

Moleculaire dynamica studie naar het effect van lipide peroxidatie op lipide dubbellenen, voor een beter inzicht in plasma-oncologie

Masterproef ingediend tot het bekomen van de graad van
Master in de Chemie

Jonas Van der Paal

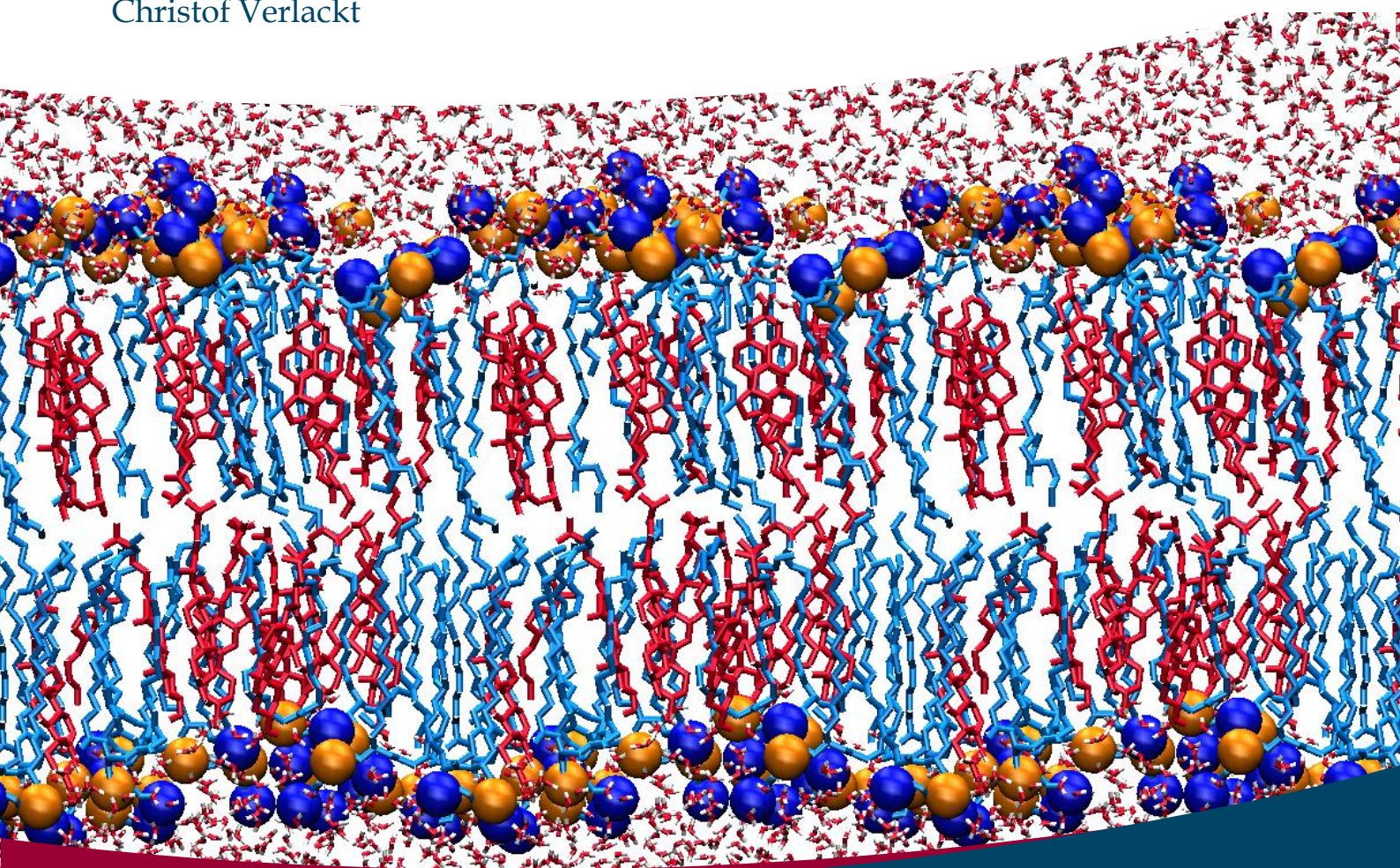
Promotoren

Prof. dr. Annemie Bogaerts

Prof. dr. Erik Neyts

M.m.v.

Christof Verlackt



Moleculaire dynamica studie naar het effect van lipide peroxidatie op lipide dubbellagen, voor een beter inzicht in plasma-oncologie

Jonas Van der Paal

Masterproef ingediend tot het bekomen van de graad Master in de Chemie
Academiejaar 2014-2015

Promotoren:

Prof. dr. Annemie Bogaerts

Prof. dr. Erik Neyts

M.m.v.

Christof Verlackt

Faculteit Wetenschappen
Departement Chemie
PLASMANT

DANKWOORD

Een master word je niet alleen! De afgelopen vijf jaar had ik nooit alleen kunnen doorspartelen, en daarom wil ik graag een aantal mensen bedanken die in deze periode een belangrijke rol hebben gespeeld voor mij.

Allereerst, mijn ouders. Hoewel ik het niet altijd even duidelijk laat blijken, zijn zij voor mij zeer belangrijk, altijd al geweest. Ze geven mij een zekere stabiliteit, mensen op wie ik onvoorwaardelijk kan terugvallen en een plaats waar ik steeds tot rust kan komen, zonder dat ik me daarover zorgen moet maken. Voortstuderen was ook vanzelfsprekend thuis. Nergens moest ik me druk in maken, zodat ik me steeds volledig kon focussen op mijn studies en sport. Deze thesis is dan ook een bekroning voor de vele tijd die jullie aan mij hebben opgeofferd. Ook mijn zussen zou ik willen vermelden, die ondanks de 'meningsverschillen' die soms opduiken, ook zeer belangrijk voor mij zijn.

Verder zou ik nog een heel speciaal iemand willen bedanken. Een dikke zes jaar geleden ontmoetten we elkaar, en sindsdien hebben we samen enorm veel leuke dingen beleefd. Samen de eerste stapjes op de universiteit gezet, samen vele reizen gemaakt, samen tranen gelaten maar gelukkig veel vaker samen enorm hard gelachen. Nog belangrijker misschien is dat je er ook steeds voor mij was wanneer ik het moeilijk had. Altijd kon ik op je rekenen, en daar ben ik je nog het meest dankbaar voor. Dank je, Linsey!

Ook mijn klasgenoten van de afgelopen vijf jaar mag ik hier niet vergeten. We hebben samen zoveel tijd doorgebracht, en de leuke sfeer, de spelletjes tijdens saaie lessen en ook de uitstappen die we samen maakten, hebben deze periode mee gekleurd.

Als laatste zou ik ook de onderzoeksgroep PLASMANT willen bedanken en in het bijzonder prof. dr. Annemie Bogaerts, prof. dr. Erik Neyts en Christof Verlackt. Allereerst uiteraard voor de kansen die ze mij bieden en het vertrouwen dat ze in mij vestigen. Ze lieten mij vrij om zelf mijn weg te zoeken in deze thesis, maar gaven me ook enorm veel advies en hulp wanneer ik deze nodig had. Kristof, Stijn en Yannick mag ik ook niet vergeten. De lange, vaak warme dagen werden aanzienlijk leuker dankzij jullie!

Natuurlijk zijn er nog zovele anderen die ik hier niet allemaal persoonlijk kan aanhalen. Daarom wil ik iedereen die mij ooit steunde, of net niet, bedanken. Jullie hebben mij immers mee gemaakt tot wie ik nu ben!

INHOUD

Hoofdstuk 1: Algemene inleiding.....	1
1. Doelstelling	1
2. Kanker.....	2
2.1 Geschiedenis.....	2
2.2 Eigenschappen van kanker.....	3
2.3 Behandeling van kanker	5
2.4 Nood aan nieuwe behandelingsmethoden	6
3. Plasma voor kankerbehandeling	7
3.1 Definitie van plasma.....	7
3.2 LTE en niet-LTE plasma's.....	8
3.3 Plasma-geneeskunde	9
3.3.1 Sterilisatie	9
3.3.2 Bloedcoagulatie.....	10
3.3.3 Wondheling.....	10
3.3.4 Tandheelkunde	11
3.4 Plasmabronnen.....	11
3.5 Plasma-oncologie	12
4. Plasmamembraan.....	16
4.1 Opbouw.....	16
4.2 Lipide peroxidatie.....	18
5. Computersimulaties voor plasma-geneeskunde	21
Hoofdstuk 2: Beschrijving van de methode	25
1. Moleculaire dynamica	25
1.1 Algemeen	25
1.2 Krachtveld.....	26
2. Modelopbouw en simulatiedetails	32
3. Analysemethoden	36
3.1 Oppervlakte per lipide.....	36
3.2 Dikte van de dubbellaag.....	36
3.3 Deuterium orde parameter.....	37
3.4 Waterdichtheid.....	38
3.5 Visuele controle.....	38

Hoofdstuk 3: Resultaten en discussie	39
1. Validatie krachtveld.....	39
2. Invloed concentratie oxidatieproducten.....	39
2.1 Oppervlakte per lipide.....	40
2.2 Dikte van de dubbellaag.....	42
2.3 Waterdichtheid.....	45
2.4 Deuterium orde parameter.....	46
3. Invloed cholesterol.....	47
3.1 Oppervlakte per lipide.....	48
3.2 Dikte van de dubbellaag.....	49
3.3 Waterdichtheid.....	51
3.4 Deuterium orde parameter.....	51
4. Invloed concentratie cholesterol.....	52
4.1 Oppervlakte per lipide.....	53
4.2 Dikte van de dubbellaag.....	53
4.3 Waterdichtheid.....	54
4.4 Deuterium orde parameter.....	55
Hoofdstuk 4: Conclusie en vooruitzichten	56
Referenties	59
Samenvatting	67
Summary	68
Abstract	69

HOOFDSTUK 1: ALGEMENE INLEIDING

1. Doelstelling

Sinds in 1971 toenmalig president van de Verenigde Staten, Richard Nixon, de *war on cancer* verklaarde, zijn er vele successen geboekt in het bestrijden van deze ziekte. Desondanks blijft kanker één van de belangrijkste doodsoorzaken. In 2012 vormde longkanker alleen al de op vier na dodelijkste ziekte, met 2,6 miljoen dodelijke slachtoffers wereldwijd [1]. Eén van de grootste problemen in het bestrijden van kanker is de resistentie die kankercellen ontwikkelen ten aanzien van de conventionele behandelingsmethoden, zoals chemotherapie of radiotherapie. In dit thema kadert de huidige masterthesis. Behandelingen van melanomacellen (huidkankercellen) met koude atmosferische plasma's tonen immers aan dat dergelijke behandelingen efficiënt zijn in het doden van kankercellen, waarbij er tot nog toe geen resistentie wordt vastgesteld bij de cellen ten aanzien van de plasmabehandeling. Hoewel deze resultaten veelbelovend zijn, zijn de onderliggende mechanismen, die zich afspelen wanneer de reactieve deeltjes uit een plasma (neutrale deeltjes, zoals radicalen, atomen en moleculen, maar ook ionen) interageren met kankercellen, nog steeds niet voldoende gekend en vormen ze tot op de dag van vandaag nog altijd de focus van een groeiend aantal studies. Voornamelijk de manier waarop invallende radicalen uit het plasma de cel kunnen binnendringen, blijft een belangrijk vraagstuk. Het doel van dit onderzoek is om aan de hand van moleculaire dynamica (MD) simulaties na te gaan hoe lipide peroxidatie, een proces dat als essentieel wordt beschouwd om de kankercellen te kunnen bestrijden, op atomaire schaal de eigenschappen van het plasmamembraan beïnvloedt. Deze processen zijn van groot belang daar het plasmamembraan de eerste barrière vormt tussen de plasmabehandeling en de delicate biochemie in de betrokken cellen. Opdat de reactieve deeltjes in de cel kunnen worden opgenomen, moeten ze eerst door deze barrière heen kunnen migreren. In dit onderzoek worden structurele en dynamische eigenschappen van het membraan onderzocht in functie van de concentratie aan geoxideerde lipiden. Hierbij zal tevens de invloed van het type geoxideerde lipide bestudeerd worden. Tot slot zal ook de invloed van cholesterol worden nagegaan, daar dit molecuul in significant lagere concentraties aanwezig is in het plasmamembraan van een kanker cel, en mogelijk de basis vormt van de waargenomen selectiviteit van plasmabehandelingen ten aanzien van kankercellen.

2. Kanker

2.1 Geschiedenis

De eerste verwijzingen naar kanker als ziekte dateren reeds van 3000 voor Christus, waar in Egyptische teksten wordt verwezen naar verschillende soorten borsttumoren. De enige manier die toen bestond om dergelijke tumoren te behandelen, was door ze weg te snijden. Het mag dan ook geen wonder zijn dat kanker toen beschreven werd als een onbehandelbare ziekte. Eens de kanker uitgezaaid was over het lichaam was men volkomen machteloos.

De term 'kanker' werd echter pas ingevoerd door de Grieken rond 400 voor Christus. Het was meer bepaald Hippocrates die het begrip *carcinoma* invoerde om bepaalde soorten tumoren te beschrijven. Later werd dit vertaald naar het Latijn en was de term *cancer* geboren. Hippocrates ontwikkelde eveneens een eerste theorie omtrent het ontstaan van kanker [2]. Hij stelde dat het lichaam vier lichaamssappen bevatte, namelijk: bloed, flegma, geel gal en zwart gal. De gezondheid van een individu ging gepaard met de balans van de vier lichaamssappen in zijn lichaam. Zo werd een teveel aan zwart gal geacht kanker te veroorzaken. Deze theorie was gangbaar tot diep in de Middeleeuwen. De opvolger van Hippocrates' theorie was nog steeds gebaseerd op lichaamssappen. Hierbij werd gesteld dat de belangrijkste lichaamssappen bloed en weefselvocht waren. Het idee was vervolgens dat kanker het gevolg was van onder meer een verzuring of degradatie van het weefselvocht.

Het was pas in 1838 dat Müller, een Duits patholoog, als eerste kon aantonen dat kanker niet opgebouwd is uit vloeistoffen, maar wel degelijk uit cellen. Sinds deze ontdekking is men snel veel meer te weten gekomen over kanker. Zo toonde Virchow, een student van Müller, niet veel later aan dat kankercellen gevormd worden uit andere cellen. Nog later, in 1860, werd ontdekt hoe kankercellen zich verspreiden doorheen het lichaam (zie verder) [2].

Hoewel nu reeds geweten was waaruit kanker is opgebouwd en hoe het zich verspreidt doorheen het lichaam, had men nog steeds geen idee van waar de oorzaak juist lag. In vele gevallen werden trauma's nog steeds als de aanleiding tot kanker gezien. Andere wetenschappers dachten dan weer dat kanker besmettelijk was, waardoor kankerpatiënten ver weg van gezonde mensen moesten leven en behandeld worden. Hoewel we nu weten dat kanker op zichzelf niet besmettelijk is, is het idee van besmetting niet volledig verkeerd. Bepaalde virussen, bacteriën en parasieten die wel besmettelijk zijn, kunnen de kans op kanker immers aanzienlijk verhogen (bv. Epstein barr virus) [3].

2.2 Eigenschappen van kanker

Het begrip 'kanker' omvat ruim 100 verschillende ziektes, dewelke echter allemaal kunnen terug gebracht worden tot één gemeenschappelijk concept: de ongecontroleerde groei van lichaamscellen. Kankercellen onderscheiden zich van normale cellen op vele vlakken [4]. Allereerst verschilt de celcyclus van een kankercel van deze van een normale cel. Normale cellen groeien eerst, splitsen vervolgens om nieuwe cellen aan te maken en sterven nadien op een gecontroleerde manier (apoptose). Kankercellen daarentegen zullen ook groeien en zichzelf delen om nieuwe cellen te maken, maar sterven niet, of veel trager. De celgroei verloopt bovendien op een ongecontroleerde manier, in tegenstelling tot de celgroei bij normale, gezonde cellen. Dit alles komt doordat kankercellen dusdanig geprogrammeerd zijn om signalen voor celgroei en geprogrammeerde celdood, die elke cel ontvangt, te negeren. Hierdoor worden steeds meer en meer abnormale kankercellen aangemaakt, wat uiteindelijk leidt tot het vormen van tumoren. Hoewel de meeste soorten kanker vaste tumoren vormen (een grote massa kankerweefsel), zijn er ook een aantal die zich niet groeperen in een weefsel. Bloedkankers, zoals leukemie, zijn daar een voorbeeld van.

Een tweede verschil tussen normale cellen en kankercellen is de invasieve aard van deze laatste. Kankercellen zijn immers in staat om in andere weefsels te groeien, iets wat voor normale cellen onmogelijk is.

Een derde belangrijke eigenschap is de mogelijkheid van kankercellen om nabij gelegen normale cellen te beïnvloeden. Zo zijn ze bijvoorbeeld in staat omringende cellen ertoe aan te zetten om bloedvaten naar de kankercel aan te maken (angiogenese). Op deze manier worden de kankercellen dan voorzien van de nodige voedingsstoffen en kunnen afvalproducten weggevoerd worden.

Een laatste kenmerk van kankercellen is dat ze in staat zijn om het immuunsysteem te ontlopen. Dit systeem is verantwoordelijk voor het verwijderen van beschadigde of abnormale cellen uit het lichaam, maar het faalt soms in zijn opzet bij bepaalde types kankercellen. Deze cellen blijven onopgemerkt door het immuunsysteem en kunnen bijgevolg verder blijven groeien en delen.

De oorzaak van het ontwikkelen van kankercellen uit normale cellen ligt bij mutaties in het DNA (desoxyribonucleïnezuur). Niet alle DNA-mutaties zullen echter leiden tot het ontwikkelen van kanker. In het algemeen worden drie soorten genen verantwoordelijk geacht voor het vormen van tumoren, m.a.w., een mutatie in één van dergelijke genen kan leiden tot tumorvorming:

4 | Hoofdstuk 1: Algemene inleiding

- *Proto-oncogenen* zijn betrokken in het groei- en delingsproces van de cel. Wanneer deze genen een mutatie ondergaan, kan dat leiden tot cellen die ongecontroleerd blijven groeien en delen.
- *Tumor suppressor genen* zijn eveneens betrokken in het celgroei- en celdelingsproces. Een mutatie in dergelijke genen kan leiden tot ongecontroleerde deling van de cel.
- *DNA-repair genen* zijn verantwoordelijk voor het herstellen van beschadigd (gemuteerd) DNA. Indien zij een mutatie ondergaan, leidt dit vaak tot het ontwikkelen van extra mutaties in andere cellen.

Wanneer het DNA van een normale cel beschadigd raakt, wordt ofwel de beschadiging ongedaan gemaakt, via een DNA herstelmechanisme, of anders zal de cel zich opofferen en sterven via apoptose. Wanneer het DNA daarentegen niet is hersteld alvorens de volgende replicatie plaatsvindt, zal de mutatie blijven bestaan en sterft de gemuteerde cel bijgevolg niet af. In dergelijke gevallen wordt de mutatie doorgegeven naar volgende generaties cellen tijdens de splitsing van de gemuteerde cel, dewelke zelf blijft bestaan en zich ongebreideld kan blijven delen. Wanneer dit zich voordoet, spreekt men van kankercellen.

De hierboven besproken DNA-mutaties kunnen drie oorzaken hebben:

- Ze kunnen overgeërfd zijn van één van de ouders.
- Ze kunnen het gevolg zijn van een foute overschrijving van de gensequentie tijdens de DNA-replicatie.
- Ze kunnen ontstaan zijn door omgevingsfactoren zoals UV-straling of chemicaliën.

Wanneer kanker op één plaats in het lichaam ontstaat, kan het zich vervolgens ook verspreiden naar andere plaatsen. Dit is mogelijk omdat kankercellen in de bloedstroom of het lymfestelsel kunnen terecht komen. De cellen worden door deze netwerken mee getransporteerd en kunnen zo op andere plaatsen van het lichaam terechtkomen, waar ze opnieuw beginnen te groeien en nieuwe tumoren vormen. Het proces van het verspreiden van kanker doorheen het lichaam wordt metastase genoemd. Tumoren die in staat zijn om zich te verspreiden doorheen het lichaam noemen we kwaadaardige tumoren. Er bestaan ook tumoren die deze eigenschap niet bezitten (bv. vetbolletjes), dewelke bijgevolg goedaardig worden genoemd.

2.3 Behandeling van kanker

De oudste behandelingsmethode van kanker is het chirurgisch verwijderen van de vaste tumor. De kans is hierbij zeer reëel dat de tumor opnieuw terug groeit nadat deze verwijderd is, waardoor kanker initieel dan ook als onbehandelbaar werd gezien bij de Grieken (zie hierboven). Enkel wanneer de tumor volledig werd weggesneden, kon men zich ervan verzekeren dat de kanker niet meer zou terugkomen. Hierdoor werd vaak overgegaan tot het verwijderen van hele borsten bij vrouwen met borstkanker, of het amputeren van een been bij mensen met botkanker in het been. Doorheen de jaren is de chirurgie echter sterk vooruitgegaan, waardoor men veel nauwkeuriger kan werken. Dit heeft tot gevolg dat dergelijke radicale operaties nu nauwelijks nog gebeuren. Het chirurgisch verwijderen van tumoren wordt dan ook nog vaak toegepast, voornamelijk wanneer de kanker nog niet is uitgezaaid naar meerdere plaatsen in het lichaam. Chirurgische ingrepen kunnen zowel curatief als palliatief zijn. Bij een curatieve ingreep wordt de volledige tumor verwijderd, wat tot genezing van de kanker leidt. Een curatieve ingreep is echter niet altijd mogelijk, waardoor soms wordt overgegaan tot een palliatieve ingreep. Hierbij wordt de tumor deels verwijderd zodanig dat de patiënt na de operatie bijvoorbeeld minder pijn ondervindt van de tumor.

Sinds de eerste waarnemingen van kanker zijn er ook een aantal nieuwe technieken toegevoegd aan het arsenaal om kanker te bestrijden [3]. Al deze technieken worden ook vaak in combinatie met elkaar toegepast, of gecombineerd met chirurgie. Er is immers sprake van een synergetisch effect in dergelijke gevallen [5].

- *Chemotherapie*: Deze behandelingsmethode werd voor het eerst toegepast in de jaren '50, en maakt gebruik van geneesmiddelen om de kanker te behandelen. In het ideale geval is chemotherapie in staat om de kanker volledig te verwijderen. Meestal wordt het echter gebruikt om tumoren te verkleinen, zodat ze nadien chirurgisch verwijderd kunnen worden, of om de groei van de tumor af te remmen. Een belangrijke variant van chemotherapie is gerichte therapie. De geneesmiddelen die hierbij aangewend worden, maken gebruik van de verschillen tussen normale en kankercellen om deze laatste doelgericht te doden. Dit heeft tot gevolg dat nevenwerkingen (beschadiging van gezonde cellen en weefsels) geminimaliseerd worden. Voorbeelden van deze doelgerichte geneesmiddelen zijn apoptose-inducerende agentia of angiogenese-inhibitoren.

- *Bestralingstherapie*: Bij deze behandelingsmethode worden hoogenergetische deeltjes of golven gebruikt om een tumor te behandelen. De energetische golven/deeltjes zorgen ervoor dat het DNA in een cel beschadigd wordt, zodat de cel niet meer kan groeien of zichzelf delen. Voornamelijk cellen die zich in de M-fase (mitotische fase) van de celcyclus bevinden, zijn gevoelig voor radiotherapie [6]. Op basis van het soort deeltjes of het type golven die gebruikt worden, kan onderscheid gemaakt worden tussen verschillende soorten radiotherapie, zoals onder meer X- of γ -stralen-, elektronen-, protonen- en neutrontherapie. Afhankelijk van het type kanker, kan de therapie bovendien ook gebruik maken van externe/interne bestraling of van radiofarmaceutica. Bij deze laatste methode wordt een geneesmiddel ingenomen dat een bepaalde affiniteit bezit voor de tumor. Het geneesmiddel zal dan lokaal zijn straling afgeven. Belangrijk op te merken is dat tijdens de bestraling doorgaans ook gezonde cellen beschadigd worden. Men moet dus steeds de balans maken tussen het behandelen van de kankercellen en de negatieve gevolgen voor gezonde cellen.
- Chirurgie, chemo- en bestralingstherapie zijn de meest gekende en gebruikte behandelingsmethoden. Daarnaast zijn er echter nog een aantal technieken die minder gebruikt worden, zoals bijvoorbeeld hyperthermie (gebruik van hitte om kankercellen te doden) of stamceltransplantatie.

2.4 Nood aan nieuwe behandelingsmethoden

Zoals in de vorige paragraaf reeds enkele keren werd aangehaald, is specificiteit zeer belangrijk. Het doel is immers steeds om de kankercellen zo efficiënt mogelijk te doden, zonder gezonde cellen of weefsels te beschadigen. Een ander, veelvoorkomend probleem bij kankerbehandeling is resistentie van kankercellen ten aanzien van de gebruikte behandeling [7]. Omwille van deze twee problemen blijft onderzoek naar nieuwe, verbeterde methoden zeer belangrijk. In dit opzicht gebeurt er ook onderzoek naar het gebruik van koude atmosferische plasma's om kanker te behandelen (zie sectie 3.5). Experimenten wijzen immers uit dat gezonde cellen niet of nauwelijks worden aangetast door dergelijke plasma's en dat kankercellen eveneens geen resistentie opbouwen tegen deze behandelingsmethode [8,9].

3. Plasma voor kankerbehandeling

3.1 Definitie van plasma

Plasma kan gezien worden als een vierde aggregatietoestand waaronder materie kan voorkomen, naast vast, gas en vloeibaar. De term 'plasma' werd voor het eerst ingevoerd door Irving Langmuir in 1928 om een geïoniseerd gas te beschrijven [10]. In een plasma komen naast neutrale deeltjes ook ionen en vrije elektronen voor. De ionisatiegraad varieert in de praktijk tussen 100 % (voor volledig geïoniseerde plasma's) en 10^{-7} (zwak geïoniseerde plasma's). Hoewel een plasma vrije elektronen bevat, zijn ze globaal gezien elektrisch neutraal [11]. Dit betekent dat er een gelijk aantal positief geladen ionen en negatief geladen elektronen (en/of ionen) aanwezig zijn. De ladingsdragers zorgen er voor dat plasma een elektrische geleider is. De plasmafase kan bereikt worden indien er voldoende energie aan materie wordt toegevoegd, zodat uiteindelijk minstens één elektron niet meer gebonden is aan een bepaald atoom/molecule.

Hoewel plasma veel minder bekend is dan aggregatietoestanden als vast, vloeibaar of gas, bevindt meer dan 99% van het zichtbare universum zich in de plasmafase. Dit komt voornamelijk omdat onder meer alle sterren in het universum zich in de deze toestand bevinden, maar ook op Aarde komen plasma's voor in de natuur. Hiervan zijn bliksem en het noorderlicht de best gekende voorbeelden. Naast deze plasma's van natuurlijke oorsprong zijn er ook tal van voorbeelden van artificiële plasma's. Enkele toepassingen van dergelijke artificiële plasma's zijn terug te vinden in de micro-elektronica (voor het maken van microchips), in TL-lampen en autoverlichting, in een plasma-tv of in de medische sector (voor onder meer het steriliseren van operatiegereedschap) [12].

Er zijn drie belangrijke eigenschappen van plasma die ertoe leiden dat deze aggregatietoestand zoveel toepassingen vindt in sterk verschillende disciplines [11].

- i. In een plasma kan de temperatuur van bepaalde deeltjes aanzienlijk hoger worden dan diegene die via conventionele technologieën kan bereikt worden.
- ii. De dichtheid van bepaalde reactieve deeltjes (bv. elektronen of radicalen) kan zeer hoog zijn.
- iii. Sommige plasma's bevinden zich ver van thermodynamisch evenwicht, wat tot gevolg heeft dat de dichtheid of temperatuur van bepaalde reactieve deeltjes zeer hoog kan zijn, hoewel de bulktemperatuur van het plasma zeer laag blijft (vaak kamertemperatuur - zie verder).

Deze eigenschappen leiden ertoe dat door gebruik te maken van plasma de energie-efficiëntie van chemische processen sterk verhoogd kan worden, of dat er reacties optreden die via conventionele chemische methoden onmogelijk zijn.

3.2 LTE en niet-LTE plasma's

Globaal gezien kunnen twee grote soorten plasma's onderscheiden worden, namelijk (i) plasma's die in thermisch evenwicht zijn (lokaal thermisch evenwicht - LTE), de zogenaamde thermische plasma's, en (ii) plasma's die zich niet in thermisch evenwicht bevinden (niet-LTE of koude plasma's) [12]. Wanneer een plasma zich in thermisch evenwicht bevindt, duidt dit erop dat alle deeltjes (elektronen, radicalen, ionen, etc.) eenzelfde temperatuur hebben. Dergelijke plasma's hebben hun naam te danken aan het feit dat hun temperatuur kan oplopen tot enkele tienduizenden graden Celsius. Een niet-LTE plasma heeft typisch een gastemperatuur tussen kamertemperatuur en enkele honderden graden Celsius, terwijl de elektronentemperatuur kan oplopen tot enkele duizenden graden Celsius.

De mogelijkheid van plasma om een multi-temperatuur systeem (niet-LTE) te vormen volgt uit het feit dat de opwarming, tijdens een elektrische ontlading (gasontlading), wordt geïnitieerd door de elektronen. De elektronen worden versneld door de hoge elektrische spanning die wordt aangelegd, waardoor hun snelheid/temperatuur stijgt. Het elektrische veld dat wordt aangelegd heeft daarentegen een veel kleinere invloed op zwaardere deeltjes (zoals atomen, ionen, ...), vanwege hun grotere massa. De enige manier waarop deze zware deeltjes kunnen opwarmen is via botsingen met de meer energetische elektronen. Tijdens dergelijke botsingen zal er energie worden overgedragen van de elektronen naar de zware deeltjes. Dit effect noemt men Joule-opwarming [11]. Door het grote massaverschil tussen de twee botsende deeltjes, zal de energieoverdracht echter erg inefficiënt verlopen, waardoor vele botsingen nodig zijn om zo de gastemperatuur, die bepaald wordt door de temperatuur van de zware deeltjes, even hoog te krijgen als de elektronentemperatuur. Het is dus enkel wanneer er een zeer hoge gasdichtheid is, waardoor er vele botsingen plaatsvinden, dat een LTE-plasma gevormd kan worden.

Naast de vorming van een plasma via een elektrische ontlading, kan dit ook gebeuren aan de hand van hitte. Bij het opdrijven van de temperatuur gaat materie achtereenvolgens over van de vaste toestand, naar een vloeibare en uiteindelijk de gasfase. Indien nog meer energie wordt toegevoegd zal de overgang naar plasma uiteindelijk plaatsvinden. Door de hoge temperatuur (tot meer dan 100 miljoen °C) die hiervoor nodig is, spreekt men van hoge-temperatuurplasma's. LTE en niet-LTE plasma's worden bijgevolg samen gegroepeerd

als lage-temperatuurplasma's. Hoge-temperatuurplasma's, waarvan de zon een voorbeeld uit de natuur is, worden voornamelijk gebruikt bij het onderzoek naar kernfusie. Ze zijn bijgevolg van geen belang voor de biomedische toepassingen en deze thesis.

3.3 Plasma-geneeskunde

Plasma-geneeskunde (*plasma medicine*) is een relatief nieuwe discipline waarbij plasma's worden aangewend voor medische toepassingen [8,13-15]. Zowel LTE als niet-LTE plasma's kunnen daarbij gebruikt worden. De eerste toepassingen van plasma's voor medische toepassingen maakten voornamelijk gebruik van thermische plasma's. De hitte van deze plasma's werd daarbij aangewend in chirurgische ingrepen om weefsel te verwijderen of om bloedingen te stoppen. Meer recente toepassingen maken voornamelijk gebruik van niet-thermische plasma's (in deze context ook koude plasma's genoemd). Deze werken min of meer bij kamertemperatuur en atmosferedruk. Vele deeltjes, maar ook UV-stralen of elektrische velden, die in een plasma gevormd worden, zijn immers biomedisch actief. Reactieve zuurstofdeeltjes (Eng: *Reactive oxygen species*; ROS; vb. O, OH, H₂O₂) en reactieve stikstofdeeltjes (Eng: *Reactive nitrogen species*; RNS; vb. NO, NO₂, ONOO⁻) worden hierbij als meest belangrijk beschouwd voor de biomedische toepassingen [16]. Het grootste voordeel van niet-thermische plasma's, ten opzichte van hun thermische variant, is dat selectiviteit kan worden ingebouwd. Het plasma kan zodanig afgesteld worden dat bepaalde cellen, welke gevoeliger zijn voor deze reactieve deeltjes, behandeld worden zonder omliggend weefsel te beïnvloeden [17,18]. Hieronder volgt een kort overzicht van enkele van deze toepassingen. De toepassing die in deze masterthesis van belang is, wordt besproken in sectie 3.5.

3.3.1 Sterilisatie

Sterilisatie was de eerste medische toepassing van koude atmosferische plasma's. Hierbij kunnen zowel directe als indirecte plasmabronnen gebruikt worden (zie sectie 3.4). De reactieve deeltjes van een plasma worden hier gebruikt om micro-organismen of virussen te doden. Een groot voordeel van plasmabehandelingen is dat ze kunnen toegepast worden op verschillende temperatuurgevoelige substraten, zoals levende weefsels of chirurgisch materiaal, maar ook andere substraten zoals vloeistoffen of gasstromen behoren tot de mogelijkheden.

Zoals hierboven al aangehaald werd, is de selectiviteit een zeer belangrijke parameter tijdens de behandeling. In het ideale geval worden immers enkel micro-organismen gedood zonder een nadelig effect te hebben op omliggend weefsel. Experimenten wijzen uit dat

selectiviteit bekomen kan worden door plasma's bij een laag vermogen te gebruiken. Zo worden bij dosissen (energie per oppervlakte) lager dan $2 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ bacteriën reeds zeer efficiënt gedood zonder dat normale cellen beïnvloed worden [19].

Experimentele resultaten tonen aan dat de belangrijkste rol in het sterilisatieproces is weggelegd voor de reactieve zuurstofdeeltjes (voornamelijk O en OH radicalen). UV fotonen, geladen deeltjes, warmte en elektrische velden spelen ook een rol, maar deze is aanzienlijk kleiner dan die van de ROS [20,21].

3.3.2 Bloedcoagulatie

Coagulatie van bloed aan de hand van plasma's is eveneens een lang gekende toepassing in de geneeskunde. De eerste technieken, zoals *argon plasma coagulatie* (APC), maken gebruik van de hitte van quasi-thermische plasma's voor deze toepassing. Deze hitte zorgt ervoor dat het water uit het bloed verdampt, waardoor de wonde uitdroogt. Thermische schade aan omliggend weefsel kan met deze technieken echter niet vermeden worden [22]. Meer recente ontwikkelingen gebruiken daarom niet-thermische plasma's, zoals de *floating-electrode DBD*. In vergelijking met de oorspronkelijke methoden, kunnen dezelfde positieve resultaten bekomen worden zonder het nadelige effect van thermische schade aan omliggend weefsel. Experimenten wijzen uit dat plasma-behandelingen van wonden de coagulatie van bloed tot 15x kunnen versnellen [23–25]. Het achterliggende mechanisme van de coagulatie blijft voorlopig nog wel onduidelijk maar recente resultaten wijzen op het belang van RNS, en in het bijzonder NO. Om plasmabehandelingen ook te kunnen gebruiken voor andere toepassingen, is het echter zeer belangrijk om deze achterliggende mechanismen te achterhalen. Een voorbeeld van een andere toepassing is de sterilisatie van opgeslagen bloed in bloedbanken. Het bloed kan immers geïnfecteerd zijn met bacteriën of virussen, maar kan dan via plasmabehandeling opnieuw gezuiverd worden [26]. In dit geval mag het bloed natuurlijk niet coaguleren waardoor een veel zachtere plasmabehandeling nodig is.

3.3.3 Wondheling

Een derde toepassing van plasma's in de medische sector, is het versnellen van het helingsproces van wonden [27]. In de wonde wordt na de plasmabehandeling een verhoogde oxidatieve stress waargenomen, wat kan betekenen dat ROS verantwoordelijk zijn voor het helingsproces [28,29]. Het versnellen van het helingsproces is enerzijds toe te wijzen aan directe effecten van het plasma op huidcellen, maar anderzijds ook aan het doden

van de bacteriën in de wonde (zie deel 'sterilisatie' hierboven). Een te groot aantal bacteriën in een wonde vertraagt namelijk de wondheling [30].

3.3.4 Tandheelkunde

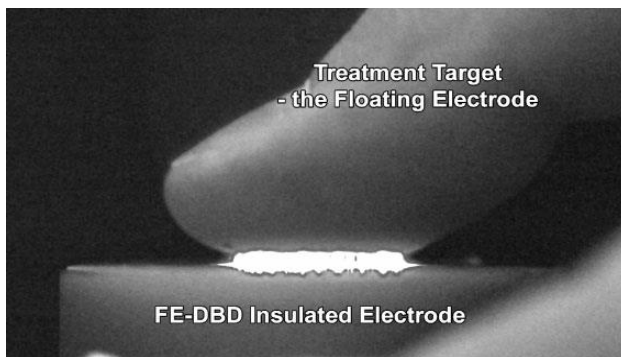
In de tandheelkunde worden plasma's onder meer aangewend om oppervlakken te modificeren. De behandelingen kunnen bijvoorbeeld als doel hebben om de biocompatibiliteit of de levensduur van de gebruikte polymeren te verbeteren, zonder de bulkeigenschappen te modificeren [31]. Een totaal andere toepassing is het bleken van tanden [32]. Het exacte blekingsmechanisme is nog onbekend, maar vermoed wordt dat waterstofperoxide (H_2O_2) of zuurstofradicalen voor een degradatie van het pigment zorgen, wat een blekend effect heeft.

3.4 Plasmabronnen

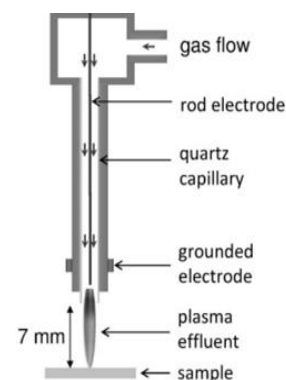
De plasmabronnen die aangewend worden in plasma-geneeskunde maken allemaal gebruik van een elektrische ontlading om een plasma op te wekken. Om een dergelijke ontlading mogelijk te maken, worden twee elektroden gebruikt, waartussen een spanning wordt aangelegd. Indien de spanning hoog genoeg is, ontvangen de kleine hoeveelheid geladen deeltjes die steeds aanwezig zijn, genoeg energie om andere atomen te ioniseren, waarbij er elektron-ion paren worden gevormd. Vanaf dit moment is er sprake van een plasma. Merk hierbij op dat ook na de elektrische ontlading het plasma elektrisch neutraal blijft. De gebruikte bronnen kunnen verdeeld worden in twee grote groepen, namelijk directe en indirecte bronnen [33]. Beide bronnen bezitten specifieke eigenschappen en worden hieronder kort besproken.

Bij een directe bron wordt het te behandelen substraat (bijvoorbeeld een weefsel) gebruikt als één van de twee hierboven vermelde elektroden. Een tweede, externe elektrode wordt boven het weefsel gehouden, en een plasma wordt opgewekt tussen dit weefsel en de externe elektrode. Een voorbeeld hiervan is de *floating*-elektrode diëlektrische barrière ontlading (FE-DBD) (zie figuur 1) [24,34]. Het gevolg van deze opstelling is dat er naast radicalaire en neutrale deeltjes ook een grote fractie aan ionen en elektronen het doeloppervlak bereikt, dewelke mogelijk een positief effect hebben op de behandeling. Hiernaast bestaat de kans ook dat er een kleine hoeveelheid elektrische stroom door het doeloppervlak loopt. Die stroom moet steeds zo laag mogelijk gehouden worden daar deze kan leiden tot thermische effecten op het weefsel. Deze thermische effecten zijn in biomedische toepassingen (bv. behandeling van levend weefsel of gevoelige apparatuur) niet gewenst, omdat ze niet specifiek zijn.

Indirecte bronnen, zoals de plasma jet (zie figuur 2), maken gebruik van twee elektroden waartussen een plasma wordt opgewekt [35,36]. Door gebruik te maken van een gasstroom (dragergas) wordt het plasma, en bijgevolg ook de reactieve deeltjes, voorbij de elektroden getransporteerd naar het doeloppervlak. Deze zone van plasma (buiten de elektroden) noemt men een pluim (*ENG: plasma effluent*; zie afbeelding 2). Doordat de ionen en elektronen in de plasma pluim recombineren met de vorming van neutrale deeltjes (bv. radicalen of neutrale moleculen/atomen), heeft dergelijke opstelling tot gevolg dat er nauwelijks ionen en elektronen het oppervlak bereiken. Vermits elektronen het doeloppervlak niet kunnen bereiken, is er geen gevaar voor lokale opwarming ten gevolge van een elektrische stroom.



Figuur 1: FE-DBD [24]



Figuur 2: Atmosferische druk plasmajet [35]

3.5 Plasma-oncologie

Het idee dat koude atmosferische plasma's gebruikt kunnen worden om kanker te behandelen is nog maar zeer recent. In 2006 werden de eerste experimenten uitgevoerd waarbij werd aangetoond dat plasma's in staat zijn om gezonde menselijke cellen te doden via apoptose [37]. Niet veel later volgden experimenten die uitwezen dat plasmabehandelingen ervoor kunnen zorgen dat cellen loskomen van de bodem van een petrischaal. Deze werden opgevolgd door nog andere experimenten waaruit bleek dat plasma's effectief in staat zijn om verschillende soorten kankercellen selectief te doden, zonder hierbij (blijvende) schade toe te brengen aan de omliggende gezonde cellen [38,39]. Naast het rechtstreeks doden van kankercellen, zouden plasmabehandelingen ook bijvoorbeeld aangewend kunnen worden om cellen die resistent zijn aan traditionele behandelingsmethoden opnieuw vatbaar te maken voor dergelijke technieken [40,41]. Alle hierboven beschreven experimenten werden *in vitro* uitgevoerd, maar de eerste *in vivo* resultaten zijn eveneens veelbelovend [42,43].

Sinds deze eerste ontdekkingen is de interesse in plasma-oncologie vanuit de hele plasmagemeenschap (en ver daarbuiten) spectaculair toegenomen [44]. De interesse in deze

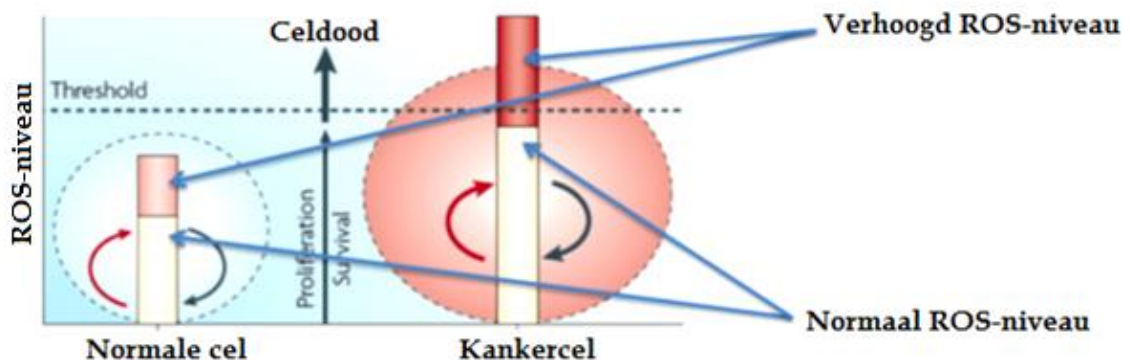
nieuwe discipline is tweeledig. Naast de talrijke onderzoeksuitdagingen mag ook het maatschappelijke aspect niet vergeten worden. Zoals blijkt uit de kadering hierboven is kanker immers meer dan ooit een ziekte waar nagenoeg iedereen in zijn leven mee wordt geconfronteerd. Elke bijdrage aan het oplossen van deze ziekte heeft bijgevolg een enorme sociale impact. Belangrijk hierbij is dat er een samenwerking is over verschillende disciplines heen. De vraagstukken omtrent het mechanisme van celdood, selectiviteit ten opzichte van gezonde cellen of eventuele resistentie die zich zou kunnen voordoen ten aanzien van plasmabehandelingen, zijn immers zeer complex. De afgelopen jaren is men steeds meer en meer te weten gekomen over de processen die optreden wanneer plasmadeeltjes interageren met kankercellen. De belangrijkste ontdekkingen, maar ook de grote vraagstukken die nog onbeantwoord zijn, worden hieronder opgesomd.

De hierboven vermelde experimenten toonden allemaal aan dat kankercellen gedood kunnen worden aan de hand van plasmabehandelingen. De wijze waarop ze sterven, via apoptose of via necrose, is eveneens van groot belang. Gedurende het apoptoseproces worden de macromoleculen in een cel afgebroken tot kleinere fragmenten, waardoor de cel uiteindelijk samenklapt in verschillende kleinere delen die allemaal worden verwijderd door fagocytose (waarbij andere cellen deze bouwstenen opnemen en verder gebruiken). Apoptose kan dus gezien worden als een gecontroleerde zelfdoding. Necrose daarentegen, treedt op bij een onvoorziene celdood, waarbij de cel openbarst en alle inhoud vrijkomt [45]. Dergelijk proces kan echter leiden tot inflammatie, waarbij het immuunsysteem wordt geactiveerd. Dit gaat gepaard met het opzwellen en rood worden van de behandelde regio, wat eveneens pijn veroorzaakt. Uit experimenten blijkt dat de manier waarop een kanker cel afsterft afhankelijk is van de toegediende dosis reactieve deeltjes, wat direct overeenkomt met de duur van de plasmabehandeling. Lage dosissen leiden tot apoptose, terwijl hogere dosissen necrose veroorzaken [39]. Controle over de plasmadosis is dus van groot belang, zodat er steeds in de regio wordt gebleven waarbinnen apoptose optreedt.

Het belangrijkste om te ontrafelen is nog steeds volgens welk mechanisme plasmadeeltjes kankercellen doden. Het meest aanvaarde voorstel gaat uit van de oxidatieve stress die veroorzaakt wordt in tumorcellen wanneer plasmadeeltjes in contact komen met, of worden opgenomen in, deze cellen. Hierbij worden opnieuw reactieve zuurstofdeeltjes als belangrijkste element beschouwd. Dergelijke deeltjes worden immers ook verantwoordelijk geacht voor het induceren van apoptose in kankercellen bij traditionele behandelingsmethoden, zoals chemotherapie of radiotherapie [46,47]. Naast ROS zouden ook reactieve stikstofdeeltjes (RNS) van groot belang zijn. De samenwerking tussen de

oxidatieve en de nitrosatieve stress zou er namelijk toe leiden dat er geen resistentie optreedt, zoals wel vaak het geval is bij de traditionele behandelingsmethoden [48].

Om plasmabehandelingen uiteindelijk toe te kunnen passen op mensen is eveneens de selectiviteit van dergelijke behandelingen ten aanzien van kankercellen zeer belangrijk. Onderzoek wijst uit dat kankercellen inderdaad kwetsbaarder zijn in vergelijking met hun gezonde tegenhanger [17,18]. Hieromtrent circuleren verschillende theoriën. Een mogelijke verklaring wordt gezocht in de celcyclus van gezonde cellen en kankercellen. Vermits kankercellen zich veel sneller delen, bevinden meer cellen zich in de S-fase (DNA-replicatie fase). Deze fase wordt als doelwit gezien van de plasmabehandeling, wat ertoe zou leiden dat inderdaad voornamelijk kankercellen zullen worden gedood [17]. Een andere verklaring voor de selectiviteit van de behandeling is gebaseerd op de verhoogde concentratie aan ROS en RNS die in de meeste kankercellen wordt teruggevonden. De extra ROS en RNS die worden toegevoegd in deze cellen, afkomstig van het plasma, zouden de concentratie hierbij zo hoog maken dat de cel uiteindelijk afsterft. Gezonde cellen hebben initieel lagere niveaus aan ROS en RNS en kunnen bijgevolg de extra ROS en RNS van het plasma verwerken (via antioxidantia - zie figuur 3) [49]. Er is echter nog meer onderzoek vereist om na te gaan of de ROS en RNS, die in gezonde cellen worden opgenomen, zelf geen nieuwe gevaarlijke mutaties kunnen veroorzaken [8,9].



Figuur 3: De extra verhoging van het ROS-niveau is voor kankercellen dodelijk. Gezonde cellen kunnen deze verhoging daarentegen wel verwerken. Dit verschil heeft het selectief doden van kankercellen tot gevolg [49].

Een derde belangrijke theorie die de selectiviteit van plasmabehandelingen ten aanzien van kankercellen tracht te verklaren, gaat uit van de verschillen in de samenstelling van het plasmamembraan tussen een normale cel en een kankercel. Het plasmamembraan van een kankercel bevat typisch een aanzienlijk lagere fractie aan cholesterol. Vermits cholesterol verantwoordelijk is voor de ordening van de lipiden in het plasmamembraan (zie verder),

leidt een daling van de concentratie tot een minder viskeus membraan [50,51]. Dit zou op zijn beurt er voor kunnen zorgen dat bepaalde moleculen (zoals ROS of RNS) makkelijker door dit membraan kunnen diffunderen, waar ze dat in een sterk geordend, cholesterolrijk, membraan niet kunnen.

De manier waarop plasmabehandelingen in de diepte werken is eveneens niet helemaal duidelijk. Hieromtrent bestaan twee belangrijke theorieën. Een eerste verklaart deze werking doordat de langlevende ROS (zoals waterstofperoxide) zelf in staat zijn om diep in een weefsel door te dringen, tot een diepte van 1,5 mm [52]. Zo zouden deze deeltjes aan elke cel het signaal geven om tot apoptose over te gaan. De andere theorie gaat echter uit van het 'omstaander effect' (*ENG: bystander effect*). Volgens dit effect zouden enkel de cellen aan de oppervlakte rechtstreeks beïnvloed worden door de plasmabehandeling. Door de verhoging van de stress in deze cellen zullen verschillende biochemische mechanismen geactiveerd worden (waaronder het antioxidant systeem), en worden de getroffen cellen in staat geacht om het signaal door te geven naar onderliggende cellen, waardoor het effect zich doorheen een weefsel verspreidt. In deze theorie wordt tevens ook aangenomen dat de uitgezonden signalen in staat zijn de immuunsysteemcellen in het behandelde weefsel alert te maken, waarbij de kans groter is dat zij de kankercellen zullen opmerken en verwijderen. Hoe deze communicatie tussen deze cellen exact plaats vindt, is voorlopig nog onduidelijk [8].

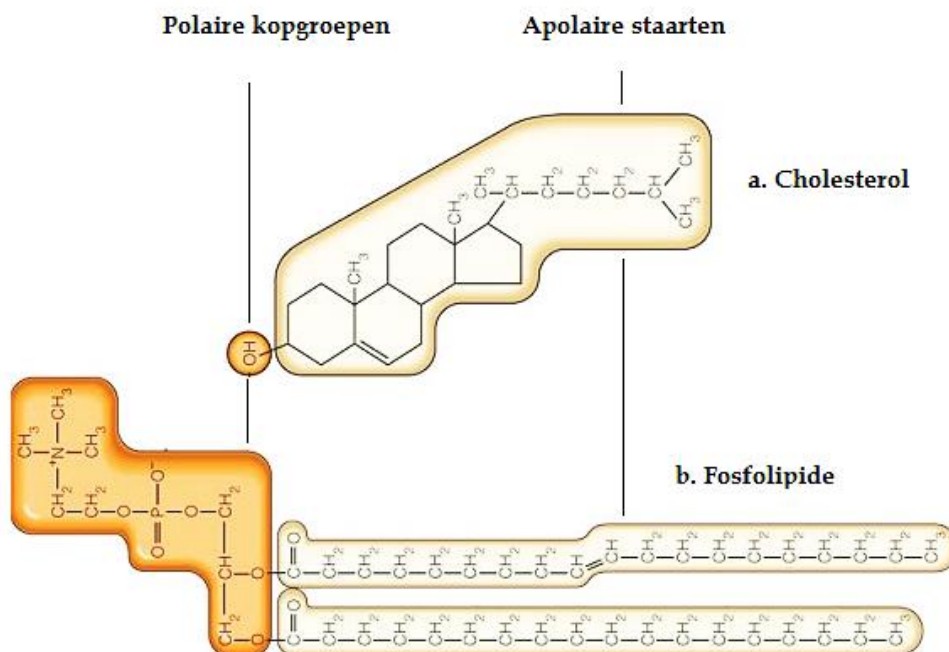
Indien uitgegaan wordt van de theorie dat ROS en RNS verantwoordelijk zijn voor het doden van kankercellen, duikt nog een bijkomend vraagstuk op. Hoe worden deze deeltjes opgenomen in de desbetreffende cellen? Hiervoor moeten ze immers doorheen het plasmamembraan kunnen migreren, hetwelke een hydrofobe barrière vormt tussen de cel en de buitenwereld. Vermits dit het onderwerp is van deze thesis, wordt in het volgende hoofdstuk kort ingegaan op dit membraan. Eerst wordt er gekeken naar hoe een membraan is opgebouwd, en daarna wordt er ingegaan op de reacties die optreden wanneer plasma-radicalen invallen op dit membraan.

4. Plasmamembraan

Het plasmamembraan is een essentieel onderdeel van elke cel. Het vormt de eerste beschermende barrière tussen het interne milieu van de cel en zijn omgeving. Naast het plasmamembraan zijn er in iedere eukaryote cel nog andere types celmembranen aanwezig zoals het membraan van de mitochondriën, van het endoplasmatisch reticulum of van het Golgi-apparaat. Elk van deze membranen heeft opnieuw als functie om het interne milieu af te scheiden van het externe milieu, in dit geval het cytosol. De barrière die het membraan vormt is semi-permeabel. Aan de hand van passief (gestuurd door een concentratiegradiënt over het membraan) of actief transport (waarbij ATP verbruikt wordt) kunnen uitwisselingen plaatsvinden tussen de desbetreffende binnen- en buitenwereld.

4.1 Opbouw

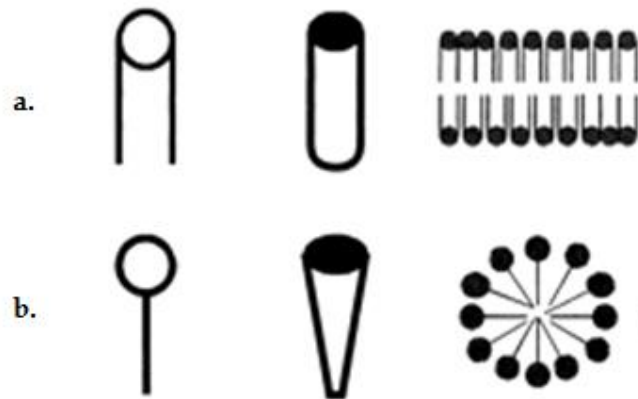
Elk membraan is samengesteld uit lipiden en proteïnen, die elk ongeveer 50% bijdragen aan de massa van het membraan. De lipiden kunnen onderverdeeld worden in drie grote groepen, namelijk fosfolipiden, sfingolipiden en sterolen, waarbij fosfolipiden de belangrijkste groep vormen [53]. Elk van deze drie groepen zijn amfifiel, wat betekent dat ze zowel een hydrofiel (polair) als een hydrofoob (apolair) deel bezitten, zoals wordt aangetoond in figuur 4 voor een fosfolipide en cholesterol.



Figuur 4: Schematische voorstelling van het amfifiele karakter van cholesterol (a) en een fosfolipide (b)

Dit amfifiele karakter zorgt ervoor dat deze lipiden zich in water zullen organiseren in een dubbellaagstructuur. De interacties tussen watermoleculen en de polaire kopgroepen

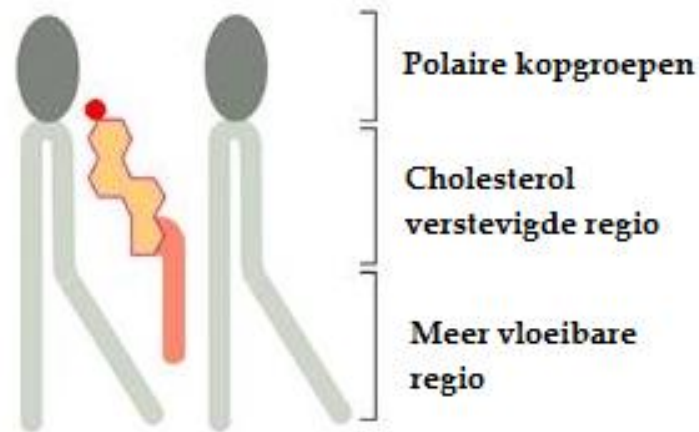
worden zo gemaximaliseerd, terwijl deze tussen watermoleculen en de apolaire staarten geminimaliseerd worden. Dat net deze dubbellaagstructuur energetisch de meest stabiele is, is te wijten aan de cilindrische vorm van fosfolipiden [54]. Andere types van lipiden kunnen immers aanleiding geven tot andere 3D-configuraties, zoals micellen (zie figuur 5).



Figuur 5: Lipiden met een cilindrische vorm, zoals fosfolipiden, zullen spontaan een dubbellaag vormen (A). Kegelvormige lipiden daarentegen, zoals lysofosfolipiden, vormen spontaan micellen (B).

In deze conformatie worden de hydrofobe Van der Waals interacties tussen de apolaire ketens gemaximaliseerd. Deze Van der Waals krachten zorgen er ook voor dat de twee lagen worden samengehouden. Hoewel de globale structuur redelijk star is, zijn de individuele lipiden en proteïnen zelf zeer dynamisch. Ze verplaatsen zich namelijk voortdurend doorheen het vlak van de dubbellaag. De fluïditeit van deze dubbellaag wordt hierbij in grote mate bepaald door de exacte samenstelling ervan. Belangrijke parameters hiervoor zijn de lengte van de ketens van de vetzuurstaarten, het aantal dubbele bindingen in deze ketens, alsook de fractie aan cholesterol [55]. De rigide ringen die aanwezig zijn in cholesterol zorgen voor een meer geordende dubbellaag, wat de structurele (bv. dikte van de dubbellaag) en dynamische (bv. permeabiliteit) eigenschappen van de dubbellaag beïnvloedt [56,57]. Dit effect is geïllustreerd in figuur 6.

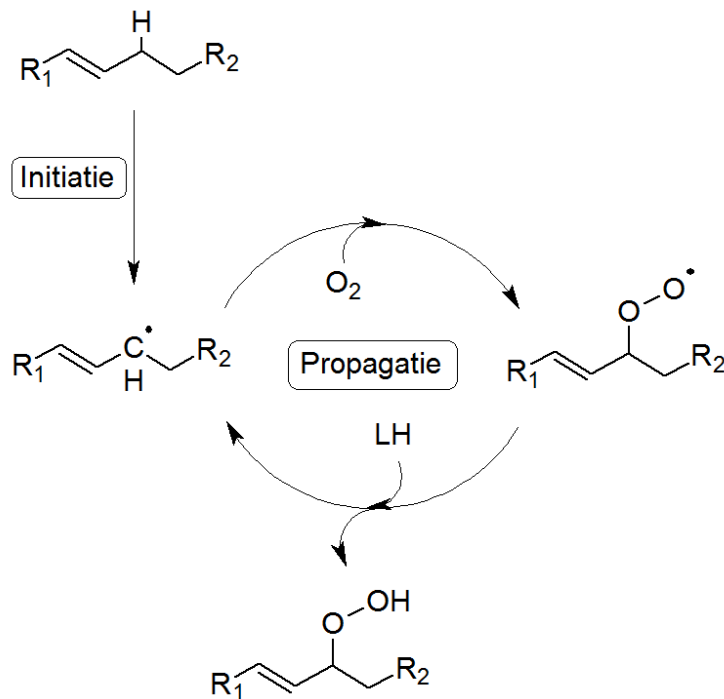
De fractie aan cholesterol kan bovendien sterk variëren tussen verschillende types membranen in de cel. Zo zijn er in het plasmamembraan evenveel fosfolipiden als cholesterolmoleculen aanwezig, terwijl de cholesterolfractie in het membraan van de mitochondriën slechts één op tien bedraagt [58].



Figuur 6: Illustratie van het verstevigend effect van cholesterol [54].

4.2 Lipide peroxidatie

Wanneer plasmadeeltjes invallen op een cel zullen deze in eerste instantie interageren met het plasmamembraan. Een belangrijk proces dat hierbij kan optreden, is lipide peroxidatie. Het algemene lipide peroxidatie proces wordt voorgesteld in figuur 7.



Figuur 7: Schematische voorstelling van het lipide peroxidatieproces. LH stelt hierbij een nieuw onverzadigd lipide voor.

Initiatie vindt plaats wanneer een invallend radicaal een waterstofatoom onttrekt van het lipide. Deze abstractie kan gebeuren door eender welk zuurstof- of stikstofradicaal (zoals bv. gevormd in het plasma). Voornamelijk de lipiden met onverzadigde koolstof-koolstof bindingen in de vetzuurstaarten zijn hier uiterst gevoelig voor, vermits waterstofabstractie

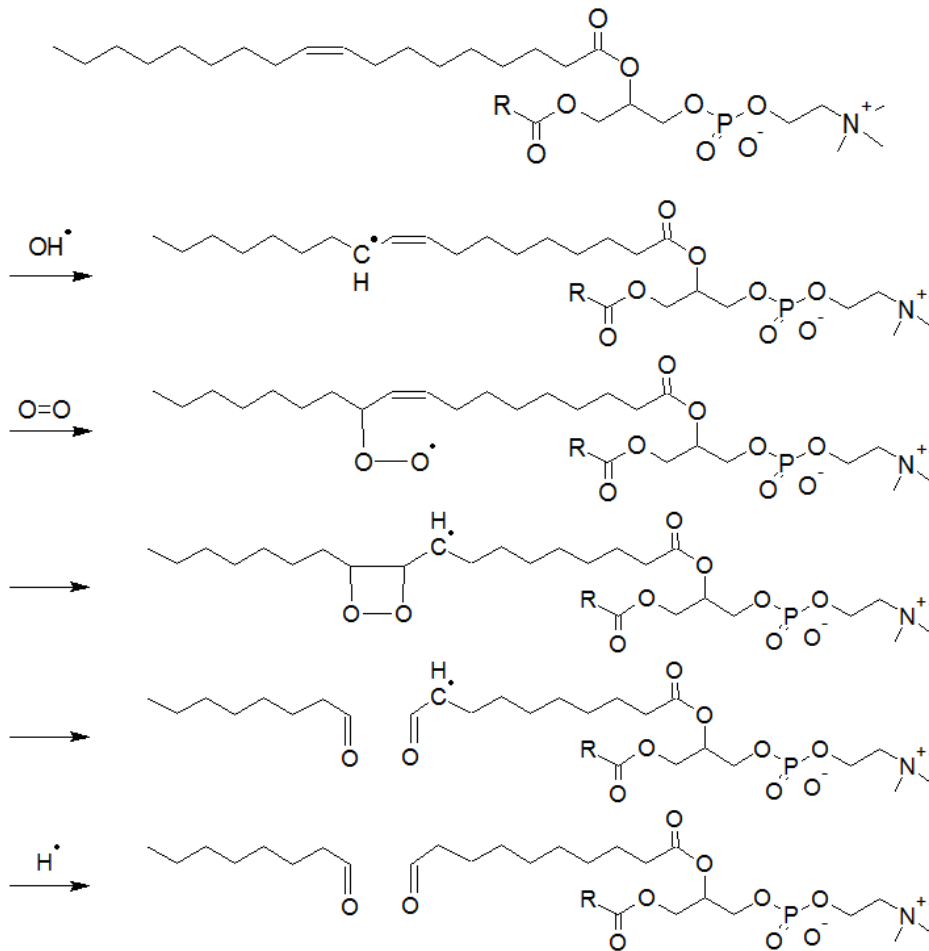
preferentieel naast een dubbele binding plaatsvindt. In dit geval wordt het gevormde lipide radicaal namelijk gestabiliseerd door resonantie met de dubbele binding. Het koolstofradicaal dat gevormd wordt, kan verder reageren met dizuurstof, waarbij een peroxy radical ontstaat. In de propagatiestap reageert het gevormde peroxy radical vervolgens met een onverzadigd lipide, met de vorming van een nieuw lipide radicaal en het uiteindelijke primaire peroxidatieproduct (lipide peroxide). Terminatie kan onder meer gebeuren door de recombinitie van twee lipide radicalen, of door reactie met antioxidanten die in de omgeving aanwezig zijn [59,60].

Hoewel het algemene concept (figuur 7) redelijk eenvoudig is, is de werkelijke situatie veel complexer. Het peroxidatieproduct of de intermediaire radicalen kunnen immers aanleiding geven tot vele verschillende secundaire afbraakproducten [61]. Daar een overzicht van al deze mogelijke reacties te uitgebreid is, zal hier de focus gelegd worden op één specifieke reactie. Het reactiemechanisme van de beschouwde reactie wordt voorgesteld in figuur 8. Deze reactie wordt getoond omdat de bekomen eindproducten verder worden gebruikt in de simulaties uitgevoerd in deze master thesis. Enerzijds werden deze moleculen gekozen omdat ze frequent worden waargenomen als reactieproduct na lipide peroxidatie [62]. Anderzijds werden de parameters, die nodig zijn voor de gebruikte simulatiemethode, reeds geoptimaliseerd voor deze moleculen, aan de hand van kwantumchemische berekeningen [63]. Deze parameters zijn essentieel om de moleculen in kwestie te kunnen toevoegen aan een bestaand krachtveld (zie verder). Gezien deze stap enkele maanden in beslag kan nemen, was het onmogelijk om andere interessante eindproducten, zoals malondialdehyde of 4-hydroxy-hexenal, te gebruiken in de context van deze master thesis [64,65]. Deze kunnen eventueel wel onderzocht worden in volgende studies.

De eerste twee stappen zijn hetzelfde als in het algemene mechanisme dat voorgesteld werd in figuur 7 (onttrekking van waterstof, gevolgd door additie van dizuurstof). Het peroxy radical reageert echter niet met een nieuw lipide, maar ondergaat een cyclisatie. De gevormde ringstructuur is onstabiel, waardoor deze spontaan breekt, met de vorming van twee aldehyden. Er blijft nog steeds een koolstofradicaal over, dat gevormd werd in de cyclisatiestap, en dat een waterstofatoom kan onttrekken van een nieuw lipide (zie propagatiestap in figuur 7). Hierdoor ontstaat een nieuw lipide radicaal en een tweede aldehyde molecule (zie figuur 8).

Doordat polaire zuurstofgroepen worden ingevoerd, is het resultaat van elke peroxidatiereactie steeds dat het apolaire gedeelte van een fosfolipide aanzienlijk meer polair wordt. Vermits de dubbellaagstructuur net ontstaat door het amfifiele karakter van de

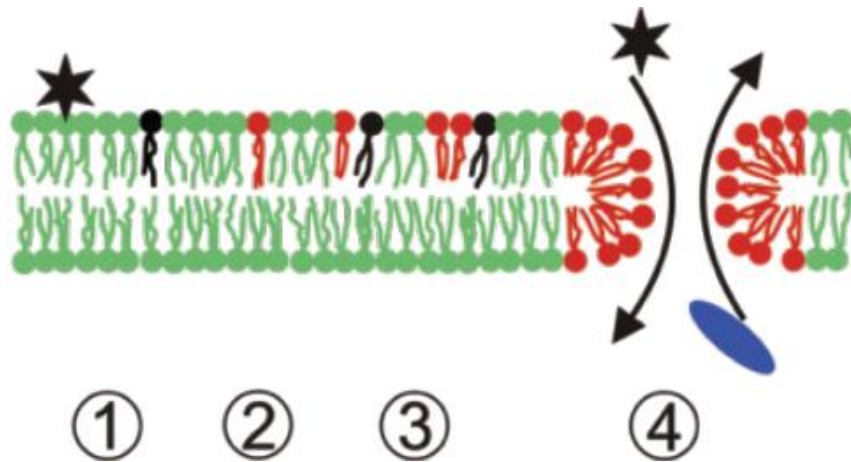
lipiden (zie hierboven), hebben deze reacties uiteraard gevolgen voor de structuur van de dubbellaag. Gekende structurele en dynamische modificaties omvatten onder meer een vermindering van de orde in de apolaire staarten, het dunner worden van de dubbellaag, wat samengaat met een laterale expansie, het verlagen van de fase-transitietemperatuur (temperatuur waarbij een overgang plaatsvindt van een sterk geordende naar een meer wanordelijke dubbellaag) en het ontstaan van waterdefecten [66,67].



Figuur 8: Reactiemechanisme van de peroxidatie van een onverzadigd fosfolipide. De secundaire afbraakproducten zijn twee aldehyden in dit geval.

De modificaties aan de dubbellaagstructuur die optreden na lipide peroxidatie zouden ervoor zorgen dat ROS en RNS tijdens de plasmabehandeling wel degelijk in het cytoplasma van de cel geraken. Een theorie die hierbij vaak wordt aangehaald is de vorming van transiënte poriën, waarlangs de reactieve deeltjes de cel kunnen binnen treden [68]. Deze theorie wordt voorgesteld in figuur 9. Eens in de cel kunnen ze, via modificaties van het DNA, proteïnen en interne celmembranen, apoptose inleiden. Ook kleinere secundaire

afbraakproducten die gevormd worden tijdens de peroxidatie van lipiden zouden hier een rol in spelen [69].



Figuur 9: Schematische voorstelling van de vorming van transiënte poriën in het plasmamembraan [68]. Reactieve deeltjes (ster) bereiken de buitenzijde van het plasmamembraan, waar ze voor lipide peroxidatie van een fosfolipide (zwart) zorgen (1). Hierdoor verandert de conformatie van dit lipide (rood - 2). Indien dit vaker gebeurt in de nabije omgeving (mogelijk door propagatie - 3), kan dit uiteindelijk leiden tot het vormen van poriën (4). Doorheen deze poriën kunnen reactieve deeltjes van buiten in de cel migreren. Ook intracellulaire moleculen (blauw) kunnen hierdoor naar buiten diffunderen.

Zoals hierboven werd aangehaald, is de invloed van lipide peroxidatie op de structuur van een lipide dubbellaag reeds uitvoerig experimenteel onderzocht [68,70,71]. Dergelijk onderzoek is uitermate geschikt om het hele proces te volgen, op grotere tijd- en ruimteschalen. Bovendien zijn ze ook noodzakelijk om bepaalde theorieën te valideren. Het is echter enorm moeilijk om via dergelijke methoden informatie te bekomen op atomair niveau. Dit is daarentegen één van de grote sterktes van computationele methoden. Deze kunnen gezien worden als een soort vergrootglas, waarmee de processen die optreden op sub-nanometer lengteschaal en pico- tot nanoseconde tijdschaal kunnen opgevolgd worden. Hiernaast is het via simulaties ook zeer makkelijk om verschillende parameters individueel te onderzoeken. Beide methodes - experimenteel en computationeel - moeten dus gezien worden als complementair aan elkaar [72].

5. Computersimulaties voor plasma-geneeskunde

Computationele studies werden reeds veelvuldig gebruikt in het kader van plasma-geneeskunde, zoals blijkt uit een recente review van de onderzoeksgroep PLASMANT [73]. De meeste studies bestuderen echter het plasma zelf. Zo worden 0D, 1D en 2D modellen bijvoorbeeld gebruikt om inzicht te krijgen in de plasmachemie (bijvoorbeeld [74-76]). Deze modellen zijn onder meer geschikt om fluxen en dichtheden van de verschillende reactieve deeltjes te berekenen.

Om bovenstaande modellen te kunnen gebruiken, moet er echter steeds op voorhand een bepaalde kennis zijn over de processen die kunnen optreden (bv. set van alle reacties, reactiesnelheidsconstanten, etc.). Bovendien beschrijven deze modellen niet de interactie van de plasmadeeltjes met de biomoleculen. Voor dit laatste zijn moleculaire dynamica (MD) simulaties wel geschikt. Hierbij moeten er, naast het krachtveld (zie verder in Hoofdstuk 2), geen veronderstellingen worden gemaakt over wat er kan gebeuren gedurende de simulatie. Een dergelijke methode leent er zich dan ook toe om bijvoorbeeld chemische reacties te bestuderen die optreden wanneer plasmadeeltjes invallen op bepaalde biomoleculen, d.w.z. “reactieve MD simulaties” (zie verder in Hoofdstuk 2). Zo werden binnen de onderzoeksgroep PLASMANT recent reactieve MD simulaties uitgevoerd om de reacties te onderzoeken die optreden wanneer ROS invallen op (i) peptidoglycaan (als modelsysteem voor de celwand van een bacterie) [77], (ii) lipide A (wat voorkomt in het celmembraan van gram-negatieve bacteriën zoals *Escherichia coli*) [78], (iii) kleine organische moleculen zoals alcoholen, amines of carbonzuren (modelsysteem voor belangrijke biofilm componenten) [79] en (iv) een modelsysteem voor het stratum corneum (buitenste laag van de huid) [80,81]. Dit modelsysteem bestond in een eerste fase uit vrije vetzuren, wat erna uitgebreid werd met ceramiden en cholesterol.

Lipide peroxidatie was ook reeds het onderwerp van enkele MD-studies. Het mechanisme, zoals beschreven staat in figuur 7, werd reeds uitvoerig experimenteel onderzocht [60,61,82,83], waardoor MD simulaties totnogtoe uitsluitend worden gebruikt om te kijken naar de gevolgen van lipide peroxidatie op de eigenschappen van een membraan. Hiervoor werden niet-reactieve MD simulaties aangewend. Deze zijn niet in staat om het breken en vormen van bindingen te simuleren (zie Hoofdstuk 2), maar ze zijn (daardoor) wel sneller, en dus in staat om het gedrag op iets langere termijn (orde van honderden nanoseconden) te bestuderen.

De eerste studie hieromtrent werd uitgevoerd door Wong-ekkabut et al. [63]. Deze studie maakte gebruik van het *united-atom* Berger krachtveld om een PLPC membraan (palmitoyl-, C16:0, en linoleoyl-, C18:2, ketens) te onderzoeken. In eerste instantie werd gekeken naar de eigenschappen van een niet-geoxideerde dubbellaag, waarna vervolgens een variërende fractie van de fosfolipiden vervangen werd door een oxidatieproduct (met concentraties tussen 2,8 % en 50 %). De oxidatieproducten die in rekening werden gebracht omvatten twee aldehyden en twee peroxiden, dewelke onderling van elkaar verschillen door de positie van de functionele groep in de apolaire staart. Het belangrijkste effect dat werd waargenomen is het buigen van de geoxideerde staarten naar de waterlaag toe, waarbij

waterstofbruggen gevormd werden tussen de polaire groepen (aldehyden of peroxiden) en watermoleculen. Hierdoor neemt de oppervlakte per lipide toe, terwijl de dikte van de dubbellaag afneemt, en de deuterium orde parameter daalt. Deze effecten waren overigens het sterkst voor de oxidatieproducten die een peroxide bevatten. Verder werd ook de energiebarrière voor de migratie van watermoleculen doorheen de dubbellaag bepaald, dewelke tot 10 kcal.mol^{-1} afnam in het geval van 50 % oxidatie (de initiële waarde bedroeg circa 29 kcal.mol^{-1}).

In een volgende studie, uitgevoerd door Khandelia en Mouritsen, werd een POPC-membraan (palmitoyl-, C16:0 en oleoyl-ketens, C18:1) als modelsysteem gekozen [84]. Hierbij werd eveneens gebruik gemaakt van het Berger krachtveld. De concentratie aan geoxideerde fosfolipiden (aldehyden en carboxylaat) werd gevarieerd tussen 0 % en 25 %. De belangrijkste waarneming in deze studie was dat de anionische groep in het carboxylaat een volledige omkering van de oriëntatie van de *sn2*-keten veroorzaakte (dit is de apolaire staart die de geoxideerde groep bevatte, nl. de oleoyl-keten). In de meest extreme gevallen (bij een concentratie van 25 %), penetreerde de carboxylgroep tot 1 nm in de waterlaag. Dit leidde eveneens tot een daling van de oppervlakte per lipide. Voor het niet-geladen oxidatieproduct (aldehyde) trad deze extreme heroriëntatie niet op. De resultaten van dit oxidatieproduct waren wel in overeenkomst met die van Wong-ekkabut, namelijk een toename van de oppervlakte per lipide, een afname van de dikte van de dubbellaag en een daling van de deuterium orde parameter.

Voortbouwend op het onderzoek van Wong-ekkabut, onderzocht Cwiklik et al. de gevolgen op de structuur van een DOPC membraan (hetwelke twee oleoyl-ketens, C18:1, bevat) indien alle lipiden werden vervangen door oxidatieproducten [85]. Ook deze studie maakte gebruik van het Berger krachtveld. Hierbij werden systemen voor vier verschillende oxidatieproducten geconstrueerd (aldehyden of alkylketens). Een zeer belangrijke waarneming hierbij was dat voor oxidatieproducten waarbij beide apolaire ketens werden geoxideerd, de vorming van poriën werd waargenomen. Indien slechts één van de apolaire ketens geoxideerd werd, kon de dubbellaag zijn structuur behouden. Andere waarnemingen waren in overeenstemming met voorgaande studies. Gelijktijdig werd in dezelfde groep door Beranova et al. gekeken naar het effect van oxidatie van een POPC membraan, wanneer slechts 10 % van de fosfolipiden werd geoxideerd [86]. Naast computationeel werd in dit werk eveneens experimenteel onderzoek uitgevoerd naar deze effecten. De resultaten die bekomen werden, waren in goede overeenkomst met de hierboven besproken studies.

Belangrijker is echter dat de computationele en experimentele waarnemingen elkaar bevestigden.

De review van Jurkiewicz et al. geeft een meer uitgebreid overzicht van de resultaten van de hierboven vermelde studies [66]. Bovendien worden de resultaten van MD studies hierin ook vergeleken met experimentele resultaten. Hieruit blijkt dat de MD-resultaten steeds direct te linken zijn aan experimentele waarnemingen.

In voorgaande studies werd steeds het Berger krachtveld (zie Hoofdstuk 3) gebruikt. Dit liet de onderzoekers in kwestie niet toe de invloed van cholesterol te onderzoeken. Vermits dit de basis vormt van één van de theorieën om de selectiviteit ten aanzien van kankercellen te verklaren, is dit een essentieel onderdeel voor plasma-geneeskunde. Een studie waarin ook het effect van cholesterol onderzocht wordt, is dus een duidelijke verruiming ten opzichte van alle voorgaande computationele onderzoeken betreffende de gevolgen van lipide peroxidatie.

HOOFDSTUK 2: BESCHRIJVING VAN DE METHODE

1. Moleculaire dynamica

1.1 Algemeen

In een moleculaire dynamica (MD) simulatie wordt de tijdsevolutie van een systeem gevolgd door de bewegingsvergelijkingen van elk gedefinieerd deeltje te integreren. Dergelijk deeltje kan overeenkomen met één atoom, hoewel in sommige varianten verschillende atomen worden gegroepeerd tot één effectief deeltje, ook wel pseudo-atoom genoemd (zie verder). Aan de hand van een simulatie wordt informatie bekomen over statische (structurele), maar ook dynamische eigenschappen van een systeem, op atomair niveau.

Om de bewegingsvergelijkingen op te kunnen lossen, zijn de krachten nodig die inwerken op de verschillende deeltjes. Op basis van de manier waarop de krachten bekomen worden, kan er een onderscheid gemaakt worden tussen twee types MD, namelijk *ab-initio* en klassieke MD. *Ab-initio* MD simulaties (kwantum mechanisch, QM) zijn meestal gebaseerd op de dichtheidsfunctionaaltheorie (DFT), waarin de systeemenergie beschreven wordt als een functionaal van de elektronendichtheid. Deze methode is zeer accuraat, maar heeft als nadeel dat ze erg tijd-intensief is. Hierdoor kunnen er slechts systemen van enkele honderden atomen gedurende een tijd van enkele tientallen picoseconden gevolgd worden [87]. Klassieke MD (klassieke moleculaire mechanica, MM) daarentegen, maakt gebruik van een reeds vooropgestelde interactiepotentiaal, dewelke in deze context ook krachtveld wordt genoemd. Het krachtveld definieert hierbij alle interacties tussen de aanwezige deeltjes in het systeem. De krachten die op deze deeltjes inwerken, worden vervolgens bekomen door de negatieve gradiënt te nemen van de interactiepotentiaal. Het grote voordeel van deze methode is dat systemen tot enkele honderdduizenden deeltjes kunnen gevolgd worden over tijdschalen tot enkele honderden nanoseconden.

In klassieke MD is het krachtveld veruit het belangrijkste onderdeel van de simulatie. Indien dit niet voldoende accuraat is, zullen de krachten die op de deeltjes inwerken onrealistisch zijn. Daar de krachten de tijdsevolutie, alsook de dynamische en structurele eigenschappen van het hele systeem bepalen, zullen deze laatste bijgevolg ook inaccuraat zijn. Gezien de cruciale rol van het krachtveld in de simulatie, wordt er in het volgende onderdeel in meer detail ingegaan op dit concept.

Naast *ab-initio* en klassieke MD, bestaat er ook een derde type MD, welke kan gezien worden als een kruising van de twee bovenstaande strategieën. Deze methode wordt de

kwantum mechanica/moleculaire mechanica benadering genoemd (QM/MM). Hierbij wordt een deel van het moleculair systeem via *ab-initio* MD gevolgd, terwijl het overige gedeelte de klassieke MD-methode volgt [88]. Het voordeel van deze aanpak is dat het maximaal aantal atomen bepaald wordt door de klassieke MD-methode, waardoor eveneens systemen tot enkele honderd duizenden deeltjes onderzocht kunnen worden. De tijdschaal blijft echter beperkt door de *ab-initio* methode.

1.2 Krachtveld

Zoals hierboven reeds werd aangehaald, wordt een krachtveld, of interactiepotentiaal ($V(\mathbf{r})$), in klassieke MD gebuikt om de krachten die inwerken op de deeltjes te bepalen. In het algemeen kan er een onderscheid gemaakt worden tussen twee types van krachtvelden, namelijk reactieve en niet-reactieve. Reactieve krachtvelden zijn in staat om gedurende de simulatie bestaande bindingen te breken en nieuwe bindingen te vormen. Een voorbeeld hiervan is het Reax krachtveld (ReaxFF) [89]. Omdat dit krachtveld geschikt is om nieuwe, onbekende, reacties te onderzoeken, werd dit ook gebruikt in een aantal van de toepassingen vermeld in Hoofdstuk 1 [77–81]. In dit onderzoek werden daarentegen enkel niet-reactieve krachtvelden gebruikt, waardoor er hier ook niet dieper wordt ingegaan op de reactieve krachtvelden.

Niet-reactieve krachtvelden zijn niet in staat om bindingen te breken of te vormen gedurende een simulatie. Chemische reacties onderzoeken is bijgevolg onmogelijk, maar er kan wel gekeken worden naar dynamische en statische eigenschappen van systemen. Het grote voordeel van deze krachtvelden is dat ze aanzienlijk sneller zijn dan hun reactieve tegenhanger, waardoor grotere systemen en/of langere tijdschalen onderzocht kunnen worden. De functionele vorm van een niet-reactieve interactiepotentiaal wordt voorgesteld in vergelijking 1.

$$E(\mathbf{r}) = E_{bindingen} + E_{hoeken} + E_{dihedralen} + E_{niet-gebonden} \quad (1)$$

De eerste drie termen brengen interacties in rekening tussen gebonden deeltjes, waarbij de eerste term de bindingsenergie tussen twee gebonden deeltjes bepaalt. De tweede en de derde term brengen respectievelijk de valentiehoeken tussen drie deeltjes en de dihedrale hoeken tussen vier deeltjes in rekening. De laatste term bepaalt dan weer de elektrostatische en Van der Waals interacties tussen niet-gebonden deeltjes. De functionele vorm van de verschillende termen wordt voorgesteld in onderstaande vergelijkingen.

$$E_{bindingen} = \sum_{bindingen} \frac{1}{2} K_{ij}^b (r_{ij} - r_{ij}^0)^2 \quad (2)$$

$$E_{hoeken} = \sum_{hoeken} \frac{1}{2} K_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 \quad (3)$$

$$E_{dihedralen} = \sum_{dihedralen} K^\varphi (1 + \cos(n\varphi - \varphi^0)) \quad (4)$$

$$E_{niet-gebonden} = \sum_{i < j} \frac{q_i q_j e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} + \sum_{i < j} \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \quad (5)$$

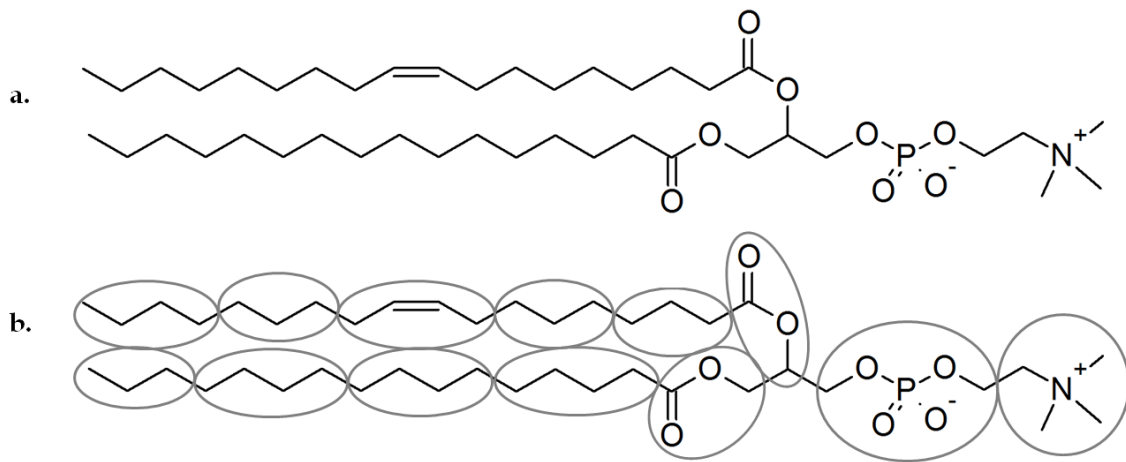
In deze vergelijkingen is r_{ij} de afstand tussen twee deeltjes i en j , en is q_i de partiële lading op deeltje i . A_{ij} en B_{ij} zijn de Lennard-Jones parameters. K^b , K^θ en K^φ stellen respectievelijk de krachtsconstanten van de bindingen, hoeken en dihedrale hoeken voor. De evenwichtswaarden voor bindingslengten, -hoeken en dihedrale hoeken worden voorgesteld door r^0 , θ^0 en φ^0 . De multipliciteit van de dihedrale hoek wordt weergegeven door n . ϵ_0 en e stellen de permitiviteit van vacuüm en de lading van een elektron voor.

Vergelijking 5 geeft bovendien aanleiding tot een belangrijke maatregel die genomen moet worden in grote systemen. Deze term brengt de interacties in rekening tussen elk paar niet-gebonden deeltjes. Voor een systeem met 1000 deeltjes leidt dit echter tot circa 500.000 termen die berekend moeten worden. Dit zou een enorm lange rekentijd met zich mee brengen. Om dit te vermijden, wordt een zogenoemde *cutoff* geïntroduceerd. Dit is een bepaalde afstand vanaf dewelke niet-gebonden interacties niet meer in rekening worden gebracht. Een typische waarde voor deze *cutoff* is 10 Å. De benadering van het invoeren van een *cutoff* kan gerechtvaardigd worden voor alle interacties behalve Coulomb interacties, vermits deze over een afstand groter dan 10 Å zeer weinig bijdragen tot de totale energie van het systeem. Om de Coulomb interacties over een langere afstand toch in rekening te brengen, wordt daarom de *Particle Mesh Ewald* methode gebruikt (zie verder).

Bij het ontwikkelen van een krachtveld moeten alle parameters die voorkomen in bovenstaande vergelijkingen bepaald worden voor elke combinatie van deeltjes die in het krachtveld aanwezig zijn. De parametrisatie kan gebeuren op verschillende manieren. Enerzijds kan deze gebaseerd zijn op experimentele data, zoals bijvoorbeeld solvatatie-energieën, diffusiecoëfficiënten of diëlektrische constanten. Anderzijds kunnen de parameters ook afgeleid worden uit kwantummechanische berekeningen. Aan de hand van

deze *ab-initio* berekeningen kunnen bijvoorbeeld bindingslengten of -hoeken afgeleid worden. In de praktijk worden beide methoden vaak gecombineerd.

Hierboven werd reeds aangehaald dat niet elk krachveld alle atomen afzonderlijk beschouwt. In sommige gevallen worden immers verschillende atomen gegroepeerd tot één effectief deeltje, wat ook wel een pseudo-atoom genoemd wordt. Twee verschillende benaderingen kunnen hierbij onderscheiden worden, op basis van de graad van detail die gebruikt wordt in het krachveld. De verschillende mogelijke methodes worden voorgesteld in figuur 10. Hieruit blijkt dat de grootste benadering wordt gemaakt in een *coarse-grained* krachveld.



Figuur 10: Voorstelling van de *united-atom* benadering (a) en de *coarse-grained* benadering (b) voor een POPC lipide (zie verder). In de *united-atom* benadering worden methyleen (CH_2) of methylgroepen (CH_3) in de apolaire staarten als één deeltje beschouwd. In figuur b stellen de grijze ovalsche deeltjes voor zoals deze gebruikt worden in het Martini krachveld. Een POPC molecuul bevat zo nog slechts 13 deeltjes, waar in een *united-atom* model eenzelfde molecuul wordt voorgesteld door 52 deeltjes. Ook dit laatste is nog steeds een aanzienlijke afname, gezien het *all-atom* model van POPC 134 atomen bevat.

In *coarse-grained* krachvelden worden typisch drie tot vijf zware atomen (geen waterstofatomen) gegroepeerd tot één *coarse-grained* deeltje. Door deze benadering daalt het aantal deeltjes in een bepaald systeem drastisch, waardoor de simulatie aanzienlijk versneld wordt. Het gevolg hiervan is dat, in vergelijking met een *all-atom* krachveld (waarbij elk atoom afzonderlijk wordt beschreven), veel grotere tijd- en lengteschalen mogelijk worden. Een *united-atom* krachveld bevindt zich tussen een *all-atom* en een *coarse-grained* krachveld in. Niet alle atomen worden expliciet beschreven, maar er worden ook geen zware atomen gegroepeerd. De benadering die doorgevoerd wordt is het groeperen van een koolstofatoom en de waterstofatomen die eraan gebonden zijn. Zo worden bijvoorbeeld de verschillende methyleengroepen (en de methylgroepen) in de apolaire staarten van het fosfolipide in figuur 10 elk tot één effectief deeltje gegroepeerd. Hierdoor daalt het aantal atomen eveneens sterk, zij het niet zo drastisch als in een *coarse-grained*

model. Polaire waterstofatomen, zoals in een alcohol-groep of in een watermolecule, worden nog steeds expliciet beschreven. Hierdoor is het bijvoorbeeld wel mogelijk om waterstofbruggen te vormen.

In eerste instantie werd in dit onderzoek geopteerd om een *coarse-grained* krachtveld te gebruiken, namelijk het Martini krachtveld [90]. Dit krachtveld is ontwikkeld voor biomoleculaire MD simulaties en zou zich dus uitstekend moeten lenen voor dit onderzoek. De belangrijkste reden voor deze keuze was dat aan de hand van dit krachtveld zeer grote systemen onderzocht kunnen worden over een lange tijdschaal (zie hierboven), zodat het mogelijk wordt om een zo realistisch mogelijke vertaling te maken van een membraan. In eerste instantie werden simulaties uitgevoerd voor niet-geoxideerde membranen, waarbij de lipidensamenstelling werd gevarieerd, zonder geoxideerde lipiden te implementeren. De resultaten die hieruit volgden waren veelbelovend. Typische membraaneigenschappen die bepaald werden van de verschillende membranen (zoals dikte van de dubbellaag, oppervlakte per lipide, etc.) waren immers in goede overeenkomst met experimentele resultaten.

De simulaties waarbij geoxideerde lipiden werden toegevoegd aan het systeem, leverden echter niet de gewenste resultaten op. Zowel dynamische als structurele eigenschappen van het membraan werden, volgens de simulaties, nauwelijks beïnvloed door de geoxideerde lipiden. Deze resultaten stemden niet overeen met wat in de literatuur, in zowel computationele als experimentele studies, beschreven staat [63,68,71]. Een belangrijke vaststelling was dat elke voorgaande MD studie, die ook handelde omtrent de gevolgen van geoxideerde lipiden op de lipide dubbellaag, gebruik maakte van een *united-atom* krachtveld, waardoor vermoed werd dat de afwijkende resultaten te wijten waren aan het gebruikte krachtveld. Dit vermoeden werd bevestigd door een artikel van de groep van Tieleman (die het Martini krachtveld eveneens mee ontwikkelde) [91]. Het vormen van poriën en waterdefecten in een lipide dubbellaag werd hierin vergeleken voor twee versies van het Martini krachtveld (standaard Martini [90] en *polarizable* Martini [92]) met het *united-atom* Berger krachtveld [93]. Hieruit bleek dat beide versies van het Martini krachtveld steeds kleine waterdefecten opleverden. Simulaties die dezelfde set-up gebruikten, maar waar het *united-atom* krachtveld werd gebruikt, leverden daarentegen wel poriën op, zoals verwacht werd. De verklaring voor dit verschil is nog onduidelijk, maar er wordt vermoed dat de krachten tussen watermoleculen en polaire groepen, die in de gebruikte setup werden toegevoegd in het midden van de dubbellaag, onderschat worden door het Martini krachtveld. Vermits oxidatie van de fosfolipiden eveneens leidt tot het vormen van een

polaire groep in de lipide staarten, zijn deze interacties net essentieel in onze studie. Als gevolg hiervan werd besloten dat het Martini krachtveld niet meer gebruikt kon worden voor dit onderzoek. Gezien de beperkte tijd van een master thesis, werd eveneens afgestapt van andere *coarse-grained* krachtvelden, zoals het ELBA krachtveld [94]. Het was hierbij immers niet op voorhand duidelijk of dergelijke krachtvelden al dan niet dezelfde problemen zouden ondervinden. Het nieuwe krachtveld dat gekozen werd voor deze studie, is het GROMOS 43A1-S3 krachtveld [95]. Dit krachtveld werd gekozen om de volgende redenen:

- i. Het is een *united-atom* krachtveld. Hierdoor is het mogelijk om, wanneer kleinere systemen gekozen worden, nog steeds tijdschalen tot enkele honderden nanoseconden te bereiken. Dit is noodzakelijk, vermits bijvoorbeeld het vormen van poriën zich afspeelt op een tijdschaal van meerdere nanoseconden [96].
- ii. In tegenstelling tot het Berger krachtveld, dat steeds werd gebruikt in voorgaande MD-studies naar de invloed van geoxideerde lipiden, is het GROMOS 43A1-S3 krachtveld wel geparаметeriseerd voor cholesterol. Hierdoor kan cholesterol ook geïmplementeerd worden in de modelsystemen. Dit is zeer interessant, gezien de belangrijke rol van cholesterol in een lipide dubbellaag en de mogelijke rol in het bestrijden van kankercellen (zie hierboven).

Naast cholesterol bevat het GROMOS krachtveld ook de nodige parameters voor een grote waaier aan lipiden. De peroxide- en aldehydegroepen die voorkomen in de geoxideerde structuren zijn echter nog niet opgenomen in dit krachtveld. De parameters werden daarom overgenomen uit de literatuur, en worden voorgesteld in tabel 1.

Tabel 1: Parameters die werden overgenomen uit referentie [63] voor de peroxide- en aldehydegroep in de geoxideerde lipiden. De functionele vorm voor de dihedrale hoeken die hierbij gebruikt wordt, is: $E = a(1+\cos(x-b)) + c(1+\cos(2x-d)) + e(1-\cos(3x-f))$, zoals werd voorgesteld in vergelijking 4 (voor $n=1, 2, 3$). De kolommen aangeduid met * hebben als eenheid $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, de kolommen aangeduid met † zijn in graden uitgedrukt.

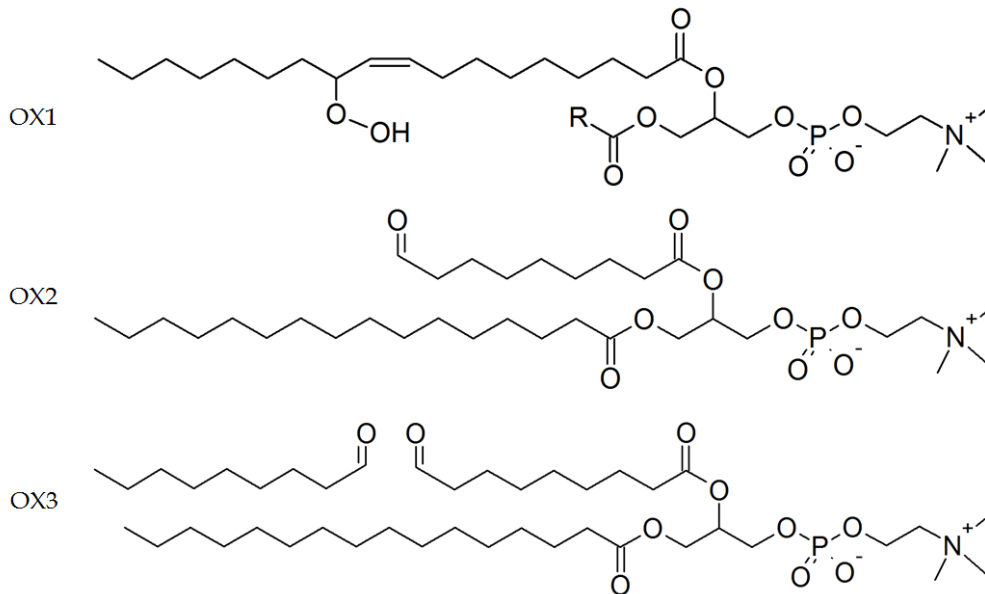
Bindingen						
Type binding	r_{ij} (nm)			K_{ij}^b ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$)		
C-O (peroxide)	0,14180			225670		
O-O (peroxide)	0,14430			269580		
O-H (peroxide)	0,09810			44130		
Hoeken						
Type hoek	α_0 (graden)			K_{ijk}^θ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{rad}^{-2}$)		
=C-C-O (peroxide)	104,00			418,40		
C-C-O (peroxide)	109,50			418,40		
C-O-O (peroxide)	105,90			598,37		
O-O-H (peroxide)	100,00			506,92		
Dihedrale hoeken						
Type dihedrale hoek	a*	b†	c*	d†	e*	f†
C=C-C-O (peroxide)	2,12	223,90	0	0	3,62	180,50
C-C-O-O (peroxide)	2,13	334,25	0	0	7,04	8,10
C-O-O-H (peroxide)	8,46	23,30	6,51	18,40	0	0
C-C-C=O (aldehyde)	0,47	180,00	1,58	180,00	2,67	180,00
Partiële ladingen						
Functionele groep	CH	O	O	H		
Hydroperoxide	0,30	-0,30	-0,45	0,45		
Aldehyde	0,53	-0,53	-	-		

In de volgende sectie wordt de opbouw van de verschillende modelsystemen besproken en worden de computationele details omtrent de simulaties overlopen.

2. Modelopbouw en simulatiedetails

Zoals in de inleiding werd besproken, bestaat de dubbellaag van een celmembraan in hoofdzaak uit lipiden en eiwitten. Gezien de cruciale rol van de lipiden voor de structuur van de dubbellaag, wordt in deze studie de benadering gemaakt dat het membraan enkel is opgebouwd uit lipiden. Deze benadering kan eveneens gerechtvaardigd worden door de kleine lengteschaal van het modelsysteem dat gebruikt wordt (zie verder). Naast deze eerste benadering werd initieel geopteerd om een modelsysteem op te bouwen dat een zo realistisch mogelijke vertaling voorstelde van een werkelijk plasmamembraan. Binnen één systeem werden variaties aangebracht in de lengte en het aantal dubbele bindingen in de vetzuurstaarten, en werden de kopgroepen eveneens gevarieerd (zowel fosfatidylcholines, fosfatidylethanolamines, fosfatidylserines, etc.). Dit was mogelijk vermits het Martini krachtveld toeliet om dubbellen te simuleren die in totaal circa 2000 lipiden bevatten. Bij het overschakelen naar het *united-atom* GROMOS krachtveld, werd de grootte van het modelsysteem echter teruggebracht naar 72 lipiden, waardoor geopteerd werd om dubbellen op te bouwen die slechts één type lipide bevatten, namelijk 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholine (POPC - zie figuur 10). Dit lipide is opgebouwd uit twee apolaire vetzuurstaarten (palmitine- en oliezuur), dewelke beide veresterd zijn aan een glycerol molecule. De derde OH-groep van glycerol is gebonden aan een fosfaatgroep (PO_4^-), dewelke zelf via een tweede zuurstofatoom veresterd is aan choline, $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$. Allereerst werd voor fosfolipiden gekozen, daar dit type lipiden de grootste fractie vormt binnen de lipidengroep. Verder werd POPC ook gekozen vermits dit een gemiddelde ketenlengte (palmitine- en oliezuur bevatten respectievelijk 16 en 18 koolstofatomen) en een gemiddeld aantal dubbele bindingen (respectievelijk 0 en 1) bezit.

De oxidatieproducten die gebruikt worden in de modelsystemen worden weergegeven in figuur 11. OX1 wordt gevormd door peroxidatie van POPC, waarbij het gevormde lipide peroxy radical een waterstofatoom onttrekt van bijvoorbeeld een ander lipide. De vorming van OX2 en OX3 werd besproken in figuur 8.



Figuur 11: Voorstelling van de verschillende oxidatieproducten die gebruikt worden in deze studie.

Door zowel OX2 als OX3 te testen kan de invloed van het kleine aldehyde, dat overblijft na de splitsing, worden nagegaan. In gelijkaardige studies in de literatuur werden dergelijke structuren namelijk nooit beide meegenomen in het model [63,96]. Hierdoor kon nooit een vergelijking worden gemaakt tussen de twee oxidatieproducten, waaruit het effect van het kleine aldehyde afzonderlijk kan afgeleid worden.

Om het effect van bovenstaande geoxideerde structuren op de dubbellaag na te gaan, werd de concentratie ervan gevarieerd tussen 0 % en 100 %. Hiervoor werden in totaal 47 modelsystemen opgebouwd. Elk systeem bevatte naast 72 lipiden ook steeds 4000 watermoleculen, die allen in een box van ongeveer $5,5 \times 5,5 \times 11 \text{ nm}^3$ werden geplaatst. De verhouding van watermoleculen per lipide bedraagt meer dan 50, waardoor er zeker gesproken kan worden van een volledig gehydrateerde dubbellaag. De experimentele verhouding bedraagt immers 32,5 [97]. De lipidesamenstelling van de modelsystemen die werden opgebouwd voor OX1 (peroxide), wordt in tabel 2 weergegeven. De waarden die hierbij getoond worden, zijn gesommeerd over beide lagen van de lipide dubbellaag. Beide lagen zijn overigens steeds symmetrisch gemaakt (indien mogelijk). Voor OX2 en OX3 werden dubbellaagen met identieke samenstellingen geconstrueerd.

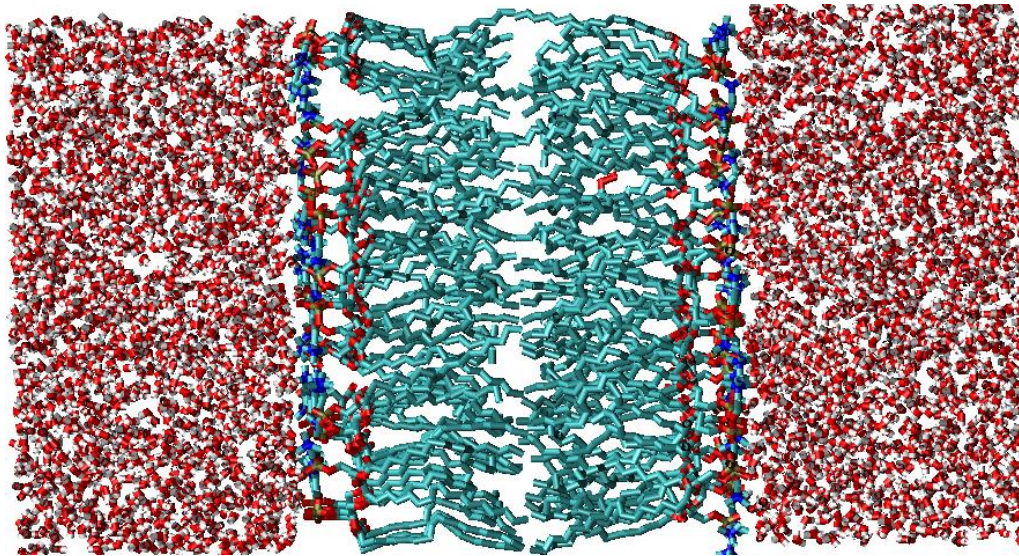
Tabel 2: Samenstelling van de verschillende modellen die werden opgebouwd voor OX1.

Model	POPC	Cholesterol	OX1	Concentratie geoxideerde fosfolipiden (%)
1	72	0	0	0
2	70	0	2	2,8
3	68	0	4	5,6
4	64	0	8	11,1
5	54	0	18	25
6	36	0	36	50
7	26	0	46	63,9
8	14	0	58	80,6
9	0	0	72	100
10	36	36	0	0
11	35	36	1	2,8
12	34	36	2	5,6
13	32	36	4	11,1
14	28	36	8	22,2
15	24	36	12	33,3
16	18	36	18	50
17	0	36	36	100

Zoals hierboven werd besproken, is de cholesterolfractie in het plasmamembraan sterk verschillend voor een normale, gezonde cel, en een kankercel. Uit tabel 2 volgt dat modelsystemen 1 tot 9 geen cholesterol bevatten. Door de resultaten van deze systemen te vergelijken met die van systemen 10 tot 17 kan aldus de invloed van cholesterol worden nagegaan. Systemen met cholesterol kunnen hierbij gezien worden als model voor een normaal plasmamembraan, terwijl systemen zonder cholesterol gezien kunnen worden als een eerste benadering voor het plasmamembraan van een kankercel.

De initiële configuratie van elk systeem werd geconstrueerd aan de hand van het Packmol script [98]. Dit script gebruikt de structuur van bijvoorbeeld één POPC molecule, en plaatst deze structuur een gedefinieerd aantal keer in een op voorhand gedefinieerde ruimte. Door dit zowel voor de boven- als de onderlaag te doen, alsook voor beide waterlagen, wordt een dubbellaag gecreëerd. Een snapshot van de initiële structuur van model 2 uit tabel 2 wordt weergegeven in figuur 12. Deze structuur werd gevisualiseerd door het programma

VMD (Visual Molecular Dynamics), net zoals alle andere 3D structuren die in deze thesis worden getoond [99].



Figuur 12: Initiële structuur van modelsysteem 2 uit tabel 2, zoals deze wordt weergegeven door VMD. Rode delen stellen zuurstof voor, wit staat voor waterstof, donkerblauw voor stikstof, lichtblauwe delen geven koolstof weer en oranje staat voor fosfor.

Met uitzondering van de dubbellaag waarin enkel POPC wordt opgenomen (modelsysteem 1 uit tabel 2), zijn alle dubbellagen een mengsel van 2 of meerdere lipiden. Om deze zo realistisch mogelijk te maken, wordt door Packmol een random verdeling van deze lipiden gegenereerd. Atomen van verschillende lipiden worden overigens steeds op een minimale afstand van 2 \AA van elkaar geplaatst, om onrealistisch grote krachten in het begin van de MD simulatie te vermijden. Dit heeft echter tot gevolg dat de initiële structuur verre van de optimale evenwichtsstructuur is. Hierdoor wordt in eerste instantie een energiminimalisatie uitgevoerd, waarbij gebruik gemaakt wordt van het *steepest-descent* algoritme.

Hierna wordt een equilibratie uitgevoerd in het NPT-ensemble. In dergelijk ensemble worden het aantal deeltjes, de temperatuur en de druk constant gehouden. Om de temperatuur constant te houden, wordt het systeem gekoppeld aan een extern warmtebad. In dit onderzoek wordt hiervoor de Nosé-Hoover thermostaat gebruikt bij een referentietemperatuur van 303 K en een koppelingsconstante van 0,2 ps [100]. Lipiden en watermoleculen werden hierbij elk apart gekoppeld. De druk werd gecontroleerd via het semi-isotrope (apart voor x/y en z) Parinello-Rahman koppelingschema, met een referentiedruk van 1 atmosfeer, een compressibiliteit van $4,5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$, en een koppelingsconstante van 1 ps. Verder werden in iedere simulatie periodische randvoorwaarden toegepast in alle drie dimensies.

De tijdstap die gebruikt werd bij het integreren van de bewegingsvergelijkingen bedroeg steeds 2 fs, waarbij in totaal 40 miljoen iteraties werden doorlopen. Dit levert een totale gesimuleerde tijd op van 80 ns. De cutoff werd ingesteld op 1 nm voor Coulomb interacties en 1,6 nm voor Van der Waals interacties. Zoals hierboven aangehaald, werd voor elektrostatische interacties over langere afstand de Particle Mesh Ewald (PME) methode gebruikt [101,102]. Hierbij werd voor de interacties in de echte ruimte opnieuw een cutoff van 1 nm gebruikt, waar voor interacties in de reciproke ruimte deze methode gebruik maakt van een grid. De *spacing* van deze grid werd ingesteld op 0,15 nm.

De laatste structuur van deze simulatie werd steeds gebruikt als inputgeometrie voor de uiteindelijk productierun. Voor deze nieuwe *run* gelden identiek dezelfde parameters als in voorgaande (betreffende temperatuur, druk, tijdstap, etc.). De geometrie van het systeem werd hierbij elke 100 ps weggeschreven, zodat deze gegevens gebruikt kunnen worden om parameters uit te middelen tijdens de analyse. De simulaties, alsook de analysemethoden die hieronder besproken worden, maakten allemaal gebruik van het GROMACS 4.6 software pakket [103].

3. Analysemethoden

Om de invloed van de geoxideerde lipiden na te gaan werden een aantal typische eigenschappen van lipide dubbellaagen nagegaan voor elk opgebouwd modelsysteem. Hoe deze eigenschappen bepaald worden, wordt hieronder besproken.

3.1 Oppervlakte per lipide

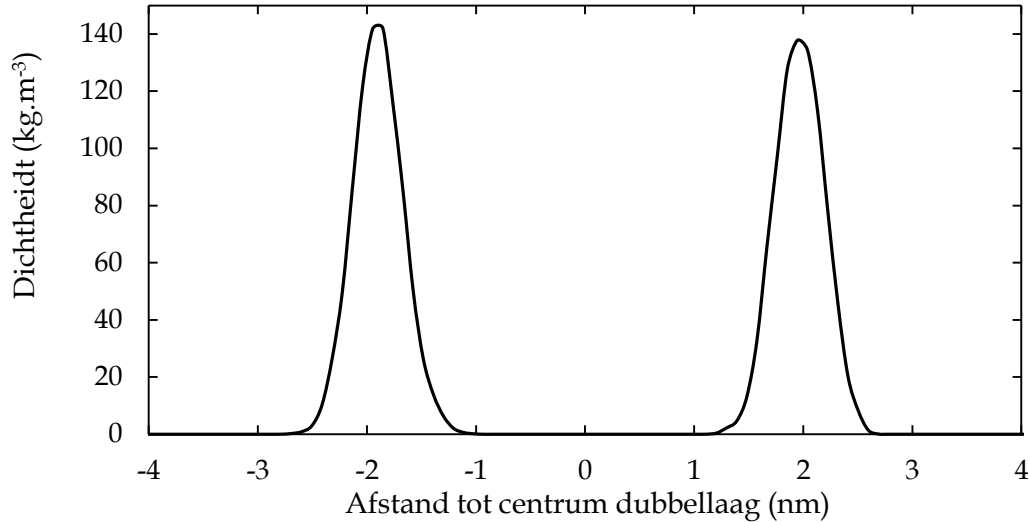
De oppervlakte per lipide wordt berekend door de oppervlakte van het hele systeem te delen door het aantal lipiden die zich in één laag bevinden, zijnde 36. De oppervlakte van het systeem wordt bekomen door deze na elke 100 ps te berekenen en het gemiddelde te nemen over de volledige 80 ns van de productierun. Om een schatting te verkrijgen van de foutenmarge op deze waarde wordt de blokmethode van Hess toegepast [104].

3.2 Dikte van de dubbellaag

In de literatuur bestaan vele definities om de dikte van de dubbellaag te definiëren. Hiervoor kan onder meer de afstand tussen de fosfaatgroepen of de cholinegroepen, maar ook de dikte van de apolaire staarten gebruikt worden. In dit onderzoek wordt steeds de afstand tussen de fosfaatgroepen gebruikt. Deze definitie werd gekozen om de waarden die bekomen worden te kunnen vergelijken met waarden uit de literatuur.

Om de fosfaatgroepen te lokaliseren wordt elke simulatiebox volgens de z-as verdeeld in 100 intervallen met eenzelfde breedte. Binnen elk van deze intervallen wordt vervolgens

de dichtheid van fosfor bepaald. Deze dichtheid wordt elke 100 ps weggeschreven en nadien uitgemiddeld over de hele simulatie. Een voorbeeld van een curve die hiermee bekomen wordt, is weergegeven in figuur 13, opnieuw voor modelsysteem 2 uit tabel 2. Uit de afstand tussen de maxima twee pieken kan bijgevolg de gemiddelde dikte van de dubbellaag worden geschat. De curve is overigens gecentreerd rond het centrum van de dubbellaag.



Figuur 13: Dichtheid van fosfor langs de z-as van de simulatiebox. De piek-tot-piek afstand bepaalt de dubbellaagdikte.

De fout op deze waarde wordt bepaald door de breedte van de intervallen die gedefinieerd worden langs de z-as. Dit wordt duidelijk gemaakt in volgend voorbeeld.

Stel dat de dubbellaag, met beide waterlagen mee gerekend, in totaal 8 nm langs de z-as meet. De breedte van elk interval zal bijgevolg 0,08 nm meten, waardoor de middelbare fout (MF) op elk van de twee maxima 0,04 nm bedraagt. De middelbare fout op de berekende dikte wordt berekend volgens onderstaande vergelijking:

$$MF_{dikte} = \sqrt{(MF_{piek\ 1})^2 + (MF_{piek\ 2})^2} = \sqrt{(0,04\ nm)^2 + (0,04\ nm)^2} = 0,06\ nm \quad (6)$$

Dit is uiteraard slechts een voorbeeld. De totale lengte langs de z-as varieert immers voor elk systeem, waardoor ook de intervallen verschillend zijn per systeem.

3.3 Deuterium orde parameter

De deuterium orde parameter, S_{CD} , kan als maatstaf gezien worden voor de orde in de lipide staarten van de dubbellaag. Een groot voordeel van deze parameter is dat deze ook experimenteel gemeten kan worden aan de hand van NMR. Hierdoor kunnen

computationele en experimentele waarden met elkaar vergeleken worden. De deuterium orde parameter is gedefinieerd als volgt:

$$S_{CD} = \frac{1}{2} \langle 3\cos^2(\theta_j) - 1 \rangle \quad (7)$$

θ_j stelt hierbij de hoek tussen een koolstof-deuterium (C-D) binding en de normaal van het membraan (z-as) voor. Een S_{CD} waarde van 1 komt overeen met perfecte oriëntatie langs de z-as. Indien de lipide staarten daarentegen loodrecht op de z-as georiënteerd zijn, wordt de deuterium orde parameter $-1/2$. De rechte haakjes in vergelijking 7 duiden op een uitmiddeling over twee C-D bindingen in een CD_2 groep, over alle lipiden en over de tijd. De C-D bindingen, die niet aanwezig zijn in een *united-atom* representatie, worden voor de analyse toegevoegd aan de koolstofatomen van de lipide staarten. De deuteriumatomen worden hierbij volgens een ideale tetragonale symmetrie geplaatst. De deuterium orde parameter wordt steeds bepaald voor elk koolstofatoom van de *sn-1* keten, nl. de palmitoyl-keten, dewelke niet geoxideerd wordt. Deze waarden worden vervolgens uitgemiddeld over de hele keten, om zo tot één waarde te komen die vergeleken kan worden in verschillende modelsystemen.

3.4 Waterdichtheid

Als maatstaf voor de polariteit van de binnenzijde van het membraan, wordt de gemiddelde waterdichtheid in de binnenste 1 nm bepaald, die eveneens wordt uitgemiddeld over de hele simulatietijd. Het berekenen van de waterdichtheid verloopt analoog aan de berekening van de fosfordichtheid, beschreven in sectie 3.2.

3.5 Visuele controle

Naast de waarden die hierboven bepaald worden, is een visuele controle van de tijdsevolutie van het systeem ook zeer belangrijk. Onder meer een proces als de vorming van poriën kan een zeer interessante waarneming vormen in de context van plasma-oncologie, maar kan moeilijk worden uitgedrukt in één van bovenstaande waarden. Belangrijke visuele waarnemingen zijn in volgend hoofdstuk dan ook toegevoegd waar nodig, en worden geïllustreerd aan de hand van snapshots van de simulatie.

HOOFDSTUK 3: RESULTATEN EN DISCUSSIE

1. Validatie krachtveld

Om het GROMOS 43A1-S3 krachtveld te valideren werd in eerste instantie gekeken naar de oppervlakte per lipide en de dikte van de dubbellaag voor een zuivere POPC dubbellaag. In onderstaande tabel worden deze waarden vergeleken met experimentele of andere computationele studies uit de literatuur [105–107]. De kwalitatieve overeenkomst die blijkt uit deze tabel bewijst de accurateheid van het GROMOS 43A1-S3 krachtveld voor het gebruikte systeem.

Tabel 3: Vergelijking van berekende en experimentele waarden voor een zuivere POPC dubbellaag.

	Berekende waarde	Experimentele waarde
Oppervlakte per lipide (\AA^2)	$63,5 \pm 0,4$	63,0 - 64,3
Dikte dubbellaag (\AA)	$38,6 \pm 0,6$	37,5 - 39,1

In wat volgt wordt eerst gekeken naar de invloed van de concentratie aan oxidatieproducten. Nadien wordt nagegaan in welke mate cholesterol de eigenschappen van zowel niet-geoxideerde als geoxideerde membranen beïnvloedt, waaruit ook het effect van het kleine aldehyde in OX3 duidelijk wordt. In een laatste sectie wordt het effect van een variërende cholesterolconcentratie besproken voor systemen die, naast cholesterol, enkel OX3 bevatten. De keuze voor dit oxide volgde uit de resultaten van voorgaande simulaties (zie verder).

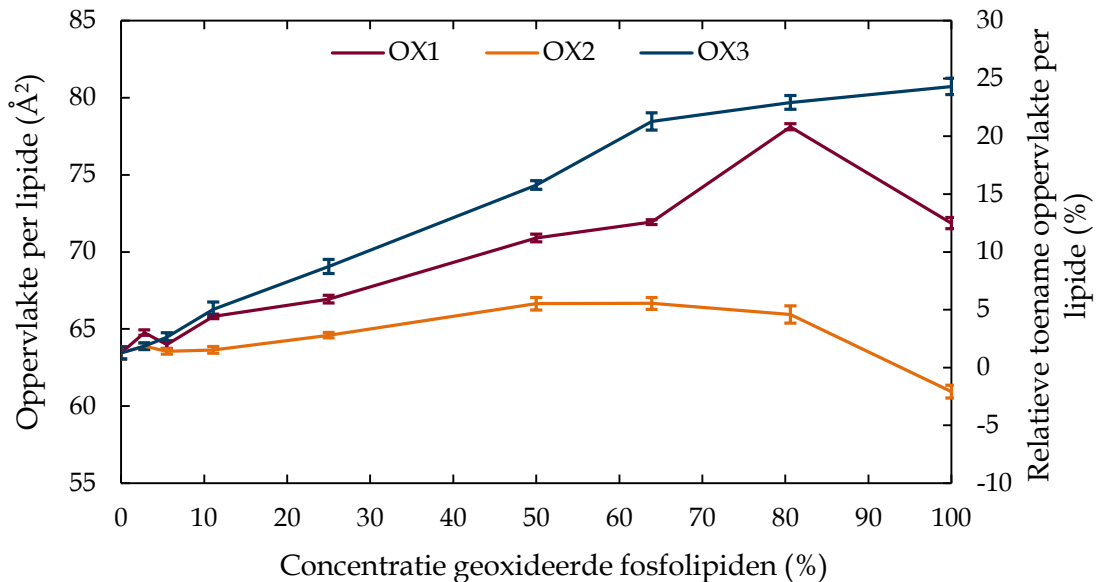
2. Invloed concentratie oxidatieproducten

Om de invloed van de concentratie aan oxidatieproducten na te gaan, werd gekeken naar de systemen zonder cholesterol, dewelke dus enkel POPC en een van de drie oxidatieproducten bevatten. De concentratie van de oxidatieproducten wordt hierbij gevarieerd tussen 0 en 100%. Elk systeem bevat in totaal steeds 72 lipiden, waarbij in de verschillende modelsystemen 2, 4, 8, 18, 36, 46, 58 of 72 (of respectievelijk 2.8, 5.6, 11.1, 25, 50, 63.9, 80. 100 %) van de POPC moleculen werden vervangen door één van de oxidatieproducten (OX1, OX2 of OX3). Een concentratie van 100 % kan overigens gerechtvaardigd worden, daar lipide peroxidatie een kettingreactie is (zie mechanisme in figuur 7). De propagatiestap kan er hierbij voor zorgen dat op nanoschaal (zoals in het gesimuleerde systeem), alle lipiden geoxideerd worden, zonder dat het hele plasmamembraan van een cel (grootte-orde van micrometers) geoxideerd hoeft te zijn. De

exacte waarden voor de oppervlakte per lipide, de dikte van de dubbellaag, de gemiddelde deuterium orde parameter en de gemiddelde waterdichtheid, zijn terug te vinden in tabellen 1-3 uit de bijlage.

2.1 Oppervlakte per lipide

Uit figuur 14 blijkt voor elk van de drie systemen dat de oppervlakte per lipide in het algemeen toeneemt in functie van een stijgende oxidatiegraad van het systeem. Het effect is hierbij het sterkst voor OX3. Een mogelijke oorzaak hiervoor is het vormen van twee korte, mobiele ketens in OX3 bij oxidatie. Deze kortere ketens kunnen, dankzij hun hoge mobiliteit, makkelijker van conformatie veranderen om zo de structuur van de dubbellaag te beïnvloeden. In het peroxide (OX1), blijven daarentegen beide lange, apolaire staarten aanwezig, waardoor het voor de polaire groep (-OOH groep) moeilijker is om de eigenschappen van de dubbellaag te wijzigen. OX2 kan moeilijk met de andere oxidatieproducten vergeleken worden, aangezien er hier twee effecten meespelen die elkaar tegen werken (zie verder). Voor de sterke toename in de kurve van OX1 bij een oxidatiegraad van 80 %, gevolgd door opnieuw een sterke afname bij volledige oxidatie, is momenteel nog geen verklaring. Uit de analyse van andere parameters (secties 2.2 en 2.4), blijkt echter dat voor deze systemen opnieuw onverklaarbare trends worden waargenomen. Bijkomende controlesimulaties zijn opgestart, maar de resultaten hiervan konden niet meer bekomen worden binnen het tijds kader van deze thesis.



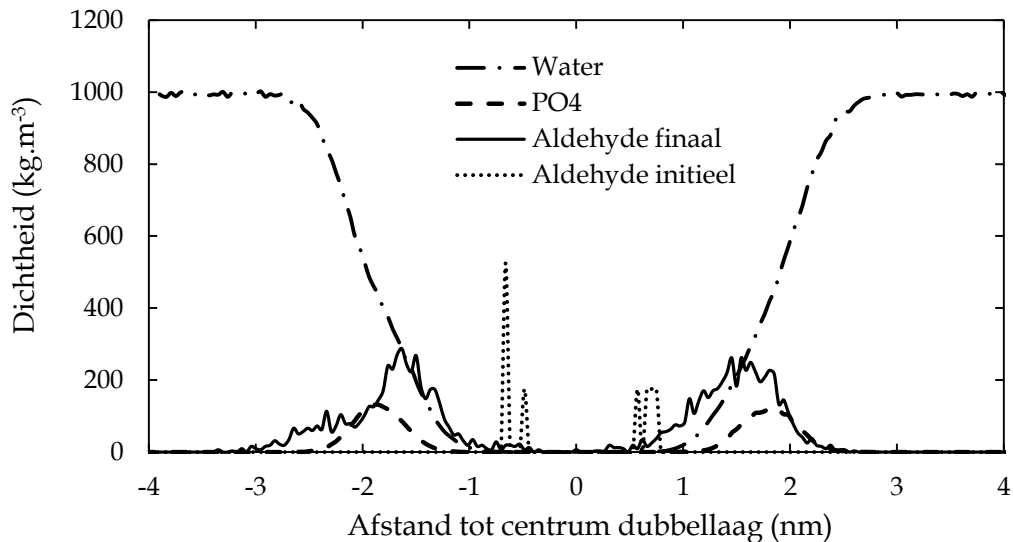
Figuur 14: Oppervlakte per lipide uitgedrukt in functie van de concentratie aan geoxideerde fosfolipiden, voor elk van de drie oxidatieproducten.

De relatieve toename, die is weergegeven op de secundaire verticale as, wordt berekend aan de hand van onderstaande vergelijking.

$$\text{Relatieve toename}_i (\%) = \left(\frac{\text{Oppervlakte per lipide}_i}{\text{Oppervlakte per lipide}_{0\% \text{ oxidatie}}} - 1 \right) \times 100 \quad (8)$$

De waargenomen trend stemt overeen met zowel experimentele als computationele waarnemingen in de literatuur [63,66,96]. Bij een oxidatiegraad van 50 %, werd in de studie van Wong-ekkabut bijvoorbeeld ook een toename van circa 10 % waargenomen voor een oxidatieproduct dat gelijkaardig is aan OX1 [63]. Deze toename kan verklaard worden doordat de polaire groepen (aldehyde of peroxide), gevormd na oxidatie, geneigd zijn om naar de waterlaag toe te buigen. Hierdoor zullen ze immers de interacties (onder meer H-bruggen) met watermoleculen maximaliseren. De apolaire staarten van de lipiden gaan aldus van een uitgerekte lineaire structuur naar een gebogen conformatie, waardoor ze een grotere oppervlakte innemen in het membraan.

Deze waarneming wordt eveneens bevestigd door de dichtheid van de aldehydegroepen van OX3 weer te geven in functie van de afstand tot het centrum van de dubbellaag, zoals getoond in figuur 15. In deze figuur wordt de positie van de aldehydegroepen (van het grote aldehyde, zie figuur 11) geplot in functie van de afstand tot het centrum van de dubbellaag, in enerzijds de structuur die door Packmol gegenereerd is, en anderzijds gedurende de productierun (uitgemiddeld over de tijd). De fosfaat- en waterdichtheid worden eveneens getoond, om de positie van de dubbellaag aan te duiden. Zoals verwacht bevinden de aldehydegroepen zich initieel halverwege de dubbellaag, aangezien daar de oxidatie ook plaatsvindt. Doorheen de equilibratieperiode, buigen ze echter naar de fosfaatgroepen toe, omdat ze daar kunnen interageren met de watermoleculen (de waterdichtheid is daar immers aanzienlijk groter). Vermits dit de stabielste situatie is, blijven de aldehydegroepen op die positie gedurende de productierun, zoals onderstaande grafiek weergeeft.



Figuur 15: Dichtheden van water, fosfaatgroepen en aldehydegroepen van OX3 uitgedrukt in functie van de afstand tot het centrum van de dubbellaag. De kurve 'Aldehyde initieel' geeft de positie weer in de structuur gegenereerd door Packmol, de kurve 'Aldehyde finaal' is de positie van de aldehydegroep doorheen de productierun.

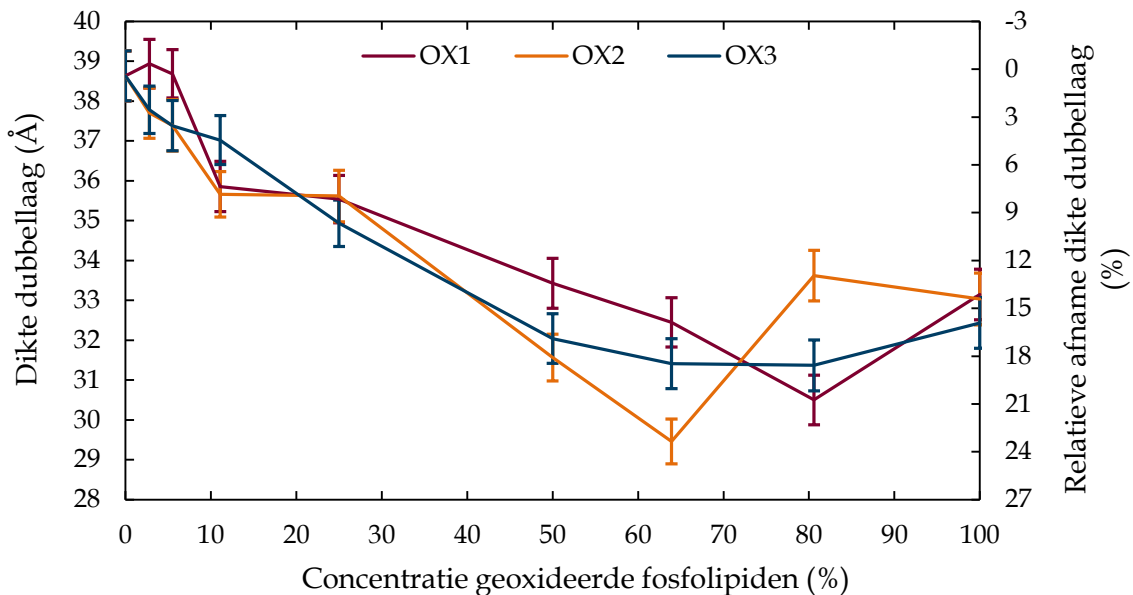
De enige uitzondering op de hierboven besproken toename in de oppervlakte per lipide bij toenemende oxidatiegraad, wordt opgemerkt voor OX2 bij 100 % oxidatie, waar de oppervlakte per lipide terug daalt tot onder de waarde van het zuivere lipide (zie figuur 14). Een mogelijke oorzaak hiervoor is de vermindering van het aantal koolstofatomen in vergelijking met een niet-geoxideerd POPC lipide. OX2 bevat namelijk niet het kleine aldehyde, zoals het geval is bij OX3. Hierdoor wordt bij het vervangen van POPC door OX2 extra lege ruimte toegevoegd in de dubbellaag. Door deze lege ruimtes kan de structuur inkrimpen in de drie dimensies. Dit effect werkt het uitzettend effect, vanwege de wanorde die veroorzaakt wordt door de oxidatieproducten tegen. Het uiteindelijke resultaat is aldus het verschil van beide effecten. Indien de oppervlakte per lipide opnieuw daalt, kan dit er dus op wijzen dat het inkrimpend effect, veroorzaakt door het creëren van lege ruimtes, de overhand neemt van het uitzettend effect van de polaire groepen in dit systeem. Uit de vergelijking van de twee curves (voor OX2 en OX3) kan afgeleid worden dat het kleine aldehyde een groot effect heeft op de gevolgen van lipide peroxidatie op de dubbellaag.

2.2 Dikte van de dubbellaag

In eerste instantie kan de lipide dubbellaag gezien worden als een niet-samendrukbare vloeistof, waarbij het volume die de dubbellaag inneemt een constante is. Hieruit volgt dat, indien de totale oppervlakte van het membraan toeneemt, de dikte van de dubbellaag zou moeten afnemen. Bij het opvoeren van de concentratie aan geoxideerde lipiden werd deze trend ook waargenomen. Figuur 16 visualiseert deze trend, opnieuw voor de drie

verschillende oxidatieproducten. Vanwege de dalende trend wordt op de secundaire verticale as ditmaal de relatieve afname weergegeven. Deze waarde is het tegenovergestelde van de relatieve toename, waarvan de formule werd voorgesteld in vergelijking 8.

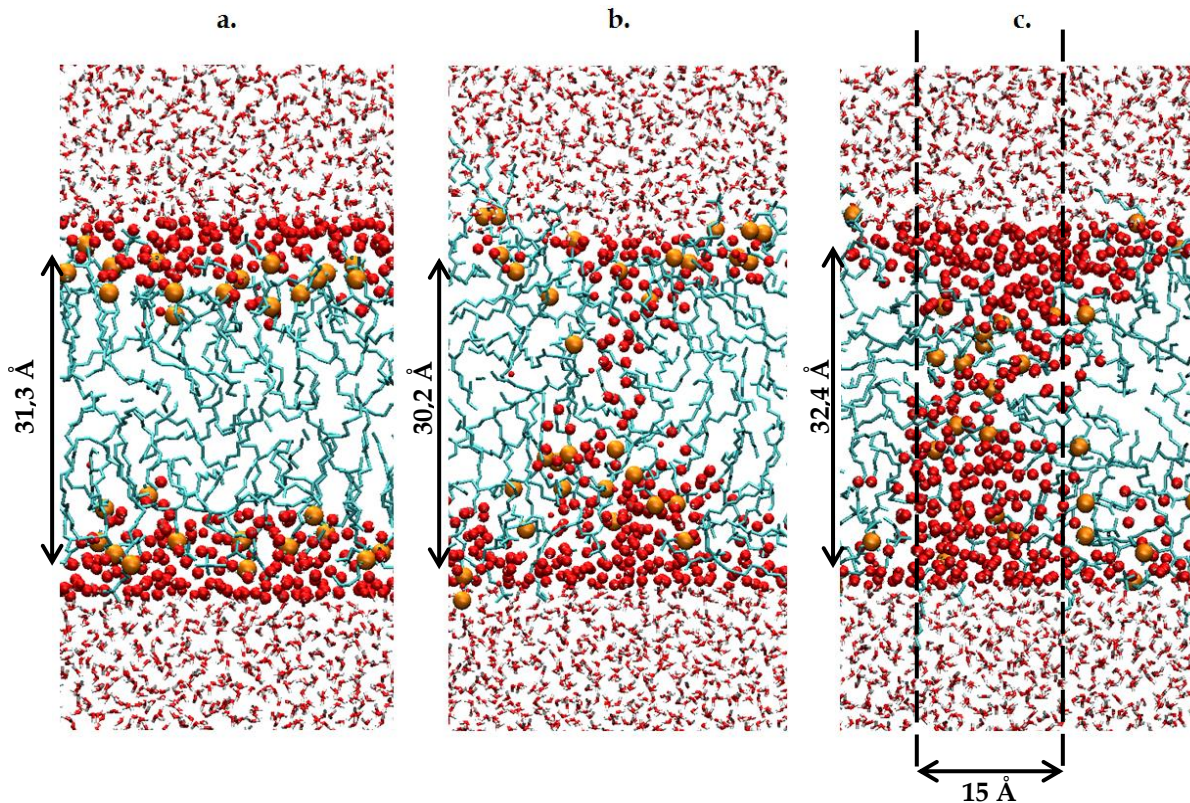
Net zoals in de oppervlakte per lipide (figuur 14), heeft OX3 wederom een grotere invloed dan OX1 (met uitzondering van de waarde bij 80 % oxidatie). De verklaring hiervoor is dezelfde als diegene die hierboven reeds werd aangehaald. Ook hier kan wederom OX2 moeilijk vergeleken worden met de andere, daar opnieuw de twee effecten die hierboven werden vermeld meespelen. Voor de dikte van de dubbellaag versterken deze effecten elkaar echter. Zowel de wanorde die de polaire oxidatieproducten veroorzaken, als de lege ruimtes die gecreëerd worden, zorgen ervoor dat de dikte van de dubbellaag zal afnemen. Dit verklaart ook het sterke effect van OX2 op de dikte van de dubbellaag (zie figuur 16).



Figuur 16: Dikte van de dubbellaag uitgedrukt in functie van de concentratie aan geoxideerde fosfolipiden, voor elk van de drie oxidatieproducten.

De stijging die wordt waargenomen bij een concentratie van 100 % (voor OX 3), en vanaf een concentratie van 81,6 % (voor OX2), kan verklaard worden door de porievorming die tijdens de simulaties wordt vastgesteld. Deze porie zorgt er voor dat water wordt opgenomen in de dubbellaag, waardoor deze opnieuw opzwellt en de membraandikte bijgevolg toeneemt. De porievorming in het systeem van OX3 (bij 100 % oxidatie) is in overeenstemming met de studie van Cwiklik et al. Hierin werd, bij volledige oxidatie van het membraan, de vorming van een porie met gelijkaardige diameter (zie verder) namelijk ook waargenomen voor een oxidatieproduct dat identiek is aan OX3 (voor DOPC in plaats van POPC) [85]. Het hele proces wordt geïllustreerd in figuur 17. Deze figuur werd bekomen

door een doorsnede te nemen van het systeem, langs de z-as en door het centrum van de porie.



Figuur 17: Vorming van een porie in een simulatie met 72 OX3 lipiden. Figuren a, b en c geven de structuur weer na respectievelijk 10, 60 en 120 ns. Rood staat voor zuurstof, oranje voor fosfor en waterstof is wit gekleurd. De lipiden zijn in hun geheel lichtblauw gekleurd. In elke figuur is de fosfaat-fosfaat afstand aangeduid, en in figuur c wordt eveneens de diameter van de porie weergegeven.

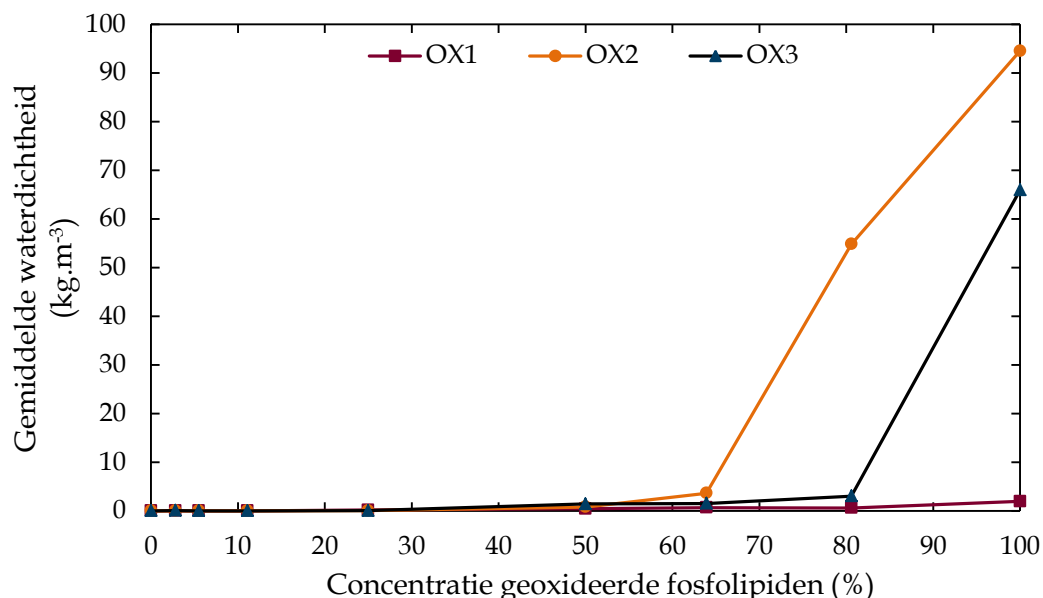
De watermoleculen in de porie zijn hierin steeds als rode sferen weergegeven. Deel (a) stelt de initiële conformatie voor van de lipide dubbellaag, waarbij nog geen waterdefecten gevormd zijn. Na 60 ns (b) is er al een aanzienlijke hoeveelheid water gediffundeerd tot in het centrum van de dubbellaag. Gezien de polaire kopgroepen nog niet helemaal ingesnoerd zijn, kan afgeleid worden dat deze watermoleculen in eerste instantie gestabiliseerd moeten worden door de aldehydegroepen die gecreëerd werden door oxidatie van de lipide staarten. Na 120 ns (c) zijn de kopgroepen mee gemigreerd naar het centrum van de dubbellaag. De insnoering, zoals werd voorgesteld in figuur 9 is voltrokken, wat tot de vorming van een porie heeft geleid. Voor elk tijdstip wordt ook de dikte van de dubbellaag aangeduid in figuur 17. In eerste instantie (a naar b), neemt de dikte nog af. Dit is het gevolg van de wanorde die de oxidatieproducten veroorzaken. Vervolgens (b naar c), zwelt het membraan opnieuw op, ten gevolge van het opnemen van water in de structuur. De maximale diameter van de porie die hierbij gevormd wordt, bedraagt circa 15 Å. Dit is een belangrijk vaststelling in het kader van plasma-geneeskunde, daar dergelijk microporiën te klein zijn om de

migratie van hele organellen of macromoleculen als eiwitten, doorheen het membraan, mogelijk te maken. Dat deze entiteiten niet uit de cel kunnen diffunderen, kan mogelijk een verklaring vormen waarom apoptose, en geen necrose, experimenteel wordt waargenomen [39]. Plasmadeeltjes (bv. RONS) zijn daarentegen wel klein genoeg om doorheen deze poriën in de cel te kunnen migreren.

Dat de porievorming in systemen met OX2 reeds bij een lagere oxidatiegraad mogelijk is, kan verklaard worden door de kleine dikte van de dubbellaag in het systeem bij 63,9 % oxidatie (zie figuur 16). Doordat het membraan zo dun wordt, kunnen watermoleculen sneller tot in het centrum van de dubbellaag migreren (langs beide zijden), om zo een porie te vormen. Systemen met OX1 leverden eenzelfde verloop op voor de dikte van de dubbellaag of de oppervlakte per lipide in functie van de concentratie geoxideerde fosfolipiden, zoals blijkt uit bovenstaande figuren, maar binnen de gesimuleerde tijd trad in deze systemen geen porievorming op. Dat er in de systemen die OX2 en OX3 een aanzienlijke hoeveelheid water in staat is om door het membraan te diffunderen, kan ook afgeleid worden uit de gemiddelde waterdichtheid in het centrum van de dubbellaag. Dit wordt in de volgende sectie extra verduidelijkt.

2.3 Waterdichtheid

De gemiddelde waterdichtheid in het centrum van de dubbellaag wordt in figuur 18 voorgesteld in functie van de concentratie aan de verschillende oxidatieproducten.

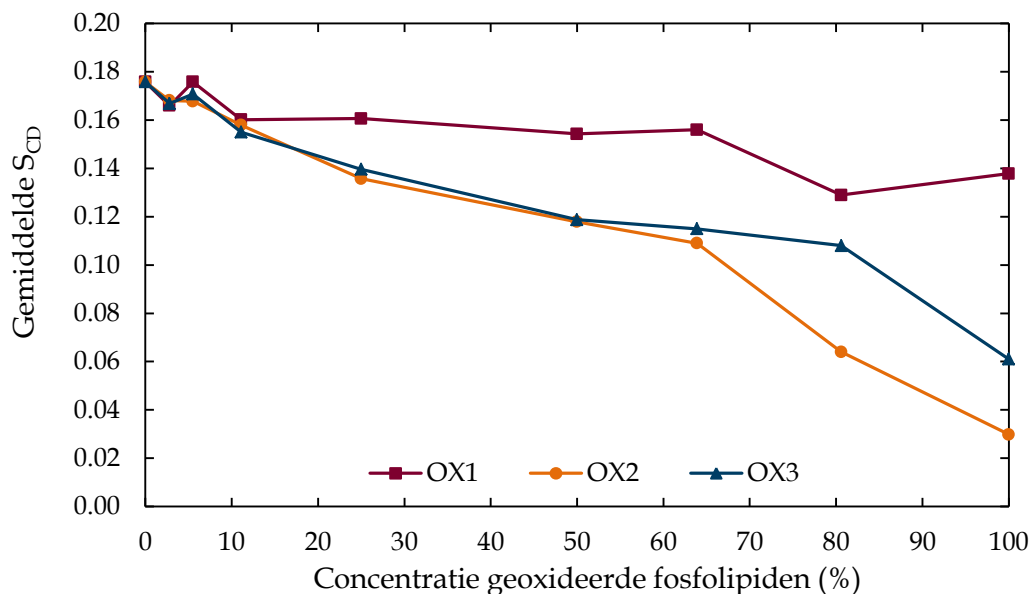


Figuur 18: Gemiddelde waterdichtheid in het centrum van de dubbellaag, in functie van de concentratie aan geoxideerde fosfolipiden, voor elk van de drie oxidatieproducten.

Uit bovenstaande figuur volgt dat oxidatie tot 63,9 % nauwelijks een effect heeft op de waterhuishouding van het membraan. Bij een concentratie van 81,6 % stijgt de waterdichtheid wel aanzienlijk in het geval van OX2, evenals bij een concentratie van 100 % voor OX3. Dit is het gevolg van de porievorming die hiervoor besproken werd. Voor het peroxide (OX1) bedraagt de maximale waterdichtheid (bij een concentratie van 100 %) slechts $2 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ (zie tabel 1 in bijlage), wat er nogmaals op wijst dat het peroxide een kleinere invloed heeft op de structuur van de dubbellaag dan de aldehyden.

2.4 Deuterium orde parameter

Door het toevoegen van oxidatieproducten aan het membraan wordt eveneens de orde van de lipide staarten in het membraan verstoord. Enerzijds komt dit doordat de polaire groepen voor een verstoring van de apolaire omgeving zorgen, anderzijds doordat de aldehydeproducten een kortere ketenlengte bezitten, waardoor de pakking van de lipide staarten wordt verstoord. De gemiddelde orde parameter over alle koolstofatomen binnen een lipide staart werd berekend in functie van de concentratie aan geoxideerde lipiden. Dit wordt geïllustreerd in figuur 19.



Figuur 19: Gemiddelde deuterium orde parameter in functie van de concentratie aan geoxideerde fosfolipiden, voor elk van de drie oxidatieproducten.

De daling van de orde stemt overeen met voorgaande waarnemingen betreffende het vergroten van de oppervlakte per lipide en de afname van de dikte van de dubbellaag. Bovendien kan ook hier afgeleid worden dat OX1 inderdaad een kleiner effect heeft op de structuur van de dubbellaag, in vergelijking met OX3. Dat de deuterium orde parameter het sterkst wordt beïnvloed door OX2, geeft aan dat de twee effecten die hierboven besproken

werden beide de wanorde in het membraan doen toenemen en elkaar aldus versterken. Algemeen kan gesteld worden dat de dubbellaag minder viskeus wordt door het toevoegen van de oxidatieproducten wat uiteindelijk kan leiden tot de vorming van poriën, zoals getoond werd in figuur 17.

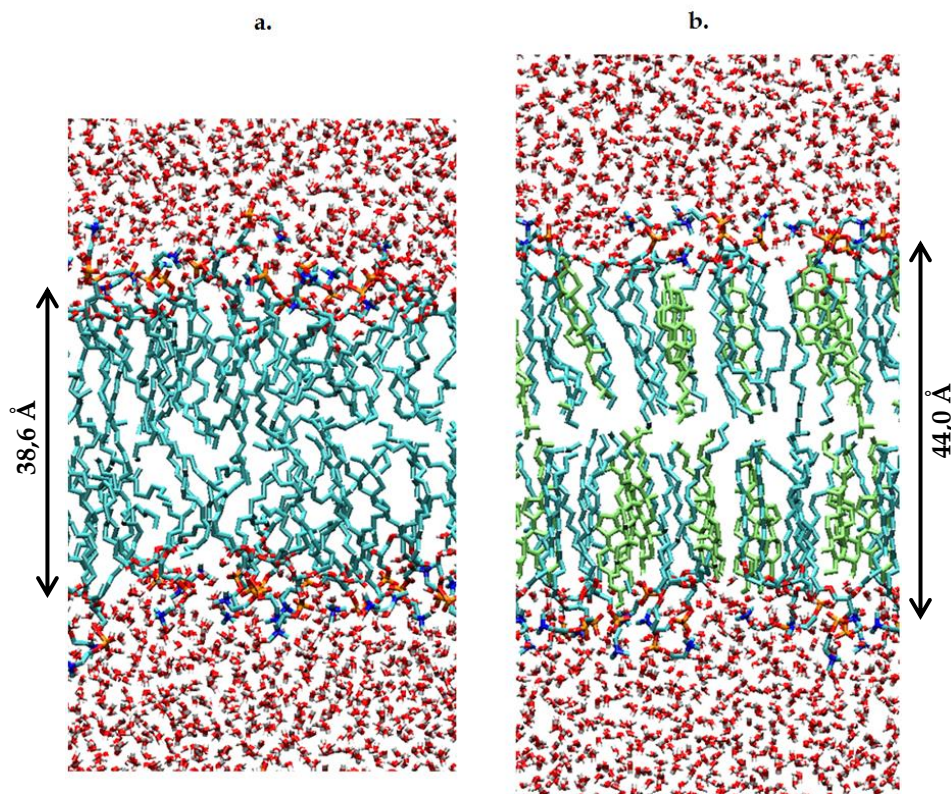
3. Invloed cholesterol

De exacte waarden van de verschillende geanalyseerde parameters voor systemen die naast POPC en één van de drie oxidatieproducten, ook cholesterol bevatten, zijn opnieuw opgenomen in de bijlage (tabel 4-6). Belangrijk om op te merken in deze tabellen en in de figuren die volgen, is dat de concentratie aan geoxideerde lipiden het percentage aan fosfolipiden beschrijft dewelke vervangen zijn door één van de oxidatieproducten. Het initiële systeem (POPC/CHOL), bevat 36 POPC moleculen en 36 cholesterolmoleculen. In de verschillende modelsystemen, gaande van een lage oxidatiegraad tot volledige oxidatie, worden hierin respectievelijk 1, 2, 4, 8, 12, 18 en 36 POPC moleculen geoxideerd (of respectievelijk 2.8, 5.6, 11.1, 22.2, 33.3, 50 en 100 %). Elk systeem bevat bijgevolg nog steeds 36 cholesterolmoleculen. Dit is een benadering van de realiteit, vermits tijdens lipide peroxidatie ook cholesterol geoxideerd kan worden, maar in deze thesis werd de focus enkel gelegd op de oxidatieproducten zoals ze zijn weergegeven in de inleiding [108,109]. Deze benadering kan gerechtvaardigd worden, aangezien de literatuur uitwijst dat de peroxidatie van cholesterol aanzienlijk trager verloopt dan de peroxidatie van onverzadigde fosfolipiden [110]. Hierdoor is het zeer goed mogelijk dat een grote fractie van de fosfolipiden geoxideerd wordt tijdens de plasmabehandeling, zonder dat de structuur van cholesterol significant beïnvloed wordt. De oxidatieproducten van cholesterol bezitten overigens ook allemaal nog steeds de starre ringstructuren, waardoor verwacht wordt dat, indien de oxidatie toch plaats vindt, het effect van de gevormde oxidatieproducten op de structuur van de dubbellaag eerder gering zal zijn. In onderstaande tabel worden eerst de waarden voor de zuivere POPC-dubbellaag vergeleken met de dubbellaag bestaande uit POPC en cholesterol, zonder dat geoxideerde lipiden zijn opgenomen.

Tabel 4: Berekende waarden voor het POPC systeem, met en zonder cholesterol.

	POPC	POPC/Cholesterol
Oppervlakte per lipide (\AA^2)	63,5 \pm 0,4	42,1 \pm 0,1
Dikte dubbellaag (\AA)	38,6 \pm 0,6	44,0 \pm 0,6
Gemiddelde S_{CD}	0,176	0,347

Een eerste waarneming is dat de oppervlakte per lipide aanzienlijk daalt door het toevoegen van cholesterol. Hiervoor zijn twee oorzaken. Allereerst komt dit doordat in de berekeningen van de oppervlakte per lipide ook cholesterol wordt meegerekend als lipide. Een cholesterolmolecule is echter aanzienlijk kleiner dan een fosfolipide of een oxidatieproduct (in de literatuur wordt de oppervlakte per cholesterol molecule geschat op 22 \AA^2 [111]), waardoor de gemiddelde waarde bijgevolg ook lager is. Ten tweede zorgt cholesterol als starre molecule ook voor het ordenen van de dubbellaag (zie sectie 1.4.1). Deze stijging van de orde blijkt eveneens uit de gemiddelde deuterium orde parameter in tabel 4, en heeft tot gevolg dat elk lipide een kleinere oppervlakte zal innemen in het membraan. Deze meer geordende situatie komt overeen met een meer uitgestrekte conformatie van de lipide staarten, wat de dikte van de dubbellaag doet toenemen. Figuur 20 geeft de structuur weer van beide systemen na 160 ns. Ook hieruit blijken de structurele verschillen tussen beide systemen.

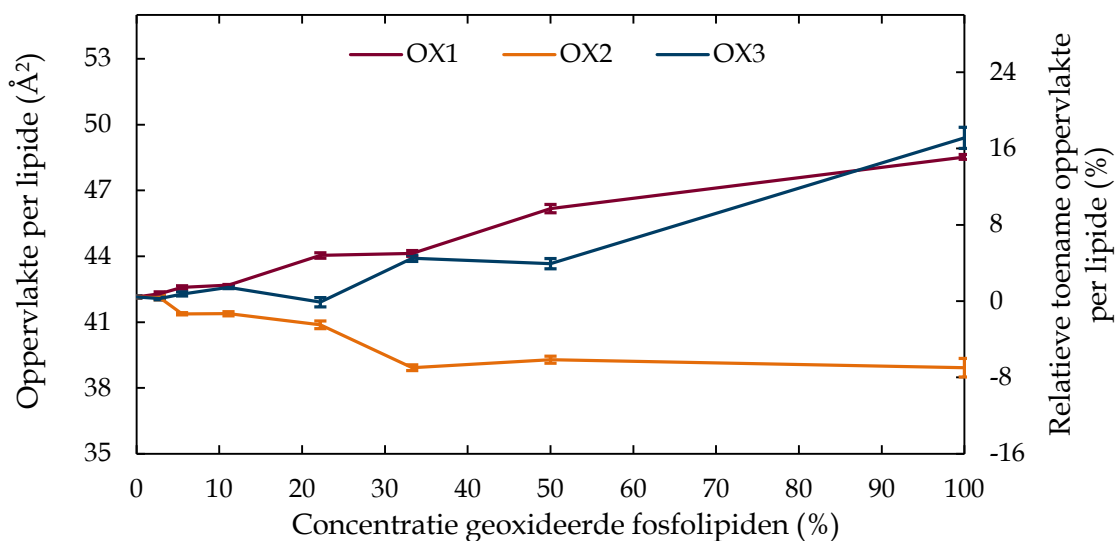


Figuur 20: Finale structuur van het POPC systeem (a) en het POPC/Cholesterol systeem (b). De kleurencode die gehanteerd wordt in deel a is dezelfde als in figuur 12. In deel b volgen POPC en water eenzelfde kleurencode, en wordt cholesterol aangeduid in groen.

3.1 Oppervlakte per lipide

Het verloop van de oppervlakte per lipide in functie van de concentratie aan geoxideerde lipiden is voor de systemen met cholesterol gelijkaardig aan die van de systemen zonder cholesterol. Voor zowel OX1 als OX3 wordt een toename waargenomen,

waar er bij OX2 een kleine afname plaatsvindt van de oppervlakte per lipide. Dit wordt voorgesteld in figuur 21. De oorzaak voor de afname bij OX2 is dezelfde als die hierboven reeds werd aangehaald. De vermindering van het aantal koolstofatomen in OX2, in vergelijking met een niet-geoxideerd POPC lipide, leidt ertoe dat door het vervangen van POPC door OX2 extra lege ruimtes toegevoegd worden in de dubbellaag. Dit laat de structuur toe in te krimpen in de drie dimensies, wat het uitzettend effect van de wanorde, die veroorzaakt wordt door de oxidatieproducten, tegenwerkt. In het huidige geval zorgt cholesterol er voor dat de geordende structuur optimaal gebruik maakt van de vrije ruimte die ontstaat, waardoor het uiteindelijke resultaat een afname van de oppervlakte per lipide is.



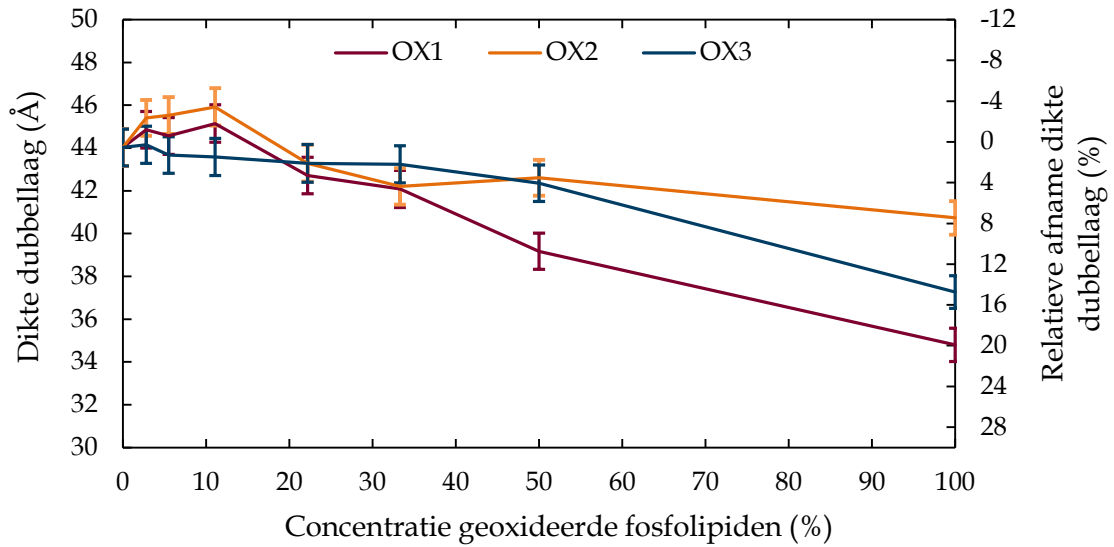
Figuur 21: Oppervlakte per lipide in functie van de concentratie aan geoxideerde fosfolipiden, voor elk van de drie oxidatieproducten.

3.2 Dikte van de dubbellaag

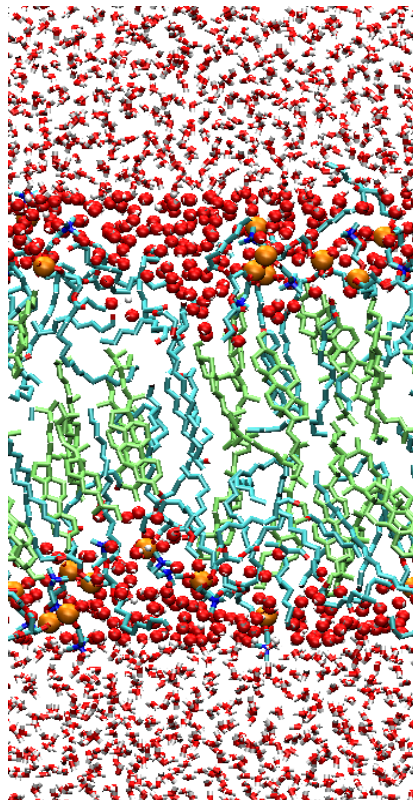
In tegenstelling tot de oppervlakte per lipide, is het verloop van de dikte van de dubbellaagen in functie van de concentratie aan geoxideerde lipiden wel eenduidig voor ieder oxidatieproduct. Bij een toenemende fractie aan oxidatieproducten neemt de dikte van het membraan namelijk af. Deze trend is identiek aan diegene voor de systemen zonder cholesterol (zie figuur 16), en wordt voorgesteld in figuur 22.

De kleine toename die wordt waargenomen voor systemen met OX1 en OX2, bij lage concentraties aan geoxideerde fosfolipiden, is in overeenstemming met de studie van Wong-ekkabut, maar kan vooralsnog niet verklaard worden. Een belangrijk verschil bij de huidige systemen, in vergelijking met de systemen zonder cholesterol, is echter dat deze curves geen stijging vertonen bij een concentratie van 100 %. Dit komt doordat deze toename in de systemen zonder cholesterol het gevolg was van het vormen van een porie (zie hierboven).

Dergelijk proces kwam daarentegen niet voor in de modelsystemen die cholesterol bevatten. In de meest extreme situaties, nl. in systemen die enkel geoxideerde fosfolipiden bevatten, werden slechts kleine waterdefecten waargenomen, zoals wordt geïllustreerd in figuur 23. De watermoleculen die in de dubbellaag penetreren, zijn in deze figuur opnieuw aangeduid door rode sferen.



Figuur 22: Dikte van de dubbellaag in functie van de concentratie aan geoxideerde fosfolipiden, voor elk van de drie oxidatieproducten.



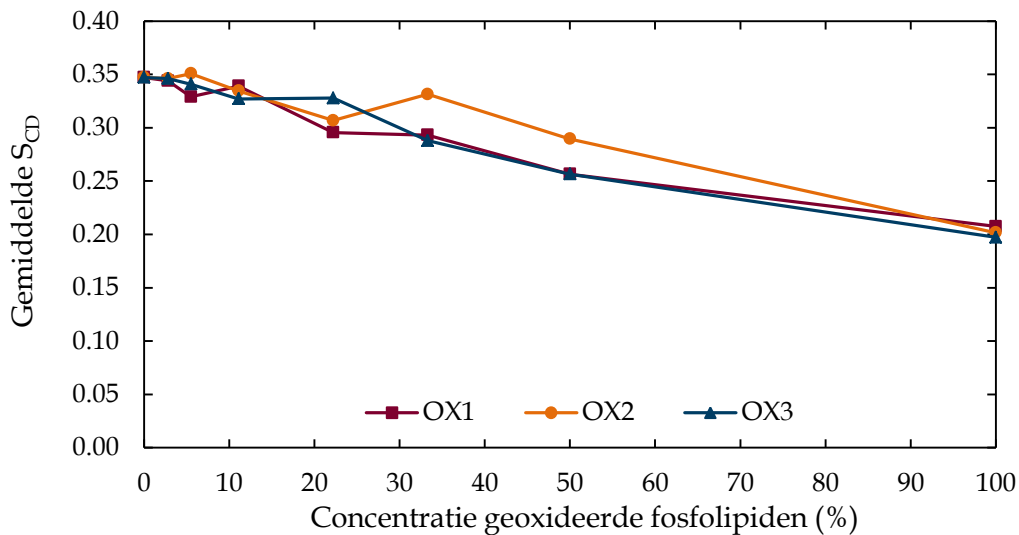
Figuur 23: Structuur van het systeem bestaande uit 36 cholesterol en 36 OX3 moleculen na 160 ns. De kleurencode is identiek aan voorgaande figuren.

3.3 Waterdichtheid

Vermits in de systemen die cholesterol bevatten geen poriën werden gevormd, blijft de waterdichtheid in het centrum van de dubbellaag zeer laag voor ieder systeem. In de meeste gevallen is de dichtheid nul, zoals blijkt uit tabellen 4-6 in bijlage. De hoogste waterdichtheid die gemeten werd, bedraagt $1,320 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. Dit is het gevolg van slechts enkele individuele watermoleculen die toch tot het centrum gediffundeerd zijn.

3.4 Deuterium orde parameter

Het verloop van de gemiddelde deuterium orde parameter in functie van de concentratie aan geoxideerde fosfolipiden is identiek aan die van de systemen zonder cholesterol (zie figuur 24). Hoewel de daling van deze parameter duidt op een daling van de orde in de dubbellaag, is belangrijk op te merken dat de finale waarden (voor 100 % geoxideerde systemen), nog steeds groter zijn dan de waarde bekomen voor het systeem dat enkel POPC bevat (nl. 0.168; zie tabel 1 en tabellen 4-6 in bijlage). Dit wijst erop dat, ondanks de wanorde die veroorzaakt wordt door het toevoegen van oxidatieproducten, cholesterol er nog steeds voor zorgt dat deze dubbellen sterker geordend zijn dan een zuivere POPC dubbellaag. Deze sterke ordening kan dan ook verantwoordelijk geacht worden voor het gebrek aan porievorming in de systemen die cholesterol bevatten.



Figuur 24: Gemiddelde deuterium orde parameter in functie van de concentratie aan geoxideerde fosfolipiden, voor elk van de drie oxidatieproducten.

De verschillen die worden waargenomen tussen systemen die al dan niet cholesterol bevatten, zijn zeer belangrijk in het kader van plasma-oncologie. Ze suggereren namelijk dat het plasmamembraan van een kankercel, hetwelke in deze studie wordt voorgesteld door de systemen zonder cholesterol, gevoeliger is voor de gevolgen van lipide peroxidatie, nl. het

inbrengen van oxidatieproducten, in vergelijking met zijn gezonde tegenhanger. Door het gebrek aan cholesterol worden immers poriën gevormd in het membraan, waardoor RONS vervolgens kunnen migreren en zo het interne milieu van de cel kunnen bereiken. Eenmaal in de cel, kunnen de RONS vervolgens schade aanbrengen aan onder meer het DNA of proteïnen van de kankercel. Gezonde cellen daarentegen, zijn minder gevoelig aan de gevolgen van lipide peroxidatie, wat hen meer resistent zou maken ten opzichte van de plasmabehandeling.

4. Invloed concentratie cholesterol

Vermits in systemen zonder cholesterol poriën gevormd worden bij volledige oxidatie, terwijl in systemen die 50 % cholesterol bevatten slechts kleine waterdefecten optreden, werd in een laatste fase gekeken naar de invloed van de cholesterolconcentratie op het membraan. Hiervoor werden verschillende modelsystemen geconstrueerd, zoals voorgesteld in tabel 5.

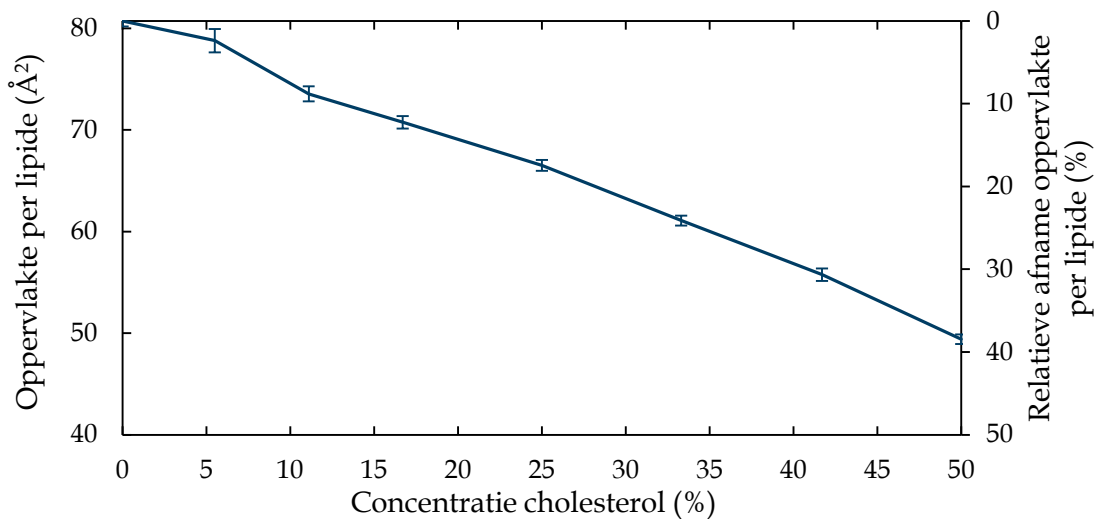
Tabel 5: Samenstelling van de verschillende modelsystemen die werden opgebouwd om de invloed van de cholesterolconcentratie te onderzoeken.

Model	Aantal cholesterol moleculen	Aantal OX3 moleculen	Cholesterolconcentratie (%)
1	4	68	5,6
2	8	64	11,1
3	12	60	16,7
4	18	54	25
5	24	48	33,3
6	30	42	41,2

Vermits de resultaten uit secties 2 en 3 uitwijzen dat enkel de aldehyden (OX2 en OX3) het vormen van poriën mogelijk maken, werd geopteerd om met één van deze oxidatieproducten verder te werken. Hierbij werd gekozen voor OX3, omdat de waargenomen trends in sectie 2 niet altijd eenduidig zijn voor OX2. Aangezien voor OX3 de porievorming bovendien enkel werd vastgesteld in het volledig geoxideerde systeem, werd ook enkel met volledig geoxideerde systemen verder gewerkt (zie tabel 5). De berekende waarden voor de oppervlakte per lipide, de dikte van de dubbellaag, de gemiddelde deuterium orde parameter en de gemiddelde waterdichtheid in het centrum van de dubbellaag staan opnieuw opgelijst in bijlage (tabel 7). De waarden voor de twee uiterste situaties, namelijk het systeem zonder cholesterol en het systeem met 50 % cholesterol worden overgenomen uit respectievelijk tabel 1 en 4 van de bijlage.

4.1 Oppervlakte per lipide

De oppervlakte per lipide in functie van de concentratie aan cholesterol wordt weergegeven in figuur 25. De waargenomen trend is het gevolg van twee effecten die hierboven reeds werden besproken. Enerzijds daalt de ingenomen oppervlakte per lipide doordat cholesterol voor een toename van de orde zorgt (wat eveneens wordt bevestigd door het verloop van de deuterium orde parameter - zie figuur 28). Anderzijds neemt cholesterol zelf een kleinere oppervlakte in, en daalt de gemiddelde waarde over alle lipiden, die in bovenstaande grafiek wordt geplot, bijgevolg ook.



Figuur 25: Oppervlakte per lipide uitgedrukt in functie van de cholesterolconcentratie.

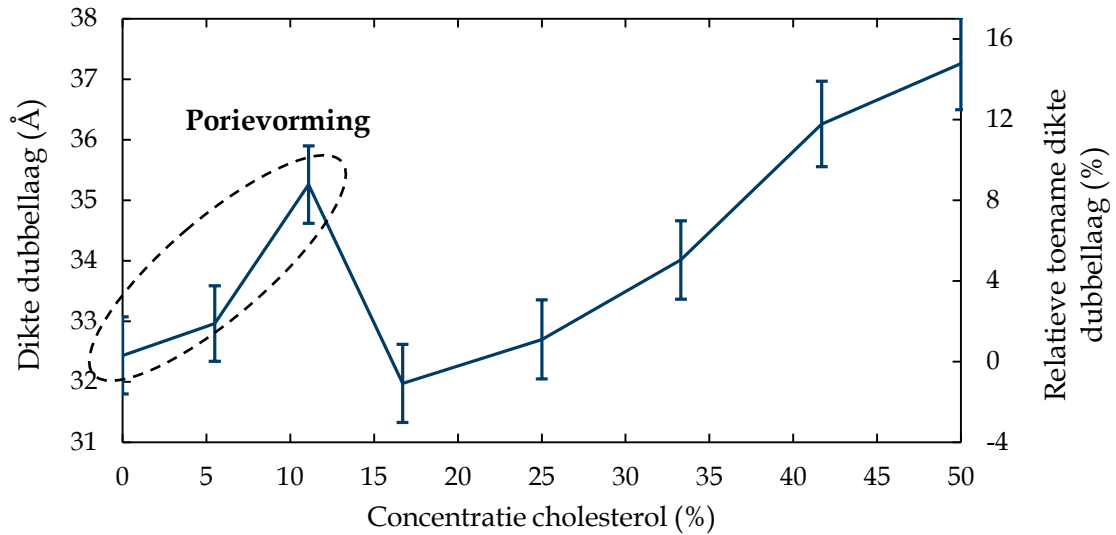
4.2 Dikte van de dubbellaag

Het verloop van de dikte van de dubbellaag wordt weergegeven in figuur 26. Uit deze grafiek volgt dat bij cholesterolconcentraties tussen 0 % en 11,1 % de dikte van de dubbellaag toeneemt. Deze waarneming is in overeenstemming met wat hierboven besproken werd. Een toename van de orde in de apolaire lipide staarten zorgt voor een meer uitgestrekte conformatie, waardoor de afstand tussen de fosfaatgroepen in de twee lagen toeneemt.

Bij het verder opvoeren van de cholesterolconcentratie, daalt de dikte van de dubbellaag opnieuw. Deze daling kan verklaard worden door een visuele waarneming van de structuur van de dubbellaag. Een cholesterolconcentratie tot maximaal 11,6 % leidt namelijk nog steeds tot het vormen van poriën in het membraan, net zoals werd waargenomen in het systeem zonder cholesterol (zie figuur 17). Dit gebied wordt in figuur 26 aangeduid door een zwarte ovaal. Wanneer de concentratie vervolgens verder wordt opgevoerd tot 16,7 %, zijn de geoxideerde lipiden niet meer in staat om poriën te veroorzaken. Hierdoor bevat het membraan een aanzienlijk lagere concentratie aan water, wat eveneens blijkt uit de waarde van de gemiddelde waterdichtheid in het centrum van de

dubbellaag (zie figuur 27). Door de daling van het watervolume in het membraan, zal dit laatste globaal gezien ook een kleiner volume innemen. Het membraan gaat aldus over van een sterk gehydrateerde, naar een gedehydrateerde toestand.

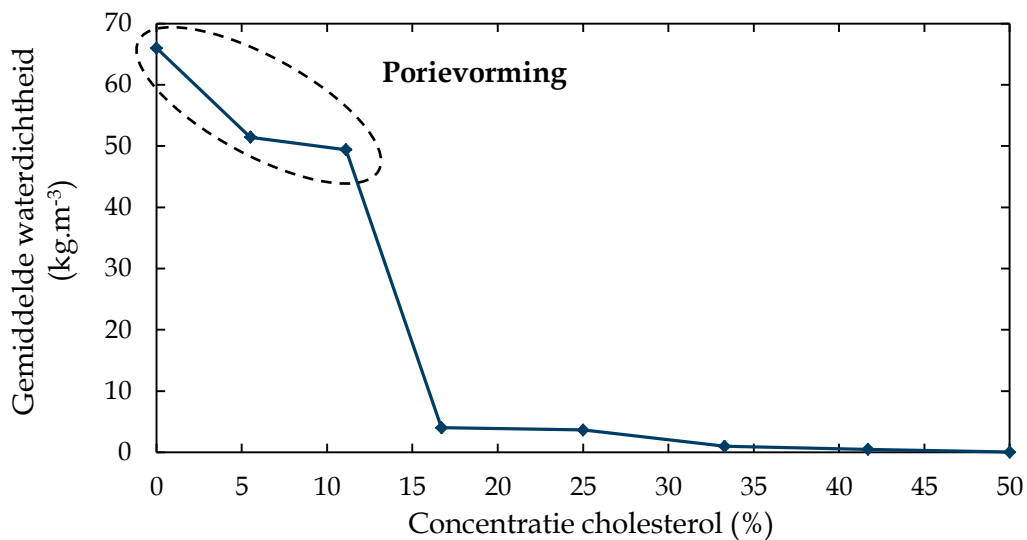
Indien de concentratie aan cholesterol verder wordt opgevoerd, zal de dikte van de dubbellaag opnieuw toenemen, omwille van dezelfde redenen als die hiervoor werd gegeven.



Figuur 26: Dikte van de dubbellaag uitgedrukt in functie van de cholesterolconcentratie.

4.3 Waterdichtheid

Het verloop van de waterdichtheid in functie van de concentratie aan cholesterol wordt weergegeven in figuur 27.



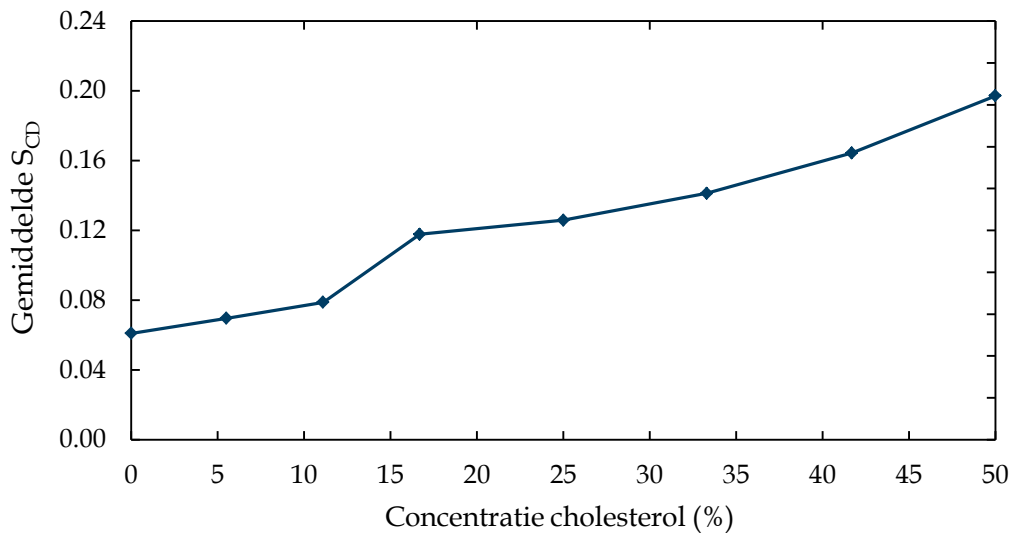
Figuur 27: Gemiddelde waterdichtheid in het centrum van de dubbellaag, in functie van de concentratie aan cholesterol.

Uit deze grafiek kan zeer duidelijk het gebied waarin porievorming optreedt worden teruggevonden (zie zwarte ovaal). Initieel is er namelijk een hoge gemiddelde

waterdichtheid in het centrum van de dubbellaag, wat duidt op de aanwezigheid van een porie. Bij het opvoeren van de concentratie daalt deze dichtheid echter drastisch. Dit komt doordat het cholesterol de dubbellaag minder gevoelig maakt aan de gevolgen van cholesterol en er bijgevolg geen poriën meer gevormd worden, zoals in vorige secties uitvoerig werd besproken.

4.4 Deuterium orde parameter

Het verloop van de deuterium orde parameter in functie van de concentratie aan cholesterol wordt voorgesteld in figuur 28. Hieruit volgt dat de orde toeneemt naarmate de cholesterolfractie in het membraan toeneemt. Dit is ten gevolge van het verstevigende effect dat cholesterol uitoefent op het membraan (zie Hoofdstuk 1).



Figuur 28: Gemiddelde deuterium orde parameter in functie van de concentratie aan cholesterol.

De kleine sprong die gemaakt wordt wanneer overgegaan wordt van 11,1 % naar 16,7 % is opnieuw het gevolg van de poriën die gevormd worden bij lagere concentraties, maar die afwezig zijn bij concentraties hoger dan 16,7 %. Door de micelvorming bij lage concentraties zullen de ketens namelijk bijna isotroop georiënteerd zijn. In afwezigheid van poriën blijft de dubbellaagstructuur behouden, waardoor de ketens - ondanks de wanorde die veroorzaakt wordt door de oxidatieproducten - globaal gezien toch nog volgens de z-as georiënteerd zullen zijn.

HOOFDSTUK 4: CONCLUSIE EN VOORUITZICHTEN

In deze studie werd het effect van lipide peroxidatie op de eigenschappen van een 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC) dubbellaag onderzocht aan de hand van *united-atom* moleculaire dynamica simulaties. Drie geoxideerde lipiden werden hierbij geïmplementeerd in verschillende modelsystemen. De oxidatieproducten bevatten elk een polaire groep (aldehyde of peroxide) in de onverzadigde lipide staart, dewelke het gevolg is van peroxidatiereacties. De verschillende modelsystemen die gebouwd werden, kunnen onderverdeeld worden in drie groepen:

1. POPC/peroxidatieproducten: waarbij de concentratie van de verschillende oxidatieproducten de variabele is.
2. POPC/cholesterol/peroxidatieproducten: waarbij eveneens de concentratie van de oxidatieproducten de variabele is, en elk systeem steeds 50 % cholesterol bevat.
3. Cholesterol/OX3: waarbij de concentratie van cholesterol de variabele is en de overige lipiden in het systeem steeds OX3 zijn.

De systemen uit groep 2 kunnen gezien worden als een eerste benadering van het plasmamembraan van een gezonde cel, terwijl de systemen uit groep 1 een eerste benadering vormen van het plasmamembraan van een kankercel. Deze laatste bevatten namelijk een aanzienlijk lagere fractie aan cholesterol in vergelijking met zijn gezonde tegenhangers. De systemen uit groep 3 werden toegevoegd om de situaties tussen deze twee uitersten te scannen, daar de exacte samenstelling van het plasmamembraan van een kankercel onbekend is.

Uit de resultaten van de eerste groep modelsystemen volgt dat de aanwezigheid van geoxideerde lipiden zorgt voor een daling van de orde in de apolaire lipide ketens, wat ertoe leidt dat de oppervlakte per lipide toeneemt en de dikte van de dubbellaag afneemt. Deze trend is het sterkst voor systemen die OX3 (twee aldehyden) bevatten, waar bijvoorbeeld de oppervlakte per lipide circa 25 % toeneemt bij 100 % oxidatie.

Bij het toevoegen van cholesterol (groep 2) neemt de orde in de lipide staarten aanzienlijk toe. De deuterium orde parameter, die hiervoor als maatstaf kan worden gezien, stijgt in alle systemen met ongeveer 100 % indien de cholesterolconcentratie 50 % bedraagt. In functie van de concentratie aan geoxideerde lipiden vertonen deze systemen in het algemeen dezelfde trends als de systemen uit groep 1.

De belangrijkste waarneming in deze studie is echter dat in modelsystemen uit groep 1, die OX2 of OX3 bevatten, grote waterdefecten worden gevormd ten gevolge van het toevoegen van geoxideerde lipiden. In de meest extreme gevallen leiden deze waterdefecten

uiteindelijk tot het vormen van microporiën, met een maximale diameter van circa 15 Å. Dezelfde systemen uit groep 2, die 50 % cholesterol bevatten, geven zelfs in de meeste extreme systemen slechts aanleiding tot kleinere waterdefecten. Uit de resultaten van de simulaties bij een variërende cholesterolconcentratie volgt dat indien de concentratie lager wordt dan 11,1 %, er in membranen die opgebouwd zijn uit OX3 poriën gevormd kunnen worden. Bij hogere cholesterolconcentraties is OX3 daarentegen niet in staat om dergelijke drastische wijzigingen te veroorzaken in de structuur van de dubbellaag.

Deze waarnemingen suggereren dat membranen met een lagere cholesterolfractie, zoals kankercellen, gevoeliger zouden zijn voor het lipide peroxidatieproces, hetgeen optreedt tijdens de behandeling van de cellen met koude atmosferische plasma's. De poriën die gevormd worden in het membraan doorbreken de barrière die de cel initieel beschermt ten opzichte van de invallende RONS. Eens deze RONS in staat zijn om de cel te betreden, kunnen ze daar interne structuren van de cel, zoals DNA, eiwitten of andere celmembranen, beschadigen. Deze theorie kan een verklaring vormen voor het induceren van apoptose in kankercellen, hetgeen experimenteel wordt waargenomen.

In de toekomst kan het interessant zijn om ook het effect van andere belangrijke oxidatieproducten te onderzoeken. Hiervoor komen onder meer kleinere fragmenten als malondialdehyde of 4-hydroxy-2-nonenal in aanmerking. Verder, wordt in de onderzoeksgroep PLASMANT eveneens onderzoek verricht naar de reacties van reactieve zuurstofdeeltjes met de polaire kopgroepen van de lipiden. De reactieproducten die hierbij gevormd worden, kunnen vervolgens geïmplementeerd worden in het *united-atom* krachtveld, om zo hun effect op de structuur van de dubbellaag te onderzoeken. Deze reacties worden onderzocht aan de hand van de DFTB methode (*density functional based tight binding*). Deze methode is noodzakelijk om de onbekende reacties accuraat te beschrijven, maar heeft als nadeel dat de systemen die onderzocht worden maximaal enkele honderden atomen kunnen bevatten, en gevolgd kunnen worden over een tijdschaal van enkele honderden picoseconden. Om grotere tijd- en lengteschalen te kunnen bestuderen, moet worden overgestapt naar het *united-atom* krachtveld.

Om de complexe samenstelling van een membraan te kunnen nabootsen moeten grotere systemen onderzocht worden. De systemen uit de huidige studie zijn namelijk te klein om bijvoorbeeld de totale samenstelling van verschillende ketenlengtes of verschillende kopgroepen na te bootsen, alsook om de asymmetrie van het membraan in rekening te brengen. Hiervoor zou in de toekomst opnieuw het *coarse-grained* Martini krachtveld kunnen worden aangewend. Het probleem met dit krachtveld dat zich tijdens

deze studie voor deed, is namelijk gekend bij de ontwikkelaars, en in volgende versies zou getracht worden om dit dan ook op te lossen.

Naast computationele studies zijn ook experimenten zeer belangrijk voor plasma-oncologie. Hoewel de onderzoeksgroep PLASMANT de focus legt op het modelleren, wordt ook hier aandacht aan besteed. In dit kader werd een samenwerking opgestart met de onderzoeksgroep Proteïnechemie, Proteoomanalyse en Epigenetische Signalisatie (PPES) van prof. dr. Sylvia Dewilde. In dit project worden kankercellen behandeld met een plasmajet die gebouwd werd binnen de onderzoeksgroep PLASMANT, dewelke nadien geanalyseerd worden binnen de onderzoeksgroep PPES. Het doel is vervolgens om de optimale condities te zoeken waarbij kankercellen zo selectief en snel mogelijk worden gedood. In een later stadium kunnen de computationele resultaten mogelijks gecorreleerd worden met experimentele waarnemingen, om zo een beter inzicht te krijgen in het verband tussen de waarnemingen op atomair niveau en hun gevolgen op cellulair niveau.

REFERENTIES

- [1] World Health Organization 2013 Fact sheet: The top 10 causes of death, geraadpleegd op 10 april 2015 van <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
- [2] Sudhakar A 2010 History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods Akulapalli *J Cancer Sci Ther.* **1** 1-4
- [3] Souhami R and Tobias J 2005 *Cancer and its management* (Blackwell)
- [4] Abercrombie M and Ambrose E 1962 The surface properties of cancer cells: a review *Cancer Res.* **22** 525-48
- [5] Vijayaraghavalu S, Dermawan J K, Venugopalan C and Labhasetwar V 2013 Highly synergistic effect of sequential treatment with epigenetic and anticancer drugs to overcome drug resistance in breast cancer cells is mediated via activation of p21 gene expression leading to G2/M cycle arrest *Mol. Pharm.* **10** 337-52
- [6] Pawlik T M and Keyomarsi K 2004 Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **59** 928-42
- [7] Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley D B and Johnston P G 2013 Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **13** 714-26
- [8] Laroussi M 2014 From Killing Bacteria to Destroying Cancer Cells: 20 Years of Plasma Medicine *Plasma Process. Polym.* **11** 1138-41
- [9] Graves D B 2014 Reactive Species from Cold Atmospheric Plasma: Implications for Cancer Therapy *Plasma Process. Polym.* **11** 1-8
- [10] Tonks L and Langmuir I 1929 Oscillations in ionized gases *Phys. Rev.* **33** 195-210
- [11] Fridman A 2008 *Plasma chemistry* (Cambridge)
- [12] Bogaerts A, Neyts E C, Gijbels R and van der Mullen J 2002 Gas discharge plasmas and their applications *Spectrochim. Acta Part B* **57** 609-58
- [13] Von Woedtke T, Reuter S, Masur K and Weltmann K D 2013 Plasmas for medicine *Phys. Rep.* **530** 291-320
- [14] Kong M G, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, Van Dijk J and Zimmermann J L 2009 Plasma medicine: An introductory review *New J. Phys.* **11** 1-35
- [15] Fridman A and Friedman G 2013 *Plasma Medicine* (Wiley)
- [16] Graves D B 2012 The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology *J. Phys. D. Appl. Phys.* **45** 1-42

- [17] Keidar M, Walk R, Shashurin A, Srinivasan P, Sandler A, Dasgupta S, Ravi R, Guerrero-Preston R and Trink B 2011 Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *Br. J. Cancer* **105** 1295–301
- [18] Utsumi F, Kajiyama H, Nakamura K, Tanaka H, Hori M and Kikkawa F 2014 Selective cytotoxicity of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma against ovarian clear-cell carcinoma *Springerplus* **3** 1–9
- [19] Dobrynin D, Fridman G, Friedman G and Fridman A 2009 Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue *New J. Phys.* **11** 1–26
- [20] Deng X T, Shi J . and Kong M G 2006 Physical mechanisms of inactivation of *Bacillus subtilis* spores using cold atmospheric plasmas *IEEE Trans. Plasma Sci.* **34** 1310–6
- [21] Walsh J L, Shi J J and Kong M G 2006 Contrasting characteristics of pulsed and sinusoidal cold atmospheric plasma jets *Appl. Phys. Lett.* **88** 171501–3
- [22] Raiser J and Zenker M 2006 Argon plasma coagulation for open surgical and endoscopic applications: state of the art *J. Phys. D. Appl. Phys.* **39** 3520–3
- [23] Kalghatgi S, Fridman G, Nagaraj G, Peddinghaus M, Balasubramanian M, Brooks A and Gutsol A 2007 Mechanism of Blood Coagulation by Non-Equilibrium Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge Plasma *IEEE Trans. Plasma Sci.* **35** 1559–66
- [24] Fridman G, Peddinghaus M, Ayan H, Fridman A, Balasubramanian M, Gutsol A, Brooks A and Friedman G 2006 Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air *Plasma Chem. Plasma Process.* **26** 425–42
- [25] Yousfi M, Merbahi N, Pathak A and Eichwald O 2014 Low-temperature plasmas at atmospheric pressure: Toward new pharmaceutical treatments in medicine *Fundam. Clin. Pharmacol.* **28** 123–35
- [26] Hourfar M K, Themann A, Eickmann M, Puthavathana P, Laue T, Seifried E and Schmidt M 2007 Blood screening for influenza *Emerg. Infect. Dis.* **13** 1081–3
- [27] Heinlin J, Isbary G, Stolz W, Morfill G, Landthaler M, Shimizu T, Steffes B, Nosenko T, Zimmermann J L and Karrer S 2011 Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **25** 1–11
- [28] Nastuta A V, Topala I, Grigoras C, Pohoata V and Popa G 2011 Stimulation of wound healing by helium atmospheric pressure plasma treatment *J. Phys. D. Appl. Phys.* **44** 1–9
- [29] Cheng K and Goldman R J 1998 Electric fields and proliferation in a dermal wound model: cell cycle kinetics. *Bioelectromagnetics* **19** 68–74
- [30] Robson M C and Hegggers J P 1970 Delayed wound closure based on bacterial counts. *J. Surg. Oncol.* **2** 379–83

- [31] Kim J-H, Lee M-A, Han G-J and Cho B-H 2014 Plasma in dentistry: a review of basic concepts and applications in dentistry. *Acta Odontol. Scand.* **72** 1-12
- [32] Lee H W, Kim G J, Kim J M, Park J K, Lee J K and Kim G C 2009 Tooth Bleaching with Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma *J. Endod.* **35** 587-91
- [33] Weltmann K D, Kindel E, von Woedtke T, Hähnel M, Stieber M and Brandenburg R 2010 Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine *Pure Appl. Chem.* **82** 1223-37
- [34] Tak G, Gallagher M, Gangoli S, Gutsol A and Fridman A 2005 Use of Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma for Air Cleaning and Sterilization *EEE International Conference on Plasma Science* pp 1-6
- [35] Fricke K, Koban I, Tresp H, Jablonowski L, Schröder K, Kramer A, Weltmann K D, von Woedtke T and Kocher T 2012 Atmospheric pressure plasma: A high-performance tool for the efficient removal of biofilms *PLoS One* **7** 1-8
- [36] Laroussi M and Lu X 2005 Room-temperature atmospheric pressure plasma plume for biomedical applications *Appl. Phys. Lett.* **87** 22-4
- [37] Kieft I E, Kurdi M and Stoffels E 2006 Reattachment and apoptosis after plasma-needle treatment of cultured cells *IEEE Trans. Plasma Sci.* **34** 1331-6
- [38] Yonson S, Coulombe S, Léveillé V and Leask R L 2006 Cell treatment and surface functionalization using a miniature atmospheric pressure glow discharge plasma torch *J. Phys. D. Appl. Phys.* **39** 3508-13
- [39] Fridman G, Shereshevsky A, Jost M M, Brooks A D, Fridman A, Gutsol A, Vasilets V and Friedman G 2007 Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in Melanoma skin cancer cell lines *Plasma Chem. Plasma Process.* **27** 163-76
- [40] Köritzer J, Boxhammer V and Al. E 2013 Restoration of Sensitivity in Chemo - Resistant Glioma Cells by Cold Atmospheric Plasma *PLoS One* **8** 1-10
- [41] Ishaq M, Han Z J, Kumar S, Evans M D M and Ostrikov K K 2015 Atmospheric-Pressure Plasma- and TRAIL-Induced Apoptosis in TRAIL-Resistant Colorectal Cancer Cells *Plasma Process. Polym.* DOI: 10.1002/ppap.201400207
- [42] Walk R M, Snyder J a., Srinivasan P, Kirsch J, Diaz S O, Blanco F C, Shashurin A, Keidar M and Sandler A D 2013 Cold atmospheric plasma for the ablative treatment of neuroblastoma *J. Pediatr. Surg.* **48** 67-73
- [43] Daeschlein G, Scholz S, Lutze S, Arnold A, von Podewils S, Kiefer T, Tueting T, Hardt O, Haase H, Grisk O, Langner S, Ritter C, von Woedtke T and Jünger M 2013 Comparison between cold plasma, electrochemotherapy and combined therapy in a melanoma mouse model *Exp. Dermatol.* **22** 582-6
- [44] Keidar M 2015 Plasma for cancer treatment *Plasma Sources Sci. Technol.* **24** 1-20

- [45] De Bruin E C and Medema J P 2008 Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response *Cancer Treat. Rev.* **34** 737–49
- [46] Renschler M F 2004 The emerging role of reactive oxygen species in cancer therapy *Eur. J. Cancer* **40** 1934–40
- [47] Liou G-Y and Storz P 2010 Reactive oxygen species in cancer *Free Radic. Res.* **44** 1–31
- [48] Gorrini C, Harris I S and Mak T W 2013 Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12** 931–47
- [49] Trachootham D, Alexandre J and Huang P 2009 Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* **8** 579–91
- [50] Sok M, Sentjurs M and Schara M 1999 Membrane fluidity characteristics of human lung cancer. *Cancer Lett.* **139** 215–20
- [51] Van Blitterswijk W J, De Veer G, Krol J H and Emmelot P 1982 Comparative lipid analysis of purified plasma membranes and shed extracellular membrane vesicles from normal murine thymocytes and leukemic GRSL cells. *Biochim. Biophys. Acta* **688** 495–504
- [52] Szili E J, Bradley J W and Short R D 2014 A “tissue model” to study the plasma delivery of reactive oxygen species *J. Phys. D. Appl. Phys.* **47** 1–7
- [53] Elliot W H and Elliot D C 2009 *Biochemistry and Molecular Biology* (Oxford)
- [54] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P 2008 *Molecular Biology of the Cell* (Garland science)
- [55] Shinitzky M 1984 Membrane fluidity in malignancy *Biochim. Biophys. Acta* **738** 251–61
- [56] De Meyer F and Smit B 2009 Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106** 3654–8
- [57] Raffy S and Teissié J 1999 Control of lipid membrane stability by cholesterol content. *Biophys. J.* **76** 2072–80
- [58] Van Meer G, Voelker D R and Feigenson G W 2008 Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9** 112–24
- [59] Reis A and Spickett C M 2012 Chemistry of phospholipid oxidation *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818** 2374–87
- [60] Catalá A 2010 A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **399** 318–23
- [61] Catalá A 2009 Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxyalkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions *Chem. Phys. Lipids* **157** 1–11

- [62] Reis A, Domingues M R M, Amado F M L, Ferrer-Correia a. J V and Domingues P 2005 Separation of peroxidation products of diacyl-phosphatidylcholines by reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry *Biomed. Chromatogr.* **19** 129–37
- [63] Wong-Ekkabut J, Xu Z, Triampo W, Tang I-M, Tieleman D P and Monticelli L 2007 Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys. J.* **93** 4225–36
- [64] Spickett C M 2013 The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis *Redox Biol.* **1** 145–52
- [65] Marnett L J 1999 Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* **424** 83–95
- [66] Jurkiewicz P, Olżyńska A, Cwiklik L, Conte E, Jungwirth P, Megli F M and Hof M 2012 Biophysics of lipid bilayers containing oxidatively modified phospholipids: Insights from fluorescence and EPR experiments and from MD simulations *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818** 2388–402
- [67] Kinnunen P K J, Kaarniranta K and Mahalka A K 2012 Protein-oxidized phospholipid interactions in cellular signaling for cell death: From biophysics to clinical correlations *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818** 2446–55
- [68] Hammer M U, Forbrig E, Kupsch S and Reuter S 2013 Influence of Plasma-Treatment on the Structure and Function of Lipids *Plasma Med.* **3** 97–114
- [69] Barrera G, Pizzimenti S and Dianzani M U 2008 Lipid peroxidation: control of cell proliferation, cell differentiation and cell death *Mol. Aspects Med.* **29** 1–8
- [70] Tai W, Yang Y, Lin H, Huang C, Cheng Y, Chen M, Yen H and Liau I 2010 Interplay between Structure and Fluidity of Model Lipid Membranes under Oxidative Attack *J. Phys. Chem. B* **114** 15642–9
- [71] Chen J J and Pal Yu B 1994 Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products *Free Rad. Biol. Med.* **17** 411–8
- [72] Tieleman D ., Marrink S . and Berendsen H J . 1997 A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1331** 235–70
- [73] Neyts E C, Yusupov M, Verlack C C and Bogaerts A 2014 Computer Simulations of Plasma-Biomolecule and Plasma- Tissue Interactions for a Better Insight in Plasma Medicine *J. Phys. D. Appl. Phys.* **47** 1–17
- [74] Van Gaens W, Iseni S, Schmidt-Bleker A, Weltmann K-D, Reuter S and Bogaerts A 2015 Numerical analysis of the effect of nitrogen and oxygen admixtures on the chemistry of an argon plasma jet operating at atmospheric pressure *New J. Phys.* **17** 1–23

- [75] Babaeva N Y, Tian W and Kushner M J 2014 The interaction between plasma filaments in dielectric barrier discharges and liquid covered wounds: electric fields delivered to model platelets and cells *J. Phys. D. Appl. Phys.* **47** 1-11
- [76] Waskoenig J, Niemi K, Knake N, Graham L M, Reuter S, Schulz-von der Gathen V and Gans T 2010 Atomic oxygen formation in a radio-frequency driven micro-atmospheric pressure plasma jet *Plasma Sources Sci. Technol.* **19** 1-11
- [77] Yusupov M, Neyts E C, Khalilov U, Snoeckx R, Van Duin a. C T and Bogaerts A 2012 Atomic-scale simulations of reactive oxygen plasma species interacting with bacterial cell walls *New J. Phys.* **14** 1-18
- [78] Yusupov M, Neyts E C, Verlackt C C, Khalilov U, Duin a C T Van and Bogaerts A 12AD Inactivation of the endotoxic biomolecule lipid A by oxygen plasma species : a reactive molecular dynamics study *Plasma Process. Polym.* **12** 162-71
- [79] Khosravian N, Bogaerts A, Huygh S, Yusupov M and Neyts E C 2015 How do plasma-generated OH radicals react with biofilm components ? Insights from atomic scale simulations *Biointerphases* **10** 1-9
- [80] Van der Paal J, Aernouts S, van Duin A C T, Neyts E C and Bogaerts A 2013 Interaction of O and OH radicals with a simple model system for lipids in the skin barrier: a reactive molecular dynamics investigation for plasma medicine *J. Phys. D. Appl. Phys.* **46** 395201
- [81] Van der Paal J, Verlackt C C, Yusupov M, Neyts E C and Bogaerts A 2013 Structural modification of the skin barrier by OH radicals : A reactive molecular dynamics study for plasma medicine *J. Phys. D. Appl. Phys.* **46** 1-18
- [82] Girotti a W 1985 Mechanisms of lipid peroxidation. *J. Free Radic. Biol. Med.* **1** 87-95
- [83] Gutteridge J M and Halliwell B 1990 The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* **15** 129-35
- [84] Khandelia H and Mouritsen O G 2009 Lipid gymnastics: Evidence of complete acyl chain reversal in oxidized phospholipids from molecular simulations *Biophys. J.* **96** 2734-43
- [85] Cwiklik L and Jungwirth P 2010 Massive oxidation of phospholipid membranes leads to pore creation and bilayer disintegration *Chem. Phys. Lett.* **486** 99-103
- [86] Beranova L, Cwiklik L, Jurkiewicz P, Hof M and Jungwirth P 2010 Oxidation changes physical properties of phospholipid bilayers: Fluorescence spectroscopy and molecular simulations *Langmuir* **26** 6140-4
- [87] Carloni P, Rothlisberger U and Parrinello M 2002 The role and perspective of ab initio molecular dynamics in the study of biological systems *Acc. Chem. Res.* **35** 455-64
- [88] Senn H M and Thiel W 2007 QM/MM methods for biological systems *Top Curr Chem* **268** 173-290

- [89] Van Duin a. C T, Dasgupta S, Lorant F and Goddard W a. 2001 ReaxFF: A reactive force field for hydrocarbons *J. Phys. Chem. A* **105** 9396–409
- [90] Marrink S J, Risselada H J, Yefimov S, Tieleman D P and Vries A H De 2007 The MARTINI Force Field : Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations *J. Phys. Chem. B* **111** 7812–24
- [91] Bennett W F D and Tieleman D P 2011 Water Defect and Pore Formation in Atomistic and Coarse-Grained Lipid Membranes : Pushing the Limits of Coarse Graining **12** 2981–8
- [92] Yesylevskyy S O, Schäfer L V., Sengupta D and Marrink S J 2010 Polarizable water model for the coarse-grained MARTINI force field *PLoS Comput. Biol.* **6** 1–17
- [93] Berger O, Edholm O and Jahnig F 2013 Molecular Dynamics Simulations of a Fluid Bilayer of Dipalmitoylphosphatidylcholine at Full Hydration , Constant Pressure , *Biophys. J* **72** 2002–13
- [94] Orsi M and Essex J W 2011 The ELBA force field for coarse-grain modeling of lipid membranes *PLoS One* **6** 1–22
- [95] Chiu S W, Pandit S a., Scott H L and Jakobsson E 2009 An improved united atom force field for simulation of mixed lipid bilayers *J. Phys. Chem. B* **113** 2748–63
- [96] Lis M, Wizert A, Przybylo M, Langner M, Swiatek J, Jungwirth P and Cwiklik L 2011 The effect of lipid oxidation on the water permeability of phospholipids bilayers *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13** 17555–63
- [97] Tristram-Nagle S, Petrache H I and Nagle J F 1998 Structure and interactions of fully hydrated dioleoylphosphatidylcholine bilayers. *Biophys. J.* **75** 917–25
- [98] L. Martinez, R. Andrade, E. G. Birgin J M M 2009 Packmol: A Package for Building Initial Configurations for Molecular Dynamics Simulations *J. Comput. Chem.* **30** 2157–64
- [99] Humphrey W, Dalke A and Schulten K 1996 VMD: Visual molecular dynamics *J. Mol. Graph.* **14** 33–8
- [100] Hoover G W 1985 Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions *Phys. Rev.* **31** 1695–7
- [101] Darden T, York D and Pedersen L 1993 Particle mesh Ewald: An N log(N) method for Ewald sums in large systems *J. Chem. Phys.* **98** 10089–92
- [102] Essmann U, Perera L, Berkowitz M L, Darden T, Lee H and Pedersen L G 1995 A smooth particle mesh Ewald method *J Chem Phys* **103** 8577–93
- [103] Hess B, Kutzner C, Van Der Spoel D and Lindahl E 2008 GRGMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation *J. Chem. Theory Comput.* **4** 435–47

- [104] Hess B 2002 Determining the shear viscosity of model liquids from molecular dynamics simulations *J. Chem. Phys.* **116** 209–17
- [105] Kučerka N, Nieh M P and Katsaras J 2011 Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1808** 2761–71
- [106] Lewis B a and Engelman D M 1983 Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. *J. Mol. Biol.* **166** 211–7
- [107] Leekumjorn S and Sum A K 2007 Molecular characterization of gel and liquid-crystalline structures of fully hydrated POPC and POPE bilayers *J. Phys. Chem. B* **111** 6026–33
- [108] Niki E, Yoshida Y, Saito Y and Noguchi N 2005 Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338** 668–76
- [109] El-beltagi H S and Mohamed H I 2013 Reactive Oxygen Species , Lipid Peroxidation and Antioxidative Defense Mechanism *Not. Bot. Horti Agrobot. Chij-Napoca* **41** 44–57
- [110] Schnitzer E, Pinchuk I, Bor a., Leikin-Frenkel a. and Lichtenberg D 2007 Oxidation of liposomal cholesterol and its effect on phospholipid peroxidation *Chem. Phys. Lipids* **146** 43–53
- [111] Chiu S W, Jakobsson E, Mashl R J and Scott H L 2002 Cholesterol-induced modifications in lipid bilayers: a simulation study. *Biophys. J.* **83** 1842–53

SAMENVATTING

De behandeling van kanker heeft reeds een lange weg afgelegd sinds de eerste waarnemingen van deze ziekte. De huidige behandelingsmethoden zijn echter nog steeds niet altijd doeltreffend. Voornamelijk de selectiviteit ten opzichte van kankercellen, en de resistentie die deze cellen opbouwen ten aanzien van deze therapieën, blijven een groot probleem. In de afgelopen jaren werd er een nieuwe therapie ontwikkeld, dewelke gebruik maakt van koude atmosferische plasma's om kankercellen te behandelen. Hoewel de eerste experimentele resultaten veelbelovend zijn, blijven de onderliggende mechanismen die zich afspeelen tijdens de plasma-cel interactie, onbekend. Voornamelijk de manier waarop reactieve plasmadeeltjes de cel binnendringen, vormt een belangrijk vraagstuk. Een van de theorieën hieromtrent is dat lipide peroxidatie veranderingen veroorzaakt in de structuur van het membraan, waardoor de reactieve deeltjes in staat zijn om in de cel te migreren.

In de huidige studie wordt getracht om deze theorie te ondersteunen. Het effect van lipide peroxidatie op de eigenschappen van een modelsysteem voor het membraan wordt onderzocht aan de hand van moleculaire dynamica simulaties. Drie verschillende peroxidatieproducten worden in rekening gebracht, waarvan twee aldehyden en één peroxide. De invloed van de concentratie van deze producten wordt onderzocht, alsook het effect van cholesterol.

De simulaties tonen aan dat in systemen zonder cholesterol poriën gevormd kunnen worden indien alle fosfolipiden geoxideerd worden. Deze poriën kunnen vervolgens als een doorgang dienen, waardoor de reactieve deeltjes in contact komen met het interne milieu van de cel. Wanneer cholesterol wordt toegevoegd, worden daarentegen slechts kleine waterdefecten gevormd. Daar het plasmamembraan van een kankercel een aanzienlijk lagere fractie aan cholesterol bevat, suggereren deze waarnemingen dat deze cellen gevoeliger zijn aan de plasmabehandeling. Bijgevolg zouden deze selectief behandeld kunnen worden ten opzichte van gezonde cellen. Het waarnemen van de vorming van poriën bevestigt eveneens de hierboven vermelde theorie.

SUMMARY

The treatment of cancer has come a long way since the first observations of the disease. The current therapies, however, are still not always successful. In particular, selectivity towards cancer cells and the resistance these cells develop with respect to these methods remain problematic. In recent years, a new therapy was developed in which cold atmospheric plasmas are used for cancer treatment. Although first experiments are very promising, the underlying mechanism of the plasma-cell interaction remains elusive. Especially the manner in which reactive species from the plasma are able to enter cancer cells remains a large mystery. One of the theories is that lipid peroxidation causes alterations in the structure of the plasma membrane of the cell, allowing reactive species to migrate through the membrane, into the cell.

In the current study, we try to find support for this theory. The effect of lipid peroxidation on the properties of a model system for the plasma membrane is investigated by molecular dynamics simulations. Three different lipid peroxidation end products are taken into account. These include two aldehydes and one peroxide. The effect of the concentration of these products is investigated, as well as the effect of cholesterol.

The simulations show that in systems without cholesterol, pores can be formed in case of total oxidation of the membrane phospholipids. These pores can then act as a passage way for the reactive species, into the cell's internal environment. When adding cholesterol, however, no pores are formed. Even in the case of total oxidation, only small water defects occur. As the plasma membrane of cancer cells contains significant lower amounts of cholesterol, these results not only confirm the above mentioned theory, but also suggest that cancer cells are more vulnerable to plasma treatment, and consequently can be selectively treated over healthy cells.

ABSTRACT

Ondanks de evolutie betreffende de behandeling van kanker, blijven huidige therapiën soms ontoereikend. Enerzijds kunnen kankercellen resistent worden tegen deze behandelingen, anderzijds zijn er vaak nevenwerkingen aanwezig. Recente experimenten wijzen uit dat plasma's (die een cocktail van reactieve deeltjes produceren) in staat zijn om kankercellen efficiënt te doden, zonder gezonde cellen te beïnvloeden. Om dit optimaal te benutten is er echter meer kennis vereist over de chemische processen die de celdood veroorzaken. Een mogelijke theorie stelt dat reactieve deeltjes de wand van deze kankercellen verstoren, wat uiteindelijk tot celdood leidt.

Het doel van deze studie is om na te gaan of deze deeltjes inderdaad de wand aantasten of doorbreken. Uit het onderzoek kan afgeleid worden dat deze deeltjes poriën veroorzaken in de wand van een kanker cel. Deze deeltjes kunnen vervolgens door deze poriën migreren naar het interne milieu van de cel, om zo celdood te veroorzaken. Dit effect wordt tegengewerkt door de aanwezigheid van cholesterol in de wand, welke niet aanwezig is in de meeste kankercellen, maar wel in gezonde cellen. Deze laatste zouden dus niet aangetast worden door de nieuwe therapie. Deze studie draagt bij tot het uitbreiden van de kennis omtrent de behandeling van kankercellen met plasma's.

i | Bijlage

Tabel 1: Berekende waarden voor het modelsysteem zonder oxidatieproducten en de modelsystemen die naast POPC een variërende concentratie aan OX1 bevatten.

	Concentratie geoxideerde fosfolipiden (%)	Oppervlakte per lipide (Å ²)	Middelbare fout op oppervlakte per lipide (Å ²)	Dikte dubbellaag (Å)	Middelbare fout op dikte dubbellaag (Å)	Gemiddelde S _{CD}	Gemiddelde H ₂ O dichtheid (kg.m ⁻³)
POPC	0	63,5	0,4	38,6	0,6	0,176	0,005
	2,8	64,8	0,2	38,9	0,6	0,166	0,002
	5,6	64,0	0,2	38,7	0,6	0,176	0,013
	11,1	65,8	0,1	35,9	0,6	0,160	0,008
OX1	25	66,9	0,3	35,5	0,6	0,161	0,180
	50	70,9	0,3	33,4	0,6	0,154	0,443
	63,9	71,9	0,2	32,4	0,6	0,156	0,680
	80,6	78,1	0,2	30,5	0,6	0,129	0,600
	100	71,9	0,4	33,1	0,6	0,138	1,953

Tabel 2: Berekende waarden voor de modelsystemen die naast POPC een variërende concentratie aan OX2 bevatten.

	Concentratie geoxideerde fosfolipiden (%)	Oppervlakte per lipide (Å ²)	Middelbare fout op oppervlakte per lipide (Å ²)	Dikte dubbellaag (Å)	Middelbare fout op dikte dubbellaag (Å)	Gemiddelde S _{CD}	Gemiddelde H ₂ O dichtheid (kg.m ⁻³)
	2,8	63,9	0,2	37,7	0,6	0,168	0,000
	5,6	63,5	0,1	37,4	0,6	0,168	0,000
	11,1	63,6	0,2	35,7	0,6	0,158	0,017
OX2	25	64,6	0,2	35,6	0,6	0,136	0,057
	50	66,6	0,4	31,6	0,6	0,118	0,805
	63,9	66,7	0,4	29,5	0,6	0,109	3,623
	80,6	65,9	0,6	33,6	0,6	0,064	54,803
	100	60,9	0,4	33,0	0,6	0,030	94,484

Tabel 3: Berekende waarden voor de modelsystemen die naast POPC een variërende concentratie aan OX3 bevatten.

	Concentratie geoxideerde fosfolipiden (%)	Oppervlakte per lipide (Å ²)	Middelbare fout op oppervlakte per lipide (Å ²)	Dikte dubbellaag (Å)	Middelbare fout op dikte dubbellaag (Å)	Gemiddelde S _{CD}	Gemiddelde H ₂ O dichtheid (kg.m ⁻³)
OX3	2,8	63,9	0,2	37,8	0,6	0,167	0,075
	5,6	64,5	0,3	37,4	0,6	0,171	0,002
	11,1	66,3	0,5	37,0	0,6	0,155	0,023
	25	69,1	0,5	34,9	0,6	0,140	0,059
	50	74,3	0,3	32,0	0,6	0,119	1,442
	63,9	78,5	0,6	31,4	0,6	0,115	1,520
	80,6	79,7	0,4	31,4	0,6	0,108	3,025
	100	80,7	0,5	32,4	0,6	0,061	65,993

Tabel 4: Berekende waarden voor het modelsysteem zonder oxidatieproducten (POPC/CHOL) en de modelsystemen die naast POPC een variërende concentratie OX1 bevatten. Elk van deze systemen bevat 50 % cholesterol (CHOL).

	Concentratie geoxideerde fosfolipiden (%)	Oppervlakte per lipide (Å ²)	Middelbare fout op oppervlakte per lipide (Å ²)	Dikte dubbellaag (Å)	Middelbare fout op dikte dubbellaag (Å)	Gemiddelde S _{CD}	Gemiddelde H ₂ O dichtheid (kg.m ⁻³)
POPC/CHOL	0	42,1	0,1	44,0	0,9	0,347	0,000
	2,8	42,3	0,1	44,9	0,9	0,344	0,206
	5,5	42,6	0,1	44,6	0,9	0,329	0,000
	11,1	42,7	0,1	45,1	0,9	0,339	0,000
OX1	22,2	44,0	0,1	42,7	0,9	0,295	0,000
	33,3	44,1	0,1	42,1	0,9	0,293	0,000
	50	46,2	0,2	39,2	0,8	0,256	1,320
	100	48,5	0,1	34,8	0,8	0,207	0,000

Tabel 5: Berekende waarden voor modelsystemen die naast POPC een variërende concentratie aan OX2 en 50 % cholesterol bevatten.

	Concentratie geoxideerde fosfolipiden (%)	Oppervlakte per lipide (Å ²)	Middelbare fout op oppervlakte per lipide (Å ²)	Dikte dubbellaag (Å)	Middelbare fout op dikte dubbellaag (Å)	Gemiddelde S _{CD}	Gemiddelde H ₂ O dichtheid (kg.m ⁻³)
	2,8	42,1	0,1	45,4	0,9	0,346	0,000
	5,5	41,4	0,1	45,5	0,9	0,351	0,000
	11,1	41,4	0,1	45,9	0,9	0,334	0,000
OX2	22,2	40,9	0,2	43,3	0,9	0,307	0,000
	33,3	38,3	0,1	42,2	0,9	0,331	0,000
	50	39,3	0,2	42,6	0,8	0,290	0,000
	100	38,9	0,4	40,7	0,8	0,202	0,179

Tabel 6: Berekende waarden voor modelsystemen die naast POPC een variërende concentratie aan OX3 en 50 % cholesterol bevatten.

	Concentratie geoxideerde fosfolipiden (%)	Oppervlakte per lipide (Å ²)	Middelbare fout op oppervlakte per lipide (Å ²)	Dikte dubbellaag (Å)	Middelbare fout op dikte dubbellaag (Å)	Gemiddelde S _{CD}	Gemiddelde H ₂ O dichtheid (kg.m ⁻³)
	2,8	42,1	0,1	44,2	0,9	0,346	0,000
	5,5	42,3	0,1	43,7	0,9	0,341	0,000
	11,1	42,6	0,1	43,6	0,9	0,327	0,000
OX3	22,2	41,9	0,2	43,3	0,9	0,328	0,000
	33,3	43,9	0,1	43,2	0,9	0,288	0,000
	50	46,7	0,2	42,4	0,9	0,256	0,005
	100	49,4	0,5	37,3	0,8	0,197	0,028

Tabel 7: Berekende waarden voor modelsystemen die opgebouwd zijn uit OX3 en een variërende concentratie aan cholesterol.

	Cholesterol- concentratie (%)	Oppervlakte per lipide (Å ²)	Middelbare fout op oppervlakte per lipide (Å ²)	Dikte dubbellaag (Å)	Middelbare fout op dikte dubbellaag (Å)	Gemiddelde S _{CD}	Gemiddelde H ₂ O densiteit (kg.m ⁻³)
OX3	0	80,7	0,5	32,4	0,6	0,061	65,993
	5,6	78,8	1,2	33,0	0,6	0,070	51,432
	11,1	73,6	0,7	35,3	0,6	0,079	49,396
	16,7	70,8	0,6	32,0	0,6	0,118	4,005
	25	66,5	0,5	32,7	0,7	0,126	3,629
	33,3	61,1	0,5	34,0	0,7	0,141	0,963
	41,7	55,8	0,6	36,3	0,7	0,164	0,472
	50	49,4	0,5	37,3	0,8	0,197	0,028

