-Benzentricarboxylat
CDP	Cytidine diphoshat
CM-PBS	Calcium/magnesium fri phosphat bufferet saltopløsning
DAONL	6-diazo-5-oxo-L-norleucin
dBcAMP	Dibutyrylcyklisk adenosin 5' monophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsyre
Dy(ATP) ⁻¹	Dysprosium (III) adenosin 5' triphosphat
Dy(dpm) ₃	Dysprosium (III) tris-dipivaloyImethanato chelat
Dy(PPP _i) ⁻⁷	Dysprosium (III) tripolyphosphat
Dy(thd) ₃	Dysprosium (III) 2,2,6,6-tetramethyl-3,5-heptandionato chelat
EDTA	Ethylen diamin tetraacetat
FCS	Føtalt kalve serum
GABA	γ-Aminosmørsyre
GSH	Reduceret glutathion
GSH-DEE	Glutathion diethylester
GSH-MEE	Glutathion monoethylester
iu	Internationale enheder
LDH	Laktat dehydrogenase
LIS	Lanthanid induceret shift
LSR	Lanthanid shift reagens
MCT	H⁺-koblet monocarboxylase transporter
Md/D ₂ O	Frysetørret dyrkningsmedie resuspenderet i D ₂ O
MTT	Thiazoyl blåt
NADH	Nicotinamid adenin dinucleotid (reduceret form)

NMR	Kernemagnetisk resonans spektroskopi	
PAG	Phosphat aktiveret glutaminase	
PBS	Phosphat bufferet saltopløsning	
PBS/D ₂ O	Frysetørret PBS resuspenderet i D ₂ O	
PCA	Perchlorsyre	
PETG	Polyethylenterephthalatglycol	
RF-HPLC	Omvendt fase højt tryk væskekromatografi	
S/N	Signal-støj forhold	
SDS	Natriumdodecylsulfat	
TRIS	Tris[hydroxymethyl]aminomethan	
TSP	Trinatriumpropionat	

Summary.

Abstract:

Titel; Applicability of an *ex vivo* NMR modelsystem based on cerebellar astrocytes.

During the last tree decades attempts have been made to develop a functional *in vivo/ex vivo* NMR model by which cellular processes such as metabolism, cell communication, energy comsumption and intracellular detoxification can be studied. The primary task for all *ex vivo/in vivo* experiments has been to develop a model in which pH, oxygene supply, temperature, diffusion of nutrients and metabolic products to and from the cells can be controlled. At present *ex vivo/in vivo* NMR experiments on isolated cell preparations afford reasonable control over physiological and biochemical variables that are not under experimental control in intact animals or in perfused organ systems (Brindle, *et al.*, 1979; Fabry, 1987; Van Zijl, *et al.*, 1991).

One reoccuring problem in *ex vivo* NMR is to maintain a high density of viable cells in the field of view of the NMR detection coil. This problem, together with the control over the biochemical and physiological variables, is tradionelly solved by imbedding cells in a matrix consisting of agarose (Brindle, *et al.*, 1979; Fabry, 1987; Van Zijl, *et al.*, 1991) or managed through attachment of the cells to microcarriers. Microcarriers is especially useful if anchorage-dependent cells are to be used.

The present NMR study is based on a cerebellar astrocyte primary culture grown on microcarriers that provide a matrix for oxygene and substrate perfusion in the NMR tube. Cultured astrocytes constitute a good experimental model because this celltype reflect most of the morphological properties of astrocytes *in situ*. Astrocytes are involved in a variety of physiological roles for example 1) uptake of K⁺, glutamate, (-aminobutyric acid (GABA), adenosine and taurine, 2) influence in the formation of the blood-brain barrier (Janzer & Raff, 1979) and 3) synthesis of the tripeptide glutathione (GSH)(Raps, *et al.*, 1989). The later is an intracellular redox component and plays several roles in cell physiology (Viña, *et al.*, 1989) and in detoxification of xenobiotics.

The purpose of the present investigation was to develop an *ex vivo/in vivo* NMR model to examine the consequences of exposing cells to toxic levels of a compound during hypoxia. Another task was to distinguish between

compounds in the extra- and intracellular compartments, in such a way that information about membrane transport and reabsorbance of substances could be obtained.

Future application of this NMR model could be studies of oxidative stress in astrocytes; influx/efflux rates of metabolites during hypoxia or hyperoxia; drug effects on the brain metabolism or NMR spectroscopy studies of intracellular ions.

Methods:

Cell culture. Primary cultures of cerebellar astrocytes were prepared from 7-day-old rats and cultured as described previously (Hertz, *et al.*, 1989; Damgaard, *et al.*, 1995). Microcarriers (85 mg ml⁻¹) were added on day 8 to the culture flasks (75 cm²) and cultured for an additional 2 weeks.

Cell preparation before NMR studies. The culture medium was freeze dried and redissolved in 100 % (v/v) D_2O and 1,2,4-benzenetricarboxylic acid (BTC) was added to the redissolved culture medium to a final concentration of 3 mM and the pH was finally adjusted to approximately 7.2 (read directly from the pH meter). BTC was used as an extracellular reference. The cell cultures (cells cultured on carriers) were washed twice in ice-cold PBS and incubated 20 min with deuterated medium (75% (v/v) deuterated) and finally transferred to a 5-mm NMR tube.

Viability tests. Loss of membrane integrity was determined by the extracellular lactate dehydrogenase [EC 1.1.1.27; LDH] activity. Cell viability tests using traditionel dyes was not conducted due to problems concerning the differentiation of nonviable and viable cells grown on microcarriers. The amount of living cells was instead evaluated by mitochondria succinate dehydrogenase [EC 1.3.99.1; SDH] activity, extracellulary glyceraldehyde 3-P dehydrogenase [EC 1.2.9.1; GADPH] activity and lactate efflux. At D₂O concentations below 75% (v/v), the cells were viable for at least 3 hrs.

Glutathione analog. The glutathione analogue, glutathione-diethylester (GSH-DEE), was synthesised as previously described (Thornalley, 1991) with slight modifications and used in the NMR experiments.

NMR. Spectra were obtained on a Bruker AM250 spectrometer equipped with a 5-mm broad-band probe. 250 MHz ¹H-NMR spectra were accumulated at 310 K. The Hahn spin echo pulse sequence (90° - τ - 180° - τ - *acquisition*) (Hahn, 1950) was used combined with a continuous homonuclear presaturation of residual water for 1.3 s (Farrar & Becker, 1971). A sweep width of 5 kHz with 16 K data points was used in all experiments. Typically 300 scans were

8

accumulated. A line broadening of 1.3 Hz was applied before the Fourier transformation. Peak assignments were based on published chemical shift information (Pouchert, 1983).

Use of Dy(ATP)⁻¹ **and BTC as an extracellular NMR reference.** The relaxation-/shiftreagent dysprosium-ATP (Dy(ATP)⁻¹) was synthesised as previously described (Barry, *et al.*, 1974b; Geraldes & Ascenso, 1984; Gupta & Gupta, 1982). Disappearance of extracellulary reference (1,2,4-benzenetri-carboxylate; BTC) peaks (7.4 ppm - 7.9 ppm) indicated the effect of the Dy(ATP)⁻¹ shift-/relaxation reagent. Disappearance of natural occurring intracellular reference peaks indicated cell death. The cluster of peaks at 3.2 ppm is assigned to choline containing compounds and were selected as intracellular shift references.

Results and discussion:

Preliminary NMR studies. The choice of the metal ion Dy³⁺ was based on the fact that this paramagnetic lanthanide produces especially large hyperfine shifts.

Difference between extra/intracellular compartment could be established with the paramagnetic lanthanide complex Dy(PPP)⁷, a paramagnetic complex reported (Gupta & Gupta, 1982) to cause relaxation and large hyperfine shifts in erythrocytes, but a dysprosium-ATP complex (Dy(ATP)⁻¹) imitating the effects of Dy(PPP)⁻⁷ complex was used instead, because of the large shift- and relaxation properties of this reagent (Barry, et al., 1974a,b; Gupta & Gupta, 1982 Geraldes & Ascenso, 1984). Dy(PPP)⁻⁷ has previously been reported to be non-hydrolyzable (Gupta & Gupta, 1982). This anionic complex did not penetrate the cell membrane within the time scale of NMR measurements and therefore the reagent remains on the outside of the cells. The relaxation- and shift effects of Dv(ATP)⁻¹ were in this thesis established during experiments with the extracellulary reference compound BTC. The signals from BTC were in these experiments completely relaxed when a mol/mol ratio (complex /BTC) of 1:6 was reached. It should be mentioned that Gupta & Gupta, 1982, concluded that the hydrolysis of Dy(ATP)⁻¹ was negligible within the time scale of the NMR experiment. In this context it should be noticed that the dysprosium-AMP complex has been reported (Barry, et al., 1974a; Geraldes & Ascenso, 1984) to have the same shift/relaxation effects as the dysprosium-ATP complex.

The spectrum of cells incubated with BTC reveals peaks from glycine, choline containing compounds, lactate, triacylglycerols, valine, isoleucine and

leucine. Among these are a few unassigned peaks. Addition of the shift- and relaxation reagent (Dy(ATP)⁻¹) improved the spectrum substantially.

The tripeptide glutathione (GSH) was used to prove the ability of the modelsystem. The choice of GSH as the model compound was due the multi functionality of this tripeptide and its high intracellulary concentration. Among many intracellulary functions were particularly the GSH conjugation to added xenobiotics (GSH-adducts) selected.

GSH-DEE was used instead of GSH because of its enhanced uptake rate (Puri & Meister, 1983; Levy, *et al.*, 1993) and because GSH esters like GSH-DEE has been shown to be more stable than GSH intracellulary (Grattagliano, *et al.*, 1994). In expectation of NMR detectable amounts of GSH adducts and because of the need of a high intracellular GSH concentration for observing the conjugation process, 100 μ M 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DAONL) was injected into the cell suspension. DAONL has been reported (Griffith & Meister, 1979b) to prevent the release of GSH and GSH adducts. Appearance of ethanol in the spectrums indicated carboxyl esterase [EC 3.1.1.1] activity in the cytoplasm and thus the presence of intracellular GSH. Uptake of GSH-DEE into cells and conversion to ethanol by esterase activity was demonstrated with Dy(ATP)⁻¹.

GSH adducts studied with *ex vivo* **proton NMR.** The results presented here has shown that preincubation of cells with GSH-DEE enhances the cellular glutathione concentration and probably also protection against toxic levels of xenobiotics. An example is the detoxification of ethylacrylate, a well known toxic.

Applying 3 mM ethylacrylate and Dy(ATP)⁻¹ into the cell suspension with a microcapillary pipette, resulted in new peaks. Elimination of the creatine signal at 3.05 ppm, appearence of a positive triplet at 2.7 ppm and a negative signal at 2.0 ppm, indicated that ethylacrylate was detoxified to yield at least two GSH-adducts. The negative signal at 2.90 ppm arise from a deformation of signals over-lapping in this region. The vinyl signals from ethylacrylate could not be observed as these are buried under the water signal. The multiplet at 3.65 ppm must reflect that the ethanol is produced during cellular deesterification of GSH-DEE and ethylacrylate, but not by uncatalysed hydrolysis of ethylacrylate. It has been reported (Skibsted, 1988) that hydrolysis of ethylacrylate will not occur on the time scale used in this experiment. The signal at 3.65 ppm is believed to be a result of the cellular deesterification of ethylacrylate (to acrylate) by the enzyme carboxyl esterase [EC 3.1.1.1]. Acrylate syntetised in this way is a target for glutathione detoxification. The chemical shifts from these conjugates are similar to the ethylacrylat-glutathione conjugates, why these signals only add to the intensites from the other conjugates. Addition of 5 mM

10

Dy(ATP)⁻¹ reveals signals due to intracellulary GSH/ ethylacrylate deuterated conjugated products. Use of Dy(ATP)⁻¹ in this experiment to eliminate signals from the extracellulary environment indirectly indicate uptake of ethylacrylate and GSH-DEE in the cells.

Use of GSH-DEE to enhance the intracellular GSH concentrations enables a quick way to study of the conjugation of xenobiotics and free radicals to GSH, within the astrocytes. Furthermore, oxidation of GSH may be monitored directly as the conjugation progresses.

The NMR system presented here can also be used to monitor the chemical responce due to an toxic exposure. An example of this is the incubation of the astrocytes with acetaldehyde. This compound was choosen because of its ability to produce a well defined response - the cellular enzymatic production of acetate.

As shown in the spectrum for acetaldehyde only one of the two expected peaks for acetaldehyde can be observed in the spectrum (peak at 2.23 ppm). The aldehyde proton at 9.70 ppm is not detected (region not presented). The methyl group from the hydrated acetaldehyde (a diol) is observed at 1.33 ppm. The intracellular presence of the hydrated form of acetaldehyde is not unambiguous. Uptake of the extracellular diol is slow on the NMR timescale, but the conversion of intracellular acetaldehyde to the hydrated form is likely. The occurrence of a peak at 1.92 ppm indicate that absorbed acetylaldehyde has been converted to acetate intracellulary. This fact is established by the addition of shift- /relaxation reagent, Dy(ATP)⁻¹. The spectrum reveals, beside the normally observed resonances, only one peak - acetate (1.92 ppm). The slight difference between assignments in the literature and this study could be due to acidification during the experiment due to the presence of lactate (from pH 7.3 to pH 6.9).

Conclusion:

In this thesis it has been demonstrated: 1) That it is possible to detect, using *ex vivo* ¹H-NMR techniques, the conversion of toxic concentrations of a naturally occurring compound into a nontoxic compound, 2) how the NMR modelsystem can be used to monitor the detoxification process in cells preincubated with an glutathione analogue, 3) that the shift-/relaxation reagent Dy(ATP)⁻¹ is able to eliminate the resonances (by fast relaxation or by inducing large hyperfine shift) from the extracellular compounds and finally 4) that the cellular metabolism can be followed by this model system in a easy way.

11

This study shows that NMR evaluation of secondary drug effects, detoxification in astrocytes, membrane transport, free radical scavengers and metabolism of neuropharmaceuticals, xenobiotics and naturally occurring metabolites in gliacells, can be evaluated *ex vivo* on a short time basis using this model system.

The viability of the cells, in the NMR tube, is uncertain due to the problems concerning the oxygen distribution in the NMR tube, but the biochemical measurements show that the cells are still viable after nearly four hours of experiments.

At present the model system is still in a phase of development, but the work presented in this thesis, shows that the system is useful and even more convincing results are expected at a higher magnetic field. Recent experiments (not presented here) performed on a newly purchased 600 MHz spectrometer has verified some of the results presented in this paper. Some of these experiments (at 600 MHz) have been accomplished with substrate and oxygene perfusion of the matrix (cells puls microcarriers) in the NMR tube.

Resume.

Det i denne afhandling beskrevne modelsystem kan i dag benyttes til at bestemme disse parametre på en forholdsvis enkel vis. Den celletype der benyttes i denne afhandling er cerebellare astrocytter, der hører ind under gruppen gliaceller.

Astrocytter varetager i hjernen funktioner som syntese sted og depot for flere af de forbindelser som de omkringliggende neuroner har behov for. Herudover reabsorberer denne celletype også affaldsprodukter fra neuronernes metabolisme og regulerer koncentrationen af f.eks. transmitter substanserne og elektrolytter i ekstracellular væsken, således at der ikke opstår toksiske koncentrationer af disse og andre secernerede forbindelser.

Den anvendte celletype er udvalgt på grund af at gliacellen indtager en central rolle i hjernen med hensyn til metabolisme og detoksificering af flere forbindelser og at denne celletype er vist at beskytte omkringliggende celler ved pathologiske tilstande som iskæmi, hypoxi og hyperoxi.

Målet for denne afhandling var at udvikle et modelsystem udfra hvilket det ville være muligt, at undersøge hvordan cellen respondere på toksiske forbindelser og toksiske koncentrationer af naturligt forekommende forbindelser når systemet overgår fra *ex vivo* til *non vivo*.

Syntesen af et relaksationsreagens, der samtidig fandtes at fungerer som et shift reagens muliggjorde identifikation af cellens metaboliter i NMR spektret. Relaksationsreagenset er et kompleks bestående af dysprosium og ATP i et formodet 1:2 kompleks. De kemisk/fysiske forhold omkring dette lanthanid-ATP kompleks mangler at blive undersøgt, men et dysprosium-AMP kompleks, der tidligere er anvendt til strukturopklaring, har vist sig at have relaksations- og shiftegenskaber. Forsøg med flere modelforbindelser viste at dysprosium-ATP komplekset besidder tilsvarende egenskaber.

Ved brug af en glutathion analog og en inhibitor af enzymet γ -glutamyl transpeptidase [EC 2.3.2.2], blev det muligt at akkumulere større mængder (>1 mM) glutathion og glutathion konjugater i cellens cytosol. Før selve forsøget med egnede konjugationsforbindelser blev cellesuspensionen (placeret i NMR røret) inkuberet med glutathion analogen. Inhibering af γ -glutamyl transpeptidase, et membranbundet enzym, med 6-diazo-5-oxo-L-leucin blev udført før tilsætning af xenobiotika. Ved mistanke om at inhibitoren kunne inhibere optagelsen af det anvendte xenobiotika, blev inhibitoren først tilsat efter inkubering med det pågældende xenobiotika.

13

Flere biokemiske forbindelser, som kunne anvendes som energikilde blev anvendt som indikator for en metabolisk aktivitet i NMR røret. Specielt i tilfælde hvor cellernes energi status (f.eks. under faste) må formodes at være nedsat, var disse forsøg garant for at systemet fungerede. For eksempel viste NMR eksperimentet at tilsat pyruvat blev metaboliseret i cellerne og at acetat begyndte at akkumuleres. Celle vitalitet efter NMR forsøg blev i nærværende arbejde søgt bestemt ud fra mitochondrie aktivitet (assay af succinat dehydrogenase) og permeabilitet af cellernes plasmamembran (bestemmelse af laktat i det konditioneret medie). Disse data indikerede at der var levende celler i NMR røret efter en forsøgsperiode på 3 timer.

Resultatet af det eksperimentelle arbejde er, at der nu er etableret et modelsystem bestående af et NMR rør indeholdende en matrix af konfluente cerebellare astrocytter bundet til et adhæsionsmateriale^a, hvori solvent penetrering er mulig. Næste skridt i processen er at videreudvikle systemet til at omfatte fuld kontrol med medie sammensæt, pH i NMR røret og udskiftning af medie under NMR eksperimenter med cerebellare astrocytter.

^a Små sfæriske kugler af plastmateriale coatet med collagen - omtales senere.

1. Introduktion.

1.1 Indledning.

Mange af de forbindelser der anvendes i fødevarer og de materialer vi til daglig er i kontakt med, mistænkes i dag for at være medvirkende til udvikling af forskellige neuronale sygdomme/sindslidelser. I normal dosis og i normalt fungerende celler vil disse forbindelser blive omsat i biosyntesen eller detoksificeret cellulært før en eventuel toksisk effekt igangsættes. Specielt interessant er cellens respons på en toksisk, men subletal koncentration af sådanne forbindelser ved hyperoxi, hypoxi og iskæmi. Det er velkendt at f.eks. den ekstracellulære glutamat koncentration i hiernen forøges under hypoxi og iskæmi (Benveniste, et al., 1984; Simms, 1991; Ohashi, et al., 1993) og at forhøjet glutamat koncentration ekstracellulært kan føre til neuronal død (Choi, 1985; Rothman & Olney, 1986). Især cellernes metabolisme under hypoxi er interessant. De mest markante ændringer er en forøget glukose forbrænding (Heacock & Sutherland, 1990), nedsat DNA syntese og forøget protein syntese (stress proteiner) (Heacock & Sutherland, 1990). Inkubering af celler med xenobiotika er vist (Ray, et al., 1994; Romero, et al., 1995) at påvirke glukose forbrændingen og cellernes metabolisme mærkbart. Om NMR spektroskopi kan synliggøre cellernes respons på xenobiotika under forhold hvor tilgangen af ilt og medie er begrænset vil forsøges besvaret her.

Flere forskergrupper heriblandt Müller, *et al.*, 1994 og Sonnewald, *et al.*, 1994b, har udført NMR eksperimenter på PCA ekstrakter af forskellige neuronale celletyper der har været udsat for hypoxi, iskæmi og anoxi. I denne afhandling vil der blive præsenteret et model system der, med få modifikationer, vil kunne benyttes til at undersøge forhold som hypoxi, iskæmi og hyperoxi *ex vivo*^a. Modellen består af en vel undersøgt celletype (cerebellare astrocytter) og en hyppigt anvendt NMR teknik (spin-echo).

1.2 Valg af modelforbindelser.

Ved valget af en brugbar naturlig forekommende modelforbindelse er det vigtigt, at den koncentration der skal anvendes ikke er letal for cellen. Samtidig skal forbindelsen kunne indgå i reaktioner, der resulterer i et eller flere mellem eller slutprodukter der vil kunne observeres via NMR spektroskopi.

Ved toksikologiske undersøgelser skal eksport af rest produkter fra detoksificerings processer i cellen kunne inhiberes således, at der opnås høje

^a Med ex vivo menes celler oprindende fra en primær kultur dyrket fra levende væv.

koncentrationer af produktet (-erne). På denne vis vil det være muligt at indhente oplysninger om hvordan store koncentrationerne af produktet (-erne) påvirker cellen, samt oplysninger om hvilke produkter, der dannes i en given proces. Herudover skal koncentrationen af forbindelsen kunne reguleres i et omfang der muliggør detektion. Denne regulering skal kunne foretages via enten inhibering af centrale enzym-/transportsystemer eller ved inkubation af cellerne med forbindelsen.

I denne afhandling er tripeptidet glutathion og en analog heraf, glutathion diethyl ester, valgt som forsøgsmodeller. Årsagen til dette valg er at glutathion analogen, glutathion diethyl ester, forholdsvis hurtigt transporteres ind i cellen og at analogen i cytosolen hurtigt vil omdannes til reduceret glutathion. En efterfølgende irreversibel inhibering af det membranbundne enzym, γ-glutamyl transpeptidase^a [EC 2.3.2.2], forhindrer efflux af GSH, GSSG og glutathion konjugater. På denne måde opnås en høj koncentration af intracellulært GSH^b og GSH konjugater der vil kunne observeres. Visualisering af den cellulære fraktion i spektrene etableres ved brug af et nysyntetiseret relaksations reagens - et dysprosium-ATP kompleks. I co-operation med den valgte NMR teknik vil dette kompleks relaksere de ekstracellulære molekylære forbindelser vil give ophav til signaler i det færdige spektrum.

I de forsøg der præsenteres i denne afhandling vil der blive anvendt ikke fysiologiske koncentrationer af forskellige forbindelser. Årsagen til dette er primært den anvendte metodes sensitivitet og sekundært ønsket om at kunne observere udgangsproduktet i det opsamlede spektrum. Problemet vedrørende inkuberingen af celler med ikke-fysiologiske koncentrationer og indflydelsen af dette på resultaterne, vil blive diskuteret senere.

1.3 Gliacellen - et modelsystem.

Gliaceller blev beskrevet første gang af Virchow, 1846, som betragtede gliaceller som værende inaktive celler, hvis primære formål var at holde sammen på neuronerne og sekundært at medvirke ved dannelsen af nyt væv hvor eventuelle skader opstod. Ved hjælp af AuCl₂ farvning blev det i 1913 (Ramón y Cayal, 1913), muligt at opdele neuroglia i grupperne makroglia og mikroglia. Derved åbnes mulighed for undersøgelser af gliacellens betydning for de biokemiske og fysiologiske processer i hjernen.

^a Omtales senere.

^b Den metaboliske omsætning af GSH og GSSG i cellerne fungerer dog stadig.

Makroglia blev, efter fremkomsten af elektronmikroskopien, yderligere opdelt i to grupper henholdsvis oligodendrocytter og astrocytter. Astrocytten er en stor lys celle med en karakteristisk uregelmæssig oval kerne, der er mindre end neuronernes. Astrocytkernen er større end de andre gliale celletypers og kan derfor forholdsvis enkelt skelnes fra disse. Cerebellar cortex indeholder en stor mængde astrocytter, som menes at fungere som retningsledere for granula celle precursornes indadrettede udvikling i cerebellar cortex (Rakic, 1971).

Astrocytter spiller en central rolle i reguleringen af det ekstracellulære miljø omkring neuronerne. Astrocytter med kontakt til neuronerne menes at regulere mikromiljøet omkring disse celler, mens astrocytter med kontakt til de kapillære endothelialceller menes at være essentielle for dannelsen af blod/hjerne barrieren (Janzer & Raff, 1987). Det klassiske billede af astrocyttens funktioner indeholder flere ting deriblandt: Optagelse af K⁺, optagelse af glutamat, GABA, adenosin og taurin, metabolisme af ammoniak via glutamin syntetase [EC 6.3.1.2] aktivitet (Norenberg & Martinez-Hernandez, 1979), indvirkning på dannelsen af blod/hjerne barrieren og introduktionen af γ -glutamyl transferase [EC 2.3.2.2;γ-GT]^a i denne (Ghandour, et al., 1980; Maxwell, et al., 1987; Bauer, et al., 1992), kontrol af hjernens pH niveau og vand volumen, påvirkning af den neuronale migration samt syntese af flere, for astrocytten selv og omkringliggende celletypers, vigtige forbindelser, hvoraf f.eks. reduceret glutathion (GSH) (Raps, et al., 1989) kan nævnes. En anden og måske ligeså vigtigt funktion er at astrocytter i forhold til f.eks. neuroner, kan overleve længere tids sult og begrænset eller ingen ilt tilgang (Juurlink, et al., 1992; Sochocka, et al., 1994).

1.4 Detoksificerings processer i hjernen.

Reguleringen af mikromiljøet udføres af de omkringliggende^b astrocytter f.eks. via en specifik optagelse af molekyler, som ville kunne skabe en uhensigtsmæssig tilstand for neuronernes funktion og overlevelse. Enzymer som f.eks. superoxid dismutase [EC 1.15.1.1], glutathion peroxidase [EC 1.11.1.9], glutathion reduktase [EC 1.6.4.2], katalase [EC 1.11.1.6] og forbindelser som f.eks. β -caroten, α -tocopherol, ascorbat, diverse metal chelatorer og GSH beskytter hjernen mod virkningerne fra f.eks. toksiske forbindelser, der formår at overskride blod/hjerne barrieren.

^a Hedder også γ-glutamyl transpeptidase.

^b Hermed menes de astrocytter der grænser op til blod kapillærerne. Endothel cellers rolle i denne proces vil ikke blive omtalt, da projektet er baseret på en primær kultur af cerebellare astrocytter.

Det er foreslået, at astrocytter har en afgørende betydning for beskyttelsen af neuroner ved toksiske koncentrationer af naturligt forekommende forbindelser og xenobiotika i ekstracellulær væsken (Lopachin & Aschner, 1993; Cookson, *et al.*, 1994). Rosenberg & Aizenmann, 1989, har som en understregning af dette påvist, at corticale neuroner i co-kultur med astrocytter kan overleve 100x højere glutamat koncentrationer (200-300 mM) end hvis neuronerne dyrkes alene. Dette resultat er endnu et eksempel på astrocytters centrale og vigtige funktion i hjernen. En forøgelse af den ekstracellulære glutamat- (og aspartat-) koncentration, er vist at forekomme under patologiske tilstande som iskæmi, hypoxi og hyperglycæmi (Benveniste, *et al.*, 1984).

1.4.1 Glutathion - funktion.

GSH er et tripeptid bestående af en glutamyl, cysteinyl og glycinyl del. Peptidet findes i høj koncentration i hjernen (~2 mM, heraf 0,3 % i den oxideret form) (Cooper, *et al.*, 1980; Slivka, *et al.*, 1987; Philbert, *et al.*, 1991) og forekommer i nyrer, lever, bugspytkirtel, muskler og erythrocytter i koncentrationer indtil 5 mM (Griffith & Meister, 1979a; Viña, *et al.*, 1986).

Peptidet indgår som beskrevet (Orlowski & Karkowsky, 1976; Viña, *et al.,* 1989; Dekant & Vamvakas, 1993; Meister, 1994) i en vifte af processer, blandt andet i detoksificerings processer, hvor både non-enzymatisk og enzymatisk konjugation med xenobiotika^a indgår.

GSH er beskrevet som værende en fri radikal scavanger (Slater, 1972; Aebi & Suter, 1974). Konjugation med overgangsmetaller som Fe(III) eller Cu(II) menes at forhindre den videre lipid peroxidering i cellen (via de reducerede metaller og fri radikal dannelse) (Reiderer, *et al.*, 1989; Jenner, 1993). Disse overgangsmetaller er sat i forbindelse med etiologien af f.eks. Parkinsons syge (Antonini, *et al.*, 1993; Cabreravaldivia, *et al.*, 1994) og Alzheimers syge (Reiderer, *et al.*, 1989). Hertil skal nævnes, at undersøgelser af patienter med Parkinsons syge har afsløret lavere koncentrationer af GSH i blodbanen hos disse patienter end hos raske personer (Skullerud, *et al.*, 1980; Reiderer, *et al.*, 1989).

Raps, *et al.*, 1989, har påvist, at astrocytter (i primærkultur) har en høj koncentration af GSH, mens neuroner (i primærkultur) i forhold til astrocytter har en lav koncentration af GSH. Hvorvidt dette betyder at astrocytten varetager en stor del af detoksificerings processerne i hjernen er uvist. I denne afhandling vil glutathions funktion som scavanger af xenobiotika i astrocytter

^a De specifikke konjugationsprocesser mellem glutathion og de i projektet anvendte forbindelser bliver beskrevet mere detaljeret under resultatbehandlingen.

blive beskrevet udfra NMR undersøgelser af astrocytter preinkuberet med en GSH analog.

1.4.2 GSH - optagelse/eksport.

Transport af plasma GSH via blod/hjerne barrieren er foreslået (Kannan, *et al.*, 1990; 1992), at foregå via en speciel transporter som er forskellig fra Lsystemet. Denne transporter menes at være identisk med det membranbundne enzym γ -glutamyl transferase^a [EC 2.3.2.2: γ -GT], der tidligere er omtalt (kapitel 1.2). Dette enzym er et normalt forekommende membran bundet glykoprotein. γ -GT aktivitet er tidligere bestemt i hjerne homogenat og synaptosomer (Minn & Besagni, 1983), i primær kultur af neuroner (Kvamme, *et al.*, 1985) og astrocytter (Shine, *et al.*, 1981). Flere grupper har vist at γ -GT kan hydrolysere γ -glutamyl bindingen i GSH eller associere γ -glutamyl delen til et acceptor molekyle, f.eks. cystein før optagelse (bl.a. Hanigan & Pitot, 1985). Flere reviews beskriver den videre cyklus og de omfattende feedback mekanismer i cellen bl.a. Meister, 1976.

Det er tidligere demonstreret hvorledes cystein stammende fra ekstracellulært GSH kan forøge den intracellulære GSH koncentration (Hanigan & Ricketts, 1993). Eksperimenter med co-kulturer af neuroner og astrocytter indikerer, at neuronalt GSH suppleres med cystein eksporteret fra de omkringliggende astrocytter (Sagara, *et al.*, 1993). Netop denne forøgelse af intracellulært GSH er måske ønskværdig i flere situationer. Studier har vist, at en forøgelse af det cellulære GSH niveau, medfører større cellulær beskyttelse mod en skadelig dosis af stråling (Wellner, *et al.*, 1984) og mod eksponering fra flere toksiske forbindelser (Williamson, *et al.*, 1982; Puri & Meister, 1983). Grundet glutathions ringe membran permeabilitet (Puri & Meister, 1983; Wellner, *et al.*, 1984) er det dog ikke i praksis muligt at inkubere celler med GSH i store mængder (mM).

Flere forskergrupper har påvist, at en syrekatalyseret esterificering af GSH kan løse permeabilitets problemet (Puri & Meister, 1983; Wellner, *et al.*, 1984; Anderson, *et al.*, 1985; Noguchi, *et al.*, 1989; Levy, *et al.*, 1993). Puri & Meister, 1983, har endvidere påvist, at intravenøs administration af en GSH monoester kan forøge koncentrationen af GSH 100 % i nyre- og levervæv i løbet af 2 timer (fra kontrol 2,2 μ mol/g^b til 4,8 μ mol/g). Subkutan injektion af GSH i stedet medførte derimod ingen signifikant stigning i GSH koncentrationen i vævet, et

^a Ofte omtalt i litteraturen som γ-glytamyl transpeptidase.

^b Våd vægt. Vævet blev vasket, vejet og homogeniseret.

resultat der umiddelbart kun kan forklares ved glutathions langsomme optagelseshastighed i cellerne.

Ved brug af humane erythrocytter som modelsystem er det påvist, at diester analoger af GSH, optages/absorberes hurtigere og mere effektivt i cellen (Levy, *et al.*, 1993) end monoester analoger og GSH. Levy, *et al.*, 1993, har desuden vist, at intravenøs administration af diestere i stedet for monoestere resulterer i en større intracellulær GSH koncentration. Dette forhold ændres ved GSH diester administration i mus og rotter. Her bliver diethylesteren hurtigt omdannet til monoesteren, sandsynligvis p.g.a. carboxyl esterase [EC 3.1.1.1] aktivitet i plasmaet. Humant blodplasma er fundet ikke at have nogen carboxyl esterase aktivitet (Levy, *et al.*, 1993).



Glutathion DiEthylEster (GSH-DEE)^a blev valgt som GSH analog udfra den antagelse at restproduktet (ethanol) fra den intracellulære carboxyl esterase [EC 3.1.1.1] aktivitet er mindre toksisk for cellerne end methanol, højere alkoholer og ammoniak, som vil være restprodukter fra andre mulige GSH derivater. Fremkomst af ethanol signaler i NMR spektret vil indikere optagelsen af GSH-DEE og den cellulære omdannelse til GSH. Ved brug af et relaksationsreagent^b vil cellernes vitalitet desuden kunne bedømmes. For at forhindre efflux af nydannet konjugationsprodukter til det ekstracellulære miljø blev der tilsat en kendt inhibitor (100 μ M 6-diazo-5-oxo-L-norleucin; DAONL) af glutamin bindende enzymer blandt andre γ -GT (Inoue & Horiuchi, 1977; Griffith & Meister, 1979b).

^a Et spektrum af GSH-DEE findes i resultat afsnittet. Syntesen er omtalt i metode afsnittet.

^b Et relaksationsreagent anvendes senere til at eliminere NMR signaler fra ekstracellulære forbindelser i spektret.



6-diazo-5-oxo-L-norleucin^a

Det er fundet, at glutamin analogen DAONL kan interagere med forskellige aminosyre transportere som f.eks. B^{o,+} systemet^o (Taylor *et al.*, 1992) og L1 systemet^o (Momma, *et al.*, 1987). Sidstnævnte transporter er vidt udbredt i blod/hjerne barrieren og i neuronale og gliale cellemembraner.

1.5 NMR teori - kort gennemgang.

I alle eksperimenter, hvor der anvendes kernemagnetisk resonans (NMR) spektroskopi, er der udelukkende udført proton NMR (¹H-NMR). Alle NMR eksperimenter er udført på et 250 MHz Bruker NMR spektrometer. Princippet bag den anvendte NMR teknik i denne afhandling skal kort forklares her.

1.5.1 Vand undertrykkelse og spin-echo.

Ved proton NMR spektroskopi på biologiske prøver opstår der et problem med det intense signal fra solventet. Ved NMR forsøg med celler kan det totale intra- og ekstracellulære signal fra H₂O have en intensitet der er en faktor 10⁶ højere end intensiten af en intracellulær komponent, hvilket i flere tilfælde umuliggøre detektion af mobile komponenter, der forekommer i en lille koncentration < 10 mM. Van Zijl, *et al.*, 1991, har, ved at bruge diffusionsvægtede spektroskopi^d, vist at det cellulære vand volumen kun udgør 0,8% af det totale vand volumen i NMR røret. Det betyder at NMR signalet fra en ekstracellulær metabolit med en koncentration på 0,1 mM, i intensitet, svarer til en intracelluær koncentration på ca. 10 mM. Ved rotation af NMR røret opnås en sedimentation af cellerne i NMR røret, hvorved forholdet mellem det ekstracelluære volumen og det celluære volumen reduceres væsentligt i detektionsområdet^e.

^a Diazoniumsalt dannet ved en diazotering.

^b Forsøg udført med *Xenopus* oocytter.

^c Large Neutral Amino Acid Carrier - System L1 (høj affinitetscarrier). Transporterer bl.a. Ile, Phe, His og flere andre aminosyrer foruden flere analoger heraf.

^d Tumor celler er her indstøbt i en agarose gel.

Optagelsen af spektret foregår i et begrænset område i den nederste del af NMR røret.

Det er alment kendt at T_2^* værdien for H₂O i biologiske prøver er væsentligt kortere end for andre lav molekylære forbindelser i prøven. Dette indebærer at protonerne fra vand relakserer hurtigere end protonerne fra de andre molekyler i prøven og at der derfor vil være en udtalt linieforbredning^b af solventsignalet i spektret.

Dæmpning af det intense vandsignal kan foregå på forskellig vis (Benz, *et al.*, 1972; Patt & Sykes, 1972; Rabenstein, *et al.*, 1985). Kontinuerlig presaturation af solventsignalet er den mest almindeligt anvendte metode fordi den er enkelt at benytte. Solventsignalet bestråles i en given tid, typisk mellem 1-2 sek., således at der er en ligelig fordeling mellem energitilstandene. Typisk vil en sådan presaturering af solventsignalet medføre spin-diffusion effekter i større molekyler, blandt andet nedsatte signal intensiteter.



Skema for vandundertrykkelse ved presaturation (Sanders & Hunter, 1993).

Et andet problem ved NMR spektroskopi af biologiske prøver er, at lavmolekylære forbindelser er kendt for at kunne bindes til makromolekyler og membraner. Denne binding kan resultere i nedsat molekylær mobilitet hvilket kan resultere i linieforbredning og nedsat visibilitet af den interessante komponent.

Linieforbredning af signalerne i spektret som følge af tilstedeværelsen af korte T_2 værdier fra makromolekyler kan elimineres ved brugen af en refokuseringsteknik. Denne teknik, som er udviklet af Hahn, 1950, og Campbell, *et al.*, 1974, udnytter det faktum at signalet bliver refokuseret oveni sig selv og at felt inhomogeniteten teoretisk udlignes.

Hahn's spin-echo sekvens. $\pi/2 = 90^{\circ}$ og $\tau = 68$ msek. Pulssekvensen udføres i serier, hvor solvent signalet umiddelbart før $\pi/2$ pulsen mættes i 1,3 sek.

^a Spin-spin relaksation - korte T₂ værdier (langsom molekylar bevægelse) giver brede toppe i spektret.

^b Halvhøjdebredde $v_{1/2}=1/T_2$.

Princippet er, at der til prøven tilføres en 90° puls og derefter en 180° før selve dataopsamlingen (en transient). Ved at indstille ventetiden τ til 68 ms, kan der opnås et spektrum hvor kun signaler fra lavmolekylære forbindelser observeres. J-modulationen af spektret betyder at spektret ikke vil være konventionelt faset, men i stedet resulterer i et spektrum hvor dubletter, kvartetter og multipletter har negativ fase, mens singletter og tripletter har positiv fase som i et normalt enkelt puls spektrum.

Kort efter $\pi/2$ pulsen vil de individuelle komponenter være rettet langs y' aksen (M_{xy}). Samtidig vil M_{xy} , H_2O , hvis indstillingerne er sat korrekt, være negliseret når refocuserings pulsen påbegyndes, hvilket betyder at der i teorien ikke vil være bidrag fra vand protonerne i spektret. Ovenstående sekvens gentages indtil et passende antal transienter er opsamlet.

Pulssekvensen er skitseret grafisk i figur 1.1 og kan kort forklares udfra et AX system, hvor et par af vektorer, α og β , fra den roterende ramme^a, repræsenterer tilstanden af et sæt spin.



Figur 1.1. Figuren viser et typisk spin echo eksperiment. Magnetiserings vektorerne, α og β (vist ved markeret pile) og deres orientering i den roterende ramme er vist før under og efter 90° og 180° pulsen. M₀ er retningen af det magnetiske felt og τ er ventetiden mellem pulsene. (Sanders & Hunter, 1993).

^a Det normale koordinatsystem x,y,z er erstattet af et koordinatsystem x',y',z' der roterer ved Larmor frekvensen. På denne vis kan magnetiserings vektoren betragtes som være stationær.

Hvis den kemiske shift frekvens for en dublet (opsplitning 1:1) vælges som reference frekvens (kemisk shift vektor rettet langs y') og betragtes x'y'-planet oppefra kan det videre forløb iagttages.

Efter en ventetid, τ , vil vektorerne α og β have bevæget sig væk fra y' med en hastighed $\pm J_{AX}/2$. Tilføres endnu en puls, i dette tilfælde en π puls, vil vektorerne præcessere omkring x' til den modsatte side af x'y' planet. De to vektorer vil på dette tidspunkt stadig præcessere bort fra den kemiske shift vektor (rettet langs y'-aksen).

Efter yderligere en ventetid, τ , vil det kemiske shift vil være rettet langs -y', mens α og β vil være ude af fase med hinanden med en vinkel $4\pi\tau J_{AX}$ (fasemodulation).



Figur 1.2. Effekten af en J-modulation på en dublet (øverst) og en triplet (nederst) ses ovenfor. Tiden er vist som 2τ (100 ms) og modelforbindelsen er CHCl₂CH₂OH (Sanders & Hunter, 1993).

Opsamles data på dette tidspunkt, vil dette forløb bl.a. resultere i en negativ dublet i spektret. I tilfældet med en triplet vil centerlinien i opsplitningen 1:2:1 være identisk med den kemiske shift frekvens og vil derfor ikke blive fasemoduleret. Dette medfører at en triplet, hvis varigheden af τ er sat korrekt, vil have positiv fase. Betydningen af varigheden af τ er illustreret i figur 1.2.

I tilfælde hvor T_2 for H₂O er tæt på T_2 for andre molekyler i en biologiske prøve, vil brugen af paramagnetiske ioner som f.eks. lanthanider i kompleks

med en større uorganisk eller organisk gruppe kunne forkorte T_2 værdien for H_2O . Vand kommer hurtigere ind i koordinations sfæren af paramagnetiske ioner end større molekyler i den føromtalte biologiske prøve og derfor vil vand protonerne hurtigere relaksere (Bryant & Eads, 1985).

1.5.2 Shift-/relaksationsreagenser i in vivo/ex vivo NMR eksperimenter.

Paramagnetiske lanthanider benyttes ofte på grund af deres dipolære karakter. Lanthaniderne kan udover at inducere store ændringer i det kemiske shift ofte ved store koncentrationer medføre en relaksation (Barry, *et al.*, 1974a,b; Alsaadi, *et al.*, 1977; Elgavish & Reuben, 1978). På grund af deres relative korte elektronspin relaksationstid (>10⁻¹² sekund) kan paramagnetiske ioner som Eu³⁺(4f⁶) og Yb³⁺(4f¹³) inducere NMR shift uden at medføre nogen nævneværdig linieforbredning.

Paramagnetiske lanthanid kationer som $Gd^{3+}(4f^7)$, $Ho^{3+}(4f^{10})$ og $Dy^{3+}(4f^9)$ med mellemlange og lange (Gd^{3+})(<10⁻¹⁰ sekund) elektronspin relaksationstider er vist at forøge relaksationshastigheden betragteligt (Morill, 1986).

Den magnetiske anisotropi af lanthanid shift reagenset (LSR) "mærkes" af protonerne i organiske forbindelser på grund af, at Lewis syre metal kationer koordineres med Lewis basiske sites i de funktionelle grupper i disse forbindelser (se nedenfor). Følgende ligevægt vil indstilles:

LSR + S ─ LSR•S (1.5.2-1)

Substratet (S) indeholder her et Lewis basisk site. Normalt vil der kun kunne observeres middel signaler fra de enkelte protonsæt i LSR•S og S. Der vil sjældent kunne skelnes mellem signaler fra S alene og signaler fra S i LSR•S. En forøgelse af LSR koncentrationen vil medføre at bidraget fra LSR•S bliver større. Dette betyder at NMR solventet skal være mindre Lewis basisk end substratet, hvis en optimal udnyttelse skal opnås (koordinering med substratet). Her kan der være et problem, når der arbejdes i vandige miljøer, men til trods herfor er hydratiserede lanthanid ioner rapporteret (Barry, *et al.,* 1974a; Morill, 1986), at havde en stor affinitet for molekyler indeholdende oxygen og nitrogen.

Den ovenfor viste ligevægt (1.5.2-1) er sandsynligvis ikke er den eneste der forekommer i disse systemer. En anden mulighed er en ligevægt mellem LSR•S og S (1.5.2-2);

$LSR \bullet S + S \iff LSR \bullet S_2$ (1.5.2-2)

eller mellem to LSR•S komplekser (1.5.2-3);

 $LSR \bullet S + LSR \bullet S \rightleftharpoons (LSR \bullet S)_2 (1.5.2-3)$

Begge ligevægte (1.5.2-2 og 1.5.2-3) der øger kompleksiteten af substrat med LSR. Tabel 1B nedenfor viser lanthanid induceret shift (LIS) af forskellige lanthanider på α -methyl protonerne i cyclohexanon og i samme tabel er opgjort størrelsen af NMR linieforbredning (relaksationseffekten) induceret af forskellige lanthanid ioner på methyl protonerne i 2-picolin. Af tabellen ses at specielt dysprosium komplekset udviser store effekter på såvel linieforbredning som på det kemiske shift for methyl protonerne i henholdsvis 2-picolin og cyclohexanon.

Ved tilsætning af et LSR, i et mol forhold på 1:6 (LSR:modelforbindelse), til et NMR rør indeholdende modelforbindelsen^a er det vist (omtales senere), at der kan opnås et effektivt downfield shift af signalerne i proton spektret. Der observeres desuden en udbredt linieforbredning ved en forøgelse af molforholdet (LSR:modelforbindelse) i blandingen.

Lanthanid (M)	LIS (Hz)	Linieforbredning (Hz)
	Cyclohexanon *	2-Picolin **
Pr	-11,25	5,6
Sm	-1,35	4,4
Dy	-54	200
Но	-51,45	50
Er	25,55	50
Eu	2,95	5

Tabel 1B. LIS, halvhøjde linieforbredning af forskellige komplekser med forskellige model forbindelser er vist. Alle forsøg er udført med $M(dpm)_3$. Minus (-) indikerer et skift mod lavere felt.* Signalet for α -methyl protonerne er anvendt i beregningen. ** Halvhøjde værdien af signalet for methyl protonerne er anvendt. Koncentrationer af de anvendte forbindelser er ikke oplyst. Uddrag af tabel fra Morill, 1986.

1.5.3 Anvendelse af deuteriumoxid - et paradoks.

Deuteriumoxid anvendes traditionelt som heteronuclear lock signal i proton NMR, hovedsagelig fordi deuteriumoxid indeholder kerner der er forskellige fra de kerner der giver signaler af interesse. Anvendelse af deuteriumoxid (D₂O)

^a Eksperimentet bliver omtalt senere.

som solvent forenkler spektret væsentligt. Det er velkendt at hydroxyl-, amid-^a og mercaptoprotoner udveksler hurtigt i vandige opløsninger, hvor D₂O er solventet^b, hvorfor signaler fra disse sjældent observeres i rutine NMR eksperimenter.

Tolkningen af *ex vivo* NMR spektre af celler hvor forholdet D₂O:H₂O er stort, bliver ofte besværliggjort af cellernes metaboliske aktivitet. Faktum er at der via anaplerotiske synteseveje i tilstedeværelse af deuteriumoxid vil være en kontinuerlig inkorporering af deuterium i tricarboxylsyre cyklus intermediaterne og dermed også i de tilknyttede biokemiske forbindelser. Dette betyder at spektrene i en overgangsperiode vil bestå af bidrag fra en blanding af samme produkt med forskellige grader af deuterium inkorporeret.

Anvendelse af spin-echo teknikken vil i flere tilfælde kunne synliggøre en inkorporering af deuterium i biokemiske strukturer som f.eks. i laktat, hvor en fuldstændig inkorporering af deuterium på α -kulstoffet vil resultere i en fasevending af signalet fra et negativt faset signal til et positivt faset signal.

Koblingsmønstret vil til en given tid afspejle graden af deuterium inkorporering i strukturerne, forstået på den vis at der ved optagelse af spektre over en tidsperiode vil kunne iagttages en udvikling i koblingsmønstret. Ved en fuldstændig inkorporering vil der kun observeres signaler fra det deutereret produkt.

1.6 Anvendelse af NMR spektroskopi i biokemiske studier.

NMR spektroskopi af forskellige celletyper *in vitro, in vivo* og *ex vivo* anvendes efterhånden oftere som supplement til traditionelle biokemiske undersøgelser. Årsagen til dette er at der via NMR hurtigt kan indhentes data om forskellige forhold der ikke umiddelbart kan opnås ved traditionelle biokemiske metoder. Oftest er celletyper som erythrocytter (Rabenstein, 1988; Skibsted, 1988; Skibsted & Hansen, 1990) og gærceller (Campell-Burke & Shulman, 1987) blevet anvendt, men hovedparten af de teknikker der er udviklet har været anvendt til ³¹P-NMR. I disse forsøg (Jacobsen & Cohen, 1981; Ugurbil, *et al.*, 1981; Foxall & Cohen, 1983; Foxall, *et al.*, 1984; Bourne, 1989) er perfusions problemet håndteret nogenlunde tilfredsstillende.

Flere teknikker hvor cellens metabolisme, detoksificering af xenobiotika følges *in viv*o, eksisterer allerede (Mitsumori & Nakano, 1993; Shulman, *et al.*, 1994). MR scanning af hele organer *in vivo* (1,5.Tesla; 65 MHz), er en af disse

^a Udvekslings hastigheden har et minimum ved pH 4-5.

^b For overskuelighedens skyld er der i struktur illustrationer ikke udskiftet hydroxylprotoner med deuterium, da denne udveksling ikke har betydning for tolkningen af spektrene.

teknikker. MR scanning anvendes blandt andre formål hyppigt til undersøgelser af hjernens metabolisme under hypoxi (Kuhmonen, *et al.*, 1994).

Ved anvendelse af et opkoncentreret perchlorsyre (PCA) behandlet celleekstrakt^a er det muligt, via NMR, at observere metabolitter (Sonnewald, *et al.*, 1993a, 1994a; Urenjak, *et al.*, 1993) (se figur 1.3), effekter forårsaget af substrat underskud (Brown, *et al.*, 1977), inkorporering af isotoper i metabolitter (Sonnewald, *et al.*, 1993b; Gruetter, *et al.*, 1994), undersøgelser af tumorvæv (Vion-Dury, *et al.*, 1994) eller NMR undersøgelser af ekstrakter fra celler, der har været udsat for hypoxi (Lipton & Rosenberg, 1994; Sonnewald, *et al.*, 1994b).

Metoden muliggør en hurtig identifikation af forbindelser udfra kendte tilordninger i litteraturen og eksterne koncentrationsreferencer som f.eks. trinatriumpropionat (efterfølgende kaldt TSP).

Ved anvendelse af et NMR *ex vivo* modelsystem vil der, modsat ved anvendelse af PCA metoden, opnås et mere korrekt billede af cellens biokemiske processer. I et *ex vivo* system vil cellens respons på f.eks. xenobiotika umiddelbart efter inkubation/injektion kunne aflæses i NMR spektret.



Figur 1.3. Proton NMR af PCA ekstrakt fra corticale astrocytter pH 8.9, enheden er ppm. Cr=kreatin, Cho=Cholinholdige forbindelser, HB=hydroxybutyrat, Tau=taurin, Ino=inosin, Suc=succinat (Urenjak,*et al.*, 1993).

Ikke-adhærente celletyper som f.eks. erythrocytter (Brown, et al., 1977), gærceller (Bourne, 1989) og forskellige bakteriestammer (Ugurbil, et al., 1979;

^a Genopløst i 12% PCA.

Jacobsen & Cohen, 1981) og adhærente celletyper som fibroblast celler (Ugurbil, *et al.*, 1981), er ofte anvendt som modelsystem ved NMR spektroskopi på celler *in vivo* og *ex vivo*. Fordelen ved anvendelse af *in vivo/ex vivo* NMR er, at der opnås et mere "korrekt" billede af cellens biokemiske miljø, men sensitiviteten umuliggør ofte detektion af metabolitter *ex vivo*, som forekommer i koncentrationer under 1,5 mM^a. Egne erfaringer med NMR på erythrocytter har vist at der under optimale betingelser kan iagttages metabolitter i spektret der har en koncentration på omkring 1 mM (fundet ved brug af et inderrør indeholdende en forbindelse med kendt koncentration).

Sådanne koncentrationer optræder sjældent i biologiske systemer. Et *in vivo/ex vivo* NMR modelsystem kan p.g.a. sensitivitets problemet, derfor kun benyttes til undersøgelser af forbindelser (metabolitter/xenobiotika), som produceres som følge af detoksificeringsprocesser eller inhibering af synteseveje, hvilket i flere tilfælde vil medføre en akkumulering af restprodukter.

1.7 Kriterier for anvendelse af *in vivo* og *ex vivo* NMR.

Visse celletyper, heriblandt astrocytter, forbruger store mængder ilt under deres metabolisme (Hertz & Hertz, 1979; Olson & Holtzman, 1988), hvilket betyder, at der skal tilføres en stor mængde ilt under NMR forsøget for at opretholde cellernes biokemiske status.

Indstøbning af celler^b i en agarose matrix (Cohen, *et al.*, 1989; Daly & Cohen, 1989; Kramer & Baily, 1991) er tidligere anvendt til *in vivo* ³¹P-NMR og *ex vivo* ¹H-NMR eksperimenter (Brindle, *et al.*, 1979; Fabry, 1987; Van Zijl, *et al.*, 1991). Metoden er særdeles tidskrævende og ressource krævende. Proceduren bag indstøbningen af celler i agarose gelen og selve opstillingen er vist i figur 1.4 og figur 1.5. Det ses, at der kræves en del apparatur og specielt fremstillet udstyr for at udføre et enkelt eksperiment. Desuden kan der på en opstilling, hvor ilt- og medie tilførelse er påkrævet, ikke udføres NMR forsøg med rotation af NMR røret (prøven), hvilket væsentligt forringer homogeniteten i prøven og dermed også sensitiviteten. Luftlommer i NMR røret har desuden en tendens til at vanskeliggøre tilordningen af spektret som følge af homogenitetsproblemer og derved også sensitivitetsproblemer. I opstillinger som disse, hvor rotation af prøven er umulig, er det derfor nødvendigt at opnå et så stort antal celler som muligt for at opnå en bedre homogenitet. Egne

^a Denne koncentration er apparatafhængig og det er derfor sandsynligt at en opstilling med større feltstyrke vil kunne nedbringe "observations koncentrationen" væsentligt.

^b Teknikken er anvendt i forbindelse med flere forskellige celletyper og cellelinier, som f.eks. MDF-7 bryst cancer celler (Van Zijl, *et al.*, 1991), men endnu ikke til neuronale eller gliale celletyper.

forsøg antyder, at der, hvis der skal foretages forsøg uden rotation af prøven, minimum skal anvendes 2-3 gange den mængde af celler pr. ml. Md/D₂O der normalt anvendes til forsøg med rotation af prøven.

Ved rotation af prøven forbedres kvaliteten af spektrene væsentligt, da cellematrixen har en tendens til at sedimentere i NMR røret. Der opnås derfor et forholdsvis stort antal celler i det område af NMR røret hvor NMR optagelsen foregår, men man har derimod delvist mistet kontrol med mediesammensætning, pH og iltindhold i NMR røret.



Figur 1.4. Figuren illustrerer hvorledes celler indstøbes i en agarosegel. Figuren er lånt fra Cohen. *et al.*, 1989.



Figur 1.5. Opstillingen der normalt anvendes til perfusionsteknikken. Figuren er lånt fra Cohen, et al., 1989.

En anden og mere enkel mulighed er dyrkningen af celler på et adhæsionsmateriale. Plastik kugler coatet med collagen er tidligere blevet anvendt som adhæsions materiale ved f.eks. dyrkning af adhærente celletyper eller ved dyrkning af celler i co-kultur (Westergaard, et al., 1991).

Kriterier for anvendelse af et adhæsionsmateriale til NMR er, at materialet ikke kan detekteres ved den anvendte NMR metode og at materialet ikke er coatet med en forbindelse, som kan interfere med andre forbindelser af vigtighed for forsøget eller som er toksisk for cellerne. Normalt anvendte adhæsionsmaterialer (alle sfæriske) er Biosilon (Nunc), Cytodex (Pharmacia) og Cellon (In Vitro). Disse materialer findes med forskellig coatning i materialer som glas, polystyren og hydroxyapatit (90 μ m - 500 μ m i diameter). I dette projekt er der undersøgt 4 forskellige materialer (alle sfæriske) m.h.t. celleudbytte og anvendelse (resultatet af disse undersøgelser er ikke medtaget).

1.7.1 Koncentration af prøve i NMR rør med cellematrix.

Ved brug af sfæriske materialer til celleadhæsion opstår der et alvorligt problem, idet den totale solvent fraktion ikke kan bestemmes korrekt. Adhæsionsmaterialet er opbygget af et porøst materiale, der gør solvent penetrering mulig. Ved brug af en approksimation kan volumen der udgøres af cellematrixen beregnes.

Anvendelse af 85 mg adhæsionsmateriale (tør vægt, vægtfylde 1,04 g/ml^a, størrelse 125 - 200 microns) pr. ml dyrkningsmedium resulterer i et volumen pr. dyrkningsflaske på ca. 500 μ l efter cellehøst (cellematrixen + CM-PBS). Efter endt cellehøst, sedimentation af cellematrixen og frasugning af CM-PBS, opnås et totalt volumen på ca. 250 μ l cellematrix. Herefter tilsættes Md/D₂O til et totalt volumen på 500 μ l. Ved at kende det fast afpipetteret volumen på 500 μ l (cellematrix + Md/D₂O) og udfra den antagelse at kuglerne er jævnt fordelt i røret, kan solvent mængden omkring kuglerne formodes maksimalt at udgøre 300 μ l (under antagelse af at adhæsionsmaterialet plus celler kan betragtes som en sfærisk kugle uden mulighed for solvent penetrering).

Koncentration af prøven i NMR røret vil derfor variere en smule mellem forsøgene p.g.a. det varierende ekstracellulære volumen. Der er ikke, i denne afhandling, korrigeret for denne forskel mellem forsøgene. Årsagen hertil er at de forsøg der udføres i denne afhandling, ikke skal benyttes til kvantitativ bestemmelse, men det er klart at denne faktor skal indgå i NMR eksperimenter, hvor sådanne bestemmelser skal indgå. Det er derfor valgt at tilsætte forbindelserne i en mængde der beregnes udfra det totale volumen (500 µl).

^a Opgivet af fabrikant.

2. Materialer og metoder.

2.1 Materialer.

Materialer. Celledyrkning: Wistar rotter (7 dage) blev leveret fra Panum Instituttets dyreafdeling, Danmark. Føtal kalve serum blev leveret af JRH Biosciences, Skotland, Nitex filter (80 µm) var fra SST-Thal, Schweiz. Stålkanvler (13 G x 5") var fra N.C.Nielsen, Danmark. Cellon polystyren mikrocarrier beads (125 µm) og 75 cm² PETG^a dyrkningsflasker var fra In Vitro Scientific Products, USA. Astrocyt dyrkningsmedie (Ast-DMEM) blev leveret fra Life Technologies, Danmark. Dobbeltdestilleret sterilt vand pH ca. 5 var fra Baxter A/S, Danmark. Penicillin (1x10⁶ IU/ml) var fra Løvens Kemiske Fabrik, Danmark. NMR spektroskopi: Deuteriumoxid var fra FluoroChem, England. Wilmad NMR rør (5 mm, type 507) og Wilmad glaspipetter blev leveret fra FluoroChem, England, Blodrør (10 ml) var fra Vacutainer. Reagenser: Dobbeltdestilleret vand (MilliQ) anvendes til alle opløsninger, men deuteriumoxid blev benyttet i tilfælde hvor buffere etc. skulle benyttes til NMR forsøg. Ved måling af pH blev der foretaget en direkte aflæsning fra pH apparaturet, hvilket betyder at pH værdierne i de viste spektre ikke er korrigeret for tilsætning af D⁺ og OD. Alle anvendte kemikalier var af analytisk renhed.

Apparatur. HPLC: For at vurdere renhedsgraden af den nysyntetiseret tripeptid analog diethylesterglutathion blev HPLC benyttet. Der blev hertil benyttet et Waters 486 UV/VIS fotometer og en Waters 600E system styreenhed med en U6K manuel injektor tilkoblet. Til dataopsamling og databehandling blev software programmet Millinium version 1,0 fra Waters (Milford, Massachusetts, USA) benyttet.

Centrifugering: Ved centrifugering blev en Sorvall RC28C centrifuge med et Sorvall SM-24 hoved benyttet (kapitel 2.3 og kapitel 2.4). Til ultracentrifugering blev et Sorvall S-20/17 rotorhoved benyttet. **Homogenisering**: Ved homogenisering af væv blev en Potter-Elvejhem homogenisator med motordreven teflonpastil anvendt. **Blodpræparation**: En Hemokrit 4 (Lic Instruments, Stockholm, Sverige) centrifuge blev benyttet til måling af blodets hæmotokrit. **NMR spektroskopi**: Ved ¹H-NMR forsøg blev der anvendt et 250 MHz Bruker NMR spektrometer. Alle indstillinger er opgjort i kapitel 2.4 og bibeholdes medmindre andet oplyses. Fourier transformation og databehandling af NMR data blev foretaget af software programmet NUTS 2D version 4.25 fra Acorn NMR, Fremont, Californien, USA.

32

2.2 Præparation af humane erythrocytter.

Erythrocytter blev benyttet til *in vivo* pilotforsøg og optimering af NMR opstillingen, blandt andet ved at undersøge hvorledes D_2O påvirker celler under en forsøgsperiode på maksimum 6 timer. Antallet af levende celler pr. ml blev bestemt løbende over en periode på 6 timer (40 µl 0,5 % Trypan blå/CM-PBS^b tilsættes 20 µl celler og der tælles i et Neubauer tællekammer^c).

Frisk tappet blod (10 ml), tappet fra frivillige raske personer, opblandes i Vacutainer rør indeholdende 120 μ l K₃-EDTA (340 mM). Blodet centrifugeres i 5 min ved 2500 g_{av}, 277 K og supernatant inklusiv buffy coat frasuges. Blodet vaskes i 1 vol kold PBS. Proceduren gentages 2 gange, hvorefter der tilsættes 1 vol. PBS.

Benyttes blodet samme dag til NMR forsøg tilsættes 1 vol. PBS/D₂O og blodet gennembobles i minimum 30 min med CO for at undgå tilstedeværelse af paramagnetisk met^d- og deoxyhæmoglobin i prøven. Tilstedeværelse af paramagnetiske komponenter i NMR røret vil resultere i ændrede kemiske shift værdier og en udtalt linieforbredning. Disse forhold er tidligere beskrevet af Fabry & San George (1983). Umiddelbart før NMR eksperimentet blev blodet endeligt pakket ved 3000g_{av} og 277 K. Efter frasugning af supernatant blev den endelige hæmotokrit bestemt til 80-90 %^e.

2.3 In Vivo ¹H-NMR spektroskopi på humane erythrocytter.

Flere af eksperimenterne med xenobiotika blev initialt udført med erythrocytter, dels for at optimere NMR modellen, men også fordi erythrocytten alment betragtes som værende et godt isoleret NMR modelsystem (Brown, *et al.*, 1977; Rabenstein, D.L., 1988; Szwergold, B.S, 1992).

NMR eksperimenter blev udført på et 250 MHz Bruker NMR spektrometer. En spin-echo pulssekvens' (gennemgået i kap. 1.5.1) med presaturation (1,3 sek.) af H₂O resonansen blev benyttet. Spektre blev opsamlet med 16 K datapunkter (*acquisition time* på 2,641 sekund), en ventetid τ = 68 msek mellem pulsene og med en sweep vidde på 5000 Hz. Spektre blev opsamlet i

^a Polyethyienterephthalatgiycoi.

^b calcium-magnesium fri PBS.

^{° 0,0025} mm².

^d Ferri-hæmoglobin.

^e Blodrør blev centrifugeret i en Hemokrit 4 - 11000 o/min.

^f Benyttes i dette projekt ved *ex vivo*, *in vivo* og *in vitro* forsøg.

seriekørsel i op til 6 timer. Temperaturen i alle NMR eksperimenter var 310 K. Bidraget fra makromolekyler i cellerne elimineres via spin echo teknikken^a.

2.4 Opsætning af en cerebellar astrocyt primær kultur.

Primær kulturer af cerebellare astrocytter blev præpareret som tidligere beskrevet (Hertz, et al., 1989; Damgaard, et al., 1995). Cerebellum blev udtaget operativt fra 7 dage gamle Wistar rotter og overført til 10 ml Ast-DMEM^b. Vævet blev overført til et 80 µm nylonfilter, hvorefter vævet blev presset gennem filteret ned i en ny opløsning Ast-DMEM (10 ml). På denne vis opnås en frasortering af bindevæv, blodkar o.s.v., samt en suspension bestående af udifferentierede astrogliale precursor celler. Efter gentagen opsugning (triturering) af suspensionen og fortynding blev cellesuspensionen udsået i 75 cm² kulturflasker (total volumen 15 ml). Før opsætning af cellerne blev påbegyndt blev kultur flaskerne klargjort. Kultur flaskerne blev 2 timer forinden inkuberet/coatet med 10 ml poly-L-lysin (10 mg/ml) og vasket med Tyrodes^o buffer af to omgange. Kulturerne blev dyrket i inkubator (95%) atmosfærisk luft/5% CO₂/90% humiditet/310K) i totalt 3 uger. Dyrkningsmediet blev skiftet 48 timer efter udsåning. Medieskift foretages i uge et hver tredie dag. Medie koncentrationen af føtalt kalve serum (FCS) blev ændret igennem dyrkningsperioden. FCS blev tilsat således, at der i første uge blev tilsat en medieblanding indeholdende 20% (v/v) FCS og i de efterfølgende 2 uger en medieblanding med henholdsvis 15% (v/v) og 10% (v/v) FCS. For at opnå morfologisk differentiering blev der i begyndelsen af tredie uge tilsat dibutyrylcyclisk AMP^d (dBcAMP) (0,27 mM) til dyrkningsmediet (Damgaard, et al., 1995).

På dag 8 tilsættes 85 mg Cellon mikrocarrier beads (fremover benævnt adhæsionsmateriale) pr. ml medium til dyrkningsflaskerne, således at der efter 3 ugers celledyrkning opnås en cellematrix bestående af celler plus adhæsionsmateriale. Denne cellematrix anvendes i senere NMR eksperimenter. Nedenfor i figur 2.2 og figur 2.1 er vist fotografier af en astrocytkultur henholdsvis med og uden adhæsionsmateriale.

^a Teorien er omtalt i detalje i faglitteraturen.

^b Specielt fremstillet Dulbecco modificeret Eagle medie (Gibco BRL: Kat. Nr. 074-90227A: 8,20 g l⁻¹).

^c 136,90 mM NaCl/2,68 mM KCl/1,36 mM CaCl₂.2H₂O/0,49 mM MgCl₂.6H₂O/0,36 mM NaH₂PO₄.H₂O/0,57 mM Na₂HPO₄.12H₂O.

^d N⁶, 2'-O-dibutyryladenosin 3':5'-cyklisk monophosphat.


Figur 2.1. Konfluente cerebellare astrocytter fotograferet i fase kontrast mikroskop. 1 cm = 56 μ m (sort bjælke). Et grønt filter er anvendt til kontrast forbedring.



Figur 2.2. Konfluente cerebellare astrocytter bundet til adhæsionsmaterialet, fotograferet i fase kontrast mikroskop. 1 cm = 56 μm (sort bjælke). Et grønt filter er anvendt til kontrast forbedring.

Ved en sammenligning af figur 2.1 og figur 2.2 ses, at der ved tilstedeværelse af adhæsionsmateriale og celler er en tendens til at dannelse af et netværk af celler og adhæsionsmateriale^a. Denne egenskab samt det at materialet er porøst gør, at dette netværk er et attraktivt alternativ til de eksisterende agarose baserede *in vivo, ex vivo* NMR opstillinger (Brindle, *et al.*, 1979; Fabry, 1987; Van Zijl, *et al.*, 1991). Laboratorieforsøg med en model bestående af et 10 mm NMR rør, har vist at kontrol med pH i røret og substrat tilførelse og fraførelse er mulig ved anvendelse af denne cellematrix^b. Af tekniske årsager, der vil blive omtalt senere, er det desværre ikke muligt at udnytte denne model på nuværende tidspunkt. Den model (5 mm NMR rør) der anvendes i dette projekt indbefatter derfor ikke muligheden for fuld kontrol med medie sammensætning og pH^c.

2.4.1 Behandling af astrocyt kultur og medier før NMR eksperimenter.

Dyrkningsflasker med konfluente celler (dag 21), blev vasket 2 gange med kold PBS før cellematrixen (se ovenfor) blev høstet med en rubber policeman^d og overført til et 1,5 ml eppendorfrør på isbad. Efter høst og sedimentation af cellematrixen erstattes supernatanten med deutereret medium (Md/D₂O). Ved ophør af sedimentationen bedømmes D₂O koncentrationen ekstracellulært at være ca. 75 %. Cellematrixen overføres herefter til et 5 mm NMR rør med en lang glaspipette.

Umiddelbart efter overførelsen af cellematrixen fra eppendorfrør til NMR rør blev en blanding af 95% atmosfærisk luft og 5% CO_2 tilført NMR røret, hvorefter en teflonprop med et lille hul blev ført ned i NMR røret, således at cellematrixen holdes i den nedre del af NMR røret.

Under selve eksperimentet varierede pH i få tilfælde fra pH 7,20 til et minimum på pH 6,92 ved forsøgets afslutning. Dette udsving i pH afhang dels af mængden af dannet laktat, dels af hvilke forbindelser der blev tilsat cellematrixen og hvilke restprodukter der blev dannet som følge af detoksificerings processerne i cellerne. Vitalitetsmålingerne i forbindelse med forsøg vil blive omtalt senere.

Frysetørret medium, xenobiotika og intermediære metabolitter der tilsattes cellerne^e før og under NMR forsøg, var genopløst i deutereret PBS eller D_2O og kalibreret til pH 7,2 og termostateret til stuetemperatur før anvendelse.

^a Fremover kaldt celler eller cellesuspension.

^b NMR røret er monteret med plastikslanger til ind- og udløb.

^c Mediet er i sig selv et buffersystem og indeholder phenolrød som pH indikator.

^d Blødt plastmateriale med hårdt skaft.

e I dette tilfælde både astrocytter + adhæsionsmateriale (cellematrixen), erythrocytter og lyserede erythrocytter.

Som ekstracellulær kontrol komponent blev der forud for forsøgene tilsat 1,2,4-benzentricarboxylat (BTC) svarende til en total koncentration på 3 mM. BTC er en anionisk forbindelse, som må forventes at have en så lav optagehastighed/absorption i cellerne, at denne forbindelse kan bruges som ekstern NMR reference.



1,2,4-benzentricarboxylat

2.4.2 Ex vivo NMR spektroskopi på cerebellare astrocytter.

NMR metoden er udviklet udfra tidligere arbejder og erfaringer med erythrocytter. Flere teknikker, heriblandt indstøbning af astrocytter i en agarosegel matrix og diverse perfusionsteknikker er forsøgt med ringe udbytte (der er ikke udført NMR eksperimenter på disse systemer).

2.5 Syntese af Dysprosium-ATP komplekset.

Et dysprosium-ATP kompleks anvendes i en række af forsøgene som paramagnetisk shift-/relaksationsreagens. Ved tilsætning af komplekset til cellematrixen i NMR røret, observeres der et stort shift mod lavere felt af signalerne fra kontrol komponenten, BTC, men ingen eller næsten ingen forskel i shift for andre signaler i spektret, hvilket angiver virkningen^a af komplekset. Eksperimenter udført af Barry, *et al.*, 1974b og Geraldes & Ascenso, 1984, har vist dysprosium-AMP komplekset som værende et relaksations- og shiftreagens^b.

Barry, *et al.*, 1974b, har fundet at lanthanid(III) ioner i D₂O binder selektivt til phosphatgruppen i AMP molekylet og danner et 1:1 kompleks. Udfra den antagelse at der skabes et 1:2 dysprosium-ATP kompleks, som foreslået af Gupta & Gupta, 1982, blev komplekset dannet ved opløsning af 22,31 mg DyCl₃ og 91,48 mg ATP i 1 ml D₂O, hvorefter pH blev justeret til 7,5. Hvis forholdet er 1:2, så antages koncentrationen af dysprosium-ATP komplekset at være 0,5 M.

^a Resultater der påviser effekten af shift-/relaksations reagenset på BTC er præsenteret i resultatafsnittet, tabel 3C.

^b Udført i en D₂O/DMSO-d₆ blanding.

Antallet af H₂O molekyler bundet i komplekset er ukendt for dysprosium komplekset, men vil sandsynligvis være i samme størrelsesorden, som antallet af H₂O molekyler der er fundet at være bundet til europium-ATP komplekset (1:2). Antallet af H₂O molekyler bundet til europium-ATP komplekset er bestemt til 1,6 ± 0,5^a (Eads, *et al.*, 1984). I lighed med komplekset Dy(PPP_i)⁻⁷ der tidligere er rapporteret (Gupta & Gupta, 1982) som værende non-hydrolysabelt forventes Dy(ATP)⁻¹ ikke at hydrolysere indenfor eksperimentets tidsramme (< 4 timer).

2.5.1 Syntese og anvendelse af glutathion analogen, glutathion diethylester.

Glutathion analogen, glutathion diethylester (GSH-DEE), blev syntetiseret som beskrevet (Levy, *et al.*, 1993) med få ændringer. Oprensningen af GSH-DEE foregik ved gelfiltrering (Sephadex G-25, 0,25 M NaCl) og renheden blev bestemt ved RF-HPLC^b (μ Bondapak C-18; gradienteluering (90%H₂O/10% CH₃CN/0,1% trifluoroacetat til 10%H₂O/ 90% CH₃CN/0,1% trifluoroacetat efter 45 min); 298 K), TLC (10 vol propanol/ 5 vol acetat/1 vol H₂O) og proton NMR^c. Udbyttet var på cirka 15 %. Prøven indeholder, som det vil fremgå af den senere gennemgang, små mængder af oxideret GSH-DEE og GSH monoethyl.

Forud for NMR forsøg, hvor GSH-DEE blev benyttet (omtalt ovenfor) blev der tilsat 2,5 μ l glutathion reduktase [EC 1.6.4.2] (60 U/ml) og 22,5 μ l NADPH (0,22 mM) til en 100 μ l GSH-DEE opløsning (totalt 500 mM), for at omdanne eventuelt oxideret GSH-DEE i prøven. GSH-DEE blev dernæst tilsat cellematrixen i NMR røret i en mængde svarende til 5 mM totalt.

2.6 Biokemiske målinger på astrocyt kultur.

2.6.1 Behandling af celler til bestemmelse af glyceraldehyd 3-phosphat dehydrogenase aktivitet og laktat indhold i overvæsken efter simuleret NMR forsøg.

Carrierbundne konfluente astrocytter (cellematrixen) vaskes 2x med calcium og magnesiumfri PBS (CM-PBS) og cellematrixen høstes med en police rubbermand til et eppendorfrør (totalt ca. 3,5 x10⁶ celler pr. ml). Efter henstand ved 277 K udskiftes overvæske med 100% (v/v) deutereret medie

^{*} Forsøget er udført ved pH 6,0

^b Apparatur omtalt i kapitel 2.1.

^c Indstillinger som i kapitel 2.3.

således at der opnås en D2O koncentrationen på ca. 75% (v/v)^a. Herefter overføres cellematrixen (ca. 800 µl) til et NMR rør (5 mm) med en speciel lang glaspipette. Alle NMR rør henstår i vandbad (300 K, uden rystning) under forsøget. Til varierende tid (30 - 240 min) fjernes NMR rør fra vandbadet og der udtages så meget overvæske som muligt før cellerne vaskes forsigtigt med 200 µl CM-PBS. Efter henstand overføres vaskevæsken til reagensglaset indeholdende overvæsken. Efter frysetørring genopløses overvæsken i 200 µl milliQ vand og en aliquot (50 el. 100 µl) herfra afpipeteres til et eppendorfrør og henstilles ved 193 K. Denne aliquot anvendes til senere bestemmelse af glyceraldehyd 3-phosphat dehydrogenase [EC 1.2.1.9; GADPH] aktivitet og laktat indhold.

Cellerne fra NMR røret udtages til et eppendorfrør til senere bestemmelse af DNA, protein mængde og mitochondriel succinat dehydrogenase [EC 1.3.99.1; SDH] aktivitet. Prøver til protein og DNA bestemmelse sonikeres 5x3 sek, 5 watt og henstilles ved 193 K til senere bestemmelse. Celler til bestemmelse af SDH blev viderebehandlet samme dag (stadig ved 277 K).

Som kontrol benyttes søsterkulturer (25 cm²). Kulturflaskerne vaskes med 2x CM-PBS, tilsættes frisk pH indstillet medium i kendt mængde og henstilles åbnet i inkubator (300 K, 95% $AtmO_2/5\%$ CO₂). Som positiv kontrol benyttes celler i dyrkningsflasker hvor der i 10 min er pumpet N₂ gas ind i dyrkningsflasken. Låget fastgøres dernæst og flasken sættes placeres i inkubator. Både kontrol og positiv kontrol henstår i 240 min behandles som ovenfor, dog uden ekstra vask af cellerne.

2.6.2 DNA bestemmelse.

DNA koncentrationen blev benyttet som et mål for antallet af celler i NMR røret. Celleprøven (100 μ l) overføres til eppendorf rør indeholdende 150 μ l EDTA (10 mM; pH 12,1) og der inkuberes ved 310 K i 20 min før prøvens pH indstilles til 7,0 med 25 μ l KH₂PO₄ (1 M). Dernæst tilsættes 250 μ l Hoechst^b og der måles fluorescens ved 350 nm og 455 nm.

2.6.3 Laktat bestemmelse.

Laktat indholdet i overvæsken efter et simuleret NMR forsøg, blev bestemt som tidligere beskrevet (Mills, J.C. *et al.*, 1995) med få modifikationer. En

Den høje koncentration af D₂O anvendes for at få et locksignal.

Stamopløsning; 200 μ g/ml Hoecht 33258 der fortyndes 1000x i 10 mM NaCl/10 mM Tris pH 7,0 før brug.

aliquot tilsættes 40% (v/v) perchlorat (PCA) således at PCA koncentrationen i prøverøret er 5% (v/v). Blandingen centrifugeres ved 8000 g_{av} og 277 K i 10 min, hvorefter supernatant overføres til et i forvejen afvejet eppendorfrør. Supernatanten neutraliseres med 2,5 M KHCO₃ til pH 6,5 - pH 7.0. Eppendorfrøret afvejes igen for at kunne beregne fortyndingen af aliquoten. Der centrifigures igen ved 3000 g_{av} og 277 K i 10 min. Der udtages 100 µl supernatant til 400 µl reaktionsblanding (0,5 M glycin/0,4 M hydrazin/pH 9.0). Efter henstand ved 301 K i 1 min aflæses, ved konstant spektrofotometer udvisende, den optiske densitet ved 340 nm (OD_{340nm}). Reaktionen igangsættes ved tilsætning af 32 mM β-NAD⁺.

L-laktat + β -NAD⁺ + Hydrazin \rightarrow Pyruvat-Hydrazin + NADH + H₃O⁺

Efter yderligere 15 min. aflæses OD_{340nm} for at bestemme mængden af NADH dannet. Grundet molforholdet 1:1 (laktat:NADH) kan koncentrationen af laktat bestemmes udfra mængden af NADH dannet. Der anvendtes en molær ekstinctionskoefficient for NADH på 6,22 mM⁻¹*cm⁻¹(Inoue, *et al.*, 1995). Proteinbestemmelsen blev udført som tidligere beskrevet (Lowry *et al.*, 1951).

2.6.4 LDH bestemmelse.

Efter NMR eksperimentet blev væskefasen^a over cellematrixen opsamlet for bestemmelse af ekstracellulær laktat dehydrogenase [EC 1.1.1.27; LDH] aktivitet (Welder & Acosta, 1994). Cellematrixen overføres til eppendorfrør med pasteur pipette, vaskes med 2 x 500 µl kold PBS^b. Overvæske samt cellematrix sonikeres på isbad i 5x3 sek. 5 watt og placeres ved 193 K til senere bestemmelse af LDH aktivitet.

Prøver (100 µl) udtaget fra overvæske- og cellematrixfraktionen fra henholdsvis NMR prøve og kontrolprøven^c, overføres til rør indeholdende 2,86 ml 0,1 M phosphat buffer (pH 7,5; 303 K)^d og 30 µl Na-pyruvat (2,3 mM). Reaktionen igangsættes med 8 µl NADH (0,25 µM). Absorbancen aflæses ved 340 nm ($\varepsilon_{\text{NADH}}$ = 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹) i 5 min for hvert tiende sekund.

^a Rester fra metabolisme/lysis/detoksificeringsprocesser etc. (fremover kaldt overvæske).

^b Sedimentation af celler forekom efter få minutter, hvorefter supernatant kunne frasuges.

^c Celler + adhæsionsmateriale er dyrket under normale betingelser.

 $^{^{}d}$ 2,1761 g/l KH₂PO₄ og 22,4658 g/l Na₂HPO₄.7 H20 opløst i 1000 ml milliQ vand.

2.6.5 Glyceraldehyd 3-phosphat dehydrogenase aktivitet.

Ekstracellulær aktivitet af det intracellulære membranbundne glykolyse enzym glyceraldehyd 3-phosphat dehydrogenase (GADPH) blev benyttet som indikator for celledød. Aktiviteten af enzymet blev bestemt ved en metode modificeret udfra en tidligere beskrevet metode (Mallozzi, *et al.*, 1995) under optimale kinetiske betingelser. Den opkoncentreret prøve (20 µl) opblandes i 20 µl Triton X-100 (0,2%) og henstår i 1 min, hvorefter der tilsættes 380 µl Na₂PP_i buffer (4 mM, pH 8,4)/30 µl Na₄H₂As (0,4 M)/50 µl β-NAD (20 mM). Alle prøver behandles med Triton X-100. Reaktionen igangsættes ved tilsætning af 100 µl glyceraldehyd 3-phosphat. Totalvolumen 600 µl. Reduktionen af β-NAD⁺ til NADH følges over 5 min. Ved de anvendte mol forhold opnås en liniær reaktionshastighed i minimum 5 min. Der anvendes en molær ekstinctionskoefficient for NADH på 6,22 mM^{-1*}cm⁻¹.

2.6.6 Isolering af mitochondrier fra konfluente carrierbundne astrocytter i primær kultur.

Succinat dehydrogenase (SDH) aktiviteten blev benyttet som indikation for funktionsdygtige mitochondrier og dermed også for tilstedeværelsen af levedygtige celler i NMR røret. SDH aktiviteten blev bestemt som tidligere beskrevet af Ells, 1959, med små ændringer.

Mitochondrier blev isoleret som beskrevet (Rickwood, et al., 1993). Cellerne (ca. 500 µl) frigøres fra mikrocarrierne med 200 µl trypsin (0,25% (w/v)) i 1 min, hvorefter der tilsættes 50 vol medium. Suspensionen centrifugeres ved 100gav i 2 min. Supernatant fjernes og der tilsættes 5000 µl homogeniserings buffer (triethanolamine/acetat buffer (10 mM, pH 7.0)). Suspensionen homogeniseres (10 gange op og ned, 500 rpm, 277 K). Homogenatet centrifugeres ved 1500 g_{av} (3480 rpm, SM-24 rotorhoved) og 278 K i 10 min. Supernatanten opsamles. Pellet (med bl.a mikrocarrier) tilsættes igen 5000 µl homogeniserings buffer og proceduren gentages. Den kombineret supernatant centrifugeres ved 10000 gav (8990 rpm, SM-24 rotorhoved) og 278 K i 10 min. Supernatant fjernes og pellet opslemmes i 100 μ l 0,8 M sucrose blanding (2 M sucrose fortyndet i 1mM Na₂-EDTA /0,1% BSA/10 mM Tris-HCI, pH 7.5). Forud er der produceret centrifugerør indeholdende gradienter fra 1 M - 2 M sucrose blanding (sucrose i 1 mM Na₂-EDTA/0,1% BSA/10 mM Tris-HCl, pH 7.5). Der centrifugeres dernæst i 2,5 timer ved 74168 g_{av} (20000 rpm, S-20/17 rotor hoved) og 278 K. Mitochondriefraktionen vil have en densitet på 1,19 g/ml i en sådan gradient (kan ses som et svagt brunt bånd i gradienten).

41

2.6.6.1 Bestemmelse af succinat dehydrogenase (SDH) aktivitet.

SDH aktivitet blev under optimale kinetiske betingelser bestemt som beskrevet af Glick, 1961. Mitochondriefraktionen (20 µl) tilsættes en blanding bestående af 300µl Na₂-EDTA (0,125 M)/75 µl BSA (5 g/l)/37,5 µl Na-succinat (200 mM)/205 µl NAH₂PO₄H₂O/37,5 µl KCN (40 mM)/75 µl 2,6-dichlorphenolindophenol (1 mM;DCPIP) ved 298 K. Reaktionen igangsættes ved tilsætning af prøve og OD_{600 nm} aflæses over 5 min. En molær ekstinctionskoefficient for DCPIP på 1,78*10⁴ M⁻¹*cm⁻¹ v/293 K (Glick, 1961) benyttes til bestemmelse af den enzymatiske aktivitet.

Proteinmængden i mitochondriefraktionen blev bestemt som tidligere beskrevet (Lowry *et al.*, 1951). Mitochondriefraktionen blev efter måling af enzym aktivitet nedfrosset ved 193 K og genoptøet på is dagen derpå. Den optøede mitochondriefraktion blev sonikeret 3x5 sek. (5 watt) før en aliquot på 25 µl blev opblandet i 25 µl Triton X-100 (0,2%) og henstod i 1 min, hvorefter prøven blev fortyndet med milliQ vand til 225 µl til senere proteinbestemmelse.

3. Resultater.

3.1 Biokemiske pilotforsøg.

Traditionel farvning af cellerne med f.eks. trypan-blåt, MTT^a o.s.v, med henblik på at evaluere procent levende celler kunne ikke udføres p.g.a cellernes adhæring til mikrocarrierne. Assay af laktat dehydrogenase, glyceraldehyd dehydrogenase og succinatdehydrogenase aktivitet, blev istedet anvendt som indikation for levedygtige celler i NMR røret.

Af figur A kan det iagttages, at der ikke er signifikant forskel i den cellulære DNA koncentration efter NMR forsøg og den cellulære DNA koncentration i eppendorfrøret (cellematrix). Samtidig observeres, i forhold til kontrolprøven (celler i dyrkningsflaske), en signifikant forøgelse i koncentrationen af DNA hvis cellerne dyrkes på adhæsionsmaterialet (i figur A benævnt cellematrix og celler efter NMR).



Figur A viser koncentrationen af DNA. De anvendte prøver fra NMR forsøg har ikke været udsat for xenobiotika. Prøvens pH varierede fra 6,9 - 7,2 ved udtag af prøve fra NMR røret. Tidsperioden for henstand og NMR eksperiment er ca. 6 timer for hvert af forsøgene. Celler er celler udtaget direkte fra dyrkningsflaske og uden adhæsionsmateriale. Data for cellematrix er opnået ved at placere cellematrixen i et tillukket eppendorfrør med deutereret medie ved 310 K. I alle eksperimenter er der, som i senere eksperimenter, tilført eppendorfrør og NMR rør en luftblanding bestående af 95 % atmosfærisk luft og 5 % CO₂. I alle forsøg er celler vasket 2x i PBS, hvorefter disse er sonikeret 5 x 3 sekunder (5 watt). Værdier er opgjort som gennemsnit \pm S.D. P \leq 0,05 (students t-test).

Ved bestemmelse af den specifikke laktat dehydrogenase aktivitet (intra- og ekstracellulært) i ovennævnte forsøg^e, iagttages en svag stigning i den ekstracellulære LDH aktivitet (figur B). Disse data indikerer en begyndende (ikke signifikant) celledød i NMR røret efter et 360 minutters eksperiment^e, der sandsynligt skyldes cellernes nedsatte energistatus.

^b Der er kun målt LDH aktivitet på modelsystemet med matrix bundne celler.

^a Thiazoyl-blåt.

[°] Uden tilsætning af xenobiotika.



Figur B. Specifik aktivitet af LDH i konfluente celler og overvæske før og efter NMR eksperiment. Værdier er opgjort som gennemsnit \pm S.D. P \leq 0,05 (students t-test). Antal observationer = n.

Disse data skal sammenholdes med laktat koncentrationen i overvæsken. Forholdet mellem laktat koncentrationen i overvæsken fra kontrolgruppen (normalt behandlede celler) og overvæsken fra celler der har været behandlet under betingelser der svarer til betingelserne under et NMR forsøg ses af figur C. I dette forsøg er der anvendt færre celler i NMR røret end under det reelle NMR forsøg (figur B). Af figur C (linie) iagttages det at cellematrixen efter 240 minutters inkubation med deutereret medie har udskilt signifikant ($P \le 0.05$) mere laktat end kontrolprøven (celler). Effekten af deuteriumoxid kan indirekte iagttages idet dyrkningsmediet i kontrolprøven ikke er deutereret. Det skal bemærkes at også celler med N, gas over mediet (positiv kontrol) også udskiller signifikant mere laktat end kontrolprøven i løbet af forsøgsperioden (240 min). Værdien for cellematrixen (240 min) er dog signifikant ($P \le 0.05$) højere end værdien for den positive kontrol. Ved korrigering for cellemængde ses samme udvikling i den ekstracellulære laktat koncentration (figur C, søjle). Disse data indikerer, sammenholdt med data i figur B, at cellernes energiniveau er lavere end normalt efter NMR eksperimentet, men at der stadig er levedygtige celler i NMR røret efter et 240 minutters NMR eksperiment.



Figur C viser laktat koncentrationen i overvæsken efter inkubering af carrierbundne astrocytter med medium/D₂O til varierende tid. Søjlediagram viser værdier korrigeret for cellemængde. Alle forsøg, på nær kontrol (celler), er udført i NMR rør ved 300 K og i alle forsøg er overvæsken fjernet og celler vasket til den opgivne tid. Kontrol (celler), er ikke udsat for deuterium og uden adhæsions materiale. Alle prøver har været placeret i inkubator med åbent låg. Positiv kontrol, kaldet celler med N₂, har fået tilført N₂ og er blevet henstillet i inkubator med lukket låg. Begge kontroler har været inkuberet med frisk bufferet medium i totalt 240 min. Værdier er opgjort som gennemsnit \pm S.D. P \leq 0,05 (students t-test). Antallet af observationer = n.

Virkningen af deuterium på antallet af celler blev undersøgt ved et mindre forsøg med humane erythrocytter. Det udførte pilotforsøg med humane erythrocytter viser en signifikant ændring i mængden af celler pr. ml indenfor et 6 timers eksperiment (figur D). Mængden af celler pr. ml i kontrolgruppen (PBS blev anvendt som solvent) var konstant i hele forsøgsperioden (værdi som i figur svarende til 0 tid).



Figur D. Humane erythrocytter (hæmatocrit = 50% v/v) udsat for ca. 100 % PBS/D₂O. Alle tællinger (n) er foretaget udfra samme blodrør. Antallet af celler pr. ml i kontrolgruppen (PBS/H₂O) er ikke vist, men svarer overens med værdien for 0 tid. Kontrolgruppe og prøve er behandlet ens under eksperimentet. Værdier er opgjort som gennemsnit \rangle S.D. P < 0,05 (students t-test).

Forekomst af membranrester i det konditioneret medie som følge af celledød kan identificeres på flere måder. I dette tilfælde undersøges for

tilstedeværelse af det membranbundne glykolyse enzym glyceraldehyd 3phosphat dehydrogenase (GAPDH). Som det ses af tabel 3A er aktiviteten af GAPDH i den sonikeret cellefraktion ca. 60x større end aktiviteten i overvæsken fra celler der har været inkuberet med deutereret medium. Til sammenligning kan det umiddelbart ses at der kun forekommer en svag stigning i omsætningen af glyceraldehyd 3-phosphat (G3P) i de NMR rør der har været udsat for det deutereret medium. Omsætningsniveauet er dog kun på ca. 1,3% af det niveauet for den positive kontrol (sonikeret celler - det skal bemærkes at alle prøver, også overvæsken, har været sonikeret før måling).

	nmol G3P omsat pr. ml*min
Kontrol	37,2 n=3
Negativ kontrol	ikke målelig n=3
30 min	0,56 n=2
60 min	0,63 n=2
180 min	0,54 n=3
240 min	0,56 n=3

Tabel 3A viser indirekte forekomsten af GADPH i overvæsken målt ved mængden af glyceraldehyd 3-phosphat (G3P) omsat pr. ml*min. Antallet af NMR prøver = n. Kontrol cellefraktion er tre søsterkulturer, der ikke har været inkuberet med deutereret medium. Negativ kontrol er overvæsken fra kontrol cellefraktionerne ovenfor. Mediet har i tilfældet med kontrollerne været udskiftet til tiden 0 og overvæsken fjernet efter 240 min. Kontrolerne og prøver fra overvæsker er sonikeret før måling. Alle prøver er behandlet med Triton X-100. De deutereret prøver har alle været placeret i NMR rør under NMR betingelser (se metoder), dog uden spinning, da dette var praktisk umuligt.

Aktiviteten af det mitochondrielle tricarboxylsyre cyklus enzym succinatdehydrogenase anvendes traditionelt som indikator for mængden af intakte levedygtige mitochondrier og dermed også for levedygtige celler. Den specifikke succinat dehydrogenase aktivitet anvendes her til at påvise, at der stadig er levende celler i NMR røret selv efter 240 min inkubering med deutereret medium.

Af figur E iagttages, at er der ikke signifikant forskel mellem celler der har været under NMR betingelser i 240 min (prøverne har ikke været rotereret, men ellers behandlet under samme forhold som ved et normalt NMR forsøg).



Figur E viser succinat dehydrogenase aktiviteten i isoleret mitochondria fra carrierbundne astrocytter der har været udsat for deutereret medium i 240 min og har været placeret i NMR rør ved 300K. Kontrol er celler der ikke har været udsat for D₂O. Kontrol er udtaget direkte fra dyrkningsflasken. Kontrol og prøver er behandlet ens. Værdier er opgjort som gennemsnit \pm S.D. Antallet af observationer = n. P \leq 0,05 (students t-test).

3.2 Diskussion af de biokemiske resultater - bestemmelse af vitalitet.

Under de eksperimentelle forhold hvor NMR spektrene er opsamlet er det naturligvis vigtigt at kunne dokumenterer at cellematrixen er relativt intakt. I nærværende arbejde er søgt belyst vitabiliteten ud fra mitochondrie aktivitet og permeabilitet af cellernes plasmamembran er søgt belyst henholdsvis ved assay af SDH og bestemmelse af laktat i det konditioneret medie^a. Det har ikke været muligt at bestemme vitabiliteten af cellerne efter NMR forsøg ved histokemisk farvning p.g.a cellernes adhæsion til mikrocarrier materialet.

Thomson, 1963, har vist at store koncentrationer af deuteriumoxid er toksisk for ikke konfluente celler, men det er ikke klarlagt om konfluente celler kan overleve kortere tids inkubering med deuteriumoxid. Resultatet af forsøgene med erythrocytter viser en tydelig tendens til celledød ved tilstedeværelse af deuteriumoxid (ca. 100 %). Der er i dette arbejde udført enkelte NMR eksperimenter i fravær af deuteriumoxid^b, men udbyttet af disse forsøg var beskedent.

Som ventet viser resultatet for laktat eksperimentet, at laktat indholdet i overvæsken fra celler der ikke har haft tilgang af ilt og kuldioxid forøges i løbet af 240 min i forhold til kontrolprøven. Effekten er især signifikant efter inkubering af celler i NMR rør med deutereret medie. Den tydelige udvikling i laktat koncentrationen, indikerer at cellepermeabiliteten for intracellulære

Der blev benyttet ekstern D₂O (insert) som lock-signal.

^a Her også betydende overvæske i NMR røret.

cytosoliske metabolitter er forøget. Årsagen er sandsynligvis den kombineret effekt af deuterium og sedimenteringen (ved henstand) af cellematrixen (i NMR rør). Flere forskergrupper (Olson & Holtzman, 1988; Hertz, *et al.*, 1992; Hertz & Peng, 1992; Juurlink, *et al.*, 1992; Juurlink & Hertz, 1993) har fundet, at astrocytters energiniveau nedsættes, hvis tilgangen af ilt mindskes f.eks. under hypoxi. Det skal hertil bemærkes, at astrocytter er vist, at kunne overleve hypoxi og substrat underskud i op til flere timer (Juurlink, *et al.*, 1992; Sochocka, *et al.*, 1994).

I tilknytning til ovenstående indikerer udviklingen i den ekstracellulære LDH aktivitet under NMR forsøg at en del af cellepopulationen sandsynligvis er lyseret efter et 360 minutters eksperiment, hvilket stemmer overens med resultatet fra deuteriumoxids effekt på erythrocytter og resultaterne for laktat koncentrationen i overvæske. Forklaringen på celledøden kan, som nævnt ovenfor, skyldes at koncentrationen af ilt i NMR røret, især i den nedre del af røret hvor solvent penetreringen er lav, efter 4 timer må forventes at være begrænset.

Resultaterne for den mitochondrielle SDH aktivitet, den cellulære/ekstracellulære GADPH/LDH aktivitet og udviklingen i den ekstracellulære laktat koncentration indikerer at størsteparten af cellerne i NMR røret er intakte. På baggrund af udviklingen i den ekstracellulære LDH aktivitet og laktat koncentration vil forsøgsperioden fremover blive nedsat til 3 timer. Der vil i få tilfælde blive præsenteret resultater hvor forsøgsperioden overskrider 3 timer, men generelt vil der ikke blive præsenteret resultater fra forsøg, hvor celler har været eksponeret for xenobiotika eller andre forbindelser i mere end 3 timer.

3.3 ¹H-NMR på astrocytter.

Et NMR spektrum^a af konfluente cerebellare astrocytter i en PBS/D₂O buffer, er vist i figur 3.1. Der iagttages et stort antal signaler i spektret. En tilordning af disse signaler er givet i tabel 3B. På grund af den anvendte spin-echo NMR teknik og varigheden af ventetiden, τ , vil singletter og tripletter udvise positiv fase, hvorimod dubletter, kvartetter og multipletter negativ fase^b.

Et udsnit af spektret (4,3 ppm - 0,5 ppm) ses i figur 3.2. Tilordningen af signalerne i spektret er foretaget udfra litteraturen og egne forsøg. Visse signaler mangler en tilordning. I det viste spektrum er cellerne høstet i PBS/D₂O ca. 42 min før spektret er færdig opsamlet.

^a Som tidligere nævnt er alle udførte NMR eksperimenter udelukkende spin-echo proton NMR.

^b Omtalt i introduktionen, figur 1.2.



Figur 3.1. ¹H-NMR af cerebellare astrocytter i PBS/D₂O. Tilordning i Tabel A. Området 6,0 ppm til 0,5 ppm er vist. Som ekstern reference er der anvendt 0,75% TSP (ikke vist). Spektret er opsamlet over 12 min. Cellerne har på dette tidspunkt været inkuberet med PBS/D₂O i totalt 42 minutter (ΔT = 42 min). Der observeres ingen signaler downfield for solventsignalet (4,69 ppm).

I figur 3.2 observeres signalet fra de cholinholdige forbindelser ved 3,20 ppm^a, signal fra total kreatin ved 3,05 ppm, signaler fra laktat (en dublet ved 1,32 ppm og en kvartet ved 4,13 ppm), acetat (singlet ved 1,92 ppm), flere aminosyrer blandt flere alanin (en dublet ved ca. 1,50 ppm), isoleucin, valin og leucin ved ca. 1,02 ppm (dublet) og glycin (en singlet 3,57 ppm). Disse signaler vil fremover blive brugt som reference for det intracellulære miljø. Forholdet mellem intensiteten af cholin signalet og andre signaler i spektret vil i alle fremtidige spektre blive anvendt som et udtryk for udviklingen i spektret, udfra den antagelse at intensiteten af cholin signalet (3,20 ppm) er forholdsvis stabilt i hele forsøgsperioden^b.

Som det bemærkes findes der en del signaler i spektret. Flere af disse signaler er endnu ikke tilordnet med sikkerhed, blandt andet det store negative signal ved 1,33 ppm. Dette shift passer overens med det kemiske shift for methyl gruppen fra laktat, men også for methyl protonerne i threonin. Området mellem 3,30 ppm og 4,00 ppm indeholder signaler fra inositol, flere

^a Alle ppm angivelser i afhandlingen er afrundet til 2 decimaler p.g.a usikkerheden ved bestemmelsen som følge af en software begrænsning.

^b Denne tendens er observeret i flere forsøg med en ekstern 0,75% TSP som reference (resultater ikke vist).

sukkerforbindelser og forskellige forbindelsers methylen/methin grupper, blandt andre methin protonen i glutamat (giver signal ved ca. 3,75 ppm). De tilordnede signaler er opgjort i tabel 3B.



Nedenfor i figur 3.3, vises et spektrum af dyrkningsmediet med 10 % FCS. Det ses udfra spektre af dyrkningsmediet og det konditioneret medie[®], at flere af de signaler der observeres i figur 3.1 kan genfindes her, f.eks. signalet fra de cholinholdige forbindelser (3,20 ppm) kan observeres. Det negative signal ved 1,3 ppm tilordnes som methyl gruppen fra threonin (næsten samme placering som laktat signalet i figur 3.2). Det positive signal ved 2,03 ppm er endnu ikke tilordnet, men observeres i senere spektre.

^a Opsamlet umiddelbart før NMR eksperimentet. Sidste medieskift foretaget 2 dage tidligere.

Forbindelse	Multiplicitet	ppm
Cholesterol	(singlet) -CH ₃	0,50
Triacylglyceroler (a)	(triplet) -CH ₃	0,84
Valin	(dublet) $-C^{\gamma}H_{3}$	0,98 - 1,06
Isoleucin	(dublet) -CH ₃	0,98 - 1,06
Leucin	(dublet) $-C^{\gamma}H_{3}$	0,98 - 1,06
β-hydroxybutyrat	(triplet) $-C^{\gamma}H_{3}$	1,15
Triacylglyceroler ^(a)	(kvintetter) -(CH ₂) _n	1,29
Laktat/threonin	(dublet) - $C^{\beta}H_{3}$, - $C^{\gamma}H_{3}$	1,32 - 1,33
Alanin	(dublet) $-C^{\beta}H_{3}$	1,45 - 1,50
Acetat	(singlet) -CH ₃	1,90 - 1,92
Methionin	(triplet) -S-CH ₃	2,03 - 2,05
Glutamat/glutamin	(kvartet) - $C^{\beta}H_{2}$ -	2,10 - 2,15
Glutamat/glutamin/succinat/pyruvat	(triplet) - $C^{\gamma}H_2$ -	2,34 - 2,39
Kreatin/Phosphokreatin (total kreatin)	(singlet) N-CH ₃	3,05
Cholinholdige forbindelser	(singlet) -N-(CH ₃) ₃	3,20 - 3,22
Ikke tilordnet	(triplet)	3,52
Glycin	(singlet) -CH ₂ -	3,57
Inositol/glukose/glutamat/cystein m.fl.	-CH- / -CH ₂ -	3,70 - 3,90
Kreatin/Phosphokreatin m.fl.	(singlet) -CH ₂ -	3,93
Laktat	(kvartet) -C ^α H-	4,10 - 4,20

Tabel 3B. Kemiske shift værdier i forhold til TSP. Normalt forekommende forbindelser i ex vivo ¹H NMR spektre af cerebellare astrocytter i PBS/D₂O. Solvent signalet (HDO) ved 4,69 ppm er ikke opgjort i tabellen. Da flere af forbindelserne har signaler der overlapper andre signaler, er der af hensyn til overskueligheden kun medtaget kemiske shift værdier for det eller de markante signaler fra den specifikke forbindelse. ^(a) = formodet mobile fedtsyrer fra triacylglyceroler.



* Frysetørret og genopløst i D₂O umiddelbart før NMR eksperimentet.

Nedenfor i figur 3.4 ses et spektrum af konditioneret medie (behandlet som dyrkningsmediet i figur 3.3). Der er ikke foretaget en opkoncentrering af hverken dyrkningsmedie eller det konditioneret medie før NMR eksperimenterne.

En nærmere gennemgang af spektret i figur 3.4, viser at flere af de signaler der observeres i dyrkningsmediet ikke genfindes her, men der iagttages i stedet nye signaler i spektret. Udover en stor koncentration af laktat (1,33 ppm og 4,10 ppm) i det konditioneret medie, iagttages signaler fra glutamat (3,75 ppm, 2,41 ppm og 2,14 ppm). I dette spektrum (figur 3.4) observeres også signalet ved 0,92 ppm. De to signaler ved ca. 1,48 ppm og 1,57 ppm observeres i senere spektre.



Figur 3.4. Konditioneret medie opsamlet fra dyrkningsflasker med konfluente cerebellare astrocytter. Sidste medieskift er foretaget 2 døgn tidligere. Mediets pH er indstillet til pH = 7,2 med 0,25 M NaOD. Området 4,5 - 0,5 ppm er vist. Der er ingen signaler downfield for HDO signalet. Opsamlet over $4\frac{1}{2}$ min.

3.3.1 Diskussion - medie/celler.

Som det ses af spektret i figur 3.2, er det klart at der observeres flere signaler der kun kan henføres til cellernes metabolisme. Blandt andet iagttages et signal fra acetat (1,92 ppm). Dette signal ses tydeligt efter kun 42 minutters forløb og mængden er laktat syntes samtidig at være tiltagende (ses ikke direkte af det viste spektret, men i et serieforløb kan dette observeres). Acetat signalet observeres kun sjældent, når cellematrixen er i deutereret dyrkningsmedie (se f.eks. figur 3.6)^a, hvilket tydeligt viser at eksperimenter med dette modelsystem, nødvendigvis skal foregå i nærvær af frisk gennemboblet dyrkningsmedium. En fremkomst af acetat signalet i spektret tages som udtryk for at energiniveauet i cellerne og ilt koncentrationen i NMR røret er aftagende.

En gennemgang af spektret for frisklavet dyrkningsmedie viser, at flere af de signaler der normalt observeres i NMR forsøg med cellematrixen i det deutereret medie (se f.eks. figur 3.5) kan genfindes i dette spektrum (figur 3.3). Signalet ved 1,33 ppm må tilskrives threonin, da der ikke er laktat i mediet. Det negative signal ved 1,19 ppm formodes at stamme fra en lavmolekylær forbindelse i serumet, da dette signal normalt ikke observeres i forsøg hvor serum er udeladt i mediet⁶. Der er stadig få signaler i dette spektrum der ikke er tilordnet.

Betragtes spektret for det konditioneret medie kan det ses at der er en forholdsvis stor koncentration af laktat i det konditioneret medie. Forekomsten af laktat i det konditioneret medie stemmer overens med andre data vedrørende transport af laktat ud af cellen (Clarke, *et al.*, 1989; Nedergaard & Goldman, 1993). I spektret for det konditioneret medie (figur 3.4) og i spektret for dyrkningsmediet (figur 3.3), observeres et signal ved 2,03 ppm. Dette signal kan temporært observeres i få spektre (blandt andet i figur 3.2 og figur 3.8), hvilket må betyde at det er en forbindelse der forholdsvis hurtigt metaboliseres i cellen. Dette signal kan skyldes L-methionin i dyrkningsmediet. L-methionin findes i en forholdsvis stor koncentration i mediet (ca. 2 mM), hvorfor signalet skulle kunne observeres i spektret. Methyl gruppen i methionin (-S-CH₃) vil have et kemisk shift der svarer til ca. 2 ppm (singlet), mens de andre signaler (en dublet ved ca. 1,3 ppm og en triplet omkring 3,0 ppm) fra methionin er placeret i områder hvor der i forvejen er flere signaler.

Af andre interessante signaler i figur 3.3 og figur 3.4, der ind i mellem observeres i spektrene kan nævnes signalet ved 0,92 ppm i figur 3.4. Signalet kan tænkes at oprinde fra triacylglycerolernes methyl protoner.

3.4 Ekstern reference: 1,2,4-BenzenTriCarboxylat.

1,2,4-benzentricarboxylat (BTC) også kaldt 1,2,4-tricarboxybenzen blev benyttet som ekstern reference for at synliggøre effekten af shift-

Disse celler og efterfølgende eksperimenter med celler er behandlet på samme vis som cellerne i figur 3.2. Eneste forskel er mediet.
Det normelt enverde medie med 500 mi fi tilf blackbard for state.

Det normalt anvendte medie med FCS er i få tilfælde blevet frysetørret og resuspenderet i deuteriumoxid, hvorefter det resuspenderede medie er blevet brugt til NMR forsøg med celler.

/relaksationsreagenset. BTC benyttes i lak og plastik fremstillingen. I de forsøg hvor BTC er anvendt, er BTC opløst i D_2O og pH indstillet til 7,2 med NaOD.



Astrocytter i deutereret medie (efterfølgende forkortet til Md/D_2O) tilsat BTC giver et spektrum som i figur 3.5. Signalerne i området 7,45 -7,90 ppm skyldes BTC. Kemiske shift værdier for BTC er ^aH (7,89 ppm), ^bH (7,80 ppm) og ^cH (7,45 ppm). Grundet de lidt ændrede omstændigheder i forhold til spektret i figur 3.1, er der i dette spektrum færre signaler^a end i figur 3.2. Der findes i dette spektrum nogle signaler der ikke tidligere er observeret. Der observeres et negativt signal ved ca. 1,85 ppm og et stort positivt signal ved 1,49 ppm (dette signal observeres i senere spektre). Signalet ved ca. 1,85 ppm er tidligere observeret i spektre, hvor der er tilsat henholdsvis aspartat (figur 3.33) og fumarat (figur 3.14). Da signalet også iagttages i spektret for celler uden Md/D_2O (figur 3.1) er det højst sandsynligt at signalet er fra et intermediat i metabolismen af aspartat, fumarat eller fra en de aminosyrer der er knyttet til tricarboxylsyre cyklussen.

Sammenholdt med det ovenfor nævnte kan signalet ved 6,52 tænkes at stamme fra fumarat. Signalerne ved 0,92 ppm (ikke markeret) og 1,22 ppm er tidligere (tabel 3D) tilordnet som methyl grupper og methylen grupper fra triacylglyceroler.

^a Cellerne er inkuberet i deutereret NMR medium i ca. 28 min. før forsøget påbegyndes.



3.5 Shift-/relaksations reagensets effekt.

Virkningen af shift-/relaksations reagenset (dysprosium-ATP komplekset) blev afprøvet med dimethylmalonat, dimethylmaleinsyre og 1,2,4benzentricarboxylat som modelforbindelser. Nedenfor i tabel 3C, er vist forskelle i de kemiske shift for protonerne i BTC.

Anvendelse af andre forbindelser giver signaler i områder af spektret, hvor signaler fra cellens metabolitter optræder, hvilket besværliggjorde identificeringen af signalerne fra den eksterne reference (modelforbindelsen).

Resultatet af denne undersøgelse er, at der ved tilsætning af dysprosium-ATP komplekset (Dy(ATP)⁻¹) til NMR røret opnås et skift i BTC signalerne.

Ved en koncentration på mellem 13 mM og 18 mM Dy(ATP)⁻¹ elimineres signalerne fra BTC (forhold 1:8 til 1:6) fuldstændigt. Halvhøjde linieforbredningen er ved et forhold på 1:8 så stor, at signalet stort set ikke kan observeres længere. Tilbage i spektret er kun den eksterne reference, HDO signalet fra denne og HDO signalet fra prøven (disse spektre er ikke vist).



Figur 3.6. Samme opstilling som i figur 3.5, men tilsat 5 mM Dy(ATP)⁻¹ (ΔT = 71 min). Der er ikke observeret signaler til lavere felt (> 8,5 ppm).

mM Dy(ATP) ⁻¹	μ mol	Dy(ATP) ⁻¹	°H proton	^b H proton	^a H proton
			(ppm)	(ppm)	(ppm)
0		0	7,47	7,81	7,89
0,25		0,125	7,53	7,87	7,96
0,74		0,372	7,57	7,91	8,02
1,48		0,749	7,65	7,95	8,10
2,21		1,125	7,71	8,02	8,18
4,81		2,501	7,93	8,23	8,44
7,07		3,747	8,00	8,31	8,55
9,25		4,995	8,06	8,37	8,59
11,36		6,248	8,14	8,46	8,67
13,4		7,504	8,23	8,55	8,77
18,16		10,623	- SW	- SW	- SW
Δ			0,76	0,74	0,88

Tabel 3C. Kemiske shift værdier for proton signalerne fra BTC (62,5 μ mol), pH 7,26, forårsaget af dysprosium komplekset ved forskellige koncentrationer af shiftreagenset. Målt i forhold til en ekstern reference, 0,75% TSP, -SW= falder udenfor spektral vidden, fastsættelsen af O1=O2 (4660 Hz) er ikke ændret under forsøget. Det nøjagtige molforhold, hvor signalerne fra BTC forsvinder fra spektret er ikke bestemt nøjagtigt, men må formodes at ligger omkring et forhold 1:6. Δ = difference mellem udgangs- og slutkoncentration (18,16 mM). Udfra de ovenstående resultater (tabel 3C) må det forventes, at der ved tilsætning af shift-/relaksationsreagenset (Dy(ATP)⁻¹) til en cellematrix, hvortil der er tilsat BTC (f.eks. figur 3.5), vil elimineres signaler der skyldes forbindelser i det ekstracellulære miljø.

Betragtes figur 3.6 kan det iagttages at der observeres færre signaler i dette spektrum i forhold til spektret i figur 3.5. Signalerne fra BTC er blandt andet elimineret. Denne cellematrix er kun tilsat shift/relaksationsreagens svarende til 5 mM Dy(ATP)⁻¹. Denne koncentration blev efter flere forsøg med celler, fundet at være tilstrækkelig til at eliminere signalerne fra BTC.

De signaler der observeres må formodes at tilhøre methyl/methylen grupperne (dubletter) fra de tre aminosyrer valin, isoleucin og leucin (resulterer i et negativt signal ved ca. 0,95 ppm); methyl protonerne (dublet) fra laktat der giver ophav til signal ved 1,33 ppm og ved 4,12 ppm (methinproton, kvartet); to tripletter fra glutamin/glutamat (ca. 2,4 og ca. 3,7 ppm); tripletten stammende fra kreatin/phosphokreatin (total kreatin) (3,03 ppm); singletten fra de phosphocholinholdige forbindelser (3,2 ppm) og sidst det store solvent signal.

Signalerne ved 1,22 ppm og 0,90 ppm (figur 3.6) observeres ikke kun i spektrene af dyrkningsmediet (figur 3.3) og det konditioneret medie (figur 3.4), men også i andre spektre (se senere). Det har ikke været muligt at tilordne signalerne præcist, men at signalet stammer fra en methyl gruppe uden kontakt til en elektron negativ gruppe er sandsynligt. Et forslag er at signalerne stammer fra methyl/methylen grupperne i triacylglycerolerne. Såvel dyrkningsmedium og det konditioneret medium indeholder 10 % FCS og dermed også store mængder lipider.

Resultatet af tilsætningen af shift-/relaksationsreagenset er, at signalerne ved en kombination af en hurtig relaksation og et shift af de ekstracellulære forbindelser er elimineret. Det betyder at der i de spektre, hvor signalet fra BTC er elimineret, må være foregået en relaksation eller et stort downfield shift af de ekstracellulære komponenter, således at kun intracellulære forbindelser observeres.

3.5.1 Diskussion: Dysprosium kompleksets effekt på forbindelser i NMR røret.

Som nævnt ovenfor vil flere af de signaler, der normalt observeres i spektret (f.eks. figur 3.5) elimineres ved tilsætning af dysprosium komplekset i en koncentration på 5 mM (figur 3.6). Blandt de forbindelser der forsvinder er BTC, der må formodes at være lokaliseret i det ekstracellulære miljø, på grund af den anioniske natur. 1,2,4-Benzentricarboxylat vil derfor fremover blive anvendt til at skelne mellem det ekstracellulære og intracellulære miljø.

Tidligere undersøgelser (Morill, 1986) viser at dysprosium komplekser^a forårsager kraftige downfield shift og linieforbredning af proton signalerne i et spektrum. Som omtalt i tidligere har flere forskergrupper (Barry, et al., 1974a,b; Gupta & Gupta, 1982; Eads, et al., 1984; Geraldes & Ascenso, 1984) undersøgt dysprosium-adenosin komplekser med hensyn til relaksations- og shiftegenskaber. Man fandt at der dannedes et 1:1 kompleks mellem phosphatgruppen i AMP og dysprosium ionen. Det er dog vist (Eads, et al., 1984) at der dannes et 1:2 kompleks ved reaktion mellem vandige lanthanid (III) ioner og ATP. Disse komplekser er vist (Geraldes & Ascenso, 1984), at blive hydrolyseret (ved stuetemperatur) til tungtopløselige lanthanid-AMP komplekser indenfor få uger. Gupta & Gupta, 1982, fandt at et 1:2 kompleks bestående af dysprosium(III) og tripolyphosphat (PPP_i) (Dy(PPP_i)⁻⁷) var mest stabil i vandige miljøer og at dette kompleks p.g.a sin anioniske natur ikke ville kunne transporteres ind i cellen. Dette kompleks ville måske havde været perfekt til brug i det anvendte modelsystem, men valget faldt på ATPkomplekset til trods for at det måske er mindre stabilt end tripolyphosphat komplekset. ATP komplekset blev valgt udfra den antagelse, at hverken AMP-. ADP- eller ATP-komplekset vil kunne transporteres ind i cellen under forsøget. Desuden er alle tre adenosin-komplekser vist at havde en stor shift og relaksations effekt på protoner. Herudover er det fundet at ATP har en større affinitet overfor lanthanider end PPP, og AMP (Shimizu, et al., 1983). Det skal her bemærkes, at der ikke blev observeret signaler fra eventuelt ikke kompleksbundet ATP/ADP/AMP i spektret, hvilket betyder at der i efterfølgende forsøg med Dy(ATP)⁻¹ sandsynligvis ikke vil forekomme signaler fra disse forbindelser.

Sammenlignes spektrene i figur 3.5 og figur 3.6 ses det, at der er i spektret, hvor der er tilsat Dy(ATP)⁻¹, er blevet elimineret signaler, hvilket må betyde at der er foregået en relaksation eller et shift af de ekstracellulære komponenter.

En interessant detalje er, at HDO signalet fra prøven kun skiftede 0,35 ppm downfield efter at der er tilsat Dy(ATP)⁻¹ i forholdet 1:6. Dette kan muligvis skyldes kompleksbindingen til dysprosium-ATP komplekset.

Det skal her tilføjes at acquisition parametrene igennem hele eksperimentet er forblevet uændret, hvorfor man må forvente at de ekstracellulære signaler der ikke er fuldstændig relakseret, må være placeret udenfor spektral vidden (downfield for solventsignalet ved 4,65 ppm).

^a Dy(dpm)₃, anvendes istedet f.eks. Dy(thd)₃ shifter signalerne upfield.

3.5.2 Afvigelse mellem teoretisk og eksperimentelle data.

Som det bemærkes, så er der kun tilsat 5 mM Dy(ATP)⁻¹ i figur 3.6, men alligevel relakserer eller skifter signalerne fra BTC og elimineres fra spektret. I følge tabel 3C vil en koncentration på 5 mM ikke kunne relaksere/skifte signalerne så voldsomt, men kun medføre et shift på 2,5 ppm. En tre- til firedobling af denne mængde til mellem 7,5 µmol Dy(ATP)⁻¹ og 10,6 µmol Dy(ATP)⁻¹ skulle derimod være tilstrækkelig for at opnå en udtalt relaksation af komponenten.

Årsagen til denne afvigelse mellem *ex vivo* NMR eksperimentet (cellematrixen i figur 3.5 og figur 3.6) og *in vitro* NMR eksperimentet (tabel 3C) er, som omtalt i introduktionen, at det tilgængelige volumen er betydelig mindre end forventet og at mol forholdet (Dy(ATP)⁻¹/ekstracellulære komponenter) er ukendt. Ved en approksimation blev det fundet, at der i et totalt volumen på 500 μ l (celler bundet til adhæsionsmaterialet i deutereret medie) kun var 200-250 μ l ekstracellulært volumen tilgængeligt. Koncentrationen af Dy(ATP)⁻¹ vil derfor svare til ca. 10 mM - 12 mM i stedet for 5 mM og dermed være i det område hvor shift-/relaksations reagenset fuldstændigt relakserer alle komponenter.

Af spektret i figur 3.6 er det ikke muligt at konstatere om der er signaler, der er skiftet mod lavere felt, men man må formode at relaksations/shift effekten gælder for alle ekstracellulære komponenter, dog i varierende grad.

Umiddelbart syntes signal/støj forholdet at være blevet forbedret ved tilsætning af Dy(ATP)⁻¹. Dette kan skyldes at lanthanid komplekset danner kompleks med vand molekylerne og derved medvirker til at relaksere denne komponent. Bindingen af vand til AMP-lanthanid komplekser er vel undersøgt og må formodes at være det samme for det anvendte kompleks.

Så vel interne som eksterne referencer er forsøgt anvendt til en fastsættelse af det "tilgængelige" volumen. Anvendelsen af en ekstracellulær reference fordrer at denne ikke optages i cellen (her blev BTC anvendt) og anvendelse af en intracellulær reference kræver at denne umiddelbart kan optages i cellen og ikke kan metaboliseres i cellen (her er anvendt propionat). Fælles for dem begge er at de samtidig skal give ophav til signaler der ikke "forstyrrer" spektret for cellens normalt forekommende intermediater.

Der er i dette projekt forsøgt anvendt forskellige metoder, hvormed den eksakte koncentration af de forskellige forbindelser i NMR røret kunne bestemmes. En af metoderne er at anvende en ekstern reference, men på grund af problemer med homogeniteten, blev anvendelsen af en ekstern reference (her menes brugen af inderrør) fravalgt. Brugen af en intern reference

59

(ekstracellulært) fungerede kun i de få tilfælde hvor shift/relaksations reagenset ikke blev benyttet. De fleste anvendelige cellulære referencer (f.eks. propionat) viste sig desværre at "forstyrre" spektret uforholdsvis meget, hvorfor også denne metode blev fravalgt. Det skal i den forbindelse nævnes at signalet for de cholinholdige forbindelser ved 3,20 ppm og signalet fra methylgruppen i laktat (1,33 ppm) fremover anvendes som shift reference, da dette signal altid er til stede i spektret. Årsagen til at cholin og laktat signalerne benyttes er, at en normalt anvendt ekstern shift reference som f.eks. trinatriumpropionat (TSP), vil blive elimineret fra spektret ved brug af relaksations reagens (Dy(ATP)⁻¹). Problemet med at anvende cholin signalet er at forbredningen af dette signal ofte er forholdsvis stor, hvorfor der indtræder en usikkerhed i reference punktet.

Resultatet af forsøgene er, på nuværende tidspunkt, at det tilgængelige volumen er på 200 - 250 μ l. På grund af usikkerheden omkring volumenet, er der igennem hele projektet anvendt et total volumen på 500 μ l og det er udfra dette volumen, at der er tilsat xenobiotika (de udførte forsøg skal udelukkende anvendes kvalitativt til at teste systemet, hvorfor den eksakte koncentration af den pågældende forbindelse er underordnet, så længe koncentrationen ikke er toksisk for cellerne). Med hensyn til de kemiske shift værdier, så vil der kunne iagttages en afvigelsen mellem de publiceret værdier og de anvendte shift værdier. Forskellen kan ofte være på +/- 0,05 ppm. Årsagen til denne afvigelse kan skyldes en intracellulær acidificering på grund af en akkumulering af affaldsprodukter i cellerne.

3.6 Astrocytter tilsat naturligt forekommende forbindelser i anormal koncentration.

3.6.1 Resultat: Pyruvat.

Under normoxiske betingelser vil pyruvat hurtigt, i en anaplerotisk reaktion, carboxyleres til oxaloacetat via enzymet pyruvat carboxylase [EC 6.4.1.1]. Oxaloacetat vil, ved nedsat ATP koncentration, indgå i tricarboxylsyre cyklussen. Pyruvat kan desuden, via enzymet pyruvat dehydrogenase [EC 1.2.4.1], omdannes til acetyl-CoA, der umiddelbart kan indgå i tricarboxylsyre cyklussen. Laktat dehydrogenase [EC 1.1.1.27] omdanner hurtigt pyruvat til laktat i cellerne når tilgangen af ilt er begrænset. Ved begrænset ilt tilførelse vil acetat ligeledes akkumuleres i cellerne, da det NAD⁺/FAD afhængige enzym kompleks i dette tilfælde inhiberes.

60

Forbindelse	Multiplicitet	ppm
Cholesterol	(singlet) -CH ₃	0,50
Triacylglyceroler	(triplet) -CH ₃	0,84
Valin	(dublet) $-C^{\gamma}H_{3}$	0,98 - 1,06
Isoleucin	(dublet) -CH ₃	0,98 - 1,06
Leucin	(dublet) $-C^{\gamma}H_{3}$	0,98 - 1,06
β-hydroxybutyrat	(triplet) $-C^{\gamma}H_{3}$	1,15
Ethanol	(triplet) -CH ₃	1,17
Triacylglyceroler	(kvintetter) -(CH ₂) _n	1,29
Laktat/threonin	(dublet) - $C^{\beta}H_{3}$, - $C^{\gamma}H_{3}$	1,32 - 1,33
Alanin	(dublet) $-C^{\beta}H_{3}$	1,45 - 1,50
Acetat	(singlet) -CH ₃	1,90 - 1,92
Methionin	(triplet) -S-CH ₃	2,03 - 2,05
Glutamat/glutamin	(kvartet) - $C^{\beta}H_2$ -	2,10 - 2,15
Glutamat/glutamin/succinat/pyruvat	(triplet) $-C^{\gamma}H_2^{-}$	2,34 - 2,39
Kreatin/phosphokreatin (total kreatin)	(singlet) N-CH ₃	3,05
Cholinholdige forbindelser	(singlet) -N-(CH ₃) ₃	3,20 - 3,22
Glycin	(singlet) -CH ₂ -	3,57
Ethanol	(kvartet) -CH ₂ -	3,65
Inositol/glukose/glutamat/cystein m.fl.	-CH- / -CH ₂ -	3,70 - 3,90
Kreatin/Phosphokreatin m.fl.	(singlet) -CH ₂ -	3,93
Laktat	(kvartet) -C ^a H-	4,10 - 4,20
Fumarat	(singlet)	6,50 - 6,52
1,2,4-benzentricarboxylat (reference)	aromatiske signaler	7,45 - 7,90

Tabellen viser de normalt observerede signalers kemiske shift, samt kemiske shift fra adderet forbindelser. Flere af de opgivne kemiske shift værdier er fundet ved individuelle NMR eksperimenter med og uden cellematrix. Flere af disse signaler er desuden tilordnet i litteraturen (henvisninger tidligere i teksten). På baggrund af en software begrænsning er der i visse tilfælde opgivet et interval hvor i signalet normalt observeres. Hvor det er muligt er værdien for centersignalet opgivet. Da flere af forbindelserne har signaler der overlapper andre signaler, er der af hensyn til overskueligheden kun medtaget kemiske shift værdier for det eller de markante (observerbare) signaler fra den specifikke forbindelse. Som omtalt tidligere er signalerne tilordnet i forhold til signalerne fra de cholinholdige forbindelser (3,20 ppm) og laktat (1,33 ppm).

Ved tilsætning af pyruvat til cellerne (figur 3.7) observeres et markant positivt signal ved 2,37 ppm, der tilordnes som methyl protonerne i pyruvat. Blandt flere normalt observerede signaler iagttages et signal fra acetat ved 1,90 ppm. Signalerne ved 2,65 ppm og 3,43 ppm er ikke tidligere observeret, men kan muligvis stamme fra taurin (to methylen grupper), der findes i forholdsvis stor mængde i cerebellare astrocytter. Bemærk at intensiteten af cholin signalet (3,22 ppm) syntes at være forøget i forhold til total kreatin signalet (3,04 ppm).



Efter yderligere 66 minutter (figur 3.8) er pyruvat signalets intensitet formindsket i forhold til signalet fra de cholinholdige forbindelser (3,20 ppm). Acetat signalet er nu tydeligt (1,92 ppm). Signalet fra alanin (1,4 - 1,5 ppm, dublet) kan, som signalerne fra triacylglycerolerne (0,84 ppm og 1,27 ppm), ligeledes iagttages på nuværende tidspunkt. En sammenligning mellem figur 3.5 (normal betingelser) og disse spektre vil afsløre at det kun er de signalerne for pyruvat, alanin og acetat der er ændre karakter (det observerede signal ved 1,45 ppm (figur 3.5) optræder lejlighedsvis i spektrene og ofte i den deutereret form, der i stedet resulterer i et positivt signal - forklares senere).



Figur 3.8. Fortsættelse af forsøg fra figur 3.8. ΔT = 108 min. Pyruvat 2,375 ppm og acetat 1,922 ppm.

Efter yderligere 200 min (figur 3.9) er pyruvat signalet omtrent forsvundet, imens intensiteten af acetat signalet tydeligvis er forøget. Forholdet mellem intensiteterne af cholin signalet og laktat signalet ændres ikke nævneværdigt i tidsrummet (forhold 1,64 til 1,55).



Figur 3.9. Fortsættelse af forsøg fra figur 3.8. ΔT = 308 min. Acetat signalet observeres ved 1,91 ppm.

3.6.1.1 Diskussion: Pyruvat.

I følge Matsumoto, et al., 1994, kan pyruvat fungere som energikilde for både astrocytter og neuroner, under hypoxi og iskæmi. I flere forskellige celletyper er det vist (Clarke, et al., 1989), at transporten foregår via membran proteinet MCT (H⁺-koblet monocarboxylase transporter). Nedergaard & Goldman, 1993, har tidligere vist at der eksisterer en høi affinitets transporter for laktat i neuronale og gliale membraner. Samme transporter er vist (Clarke, et al., 1989) at transportere pyruvat. Betragtes figur 3.7 til figur 3.9 er det tydeligt, at der foregår en udvikling af pyruvat signalet. Da der ikke er tilsat Dy(ATP)⁻¹/BTC i denne serie er det ikke til at fastslå, hvilke signaler der er ekstracellulære kontra intracellulære, men udfra forsvinden af pyruvat signalet og en fremkomst af et acetat signal ved ca. 1,92 ppm, må det konkluderes at der har været metabolisk aktivitet i cellerne. Mængden af laktat (totalt laktat) syntes at være uændret, hvilket ikke er unormalt da cellen er vist at eksportere laktat (Clarke, et al., 1989; Nedergaard & Goldman, 1993). Bemærk at der i dette forsøg er opsamlet spektre i indtil 5 timer efter tilsætning af det deutereret medie (normalt anvendes data fra forsøg opsamlet udover 3 timer ikke). Dette stemmer overens med resultatet fra de biokemiske undersøgelser der viser at den ekstracellulære laktatkoncentration forøges markant i løbet af 4 timer.

Bemærk at intensiteten af signalet fra de cholinholdige forbindelsers N-trimethyl gruppe^a (3,20 ppm) syntes forholdsvis stor set i forhold til kreatin signalet (3,03 ppm). Intensitets forholdet mellem cholin signalet og kreatin er gerne mellem 2,8 og 3,0 i NMR spektre af astrocytter. Usenius, et al., 1994, har kvantificeret mængden af cholin i vævsprøver fra henholdsvis raske hjerner og astrocytoma ved hjælp af ³¹P og ¹H-NMR. Resultaterne viste at intensitets forholdet mellem cholin signalet og kreatin signalet i normalt hjernevæv og i astrocytomer var på mellem 3,5 og 4. I figur 3.7 er dette forhold på ca. 6, hvilket kan tolkes således, at der er en forøget koncentration af cholinholdige forbindelser i cellerne. Den eneste plausible forklaring på dette fænomen er at aktiviteten af cholin enzym systemerne er ændret. Blandt andet phosphocholin transferase^a [EC 2.7.7.15], der katalyserer overførelsen af phosphocholin til 1,2diacylglycerol fra CDP-cholin, er vist at katalysere den modsatte reaktion phospholipid til diacylglycerol og phosphocholin når ATP niveauet er lavt (f.eks. ved hypoxi eller iskæmi)(Horrocks & Dorman, 1985). Signalerne for diacylglyceroler vil være placeret ved ca. 3,6 ppm (methylen grupperne i

^a Kan indeholde signaler fra frit cholin, phosphorylcholin, glycerophosphorylcholin og phosphatidylcholin.

glycerol), ca. 3,9 ppm (methin protonen i glycerol), 1,29 ppm og 0,94 ppm (sidstnævnte fra fedtsyrernes methyl og methylengrupper). Disse signaler er tilstede i spektret, men som det senere vil kunne iagttages, ændres cholin signalets intensitet sig ikke nævneværdigt i forsøgsperioden (< 3 timer). Ændringer i cholin signalets intensitet er udelukkende observeret i dette forsøg.

Signalerne ved 2,65 ppm og 3,43 ppm kan oprinde fra taurin (henholdsvis - $C^{\beta}H_2$ - og - $C^{\alpha}H_2$ -). Disse signaler observeres normalt ikke i spektrene og må derfor skyldes metabolisk aktivitet i cellen, f.eks. omdannelsen af pyruvat over cystein til taurin.

3.6.2 Resultat: Acetaldehyd.

Det må forventes at acetaldehyd i lighed med andre aldehyder omdannes til carboxylsyren ved auto-oxydation af luftens ilt og at der i tilstedeværelse af vand vil dannes ubestandige, gem-dioler. Sidstnævnte proces er en reversibel addition, hvor ligevægten er forskudt mod aldehyd dannelse, men processen er sandsynligvis langsom nok i forhold til NMR tidsskalaen til at begge former vil kunne iagttages.

 $CH_3CHO + H_2O = CH_3CH(OH)_2$

Ved tilsætning af acetaldehyd til cellematrixen kan der forventes to ting. Først og fremmest en delvis omdannelse af acetaldehyd til aldehyd hydratet og dels at acetaldehyd oxideres videre til acetat af enzymet aldehyd dehydrogenase (EC; 1.2.1.5:ALDH). Hjernevæv indeholder flere varianter af ALDH (Erwin & Deitrich, 1966; Petterson & Tottmar, 1982), hovedsageligt i den mitochondrielle fraktion (Eriksson, *et al.*, 1977), der må formodes at kunne omsætte acetaldehyd til acetat (ALDH er vist at havde en specifik enzymaktivitet på 2,44 ± 0,06 nmol/min mg⁻¹ protein i hjernen^b (Quintanilla & Tampier, 1992)).

Acetaldehyd tilsat cellematrixen giver et spektrum som vist i figur 3.10. Signalet fra acetaldehyd methyl protonerne ses ved 2,23 ppm. Signalet fra aldehyd protonen observeres ikke (må formodes at give signal ved ca. 9,7 ppm). Et signal ved 1,90 ppm kan svagt anes. Årsagen til at signalet fra BTC er ude af fase kendes ikke.

^b Isolerede mitochondrier fra rottehjerne.

^a Ofte kaldt cholinphosphat cytidylyl transferase.

Forbindelse	Multiplicitet	ppm
Cholesterol	(singlet) -CH ₃	0,50
Triacylglyceroler	(triplet) -CH ₃	0,84
Valin	(dublet) -C ^Y H ₃	0,98 - 1,06
Isoleucin	(dublet) -CH ₃	0,98 - 1,06
Leucin	(dublet) $-C^{\gamma}H_{3}$	0,98 - 1,06
β-hydroxybutyrat	(triplet) $-C^{\gamma}H_{3}$	1,15
Ethanol	(triplet) -CH ₃	1,17
Triacylglyceroler	(kvintetter) -(CH ₂) _n	1,29
Laktat/threonin	(dublet) - $C^{\beta}H_{3}$, - $C^{\gamma}H_{3}$	1,32 - 1,33
Alanin	(dublet) $-C^{\beta}H_{3}$	1,45 - 1,50
Acetat	(singlet) -CH ₃	1,90 - 1,92
Methionin	(triplet) -S-CH ₃	2,03 - 2,05
Glutamat/glutamin	(kvartet) - $C^{\beta}H_{2}$ -	2,10 - 2,15
Glutamat/glutamin/succinat/pyruvat	(triplet) -C ^Y H ₂ -	2,34 - 2,39
Kreatin/phosphokreatin (total kreatin)	(singlet) N-CH ₃	3,05
Cholinholdige forbindelser	(singlet) -N-(CH ₃) ₃	3,20 - 3,22
Glycin	(singlet) -CH ₂ -	3,57
Ethanol	(kvartet) -CH ₂ -	3,65
Inositol/glukose/glutamat/cystein m.fl.	-CH- / -CH ₂ -	3,70 - 3,90
Kreatin/Phosphokreatin m.fl.	(singlet) -CH ₂ -	3,93
Laktat	(kvartet) -C ^α H-	4,10 - 4,20
Fumarat	(singlet)	6,50 - 6,52
1,2,4-benzentricarboxylat (reference)	aromatiske signaler	7,45 - 7,90

Tabellen viser de normalt observerede signalers kemiske shift, samt kemiske shift fra adderet forbindelser. Flere af de opgivne kemiske shift værdier er fundet ved individuelle NMR eksperimenter med og uden cellematrix. Flere af disse signaler er desuden tilordnet i litteraturen (henvisninger tidligere i teksten). På baggrund af en software begrænsning er der i visse tilfælde opgivet et interval hvor i signalet normalt observeres. Hvor det er muligt er værdien for centersignalet opgivet. Da flere af forbindelserne har signaler der overlapper andre signaler, er der af hensyn til overskueligheden kun medtaget kemiske shift værdier for det eller de markante (observerbare) signaler fra den specifikke forbindelse. Som omtalt tidligere er signalerne tilordnet i forhold til signalerne fra de cholinholdige forbindelser (3,20 ppm) og laktat (1,33 ppm).





Efter yderligere 76½ min kan signalet ved 1,94 ppm tydeligt observeres (figur 3.11). Tilsættes 5 mM Dy(ATP)⁻¹ til cellematrixen (figur 3.12) elimineres som forventet signalerne fra BTC, men også uventet signalerne fra triacylglycerolernes methyl grupper ved 1,27 ppm. Udover de normalt observerede signaler i spektret observeres der et tydeligt signal ved 1,89 ppm^a. Signalet fra acetaldehyd er næsten forsvundet (2,25 ppm). Signalet ved 6,56 ppm er ikke tilordnet, men sættes i forbindelse med signalet fra fumarat (figur 3.14). Tilordningen af signaler fra acetat og acetaldehyd er opsummeret i tabel 3F.

^a Forskellen i de kemiske shift værdier skyldes en software begrænsning ved peak picking processen.







Acetaldehyd	CH_3^{β} - (2,23 ppm) dublet, - CH^{α} (9,7 ppm)** kvartet
Acetaldehyd - hydratiseret	CH_{3}^{β} - (1,33 ppm) dublet, - CH^{α} (5,28 ppm)
Acetate	CH ₃ -(1,94 ppm) singlet

Tabel 3F. Opsummering af resultat fra figur 3.10 - figur 3.12. ** = ikke observeret, men beregnet.

3.6.2.1 Diskussion: Acetaldehyd.

Da acetaldehyd må forventes at kunne blive hydratiseret under forsøget må der forventes signaler fra intracellulært hydratiseret acetaldehyd (bidraget fra de ekstracellulære signaler elimineres ved anvendelse af BTC i inkubationsmediet) under forsøget, men methin protonen fra den hydratiseret acetaldehyd vil ikke kunne observeres i spektrene, da dette signal er skjult under solventsignalet. Methyl protonerne fra den hydratiserede form vil give et negativt signal (dublet) ved ca. 1,33 ppm, hvilket vil sige ved samme placering som laktat/threonin signalerne, hvorfor signalet fra methyl protonerne ikke vil kunne observeres.

Dannelse af hydratiseret acetaldehyd i det deutereret medie er sandsynligvis beskeden, da det må formodes at acetaldehyd er så tilstrækkelig lipofil, at forbindelsen forholdsvis hurtigt passerer cellemembranen. Det har ikke været muligt at finde data i litteraturen for glial optagelse af acetaldehyd og gliale ALDH enzym aktiviteter. Sippel, 1974 og Eriksson & Sippel, 1977, har fundet at optagelsen af acetaldehyd over blod/hjerne barrieren først forkommer ved en koncentration på 200 µM acetaldehyd i blodet.

Ved tilsætningen af Dy(ATP)⁻¹ elimineres BTC signalerne og signalerne fra acetaldehyd er næsten forsvundet. Der iagttages i stedet et signal ved 1,92 ppm^a. Dette signal er tidligere tilordnet som acetat (ses f.eks. i figur 3.2). Da acetat signalet, som omtalt i kapitel 3.2.1, sjældent observeres tydeligt i spektrene, må fremkomsten af dette signal skyldes en omdannelse i cellerne til acetat, som følge af cellulær optagelse af acetaldehyd.

Det skal bemærkes at triacylglycerol signalerne ved 1,27 ppm og 0,92 ppm forsvinder ved tilsætning af relaksations reagens (figur 3.12). Dette fænomen er tidligere observeret - blandt andet i figur 3.19 og figur 3.20 - og kan forklares som β -oxidation i cellerne. Om det observerede acetat signal (figur 3.12) skyldes β -oxidation i cellerne er tvivlsomt, da der i lignende spektre (figur 3.19 figur 3.20), ikke observeres acetat. Fænomenet optræder igen i kapitel 3.4.2.3, hvor der ydermere iagttages et nyt negativt signal ved ca. 3,6 ppm.

^a Værdien er aflæst manuelt som centerværdi. I figur 3.12 har programmet sat værdien til 1,887 ppm.

Det må ud fra dette konkluderes, at det observerede acetat signal ved 1,92 ppm skyldes cellulær aldehyd dehydrogenase [EC 1.2.1.5] aktivitet og ikke nysyntese af acetat som følge af β -oxidation eller anaerobe betingelser.

3.6.3 Resultat: Fumarat.

Figur 3.13 viser et spektrum af konfluente cerebellare astrocytter med nyligt tilsat Md/D_2O . For at sulte cellerne har der ikke været foretaget medieskift på denne cellekultur indenfor 5 dage før eksperimentet. Det ses at intensiteten af threonin/laktat signalet (ca. 1,33 ppm) er forholdsvis stor. I dette spektrum iagttages et nyt positivt signal ved 2,06 ppm (vist med pil). Dette signal observeres normalt ikke i NMR spektre af celler. Signalet ved 3,53 ppm tilordnes som glycin. Bemærk at intensiteten af laktat signalet (4,07 ppm, negativ kvartet), i forhold til andre spektre af "normalt" behandlet celler, ikke er tilsvarende forøget på dette tidspunkt.



Figur 3.13. "Sultede" astrocytter i Md/D₂O. Opsamlet over 30 min. ΔT = 42 min.
Forbindelse	Multiplicitet	ppm
Cholesterol	(singlet) -CH₃	0,50
Triacylglyceroler	(triplet) -CH ₃	0,84
Valin	(dublet) $-C^{\gamma}H_{3}$	0,98 - 1,06
Isoleucin	(dublet) -CH ₃	0,98 - 1,06
Leucin	(dublet) $-C^{\gamma}H_{3}$	0,98 - 1,06
β-hydroxybutyrat	(triplet) $-C^{\gamma}H_{3}$	1,15
Ethanol	(triplet) -CH ₃	1,17
Triacylglyceroler	(kvintetter) -(CH ₂) _n	1,29
Laktat/threonin	(dublet) - $C^{\beta}H_3$, - $C^{\gamma}H_3$	1,32 - 1,33
Alanin	(dublet) $-C^{\beta}H_{3}$	1,45 - 1,50
Acetat	(singlet) -CH ₃	1,90 - 1,92
Methionin	(triplet) -S-CH ₃	2,03 - 2,05
Glutamat/glutamin	(kvartet) - $C^{\beta}H_{2}$ -	2,10 - 2,15
Glutamat/glutamin/succinat/pyruvat	(triplet) - $C^{\gamma}H_2$ -	2,34 - 2,39
Kreatin/phosphokreatin (total kreatin)	(singlet) N-CH ₃	3,05
Cholinholdige forbindelser	(singlet) -N-(CH ₃) ₃	3,20 - 3,22
Glycin	(singlet) -CH ₂ -	3,57
Ethanol	(kvartet) -CH ₂ -	3,65
Inositol/glukose/glutamat/cystein m.fl.	-CH- / -CH ₂ -	3,70 - 3,90
Kreatin/Phosphokreatin m.fl.	(singlet) -CH ₂ -	3,93
Laktat	(kvartet) -C ^a H-	4,10 - 4,20
Fumarat	(singlet)	6,50 - 6,52
1.2.4-benzentricarboxylat (reference)	aromatiske signaler	7.45 - 7,90

Tabellen viser de normalt observerede signalers kemiske shift, samt kemiske shift fra adderet forbindelser. Flere af de opgivne kemiske shift værdier er fundet ved individuelle NMR eksperimenter med og uden cellematrix. Flere af disse signaler er desuden tilordnet i litteraturen (henvisninger tidligere i teksten). På baggrund af en software begrænsning er der i visse tilfælde opgivet et interval hvor i signalet normalt observeres. Hvor det er muligt er værdien for centersignalet opgivet. Da flere af forbindelserne har signaler der overlapper andre signaler, er der af hensyn til overskueligheden kun medtaget kemiske shift værdier for det eller de markante (observerbare) signaler fra den specifikke forbindelse. Som omtalt tidligere er signalerne tilordnet i forhold til signalerne fra de cholinholdige forbindelser (3,20 ppm) og laktat (1,33 ppm).

Tilsætning af fumarat til cellematrixen resulterer som forventet i fremkomsten af et positivt signal ved 6,50 ppm (figur 3.14). Bemærk at flere af signalerne i spektret bliver mere synlige, især signalet ved 3,01 ppm kan detekteres nu. Der begynder samtidig at kunne spores en udvikling i signalerne ved ca. 2,42 ppm og 2,14 ppm (negativt signal).

I figur 3.15 ses resultatet efter tilsætning af relaksationsreagenset til cellematrixen. Signalet fra fumarat (6,50 ppm) kan stadig genfindes. Bemærk at signalerne omkring 2,42 ppm og 2,14 ppm er blevet mere tydelige. Samtidig syntes intensiteten af det negative signal ved 4,04 ppm (methylen protonerne fra laktat) at forøges. Denne tendens kan iagttages tydeligere i figur 3.16. Bemærk at intensiteten af signalerne fra triacylglycerolernes fedtsyrer er steget og at intensiteten af signalet for glycin methylen protonerne ved 3,53 ppm (figur 3.16) syntes at være formindsket. Signalet fra fumarat (6,50 ppm) er på dette tidspunkt af forløbet (figur 3.16, 149 min) stort set forsvundet.











3.6.3.1 Diskussion: Fumarat.

Det må forventes at fumarat forholdsvis hurtigt transporteres ind i cellen og omsættes i tricarboxylsyre cyklussen, især i betragtning af, at cellerne er sultet gennem 5 dage.

Den forholdsvis store udvikling (sammenlignet med figur 3.13) af signalerne i området omkring 2,42 ppm, 2,12 ppm og udviklingen af et positivt signal omkring 3,0 ppm kan skyldes tricarboxylsyre cyklus intermediater som f.eks. succinat og α -ketoglutarat, der hver især bidrager med signaler fra methylen protonerne ved ca. 2,45 ppm, mens en forbindelse som citrat giver signal ved ca. 3,0 ppm (methylen), hvilket α -ketoglutarat også gør (methylen, $-C^{\beta}H_{2}$ -). Det skal her nævnes, at kreatin også giver et positivt signal ved 3,0 ppm, men dette signal er normalt konstant under hele forsøget.

Det negative signal ved 2,12 ppm der observeres i figur 3.15 og figur 3.16, er placeret hvor signalerne fra glutamat (i mediet/cellen og fra GSH) og glutamin normalt observeres, men i figur 3.13 (spektrum af sultede celler ved forsøgets start) kan disse signaler ikke observeres, hvorfor signalerne ved ca. 2,12 ppm, må være et resultat af fumarat metabolismen. Signalet ved 3,76 ppm menes (sammen med signalerne ved 2,4 ppm) at stamme fra glutamat der også giver et signal i dette område. Hvilken eller hvilke forbindelser signalet repræsenterer er umiddelbart ikke klart, men at signalet skyldes glutamat er sandsynligt.

Signalet ved ca. 4,04 ppm (negativ multiplet) tilordnes som methylen protonerne i laktat (at signalet ved 1,33 ppm forøges samtidig hermed kan ikke iagttages på figurerne). Udviklingen i signalet ved ca. 4,04 ppm anvendes ofte som udtryk for laktat produktionen i cellerne. Laktats andet signal (negativt fase) ved cirka 1,33 ppm er placeret sammesteds som methyl signalerne fra threonin, hvorfor det ofte er besværligt af afgøre noget ud fra dette signal alene. Inkorporering af deuterium i strukturen vil samtidig ændre signalet fra at være negativt faset (dublet) til at være positivt faset (singlet) hvilket yderligere "forstyrrer" tolkningen af data.

Dannelsen af positive signaler i området 1,45 ppm - 1,50 ppm er tidligere observeret (figur 3.5), men det var i spektre af friske celler. Signalet ved 1,45 ppm tilordnes normalt som methyl protonerne i aminosyren alanin. Signalet er tidligere observeret i f.eks. figur 3.2 som en negativ dublet (CH_3 - $CH(NH_2)$ -), men på grund af den metaboliske aktivitet i cellerne er der blevet inkorporeret et deuterium i strukturen ((CH_3 - $CD(NH_2)$ -), hvorfor signalet nu observeres som et positivt signal (reelt en triplet med intensitets forholdet 1:1:1), men der er tydeligvis mere end et signal i dette område.

74

Umiddelbart syntes det positive signal ved ca. 2 ppm at være en triplet, men signalet kan også være to singletter. Signalet kan på nuværende tidspunkt ikke tilordnes, men der er tidligere iagttaget en singlet ved ca. 2,0 ppm (figur 3.16) er tidligere observeret i figur 3.3 (spektrum af frisk dyrkningsmedie) og senere i spektret for de sultede celler (figur 3.13). Dette signal kan skyldes methyl protonerne fra methionin.

$OOC-CH-CH_2-CH_2-S-CH_3$ NH_3^+

methionin

Ved sammenligning med spektret i figur 3.3 (frisk dyrkningsmedie) kan det iagttages at methyl signalet for methionin passer overens med singletten til lavt felt (2,03 ppm, lille intensitet). I følge Pouchert, 1983, har methionin kemiske shift ved 3,4 ppm (positiv triplet), 2,7 ppm (positiv triplet) og 2,2 ppm (positiv singlet). Det kemiske shift for β -protonerne (negativ kvartet) er ikke opgivet, men må være ca. 1,5 ppm. Signalerne kan ikke genfindes i spektrene (figur 3.13 - figur 3.16), men i stedet kan der iagttages signaler ved ca. 3,3 ppm, 2,5 ppm og 2,0 ppm, altså 0,2 ppm upfield for de publicerede værdier. Dette var ligeledes forskellen mellem de publicerede værdier for acetoacetat og de observede værdier.

Methionin, der er en bestanddel af dyrkningsmediet (se evnt. figur 3.3), optræder normalt ikke i spektrene. Forbindelsen omsættes normalt i cellen via cystein til pyruvat. Pyruvat signalet iagttages ved ca. 2,38 ppm (figur 3.13, figur 3.15 og figur 3.16). Da pyruvat signalet kan iagttages under sultperioder eller meget sent i forløbet (efter 6 timers NMR forsøg), må det konkluderes at dette signal ikke kun skyldes en eventuel metabolisme fra methionin, men kan også skyldes cellens respons på udskiftningen af medie. Laktat signalet syntes ikke at ændres, hvorfor ilt mængden i NMR røret sandsynligvis er tilstrækkelig til at de biokemiske processer kan forløbe. Hvorfor intensiteten af signalet ved ca. 2,10 ppm forbliver uændret igennem forsøget vides ikke. Man ville forvente en forsvinden af methionin signalerne som følge af en metabolisering af methionin i stedet for en stagnation af signalet.

Nicholson *et al.*, 1983, observerede lignende signaler i humant serum. De foreslår at signalerne skyldes N-acetylgrupperne fra sukkerne fra glycoproteiner. I dette forsøg er der tilsat relaksations/shift reagens, hvorfor signalerne kun kan skyldes intracellulære lav molekylære forbindelser, så signalerne skyldes næppe N-acetyl fra glycoproteiner, men måske N-acetyl grupper fra andre

75

forbindelser (f.eks. N-acetyl glutamat), men det er ikke umiddelbart klart hvilken eller hvilke forbindelser der observeres ved ca. 2 ppm.

At fumarat signalet forsvinder indenfor ca. 100 min og at dette afstedkommer en stor ændring i spektrene må betyde at fumarat bliver omsat i cellen. Men det er ikke klart hvilke reaktioner der igangsættes i cellen, da fumarat kan metaboliseres af flere biokemiske synteseveje og at intermediaterne herfra vil kunne akkumuleres i cellen alt efter hvordan energiniveauet i cellen er på det pågældende tidspunkt.

3.6.4 Resultat: D- β -hydroxybutyrat.

D- β -hydroxybutyrat er et resultat af β -oxidation i cellerne. Slutproduktet af denne er acetyl-CoA og acetoacetat, hvoraf acetyl-CoA indgår i tricarboxylsyre cyklussen. D- β -hydroxybutyrat findes i en D- og L-form, af hvilke L-formen kan spores i urinen hos diabetikere.

D-β-Hydroxybutyrat

Både acetoacetat og β -hydroxybutyrat dannes primært i leveren og udskilles i blodbanen. Begge forbindelser omsættes i hjertemuskulaturen og renal cortex i energikrævende processer. Hjernen, der normalt anvender Dglukose som energikilde, kan som vist af Auestad, *et al.*, 1991, anvende D- β hydroxybutyrat som energikilde i sultperioder. Anvendelse af ketonstoffer til forbrænding er tidligere observeret i brain slices og i hjernecelle homogenater. Enzymerne til denne metabolisme er vist at være til stede i hjernen (Krebs, *et al.*, 1971).

Tildon, *et al.*, 1994, har vist at D-β-hydroxybutyrat transporteres aktivt ind i astrocytter, men D-β-hydroxybutyrat er tidligere vist at blive optaget i cellen ved passiv diffusion (Tildon & Roeder, 1988). Den astrogliale transporter er vist (Tildon, *et al.*, 1994) at havde en K_m-værdi på 6,03 mM og en V_{max}-værdi på 65,4 nmol/mg protein/min.

Koblingsmønstret for β -hydroxybutyrat i PBS/D₂O ses nedenfor i figur 3.17. Alle signaler fra forbindelsen er negativt faset, som følge af den anvendte spinecho NMR teknik. De kemiske shift for D- β -hydroxybutyrat fordeler sig således at methyl protonerne (^aH) giver ophav til en dublet ved 1,20 ppm, methin protonen (^bH) til en multiplet ved 4,20 ppm og methylen protonerne (^cH) til en dublet ved 2,38 ppm.

Forbindelse	Multiplicitet	ppm
Cholesterol	(singlet) -CH ₃	0,50
Triacylglyceroler	(triplet) -CH ₃	0,84
Valin	(dublet) -C ^Y H ₃	0,98 - 1,06
Isoleucin	(dublet) -CH ₃	0,98 - 1,06
Leucin	(dublet) $-C^{\gamma}H_{3}$	0,98 - 1,06
β-hydroxybutyrat	(triplet) $-C^{\gamma}H_{3}$	1,15
Ethanol	(triplet) -CH ₃	1,17
Triacylglyceroler	(kvintetter) -(CH ₂) _n	1,29
Laktat/threonin	(dublet) $-C^{\beta}H_{3}$, $-C^{\gamma}H_{3}$	1,32 - 1,33
Alanin	(dublet) $-C^{\beta}H_{3}$	1,45 - 1,50
Acetat	(singlet) -CH ₃	1,90 - 1,92
Methionin	(triplet) -S-CH ₃	2,03 - 2,05
Glutamat/glutamin	(kvartet) - $C^{\beta}H_2$ -	2,10 - 2,15
Glutamat/glutamin/succinat/pyruvat	(triplet) $-C^{\gamma}H_{2}$ -	2,34 - 2,39
Kreatin/phosphokreatin (total kreatin)	(singlet) N-CH ₃	3,05
Cholinholdige forbindelser	(singlet) -N-(CH ₃) ₃	3,20 - 3,22
Glycin	(singlet) -CH ₂ -	3,57
Ethanol	(kvartet) -CH ₂ -	3,65
Inositol/glukose/glutamat/cystein m.fl.	-CH- / -CH ₂ -	3,70 - 3,90
Kreatin/Phosphokreatin m.fl.	(singlet) -CH ₂ -	3,93
Laktat	(kvartet) -C ^α H-	4,10 - 4,20
Fumarat	(singlet)	6,50 - 6,52
1,2,4-benzentricarboxylat (reference)	aromatiske signaler	7.45 - 7.90

Tabellen viser de normalt observerede signalers kemiske shift, samt kemiske shift fra adderet forbindelser. Flere af de opgivne kemiske shift værdier er fundet ved individuelle NMR eksperimenter med og uden cellematrix. Flere af disse signaler er desuden tilordnet i litteraturen (henvisninger tidligere i teksten). På baggrund af en software begrænsning er der i visse tilfælde opgivet et interval hvor i signalet normalt observeres. Hvor det er muligt er værdien for centersignalet opgivet. Da flere af forbindelserne har signaler der overlapper andre signaler, er der af hensyn til overskueligheden kun medtaget kemiske shift værdier for det eller de markante (observerbare) signaler fra den specifikke forbindelse. Som omtalt tidligere er signalerne tilordnet i forhold til signalerne fra de cholinholdige forbindelser (3,20 ppm) og laktat (1,33 ppm).

Spektret i figur 3.18 viser propionat i PBS/D₂O. Propionat er i få forsøg benyttet til at kende forskel på det intra- og ekstracellulære miljø. Propionat giver ophav til 2 signaler i spektret (^{α}H (kvartet; 2,16 ppm) og ^{β}H (triplet; 1,06 ppm)). Bemærk at signalet fra α protonerne vil medføre en udligning i området 0,90 - 1,10 ppm (normalt negativt faset) af de eksisterende signaler i dette område (fra leucin, isoleucin og valin).



l figur 3.19 kan methin signalet (2,17 ppm, ^αH) fra den tilsatte interne reference, propionat, og effekten af det positive signal fra propionat methyl gruppen (1,06 ppm, ^βH) iagttages (signalet fra propionat er placeret på kanten af signalet fra aminosyrerne).

Spektret ændres markant ved tilsætning af β -hydroxybutyrat (figur 3.20). I dette spektrum er dysprosium reagenset tilsat samtidig med β -hydroxybutyrat.

Signalet fra den interne reference (propionat, figur 3.18) kan svagt iagttages ved 2,17 ppm, men i figur 3.21 ses signalet tydeligt. Signalerne i området 2,00 - 2,50 ppm kan også bedre iagttages i denne figur. Signalet fra β -hydroxybutyrat methyl gruppen (1,19 ppm, ^aH)^a kan iagttages. Efter 230 minutter (figur 3.22) er udviklingen i spektret tydeligt. Resultatet er i alt 4 dubletter af hvilke propionat (2,198 ppm) bidrager med den ene, D- β -hydroxybutyrat med en dublet (2,33 ppm, ^cH) og de sidste to ikke tilordnede signaler ved 2,45 ppm og 2,26 ppm (vist med pile). I spektret observeres yderligere to nye signaler, der ikke tidligere er observeret. Et positivt signal ved 2,69 ppm og et negativt ved 1,81 ppm. I figur 3.22 observeres et negativt signal ved 3,81 ppm, der kan iagttages senere i forløbet (figur 3.23).



Figur 3.19. Astrocytter hvortil der er tilsat 3 mM propionat. Opsamlet over 9 min. Celler er inkuberet med Md/D₂O i 29 min. før forsøgets start. ΔT = 38 min.

Forskelle i kemisk skift skyldes i dette tilfælde en software begrænsning i databehandlings programmets peak picking proces. Signalværdien kan manuelt bestemmes til 1,20 ppm.







Figur 3.22. Fortsættelse af forsøg i figur 3.20. Regionen 4,3 - 0,5 ppm er vist. ΔT = 280 min. Der er ikke detekteret signaler i området downfield fra solventsignalet. De i teksten omtalte dubletter er vist med pile.

Efter yderligere 220 minutter (figur 3.23) er signalerne ved 1,81 ppm og 2,69 ppm forsvundet. Området 3,5 - 3,7 ppm syntes at indeholde to dubletter. Bemærk det negative signal ved ca. 4,14 ppm. Intensiteten af dette signal er forøget gennem hele forløbet. Intensiteten af laktat signalet (methyl gruppe, 1,33 ppm) er derimod forholdsvis uforandret. De negative signaler ved 2,43 ppm og 2,24 ppm kan stadig observeres. Signalet fra D- β -hydroxybutyrat kan på dette tidspunkt i forsøget stadig iagttages, hvilket også kvarteten fra propionat (2,16 ppm) kan.



3.6.4.1 Diskussion: β -Hydroxybutyrat.

Gennem hele forløbet (figur 3.19 til figur 3.23) observeres signalet fra den interne reference propionat ved ca. 2,18 ppm. Ved tilsætning af β hydroxybutyrat opstår to dubletter (2,24 ppm og 2,42 ppm) der kan skyldes tilstedeværelse af deutereret tricarboxylsyre cyklus intermediater. Fra acetyl-CoA, der er resultatet af omsætningen af β-hydroxybutyrat, via acetoacetat og acetoacetyl-CoA, er der inkorporeret et deuterium i methyl gruppen CDH₂CO-CoA, således at alle tricarboxylsyre cyklus intermediater vil kunne få inkorporeret en deuterium i strukturen. Forbindelser som succinat, citrat og αketoglutarat, hvis $C^{\beta}H$ protoner tidligere har frembragt tripletter i spektret vil nu kunne observeres som negative dubletter p.g.a det inkorporeret deuterium i nabogruppen. Dette kan forklare hvorfor der udvikles et negativt signal ved 2,4 ppm (succinat, $-C^{\beta}H_{2}$ -CHD-, multiplet). De resterende signaler ved 1,81 ppm, 2,69 ppm, 3,81 ppm (alle fra figur 3.22) og signalerne i området 3,5 ppm, må alle forklares som signaler fra den metaboliske aktivitet i cellerne. Flere tricarboxylsyre cyklus intermediater vil som ovenfor omtalt resultere i signaler i dette område, men p.g.a den mulige inkorporering af deuterium i strukturen er det ikke umiddelbart muligt at tilordne disse signaler.

3.6.5 Resultat: L-aspartat.

L-aspartat eller aminosuccinat forekommer normalt på L-form og transporteres hurtigt ind i gliaceller, mens D-aspartat har en ringe optagehastighed som beskrevet (Kera, *et al.*, 1995; Rao & Murthy, 1993). Laspartat indgår i tricarboxylsyre cyklussen ved en transamination til oxaloacetat i en reaktion der involverer α -ketoglutarsyre.



L-aspartat

Til forskel for D-aspartat optages L-aspartat hurtigt i astrocytterne via en høj affinitets natrium afhængig glutamat transporter (Drejer, *et al.*, 1983a,1983b). Den pool der findes af aspartat i cellen er vist at blive suppleret med astrocytisk malat, glutamin og α -ketoglutarat (Cooper, 1988). Aspartat indgår i reaktion med α -ketoglutarat og danner glutamat og oxaloacetat. Det må forventes at aspartat vil indgå i tricarboxylsyre cyklussen og at oxaloacetat samt glutamat koncentrationen vil stige.

Figur 3.24 viser et spektrum af 6 mM L-aspartat ved pH 7.3. En bred triplet ved 2,13 ppm og det komplekse koblingsmønstre ved 2,61 - 2,85 ppm tilordnes som methylen protonerne, mens tripletten (ude af fase) ved 3,9 ppm tilskrives methin protonen.

Forbindelse	Multiplicitet	ppm
Cholesterol	(singlet) -CH ₃	0,50
Triacylglyceroler	(triplet) -CH ₃	0,84
Valin	(dublet) -C ^γ H ₃	0,98 - 1,06
Isoleucin	(dublet) -CH ₃	0,98 - 1,06
Leucin	(dublet) -C ^Y H ₃	0,98 - 1,06
β-hydroxybutyrat	(triplet) $-C^{\gamma}H_{3}$	1,15
Ethanol	(triplet) -CH ₃	1,17
Triacylglyceroler	(kvintetter) -(CH ₂) _n	1,29
Laktat/threonin	(dublet) - $C^{\beta}H_{3}$, - $C^{\gamma}H_{3}$	1,32 - 1,33
Alanin	(dublet) -C ^β H ₃	1,45 - 1,50
Acetat	(singlet) -CH ₃	1,90 - 1,92
Methionin	(triplet) -S-CH ₃	2,03 - 2,05
Glutamat/glutamin	(kvartet) - $C^{\beta}H_{2}$ -	2,10 - 2,15
Glutamat/glutamin/succinat/pyruvat	(triplet) $-C^{\gamma}H_2$ -	2,34 - 2,39
Kreatin/phosphokreatin (total kreatin)	(singlet) N-CH ₃	3,05
Cholinholdige forbindelser	(singlet) -N-(CH ₃) ₃	3,20 - 3,22
Glycin	(singlet) -CH ₂ -	3,57
Ethanol	(kvartet) -CH ₂ -	3,65
Inositol/glukose/glutamat/cystein m.fl.	-CH- / -CH ₂ -	3,70 - 3,90
Kreatin/Phosphokreatin m.fl.	(singlet) -CH ₂ -	3,93
Laktat	(kvartet) -C ^a H-	4,10 - 4,20
Fumarat	(singlet)	6,50 - 6,52
1,2,4-benzentricarboxylat (reference)	aromatiske signaler	7,45 - 7,90

Tabellen viser de normalt observerede signalers kemiske shift, samt kemiske shift fra adderet forbindelser. Flere af de opgivne kemiske shift værdier er fundet ved individuelle NMR eksperimenter med og uden cellematrix. Flere af disse signaler er desuden tilordnet i litteraturen (henvisninger tidligere i teksten). På baggrund af en software begrænsning er der i visse tilfælde opgivet et interval hvor i signalet normalt observeres. Hvor det er muligt er værdien for centersignalet opgivet. Da flere af forbindelserne har signaler der overlapper andre signaler, er der af hensyn til overskueligheden kun medtaget kemiske shift værdier for det eller de markante (observerbare) signaler fra den specifikke forbindelse. Som omtalt tidligere er signalerne tilordnet i forhold til signalerne fra de cholinholdige forbindelser (3,20 ppm) og laktat (1,33 ppm).



rigui 0.24. O mini L-aspartati D_2 OrnaOD, pri 7,2. Opeamict over 472 min.

Nedenfor i figur 3.25 og figur 3.26, vises et spektrum af celler, hvortil der parallelt er tilsat Dy(ATP)⁻¹ og 7 mM L-aspartat. Man iagttager signalet fra de normalt forekommende signaler i spektret (f.eks. de cholinholdige forbindelser ved 3,2 ppm). Det ses at signalet fra BTC er elimineret. I figur 3.26 ses methin signalet (2,65 - 2,88 ppm) fra aspartat tydeligt. Bemærk forskellen mellem spektret i figur 3.24 og figur 3.26. Opsamling over yderligere 9 minutter frembringer et spektrum som vist i figur 3.27. Der iagttages flere positive signaler downfield for solventsignalet, der må formodes at stamme fra metabolismen af aspartat. Efter 41 minutters inkubation (figur 3.27) kan der iagttages nye signaler downfield for solventsignalet.









Betragtes figur 3.28 observeres en udvikling i området 2,5 ppm til 3,0 ppm, der bliver mere udtalt jo længere tid der går (figur 3.31 til figur 3.34). Et positivt signal der opstår ved 2,50 ppm (mulig triplet, figur 3.28 og figur 3.30), forsvinder og opstår igen samtidig med flere positive signaler i området omkring 2,36 ppm. Signalerne ved ca. 7,8 ppm (figur 3.27) syntes her at forsvinde igen og observeres ikke i resten af spektrene i denne serie (figur 3.25 til figur 3.34).













solventsignalet (4,69 ppm). $\Delta T = 112$ min.







Figur 3.34. Fortsættelse af forsøg fra figur 3.25. Regionen 4,0 - 0,5 ppm er vist. ΔT = 182 min.

3.6.5.1 Diskussion: L-aspartat.

Tolkningen af spektrene i figur 3.25 til 3.36 er særdeles vanskelig selv når spektrene er opsat i serie. Dette skyldes til dels det store indhold af H_2O i prøven (S/N signalet dårligt) og dels det at mængden af aspartat syntes meget beskeden. Umiddelbart virker intensiteten af de signaler der observeres ikke forholdsvis som 7 mM aspartat.

Umiddelbart fornemmes en form for rytme i spektrene. Blandt andet udviklingen af signaler i området 2,6 ppm til 2,9 ppm viser en rytmisk udvikling i intensiteten af de forskellige signaler. Fremkomst af signaler ved 2,34 ppm (figur 3.28), 2,50 ppm (figur 3.30) og 6,14-6,54 ppm (figur 3.27) må tilskrives omdannelsen af aspartat til tricarboxylsyre cyklus intermediater og hertil beslægtede aminosyrer som f.eks. glutamat der har kemiske shift ved ca. 3,75 ppm og 2,36 ppm. Mason, *et al.*, 1995, har, i *et* elegant forsøg, vist at udvekslingshastigheden mellem α -ketoglutarsyre og glutamat er 72 gange hurtigere end flow hastigheden af tricarboxylsyre cyklussen (0,73 µmol/min*g væv), hvilket betyder at der må forventes en stor inkorporering af deuterium i glutamat og dermed også til biokemisk tilknyttede forbindelser f.eks. glutamin.

l området 6,14 ppm - 6,54 ppm observeres normalt signaler fra f.eks. dobbeltbindings protoner (f.eks. fra fumarat (6,54 ppm)). Fremkomst af yderligere signaler downfield for solventsignalet kan ikke umiddelbart forklares. Betragtes tidsforløbet (figur 3.26 og figur 3.30) og sammenlignes signalerne i området 2,6 ppm - 2,9 ppm, så fornemmes der en vis ensartethed i spektrene. Disse spektre er opsamlet henholdsvis efter 32 min og 76½ min. Forskelle mellem de øvrige dele af spektrene kan observeres (blandt andet signalerne omkring 3,0 ppm og signalet ved 2,5 ppm). Efter 112 minutters inkubering ophører udviklingen og det er især de tre signaler ved 2,7 ppm, 2,79 ppm og 2,85 ppm der er bevaret, hvilket må betyde at systemet nu har opnået en ligevægtstilstand.

Som nævnt tidligere indgår aspartat i en reaktion med α -ketoglutarsyre hvor i der dannes oxaloacetat. Methylen protonerne (C^{α}H) fra α -ketoglutarsyre vil give et signal ved ca. 2,5 ppm, hvilket succinat methylen protonerne ligeledes vil gøre. I figur 3.30 (76½), figur 3.32 (112) og figur 3.33 (147) observeres et signal ved 2,5 ppm, hvilket interessant nok giver et tidsforløb mellem spektrene på henholdsvis 35 min og 36 min. Spektrene er opsamlet med ca. 9 minutters mellemrum, men tidsrytmen syntes at være på ca. 36 minutter.

Westergaard, *et al.*, 1994, har vist at der er en efflux af α -ketoglutarat, malat og succinat fra astrocytter i primær kultur. Interessant nok kunne dette efflux stimuleres af glutamat eller glutamin i en koncentration på 0,5 mM. Efflux hastigheden for f.eks. α -ketoglutarat blev i disse forsøg bestemt til 13,1 nmol/ (time*mg protein). Signalerne fra disse intermediater^a vil, som følge af ekstracellulært Dy(ATP)⁻¹, gradvist forsvinde fra spektret. Da der observeres signaler fra glutamat i spektrene, må det forventes at den intracellulære glutamat koncentrationen er betydelig højere end 0,5 mM, hvorfor der må forventes en efflux af tricarboxylsyre cyklus intermediater fra cellerne.

Inkorporering af deuterium i tricarboxylsyre cyklus intermediaterne vil, som omtalt i kapitel 1.1.1, vanskeliggøre tolkningen af spektrene. Uden D₂O til stede i mediet^b vil f.eks. methin protonen i isocitrat give ophav til en kvartet (negativ), men med inkorporering af deuterium i den nabostillet methylen gruppe (CD^{α}H-) vil signalet i stedet resultere i et kompleks koblingsmønster (multiplet) ved omtrent det samme kemiske shift. Det er udfra det komplekse koblingsmønster i området 2,2 ppm - 3,2 ppm, ikke muligt at klargøre hvilke isotop effekter der observeres. Det er derfor oplagt af der skal foretages yderligere studier af inkorporeringen af deuterium i tricarboxylsyre cyklus intermediater, før det kan fastslås hvilke forbindelser der observeres i spektret. Det kan dog fastslås at der i området 2,2 - 3,2 ppm vil kunne registreres flere forskellige koblingsmønstre fra samme forbindelser.

^a Udskilt i det deutereret dyrkningsmediet indeholdende relaksationsreagens.

^b Deuteriumoxid som ekstern lock signal istedet.

Der er som nævnt ovenfor ingen klar tolkning af disse spektre, andet end at der tydeligvis er en rytmisk udvikling i spektrene, hvilket må skyldes metabolisk aktivitet. Fortsættes forsøget udover 182 minutter, forsvinder signalerne fra aspartat med tiden (disse data er ikke vist.

3.7 NMR forsøg hvor glutathion diethylester (GSH-DEE) er anvendt.

De foregående forsøg har primært alle været udført for at optimere modellen. Samtidig afspejler disse spektre de "naturlige" processer der foregår under selve opsamlingen af NMR spekteret, når der ikke er xenobiotika til stede. Det sekundære formålet var at fastslå hvordan cellerne respondere på overgangen fra *ex vivo* til *non vivo*. I de efterfølgende præsenteret forsøg søges det påvist, at NMR/astrocyt modellen kan anvendes til andet end at undersøge cellens metabolisme.

I det følgende vil der blive fokuseret på hvordan cellerne respondere biokemisk på toksiske forbindelser. De detoksificeringsprodukter der dannes under forsøget, er et resultat af de mange processer der foregår i cellen, hvilket betyder at en udvikling i spektrene er vanskelig at tolke. Et andet problem er at lokalisere detoksificeringsprodukterne. Disse optræder gerne i små cellulære koncentrationer (< 1 mM) der vanskeliggør tilordningen.

Der er derfor valgt at fokusere på glutathion systemet. Dette system kan forventes at give signaler i spektrene, da GSH koncentrationen i cellerne er forholdsvis stor (> 1 mM). Brugen af GSH-DEE og en transport inhibitor, DAONL, skulle kunne forøge koncentrationen af GSH og glutathion konjugater intracellulært, således at der opnås en detektabel koncentration af konjugaterne.

Et NMR spektrum af glutathion diethylester (GSH-DEE) ses i figur 3.35. Ethyl gruppen giver et karakteristisk mønster med to tripletter (^{a,j}H) ved 1,27 ppm og en kvartet (^{b,i}H) ved 4,23 ppm. Der observeres stadig signaler fra reduceret glutathion (f.eks. ved 3,75 ppm) og fra oxideret glutathion (GSSG eller oxideret GSH-DEE).

Fordelingen af de kemiske shift værdier for GSH-DEE, er vist i tabel 3G.

Figur 3.36 viser spektret af 5 mM GSH. Bemærk at tripletten fra cysteinyl (4,5 ppm, methin proton) ikke kan observeres. I signalet 3,74 ppm er der bidrag fra glutamat og glycin delen i GSH (tabel 3G).



Figur 3.35. 200 mM glutathion diethylester i PBS/D₂O. Tilordning i tabel 3G. Opsamlet over 5 min.

Gruppe	Multiplicitet	ppm
Ethyl- (GSH-DEE)	(kvartet) CH ₃ -, (a, j)	1,20 - 1,29
γ-glutamyl- (GSH/GSH-DEE)	(kvartet) - $C^{\beta}H_{2}$ - (d)	2,14
γ-glutamyl- (GSH/GSH-DEE)	(triplet) $-C^{\gamma}H_{2}$ - (e)	2,53
Cysteinyl- (GSH/GSH-DEE)	(dublet) - $C^{\beta}H_{2}$ - (g)	2,92
Cystinyl- (GSSG)/(ox. GSH-DEE)	(dublet) - $C^{\beta}H_{2^{-}}(f)$	3,00 og 3,24*
γ-glutamyl- (GSH)	(triplet) -C ^a H-	3,74
Glycinyl- (GSH)	(singlet) -CH ₂ - (h)	3,75
Glycinyl- (GSH-DEE)	(singlet) -CH ₂ - (h)	3,87
γ-glutamyl- (GSH-DEE)	(triplet) - $C^{\alpha}H$ - (c)	3,99
Ethyl- (GSH-DEE)	(kvartet) -CH ₂ -,2 stk. (b,i)	4,14 - 4,28
Cysteinyl- (GSH)	(triplet) -C ^a H-	4,50

Tabel 3G. Parentesen viser den forventede multiplicitet af GSH-DEE og GSH. Bogstaver indikerer placering af proton-/erne i GSH-DEE (se ovenfor). * er central værdi af multiplet. Der er ikke tilsat GSH reduktase og NADPH i dette eksperiment.



Figur 3.36. 5 mM glutathion i PBS/D₂O. Opsamlet over 3,3 min.

3.7.1 Omdannelse af GSH-DEE i celler.

Betragtes figur 3.37 til figur 3.38 observeres, udover de normalt forekommende signaler, fremkomsten af nye signaler i spektret når der tilsættes GSH-DEE. Signaler ved 4,21 ppm, 4,01 ppm, 3,76 ppm, 2,95 ppm, 2,54 ppm, 2,12 ppm og 1,21 ppm stammer fra GSH-DEE/GSH (sammenlign med tabel 3G). På dette tidspunkt kan signalet fra ethanols methylen gruppe iagttages som en negativ kvartet ved 3,64 ppm. Flere af cellens normale metabolitter kan også genfindes i spektret blandt andre signalet fra de cholinholdige forbindelser (3,20 ppm). Bemærk at det negative signal fra laktat er skjult under methyl signalet fra ethyl gruppen i GSH-DEE. Der er derimod ingen logisk forklaring på at signalerne fra valin, leucin og isoleucins methyl grupper ikke iagttages (0,9 - 1 ppm). Disse signaler observeres altid i spektrene.

Restproduktet ethanol fra den cellulære carboxyl esterase [EC 3.1.1.1] aktivitet kan efter 110 minutter tydeligt observeres i spektret (figur 3.38). Methyl signalet (1,17 ppm, triplet) og signalet fra methylen gruppens protoner (3,63 ppm, dublet) i ethanol observeres. I figur 3.38 kan flere af signalerne fra nedbrydningsprodukterne fra GSH nu tydeligt observeres blandt andet signalet ved 3,55 ppm der tilordnes som glycin.







3.7.2 Diskussion - Glutathion diethylester.

Sammenlignes spektret i figur 3.35 med spektret af reduceret GSH i figur 3.36 observeres væsentlige forskelle. Koblingen af to ester grupper til

henholdsvis glutamyl og glycinyl delen i GSH giver ophav til et anderledes koblingsmønster. Det kan dog konkluderes udfra spektret i figur 3.35 at prøven ikke er ren. Prøven indeholder mængder af GSH og autooxideret DEE-GS-SG-DEE (negative signaler omkring 3,2 ppm). Koncentrationen af oxideret forbindelser i prøven skulle derfor være forholdsvis beskeden sammenlignet med koncentrationen af GSH-DEE. En TLC kørsel af produktet viser også, at kun båndet fra GSH-DEE observeres (resultat ikke vist). Ydermere vil en forurening af synteseblandingen med oxideret GSH-DEE, GSHmonoethylestere (GSH-MEE) og GSH ikke forstyrre eksperimentet, da både reduceret og oxideret glutathion er længere tid om at optages i cellen (Puri & Meister, 1983; Wellner, et al., 1984) end glutathion analogen GSH-DEE (Levy, et al., 1993). I følge Puri & Meister, 1983, og Anderson, et al., 1985, er GSH-DEE ikke et substrat for γ -glutamyl transpeptidase [EC 2.3.2.2], der normalt transporterer dipeptidet glutamyl-cystein i cotransport med glycinyl gruppen ind i cellen (og GS-konjugater ud). De samme forsker grupper mener at GSH-DEE, der er mere lipofilt end GSH, i stedet bliver transporteret passivt over membranen.

Puri & Meister, 1983, har vist at den cellulære optagelses hastighed for glutathion analogen GSH-MEE er dobbelt så stor i lever og nyre^a end optagelses hastigheden for GSH (henholdsvis 4,5 µmol GSH/g/time^b og 2,5 µmol GSH/g/time), hvorfor man må forvente at diethylesteren af GSH vil optages hurtigere. Grattagliano, *et al.*, 1994, mener derimod, udfra dyreforsøg hvor forskellige estere af GSH blev injekteret direkte ind i duodenum, at estere af GSH ikke optages hurtigere i cellerne end GSH, men at GSH estere i stedet forbliver intakte i cellerne i længere tid end GSH, hvorfor der via de traditionelle målemetoder bestemmes størrere koncentrationer af glutathion i cellerne.

Forventningen er, at GSH-DEE i passende mængder optages i cellerne (figur 3.37), hvor carboxyl esterase [EC 3.1.1.1] aktivitet vil føre til dannelsen af GSH og ethanol, og at GSH "skelettet" forbliver intakt under forsøget. Såvel GSH som ethanol giver signaler der forholdsvis enkelt kan identificeres i spektrene.

Dannelsen af biproduktet ethanol er desværre ikke formålstjentligt for forsøgene, da ethanol, selv i små koncentrationer, er vist (Cohen, *et al.*, 1980; Aragon, *et al.*, 1985; Quintanilla & Tampier, 1992; Singh, *et al.*, 1994) at påvirke hjernecellers metabolisme væsentligt. Studier af ethanol toksisitet i hjernen antyder at oxidation af ethanol til acetaldehyd i hjernen skyldes enzymet

^a Mus injekteret intraperitonealt med 10 mmol/kg GSH monomethylester eller GSH.

Våd vægt.

katalase [EC 1.11.1.16] (Cohen, *et al.*, 1980) og at det er acetaldehyd der er den direkte årsag til de toksiske effekter af ethanol i hjernen (Aragon, *et al.*, 1985).

Som det ses af figur 3.38 (110 minutter) kan restproduktet af carboxyl esterase aktiviteten tydeligt ses ved 3,63 ppm (methylen protoner fra ethanol) og 1,17 ppm (methyl protonerne fra ethanol). På samme tid kan signalet fra glycin iagttages (3,55 ppm), hvilket må betyde at GSH allerede er begyndt at blive omsat i cellen (via γ -glutamyl cyklussen). GSH signalerne kan også ses tydeligere i dette spektrum end i figur 3.37.

Fremkomsten af ethanol signaler og mere markante glutathion signaler i spektret, indikerer at GSH-DEE er blevet optaget i cellerne og omdannet til GSH og ethanol. Signalet fra ethyl gruppen (1,25 ppm) iagttages stadig i spektret (figur 3.38), hvorfor man må formode at der stadig er glycinyl-ethyl, ethyl-glutamyl-cystein peptider og GSH-DEE tilbage i cellerne. Fremkomsten af glycin signalet ved 3,55 ppm indikerer at GSH-DEE er blevet omdannet til enten glycinyl-ethyl peptidet eller til glycin og ethanol (sidstnævnte i en proces katalyseret af carboxyl esterase [EC 3.1.1.1]).

3.8 Anvendelse af transpeptidase inhibitoren 6-diazo-5-oxo-L-norleucin i NMR forsøg.

3.8.1 Resultat: 6-diazo-5-oxo-L-norleucin.

Diazoforbindelser som 6-diazo-5-oxo-L-norleucin er normalt særdeles ustabile forbindelser, der straks sønderdeles under fraspaltning af kvælstof, med mindre stoffet er resonans stabiliseret. Selv når forbindelsen er resonans stabiliseret er den særdeles reaktiv.

DAONL bliver benyttet som glutamat analog ved transportforsøg og er vist at inhibere flere glutamat bindende enzymer blandt andre den membranbundne γ -glutamyl transpeptidase [EC 2.3.2.2] (Inoue & Horiuchi, 1977; Griffith & Meister, 1979b; Sastre, *et al.*, 1991; Taylor, *et al.*, 1992). Forsøg med nyreceller har vist at samtidig tilsætning af hippurat[®] forøger den inhiberende effekt med 55 % (Griffith & Meister, 1979b). Dette er ikke efterprøvet på en astrocyt kultur.

^a Derivat af glycin - benzoylglycin.

Forbindelse	Multiplicitet	ppm
Cholesterol	(singlet) -CH ₃	0,50
Triacylglyceroler	(triplet) -CH ₃	0,84
Valin	(dublet) $-C^{\gamma}H_{3}$	0,98 - 1,06
Isoleucin	(dublet) -CH ₃	0,98 - 1,06
Leucin	(dublet) -C ^Y H ₃	0,98 - 1,06
β-hydroxybutyrat	(triplet) $-C^{\gamma}H_{3}$	1,15
Ethanol	(triplet) -CH ₃	1,17
Ethyl- (GSH-DEE)	(kvartet) CH ₃ -	1,20 - 1,29
Triacylglyceroler	(kvintetter) -(CH ₂) _n	1,29
Laktat/threonin	(dublet) - $C^{\beta}H_{3}$, - $C^{\gamma}H_{3}$	1,32 - 1,33
Alanin	(dublet) $-C^{\beta}H_{3}$	1,45 - 1,50
Acetat	(singlet) -CH ₃	1,90 - 1,92
Methionin	(triplet) -S-CH ₃	2,03 - 2,05
γ-glutamyl- (GSH/GSH-DEE)	(kvartet) - $C^{\beta}H_{2}$ -	2,14
Glutamat/glutamin	(kvartet) - $C^{\beta}H_{2}$ -	2,10 - 2,15
Glutamat/glutamin/succinat/pyruvat	(triplet) $-C^{\gamma}H_2$ -	2,34 - 2,39
γ-glutamyl- (GSH/GSH-DEE)	(triplet) $-C^{\gamma}H_{2}$ -	2,53
Cysteinyl- (GSH/GSH-DEE)	(dublet) $-C^{\beta}H_2$ -	2,92
Cystinyl- (GSSG)/(ox. GSH-DEE)	(dublet) - $C^{\beta}H_{2}$ -	3,00 og 3,24
Kreatin/phosphokreatin (total kreatin)	(singlet) N-CH ₃	3,05
Cholinholdige forbindelser	(singlet) -N-(CH ₃) ₃	3,20 - 3,22
Glycin	(singlet) -CH ₂ -	3,57
Ethanol	(kvartet) -CH ₂ -	3,65
Inositol/glukose/glutamat/cystein m.fl.	-CH- / -CH ₂ -	3,70 - 3,90
γ-glutamyl- (GSH)	(triplet) -C ^α H-	3,74
Glycinyl- (GSH)	(singlet) -CH ₂ -	3,75
Glycinyl- (GSH-DEE)	(singlet) -CH ₂ -	3,87
Kreatin/Phosphokreatin m.fl.	(singlet) -CH ₂ -	3,93
γ-glutamyl- (GSH-DEE)	(triplet) -C ^a H-	3,99
Laktat	(kvartet) -C [∝] H-	4,10 - 4,20
Ethyl- (GSH-DEE)	(kvartet) -CH ₂ -	4,14 - 4,28
Cysteinyl- (GSH)	(triplet) -C ^α H-	4,50
Fumarat	(singlet)	6,50 - 6,52
1,2,4-benzentricarboxylat (reference)	aromatiske signaler	7,45 - 7,90

Tabellen viser de normalt observerede signalers kemiske shift, samt kemiske shift fra adderet forbindelser. Flere af de opgivne kemiske shift værdier er fundet ved individuelle NMR eksperimenter med og uden cellematrix. Flere af disse signaler er desuden tilordnet i litteraturen (henvisninger tidligere i teksten). På baggrund af en software begrænsning er der i visse tilfælde opgivet et interval hvor i signalet normalt observeres. Hvor det er muligt er værdien for centersignalet opgivet. Da flere af forbindelserne har signaler der overlapper andre signaler, er der af hensyn til overskueligheden kun medtaget kemiske shift værdier for det eller de markante (observerbare) signaler fra den specifikke forbindelse. Som omtalt tidligere er signalerne tilordnet i forhold til signalerne fra de cholinholdige forbindelser (3,20 ppm) og laktat (1,33 ppm).



6-diazo-5-oxo-L-norleucin

Figur 3.39 viser et spektrum af en astrocyt kultur der er inkuberet med 2,5 mM^a Dy(ATP)⁻¹. Det skal oplyses at inkubationsmediet ikke indeholder BTC. Hvis der sammenlignes med figur 3.6, så kan de fleste af de signaler der observeres i figur 3.6 genfindes i figur 3.39. Det tidligere omtalte signal ved 2,02 ppm (f.eks. figur 3.16), der menes at stamme fra methionin ses tydeligt sammen med signalerne fra cholin (3,20 ppm), kreatin (3,02 ppm), valin, isoleucin og leucin ved 0,96 ppm, laktat (4,12 ppm og 1,33 ppm) og glutamat (3,76 ppm og 2,34 ppm). Bemærk at laktat/threonin signalet (1,33-1,37 ppm) syntes at være ude af fase (figur 3.39).



Det ses ved sammenligning af figur 3.39 og figur 3.40 at der ved inkubering med DAONL opstår nye signaler ved ca. 2,1 ppm og ca. 3,6 ppm (begge negative signaler). Signalerne fra glutamat (3,75 ppm og 2,34 ppm) og glycin

^a Årsagen til at der kun er anvendt 2,5 mM skyldes, at dette er et af de første forsøg med reagenset.

(3,57 ppm) er samtidig blevet mere markante i forhold til signalerne fra figur3.39. Bemærk den vellykkede vandundertrykkelse; linieforbredningen er ikke såudtalt som i figur 3.39 og der kan nu observeres et nyt signalet ved 5,41 ppm.



Figur 3.40. Som ovenfor men tilsat 100 μ M 6-diazo-5-oxo-L-norleucin. Optaget over 12½ min. ΔT = 76 min. Pile i figuren symboliserer ændringer i spektret. Signalet ved ca. 2,1 ppm kan af tekniske årsager ikke markeres med talværdi.

3.8.2 Diskussion: 6-diazo-5-oxo-L-norleucin.

6-diazo-5-oxo-L-norleucin (DAONL) er kendt som værende en irreversibel inhibitor af glutaminbindende enzymer heriblandt den membranbundne γ glutamyl transpeptidase. Sastre, *et al.*, 1991, og Pellifique, *et al.*, 1995, har fremsat den hypotese, at DAONL delvist vil inhibere optagelsen og udskillelse af aminosyrer der via denne sekundære optage mekanisme optages i cellen.

Inhibering af γ -glutamyl transpeptidase påvirker desuden den cellulære glutathion optagelse og udskillelse. Blandt andet udskillelsen af glutathion konjugater er vist at blive væsentligt nedsat som følge af γ -glutamyl transpeptidase inhibering (Hanigan & Pitot, 1985). Et review af Koob & Dekant, 1991, gennemgår dannelsen af glutathion konjugater samt transport af disse.

Shapiro, *et al.*, 1979, har vist at DAONL også inhiberer det metabolisk centrale enzym phosphat aktiveret glutaminase [EC, 3.5.1.2; PAG] i neuroner, hvilket betyder at glutamin ikke kan omdannes til glutamat. Da PAG findes i astrocytter, må DAONL teoretisk^a have samme virkning på PAG aktiviteten i cerebellare astrocytter. Resultatet heraf må derfor være en akkumulering af glutamin i cellerne. Der må derfor teoretisk kunne forventes en forøgelse i intensiteten af signalerne for glutamin (2,15 ppm (negativ), 2,40 ppm (positiv), 4,25 ppm (positiv)) ved inkubation af cellerne med DAONL. Umiddelbart iagttages disse signaler ikke i spektret, da de er "gemt" under andre signaler f.eks. fra glutamat, men i senere anvendte spektre, hvor der er tilsat DAONL vil disse signaler kunne iagttages.

l spektrene (figur 3.39 og figur 3.40) iagttages en udvikling i signaler (vist med pile i figur 3.40), der må tilskrives glutamyl gruppen (3,75 ppm, 2,34 ppm og 2,10 ppm) i GSH. Signalet for glycinyl methyl protonerne i GSH vil kunne observeres ved 3,75 ppm i lighed med γ -glutamyl methin protonen i GSH. Denne udvikling kan iagttages ved en sammenligning med figur 3.36 og må være et resultat af DAONL inkuberingen, hvorfor det må konkluderes at DAONL har en akkumulerende virkning på mængden af GSH i cellerne.

Bemærk at signalerne fra triacylglycerols methylen grupper (ca. 1,2 ppm) og methyl grupper ikke er til stede i spektret (figur 3.39 og figur 3.40). Dette fænomen er tidligere diskuteret i kapitel 3.3.2.2. Forsvinden af disse signaler fra spektret afstedkommer ofte, men ikke altid, fremkomst af et negativt signal ved ca. 3,6 ppm, hvilket også kan iagttages i disse spektre. Dette signal er tidligere observeret i flere spektre hvor der er ikke tilsat GSH-DEE til cellematrixen. Dette signal må derfor formodes at skyldes cellens metabolisme. Blandt andet glycerol giver ophav til et negativt signal i dette område (ca. 3,6 ppm, methylen grupperne) og et positivt signal ved ca. 3,9 ppm (methin protonen).

Signalet ved 5,41 ppm (figur 3.40) kan ikke umiddelbart tilordnes. Dette signal er tidligere observeret (resultat ikke vist) i forsøg, hvor der er tilsat relaksations-/shiftreagens og hvor undertrykkelsen af solventsignalet har fungeret perfekt, hvilket betyder at signalet normalt må være placeret under solventsignalet.

Det nye signal ved ca. 1,1 ppm (mulig triplet) der tidligere er iagttaget kan ikke umiddelbart tilordnes, men må skyldes en methyl gruppe fra et spin system som f.eks. CH_3CH_2 -.

^a Der er ikke fundet litteratur der bekræfter dette.

Forbindelse	Multiplicitet	ppm
Cholesterol	(singlet) -CH ₃	0,50
Triacylglyceroler	(triplet) -CH ₃	0,84
Valin	(dublet) -C ^Y H ₃	0,98 - 1,06
Isoleucin	(dublet) -CH ₃	0,98 - 1,06
Leucin	(dublet) $-C^{\gamma}H_{3}$	0,98 - 1,06
β-hydroxybutyrat	(triplet) $-C^{\gamma}H_{3}$	1,15
Ethanol	(triplet) -CH ₃	1,17
Ethyl- (GSH-DEE)	(kvartet) CH ₃ -	1,20 - 1,29
Triacylglyceroler	(kvintetter) -(CH ₂) _n	1,29
Laktat/threonin	(dublet) - $C^{\beta}H_{3}$, - $C^{\gamma}H_{3}$	1,32 - 1,33
Alanin	(dublet) $-C^{\beta}H_{3}$	1,45 - 1,50
Acetat	(singlet) -CH ₃	1,90 - 1,92
Methionin	(triplet) -S-CH ₃	2,03 - 2,05
γ-glutamyl- (GSH/GSH-DEE)	(kvartet) - $C^{\beta}H_{2}$ -	2,14
Glutamat/glutamin	(kvartet) - $C^{\beta}H_{2}$ -	2,10 - 2,15
Glutamat/glutamin/succinat/pyruvat	(triplet) - $C^{\gamma}H_2$ -	2,34 - 2,39
γ-glutamyl- (GSH/GSH-DEE)	(triplet) - $C^{\gamma}H_2$ -	2,53
Cysteinyl- (GSH/GSH-DEE)	(dublet) - $C^{\beta}H_2$ -	2,92
Cystinyl- (GSSG)/(ox. GSH-DEE)	(dublet) - $C^{\beta}H_2$ -	3,00 og 3,24
Kreatin/phosphokreatin (total kreatin)	(singlet) N-CH ₃	3,05
Cholinholdige forbindelser	(singlet) -N-(CH ₃) ₃	3,20 - 3,22
Glycin	(singlet) -CH ₂ -	3,57
Ethanol	(kvartet) -CH ₂ -	3,65
Inositol/glukose/glutamat/cystein m.fl.	-CH- / -CH ₂ -	3,70 - 3,90
γ-glutamyl- (GSH)	(triplet) -C ^α H-	3,74
Glycinyl- (GSH)	(singlet) -CH ₂ -	3,75
Glycinyl- (GSH-DEE)	(singlet) -CH ₂ -	3,87
Kreatin/Phosphokreatin m.fl.	(singlet) -CH ₂ -	3,93
γ-glutamyl- (GSH-DEE)	(triplet) -C ^a H-	3,99
Laktat	(kvartet) -C ^α H-	4,10 - 4,20
Ethyl- (GSH-DEE)	(kvartet) -CH ₂ -	4,14 - 4,28
Cysteinyl- (GSH)	(triplet) -C ^a H-	4,50
Fumarat	(singlet)	6,50 - 6,52
1.2.4-benzentricarboxylat (reference)	aromatiske signaler	745-790

Tabellen viser de normalt observerede signalers kemiske shift, samt kemiske shift fra adderet forbindelser. Flere af de opgivne kemiske shift værdier er fundet ved individuelle NMR eksperimenter med og uden cellematrix. Flere af disse signaler er desuden tilordnet i litteraturen (henvisninger tidligere i teksten). På baggrund af en software begrænsning er der i visse tilfælde opgivet et interval hvor i signalet normalt observeres. Hvor det er muligt er værdien for centersignalet opgivet. Da flere af forbindelserne har signaler der overlapper andre signaler, er der af hensyn til overskueligheden kun medtaget kemiske shift værdier for det eller de markante (observerbare) signaler fra den specifikke forbindelse. Som omtalt tidligere er signalerne tilordnet i forhold til signalerne fra de cholinholdige forbindelser (3,20 ppm) og laktat (1,33 ppm).

3.9 Eksperimenter hvor konjugation af xenobiotika til cellulært glutathion er vist ved NMR forsøg.

3.9.1.1 Resultat: N-ethylmaleimid.

N-ethylmaleimid eller 1-ethyl-1H-pyrrole-2,5-dione, der f.eks. anvendes i cancer forskning, er klassificeret som værende en stærk irritant og menes at have antimitotisk aktivitet.



N-ethylmaleimid.

Ved hydrolyse kan følgende forbindelse forventes at opstå;

 $\begin{array}{c} O & e & f & g & h \\ HO - C - CH = CH - C - NH - CH_2 - CH_3 \end{array}$

N-ethyl-3-amido-2-propensyre.

Figur 3.41 viser et spektrum af N-ethylmaleimid i PBS/D₂O. De kemiske shift værdier for denne forbindelse er 6,84 ppm (^{a,b}H, singlet), 3,52 ppm (^cH, kvartet) og 1,13 ppm (^dH, triplet). De resterende signaler i spekteret (figur 3.41) formodes at være hydrolyse produktet af N-ethylmaleimid. Signalerne fra det formodet hydrolyseprodukt observeres ved 6,29 ppm (^eH, dublet), 5,90 ppm (^fH, dublet), 3,22 ppm (^gH, kvartet) og 1,13 ppm (^hH, triplet).



Efter at inkubering af cellematrixen med GSH-DEE er tilendebragt, tilsættes γ -glutamyl transpeptidase inhibitoren DAONL og følgende spektrum optages, figur 3.42. Der iagttages udover signalerne fra cellens normalt tilstedeværende forbindelser også signalerne fra BTC til lavt felt og signalerne fra GSH-DEE (se tabel 3G) og restproduktet fra den cellulære carboxyl esterase [EC 3.1.1.1] aktivitet, ethanol (1.14 ppm, (triplet) og 3,6 ppm (kvartet) - ikke markeret).



Efter tilsætning af N-ethylmaleimid ændrer spektret karakter, figur 3.43. Der observeres nu en mulig singlet ved 6,84 ppm, en multiplet ved 3,53 ppm og to tripletter ved 1,14 ppm (sammenfald med ethanol signalet, figur 3.41). Der iagttages yderligere to negative signaler, formodentlig dubletter, i området omkring 2,9 ppm (svære at tyde i denne figur). Disse ses tydeligere på figur 3.44. Ved tilsætning af relaksations reagenset, figur 3.45, elimineres signalerne fra BTC (regionen downfield for solventsignalet er ikke vist).

l spektret (figur 3.45) observeres nu en række nye signaler. I forhold til spektret i figur 3.42 iagttages nu i alt 7 nye signaler, bl.a. to tydelige dubletter ved 2,98 og 2,90 ppm (alle nye signaler er vist med pile).










Figur 3.45. Fortsættelse af forsøg. Der er nu tilsat 5 mM Dy(ATP)⁻¹. Spektret er optaget over 20 min. $\Delta T = 188$ min. Downfield for solventsignalet observeres kun signalet fra N-ethylmaleimid protonerne ^a H og ^bH. Pile symboliserer placeringen af nye signaler i forhold til figur 3.42.

3.9.1.2 Diskussion: N-Ethylmaleimid.

N-ethylmaleimid giver i PBS/D₂O ophav til signaler fra to forbindelser, hvilket ses af figur 3.41. Signalerne ved 5,90 ppm og 6,29 ppm formodes at stamme fra den hydrolyserede form af N-ethylmaleimid (vinylprotoner). Methylen gruppen, der er nabostillet til en N-C(O)- gruppe, har et kemisk shift ved 3,22 ppm (negativ kvartet), hvilket passer overens med den estimerede værdi på 3,2 ppm. Signalet kan skimtes i figur 3.44.

Ved tilsætning af N-ethylmaleimid til cellematrixen optræder de forventede signaler fra N-ethylmaleimid i spektret. Yderligere to dubletter omkring 2,9 ppm syntes at stige i intensitet. Disse signaler ses tydeligt i figur 3.45, hvor der er tilsat Dy(ATP)⁻¹. Signalerne kan være glutathion konjugater der er opstået p.g.a. inkubationen med GSH-DEE. DAONL hæmmer for eksporten af konjugaterne og konjugaterne vil derfor akkumuleres i cellen. Glutathion vil udføre et nukleofilt angrib ved dobbeltbindingen, hvilket resulterer i lige store mængder af de to GSH konjugater.



Deutereret ethylmaleimid mercaptursyre.

Glutathion konjugatet (ovenstående illustration) vil have kemiske shift værdier ved ca. 2,6 ppm (-CHD-C(O)-N, negativ dublet) og ca. 2,9 ppm (S-CH-C(O)-N), negativ multiplet). Signalerne fra ethyl gruppen kan stadig iagttages ved 3,52 ppm (^cH, negativ kvartet) og ved 1,13 ppm (^hH, positiv triplet). Sidstnævnte signal er ligeledes forøget i intensitet, dels fordi signalet er placeret oveni signalet fra ethanols methyl gruppe. Bemærk (figur 3.45) at signalerne fra GSH-DEE ikke observeres på dette tidspunkt, hvilket kan tolkes sådan, at den mængde GSH-DEE der er optaget i cellerne (før DAONL blev tilsat til cellematrixen), nu er fuldstændig omdannet til ethanol og GSH.

Fremkomsten af flere negative signaler i spektret må forklares som dannelsen af GSH konjugater udfra hydrolyseret ethylmaleimid, N-ethyl-3amido-2-propensyre. Ved addering af GS⁻ og inkorporering af deuterium i strukturen vil der kunne dannes forskellige forbindelser som vist i illustrationen nedenfor.

De estimerede værdier for disse forbindelser er forbundet med stor usikkerhed, men flere af konjugaterne vil give dubletter i området mellem 2,4 ppm og 3,0 ppm. De to tripletter fra GSH konjugat nr. 3 (HOOC-**CH**(SG)-CH₂-C(O)-N-) og konjugat nr. 4 (HOOC-CH₂-**CH**(SG)-C(O)-N-) estimeres til at give ophav til positive tripletter ved ca. 3,2 ppm. En sammenligning mellem figur 3.42, 3.44 og figur 3.45 viser også en klar udvikling i dette signal. Dubletter fra konjugat nr. 1 og nr. 2 vil have kemiske shift ved henholdsvis 2,6 ppm, 2,8 ppm (konjugat nr. 1) og 2,4 ppm, 3,3 ppm (konjugat nr. 2). Signalerne fra eventuelle mercaptursyrer fra omdannelsen af konjugaterne vil ligeledes være placeret hvor flere af de omtalte signaler er placeret. Blandt andet mercaptursyrens cystein methylen protoner vil give ophav til en negativ dublet ved ca. 3,1 ppm og acetyl protonerne vil give signal ved ca. 2,1 ppm (positiv singlet). Begge signaler der iagttages i spektret (figur 3.45). De resterende signaler ved 1,85 ppm, 1,7 ppm og 1,6 ppm er forsøgt tilordnet, men der er umiddelbart ingen svar på hvorfra disse signaler stammer.



Trods disse usikkerheder i den teoretiske beregning af shift for glutathion konjugaterne, må det konkluderes at der efter tilsætning af GSH-DEE, DAONL og ethylmaleimid til cellematrixen er dannet flere produkter. Der er desværre ingen klare indikationer, men dubletterne ved 2,9 ppm og 2,6 ppm konkluderes at tilhøre et GSH/ethylmaleimid konjugat, mens signalerne ved 3,1 ppm og 2,1 ppm må formodes at skyldes en af mercaptursyrerne. Signalet ved 2,6 ppm vil også indeholde signaler fra ikke deutereret konjugat (positiv triplet).

3.9.2 Resultat: 1,2-Epoxybutan.

1,2-epoxybutan, der ofte omtales som 1,2-butylenoxid i litteraturen, er blandbar med vand, acetone og ethanol. I dette eksperiment er epoxybutan opblandet i PBS/D_2O .

$$C\mathring{H}_{3}C\mathring{H}_{2}C\mathring{H}_{-}C\mathring{H}_{2}$$

Koblingsmønstret for 1,2-epoxybutan ses nedenfor i figur 3.46. De kemiske shift værdier for 1,2-epoxybutan fordeler sig således, at protonerne (^aH) har et kemisk shift ved 0,99 ppm (triplet), methylen protonerne (^bH) ved ca. 1,56 ppm, methin protonen (^cH) ved 2,93 ppm og methylen protonerne (^dH) et kemisk skift ved 2,72 ppm. Signalet ved 3,13 ppm kan ikke umiddelbart tilordnes, men må formodes at stamme fra en syre katalyserede hydrolyse af epoxid ringen (omtales senere).



Før tilsætning af 1,2-epoxybutan til cellematrixen blev der tilsat GSH-DEE og senere transpeptidase inhibitoren DAONL til NMR røret. Signalerne fra GSH-DEE (figur 3.40) kan genfindes i figur 3.47. Ethanol signalet ved 3,6 ppm observeres. Methyl signalet fra ethanol overskygges af signalet ved 1,28 ppm, men kan anes i en forstørrelse af området (ikke vist her).

Ved tilsætning af 2 mM 1,2-epoxybutane til cellematrixen (figur 3.48) iagttages tre nye signaler ved 3,48 ppm, 1,45 ppm og ved 0,92 ppm. Der observeres endvidere en ændring i området 2,4 - 2,6 ppm. Signalerne ved 1,45 ppm og 1,53 ppm er tidligere observeret i spektrene (f.eks. i figur 3.45). Disse signaler er tidligere tilordnet som et resultat af metabolisk aktivitet, men på nuværende tidspunkt er signalet ved 1,53 ppm ikke tilordnet med sikkerhed. Signalet ved 1,45 ppm tilordnes som alanin (tidligere omtalt i kap 3.3.3.2).

Acetat signalet (1,92 ppm) der svagt kunne anes i figur 3.47 er tydeligere i dette spektrum (figur 3.48).

Forbindelse	Multiplicitet	ppm
Cholesterol	(singlet) -CH ₃	0,50
Triacylglyceroler	(triplet) -CH ₃	0,84
Valin	(dublet) $-C^{\gamma}H_{3}$	0,98 - 1,06
Isoleucin	(dublet) -CH ₃	0,98 - 1,06
Leucin	(dublet) -C ^Y H ₃	0,98 - 1,06
β-hydroxybutyrat	(triplet) $-C^{\gamma}H_{3}$	1,15
Ethanol	(triplet) -CH ₃	1,17
Ethyl- (GSH-DEE)	(kvartet) CH ₃ -	1,20 - 1,29
Triacylglyceroler	(kvintetter) -(CH ₂) _n	1,29
Laktat/threonin	(dublet) - $C^{\beta}H_{3}$, - $C^{\gamma}H_{3}$	1,32 - 1,33
Alanin	(dublet) $-C^{\beta}H_{3}$	1,45 - 1,50
Acetat	(singlet) -CH ₃	1,90 - 1,92
Methionin	(triplet) -S-CH ₃	2,03 - 2,05
γ-glutamyl- (GSH/GSH-DEE)	(kvartet) - $C^{\beta}H_{2}$ -	2,14
Glutamat/glutamin	(kvartet) - $C^{\beta}H_{2}$ -	2,10 - 2,15
Glutamat/glutamin/succinat/pyruvat	(triplet) $-C^{\gamma}H_2$ -	2,34 - 2,39
γ-glutamyl- (GSH/GSH-DEE)	(triplet) $-C^{\gamma}H_{2}$ -	2,53
Cysteinyl- (GSH/GSH-DEE)	(dublet) - $C^{\beta}H_{2}$ -	2,92
Cystinyl- (GSSG)/(ox. GSH-DEE)	(dublet) - $C^{\beta}H_{2}$ -	3,00 og 3,24
Kreatin/phosphokreatin (total kreatin)	(singlet) N-CH ₃	3,05
Cholinholdige forbindelser	(singlet) -N-(CH ₃) ₃	3,20 - 3,22
Glycin	(singlet) -CH ₂ -	3,57
Ethanol	(kvartet) -CH ₂ -	3,65
Inositol/glukose/glutamat/cystein m.fl.	-CH- / -CH ₂ -	3,70 - 3,90
γ-glutamyl- (GSH)	(triplet) -C ^a H-	3,74
Glycinyl- (GSH)	(singlet) -CH ₂ -	3,75
Glycinyl- (GSH-DEE)	(singlet) -CH ₂ -	3,87
Kreatin/Phosphokreatin m.fl.	(singlet) -CH ₂ -	3,93
γ-glutamyl- (GSH-DEE)	(triplet) -C ^a H-	3,99
Laktat	(kvartet) -C ^α H-	4,10 - 4,20
Ethyl- (GSH-DEE)	(kvartet) -CH ₂ -	4,14 - 4,28
Cysteinyl- (GSH)	(triplet) -C ^a H-	4,50
Fumarat	(singlet)	6,50 - 6,52
1,2,4-benzentricarboxylat (reference)	aromatiske signaler	7.45 - 7.90

Tabellen viser de normalt observerede signalers kemiske shift, samt kemiske shift fra adderet forbindelser. Flere af de opgivne kemiske shift værdier er fundet ved individuelle NMR eksperimenter med og uden cellematrix. Flere af disse signaler er desuden tilordnet i litteraturen (henvisninger tidligere i teksten). På baggrund af en software begrænsning er der i visse tilfælde opgivet et interval hvor i signalet normalt observeres. Hvor det er muligt er værdien for centersignalet opgivet. Da flere af forbindelserne har signaler der overlapper andre signaler, er der af hensyn til overskueligheden kun medtaget kemiske shift værdier for det eller de markante (observerbare) signaler fra den specifikke forbindelse. Som omtalt tidligere er signalerne tilordnet i forhold til signalerne fra de cholinholdige forbindelser (3,20 ppm) og laktat (1,33 ppm).





Inkubering af celler med dysprosium-ATP komplekset frembringer en ændring af spektret (figur 3.49). I spektret observeres stadig signaler fra GSH-

DEE omdannelsen til GSH/GSSG (sammenlign med tabel 3G) og signalet fra restproduktet ethanol ved 3,65 ppm. Methyl signalet fra ethanol er stadig gemt, men kan svagt anes ved 1,1 ppm. Det store negative signal ved ca. 3,48 ppm (kvartet/multiplet) og signalet ved 0,92 ppm (triplet) kan stadig iagttages (markeret med pile). Tilsætning af Dy(ATP)⁻¹ til NMR røret resulterer i en udtalt linieforbredning som vist i figur 3.49, men de føromtalte signaler kan stadig genfindes i dette spektrum. Bemærk at intensiteten af laktat signalet er mærkbart formindsket. Det beskedne signal fra acetat kan på dette tidspunkt ikke iagttages, muligvis p.g.a linieforbredningen.

3.9.2.1 Diskussion: 1,2-Epoxybutan.

Ved anvendelse af epoxid forbindelser, må der forventes reaktionsprodukter fra syre-katalyserede hydrolyse reaktioner, hvor epoxid ringen åbnes. Signalet ved 3,13 ppm (figur 3.46) formodes at være et resultat af en sådan reaktion.

De beregnede cirka værdier for kemiske shifts for hydrolyseproduktet er ^fH (kvintet, 1,5 ppm), ^hH (dublet, 3,6 ppm), ^gH (multiplet, 3,9 ppm) og ^eH (triplet, 1,4 ppm) (nomenklaturen forklares nedenfor).



Figur 3.49. Fortsættelse af forsøget i figur 3.48, men tilsat 5 mM relaksationsreagens. Opsamlet over 20 min. $\Delta T = 126$ min.

1 mag Epoxider detoksificeres i cellerne via glutathion transferase [EC 2.5.1.18; GST]^a, der åbner epoxid ringen samtidig med at der adderes GS⁻. Der er mulighed for to produkter:



Protonerne ⁱH og ^jH fra konjugat nr. 2 vil have kemiske shift ved henholdsvis 3,4 ppm - 3,5 ppm (multiplet) og 3,65 ppm (dublet), mens protonerne ^gH og ^hH fra konjugat nr. 1 vil have kemiske shift ved henholdsvis 3,9 - 4,0 ppm (multiplet) og 2,4 - 2,5 ppm (dublet). Flere af signalerne fra konjugat nr. 1 vil have samme kemiske shift som den hydrolyserede epoxybutan (^fH (multiplet, 1,3 ppm), ^gH (multiplet, 3,9 ppm) og ^eH (triplet, 1,0 ppm)) og ethyl gruppen vil give ophav til signaler sammesteds som GSH-DEE, hvorfor signalerne fra konjugat nr. 1 ikke kan iagttages direkte.

Der fremkommer som tidligere iagttaget et nyt positivt signal ved 1,4-1,5 ppm, der tidligere er tilordnet som deutereret alanin. Akkumuleringen af denne aminosyre i cellen kan være forårsaget af en inhibering af transport mekanismerne med DAONL. Nydannelse af acetat (1,92 ppm) indikerer at cellerne er metabolisk aktive efter 76 minutter. Det tydelige fald i laktat signalets intensitet efter 126 minutter (umiddelbart efter tilsætning af Dy(ATP)⁻¹ til cellematrixen) indikerer, at cellerne har eksporteret laktat.

Bemærk den markante ændring af signalerne i området 2,3 - 2,5 ppm. I figur 3.47 observeres signalerne fra GSH-DEE tydeligt, men med tiden forsvinder disse og er i figur 3.49 stort set elimineret. Normalt forbliver disse signaler synlige i spektrene, hvilket må tolkes således at der fremkommer et nyt signal med negativ fase i dette område. Netop dubletten fra konjugat nr. 1 vil resulterer i et sådant signal i dette område, hvilket kunne være en indikation på at der er dannet et GSH-konjugat som konjugat nr. 1.

^a Ind imellem optræder EC nr. 3.1.2.18 i litteraturen (Zhang, et al., 1991).

Udfra ovenstående må det konkluderes, at der er sket en udvikling i spektrene der ikke tidligere er observeret. Udviklingen må formodes at skyldes fremkomsten af minimum et glutathion konjugationsprodukt, hvoraf kun signalet ved 3,48 ppm (konjugat nr. 2)(markeret med pil) iagttages og at konjugat nr. 1 sandsynligvis også er dannet. Det kan ikke udelukkes at der i NMR røret (såvel ekstracellulært som intracellulært) er dannet hydrolyserede former af epoxybutan. Det er samtidig ikke muligt at bestemme om der stadig er epoxybutan til stede i cellematrixen. Signalerne fra epoxybutan og eventuelle mercaptursyrer, er desværre gemt under signalerne fra de normalt forekommende forbindelser og signalerne fra GSH-DEE og GSH.

3.9.3 Resultat: Ethylacrylat.

Ethylacrylat der ved stuetemperatur er en væske (monomer form), er i litteraturen ofte omtalt som 2-propionatethylester eller acrylatethylester. Den toksiske effekt af ethylacrylat skyldes reaktionen med protein thiol grupper. Dannelse af polymere opstår ved henstand over 283 K. Der foreligger ingen data for polymeriseringshastigheden ved 298 K. Monomeren anvendes i maling som additiv og ved coatning af tekstiler og papir.



På grund af resonansstrukturen vil ester gruppen være forholdsvis stabil overfor nukleofile reagenser. Derimod er β -kulstoffet tilgængeligt for et nukleofilt angreb, f.eks. af GSH. Udføres forsøg med ethylacrylat i det neutrale pH område, må esteren formodes at være stabil overfor hydrolyse i længere tid.

I figur 3.50 ses det velkendte spektrum af konfluente astrocytter tilsat henholdsvis GSH-DEE, BTC og γ -glutamyl transpeptidase inhibitoren DAONL. I dette spektrum kan det negative signal fra GSH-DEE ethyl methylen protonerne klart iagttages ved 4,22 ppm. De resterende GSH-DEE signaler er vist med pile i figur 3.50. Signalet fra laktat methin protonen kan skimtes mellem signalerne 4,22 ppm og 4,02 ppm. Desuden observeres signalerne fra glutamat ved 2,11 ppm og 3,76 ppm. Desuden observeres flere af glutathions signaler, der har flere sammenfald med signalerne fra GSH-DEE (tabel 3G). Signalet ved 2,95 ppm tilordnes som cysteinyl methylen protonerne i GSH. Tripletten ved ca. 1,5 ppm er tidligere observeret (figur 3.5 og figur 3.16), men endnu ikke tilordnet med sikkerhed. At GSH-DEE er blevet omsat i cellen ses ved fremkomst af ethanol signaler (1,18 ppm og 3,65 ppm) i spektret og udfra de tydelige signaler fra GSH i spektret. DAONL er med til at forstærke akkumuleringen af GSH og konjugater heraf i cellerne.

Forbindelse	Multiplicitet	ppm
Cholesterol	(singlet) -CH ₃	0,50
Triacylglyceroler	(triplet) -CH ₃	0,84
Valin	(dublet) $-C^{\gamma}H_{3}$	0,98 - 1,06
Isoleucin	(dublet) -CH ₃	0,98 - 1,06
Leucin	(dublet) $-C^{\gamma}H_{3}$	0,98 - 1,06
β-hydroxybutyrat	(triplet) $-C^{\gamma}H_{3}$	1,15
Ethanol	(triplet) -CH ₃	1,17
Ethyl- (GSH-DEE)	(kvartet) CH ₃ -	1,20 - 1,29
Triacylglyceroler	(kvintetter) -(CH ₂) _n	1,29
Laktat/threonin	(dublet) - $C^{\beta}H_{3}$, - $C^{\gamma}H_{3}$	1,32 - 1,33
Alanin	(dublet) $-C^{\beta}H_{3}$	1,45 - 1,50
Acetat	(singlet) -CH ₃	1,90 - 1,92
Methionin	(triplet) -S-CH ₃	2,03 - 2,05
γ-glutamyl- (GSH/GSH-DEE)	(kvartet) - $C^{\beta}H_{2}$ -	2,14
Glutamat/glutamin	(kvartet) - $C^{\beta}H_{2}$ -	2,10 - 2,15
Glutamat/glutamin/succinat/pyruvat	(triplet) $-C^{\gamma}H_{2}$ -	2,34 - 2,39
γ-glutamyl- (GSH/GSH-DEE)	(triplet) $-C^{\gamma}H_2$ -	2,53
Cysteinyl- (GSH/GSH-DEE)	(dublet) - $C^{\beta}H_2$ -	2,92
Cystinyl- (GSSG)/(ox. GSH-DEE)	(dublet) - $C^{\beta}H_{2}$ -	3,00 og 3,24
Kreatin/phosphokreatin (total kreatin)	(singlet) N-CH ₃	3,05
Cholinholdige forbindelser	(singlet) -N-(CH ₃) ₃	3,20 - 3,22
Glycin	(singlet) -CH ₂ -	3,57
Ethanol	(kvartet) -CH ₂ -	3,65
Inositol/glukose/glutamat/cystein m.fl.	-CH- / -CH ₂ -	3,70 - 3,90
γ-glutamyl- (GSH)	(triplet) -C ^a H-	3,74
Glycinyl- (GSH)	(singlet) -CH ₂ -	3,75
Glycinyl- (GSH-DEE)	(singlet) -CH ₂ -	3,87
Kreatin/Phosphokreatin m.fl.	(singlet) -CH ₂ -	3,93
γ-glutamyl- (GSH-DEE)	(triplet) -C ^a H-	3,99
Laktat	(kvartet) -C ^a H-	4,10 - 4,20
Ethyl- (GSH-DEE)	(kvartet) -CH ₂ -	4,14 - 4,28
Cysteinyl- (GSH)	(triplet) -C ^a H-	4,50
Fumarat	(singlet)	6,50 - 6,52
1,2,4-benzentricarboxylat (reference)	aromatiske signaler	7.45 - 7.90

Tabellen viser de normalt observerede signalers kemiske shift, samt kemiske shift fra adderet forbindelser. Flere af de opgivne kemiske shift værdier er fundet ved individuelle NMR eksperimenter med og uden cellematrix. Flere af disse signaler er desuden tilordnet i litteraturen (henvisninger tidligere i teksten). På baggrund af en software begrænsning er der i visse tilfælde opgivet et interval hvor i signalet normalt observeres. Hvor det er muligt er værdien for centersignalet opgivet. Da flere af forbindelserne har signaler der overlapper andre signaler, er der af hensyn til overskueligheden kun medtaget kemiske shift værdier for det eller de markante (observerbare) signaler fra den specifikke forbindelse. Som omtalt tidligere er signalerne tilordnet i forhold til signalerne fra de cholinholdige forbindelser (3,20 ppm) og laktat (1,33 ppm).



Opsamlet over 9,8 min. $\Delta T = 59\frac{1}{2}$ min.

Figur 3.51 viser et spektrum af 0,5 M ethylacrylat i PBS/D_2O ved pH 7,82. Fordelingen af de kemiske shift for ethylacrylat er 5,97 ppm - 6,44 ppm (vinylprotonerne), 4,25 ppm (ethyl gruppen methylen protoner) og methyl protonerne fra ethyl gruppen ved 1,29 ppm.



Tilsættes ethylacrylat til cellematrixen (figur 3.50) opnås et spektrum som i figur 3.52. Signalerne fra ethylacrylat observeres i spektret ved 6,41 ppm, 6,14 ppm og 5,99 ppm. Bemærk at signalerne for methyl og methylen protonerne fra ethylacrylats ethylgruppe, har shift tilsvarende protonerne fra glutathion analogens ethyl gruppe (ca. 1,2 ppm og ca. 3,6 ppm), hvorfor intensiteten af disse signaler vil forøges ved tilsætning af GSH-DEE. Sammenlignes spektret i figur 3.52 med figur 3.50, observeres et nyt positivt signal (vist med pil) ved 2,68 ppm (figur 3.53 og figur 3.54) og flere nye signaler ved 5,96 ppm - 6,4 ppm.



Figur 3.52. 3 mM ethylacrylat tilsat celler fra forsøg i figur 3.50. Cellematrixen har på dette tidspunkt været deutereret i ca. 1½ time. Opsamlet over 9,8 min.



Efter opsamlingen af ovenstående spektrum var tilendebragt, blev der tilsat 5 mM Dy(ATP)⁻¹ til cellematrixen. Resultatet af en ny data opsamling (efter yderligere 29 min) ses nedenfor i figur 3.54. Nye negative signaler ved 3,1 ppm og 2,0 ppm kan nu iagttages (hvilket ses tydeligere i figur 3.55) og signalet ved 2,92 ppm syntes markant at ændre karakter. Bemærk at det positive signal ved ca. 2,7 ppm stadig observeres. Desuden syntes det negative signal ved 2,16 ppm at være blevet mere markeret i forhold til de tidligere spektre. Dette signal tilordnes normalt γ -glutamyl C^βH protonerne i GSH (tabel 3G). Bemærk at signalet fra kreatin (3,05 ppm) nu er forsvundet. Det positive signal ved ca. 1,2 ppm der tidligere er tilordnet som GSH analogens ethyl gruppe syntes ikke at havde ændret intensitet (sammenlignet med intensiteten af cholin signalet (3,20 ppm)). Signalerne fra ethylacrylats vinylgruppe syntes derimod at være næsten forsvundet (figur 3.54).



Figur 3.54. Cellematrixen fra ovenstående forsøg er tilsat 5 mM Dy(ATP)⁻¹. ΔT = 159 min.



En sammenligning mellem figur 3.53 og figur 3.55, viser at det positive signal ved ca. 2,7 ppm øges i intensitet (sammenlignet med cholin signalet ved

3,20 ppm). Signalet tilordnes som α -protonen i GSH-konjugat nr. 2 (ikke deutereret) og α -protonen i GSH-konjugat i nr. 2a (deutereret form), ca. 2,6 - 2,7 ppm (tabel 3H). Illustrationen nedenfor viser de mulige GSH-konjugater.

Nedenfor er de observerede shift for ethylacrylat og de estimeret kemiske shift for de mulige deutererede GSH konjugater sammenfattet (tabel 3H).

Der observeres i figur 3.55 en tydelig deformation af det tidligere observerede signal ved 2,90 ppm (cysteinyl protonerne fra GSH) og et nyt negativt signal ved 2,0 ppm. Disse signaler er ikke tidligere observeret i spektrene, hvilket må betyde at disse signaler skyldes ethylacrylat inkuberingen af cellerne.

De resterende signaler fra β -protonerne i konjugat nr. 2 og nr. 2a, vil være placeret omkring 2,9 ppm. Signalerne fra β -protonerne i GSH-konjugat nr. 2 og nr. 2a vil observeres som henholdsvis en positiv triplet og en negativ dublet, hvorfor disse signaler vil kunne forventes at interfere og dermed kunne forklare hvorfor der observeres en deformation af signalet ved 2,9 ppm.

Signalet ved 2,0 ppm tilordnes som β -protonerne i konjugat nr. 1 og nr. 1a, der begge vil resulterer i negative dubletter ved ca. 2,0 ppm. Signalerne fra α protonerne (positiv og negativ) vil være placeret omkring 3,6 ppm, hvor der allerede er signaler fra ethyl gruppens methylen gruppe. Signalerne fra ethyl gruppen i alle konjugater vil være placeret sammesteds som ethanols signaler.



Bemærk at kreatin signalet (3,05 ppm), efter tilsætning af relaksationsreagens og yderligere 29 minutter er forsvundet (figur 3.55), hvilket kan skyldes en deformation af signalet på grund af nydannet konjugationsprodukter.

3.9.3.1 Diskussion: Ethylacrylat.

Betragtes spektret i figur 3.54, er det tydeligt at GSH-DEE er blevet omdannet til GSH, idet produkterne fra den cellulære carboxyl esterase [EC 3.1.1.1] aktivitet er til stede i spektret (ethanol - 1,18 ppm og 3,65 ppm og GSH - 3,74 ppm, 2,95 ppm, 2,50 ppm og 2,16 ppm). Den efterfølgende tilsætning af DAONL har tydeligvis forøget mængden af GSH i cellerne. Bemærk at intensiteten og dermed også mængden af laktat syntes at være forholdsvis beskeden i forhold til de intensiteter der ofte iagttages i flere af spektrene. På trods af at signalet fra GSH diethylesterens methyl gruppe (1,26 ppm) vil forstyrre laktat signalet (1,33 ppm), må dette resultat betragtes som værende et udtryk for at cellematrixen har optimale betingelser i NMR røret. Især tilstedeværelse af flere "naturlige" signaler fra cellens metabolitter i spektret understøtter dette.

GSH-DEE	-CH ₃ ^{β} (1,26 ppm) triplet, -CH ₂ ^{α} (4,22 ppm) kvartet, GSH (2,16 ppm; 2,50 ppm; 2,95 ppm; multipletter) og GSH glycinyl (3,74 ppm; singlet)
Ethanol	CH_3^{β} - (1,18 ppm) triplet, - CH_2^{α} - (3,65 ppm) dublet
Ethylacrylat	CH_3^{β} - (1,29 ppm) triplet, - CH_2^{α} - (4,25 ppm) multiplet, vinyl protoner (5,97 ppm - 6,44 ppm) multiplet,
CH₃ ^β -CH [∝] -(SG)C(O)OR** GSH konjugat nr. 1	CH_{3}^{β} - (1,0+0,7+0,3 ppm = 2,0 ppm) negativ dublet, -CH ^{α} - (1,5+1,2+0,9 ppm = 3,6 ppm) negativ kvartet.
CH₂ ^β D-CH [∝] -(SG)C(O)OR** GSH konjugat nr. 1a	$CH_2^{\beta}D$ - (1,0+0,7+0,3 ppm = 2,0 ppm) negativ dublet, -CH ^{α} - (1,5+1,2+0,9 ppm = 3,6 ppm) positiv triplet.
GS-CH ₂ ^β -CH ₂ ^α -C(O)OR** GSH konjugat nr. 2	$-CH_2^{\beta}$ - (1,4+1,2+0,3 ppm = 2,9 ppm) positiv triplet, - CH_2^{α} - (1,4+0,9+0,4 ppm = 2,7 ppm) positiv triplet.
GS-CH₂ ^β -CH [∝] D-C(O)OR** GSH konjugat nr. 2a	$-CH_2^{\beta}$ - (1,4+0,3+1,2 ppm = 2,9 ppm) negativ dublet, -CH ^{α} D- (1,4+0,4+0,9 ppm = 2,7 ppm) positiv triplet.

Tabel 3H. Tabellen viser tilordninger for ethylacrylat, ethanol og GSH-ethylacrylat konjugater. Værdierne for konjugaterne er estimerede værdier (**R= $-CH_2CH_3$).

Tidligere NMR forsøg, hvor erythrocytter har været inkuberet med ethylacrylat (Skibsted, 1988), har vist, at signalerne fra vinylgruppen forsvinder indenfor 120 min, hvilket indikerer at ethylacrylat enten er hydrolyseret eller må være konjugeret til GSH.

I de her præsenterede forsøg vil disse forhold også forventes, men der vil næppe kunne observeres hydrolyseprodukter i den første del af forsøget da estere normalt hydrolyseres langsomt ved neutralt pH. En forholdsvis tidlig omdannelse af ethylacrylat til acrylat (5,9 ppm - 6,4 ppm) og ethanol (1,2 ppm og 3,6 ppm) som følge af carboxyl esterase aktivitet i cellerne er mere sandsynlig. De resterende signaler fra disse esterase produkter vil være placeret hvor der allerede er signaler i spektret og derved forøge intensiteten af disse. Der må ligeledes forventes konjugations produkter dannet ved reaktion mellem acrylat og GSH, men disse signaler vil ligeledes være placeret sammensteds som signalerne fra ethylacrylat og GSH konjugations produkterne.

Det må udfra de præsenterede spektre og data konkluderes, at der trods usikkerheder, er dannet mindst to glutathion-ethylacrylat konjugater i dette forsøg og at andre konjugater (acrylat-GSH) p.g.a carboxyl esterase aktiviteten i cellerne, højst sandsynligvis også er til stede.

4. Samlet diskussion og konklusion.

Flere grupper (Hertz, *et al.*, 1992; Hertz & Peng, 1992; Juurlink, *et al.*, 1992; Juurlink & Hertz, 1993) har fundet at astrocytters energiniveau nedsættes hvis tilgangen af ilt mindskes f.eks. under hypoxi, men cellerne er trods nedgang i energiniveau vist at kunne overleve hypoxi og substrat underskud i op til flere timer (Juurlink, *et al.*, 1992; Sochocka, *et al.*, 1994).

Kendskabet til cellernes energiniveau før, under og efter *ex vivo* NMR forsøg er af absolut nødvendighed, hvis data skal anvendes kvalitativt. Ved at sammenholde data for LDH, ATP og phosphokreatin har Yager, *et al.*, 1994, vist, at den intracellulære mængde af LDH er konstant i astrocytter indtil niveauet af ATP og phosphokreatin er ca. 1/4 af det normale niveau. Samme gruppe fandt at ATP:phosphokreatin forholdet forblev stort set uændret (1:1) igennem en længere periode (12 timer) under iskæmiske betingelser. Forudsat at der er optimale betingelser tilstede under forsøget må cellerne i dette tilfælde formodes at være metabolisk stabile i en periode over 12 timer.

I dette projekt har det ikke været muligt via *ex vivo* ³¹P-NMR at undersøge om cellerne har været metabolisk stabile under NMR forsøgene. Cellernes energiniveau har derfor i visse tilfælde været forsøgt bestemt ved NMR spektroskopi på et PCA ekstrakt af cellematrixen. Resultater fra PCA ekstrakter har dog den ulempe at disse afspejler energi status efter eksperimentet og ikke udviklingen i cellernes energiniveau under forsøget. Anskaffelsen af et nyt 600 MHz spektrometer forbedre mulighederne væsentligt hvad disse forsøg angår.

Cellevitaliteten i NMR røret efter NMR forsøg blev bestemt biokemisk ved at sammenholde data for succinat dehydrogenase aktivitet, glyceraldehyd 3phosphat dehydrogenase aktivitet, den ekstracellulære laktat koncentration samt forøgelsen af den ekstracellulære laktat dehydrogenase aktivitet. Disse data indikerer at der stadig er levedygtige celler i NMR røret (cellematrixen) efter 3 timers NMR forsøg. Disse data viste dog at cellevitaliteten ikke er optimal, hvilket illustreres af den signifikante stigning i den ekstracellullære laktat koncentration. Sammenholdt med data fra kontrol må det konkluderes at denne stigning ikke kan tilskrives den naturlige eksport af laktat, men må være et resultat forårsaget af tilstedeværelsen af deuteriumoxid i kombination med et underskud af ilt i NMR røret^a.

Affaldsprodukter fra den cellulære metabolisme, heriblandt laktat, kan forsure det eksterne miljø og derved skade cellerne, som vist af f.eks. Staub, *et al.*, 1993 og Pirttilä & Kauppinen, 1994. Ifølge Nedergaard & Goldman, 1993, vil

^a I alle prøver er anvendt samme mængde celler.

en øjeblikkelig ekstracellulær forøgelse af laktat mængden med 20 mM (ved pH 7,2 ekstracellulært), indenfor ca. 100 sekunder sænke den intracellulære pH fra ca. 6,97 til pH 6,82. Ved pH 6,8 er laktat på sin membran impermeable anioniske form og vil derfor, i stedet for via passiv transport, formodentligt transporteres ud af cellen via et membran transportsystem, som foreslået af Pirttilä & Kauppinen, 1994. Data viser at pH efter få sekunder igen vil stige, således at pH indenfor 5 minutter er stabiliseret ved pH 7,0 (Nedergaard & Goldman, 1993). Dette indikerer at cellerne eksporterer laktat til det ekstracellulære miljø for at opretholde et fysiologisk pH. Da pH sjældent var lavere end pH 6,8ª ved NMR forsøgenes afslutning, må det formodes at cellerne har kunne kontrollere pH i forsøgsperioden (oftes < 3 timer).

Flere grupper har, ved at benytte perfusionsteknikken, vist at kunne forbedre vitaliteten mærkbart således at der har kunne foretages forsøg udover 3 timer^b. Det skal nævnes at der i skrivende stund er påbegyndt NMR forsøg på et nyanskaffet 600 MHz spektrometer, hvor medieperfusion anvendes. Medieperfusion af cellematrixen på 250 MHz modellen måtte desværre opgives p.g.a apparatmæssige problemer.

Til medieperfusions forsøgene på 600 MHz spektrometeret anvendes samme form for celle/carriermatrix som i projektet. Denne modelform har en ulempe i forhold til den ofte anvendte form indstøbning af celler i agarose, nemlig at mængden af celler i detektor området^o er betydeligt lavere. Anvendelse af carrierer ved perfusionsforsøg giver bedre mulighed for perfusion da carriererne er hule. Desuden udsættes celler ikke for den mekaniske påvirkning der er nødvendig ved indstøbning i agarose. Indstøbing af celler i low melting agarose har været forsøgt i dette projekt, men gliaceller har en tendens til at sammenklister, hvilket afstedkommer propper i tilførelsesslangerne. Det kan desuden diskuteres hvorvidt cellerne er intakte efter denne behandling. Dette vil sandsynligvis kunne belyses ved lysmikroskopi eller elektronmikroskopi.

Udvalgte NMR resultater som f.eks. resultatet fra pyruvat, fumarat eller acetaldehyd indikerer at der foregår en metabolisk aktivitet i cellematrixen. Tilsætning af relaksations reagenset Dy(ATP)⁻¹ verificerer disse resultater ved at eliminere bidrag fra ekstracellulære komponenter i spektret. Tidsforløbet for flere af disse eksperimenter er cirka 300 min, altså betydeligt længere end de 180 min dette model systems eksperiment periode er fastsat til. Set i lyset af Dy(ATP)⁻¹ reagensets effekt på relaksationstiden for de ekstracellulære

^a Her refereres til de præsenterede resultater.

^b Ikke astrocytter.

[°] Her menes recievercoil området i NMR proben.

komponenter, må det konkluderes at der i disse forsøg stadig er intakte celler tilbage efter 300 min forsøg. Det eksterne shift- og relaksationsreagens Dy(ATP)⁻¹ blev i projektet her påvist ikke kun at kunne eliminere bidrag fra ekstracellulære komponenter, men også at have en undertrykkende effekt på signalet fra det ekstracellulære vand. Undersøgelser af dette reagens egenskaber er endnu ikke tilendebragt, men udfra de resultater der er præsenteret i denne afhandling er der ingen tvivl om at dette dysprosium kompleks fungerer som forventet.

Den intracellulære omdannelse af GSH-DEE blev ligeledes vist ved brug af Dy(ATP)⁻¹ reagenset. Flere af disse forsøg hvor cellerne var preinkuberet med glutathion analogen GSH-DEE og xenobiotika (f.eks. N-ethylmaleimid) viste at modellen på længere sigt måske kan anvendes til toksikologiske undersøgelser. Problemet er igen, at der skal anvendes store koncentrationer af den pågældende forbindelse før en eventuel ændring i spektret. Men som omtalt ovenfor, så vil en forøgelse af feltstyrken sandsynligvis kunne forøge mængden af detaljer væsentligt.

Udfra de ovenstående betragtninger må det konkluderes at cellematrixen kan betragtes som værende biokemisk aktiv indenfor en periode på 3 timer. Modelsystemet vil sandsynligvis kunne anvendes ud over 3 timer, men i så fald skal fornævnte medieperfusion af cellematrixen fungere tilfredsstillende.

I forbindelse med nylige proton NMR eksperimenter udført på 600 MHz spektrometeret har der været anvendt en anden solvent eliminerende teknik (WATERGATE (Piotto, *et al.*, 1992)) end den i dette projekt anvendte teknik. Disse forsøg har med tydelighed vist at der, ved en forøgelse feltstyrken fra 250 MHz til 600 MHZ, kan indhentes betydelig flere informationer i spektrene. Disse forsøg blev desuden udført med færre celler i NMR røret og med en deuteriumoxid koncentration på cirka 20%.

Et system som det der er udviklet her vil kunne anvendes til at undersøge forskellige forbindelsers omdannelse i cellerne før egentlige laboratorieforsøg påbegyndes. Blandt andet kan modelsystemet benyttes ved undersøgelser af hvordan toksiske forbindelser detoksificeres ved hypoxiske/iskæmiske betingelser. Dette kræver dog en nøjere kontrol med ilt tensionen i cellematrixen. Det må konkluderes at der stadig mangler kontrol med ilt tensionen og medie perfusion i denne model. Energiniveauet i cellerne og det ekstracellulære pH vil kunne kontrolleres bedre når disse parametre er opfyldt.

5. Referencer

Aebi, H. & Suter, H. Protective function of reduced glutathione (GSH) against the effect of prooxidative substances and of irradiation in red cell. *In: Glutathione, Proceedings of the 16th Conference of the German Society of Biological Chemistry, Turbingen.* (Flohé, L., Benohr, H., Sies, H., Waller, H., & Wendel, A. eds). (1974), 192-199. Stuttgart. Thieme.

Alsaadi, B.M., Rossotti, F.J.C. & Williams, R.J.P. Structure of lanthanide (III) mono- and bis-dipicolinates in solution. *J.Chem.Soc., Chem Commun.* (1977), 527-529.

Anderson, M.E., Powrie, F., Puri, R.N. & Meister, A. Glutathione monoethylester: Preparation, uptake by tissue and conversion to glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* (1985), **239**, 538-548.

Antonini, A., Leenders, K.L., Meier, D., Oertel, W.H., Boesiger, P. & Anliker, M. T2 Relaxation Time in Patients with Parkinson's Disease. *Neurology* (1993), **43**, 697-700.

Aragon, C.M.G., Spivack, K. & Amit, Z. Blockade of ethanol induced conditioned taste aversion by 3-amino-1,2,4-triazole: Evidence for catalase-mediated synthesis in rat brain. *Life Sci.* (1985), **37**, 2077-2084.

Auestad, N., Korsak, R.A., Marrow, J.W. & Edmond, J. Fatty acid oxidation and ketogenesis by astrocytes in primary culture. *J. Neurochem.* (1991), **56**, 1376-1386.

Barry, C.D., Dobson, C.M., Williams, R.J.P. & Xavier, A.V. Ethylenediaminetetra-aceto-lanthanate(III), -praesodimate(III), -europate(III), and -gadolinate(III). Complexes as nuclear magnetic resonance probes of the molecular conformations of adenosine 5'-monophosphate and cytidine 5'monophosphate in solution. *J. Chem. Soc.*, *Dalton Trans.* (1974a), 1762-1764.

Barry, C.D., Glasel, J.A., Williams, R.J.P. & Xavier, A.V. Quantitative determination of conformations of flexible molecules in solution using lanthanide ions as nuclear resonance probes: Application to adenosine-5'-monophosphat. *J. Mol. Biol.* (1974b), **84**, 471-479.

Bauer, H.C., Tontsch, U., Amberger, A. & Bauer, H. γ -glutamyl transpeptidase (GCTP) and Na⁺/K⁺-ATPase activity in different subpopulations of cloned cerebral endothelial cells: Responses to glial stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1992), **18**, 358-363.

Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A. & Diemer, N.H. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* (1984), **43**, 1369-1374.

Benz, F.W., Freeney, J. & Roberts, G.C.K. Fourier transform proton NMR spectroscopy in aqueous solution. *J. Magn. Res.* (1972), **8**, 114-121.

Bourne, R.M. A device for aeration and mixing of cell and organelle suspension during nuclear magnetic resonance studies. *Anal. Biochem.* (1989), **182**, 151-156.

Brindle, K.M., Brown, F.F., Campbell, I.D., Grathwohl, C. & Kuchel, P.W. Application of spin-echo nuclear magnetic resonance to whole-cell systems. Membrane transport. *Biochem. J.* (1979), **180**, 37-44.

Brown, F.F., Campell, I.D., Kuchel, P.W. & Rabenstein, D.C. Human erythrocyte metabolism studies by ¹H spin echo NMR. *FEBS Lett.* (1977), **82**, 12-16.

Bryant, R.G. & Eads, T.M. Solvent peak supression in high resolution NMR. *J. Magn. Res.* (1985), **64**, 312-315.

Cabreravaldivia, F., Jimenezjimenez, F.J., Molina, J.A., Fernandezcalle, P., Vazquez, A., Canizaresliebana, F., Larumbelobalde, S., Ayusoperalta, L., Rabasa, M. & Codoceo, R. Peripheral iron metabolism in patients with Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* (1994), **125**, 82-86.

Campbell, I.D., Dobson, C.M., Jeminet, G. & Williams, R.J.P. Pulsed methods for the observation and assignments of exchangeable hydrogens: Applications to bacitracin. *FEBS lett* (1974), **49**, 115-119.

Campell-Burke, S.L. & Shulman, R.G. High resolution NMR studies of *Saccharomyces cervisiae*. *Annu. Rev. Microbiol.* (1987), **41**, 595-616.

Choi, D.W. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci. Lett.* (1985), **58**, 293-297.

Clarke, D.D., Lajtha, A.L., & Maker, H.S. Intermediary metabolism. *In: Basic Neurochemistry*. (Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., & Molinoff, P.B. eds). (1989), Kap 28, 541-564. Raven Press, New York.

Cohen, G., Sinet, P.M. & Heikkila, R. Ethanol oxidation by rat brain *in vivo*. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* (1980), **4**, 366-370.

Cohen, J.S., Lyon, R.C. & Daly, P.F. Monitor intracellular metabolism by nuclear magnetic resonance. *Methods Enzymol.* (1989), **177**, 435-452.

Conti, F. & Minelli, A. Glutamate immunoreactivity in rat cerebral cortex is reversibly abolished by 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON), an inhibitor of phosphate-activated glutaminase. *J. Histochem. Cytochem.* (1994), **42**, 717-726.

Cookson, M.R., Mcclean, R., Williams, S.P., Davenportjones, J., Egan, C., Ohare, S., Atterwill, C.K. & Pentreath, V.W. Use of astrocytes for *in vitro* neurotoxicity testing. *Toxicol. In Vitro* (1994), **8**, 817-819.

Cooper, A.J.L. *In: Glutamine and glutamate in mammals.* (Kvamme, E. eds). (1988), Kap 1, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Cooper, A.J.L., Pulsinelli, W.A. & Duffy, T.E. Glutathione and ascorbate during ischemia and postischemic reperfusion in rat brain. *J. Neurochem.* (1980), **35**, 1242-1245.

Daly, P.F. & Cohen, J.S. Magnetic resonance spectroscopy of tumors and potential *in vivo* clinical applications: A review. *Cancer Res.* (1989), **49**, 770-779.

Damgaard, I., Andersen, C.F., Jensen, B., & Schousboe, A. Vejledning til præparation af astrocytter og neuroner. (1995), Farmaceutisk h¢jskole, inst. for biologi.

Dekant, W. & Vamvakas, S. Glutathione-Dependent Bioactivation of Xenobiotics. *Xenobiotica* (1993), **23**, 873-887.

Drejer, J., Larsson, O.M. & Schousboe, A. Characterization of uptake and release processes for D- og L-aspartate in primary cultures of astrocytes and cerebellar granule cells. *Neurochem. Res.* (1983a), **8**, 231-243.

Drejer, J., Meier, E. & Schousboe, A. Novel neuron-related regulatory mechanism for astrocytic glutamat and GABA high affinity uptake. *Neurosci. Lett.* (1983b), **37**, 301-306.

Eads, C.D., Mulgueen, P., Horrocks Jr, W.W. & Villafranca, J.J. Characterization of the ATP complexes with lanthanide (III) ions. *J. Biol. Chem.* (1984), **259**, 9379-9383.

Elgavish, G.A. & Reuben, J. Lanthanide effects on the proton and carbon-13 relaxation rates of sarcosine. Evidence for isostructural amino acid complexes along the lanthanide series. *J. Am. Chem. Soc.* (1978), **100**, 3617-3619.

Eriksson, C.J.P., Sippel, H.W. The distribution and metabolism of acetaldehyde in rats during ethanol oxidation. The distribution of acetaldehyde in liver, brain, blood and breath. *Biochem. Pharmacol.* (1977), **26**, 241-247.

Eriksson, C.J.P., Sippel, H.W. & Forsander, O.A. Determination of acetaldehyde in biological samples by head-space gas chromatography. *Anal. Biochem.* (1977), **80**, 116-124.

Erwin, V.G. & Deitrich, R.A. Brain aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* (1966), **241**, 3533-3539.

Fabry, M.E. Proton nmr in cells and tissues. *In: NMR spectroscopy of cells and organisms*. (Gupta, R.K. **eds).** (1987), Kap 4, 69-97. Boca Raton, Florida, CTC Press, Inc.

Fabry, M.E., San George, R.C. Effect of magnetic susceptibility on nuclear magnetic resonance sifgnals arising from red cells: A warning. *Biochem*. (1983), **22**, 4119-4125.

Farrar, T.C. & Becker, E.D. *In: Pulse and fourier transform NMR*. (1971), 23-23. Academic Press, New York.

Foxall, D.L. & Cohen, J.S. NMR studies of perfused cells. *J. Magn. Res.* (1983), **52**, 346-349.

Foxall, D.L., Cohen, J.S. & Mitchell, J.B. Continuous perfusion of mammalian cells embedded in agarase gel treads. *Exp. Cell Res.* (1984), **154**, 521-529.

Geraldes, C.F.G.C. & Ascenso, J.R. Solvent effects on the conformation of nucleotides. Part 2. Nuclear magnetic shift and relaxation effects induced by lanthanide ions on adenosine 5'-monophosphate in water-dimethyl sulfoxide. *J. Chem. Soc. Dalton. Trans.* (1984), 267-272.

Ghandour, M.S., Langley, O.K. & Varga, V. Immunohistological localization of γ -glutamyl transpeptidase in cerebellum at light and electron microscope levels. *Neurosci. Lett.* (1980), **20**, 125-129.

Glick, D. *In:* Quantitative chemical techniques of histo- and cytochemistry. (1961). Interscience publishers, London.

Grattagliano, I., Wieland, P., Schranz, C. & Lauterburg, B.H. Effect of oral glutathione monoethyl ester and glutathione on circulating and hepatic sulfhydrils in the rat. *Pharmacol. Toxicol.* (1994), **75**, 343-347.

Griffith, O.W. & Meister, A. Glutathione: Interorgan translocation, turnover and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1979a), **76**, 5606-5610.

Griffith, O.W. & Meister, A. Translocation of intracellular glutathione to membrane-bound γ -glutamyl transpeptidase as a discrete step in the γ -glutamyl cycle: Glutathionuria after inhibition of transpeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1979b), **76**, 268-272.

Gruetter, R., Novotny, E.J., Boulware, S.D., Mason, G.F., Rothman, D.L., Shulman, G.I., Prichard, J.W. & Shulman, R.G. Localized ¹³C-NMR spectroscopy in the human brain of amino acid labeling from D-[1-¹³C]glucose. *J. Neurochem.* (1994), **63**, 1377-1385.

Gupta, R.K. & Gupta, P. Direct observation of resolved resonances from intraand extracellular sodium-23 ions in NMR studies of intact cells and tissues using dysprosium(III)tripolyphosphate as paramagnetic shift reagent. *J. Magn. Res.* (1982), **47**, 344-350.

Hahn, E.L. Spin echoes. Phys. Rev. (1950), 80, 580-594.

Hanigan, M.H. & Pitot, H.C. γ -glutamyl transpeptidase; its role in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* (1985), **6**, 165-172.

Hanigan, M.H. & Ricketts, W.A. Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express γ -glutamyl transpeptidase. *Biochem.* (1993), **32**, 6302-6306.

Hansen, P.H. Isotope effects in nuclear shielding. Progress in NMR spectroscopy (1988), **20**, 207-255.

Heacock, C.S. & Sutherland, R.M. Enhanced synthesis of stress proteins caused by hypoxia and relation to altered cell growth and metabolism. *Br. J. Cancer* (1990), **62**, 217-225.

Hertz, E. & Hertz, L. Polarographic measurement of oxygen uptake by astrocytes in primary cultures using the tissue-culture flask as the respirometer chamber. *In vitro* (1979), **15**, 429-435.

Hertz, L. & Peng, L. Energy Metabolism at the Cellular Level of the CNS. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* (1992), **70**, 145-157.

Hertz, L., Code, W.E. & Sykova, E. Ions, Water, and Energy in Brain Cells - A Synopsis of Interrelations. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* (1992), **70**, 100-106.

Hertz, L., Juurlink, B.H.J., Hertz, E., Fosmark, H., & Schousboe, A. Preparation of primary cultures of mouse (rat) cerebellar astrocytes. *In:* A dissection and *tissue culture manual of the nervous system*. (Shahar, A., de Vallis, J., Vernadakis, A., & Haber, B. eds). (1989), Kap 46, 203-206. New York, Alan R. Liss, Inc.

Horrocks, L.A. & Dorman, R.V. Prevention by CDPcholine and CDPethanolamine of lipidchanges during brain ischemia. *In: Novel biochemical pharmacological and clinic aspects of cytidinediphosphocholine*. (Zappia, V., Kennedy, E.P., Nilsson, B.I., & Galletti, P. eds). (1985), 205-215. Elsevier, New York.

Inoue, M. & Horiuchi, S. Affinity labeling of rat-kidney γ -glutamyl transpeptidase. *Eur. J. Biochem.* (1977), **73**, 335-342.

Inoue, Y., Tran, L.T., Kamakura, M., Izawa, S., Miki, T., Tsujimoto, Y. & Kimura, A. Oxidative stress respons in yeast: Glutathione peroxidase of *Hansenula mrakii* is bound to membrane of both mitochandria and cytoplasm. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1245**, 325-330.

Jacobsen, L. & Cohen, J.S. Improved technique for investigation of cell metabolism by ³¹P-NMR spectroscopy. *Biosci. Rep.* (1981), **1**, 141-150.

Janzer, R.C. & Raff, M.C. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* (1987), **325**, 253-257.

Jenner, P. Altered Mitochondrial Function, Iron Metabolism and Glutathione Levels in Parkinson's Disease. *Acta Neurol. Scand.* (1993), **87**, 6-13.

Juurlink, B.H.J. & Hertz, L. Ischemia-Induced Death of Astrocytes and Neurons in Primary Culture - Pitfalls in Quantifying Neuronal Cell Death. *Brain Res. Dev. Brain Res.* (1993), **71**, 239-246.

Juurlink, B.H.J., Hertz, L. & Yager, J.Y. Astrocyte maturation and susceptility to ishaemia or substrate deprivation. *NeuroReport* (1992), **3**, 1135-1137.

Kannan, R., Kuhlenkamp, J.F., Jeandidier, E., Trinh, H., Ookhtens, M. & Kaplowitz, N. Evidence for carrier-mediated transport of glutathione across the blood-brain barrier in the rat. *J. Clin. Invest.* (1990), **85**, 2009-2013.

Kannan, R., Kuhlenkamp, J.F., Ookhtens, M. & Kaplowitz, N. Transport of glutathione at blood-brain barrier of the rat: Inhibition by glutathione analogs and age-dependence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1992), **263**, 964-970.

Kera, Y., Aoyama, H., Matsumura, H., Hasegawa, A., Nagasaki, H. & Yamada, R.H. Presence of free D-glutamate and D-aspartate in rat tissues. *Bba-Gen. Subjects.* (1995), **1243**, 282-286.

Koob, M. & Dekant, W. Bioactivation of xenobiotics by formation of toxic glutathione conjugates. *Chem. Biol. Interact.* (1991), **77**, 107-136.

Kramer, H.W. & Baily, J.E. Mass transfer characterization of an airlift probe for oxygenating and mixing cell suspensions in an NMR spectometer. *Biotech. Bioeng.* (1991), **37**, 205-209.

Krebs, H.A., Williamson, D.H., Bates, M.W., Page, M.A. & Hawkins, R.A. The role of ketone bodies in caloric homeostasis. *Adv. Enzyme Regul.* (1971), **9**, 387-409.

Kuhmonen, J., Sivenius, J., Riekkinen, P.J. & Kauppinen, R.A. Decrease in brain choline-containing compounds following a short period of global ischemia in gerbils as detected by ¹H-NMR spectroscopy *in vivo*. *Nmr. Biomed.* (1994), **7**, 231-236.

Kvamme, E., Schousboe, A., Hertz, L., Torgner, I.A. & Svenneby, G. Developmental change of endogenous glutamate and γ -glutamyl transferase in cultured cerebral cortical interneurons and cerebellar granule cells and in mouse cerebral cortex and cerebellum *in vivo*. *Neurochem. Res.* (1985), **10**, 993-1008.

Levy, E.J., Anderson, M.E. & Meister, A. Transport of Glutathione Diethyl Ester into Human Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993), **90**, 9171-9175.

Lipton, S.A. & Rosenberg, P.A. Excitatory Amino Acids as a Final Common Pathway for Neurologic Disorders. *N. Engl. J. Med.* (1994), **330**, 613-622.

Lopachin, R.M. & Aschner, M. Glial-neuronal interactions: Relevance to neurotoxic mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1993), **118**, 141-158.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* (1951), **193**, 265-275.

Mallozzi, C, Di Stasi, A.M.M., Minetti, M. free radical induce reversible membrane-cytoplasm translocation of glyceraldehyde-3-phosphate in human erythrocytes. *Arch. Biochem.Biophys.* (1995), **321**, 345-352.

Mason, G.F., Gruetter, R., Rothman, D.L., Behar, K.L., Shulman, R.G. & Novotny, E.J. Simultaneous determination of the rates of the TCA cycle, glucose utilization, α -ketoglutarate glutamate exchange, and glutamine synthesis in human brain by NMR. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (1995), **15**, 12-25.

Matsumoto, K., Yamada, K., Kohmura, E., Kinoshita, A. & Hayakawa, T. Role of pyruvate in ischaemia-like conditions on cultured neurons. *Neurol. Res.* (1994), **16**, 460-464.

Maxwell, K., Berliner, J. & Cancilla, P.A. Induction of γ -glutamyl transpeptidase in cultured cerebral endothelial cells by a product released by astrocytes. *Brain Res.* (1987), **410**, 309-314.

Meister, A. Glutathione and the γ -glutamyl cycle. *In:* Glutathione: Metabolism and Function. (Arias, I.M. & Jakoby, W.B. eds). (1976), Kap 3, 35-43. New York, Raven Press.

Meister, A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res.* (1994), **54**, S1969-S1975.

Minn, A. & Besagni, D. Uptake of L-glutamine into synaptosomes. Is the gammaglutamyl cycle involved. *Life Sci.* (1983), **33**, 225-232.

Mitsumori, F. & Nakano, A. Proton magnetic resonance imaging and phosphorus-³¹NMR studies on the rat brain intoxicated with methyl mercury. *Environ. Res.* (1993), **62**, 81-88.

Momma, S., Aoyagi, M., Rapoport, S.I. & Smith, Q.R. Phenylalanine transport across the blood-brain barrier as studied with the situ brain perfusion technique. *J. Neurochem.* (1987), **48**, 1291-1300.

Morill, T.C. An introduction to lanthanide shift reagents. *In:* Lanthanide shift reagents in stereochemical analysis. (Morrill, T.C. eds). (1986), Kap 1, 1-17. VCH Publishers, Inc. New York.

Müller, T.B., Sonnewald, U., Westergaard, N., Schousboe, A., Petersen, S.B. & Unsgård, G. C-13 NMR spectroscopy study of cortical nerve cell cultures exposed to hypoxia. *J. Neurosci. Res.* (1994), **38**, 319-326.

Nedergaard, M. & Goldman, S.A. Carrier-mediated transport of lactic acid in cultured neurons and astrocytes. *Am. J Physiol.* (1993), **265**, R282-R289.

Nicholson, J.K., Buckingham, M.J. & Sadler, P.J. High resolution ¹H-nmr studies of vertebret blood and plasma. *Biochem. J.* (1983), **211**, 605-615.

Noguchi, K., Higuchi, S. & Matsui, H. Effects of glutathione isopropyl ester on glutathione concentration in ishemic rat brain. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* (1989), **64**, 165-168.

Norenberg, M.D. & Martinez-Hernandez, A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* (1979), **161**, 303-310.

Ohashi, M., Amano, S., Hazama, F. & Handa, J. Hypoxic Effects on Glutamate Uptake in Cultured Glial Cells. *Acta Pathol. Jpn.* (1993), **43**, 154-159.

Olson, J.E. & Holtzman, D. Astrocyte oxidative energy metabolism. *In: The biochemical pathology of astrocytes*. (1988), 287-298. Alan R. Liss.

Orlowski, M. & Karkowsky, A. Glutathione metabolism and some possible functions of glutathione in the nervous system. *Int. Rev. Neurobiol.* (1976), **19**, 75-121.

Patt, S.L. & Sykes, B.D. Water eliminatated Fourier transform NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.* (1972), **56**, 3182-3184.

Pellifique, F., Butler, J.D., Spielberg, S.P., Hollenberg, M.D., Goodman, S.I. & Schulman, J.D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1995), **73**, 997-997.

Petterson, H. & Tottmar, O. Aldehyde dehydrogenase in rat brain. Subcellular distribution and properties. *J. Neurochem.* (1982), **38**, 477-487.

Philbert, M.A., Beiswanger, Waters, D.K., Reuhl, K.R. & Lowndes, H.E. Cellular and regional distribution of reduced glutathione in the nervous system of the rat: Histochemical localization by mercury orange and o-phthaldialdehydeinduced histoflourescence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1991), **107**, 215-227.

Piotto, M., Saudek, V. & Sklenar, V. Gradient-tailored excitation for singlequantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* (1992), **2**, 661-665.

Pirttilä, T.R.M. & Kauppinen, R.A. Lactate efflux and intracellular pH during severe hypoxia in rat cerebral cortex *in vitro* studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Neurosci. Lett.* (1994), **178**, 111-114.

Pouchert, C.J. The Aldrich library of NMR spektra. (1983) 2, Milwaukee, Wisc., USA.

Puri, R.N. & Meister, A. Transport of glutathione, as γ -glutamylcysteinylglycyl ester, into liver and kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983), **80**, 5258-5260.

Quintanilla, M.E. & Tampier, L. Ethanol uptake: Effect on liver and brain mitochondrial function and acetaldehyd oxidation. *Alcohol* (1992), **9**, 375-380.

Rabenstein, D.L. Proton NMR spectroscopy of human blood plasma and red cells. *Anal. Chem.* (1988), **60**, 1380-1391.

Rabenstein, D.L., Fan, S. & Nakashima, T.T. Attenuation of the water resonance in fourier transform ¹H-NMR spectra of aqueous solutions by spin-spin relaxation. *J. Magn. Res.* (1985), **64**, 541-546.

Rakic, P. Neuron-glia relations during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A golgi and macacus rhesus. *J. Comp. Neurol.* (1971), **141**, 283-312.

Ramón y Cayal, S. Contribucion al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. *Trab. Lab. Invest. Biol.* (1913), **11**, 255-315.

Rao, V.L.R. & Murthy, C.R.K. Uptake and metabolism of glutamate and aspartate by astroglial and neuronal preparations of rat cerebellum. *Neurochem. Res.* (1993), **18**, 647-654.

Raps, S.P., Lai, J.C.K., Hertz, L. & Cooper, A.J.L. Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons. *Brain Res.* (1989), **493**, 398-401.

Ray, D.E., Abbot, N.J., Chan, M.W.K. & Romero, I.A. Increased oxidative metabolism and oxidative stress in m-dinitrobenzene neurotoxicity. *Biochem. Soc. Trans.* (1994), **22**, S407-S407.

Reiderer, P., Sofic, E., Rausch, W.D., Schmidt, B., Reynolds, G.P., Jellinger, K. & Youdim, M.B.H. Transition metals, ferritin, glutathione and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J. Neurochem.* (1989), **52**, 515-520.

Romero, I.A., Lister, T., Richards, H.K., Seville, M.P., Wylie, S.P. & Ray, D.E. Early metabolic changes during m-dinitrobenzene neurotoxicity and the possible role of oxidative stress. *Free Radical. Biol. Med.* (1995), **18**, 311-319.

Rosenberg, P. & Aizenmann, E. Hundred fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocytes-poor cultures of cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* (1989), **103**, 162-168.

Rothman, S.M. & Olney, J.W. Glutamate and pathophysiology of hypoxiaischemic brain damage. *Ann. Neurol.* (1986), **19**, 105-111.

Sagara, J., Miura, K. & Bannai, S. Maintenance of Neuronal Glutathione by Glial Cells. *J. Neurochem.* (1993), **61**, 1672-1676.

Sanders, J.K. & Hunter, B.K. Multiple-pulse experiments. *In: Modern NMR spectroscopy: A guide for chemists.* (Sanders, J.K. & Hunter, B.K. eds). (1993), Kap 3, 63-96. Oxford, Oxford University Press.

Sastre, J., Sweiry, J.H., Doolabh, K., Viña, J. & Mann, G.E. Significance of γ -glutamyltranspeptidase in exocrine pancreatic amino acid transport. *Biochim. Biophys. Acta* (1991), **1065**, 213-216.

Shapiro, R.A., Clark, V.M. & Curthoys, N.P. Inactivation of rat renal phosphatedependent glutaminase with 6-diazo-5-oxo-L-norleucin. Evidence for interaction at the glutamine binding site. *J. Biol. Chem.* (1979), **254**, 2835-2838.

Shimizu, T., Mims, W.B., Davis, J.L. & Peisach, J. Structures of the coordination of rare earth and transition metal nucleotide complexes by an electron spin echo method. *Biochim. Biophys. Acta.* (1983), **757**, 29-39.

Shine, H.D., Hertz, L., De Vallis, J. & Haber, B. A fluorimetric assay for γ -glutamyl transpeptidase: Demonstration of enzymatic activity in cultured cells of neuronal origin. *Neurochem. Res.* (1981), **6**, 453-463.

Shulman, R.G., Rothman, D.L. & Blamire, A.M. NMR studies of human brain function. *Trends. Biochem. Sci.* (1994), **19**, 522-526.

Simms, N.R. L-glutamate and GABA release from brain subregions following cerebral ischemia. *J. Neurochem.* (1991), **57**, S151-S151.

Singh, S.P., Ehmann, S. & Snyder, A.K. Ethanol and glucose-deprivation neurotoxicity in cortical cell cultures. *Metabolism* (1994), **43**, 1108-1113.

Sippel, H.W. The acetaldehyde content in rat brain during ethanol metabolism. *J.Neurochem.* (1974), **23**, 451-452.

Skibsted, U. & Hansen, P.E. ¹H-NMR spin-echo spectroscopy of human erythrocytes. Transformation of exogenous compounds. *NMR Biomed.* (1990), **6**, 248-258.

Skibsted, U. ¹H-NMR spektroskopi på humane erythrocytter; xenobiotiske reagenser som probe i cellefysiologiske studier. (1988), University of Roskilde. Thesis.

Skullerud, K., Marstein, S., Schrader, H., Brundelet, P.J. & Jellum, E. The cerebral lesions in a patient with generalized glutathione deficiency and pyroglutamic aciduria (5-oxoprolinuria). *Acta. Neuropathol.* (1980), **52**, 235-238.

Slater, T.F. Free radical scavangers. *In: Free radical mechanisms in tissue injury*. (Lagnado, J.R. **eds).** (1972), Kap 5, 48-61. London, Pion Limited.

Slivka, A., Mytilineou, C. & Cohen, G. Histochemical evaluation of glutathione in brain. *Brain Res.* (1987), **409**, 275-284.

Sochocka, E., Juurlink, B.H.J., Code, W.E., Hertz, V., Peng, L. & Hertz, L. Cell Death in Primary Cultures of Mouse Neurons and Astrocytes During Exposure to and Recovery from Hypoxia, Substrate Deprivation and Simulated Ischemia. *Brain Res.* (1994), **638**, 21-28.

Sonnewald, U., Gribbestad, I.S., Westergaard, N., Nilsen, G., Unsgård, G., Schousboe, A. & Petersen, S.B. Nuclear magnetic resonance spectroscopy: Biochemical evaluation of brain function *in vivo* and *in vitro*. *Neurotoxicology*. (1994a), **15**, 579-590.

Sonnewald, U., Müller, T.B., Westergaard, N., Unsgård, G., Petersen, S.B. & Schousboe, A. NMR spectroscopic study of cell cultures of astrocytes and neurons exposed to hypoxia: Compartmentation of astrocyte metabolism. *Neurochem. Int.* (1994b), **24**, 473-483.

Sonnewald, U., Westergaard, N., Hassel, B., Müller, T.B., Unsgård, G., Fonnum, F., Hertz, L., Schousboe, A. & Petersen, S.B. NMR spectroscopic studies of ¹³C-acetate and ¹³C-glucose metabolism in neocortical astrocytes: Evidence for mitochondrial heterogeneity. *Dev. Neurosci.* (1993a), **15**, 351-358. Sonnewald, U., Westergaard, N., Petersen, S.B., Unsgård, G. & Schousboe, A. Metabolism of [U-¹³C] glutamate in astrocytes studied by ¹³C-NMR spectroscopy - incorporation of more label into lactate than into glutamine demonstrates the importance of the tricarboxylic acid cycle. *J Neurochem.* (1993b), **61**, 1179-1182.

Staub, F., Mackert, B., Kempski, O., Peters, J. & Baethmann, A. Sweeling and death of neuronal cells by lactic acid. *J Neurol. Sci.* (1993), **119**, 79-84.

Szwergold, B.S. NMR spectroscopy of cells. *Annu. Rev. Physiol.* (1992), **54**, 775-798.

Taylor, P.M., Mackenzie, B., Hundal, H.S., Robertson, E. & Rennie, M.J. Transport and membrane binding of the glutamine analogue 6-diazo-5-oxo-Lnorleucine (DON) in Xenopus laevis oocytes. *J. Membr. Biol.* (1992), **128**, 181-191.

Thomson, J.F. *Biological effects of Deuterium.* (1963), Pergamon Press, Oxford, UK.

Thornalley, P.K. Esterification of reduced glutathione. *Biochem. J.* (1991), **275**, 535-539.

Tildon, J.T. & Roeder, L.M. Transport of 3-hydroxy[3-¹⁴C]butyrate by dissotiated cells from brain. *Amer. J. Physiol-Cell. Physiol.* (1988), **255**, C133-C139.

Tildon, J.T., Mckenna, M.C. & Stevenson, J.H. Transport of 3-hydroxybutyrate by cultured rat brain astrocytes. *Neurochem. Res.* (1994), **19**, 1237-1242.

Ugurbil, K., Guernsey, D.L., Brown, T.R., Glynn, P., Tobkes, N. & Edelman, I.S. ³¹P-NMR studies of intact anchorage-dependent mouse embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1981), **78**, 4843-4847.

Ugurbil, K., Schulman, R.G., & Brown, T.R. High-resolution ³¹P and ¹³C nuclear magnetic resonance studies of escherachia coli cells *in vivo*. *In: Biological applications of magnetic resonance*. (Schulman, R.G., eds). (1979), Kap 11, 537-589. London, Academic Press.

Urenjak, J., Williams, S.R., Gadian, D.G. & Noble, M. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy unambiguously identifies different neural cell types. *J Neurosci.* (1993), **13**, 981-989.

Usenius, J.P., Vainio, P., Hernesniemi, J. & Kauppinen, R.A. Choline-containing compounds in human astrocytomas studied by ¹H-NMR spectroscopy *in vivo* and *in vitro*. *J. Neurochem.* (1994), **63**, 1538-1543.

Van Zijl, P.C.M., Moonen, C.T.W., Faustino, P., Pekar, J., Kaplan, O. & Cohen, J.S. Complete separation of intracellular and extracellular information in NMR spectra of perfused cells by diffusion-weighted spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1991), **88**, 3228-3232.

Viña, J.R., Davis, D.W. & Hawkins, R.A. The influence of nitrous oxide on methionine, S- adenosylmethionine and other amino acids. *Anesthesiology* (1986), **64**, 490-495.

Viña, J.R., Palacín, M., Puertes, I.R., Hernández, R. & Viña, J. Role of the γglutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation. *Am. J. Physiol.* (1989), **257**, E916-E922. Vion-Dury, J., Meyerhoff, D.J., Cozzone, P.J. & Weiner, M.W. What might be the impact on neurology of the analysis of brain metabolism by *in vivo* magnetic resonance spectroscopy? *J. Neurol.* (1994), **241**, 354-371.

Virchow, R.Z. Psychol. (1846), 242-250.

Welder, A.A. & Acosta, D. Enzyme leakage as indicator of cytotoxicity in cultured cells. *In: Methods in toxicology*. (1994), Kap 4, 46-49. Academic Press.

Wellner, V.P., Anderson, M.E., Puri, R.N., Jensen, G.L. & Meister, A. Radioprotection by glutathioneester: Transport of glutathioneester into human lymphoid cells and fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1984), **81**, 4732-4735.

Westergaard, N., Sonnewald, U. & Schousboe, A. Release of α-ketoglutarate, malate and succinate from cultured astrocytes: Possible role in amino acid neurotransmitter homeostasis. *Neurosci. Lett.* (1994), **176**, 105-109.

Westergaard, N., Sonnewald, U., Petersen, S.B. & Schousboe, A. Characterization of microcarrier cultures of neurons and astrocytes from cerebral cortex and cerebellum. *Neurochem. Res.* (1991), **16**, 919-923.

Williamson, J.M., Boettcher, B. & Meister, A. Intracellular cysteine delivery system that protects against toxicity by promoting glutathione synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1982), **79**, 6246-6249.

Yager, J.Y., Kala, G., Hertz, L. & Juurlink, B.H.J. Correlation between content of high-energy phosphates and hypoxic-ischemic damage in immature and mature astrocytes. *Brain Res. Dev. Brain Res.* (1994), **82**, 62-68.

Zhang, P., Graminski, G.F. & Armstrong, R.N. Are the histidine residues of glutathione S-transferase importent in catalysis. *J. Biol. Chem.* (1991), **29**, 19475-19479.