

Antioxidant activity: from model to man

Citation for published version (APA):

Balk, J. M. (2010). *Antioxidant activity: from model to man*. Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/2010

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

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.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Algemene samenvatting

De mens kan niet zonder zuurstof. De zuurstof die wij inademen wordt vanaf de longen door het bloed naar alle cellen van ons lichaam gebracht. De cellen kunnen deze zuurstof gebruiken voor belangrijke processen. Eén van deze processen is de afweerreactie van het lichaam tegen schadelijke virussen en bacteriën. De afweercellen (witte bloedlichaampjes) beschadigen onder andere de celwand van virussen en bacteriën, waarbij ze zuurstof als wapen gebruiken. Hierdoor kunnen deze ongewenste binnendringers niet meer overleven en zijn ze niet meer schadelijk.

Gewoon zuurstof is niet reactief genoeg als wapen tegen deze micro-organismen. De afweercellen kunnen zuurstof omzetten in reactieve zuurstofdeeltjes (waaronder zuurstofradicalen). Deze deeltjes zijn reactief genoeg om met de celwand van de bacteriën te reageren, een reactie die ook wel oxidatie wordt genoemd.

Naast de afweerreactie zijn er nog veel meer processen in het lichaam waarbij reactieve zuurstofdeeltjes een rol spelen, zoals het regelproces van de bloeddruk, het gezond houden van de botten en de bloedstolling. De enzymen die zuurstof kunnen omzetten naar reactieve zuurstofdeeltjes komen dan ook in het hele lichaam voor.

Er kleeft echter ook een groot gevaar aan deze reactieve zuurstofdeeltjes. Ze zijn zo reactief dat ze met alles kunnen reageren. Wanneer ze op een verkeerde plek, een verkeerd tijdstip of in een te grote hoeveelheid gevormd worden, kunnen ze zoveel schade aanrichten dat de eigen cellen worden beschadigd. Dit kan tot gevolg hebben dat ziekten zoals COPD, diabetes type 2, leverfalen en kanker zich kunnen ontwikkelen.

Het lichaam heeft echter een verdedigingslinie tegen deze onbedoelde schade aan de eigen cellen, het antioxidant-netwerk. Een antioxidant is een stof die, op welke manier ook, schade aan de lichaamseigen cellen door reactieve zuurstofdeeltjes kan voorkomen. Eén van de manieren waarop een antioxidant kan werken is door de reactieve zuurstofdeeltjes weer terug om te zetten naar minder reactieve of niet-reactieve zuurstofdeeltjes; dit zijn de antioxidant enzymen. Een antioxidant kan ook zelf reageren met de reactieve zuurstofdeeltjes, zodat schade aan belangrijke moleculen voorkomen wordt; dit zijn de scavenging antioxidanten. Verder kunnen antioxidanten ook voorkomen dat reactieve zuurstofdeeltjes gevormd worden, door bijvoorbeeld het omzettingproces van gewoon zuurstof naar reactief zuurstof te remmen.

Het eerste deel van dit proefschrift (hoofdstukken 2, 3 en 4) gaat over de scavenging antioxidanten. Dit soort antioxidanten kan relatief makkelijk via de voeding of in de vorm van medicijnen toegediend worden. Heel veel stoffen kunnen scavenging antioxidanten zijn. Sommige stoffen beschermen alleen beter tegen schade dan andere stoffen. Daarom probeert men door onderzoek de beste antioxidanten te identificeren. Door in een reageerbuis testen uit te voeren kan de activiteit van een antioxidant worden bepaald.

Over het algemeen wordt verondersteld dat de reactiesnelheid waarmee de antioxidant met het reactieve zuurstofdeeltje reageert de belangrijkste factor is die de activiteit van

een antioxidant bepaalt. Daarom wordt geprobeerd de reactiesnelheid van een stof met een reactief zuurstofdeeltje te meten. Omdat de snelheden van de reacties van reactieve zuurstofdeeltjes zo hoog zijn, zijn ze echter niet direct te meten. Om toch de snelheid te kunnen schatten, wordt deze op een indirecte manier gemeten met zogenaamde competitie-experimenten. In deze experimenten moet de antioxidant een detector (een stof waarvan je via apparatuur precies de hoeveelheid kunt bepalen) beschermen door te reageren met de reactieve zuurstofdeeltjes. Er wordt dan gekeken hoeveel antioxidant er nodig is om 50% van de detector te beschermen tegen schade van de reactieve zuurstofdeeltjes. Van een goede antioxidant zal minder nodig zijn om 50% van de detector te beschermen dan van een slechte antioxidant. De hoeveelheid antioxidant die nodig is om 50% van de detector te beschermen wordt de EC_{50} genoemd. Deze gemeten activiteit wordt dan gebruikt om de reactiesnelheid van de antioxidant met het reactieve zuurstofdeeltje te berekenen.

Het blijkt echter dat verschillende laboratoria op andere reactiesnelheden uitkomen, terwijl dit gelijk zou moeten zijn. Om er achter te komen waar deze verschillen vandaan komen is een competitie-experiment nagebootst met de computer. Met dit computermodel is aangetoond dat de gemeten activiteit sterk afhangt van de hoeveelheid reactieve zuurstofdeeltjes die gebruikt wordt. Als hier geen rekening mee wordt gehouden, is de gemeten antioxidant activiteit onjuist. Omdat het computermodel inzicht geeft in de mate van onderschatting of overschatting, kan de werkelijke reactiesnelheid beter bepaald worden. Ook zijn in hoofdstuk 2 een aantal aanwijzingen gegeven over hoe een competitie-experiment uitgevoerd moet worden om de antioxidant activiteit zo nauwkeurig mogelijk te bepalen.

In hoofdstuk 3 is gekeken naar een specifiek competitie-experiment met de detector deoxyribose en het hydroxyl radicaal als reactief zuurstofdeeltje. Met deze methode wordt in verschillende laboratoria de activiteit van een antioxidant bepaald. De laboratoria hebben echter grote verschillen tussen de uitkomsten voor dezelfde antioxidanten. Deze verschillen in activiteit bij dit experiment hebben alleen een andere oorzaak dan beschreven in hoofdstuk 2. Om dit experiment met deoxyribose en het hydroxyl radicaal te laten werken, zijn er meer stoffen nodig dan alleen het reactieve zuurstofdeeltje, de detector en de antioxidant. Zoals eerder beschreven zijn de reactieve zuurstofdeeltjes zo reactief (zeker het hydroxyl radicaal) dat ze met alle stoffen kunnen reageren. De stoffen die nodig zijn in dit experiment zullen dus, net als de detector, ook beschadigd worden door de reactieve zuurstofdeeltjes. Als hier geen rekening mee wordt gehouden, wordt de antioxidant activiteit systematisch onderschat. Deze onderschatting is relatief makkelijk te vermijden door rekening te houden met de aanwezigheid van die extra stoffen in het experiment. Hiervoor moet een aangepaste methode gebruikt worden om de reactiesnelheid van de antioxidant (de activiteit) te berekenen, die uitgelegd is in hoofdstuk 3.

Een antioxidant moet snel met een reactief zuurstofdeeltje reageren om te voorkomen dat het reactief zuurstofdeeltje de cel beschadigt. Als echter kritisch wordt gekeken naar de eigenschappen die belangrijk worden geacht voor een antioxidant, is het de vraag of de reactiesnelheid wel het belangrijkste is. Een antioxidant hoeft alleen maar de cellen en delen van cellen te beschermen tegen de schade van de reactieve zuurstofdeeltjes. In hoofdstuk 4 is kritisch bekeken op welke manieren een scavenging antioxidant kan beschermen. Het blijkt dat de reactiesnelheid niet alleen de antioxidant activiteit bepaalt. Het is ook belangrijk met hoeveel reactieve zuurstofdeeltjes de antioxidant kan reageren. Om deze andere bepalende factor mee te nemen, is er een nieuwe manier voorgesteld om de antioxidant activiteit te beschrijven (hoofdstuk 4). Met deze nieuwe manier van beschrijven kan beter voorspeld worden hoe goed antioxidanten in het lichaam werken wanneer ze moeten beschermen tegen schade van reactieve zuurstofdeeltjes.

Een voorbeeld van schade door reactieve zuurstofdeeltjes is de leverziekte NASH (niet-alcoholische steatohepatitis). Bij deze ziekte is veel vet opgeslagen in de lever. Omdat levercellen niet gemaakt zijn om grote hoeveelheden vet op te slaan, gaan deze cellen kapot en komt er een ontsteking in de lever. Deze ontsteking zorgt weer voor extra reactieve zuurstofdeeltjes die nog meer schade veroorzaken aan de lever, met het gevolg dat de functie van de lever achteruit gaat.

Het is bekend dat in deze ziekte een enzym, CYP2E1, in verhoogde mate aanwezig is. Dit enzym, dat nodig is om de vetten te verbranden, kan ook reactieve zuurstofdeeltjes produceren. Als er meer van dit enzym aanwezig is, kunnen er ook meer reactieve zuurstofdeeltjes gevormd worden en kan er meer schade veroorzaakt worden. Het is echter nog niet bekend waarom dit enzym reactieve zuurstofdeeltjes produceert. Het zou kunnen dat de aanwezigheid van één specifieke stof dit enzym aanzet tot een grotere productie van reactieve zuurstofdeeltjes. Omdat de stof citraat meer aanwezig is in patiënten met NASH (hoofdstuk 5), is getest of citraat dit enzym stimuleert tot de vorming van reactieve zuurstofdeeltjes. Hoewel citraat wel meer aanwezig is in patiënten, zorgt het niet direct voor een verhoging van de productie van reactieve zuurstofdeeltjes. Welke rol citraat dan wel heeft in de ontwikkeling van de ziekte NASH is nog onbeantwoord.

Een andere manier om de lever in NASH te beschermen is door het enzym CYP2E1 af te remmen, zodat het minder of geen reactieve zuurstofdeeltjes meer vormt (hoofdstuk 6). Een enzym is een ingewikkeld molecuul dat heel kieskeurig is in de stoffen die het bij zich toelaat. Daarom moet eerst bepaald worden aan welke eisen de stof moet voldoen om in de buurt te komen van de plek in het enzym waar de reactieve zuurstofdeeltjes gevormd worden. Uit de verschillende stoffen die getest zijn, kan geconcludeerd worden dat de stof in ieder geval vetachtig moet zijn (lipofiel). Dit is de eerste stap in de ontwikkeling van een medicijn voor de ziekte NASH dat werkt via de remming van de aanmaak van reactieve zuurstofdeeltjes.

Veel antioxidanten komen uit de voeding. Voor hun werking moeten de antioxidanten ook opgenomen worden in het bloed. Via het bloed worden de antioxidanten overal in het lichaam gebracht en kunnen ze werken op plaatsen waar ze nodig zijn. Daar worden ze verbruikt en moeten ze weer aangevuld worden.

Omdat fruit een belangrijke bron van antioxidanten is, is nagegaan wat het effect van het eten van fruit heeft op de antioxidantwaarde van het bloed (hoofdstuk 7). Hiervoor zijn drie verschillende porties fruit getest: een fruitsalade, appels en een fruitdrink. Merkwaardig is dat na het eten van appels de antioxidantwaarde van het bloedplasma daalt. Na de inname van een fruitsalade of een fruitdrink blijft de antioxidantwaarde van het bloedplasma op peil. De antioxidanten in de fruitsalade en de fruitdrink kunnen dus de daling van de antioxidantwaarde voorkomen. Om dit effect te zien was echter een correctie nodig. In fruit, en voornamelijk in appels, zit de stof fructose. Als fructose wordt opgenomen in de cellen, komt er langs een indirecte weg de antioxidant urinezuur in het bloed. Deze antioxidant komt dus niet uit de voeding, maar draagt wel bij in het op peil houden van de antioxidantwaarde van het bloed. Dit voorbeeld laat zien hoe ingewikkeld het is om antioxidant activiteit in het lichaam te bepalen.

Het bepalen van de antioxidant activiteit lijkt simpel. In dit proefschrift zijn echter fundamentele aspecten beschreven waar rekening mee gehouden moet worden in de bepaling van de antioxidant activiteit, om zo onjuiste conclusies te voorkomen. Dit laat zien dat het juist bepalen van de antioxidant activiteit, of het nu in een model is of in een mens, een hele klus is waaraan gewerkt wordt, maar die voorlopig nog niet geklaard is.