

Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie

Biotechnologie – Cel- en Gentechnologie



DE ROL VAN INTRACELLULAIRE ANTIOXIDANTEN BIJ *IN VITRO* EN *EX VIVO* BLOOTSTELLING AAN LAGE DOSIS X-STRALING

Kristof Smeets

Promotoren:

Dr. Marjan Moreels
Drs. Niels Belmans
Dr. Ir. Ilse Smets

SCK•CEN
UHasselt, SCK•CEN
Hogeschool PXL-Tech



Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie

Biotechnologie – Cel- en Gentechnologie



DE ROL VAN INTRACELLULAIRE ANTIOXIDANTEN BIJ *IN VITRO* EN *EX VIVO* BLOOTSTELLING AAN LAGE DOSIS X-STRALING

Kristof Smeets

Promotoren:

Dr. Marjan Moreels
Drs. Niels Belmans
Dr. Ir. Ilse Smets

SCK•CEN
UHasselt, SCK•CEN
Hogeschool PXL-Tech



Voorwoord

Deze scriptie is het eindresultaat van de bachelorproef en een bachelorstage van 64 dagen in de opleiding Agro- en Biotechnologie van de hogeschool PXL Diepenbeek met specialisatie cel- en gentechnologie. Deze scriptie is hiermee tevens de afsluiter van de gehele opleiding.

Deze bachelorstage aan het onderzoekscentrum SCK•CEN kaderde binnen het doctoraatsonderzoek van Drs. Niels Belmans met als onderwerp "*Dentomaxillofacial paediatric imaging: an investigation towards low dose radiation induced risks*". "*De rol van intracellulaire antioxidanten bij in vitro en ex vivo blootstelling aan lage dosis X-straling*", waarover de bachelorscriptie handelt, is een onderdeel van het onderzoek van Drs. Niels Belmans.

Door met deze stage actief betrokken te worden bij een groter onderzoek heb ik heel wat nieuwe praktische en technische kennis vergaard. Heel wat nieuwe technieken werden mij bijgeleerd. In een onderzoek loopt niet alles even vlot, dat is bij deze stage ook gebleken toen er een aantal weken aan tests uit overmacht opnieuw uitgevoerd moesten worden. Maar ook daaruit kan enkel maar meer bijgeleerd worden door het actief denken over de oorzaak en het zoeken naar oplossingen hiervoor.

Ik zou hierbij mijn externe promotoren van het SCK•CEN willen bedanken, Dr. Marjan Moreels en Drs. Niels Belmans. Ze hebben mij steeds zeer goed begeleid, waardoor ik veel heb bijgeleerd. De samenwerking met hen heb ik als zeer aangenaam ervaren. Ook mijn interne promotor van hogeschool PXL, Dr. Ir. Ilse Smets wil ik hierbij bedanken voor haar steun en begeleiding. Ook de andere collega's van de dienst radiobiologie aan het SCK•CEN waarmee ik dagelijks in contact ben gekomen wil ik bedanken, aangezien ze altijd klaar stonden om hulp te bieden. Hierbij extra dank aan Katrien Konings en Ann Janssen voor de hulp en uitleg bij de eerste maal uitvoeren van een aantal technieken.

Ieder van hen heeft bijgedragen tot het goede verloop van deze bachelorstage en bachelorproef.

Ten slotte ook hartelijk dank aan het SCK•CEN, om mij de kans te geven deze stage te lopen en hun laboratoria en materiaal hiervoor beschikbaar te stellen.

Kristof Smeets, Mol, 18 januari 2018

De rol van intracellulaire antioxidanten bij *in vitro* en *ex vivo* blootstelling aan lage dosis X-straling

Kristof Smeets¹, Ilse Smets¹, Niels Belmans^{2,3}, Marjan Moreels²

¹Hogeschool PXL, Diepenbeek, België

²Instituut voor Omgeving, gezondheid en Veiligheid, Interdisciplinaire Biowetenschappen, Radiobiologie, SCK•CEN, Mol, België

³Faculteit voor Geneesmiddelen en Levenswetenschappen, Biomedisch Onderzoeksinstituut, Universiteit Hasselt, Hasselt, België

Abstract

Cone Beam Computed Tomography (CBCT) is een medische beeldvormingstechniek die gebruik maakt van conische X-stralenbundels. Deze techniek wordt voornamelijk gebruikt in de tandheelkunde en orthodontie om accurate driedimensionale scans van de kaken en de tanden te bekomen. CBCT wordt beschouwd als een lage stralingsdosis techniek. Hoge dosis X-stralen hebben nadelige effecten op het menselijk lichaam. Voor lagere doses, zoals bij CBCT zijn deze effecten niet duidelijk. Met het oog op stralingsbescherming is het belangrijk om de verschillende aspecten en effecten van lage doses aan ioniserende straling op het lichaam in kaart te brengen. Huidig onderzoek spitst zich toe op de effecten die lage doses X-straling hebben op het intracellulaire antioxidantsysteem.

In vitro werden deze effecten getest door enzymhoeveelheidsanalyses, enzymactiviteitsanalyses en genexpressieanalyses uit te voeren op de antioxidante enzymen catalase, superoxide dismutase 1 (SOD1) en glutathion peroxidase 1 (GPx-1) in celculturen van dentale stamcellen. De *in vitro* celculturen, bestaande uit de types Dentale Pulpa Stamcellen (DPSC), Dentale Follikel Stamcellen (DFSC) en Stamcellen van Apicale Papilla (SCAP), werden bestraald met verschillende doses X-stralen met X-straleigenschappen die overeenkomen met X-stralen gebruikt door CBCT-toestellen. De geteste doses zijn 50 mGy en 100 mGy, wat lager ligt dan de effectieve dosis van een CBCT-scan (rond de 100 tot-500 µGy). De effecten van X-straling onder een dosis van 100 mGy zijn niet geweten, door een gebrek aan statistische kracht van de huidige epidemiologische data. 50 en 100 mGy werden gekozen als startpunt voor hypothestetests tot 100 mGy. Deze celculturen werden *in vitro* verder opgekweekt en op verschillende tijdstippen na bestraling gelyseerd voor analyse. *Ex vivo* werden de effecten van lage doses straling getest op speekselstalen van pediatrische patiënten die een CBCT-scan ondergingen. Van hen werd voor en 30 minuten na de scan een speekselstaal afgenomen. Deze stalen werden getest op verschillen in enzymactiviteit van de antioxidanten catalase, GPx-1 en SOD1.

De drie *in vitro* analyses bleken geen significante verschillen tussen bestralingsdoses en tijdstippen na bestraling te geven in enzymhoeveelheid, activiteit of genexpressie. De *ex vivo* data tonen een significante stijging in de antioxidante enzymactiviteit van catalase en SOD1 30 minuten na het ondergaan van een CBCT-scan. De enzymactiviteit van GPx-1 was niet meetbaar doordat de waarden onder de detectielimiet lagen. Deze *ex vivo* resultaten suggereren dat lage doses straling de enzymactiviteit van catalase en SOD1 in speeksel verhogen in een acute reactie op stralingsblootstelling. Extra onderzoek is nodig om deze acute reacties verder te onderzoeken.

Sleutelwoorden: Cone-Beam Computed Tomografie; X-straling; catalase; Glutathion Peroxidase 1; Superoxide Dismutase 1; antioxidanten; oxidatieve stress

Introductie

Het belang van stralingsonderzoek

Het Studiecentrum voor kernenergie SCK•CEN doet onderzoek naar eigenschappen, toepassingen en gevolgen van radioactiviteit en het vreedzame gebruik ervan. Het beter begrijpen van de gevolgen van blootstelling aan radioactieve straling is belangrijk om onszelf hiertegen te kunnen beschermen. Radioactieve straling kent heel wat toepassingen in het dagelijkse leven, waaronder het gebruik voor medische beeldvorming. Er moet duidelijk geweten zijn welke gevolgen ioniserende straling in ons leven kan hebben om een betere preventie te kunnen doen en patiënten te kunnen beschermen tegen de effecten van stralingsblootstelling. Vooral kinderen zijn extra vatbaar voor de gevolgen van ioniserende straling, gezien hun verhoogde stralingsgevoeligheid in vergelijking met volwassenen. (Brenner and Hall, 2009)

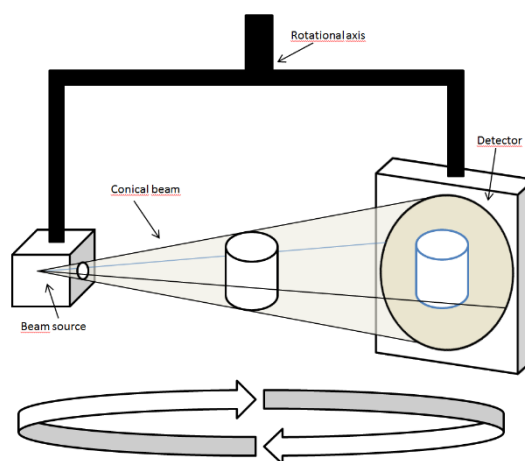
Medische Beeldvorming

Onder medische beeldvorming verstaat men de groep van technieken die gebruikt worden om beelden te maken van inwendige structuren en organen van de mens voor medisch gebruik. Diagnoses kunnen sneller gesteld worden én dit zonder operaties. Daarnaast biedt het een hulp bij heelkunde en radiotherapie. Medische beeldvorming omvat verschillende technieken zoals echografie, *Magnetic Resonance Imaging* (MRI) en *Computed Tomography* scans (CT-scans). Via dergelijke beelden die al dan niet driedimensionaal (3D) zijn, kan men delen van het lichaam zien die anders, zonder operatie, niet zichtbaar zijn. Enkele van deze medische beeldvormingstechnieken maken gebruik van ioniserende X-stralen. Hierbij worden X-stralen uit een externe X-straalbuis doorheen het gewenste lichaamsdeel gestuurd. De straling die doorheen het lichaam passeert wordt via een X-stralingsfilm opgevangen en verwerkt om tweedimensionale (2D) afbeeldingen te bekomen van het lichaamsdeel. Een specifiekere variant hiervan, die meer gedetailleerde beelden produceert is *Computed Tomography* (CT). Deze gebruikt een gemotoriseerde X-stralingsbron die een dunne bundel straling doorheen het lichaam stuurt. Deze bron draait rond het lichaam

waarbij de straling die doorheen het lichaam passeert opgevangen wordt door ééndimensionale detectoren. De beelden die door deze detectoren gevormd worden, worden digitaal verwerkt tot één tomografische doorsnede op een specifiek punt van het lichaamsdeel (Brenner and Hall, 2009; NIH, 2013; Schardt et al., 2002).

CBCT

Een nieuwere variant van CT is *Cone Beam Computed Tomography* (CBCT). Deze medische beeldvormingstechniek maakt gebruik van conische bundels X-stralen gecentreerd op een tweedimensionale detector, in tegenstelling tot smalle bundels zoals bij een conventionele CT-scan (zie figuur 1).



Figuur 1: Werkingsschema Cone Beam Computed Tomography (CBCT). Conische bundels X-stralen uit de bron gaan doorheen het weefsel en worden gecentreerd op een tweedimensionale detector waar tweedimensionale (2D) afbeeldingen genomen worden. Het bron-detectorsysteem draait rond een centrale as om meerdere 2D afbeeldingen te nemen ter reconstructie van een driedimensionaal beeld (Clinic, 2015b).

Door het gebruik van conische bundels kan een groter oppervlak bestraald worden en wordt elke keer een 2D afbeelding genomen. Door het ronddraaien van de bron en detector wordt een reeks van 2D afbeeldingen genomen die digitaal verwerkt worden na één volledige rotatie tot een 3D reconstructie. (Clinic, 2015) Deze techniek wordt vooral gebruikt bij tandheelkunde en orthodontie om accurate scans van de kaken en de tanden te bekomen. Door het bekomen van 3D beelden van de kaak kan er accurater ingeschat worden waar een ingreep moet gebeuren en een betere diagnose gebeuren dan bij een 2D afbeelding. Het gebruik van een

conische stralingsbundel zorgt ervoor dat de bestralingstijd sterk verlaagd aangezien er slechts 1 rotatie nodig is. De *Field Of View* (FOV), het gebied dat bestraald wordt, kan verkleind worden om enkel het gewenste deel van het lichaam te bestralen. Dit wordt gedaan zodat er geen onnodige bestraling gebeurt. Hierdoor wordt bij CBCT gesproken over een lage dosis techniek voor medische beeldvorming. Bij een conventionele CT ligt de gemiddelde dosis rond de 1000 microGray (μGy), terwijl dit bij een CBCT rond de 100-500 μGy ligt (Li, 2013). Door zijn lagere kost en lagere dosis aan straling ten opzichte van een conventionele CT-scanner wordt deze techniek steeds vaker gebruikt. In tegenstelling tot een conventionele CT kunnen bij een CBCT geen zachte weefsels in beeld gebracht worden. Dit maakt dat deze techniek vooral nut heeft voor harde weefsels zoals bot en tandstructuren. Naast diagnose wordt CBCT ook gebruikt voor andere doeleinden. Stralingstoestellen voor deeltjesstraling voor kankertherapie (hadrontherapie) bevatten steeds een CBCT-scanner. Deze wordt, voordat de patiënt effectief bestraald wordt, gebruikt om de therapie te plannen en de juiste instellingen per patiënt individueel aan te kunnen passen bij elke radiotherapie sessie (Scarfe and Farman, 2008; De Vos et al., 2009; Dawood et al., 2009).

X-straling

X-straling is een vorm van ioniserende straling die kunstmatig opgewekt wordt via elektriciteit. Het wordt opgewekt in een X-straalbuis. Deze bestaat uit een vacuüm buis met een kathode en een anode. De kathode emitteert elektronen. Onder invloed van een spanningsverschil worden de elektronen versneld en wordt een elektronenbundel gevormd. Deze bundel slaat in op de anode in het focuspunt en zendt hierbij straling met hoge energie uit in de vorm van X-straling. X-straling bij medische beeldvorming zoals CBCT wordt gevormd onder een spanningsverschil rond 100 kiloVolt (kV) (Schardt et al., 2002).

Ioniserende straling

Ioniserende straling, zoals X-straling, is straling met een kleine golflengte die hoge energie met zich meedraagt. Deze energie is hoog genoeg om vaste elektronen, die in een baan rond het atoom zitten, te verwijderen. Hierdoor wordt het

atoom geladen of geïoniseerd. In lichaamscellen kan deze ionisatie leiden tot interactie met verschillende moleculen, waaronder hydrolyse van water en modificaties aan belangrijke biomoleculen zoals het desoxyribonucleïnezuur (DNA). Dit kan uiteindelijk leiden tot mutaties, chromosomale herschikkingen, vervroegde senescentie en apoptose van cellen. Deze straling kan ook zorgen voor verhoogde oxidatieve stress in cellen van aërobe organismen met vorming van extra reactieve zuurstofverbindingen (ROS). Dit wordt veroorzaakt door de hydrolyse van water: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}^+ + \text{e}^-$. Het is via deze ROS dat ioniserende straling het meeste biologische schade kan aanrichten (de Barros da Cunha et al., 2015; WHO, 2017).

Reactieve zuurstofverbindingen

Atomisch zuurstof (O_2) heeft op zijn buitenste elektronenschil twee ongepaarde elektronen. Deze vrije elektronenstructuur zorgt ervoor dat zuurstof vatbaar is voor radicale vormveranderingen. Door de hoge activiteit van ioniserende straling kan dit zuurstof gereduceerd worden door toevoeging van elektronen aan deze buitenste schil. Er kunnen hierdoor verschillende ROS gevormd worden, waaronder superoxide anionen, peroxiden, waterstofperoxide, hydroxylradicalen en hydroxylionen (respectievelijk O_2^- ; O_2^{-2} ; H_2O_2 ; OH^* ; OH^-) (Fukai and Ushio-Fukai, 2011).

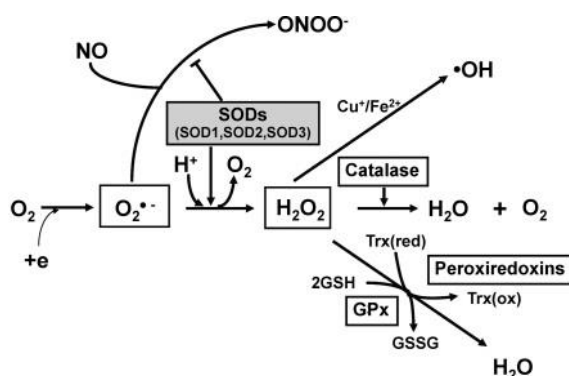
ROS worden niet enkel gegenereerd door straling, maar ook als producten en bijproducten van het elektronentransport doorheen de mitochondriën tijdens mitochondriale respiratie. ROS worden ook geproduceerd door verschillende enzymen die verbonden zijn met de mitochondriale elektronen-transportketen, waaronder xanthine oxidase, lipoxygenase en nitraatoxide synthase. Ook worden ROS gevormd als noodzakelijke tussenstappen van oxidatie-reacties met metalen als katalysator. In de cellen voeren ROS de functie uit van signaalmolecule en van cellulair toxine. De belangrijkste schadelijke ROS zijn het O_2^- en H_2O_2 (Fukai and Ushio-Fukai, 2011; Halliwell and Whiteman, 2004).

Overmatige productie van ROS kan verschillende schadelijke effecten hebben op de cellen en hun onderdelen. Dit leidt tot DNA mutaties,

proteïneoxidatie, lipideperoxidatie en kan uiteindelijk leiden tot het verlies van de moleculaire functies van verschillende stoffen en bijdragen tot de pathogenese van humane ziekten waaronder kanker (Halliwell and Whiteman, 2004; Held, 2014; Kang et al., 2013).

Antioxidante enzymen

Aërobe organismen hebben defensieve systemen tegen deze ROS die bestaan uit onder andere antioxidantische enzymen. Deze groep van enzymen gaan elk specifiek een deel van de oxidatieve stressfactoren aanpakken en deze verwijderen of neutraliseren. Bij een verhoging van de hoeveelheid ROS in cellen stijgt de hoeveelheid antioxidantische om de overbodige ROS te kunnen neutraliseren en wordt de enzymactiviteit van deze enzymen verhoogd. Bepaalde ROS kunnen echter in beperkte mate ook nuttig zijn voor de cel, waaronder H_2O_2 dat essentieel is voor groeifactor gemedieerde signaaltransductie. Hierdoor staan antioxidantische enzymen ook in voor de regulatie en modulatie van deze processen. Drie van de belangrijkste intracellulaire antioxidantische enzymen zijn superoxide dismutase 1 (SOD1), catalase, en glutathion peroxidase 1 (GPx-1) (Moore et al., 2014). De interactie en samenwerking tussen deze antioxidantische enzymen wordt schematisch voorgesteld in onderstaande figuur 2 (Fukai and Ushio-Fukai, 2011; Kang et al., 2013; Lubos et al., 2011).



Figuur 2: Het antioxidantensysteem voor reactieve zuurstofverbindingen. Superoxide (O_2^-) wordt geproduceerd door toevoeging van elektronen aan moleculair zuurstof (O_2). Superoxide wordt door superoxide dismutase (SOD) omgezet naar H_2O_2 , wat op zijn beurt gereduceerd wordt naar water door catalase, glutathion peroxidases (GPx), en peroxiredoxines (Prx). In het bijzijn van gereduceerde metalen (Fe^{2+} en Cu^+) kan H_2O_2 spontaan omgezet worden naar hydroxyl radicalen ($\bullet OH$). Stikstofmonoxide kan door superoxide geïnactiveerd worden met behulp van SOD met de vorming van oxidant peroxynitriet (Fukai and Ushio-Fukai, 2011).

SOD1

SOD1 is de belangrijkste verdediging tegen O_2^- . SOD1 zorgt ervoor dat O_2^- omgezet worden in H_2O_2 ($2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$). Dit H_2O_2 wordt later verder geneutraliseerd door onder andere catalase en GPx-1. SOD1 is een koper-zink superoxide dismutase en is een cytosol scavenger van zuurstofvrije radicalen dat koper en zink bindt om zijn enzymatische activiteit uit te voeren. Door zijn enzymatische werking vergemakkelijkt SOD1 de dismutatie van O_2^- naar H_2O_2 . SOD1 is ook een katalysator voor prooxidante reacties waarbij koper wordt gebonden (Fukai and Ushio-Fukai, 2011; Cruz, 2017c; Cruz, 2017d).

Humaan SOD1 komt veelvuldig tot expressie in somatische cellen van de meeste weefsels, en komt vooral het meeste tot expressie in lever- en nierweefsels. SOD1 functioneert als een homodimeer. SOD1 heeft een grootte van 23 kiloDalton (kDa) en wordt gecodeerd door zijn gen op chromosoomlocatie 21q22.11 (UniProt, 2017e; NCBI, 2017d).

Catalase

Catalase is een peroxisoom-specifiek markerproteïne dat tot de familie van de catalases behoort. Dit enzym komt voor in alle aërobe organismen en beschermt cellen tegen mogelijke toxische effecten van H_2O_2 door omzetting hiervan in zuurstof en water ($2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$). Het stimuleert ook de groei van een aantal celtypen waaronder T-cellen en B-cellen. Fouten in gencodering voor dit proteïne kunnen leiden tot acatalasia, een ziekte die gekenmerkt wordt door de afwezigheid van catalase-activiteit in erythrocyten en wordt in verband gebracht met zwerende mondtumoren (laesies). Hierdoor is catalase een belangrijke regulator van oxidatieve stress en ontstekingen (Kang et al., 2013; Cruz, 2017a).

Humaan catalase heeft een grootte van 64 kDa en wordt gecodeerd door zijn gen op chromosomale locatie 11p13 (UniProt, 2017a).

GPx-1

GPx-1 behoort tot de glutathion peroxidasefamilie en bevat seleniumcysteïne. Het zijn tetramere glycoproteïnen die helpen lipide peroxidatie van de celmembranen te voorkomen door de reductie van organische

lipide hydroperoxides naar alcoholen en vrij waterstofperoxide naar water met behulp van glutathion ($2 \text{ glutathion} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{glutathiondisulfide} + 2 \text{H}_2\text{O}$). Ook beschermt GPx-1 de hemoglobinemoleculen in erythrocyten tegen oxidatieve afbraak. Het voornaamste doel van GPx-1 is de accumulatie van H_2O_2 in de cellen tegengaan om de schadelijke effecten ervan te verminderen.

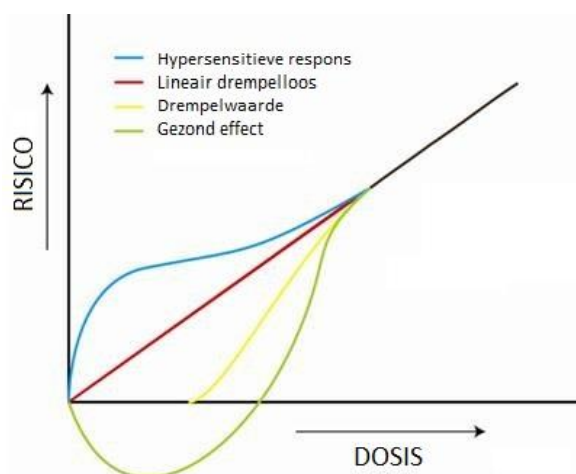
GPx-1 is één van de acht homologen van GPx die het meeste voorkomt. Hiervan speelt GPx-1 een belangrijke rol bij de antioxidant bescherming van de vasculaire wand en van neurale cellen als antwoord op oxidatieve stress (Lubos et al., 2011; NCBI, 2017a; Cruz, 2017b).

Humaan GPx-1 komt voor in alle cellen en kan gevonden worden in het cytosol, mitochondriën en in sommige celsoorten in de peroxisomen. GPx-1 heeft een grootte van 23 kDa en wordt gecodeerd door zijn gen op chromosomale locatie 3p21.31 (UniProt, 2017b; NCBI, 2017a).

Dosis-effectrelatie

Voor lage doses aan ioniserende straling is weinig geweten wat de relatie tussen dosis en respons is. Voor hogere doses (veelal boven 100 milliGray (mGy)) is er epidemiologisch bewijs voor een lineaire dosis-responsrelatie. Voor doses onder 100 mGy zijn er verschillende mogelijke hypothesen die nog niet bewezen zijn. Men stelt dat er 4 verschillende mogelijkheden zijn, namelijk: 1) er is een drempelwaarde voor hoeveelheid straling waarboven er pas een risico is, 2) een zeer snelle stijging vanaf een minimale hoeveelheid straling die later lineair wordt, 3) een hypothese waarbij beschouwd wordt dat zeer lage doses straling zelfs gezond kunnen zijn, 4) en de lineaire drempelloze dosis-effectrelatie (LNT) (*Linear no-Threshold*) (zie figuur 3) (Puskin, 2009).

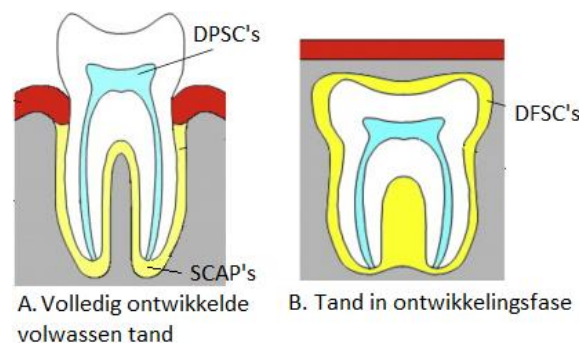
De LNT is de hypothese waarvan men het vaakst uitgaat. Deze hypothese zegt dat elke dosis, hoe klein ook, een risico inhoudt voor organismen en altijd met deze dosis in proportie is. De LNT hypothese trekt het lineair verband van hoge doses straling lineair door naar alle lagere doses (Puskin, 2009; Liu, 2003).



Figuur 3: Dosis-respons hypothesen. Mogelijke hypothesen voor dosis-responsrelatie bij lage doses ioniserende straling (< 100 milliGray). Blauw : hypersensitieve respons; rood : lineair drempelloos; geel : effect vanaf drempelwaarde; groen : gezonde lage doses.

Dentale stamcellen

CBCT wordt voornamelijk gebruikt in tandheelkunde voor beeldvorming van de kaak en tanden. Hierdoor worden vooral cellen en weefsels in de kaken en tanden blootgesteld aan straling. Ook dentale stamcellen worden door deze straling beïnvloed. Stamcellen zijn cellen die *in vitro* makkelijk te bestuderen zijn wegens hun grote overlevings- en deelvermogen en eenvoudige kweekmethode. Drie eenvoudig op te kweken dentale stamcellen zijn dentale pulp stamcellen (DPSC's), stamcellen van apicale papilla (SCAP's) en dentale follikel stamcellen (DFSC's). Deze drie types kunnen in verschillende delen van humane tanden gevonden worden (zie figuur 4) (Mayo et al., 2014).



Figuur 4: Schema dentale stamcellen. Schema locatie stamcellen in verschillende delen van humane tanden, dentale pulp stamcellen (DPSC's), stamcellen van apicale papilla (SCAP's) en dentale follikel stamcellen (DFSC's) (Mayo et al., 2014).

DPSC's vormen dentineachtige structuren en zijn gedeeltelijke precursors van osteoblasten. DFSC's zullen cementoblasten en osteoblasten vormen. SCAP's zijn gelijkaardig aan DPSC's maar bevatten een groter potentieel als progenitorcellen, met als voornaamste de vorming van odontoblasten (Gronthos et al., 2000; Honda et al., 2010; Miura et al., 2003; Sonoyama et al., 2008).

Probleem- en Doelstelling

De negatieve effecten van hoge doses ioniserende straling zoals X-straling op het lichaam zijn grondig onderzocht en in kaart gebracht. Echter, bij blootstelling aan lage geabsorbeerde doses onder 100 mGy, zoals bij een CBCT-scan, is er weinig geweten over de effectieve gevolgen. In dit onderzoek werden celculturen van drie types dentale stamcellen (DPSC, DFSC, SCAP) bestraald met X-stralddoses van 50 mGy en 100 mGy om het dosisdebiet van CBCT-scans na te bootsen, met als doel het effect van een dergelijke scan *in vitro* te bestuderen. Tevens werd de invloed van lage dosis straling op oxidatieve stress bestudeerd door veranderingen in het defensiesysteem tegen oxidatieve stress te bepalen. De meest voorkomende antioxidante enzymen zoals SOD1, catalase en GPx-1 kunnen in dentale stamcellen teruggevonden worden. Door het bestuderen van veranderingen in hoeveelheid aanwezige antioxidanten, veranderingen in enzymactiviteit en veranderingen in de aanmaak van mRNA voor deze antioxidanten in de cellen na bestraling kan er een inschatting gemaakt worden of bij lage doses straling het antioxidantensysteem beïnvloed wordt. Deze factoren werden gecontroleerd bij verschillende doses straling en op verschillende tijdstippen na bestraling. Een verhoogde aanwezigheid of verhoogde activiteit van de enzymen kan duiden op een effectieve verhoging aan oxidatieve stress in de cellen, wat op potentiële schadelijke effecten voor het lichaam zou kunnen wijzen ook bij lage doses aan straling.

Het onderzoek werd ingedeeld in twee deelonderzoeken, een *in vitro*-gedeelte en een *ex vivo*-gedeelte. Hierbij werd uitgegaan van vier deelvragen, namelijk 1) is er een significante verandering in de hoeveelheid van de antioxidante enzymen catalase, SOD1 en GPx-1

in *in vitro* bestraalde dentale stamcellen DPSC, DFSC en SCAP op verschillende tijdstippen na de bestraling en bij blootstelling aan verschillende lage doses straling? 2) Is er een significante verandering in de enzymactiviteit van deze zelfde enzymen onder dezelfde condities *in vitro*? 3) Is er een significante verandering in de hoeveelheid geproduceerd ribonucleïnezuur (RNA) dat codeert voor deze drie antioxidante enzymen onder dezelfde condities *in vitro*? 4) Is er een verandering in enzymactiviteit van de antioxidante enzymen catalase, SOD1 en GPx-1 in *ex vivo* speekselstalen van patiënten die een CBCT-scan zijn ondergaan, vergeleken tussen staalnamen voor en na het ondergaan van dergelijke scan?

Materialen en methoden

Identificatie stalen

In het *in vitro* deel van dit onderzoek werden celculturen van dentale stamcellen van de types DPSC, DFSC en SCAP gebruikt. Deze cellijnen waren afkomstig van drie verschillende donoren voor de types DPSC en SCAP. Deze donoren kregen als codenaam voor anonimiteit de benamingen Alto (vrouw, 11 jaar), Palo (man, 12 jaar) en Cynthia (vrouw, 8 jaar). Voor het celtype DFSC waren er twee donoren, Alto en Palo. De *in vitro* celculturen werden bestraald met verschillende doses X-stralen met X-straleigenschappen die overeenkomen met X-stralen gebruikt door CBCT-toestellen. De geteste doses zijn 50 mGy en 100 mGy, wat hoger ligt dan de effectieve dosis van een CBCT-scan (rond de 100 tot 500 µGy). De effecten van X-straling onder een dosis van 100 mGy zijn niet geweten, door een gebrek aan statistische kracht van de huidige epidemiologische data. 50 en 100 mGy werden gekozen als startpunt voor hypothesetests onder 100 mGy. Deze celculturen werden *in vitro* verder opgekweekt en op verschillende tijdstippen na bestraling gelyseerd. Deze lysis gebeurde met verschillende methodes naargelang het doel van de stalen. Voor de genexpressie werden de cellen met RLT-buffer gelyseerd. Om de enzymhoeveelheidsveranderingen te meten werden de cellen met

radioimmunoprecipitatie analyse (RIPA) lysisbuffer gelyseerd. Voor de enzymactiviteitsanalyse werden de cellen fysisch gelyseerd met een TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Duitsland). Speekselstalen voor *ex vivo* enzymactiviteitsanalyses werden afgenomen bij patiënten vóór en 30 minuten ná het ondergaan van een CBCT-scan, en een additionele staalname op 60 minuten ná de scan voor een beperkt aantal patiënten. Alle patiënten zijn kinderen tussen 7 en 15 jaar (Hôpital Bichat-Claude-Bernard, Parijs, Frankrijk).

Opstarten celculturen

De cellijnen werden gebruikt vanuit bevroren toestand op -180°C . De cellijnen werden ontdooid en in cultuur gebracht in T75 celcultuurflessen. Voor de opkweek werd *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) met een laag glucosegehalte gebruikt (1g/l) (Gibco ThermoFischer, Massachusetts, USA). Aan dit DMEM medium werd 10% fetaal runder serum (FBS) toegevoegd (Gibco ThermoFischer, Massachusetts, USA). De cellen werden ontdooid op 37°C in een warmwaterbad (GFL, Burgwedel, Duitsland). Na toevoeging van 10 ml voorverwarmd (37°C) medium werden de cellen gepelletiseerd door centrifugatie aan 200xG (Eppendorf, Hamburg, Duitsland) gedurende 5 minuten. Het supernatans werd verwijderd en de pellet werd geresuspendeerd in 1 ml groeimedium. De celsuspensie werd met 14 ml medium in een T75 fles overgebracht en opgekweekt in een incubator (Binder, Tuttlingen, Duitsland) op 37°C en met 5% CO_2 . Voor het gevolgde protocol, zie bijlage 1.1 "Ontdooien bevroren cellen -180°C ". Na één dag werd het medium vervangen. Voor het gevolgde protocol, zie bijlage 1.2 "Vervangen celcultuur medium".

Subcultivatie celculturen

Voor bestraling van de celculturen met verschillende doses werden de celculturen verdeeld over verschillende flessen. Per celtype, per donor, per bestralingsdosis en per tijdstip van lysis werd een fles ter opkweek bekomen.

Het medium van de startcultuur per celtype en per donor werd afgegoten. De cellen werden gewassen met 1x fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS) (Sigma Life Science, Missouri, USA). De adherente cellen werden van de flessen losgemaakt met een 0,05% Trypsine-

EDTA oplossing (Gibco ThermoFischer, Massachusetts, USA) en geïncubeerd gedurende 5 minuten op 37°C . De werking van de trypsine werd gestopt door toevoeging van laag glucose DMEM-medium met 10% FBS. De cellen werden overgebracht in een falcontube van 15ml en gecentrifugeerd op 200xG gedurende 5 minuten. De celpellet werd geresuspendeerd in 1 ml opgewarmd DMEM-medium op 37°C . 75 μl van een 1 op 20 verdunning van de celsuspensie in 1xPBS werd geteld met een Moxi M celtellingscassette (ORFLO Technologies, Ketchum, USA). In elke T25 fles werd 5×10^5 cellen uitgezaaid in 5 ml DMEM-medium. Voor het gevolgde protocol, zie ook bijlage 1.3 "Subcultivatie celcultuur".

Bestraling celcultuur

De celculturen werden bestraald met X-stralen (Radiation Protection Dosimetry and Calibration Laboratorium voor Nucleaire Kalibraties, SCK•CEN, Mol, België). De celculturen in T25 flessen werden bestraald met 2 verschillende doses; 50 mGy en 100 mGy. Er werd voor elk tijdstip van lysis ook een controlecelcultuur behouden die niet bestraald werd, deze kreeg aldus een bestralingsdosis van 0 mGy. Er werd bestraald met X-stralen op een afstand van 1 m met een Xstrahl 320kV tube. Voor de bestraling met een dosis van 50mGy werd 193 seconden bestraald met een RQR9-kwaliteit stralingsbundel (2,9mm aluminium filter, 120kV en 1,8mA). Voor de bestraling met een dosis van 100mGy werd 386 seconden bestraald, eveneens met een RQR9-kwaliteit stralingsbundel.

Lyseren van cellen voor enzymactiviteitsanalyses

Om enzymactiviteitsanalyses uit te voeren op intracellulaire enzymen moeten celstalen gelyseerd worden. Hierbij kon geen gebruik gemaakt worden van een lysisbuffer aangezien dergelijke buffer de enzymactiviteit verstoort door de tertiaire, functionele structuur van de enzymen af te breken. Volledige cellysaten voor deze analyses werden bekomen door mechanische lysis met een TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Duitsland). De celculturen werden gewassen met 1xPBS-oplossing, losgemaakt met 1 ml 0,05% Trypsine-EDTA, en gepelletiseerd in een centrifuge (Eppendorf,

Hamburg, Duitsland) gedurende 5 minuten op 200xG. De celpellet werd geresuspendeerd in 500µl fosfaatbuffer (0,05M K₂HPO₄ (Sigma Life Science, Missouri, USA), 0,05M KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, Duitsland), 1 mM EDTA (Sigma, Missouri, USA), 210 mM D-mannitol (PanReac AppliChem, Barcelona, Spanje), 70 mM sucrose (Sigma Life Science, Missouri, USA)) met een pH van 7. De cellen werden met twee keramische beads van 1,4mm (Qiagen, Hilden, Duitsland) per staal op 4°C gelyseerd in een TissueLyser II gedurende 12 minuten met 30 bewegingen per seconde. Het celdebris werd gepelleterd in een gekoelde centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Duitsland) op 4°C gedurende 10 minuten aan 10.000xG. Het supernatans werd overgepipetteerd in een eppendorftube van 1,5 ml.

Voor uitvoering van enzymactiviteitsanalyses op GPx-1 werd 4 µl fosfaatbuffer met 1 mM dithiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) toegevoegd aan 200 µl van het bekomen cellysaat. DTT voorkomt de omzetting van gereduceerd glutathion naar geoxideerd glutathion. Voor het gevolgde protocol, zie ook bijlage 1.4 "Proteïne-extractie van adherente cellen voor enzymactiviteitsanalyses".

Deze volledige cellyseringen werden uitgevoerd op bestraalde celculturen (0mGy, 50mGy, 100mGy) op 1, 4, 24 en 48 uur na bestraling.

Extractie RNA uit cellysaten voor qPCR

Voor de productie van RNA-stalen, bruikbaar voor copyDNA-synthese en daarmee qPCR, werden bestraalde celculturen (0 mGy, 50 mGy, 100 mGy) op drie verschillende tijdstippen na bestraling (24 uur, 48 uur, 168 uur) losgemaakt met 0,05% Trypsine-EDTA en gepelleterd in een centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Duitsland) op 200xG gedurende 5 minuten. Deze pelleting werd uitgevoerd volgens deel A van het protocol voor cellysis in bijlage 1.4. Na verzameling van de cellen werden de cellen gelyseerd in 400µl RTL-buffer met 10% beta-mercaptoethanol.

Na lysering werd er een RNA-extractie uitgevoerd op de volledige cellysaten met behulp van een Qiagen RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Duitsland). De gebruikte procedure kan in de online handleiding voor deze kit teruggevonden worden (QIAGEN, 2017).

De bekomen RNA-stalen werden op hun concentratie getest via het Trinean-systeem waarbij 2µl van het staal geladen werd. Als negatieve controle werd op elke plaat 2µl RNase-vrij water ingezet. Naargelang hun concentratie (ng/µl) werden de stalen al dan niet drie maal verdund door toevoeging van 76µl steriel MilliQ-water. Deze verdunning werd uitgevoerd bij stalen die meer dan 250ng/µl RNA bevatten.

cDNA synthese

Vanuit de bekomen RNA-stalen werd copyDNA (cDNA) gevormd met een Go-Script-Promega kit (A5001, Promega, Wisconsin, USA) met aangepast protocol. Van elke reactie werd 400ng RNA gebruikt dat verder verdund werd met MilliQ tot een volume van 19µl. Het totale reactievolume na toevoeging van de reactiemastermix volgens het protocol in bijlage 1.7 was 40µl.

De bekomen cDNA stalen werden 1/10 verdund door toevoeging van 360µl steriel MilliQ.

Bepaling eiwitconcentraties

De totale eiwitconcentratie van de lysaten werd bepaald om de resultaten van de enzymactiviteitsassays te normaliseren en om te berekenen hoeveel staal er geladen moet worden bij Western blot. Deze bepaling werd uitgevoerd met een bicinchoninezuuranalyse (BCA). Er werd een BCA1-1KT kit gebruikt om deze analyse uit te voeren (Sigma Life Science, Missouri, USA). De analyse werd voor elk staal in triplicaat uitgevoerd op een 96-wellplaat (Greiner, Kremsmünster, Oostenrijk). De procedure werd uitgevoerd volgens de kithandleiding die online geraadpleegd kan worden (Sigma-Aldrich, 2017).

Per well werd 10µl staal geladen. Als standaardreeks werd een zevenvoudige verdunningsreeks rundserumalbumine (BSA) (Bio-Rad, Californië, USA) gebruikt tussen 0,125 en 2 mg/ml.

De absorptie werd bepaald met een Clariostar spectrofotometer (BMG Labtech, Ortenberg, Duitsland) bij een golflengte van 562nm.

Optimalisatie western blot

Western blots voor de bepaling van de hoeveelheid catalase, SOD1 of GPx-1 werden

uitgevoerd op reeds bekomen eiwitlysaten uit het doctoraatsonderzoek van Drs. Niels Belmans. De totale eiwitconcentratie van deze stalen werd bepaald via een BCA-analyse. Voor elk van de drie te testen antioxidante enzymen werd een optimalisatie van de concentratie primair en secundair antilichaam uitgevoerd. Voor optimalisatie werden 0,2µm nitrocelluloseblots (Bio-Rad, Californië, USA) gebruikt en geblokt in 5% *Non-fat dry milk* (NFDM)(Bio-Rad, Californië, USA) in tris-gebufferde zoutoplossing met 1% Triton X-100 (TBS-T) (Trizma base (Sigma Life Science, Missouri, USA), NaCl (Merck, Darmstadt, Duitsland), H₂O, 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), pH 7,6). De western blots voor optimalisatie werden uitgevoerd volgens het protocol in bijlage 1.5 "Western blot".

Voor primair antilichaam werden voor GPx-1 vier verdunningen getest, 1/2.000, 1/1.000, 1/500 en 1/250. Voor SOD1 werden drie verdunningen getest, 1/10.000, 1/5.000 en 1/2.500. Voor Catalase waren dit 5 verdunningen, 1/4.000, 1/2.000, 1/1.000, 1/500 en 1/250.

De gebruikte antilichamen voor detectie van de drie antioxidante enzymen waren monoclonale muis-anti-humane antilichamen (Santa-Cruz, Dallas, USA). Voor SOD1 waren dit SOD1 G-11 antilichamen van het type IgG_{2b} met een Kappa lichte keten (sc-17767). Deze antilichamen binden op de aminozuren van humane SOD1 enzymen op plaats 1 tot 154. Voor catalase waren dit catalase H-9 antilichamen van het type IgG_{2a} met een Kappa lichte keten (sc-271803). Deze zijn voor humaan catalase specifiek tussen aminozuur 471 en 503, nabij de C-terminus. Voor GPx-1 waren dit GPx-1/2 B-6 antilichamen (sc-133160). Deze zijn voor humaan GPx-1 specifiek tussen aminozuur 50 en 201, nabij de C-terminus.

Voor detectie van het gebonden primair antilichaam werd een polyclonaal *Horseradish peroxidase*-gelabeld geit-anti-muis secundair antilichaam (Invitrogen ThermoFischer, Massachusetts, USA) gebruikt. Hierbij werden voor GPx-1 drie verdunningen getest, 1/10.000, 1/5.000 en 1/2.500. Voor SOD1 en catalase waren dit 1/50.000, 1/25.000 en 1/10.000.

Western blot

Voor analyse van de hoeveelheid catalase, SOD1 of GPx-1 in de volledige cellysaatstalen, bekomen in vorige delen van het doctoraatsonderzoek via lysis met RIPA-buffer, werd western blot uitgevoerd. Stalen werden verdund met MilliQ zodat 10µg proteïnen werd geladen per well. Elk staal werd in duplicaat aangebracht. Per geladen staal werd 5µl 10:1 4x Laemmlibuffer (Bio-Rad, Californië, USA) met beta-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) toegevoegd voor denaturatie. Het mengsel staal, MilliQ en Laemmlibuffer werd 10 minuten op 90°C geïncubeerd ter denaturatie van de proteïnen. Vervolgens werden de proteïnen gescheiden met SDS-PAGE gelelektroforese met voorgegoten gels (Bio-Rad, Californië, USA). De SDS-PAGE gelelektroforese werd gelopen op een voltage van 300V in 1xTGS buffer (Bio-Rad, Californië, USA). Per gel werd ook 5µl regenboogladder (Bio-Rad, Californië, USA) aangebracht en 10µg positief controlestaal. Dit positief controlestaal bestond uit een volledige lysaat van de lever afkomstig uit muizen. Dit weefsel werd gelyseerd met RIPA-buffer.

De gels werden geblot met een trans-blot systeem (Bio-Rad) op 1,5A en 25V gedurende 7 minuten. Hiervoor werd een nitrocelluloseblot membraan gebruikt. De blots werden geblokt in 50ml blocking buffer (5% NFDM in 1x TBS-T) gedurende 2 uur.

Voor immunokleuring van de blots werd per blot een verdunning van primair antilichaam voor catalase, SOD1 of GPx-1 in 12ml blocking buffer (5% NFDM in 1x TBS-T) gebruikt. Per blot werd één van de drie antilichamen gebruikt om één enzym aan te kleuren. Voor catalase en GPx-1 werd een concentratie van 1/250 aangehouden, voor SOD1 een concentratie van 1/10.000. De blots werden overnacht geïncubeerd in de verdunning van het primair antilichaam op een schudplaat op 4°C.

Na incubatie werd de blot 3 maal 5 minuten met TBS-T gewassen. Tijdens het wassen, werd het secundair antilichaam verdund in 30ml blocking buffer (5% NFDM in 1x TBS-T). De blots werden gedurende 1 uur geïncubeerd met het secundaire antilichaam op een schudplaat op kamertemperatuur. Voor GPx-1 werd een

verdunding van 1/2.500 gebruikt, voor SOD1 1/25.000 en voor catalase 1/10.000. Daarna werden de blots tweemaal gewassen met 1x TBS-T en nog een laatste keer met 1x Tris (T6066-1KG, Sigma Life Science, Missouri, USA).

Het gebonden secundair antilichaam werd gedetecteerd via *Enhanced Chemiluminescence* (ECL). Hiervoor werd 7ml ECL reagens A en 7ml ECL reagens B samengevoegd (Bio-Rad, Californië, USA). Deze chemiluminescentie werd via een illuminator (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Frankrijk) gedetecteerd. Het volume van de specifieke bandjes werd met behulp van het gespecialiseerde Bio-1D programma geanalyseerd. Voor het gevolgde protocol, zie ook bijlage 1.5 "Western blot".

Voor normalisatie van de volumewaarden werd een totale proteïnekleuring van de blots gedaan via de *Serva Purple* methode. Hiervoor werd met deze methode het volledige volume van alle geladen proteïnen in het staal bepaald. Door het bekomen volume van de specifieke enzymen te delen door de totale proteïnehoeveelheid bekwam men een verhouding voor de hoeveelheid antioxidant enzym op de totale hoeveelheid proteïnen. Hiertoe werden de gebonden antilichamen van de blots verwijderd met western blot *stripping buffer* (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) gedurende 5 minuten. De blots werden gedurende 30 minuten gekleurd met 50ml *Serva Purple* werkreagens (125µl *Serva Purple* (SERVA, Duisburg, Duitsland) in 50ml kleuringsbuffer 2 (H₂O, boorzuur, natriumhydroxide)) in het donker. De blots werden minstens 1 uur gedroogd tot ze volledig droog waren. Via een illuminator (Vilber Lourmat) werd de fluorescentie gedetecteerd en een afbeelding genomen. Het volume van de volledige stalen werd computermatig geanalyseerd met het Bio-1D programma. Voor het gevolgde protocol, zie ook bijlage 1.6 "Totale proteïnekleuring van western blots via *Serva Purple*". Elk staal werd in technisch duplicaat gemeten waarvan het gemiddelde genomen werd voor gebruik in de statistische verwerking. Het aantal herhalingen voor de n-waarde is in het geval van deze tests het aantal biologische replicaten. Voor de cellen van het type SCAP en DPSC is de n-waarde drie met drie donoren Alto, Palo en Cynthia. Voor het celttype DFSC is de n-waarde één aangezien er

enkel stalen van de donor Alto beschikbaar waren. Per staalttype werd het gemiddelde van de bekomen genormaliseerde volumes van de biologische replicaten genomen en tegenover de waarde van het niet bestraalde staal dat als controle dient uitgezet.

Enzymactiviteitsanalyses

Enzymactiviteitsanalyses werden uitgevoerd op de geproduceerde volledige cellysaten van DPSC, DFSC en SCAP. Voor catalase en SOD1 werden de cellysaten in fosfaatbuffer gebruikt, voor GPx-1 werden de cellysaten in fosfaatbuffer met 1mM DTT gebruikt. De analyses werden uitgevoerd met standaard enzymactiviteitsanalysekits (Cayman Chemical, Michigan, USA) per antioxidant: Superoxide Dismutase Assay Kit 706002, Catalase Assay Kit 707002 en Glutathione Peroxidase Assay Kit 703102. Alle analyses werden uitgevoerd in een 96-wellplaat in triplicaat voor alle stalen. De stalen werden onverdund geanalyseerd. De analyses werden uitgevoerd volgens het standaardprotocol van de kit. De gevolgde protocollen kunnen teruggevonden worden op de website van Cayman Chemical (Caymanchem, 2017a; Caymanchem, 2017b; Caymanchem, 2017c).

Deze analyses werden ook uitgevoerd op *ex vivo* speekselstalen die eerder beschreven zijn. Deze werden volgens dezelfde methode onverdund geanalyseerd voor de drie antioxidanten.

qPCR

Om veranderingen in genexpressie te bepalen werd kwantitatieve polymerase kettingreactie (qPCR) uitgevoerd op de bekomen cDNA-stalen. Voor deze qPCR's werd gebruik gemaakt van 2x Taqman Universal Mastermix 2 met Uracil-N glycosylase (UNG) (Applied Biosystems, Foster City, Californië, USA) en 20x Taqman primers en probes mix (Applied Biosystems, Foster City, Californië, USA). Voor elke reactie werd 5µl cDNA-staal gebruikt en 15µl mastermix bereid volgens het protocol in bijlage (Zie bijlage 1.8 qPCR met Taqman primers en probes voor RotorGene). De stalen en mastermix werden geladen in 100µl tubes voor een RotorGene qPCR toestel (Qiagen, Hilden, Duitsland) met een 72 tube-rotor.

De efficiëntie van de qPCR werd berekend via een 5-voudige logaritmische verdunding als

standaardreeks, van het cDNA-staal van celtype DFSC van donor Palo dat niet bestraald werd en na 48h gelyseerd werd. Relatieve kwantificatie per gen gebeurde via de Pfaffl-methode dat gebruik maakt van de treshold cyclus (C_T -waarde) en de efficiëntie per gen (Pfaffl, 2001).

Normalisatie van de waarden bekomen uit de qPCR gebeurde op 2 manieren. Ten eerste werd er een interne standaard meegenomen voor elke PCR, alsook 2 huishoudgenen Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltrans-ferase (HPRT-1) en phosphoglyceraat kinase 1 (PGK1). Deze huishoudgenen komen voor in het cytoplasma van elk celtype van aerobe organismen en worden niet in hun genexpressie beïnvloed door ioniserende straling. De stabiliteit van deze expressie werd in eerdere delen van het onderzoek aangetoond op het SCK•CEN. HPRT-1 is een transferaseproteïne dat een centrale rol in de vorming van purine nucleotiden door middel van de *Salvage-Pathway* speelt (NCBI, 2017b; UniProt, 2017c). PGK1 is een glycolytisch enzym dat een belangrijke rol speelt in de synthese van pyruvaat uit D-glyceraldehyde 3-fosfaat (NCBI, 2017c; UniProt, 2017d).

Statistische analyse

De bekomen waarden van de verschillende analyses werden statistisch vergeleken en verwerkt met GraphPad Prism 6 tussen de verschillende doses per tijdstip. Voor het *in vitro* gedeelte werden de resultaten ongepaard vergeleken, voor het *ex vivo* gedeelte gepaard.

Voor western blot en qPCR werden de stalen steeds in duplicaat ingezet, voor de enzymactiviteitsanalyses in triplicaat. Van deze technische herhalingen werd voor de statistische verwerking het gemiddelde genomen wat verder als de volledige waarde voor het staal beschouwd werd. Binnen elk tijdstip en bestralingsdosis werden de verschillende donoren als gegroepeerde waarden gebruikt voor vergelijking.

De n-waarde voor statistische vergelijking werd gevormd door de biologische herhalingen door het gebruik van stalen van verschillende donoren. Voor de celtypen SCAP en DPSC werd zo een n-waarde van drie bekomen met drie donoren Alto, Palo en Cynthia. Voor het celtype DFSC werd een n-waarde van twee bekomen voor de enzymactiviteitsanalyses en qPCR met

twee donoren Alto en Palo. Voor enzymhoeveelheidsanalyses met western blot was voor het celtype DFSC de n-waarde één aangezien er enkel stalen van de donor Alto beschikbaar waren.

Het *in vitro* gedeelte werd statistisch vergeleken via 2-way ANOVA tussen de verschillende groepen. Bij het *ex vivo* gedeelte werd gekeken naar de verandering in activiteit voor en na bestraling en wordt een gepaarde t-test gebruikt. Het verschil in activiteit werd getest op normaliteit via de Shapiro-Wilk normaliteitstest. Hieruit werd bepaald of er parametrisch of niet parametrisch getest mocht worden. Er werd statistisch vergeleken op een significantieniveau van 5% (P-waarde < 0,05).

Resultaten

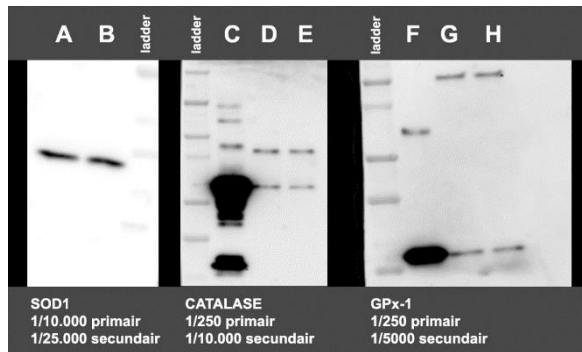
Effect van X-straling op antioxidanthoeveelheid in *in vitro* culturen van DPSC, DFSC en SCAP

Veranderingen in de hoeveelheid van de antioxidanten SOD1, catalase en GPx-1 in de stamcellen DPSC, SCAP en DFSC in functie van het tijdstip na lysering en de bestralingsdosis werden bepaald met behulp van western blot. Voor deze western blots werd het volume van de bandjes, bekomen met chemiluminescentie, bepaald en genormaliseerd door te delen met het volume van de volledige laan van alle geladen proteïnen, bekomen via *Serva Purple*.

Deze western blot techniek werd voor de drie antioxidanten geoptimaliseerd op de combinatie van verdunning van het gebruikte primair en secundair antilichaam. De optimalisatie gebeurde visueel door het selecteren van de duidelijkst zichtbare specifieke bandjes voor elk enzym na ECL-detectie (zie ook onderstaande figuur 5 voor de visueel geoptimaliseerde western blots). Een eerste optimalisatie werd uitgevoerd op primair antilichaamconcentratie voor de beste detectie. De tweede optimalisatie op secundair antilichaam gebeurde voor verlaging van de belichtingstijd in het proces. De specifieke bandjes voor SOD1 waren het duidelijkst bij een verdunning primair van 1/10.000 en secundair 1/25.000. Catalase werd geoptimaliseerd op 1/250 primair en 1/10.000

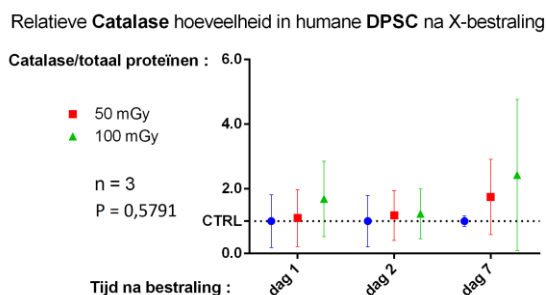
secundair. GPx-1 werd geoptimaliseerd op 1/250 primair en 1/5000 secundair antilichaam.

GPx-1 werd tijdens de uitvoering van de western blots op de *in vitro* stalen hergeoptimaliseerd op 1/250 primair en 1/2500 secundair antilichaam.



Figuur 5: Optimalisatie western blot. Geoptimaliseerde western blots met gebruikte verdunningen primaire en secundaire antilichamen voor SOD1, catalase en GPx-1. Laan A, B, D, E, G, H: volledig cellysaat dentale stamcellen van eenzelfde staal dentale stamcellen, onbestraald en gelyseerd met radioimmunoprecipitatiebuffer; in duplicaat ingezet; laan C en F: volledig cellysaat levercellen (= positieve controle).

De genormaliseerde waarden voor western blot werden per combinatie van celtype en enzym grafisch relatief uitgezet ten opzichte van de basislijn van de controlestalen zoals zichtbaar in figuur 6 voor de relatieve catalase hoeveelheid in humane DPSC na X-bestraling. Zie ook bijlage 2 voor de grafische weergave van alle celtypen en antioxidanten (figuur 2.1 tot 2.9).



Figuur 6: Relatieve catalase hoeveelheid in humane DPSC na X-bestraling. Relatieve enzymconcentratie tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant catalase op stalen afkomstig van Dentale Pulpa Stamcellen (DPSC) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). De n-waarde wordt bepaald door de drie biologische herhalingen met drie donoren. Er is geen significantie tussen doses per tijdstip met $p > 0,05$.

De relatieve waarden voor de enzymhoeveelheid in de stamcellen werden statistisch gegroepeerd vergeleken met een 2-way ANOVA test op een significantieniveau van 5%. Hierbij werd gekeken naar significante verschillen in relatieve enzymconcentratie tussen de verschillende doses. Hierbij werden voor geen van de drie enzymen significante verschillen gevonden.

Effect van X-straling op antioxidantactiviteit in *in vitro* culturen van DPSC, DFSC en SCAP

Veranderingen in de enzymactiviteit van de antioxidanten SOD1, catalase en GPx-1 in de stamcellen DPSC, SCAP en DFSC in functie van het tijdstip na lysering en de bestralingsdosis werden bepaald met enzymactiviteitsanalysekits.

Voor deze kits werd een optimalisatie uitgevoerd op verdunning van de stalen. Vanuit deze optimalisatie werd verder gegaan met onverdunde stalen om boven de detectielimiet te kunnen werken.

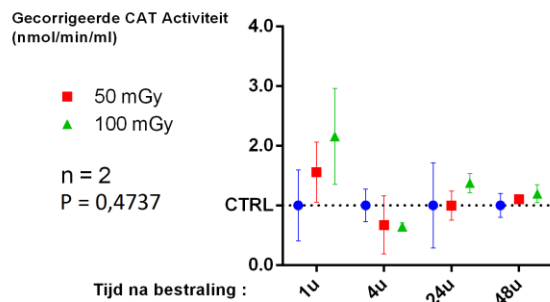
Voor het staal van celtype DFSC met een bestralingsdosis van 50mGy en een lyseringstijdstip van 48 uur is de n-waarde één door het ontbreken van dit staal van de donor Alto (zie bijlage 3 figuur 3.1, 3.4 en 3.7).

De gemeten absorbanties werden voor catalase en SOD1 via de helling van de standaardcurve omgezet naar waarden voor enzymactiviteit. Bij GPx-1 werd de helling van de lineaire curve per staal gebruikt. Deze waarden werden genormaliseerd door de waarden te delen door de totale proteïneconcentratie van het staal. Deze proteïneconcentraties werden verkregen met BCA.

De genormaliseerde waarden werden relatief uitgezet tegenover de waarden van de controlestalen. De genormaliseerde waarden werden grafisch uitgezet per combinatie van celtype en antioxidant zoals zichtbaar in figuur 7 (Zie bijlage 3 voor de grafische weergave van de genormaliseerde data voor alle stalen, figuur 3.1 tot figuur 3.9).

Met een 2-way ANOVA test op een significantieniveau van 5% werd geen significantie gevonden.

Catalase activiteit in humane DFSC na X-bestraling



Figuur 7: Catalase activiteit in humane DFSC na X-bestraling. Relatieve enzymactiviteit tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant catalase op stalen afkomstig van Dentale Follikel Stamcellen (DFSC) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). De n-waarde wordt bepaald door de twee biologische herhalingen met twee donoren. Er is geen significantie tussen doses per tijdstip met $P > 0,05$.

Effect van X-straling op antioxidant genexpressie in *in vitro* culturen van DPSC, DFSC en SCAP

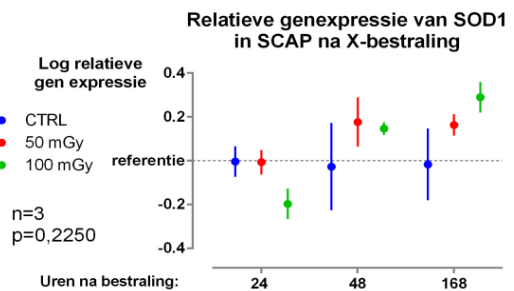
Veranderingen in genexpressie van de antioxidanten catalase, SOD1 en GPx-1 in de stamcellen DPSC, SCAP en DFSC in functie van het tijdstip na lysering en de bestralingsdosis werden gecontroleerd via qPCR.

Voor de stalen van het type SCAP, bestraald met 50mGy en gelyseerd na zeven dagen, is de n-waarde twee aangezien er geen staal voor de donor Alto werd ingezet als biologisch replicaat (zie bijlage 4 figuur 4.3, 4.6 en 4.9). Zo ook voor het controlestaal van het type DFSC gelyseerd op 24 uur voor de donor Alto. Dit leverde voor dit staaltype een n-waarde van één op (zie bijlage 4 figuur 4.1, 4.4 en 4.7).

De genormaliseerde waarden werden relatief uitgezet tegenover de waarden van de controlestalen, waarna hiervan het twee logaritme (Log2) genomen werd om toe- of afname van de relatieve genexpressie een betere verdeling te geven. Hierdoor wordt de stijging en daling ten opzichte van nul weergegeven in plaats van tegenover één. Hierdoor wordt een verdubbeling en een halvering van relatieve genexpressie als een respectievelijke stijging of daling van de waarde met één bekomen in plaats van respectievelijk een stijging van één of een daling van 0,5.

Deze genormaliseerde verhoudingen voor de genexpressie van de drie antioxidanten, waarop de statistische analyses werden uitgevoerd werden grafisch uitgezet per combinatie van celtype en antioxidant (zie onderstaande figuur 8 voor één combinatie van celtype en antioxidant) (Zie bijlage 4 voor de grafische weergave van de genormaliseerde data voor alle stalen, figuur 4.1 tot figuur 4.9).

Met een 2-way ANOVA test op een significantieniveau van 5% werd geen significantie gevonden.



Figuur 8: Relatieve genexpressie van SOD1 in SCAP na X-bestraling. Relatieve genexpressie genormaliseerd tegenover de controlestalen met referentiewaarde 0 per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant enzym Superoxide Dismutase 1 (SOD1) in Stamcellen van Apicale Papilla (SCAP) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle werd gelijkgesteld aan 1, van alle waarden werd de LOG2 genomen om een referentielijn van 0 te bekomen. Er is geen significantie tussen doses per tijdstip met $P > 0,05$. Voor de stalen bestraald met 50mGy en gelyseerd na zeven dagen, is de n-waarde twee aangezien er geen staal voor de donor Alto werd ingezet als biologisch replicaat.

Effect van CBCT-straling op antioxidantactiviteit in *ex vivo* speekselstalen van kinderen

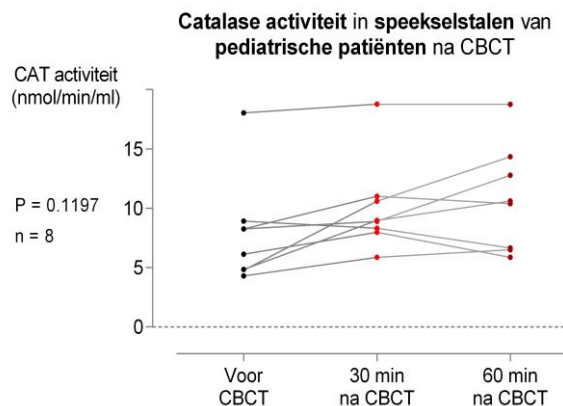
Via enzymactiviteitsanalysekits werden speekselstalen van patiënten die een CBCT scan ondergingen getest op verschillen in activiteit voor de enzymen catalase en SOD1. Eerst werden de verschillen werden vergeleken tussen vóór de scan en 30 minuten ná de scan. Voor zowel catalase als SOD1 gebeurde dit op 32 patiënten. Voor beide enzymen werden de stalen van dezelfde patiënten gebruikt. Vervolgens werden voor beide enzymen 8 patiënten vergeleken tussen vóór, 30 minuten na en 60 minuten ná CBCT.

De verwerkte data van enzymactiviteit voor alle patiënten voor catalase en SOD1 werd grafisch

uitgezet per tijdstip van staalname zoals zichtbaar in onderstaande figuren 9 en 10 voor catalase en figuren 11 en 12 voor SOD1.

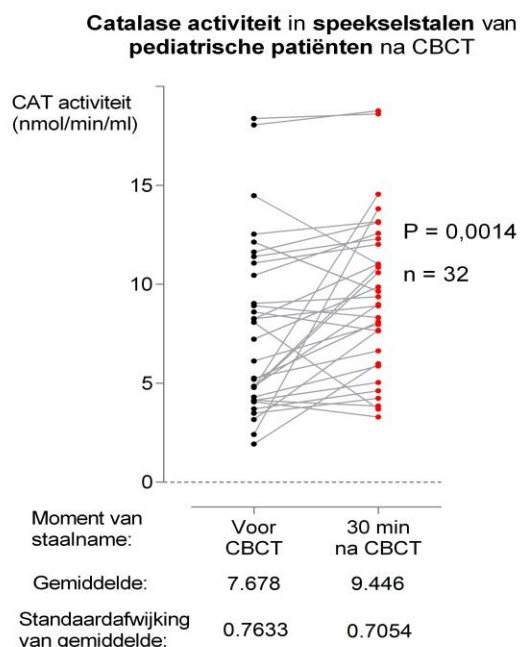
Via een Shapiro Wilk normaliteitstest werd de normaliteit van het effect (activiteit na behandeling verminderd met activiteit voor behandeling) getest. Voor catalase waren beide vergelijkingen hiermee niet normaal verdeeld. Hierdoor werden de data gepaard niet-parametrisch getest met de Wilcoxon signed rank test. Voor SOD1 was het effect na 30 minuten normaal verdeeld en werden deze data gepaard parametrisch getest via een gepaarde t-test. Het effect na 60 minuten bij SOD1 was niet normaal verdeeld en werd getest via niet-parametrische 1-way ANOVA.

Via een Wilcoxon signed rank test voor vergelijking van twee niet-normaal verdeelde groepen afhankelijke data werd voor de eerste vergelijking voor catalase (zie figuur 9) significantie bekomen met een P-waarde van 0,0014. Via *Repeated Measures* 1-way ANOVA voor vergelijking van meerdere groepen afhankelijke data werd voor de tweede vergelijking voor catalase (zie figuur 10) geen significantie bekomen met een P-waarde van 0,1197.

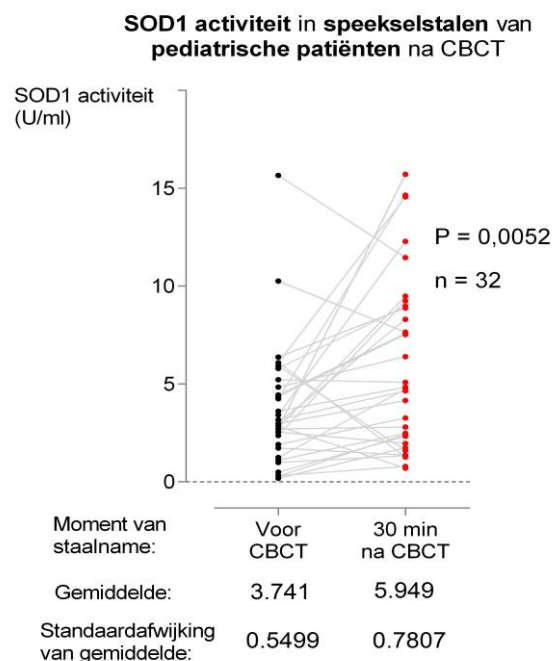


Figuur 10: Catalase activiteit in speekselstalen van pediatrische patiënten 60 minuten na CBCT. Vergelijking tussen catalase activiteit in speekselstalen van pediatrische patiënten voor en na CBCT. Data is niet normaal verdeeld. ANOVA-test voor effect is niet significant voor een stijging in enzymactiviteit met een P-waarde > 0,05.

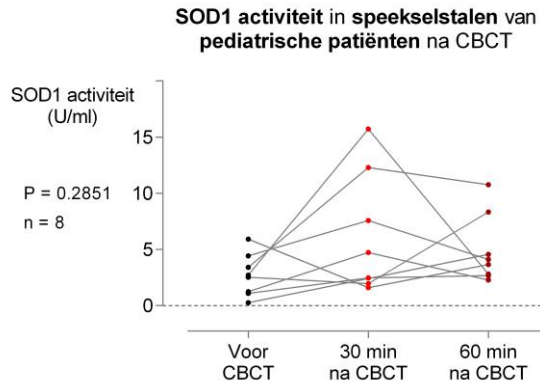
Via een gepaarde t-test voor vergelijking van 2 normaal verdeelde groepen afhankelijke data werd voor de eerste vergelijking voor SOD1 (zie figuur 11) significantie bekomen met een P-waarde van 0,0052. Via *Repeated Measures* 1-way ANOVA voor vergelijking van meerdere groepen afhankelijke data werd voor de tweede vergelijking voor SOD1 (zie figuur 12) geen significantie bekomen met een P-waarde van 0,2851.



Figuur 9: Catalase activiteit in speekselstalen van pediatrische patiënten 30 minuten na CBCT. Vergelijking tussen catalase activiteit in speekselstalen van pediatrische patiënten voor en na Cone Beam Computed Tomography scan (CBCT). Data is niet normaal verdeeld. Wilcoxon signed rank test voor effect is significant voor een stijging in enzymactiviteit met een P-waarde < 0,05.



Figuur 11: SOD1 activiteit in speekselstalen van pediatrische patiënten 30 minuten na CBCT. Vergelijking tussen Superoxide Dismutase 1 (SOD1) activiteit in speekselstalen van pediatrische patiënten voor en na Cone Beam Computed Tomography scan (CBCT). Data is normaal verdeeld. Gepaarde t-test voor effect is significant voor een stijging in enzymactiviteit met een P-waarde < 0,05.

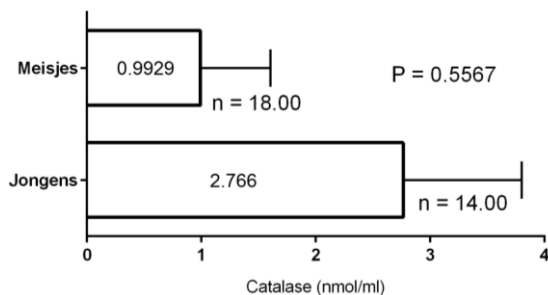


Figuur 12: SOD1 activiteit in speekselstalen van pediatrische patiënten 60 minuten na CBCT. Vergelijking tussen Superoxide Dismutase 1 (SOD1) activiteit in speekselstalen van pediatrische patiënten voor en na CBCT. Data is niet normaal verdeeld. ANOVA-test voor effect is niet significant voor een stijging in enzymactiviteit met een P-waarde $> 0,05$.

De activiteit voor en 30 minuten na CBCT van beide enzymen werd opgesplitst tussen jongens ($n=14$) en meisjes ($n=18$). Dit was voor meisjes normaal verdeeld, voor jongens niet bij beide enzymen. Deze opdeling in jongens en meisjes werd op dezelfde manier als de volledige vergelijking grafisch uitgezet (zie figuur 5.1 tot 5.4 in bijlage 5). Via niet-parametrische Wilcoxon signed rank test voor jongens werd significantie bekomen met $P=0,0166$ voor catalase en $P=0,006714$ voor SOD1. Via parametrische gepaarde t-test voor meisjes werd geen significantie bekomen met $P = 0,1221$ voor catalase en $P=0,1320$ voor SOD1.

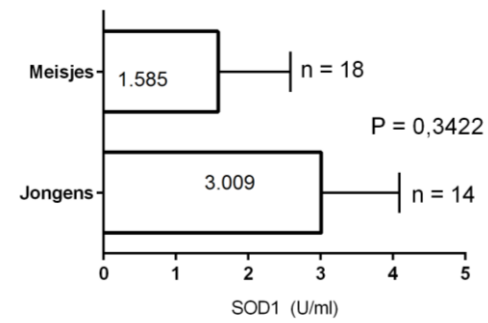
Het verschil in grootte van stijgend effect tussen jongens en meisjes werd via een ongepaarde t-test vergeleken en was niet significant met een P-waarde van $0,5567$ (zie figuur 13 en figuur 14).

Catalase activiteit: Effectgrootte jongens vs meisjes



Figuur 13: Catalase activiteit: Effectgrootte jongens vs meisjes. Vergelijking gemiddelde effectgrootte van CBCT op enzymactiviteit van catalase tussen speekselstalen afkomstig van jongens en meisjes. Meisjes: $n=18$; $P=0,1221$; gemiddeld effect $0,9929$ nmol/ml. Jongens: $n=14$; $P=0,0166$; gemiddeld effect $2,766$ nmol/ml. Geen significant verschil in effectgrootte tussen jongens en meisjes ($P>0,05$).

SOD1 activiteit: Effectgrootte jongens vs meisjes



Figuur 14: SOD1 activiteit: Effectgrootte jongens vs meisjes. Vergelijking gemiddelde effectgrootte van CBCT op enzymactiviteit van Superoxide Dismutase 1 (SOD1) tussen speekselstalen afkomstig van jongens en van meisjes. Meisjes: $n=18$; $P=0,1320$; gemiddeld effect $1,585$ U/ml. Jongens: $n=14$; $P=0,0067$; gemiddeld effect $3,009$ U/ml. Geen significant verschil in effectgrootte tussen jongens en meisjes ($P>0,05$).

Discussie

Effect van X-straling op antioxidanthoeveelheid in *in vitro* culturen van DPSC, DFSC en SCAP

Aangezien er bij dit aantal herhalingen geen significante verschillen in relatieve enzymconcentratie tussen de verschillende doses en per tijdstip zijn, hebben X-stralen bij deze lage doses statistisch gezien geen effect op de antioxidanthoeveelheid van SOD1, catalase en GPx-1 (analyse via western blot) in de stamcellen DPSC, SCAP en DFSC.

Voor een aantal tijdstippen kunnen echter terugkerende trends opgemerkt worden. Voornamelijk bij de analyses uitgevoerd op DPSC cellen zien we steeds stijgende trends in functie van een stijgende dosis X-straling tegenover de controles. Dit is zichtbaar voor alle drie de gemeten tijdstippen voor de drie antioxidanten, behalve na twee dagen bij DPSC cellen van GPx-1. Deze stijgingen zijn echter niet significant. Voor andere celtypen zijn er geen duidelijk visuele trends merkbaar.

Aangezien de donoren van verschillende leeftijden zijn werd de volledige statistische analyse ook uitgevoerd op elke individuele donor. Hiervoor werd geen gemiddelde van de technische herhalingen genomen, maar werd de n-waarde voor deze tweede analyse door het aantal technische replicaten bepaald. Dit uit

elkaar trekken van de resultaten zorgde tevens niet voor significante data en er waren minder visuele trends zichtbaar. Ook de standaardafwijkingen namen hierdoor toe.

Deze grote standaardafwijkingen zijn eigen aan western blot analyses, zeker als het verwachte effect eerder klein is. Dit mede omdat western blot op zich niet kwantitatief is en de analyse visueel gebeurt. Hierdoor is de analyse relatief subjectief en kunnen afwijkingen afgelezen worden (Hnasko and Hnasko, 2018). Om standaardafwijkingen te verkleinen en de trends beter te kunnen inschatten zouden meer biologische herhalingen van andere donoren moeten gebeuren. Een andere mogelijkheid is het testen van de relatieve enzymhoeveelheid via bijvoorbeeld ELISA, een techniek die gevoeliger en kwantitatiever is dan western blot (Lin, 2018).

Voor verdere tests naar de relatieve enzymhoeveelheid zou er ook kunnen gekeken worden naar andere tijdstippen van lysis, en dan voornamelijk verschillende tijdstippen in de eerste 24 uur na bestraling. Dit om te controleren of de relatieve enzymhoeveelheid eventueel stijgt en terug naar een basiswaarde daalt binnen de eerste 24 uur na stralingsblootstelling.

Effect van X-straling op antioxidantactiviteit in *in vitro* culturen van DPSC, DFSC en SCAP

In vitro testen van activiteit leverden geen significante verschillen op tussen de verschillende doses ten opzichte van de controles per tijdstip. Statistisch gezien heeft de dosis geen effect op de enzymactiviteit van catalase, SOD1 en GPx-1. De standaardafwijkingen per staaltipe liggen echter zeer hoog.

De stalen voor de enzymactiviteitstests konden niet met een lysisbuffer gelyseerd worden aangezien deze met de activiteit van de enzymen kan interfereren. Lysisbuffers bevatten ionische detergents die proteïnen kunnen denatureren (Walker, 2009). Hierdoor moest er fysisch gelyseerd worden, wat zorgde dat de totale proteïneconcentraties van de eiwitlysaten rond de 0,2 mg proteïne per 1 ml lag. Doordat er zo'n lage concentratie aan totale eiwitten in de stalen

bekomen werd, lag de totale enzymactiviteit van catalase, GPx-1 en SOD1 tegen de onderste detectielimiet van de gebruikte kits. Waarden die buiten de standaardcurves vielen en voor de berekeningen hierdoor onder de detectielimiet liggen, werden als negatieve waarde berekend, wat manueel op een waarde van nul gezet werd. Door zo dicht bij de detectielimiet te werken voor alle stalen waren vele waarden voor catalase en GPx-1 negatief. Voor SOD1 analyse waren totale proteïneconcentraties voldoende hoog om positieve waarden te bekomen voor alle stalen.

Door zo dicht tegen de detectielimiet te werken is de statistische interpretatie van deze analyses niet betrouwbaar. Bij herhaling van deze tests zou moeten gezorgd worden dat er met hogere proteïneconcentraties gewerkt wordt, hetgeen zou leiden tot een totale gemeten enzymactiviteit die hoger boven de detectielimiet komt te liggen en betrouwbaarder wordt. Er kan dus geen betrouwbare conclusie uit deze test getrokken worden.

Bij dit onderzoek is de lysistijd met de Tissue Lyser II al maximaal verhoogd bij een herhaling van de celkweek en lysis. Verdere verhoging van de lyseringstijd zou niet voor een hogere totale proteïneconcentratie zorgen.

Mogelijke oplossingen om boven de detectielimiet te kunnen werken is het herhalen van het experiment met een hoger totaal aantal cellen, lysering in een kleiner volume buffer, of een andere fysische lysismethode testen zoals sonicatie of elektrische lysis (Brown and Audet, 2008). Ook toevoeging van Triton X-100 aan de buffer kan getest worden op een verbetering van de eiwitopbrengst. Triton X-100 maakt celmembranen permeabel en kan dus de lysis vergemakkelijken (Koley and Bard, 2010). In lage concentraties interfereert Triton X-100 niet met de uitgevoerde assays (Caymanchem, 2017a; Caymanchem, 2017b; Caymanchem, 2017c).

Effect van X-straling op antioxidant genexpressie in *in vitro* culturen van DPSC, DFSC en SCAP

Bij de verschillende celtypes en de verschillende geteste antioxidanten werden geen significante verschillen tussen de bestralingsdoses en de tijdstippen van lysis gevonden.

Statistisch gezien kan uit deze proefopzet besloten worden dat lage dosis X-stralen geen invloed hebben op de genexpressie van catalase, SOD1 en GPx-1 in de celtypen DPSC, SCAP en DFSC. Er kunnen geen duidelijke visuele stijgende of dalende trends waargenomen worden.

De resultaten van de genexpressieanalyse kunnen op meerdere manieren geïnterpreteerd worden. Het zou kunnen dat de genexpressie van catalase, SOD1 en GPx-1 effectief niet verhoogt zoals statistisch angetoond is. Dit zou betekenen dat een lage dosis X-straling geen effect heeft op de genexpressie. Het is echter ook mogelijk dat de effectieve genexpressie na bestraling wel verhoogt, maar dat in de gemeten tijdstippen het extra gevormde RNA van deze verhoogde genexpressie al omgezet is naar hun respectievelijke enzymen. Dit laatste zou betekenen dat via de methode van qPCR de relatieve genexpressie ten opzichte van de dosis verkeerd wordt ingeschat.

Een derde mogelijkheid is dat er op de verkeerde tijdstippen na bestraling gecontroleerd wordt. Genexpressie gebeurt relatief snel, tot binnen enkele uren. Indien na bestraling de genexpressie onmiddellijk opgestart wordt zou de volledige genexpressie al voor het eerste moment van lysis beïndigd zijn en het RNA omgezet in enzymen. Na deze omzetting is de hoeveelheid gevormd RNA niet correct meetbaar. Voor een verdere optimalisatie van deze test zou eventueel gelyseerd kunnen worden op extra tijdstippen tussen de bestraling en één dag zoals bij de enzymactiviteitsanalyse om deze hypothese te testen.

Effect van CBCT-straling op antioxidantactiviteit in *ex vivo* speekselstalen van kinderen

Voor de antioxidanten catalase en SOD1 werd bij patiënten een significant verschil van enzymactiviteit in het speeksel gevonden na het ondergaan van een CBCT scan. Dit verschil duidt op een verhoging van de activiteit van catalase en SOD1 op 30 minuten na bestraling met lage dosis X-stralen in een CBCT-scan. Verhogingen van de activiteit van deze enzymen wijst op verhogingen in oxidatieve stress (Fukai and Ushio-Fukai, 2011; Kang et al., 2013). Deze oxidatieve stress zou voor oxidatieve schade aan

het DNA en proteïnen in speeksel en weefsels kan zorgen (Sinha and Dabla, 2015).

60 minuten na bestraling is er geen statistisch significant verschil tussen vóór bestraling, 30 minuten na en 60 minuten na bestraling voor de enzymactiviteit van catalase en SOD1. Statistisch blijft de enzymactiviteit gelijk over de drie tijdstippen.

60 minuten na bestraling werden echter maar een beperkt aantal patiëntstalen (n=8) gemeten. Aangezien er een duidelijke verder stijgende trend van 30 minuten naar 60 minuten na bestraling zichtbaar is en de P-waardes relatief laag op 0,1197 en 0,2851 liggen, zou deze test herhaald moeten worden op stalen van meerdere patiënten om te controleren of deze trends van stijging al dan niet significant worden.

De data voor het effect van CBCT op enzymactiviteit van catalase en SOD1 in jongens en meisjes apart bekeken, vertoont geen significant verschil bij meisjes, echter wel een significante stijging bij jongens. Het gemiddelde effect bij de gemeten stalen in dit onderzoek is ongeveer drie keer hoger bij jongens dan bij meisjes. Om te controleren of dit verschil al dan niet significant kan worden moeten er meerdere patiënten geïncubeerd worden. In ander onderzoek is al eerder aangetoond dat vrouwen minder oxidatieve stress ondergaan dan mannen en dat jongens hierdoor een verhoogde anti-oxidantproductie en hierdoor een verhoogde totale antioxidantenzymactiviteit vertonen. Bij deze onderzoeken werd een verhoging van 200% bij jongens ten opzichte van meisjes aangetoond (Lopez-Ruiz et al., 2008). Deze bevindingen komen overeen met wat in dit onderzoek aangetoond werd.

Onderzoek bij pasgeborenen toont echter het omgekeerde aan, namelijk dat pasgeboren meisjes een hogere activiteit van catalase, SOD1 en GPx vertonen (Diaz-Castro et al., 2016). Dit komt niet overeen met de bevindingen in dit onderzoek. Dit zou kunnen verklaard worden als een verandering in het genderverschil op latere leeftijd waarop in dit onderzoek getest is. Aangezien er geen significant verschil bekomen is tussen de effectgrootte bij jongens en bij meisjes maar enkel een trend, kan er echter niks met statistische zekerheid gezegd worden over het genderverschil.

De uitgevoerde enzymactiviteitstesten voor GPx-1 op speekselstalen waren negatief voor alle technische herhalingen van alle stalen. Dit kunnen we toeschrijven aan het niet toevoegen van DTT aan het speeksel na staalname. DTT voorkomt de omzetting van gereduceerd glutathion naar geoxideerd glutathion. Dit geoxideerde glutathion bevat geen enzymatische activiteit. Door het niet toevoegen van DTT aan deze stalen en het lange tijdsverloop tussen staalname en enzymactiviteitsanalyse gaat alle glutathion geoxideerd zijn waardoor deze niet gemeten kan worden. Deze data zijn dus niet betrouwbaar als zijnde negatief. Indien de enzymactiviteit van GPx-1 *ex vivo* op speekselstalen opnieuw getest dient te worden, moet er een nieuwe staalname gebeuren waarbij na de staalname DTT aan de stalen wordt toegevoegd (Chau and Nelson, 1991).

Conclusie

In dit onderzoek werd bij *in vitro* tests op celculturen van DPSC, SCAP en DFSC dentale stamcellen geen statistisch significant effect gevonden van lage dosis X-stralen (50 en 100 mGy) op de relatieve enzymhoeveelheid, enzymactiviteit en genexpressie van de antioxidanten catalase, SOD1 en GPx-1.

Bij deze *in vitro* tests op de drie types dentale stamcellen heeft een bestraling met X-stralen aan een dosis van 50 en 100 mGy geen aantoonbaar effect op het antioxidantsysteem voor catalase, SOD1 en GPx-1.

Ex vivo tests in speekselstalen voor enzymactiviteit van pediatrische patiënten werden uitgevoerd op de antioxidanten catalase en SOD1. Deze tests wezen uit dat de enzymactiviteit voor deze antioxidanten significant verhoogd is in het speeksel 30 minuten na het ondergaan van een CBCT-scan. Er is bij het aantal geteste patiënten in dit onderzoek geen significant verschil in effectgrootte op de enzymactiviteit van catalase en SOD1 tussen jongens en meisjes aangetoond.

CBCT-scans hebben een invloed op de activiteit van het antioxidantsysteem voor catalase en SOD1.

De aangetoonde invloed van straling door CBCT-scans op het antioxidantsysteem is van belang voor stralingsbescherming van patiënten. Verhogingen van de activiteit van deze enzymen wijst op verhogingen in oxidatieve stress wat voor oxidatieve schade aan het DNA en proteïnen in speeksel en weefsels kan zorgen. Hierdoor is het belangrijk om geen overmatige scans te doen en de scans zo kort mogelijk en op een zo klein mogelijk oppervlak te houden. Dit om de kans op oxidatieve stress te minimaliseren.

Bibliografie

Brenner, D. J. and Hall, E. J. (2009) 'Computed Tomography — An Increasing Source of Radiation Exposure', *N Engl J Med*, 2007(357), 2277-2284.

Brown, R. B. and Audet, J. (2008) *Current techniques for single-cell lysis, Single Cell Analysis*, The Royal Society.

Caymanchem (2017a) '703102 Glutathione Peroxidase Assay Kit', [online], available: <https://www.caymanchem.com/pdfs/703102.pdf> [Accessed 16 januari 2018].

Caymanchem (2017b) '706002 Superoxide Dismutase Assay Kit', [online], available: <https://www.caymanchem.com/pdfs/706002.pdf> [Accessed 16 januari 2018].

Caymanchem (2017c) '707002 Catalase Assay Kit', [online], available: <https://www.caymanchem.com/pdfs/707002.pdf> [Accessed 16 januari 2018].

Chau, M.-H. and Nelson, J. W. (1991) 'Direct measurement of the equilibrium between glutathione and dithiothreitol by high performance liquid chromatography', *FEBS Letters*, 291(2), 296-298.

Clinic, A. V. (2015) 'Cone Beam Computed Tomography and EVAR', [online], available: <http://ajlyon.co.uk/2015/04/19/cone-beam-computed-tomography-and-evar/> [Accessed 16 januari 2018].

- Cruz, S. (2017a) 'Anticorps catalase (H-9)', [online], available: <https://www.scbt.com/scbt/fr/product/catalase-antibody-h-9> [Accessed 16 januari 2018].
- Cruz, S. (2017b) 'Anticorps GPx-1/2 (B-6)', [online], available: <https://www.scbt.com/scbt/fr/product/gpx-1-2-antibody-b-6> [Accessed 16 januari 2018].
- Cruz, S. (2017c) 'Anticorps SOD-1 (G-11)', [online], available: <https://www.scbt.com/scbt/fr/product/sod-1-antibody-g-11/> [Accessed 16 januari 2018].
- Cruz, S. (2017d) 'SOD- 1 (G- 11) : sc-17767 Datasheet', [online], available: <https://datasheets.scbt.com/sc-17767.pdf> [Accessed 16 januari 2018].
- Dawood, A., Patel, S. and Brown, J. (2009) 'Cone beam CT in dental practice', *British Dental Journal*, 207(1), 23.
- de Barros da Cunha, S. R., Ramos, P. A., Nesrallah, A. C., Parahyba, C. J., Fregnani, E. R. and Aranha, A. C. (2015) 'The Effects of Ionizing Radiation on the Oral Cavity', *J Contemp Dent Pract*, 16(8), 679-687.
- De Vos, W., Casselman, J. and Swennen, G. R. (2009) 'Cone-beam computerized tomography (CBCT) imaging of the oral and maxillofacial region: a systematic review of the literature', *Int J Oral Maxillofac Surg*, 38(6), 609-25.
- Diaz-Castro, J., Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J., Kajarabille, N., de Paco, C., Garrido-Sanchez, M., Prados, S. and Ochoa, J. J. (2016) 'Gender specific differences in oxidative stress and inflammatory signaling in healthy term neonates and their mothers', *Pediatr Res*, 80(4), 595-601.
- Fukai, T. and Ushio-Fukai, M. (2011) 'Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases', *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(6), 1583-1606.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P. G. and Shi, S. (2000) 'Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and invivo', *PNAS*, 97(25), 13625–13630.
- Halliwell, B. and Whiteman, M. (2004) 'Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?', *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231-255.
- Held, P. (2015) 'An Introduction to Reactive Oxygen Species', *BioTek White Paper*.
- Hnasko, T. S. and Hnasko, R. M. (2018) 'The Western Blot', 1318(1), 87-96.
- Honda, M. J., Imaizumi, M., Tsuchiya, S. and Morsczeck, C. (2010) 'Dental follicle stem cells and tissue engineering', *Journal of Oral Science*, 52(4), 541-552.
- Kang, M. Y., Kim, H. B., Piao, C., Lee, K. H., Hyun, J. W., Chang, I. Y. and You, H. J. (2013) 'The critical role of catalase in prooxidant and antioxidant function of p53', *Cell Death and Differentiation*, 20(1), 117-129.
- Koley, D. and Bard, A. J. (2010) 'Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM)', *PNAS*, 107(39), 16783–16787.
- Li, G. (2013) 'Patient radiation dose and protection from cone-beam computed tomography', *Imaging Sci Dent*, 43(2), 63-9.
- Lin, A. V. (2018) 'Indirect ELISA', 1318(1), 51-59
- Liu, S.-Z. (2003) 'Nonlinear Dose-Response Relationship in the Immune System Following Exposure to Ionizing Radiation: Mechanisms and Implications', *Nonlinearity in Biology, Toxicology, and Medicine*, 1(1), 71-92.
- Lopez-Ruiz, A., Sartori-Valinotti, J., Yanes, L. L., Iliescu, R. and Reckelhoff, J. F. (2008) 'Sex differences in control of blood pressure: role of oxidative stress in hypertension in females', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295(2), 466-74.

- Lubos, E., Loscalzo, J. and Handy, D. E. (2011) 'Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities', *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(7), 1957-1997.
- Mayo, V., Sawatari, Y., Huang, C. Y. C. and Garcia-Godoy, F. (2014) 'Neural crest-derived dental stem cells—Where we are and where we are going', *Journal of Dentistry*, 42(9), 1043-1051.
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G. and Shi, S. (2003) 'SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(10), 5807–5812.
- Moore, H. D., Ivey, R. G., Voytovich, U. J., Lin, C., Stirewalt, D. L., Pogossova-Agadjanyan, E. L. and Paulovich, A. G. (2014) 'The Human Salivary Proteome is Radiation Responsive', *Radiat Res.*, 181(5), 521-30.
- NCBI (2017a) 'GPX1 glutathione peroxidase 1 [Homo sapiens (human)] - Gene', [online], available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=2876> [Accessed 16 januari 2018].
- NCBI (2017b) 'HPRT1 hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI', [online], available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3251> [Accessed 16 januari 2018].
- NCBI (2017c) 'PGK1 phosphoglycerate kinase 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI', [online], available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5230> [Accessed 16 januari 2018].
- NCBI (2017d) 'SOD1 superoxide dismutase 1 [Homo sapiens (human)] - Gene', [online], available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6647#gene-expression> [Accessed 16 januari 2018].
- NIH (2013) 'Computed Tomography (CT)', [online], available: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/computed-tomography-ct> [Accessed 16 januari 2018].
- Pfaffl, M. W. (2001) 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR', *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45.
- Puskin, J. S. (2009) 'Perspective on the Use of LNT for Radiation Protection and Risk Assessment By The U.S. Environmental Protection Agency', *Dose Response*, 7(4), 284-91.
- QIAGEN (2017) 'RNeasy Plus Mini Handbook', [online], available: <https://www.qiagen.com/us/resources/resource-detail?id=c8cdc6bf-5bbf-4e3b-a0f4-476da9215012> [Accessed 16 januari 2018].
- Scarfe, W. C. and Farman, A. G. (2008) 'What is cone-beam CT and how does it work?', *Dent Clin N AM*, 52, 707-730.
- Schardt, P., Hell, E., Mattern, D. and Aktiengesellschaft, S. (2002) *X-ray tube US 6339635 B1*,
- Sigma-Aldrich (2017) 'Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (BCA1) - Technical Bulletin', [online], available: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/bca1bul.pdf> [Accessed 16 januari 2018].
- Sinha, N. and Dabla, P. K. (2015) 'Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review', *Curr Hypertens Rev*, 11(2), 132-42.
- Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R. S., Wang, S., Shi, S. and Huang, G. T. J. (2008) 'Characterization of Apical Papilla and its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth –A Pilot Study', *Journal of Endodontics*, 34(2), 166-171.
- UniProt (2017a) 'Catalase Homo sapiens', [online], available: <http://www.uniprot.org/uniprot/P04040> [Accessed 16 januari 2018].

UniProt (2017b) '*Glutathione peroxidase 1 Homo sapiens*', [online], available: <http://www.uniprot.org/uniprot/P07203> [Accessed 16 januari 2018].

UniProt (2017c) 'HPRT1 - Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase - Homo sapiens (Human) - HPRT1 gene & protein', [online], available: <http://www.uniprot.org/uniprot/P00492> [Accessed 16 januari 2018].

UniProt (2017d) 'PGK1 - Phosphoglycerate kinase 1 - Homo sapiens (Human) - PGK1 gene & protein', [online], available:

<http://www.uniprot.org/uniprot/P00558> [Accessed 16 januari 2018].

UniProt (2017e) 'Superoxide dismutase [Cu-Zn]', [online], available: <http://www.uniprot.org/uniprot/P00441> [Accessed 16 januari 2018].

Walker, J. (2009) *The Protein Protocols Handbook*, Springer.

WHO (2017) 'What is Ionizing Radiation?', *WHO* [online], available: http://www.who.int/ionizing_radiation/about/what_is_ir/en/ [Accessed 16 januari 2018].

Bijlagen

Bijlage 1.1 Protocol ontdooien bevroren cellen -180°C

- Laminaire airflow (Clean air CA/REVD 5, Bannockburn, UK) ontsmetten met Umonium (Huckert's, Wavre, België) en 70% ethanol (1.00990.0500, Merck, Darmstadt, Duitsland)



Ethanol is een ontvlambare vloeistof, verwijderd houden van warmte/vonken/open vuur/hete oppervlakken en andere ontstekingsbronnen!

- Cryovial met bevroren cellen uit vloeibare stikstofopslag halen (-180°C)
- Bevroren cellen onmiddellijk in ontsmet, verwarmd waterbad (GFL, Burgwedel, Duitsland) brengen voor ontdooiing op 37°C
- Cryovial in beweging houden voor snellere ontdooiing tot slechts een kleine hoeveelheid ijs overblijft.
- Cryovial ontsmetten met 70% ethanol aan de buitenkant
- In steriele omgeving onder laminaire airflow brengen
- Inhoud vial overbrengen naar 15ml falcontube met behulp van micropipet (Eppendorf, Hamburg, Duitsland)
- Voeg 1ml DMEM medium met 1g/l glucose en pyruvaat (21885-025, Gibco ThermoFischer, Massachusetts, USA) met 10v/v% FBS (10270, Gibco ThermoFischer, Massachusetts, USA), opgewarmd tot 37°C in een waterbad, toe
- Centrifugeer celsuspensie 10 minuten op 200xG in een centrifuge (5810, Eppendorf, Hamburg, Duitsland)
- Giet supernatans voorzichtig af, met behoud van de celpellet
- Resuspendeer cellen in 1 ml laag glucose DMEM medium met 10%FBS
- Breng de celsuspensie over in een T75 celcultuur flask
- Voeg 14ml laag glucose DMEM medium met 10% FBS toe aan de flask en meng door kanteling
- Incubeer de celcultuur op 37°C in een incubator (Binder, Tuttlingen, Duitsland)

Bijlage 1.2 Protocol vervangen celcultuur medium

- Laminaire airflow (Clean air CA/REVD 5, Bannockburn, UK) ontsmetten met Umonium (Huckert's, Wavre, België) en 70% ethanol (1.00990.0500, Merck, Darmstadt, Duitsland)



Ethanol is een ontvlambare vloeistof, verwijderd houden van warmte/vonken/open vuur/hete oppervlakken en andere ontstekingsbronnen!

- Warm DMEM medium met 1g/l glucose en pyruvaat (21885-025, Gibco ThermoFischer, Massachusetts, USA) met 10v/v% FBS (10270, Gibco ThermoFischer, Massachusetts, USA) op in een waterbad (GFL, Burgwedel, Duitsland) op 37°C
- Haal de celcultuurflasks uit de incubator (Binder, Tuttlingen, Duitsland) en breng ze onder de laminaire airflow
- Giet het oude medium voorzichtig af via de bovenkant van de flask
- Breng met behulp van een pipet nieuw medium in de flask aan langs de bovenkant van de flask (5ml voor T25-flask, 15ml voor T75-flask, 25ml voor T175-flask)
- Leg de flask plat en zorg dat het medium zich goed verspreid
- Incubeer de celcultuur in een incubator op 37°C

Bijlage 1.3 Protocol subcultivatatie celcultuur

- Laminaire airflow (CA/REVD 5, Clean air, Bannockburn, UK) ontsmetten met Umonium (Huckert's, Wavre, België) en 70% ethanol (1.00990.0500, Merck, Darmstadt, Duitsland)



Ethanol is een ontvlambare vloeistof, verwijderd houden van warmte/vonken/open vuur/hete oppervlakken en andere ontstekingsbronnen!

- Warm DMEM medium met 1g/l glucose en pyruvaat (21885-025, Gibco ThermoFischer, Massachusetts, USA) met 10v/v% FBS (10270, Gibco ThermoFischer, Massachusetts, USA) op in een waterbad (GFL, Burgwedel, Duitsland) op 37°C
- Haal de celcultuurflasks uit de incubator (Binder, Tuttlingen, Duitsland) en breng ze onder de laminaire airflow
- Giet het oude medium voorzichtig af via de bovenkant van de flask
- Was de cellen met steriel 1x PBS (P4417-100TAB, Sigma Life Science, Missouri, USA) (1ml voor T25, 7ml voor T75, 15ml voor T175)
- Giet af en verwijder overschot PBS met een pipet
- Voeg 0,05% Trypsine-EDTA (25300-062, Gibco ThermoFischer, Massachusetts, USA) toe (1ml voor T25, 7ml voor T75, 15ml voor T175)
 - Leg flasks plat en zorg dat de trypsin overall over de bodem verspreid is
- Incubeer op 37°C gedurende 5 minuten
- Voeg medium toe (1ml voor T25, 7ml voor T75, 15ml voor T175)
- Breng met behulp van een pipet de suspensie over in een 15ml falcontube
- Pelleteer de cellen in een centrifuge (5810, Eppendorf, Hamburg, Duitsland) op 200xG gedurende 5 minuten
- Verwijder supernatans
- Resuspendeer cellen in 1ml opgewarmd medium van 37°C
- Verdun 10µl celsuspensie met 90 of 190µl PBS om een verdunning van respectievelijk 10x of 20x te bekomen
- Tel de verdunde celsuspensie met een M cassette van Moxi voor celtelling (ORFLO Technologies, Ketchum, USA)
- Bereken de hoeveelheid uit te zaaien celsuspensie voor het gewenste aantal uit te zaaien cellen
- Breng de gewenste hoeveelheid celsuspensie over in nieuwe flasks met behulp van een micropipet
- Breng met behulp van een pipet nieuw medium in de flask aan langs de bovenkant van de flask (5ml voor T25-flask, 15ml voor T75-flask, 25ml voor T175-flask)
- Leg de flask plat en zorg dat het medium zich goed verspreid
- Incubeer de celcultuur in een incubator op 37°C

Bijlage 1.4 Protocol proteïne-extractie van adherente cellen voor enzymactiviteitsanalyses

Deel A : verzamelen van cellen

- Laminare airflow (CA/REVD 5, Clean air, Bannockburn, UK) ontsmetten met Umonium (Huckert's, Wavre, België) en 70% ethanol (1.00990.0500, Merck, Darmstadt, Duitsland)



Ethanol is een ontvlambare vloeistof, verwijderd houden van warmte/vonken/open vuur/hete oppervlakken en andere ontstekingsbronnen!

- Warm DMEM medium met 1g/l glucose en pyruvaat (21885-025, Gibco ThermoFischer, Massachusetts, USA) met 10v/v% FBS (10270, Gibco ThermoFischer, Massachusetts, USA) op in een waterbad (GFL, Burgwedel, Duitsland) op 37°C
- Haal de celcultuurflasks uit de incubator (Binder, Tuttlingen, Duitsland) en breng ze onder de laminare airflow
- Giet het oude medium voorzichtig af via de bovenkant van de flask
- Was de cellen met steriel 1x PBS (P4417-100TAB, Sigma Life Science, Missouri, USA) (1ml voor T25, 7ml voor T75, 15ml voor T175)
- Giet af en verwijder overschot PBS met vacuüm pasteurpipet
- Voeg 0,05% Trypsine-EDTA (25300-062, Gibco ThermoFischer, Massachusetts, USA) toe bij elke flask met behulp van een multipipet (Eppendorf, Hamburg, Duitsland) (1ml voor T25, 7ml voor T75, 15ml voor T175)
- Leg flasks plat en zorg dat de trypsine overal over de bodem verspreid is
- Incubeer flasks op 37°C gedurende 5 minuten
- Voeg medium toe (1ml voor T25, 7ml voor T75, 15ml voor T175) met behulp van een multipipet
- Breng met behulp van een pipet de suspensie over in een 15ml falcontube per flask
- Pelleteer de cellen in een centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Duitsland) op 200xG gedurende 5 minuten
- Verwijder supernatans met vacuüm pasteurpipet
- Voeg 1ml PBS toe om de cellen te wassen met behulp van een multipipet, resuspendeer
- Pelleteer de cellen in een centrifuge op 200xG gedurende 5 minuten
- Verwijder supernatans met vacuüm pasteurpipet

Deel B : lysis van verzamelde cellen

- Voeg 500µl fosfaatbuffer toe en resuspendeer (0,05M K₂HPO₄ (60354-1KG, Sigma Life Science, Missouri, USA), 0,05M KH₂PO₄ (1.04873.1000, Merck, Darmstadt, Duitsland), 1 mM EDTA (E5134-1KG, Sigma, Missouri, USA), 210 mM D-mannitol (A1903,0500, PanReac AppliChem, Barcelona, Spanje), 70 mM sucrose (S9378-1KG, Sigma Life Science, Missouri, USA), met een pH van 7)
- Breng 2 keramische beads van 1,4mm voor lysis (13113-50, Qiagen, Hilden, Duitsland) aan in elke verstevigde eppendorftube
- Breng de celsuspensie over in de verstevigde eppendorftubes voor de lysis
- Lyseer de cellen in een gekoelde TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Duitsland) op 4°C op maximum snelheid (30 bewegingen per seconde) gedurende 12 minuten
- Pelleteer celresten in een gekoelde centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Duitsland) op 4°C op 10000G gedurende 10 minuten
- Breng supernatans met een micropipet over in een gelabelde eppendorftube, hou op ijs
- Breng 200µl van dit eiwitstaal over in een andere eppendorftube voor GPx-1 enzymactiviteitsanalyses, hou op ijs

- Voeg 4µl fosfaatbuffer met toegevoegd 1mM DTT (D-5545, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) toe aan de stalen bestemd voor GPx-1 enzymactiviteitsanalyses, hou op ijs



DTT is schadelijk bij inslikken en kan huid- en ernstige oogirritatie veroorzaken. Gebruik handschoenen en vermijd rechtstreeks contact.

- Bewaar stalen op -80°C

Bijlage 1.5 Protocol western blot

Dag 1

1. SDS-PAGE gelelectroforese

- Verdun de stalen met MiliQ tot een totaal van 22µl per well, maak hiervoor een berekening met de waarden voor de proteïnc concentraties van het staal, zodat deze 22µl voor elk staal éénzelfde hoeveelheid proteïnen bevat
 - Verdun elk staal tot een hoeveelheid totaal proteïne van 10µg/22µl
 - Bereid per staal genoeg om 2 wellen in duplicaat te laden
- Bereid laemmli buffer met 4xLaemmli (161-0747, Bio-Rad, Californië, USA) en Beta-mercaptoethanol (M6250-100ML, Sigma-Aldrich, Missouri, USA)



Beta-mercaptoethanol is zeer toxisch, corrosief en carcinogeen, draag handschoenen ten allen tijde en werk onder een afzuiging om inademing te voorkomen

- Verhouding van 10:1
- 5,5 µl buffer per well
- Voeg 5,5µl van het Laemmlireagens per well aan elk staal
- Incubeer op een verwarmde schudplaat (Eppendorf, Hamburg, Duitsland) bij 90°C gedurende 10 minuten
- Haal de voorgegoten SDS-PAGE gel (5678085, Bio-Rad, Californië, USA) uit de verpakking en verwijder de witte strip aan de onderkant
 - 4-15% 26-well TGX gel met een dikte van 1mm
- Reinig de gel met MilliQ
- Plaats de gel in de gelelectroforesehouder (Criterion, Bio-Rad, Californië, USA)
- Vul de container en het bakje met de kam gedeeltelijk met 1xTGS (161-0772, Bio-Rad, Californië, USA)



TGS is schadelijk, gebruik handschoenen en vermijd inademing van dampen

- Verwijder de kam zonder de wellen te beschadigen
- Reinig de wellen met 1xTGS en vul de container tot het met een pijl aangeduide niveau
- Laat de stalen afkoelen tot kamertemperatuur
- Laad 5µl van de regenboogladder (161-0375, Bio-Rad, Californië, USA) in de eerste well van de SDS-PAGE gel
- Laad 18µl van elk staal in na afkoeling per well in duplicaat
- Sluit de gelelectroforesecontainer met het deksel en sluit aan op de spanningsbron (Bio-Rad, Californië, USA)
- Laat de gel lopen op 300V tot de blauwe band de onderkant van de gel bereikt
- Bereid de blockingbuffer tijdens het lopen van de gel
 - Per blot is 12ml buffer benodigd voor de immunokleuring en ongeveer 50ml buffer voor het blokken van de blot
 - Bereid de benodigde hoeveelheid buffer met 1xTBS-T (Trizma base (T6066-1KG, Sigma Life Science, Missouri, USA), NaCl (1.06404.1000, Merck, Darmstadt, Duitsland), H₂O, 1% Triton X-100 (X100-100ML, Sigma-Aldrich, Missouri, USA), pH 7,6) met 5% NFDM (170-6404, Bio-Rad, Californië, USA)

2. Blotten

- Haal de gel uit de gelelectroforesecontainer
- Open de platen rondom de gel
- Verwijder de gel met een *gelcutter*
- Plaats de bovenste helft van de 0,2µm nitrocelluloseblot (170-4159, Bio-Rad, Californië, USA) in het compartiment van het trans-blot-toestel (Bio-Rad, Californië, USA)
- Plaats de gel op deze stapel met de proteïnen aan de bovenkant
- Plaats de onderste helft bovenop de gel en druk aan met de roller om alle luchtbellen te verwijderen
- Sluit het compartiment en plaats deze in het trans-blot-toestel
- Laat het trans-blot-toestel lopen met als instelling P0 voor 7 minuten
- Verwijder het nitrocellulosemembraan dat zich als bovenste laag onder de gel bevindt
- Block de blot met ongeveer 50ml blockingbuffer op een schudplaat gedurende 2 uur
(- Zie laatste punt van stap 1 voor bereidingswijze)

3. Immunokleuring

- Voeg de gewenste hoeveelheid primair antilichaam (sc-271803, sc-17767, sc-133160, Santa-Cruz, Dallas, USA) toe aan 12ml blockingbuffer per blot in een 15ml falcontube
- Sluit de blot luchtdicht in een zakje in met het verdunde primair antilichaam
- Plaats op een schudplaat (Grant-Bio, Royston, UK) en laat overnacht inwerken op 4°C

Dag 2

- Was het membraan 3 keer gedurende minstens 5 minuten met voldoende 1xTBS-T op een schudplaat (Grant-Bio, Royston, UK)
- Bereid de gewenste verdunning van secundair antilichaam (62-6520, Invitrogen ThermoFischer, Massachusetts, USA) in blocking buffer (5% NFDM in TBS-T), 30ml per blot
- Voeg de verdunning toe in een container aan de blot en meng op een schudplaat gedurende 1 uur
- Was het membraan 2 keer gedurende minstens 5 minuten met voldoende 1xTBS-T op een schudplaat
- Was het membraan 1 keer gedurende minstens 5 minuten met voldoende 1xTris (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) op een schudplaat
- Bereid het ECL werkreagens (170-5061, Bio-Rad, Californië, USA) voor detectie van de immunokleuring, meng reagens A en reagens B in een verhouding 1:1, dit samenvoegen moet in het donker gebeuren.
- Houd het werkreagens in het donker tijdens het volledige gebruik. Het werkreagens is 1 uur stabiel
- Voeg het werkreagens in een verduisterde container toe aan de blot en laat inwerken gedurende 5 minuten
- Meet de chemiluminescentie met een illuminator (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Frankrijk) om een afbeelding te bekomen van de aangekleurde bandjes
- Varieer de belichtingstijd om optimale bandjes te bekomen, let wel dat het signaal niet verzadigd is.

Bijlage 1.6 Protocol totale proteïnekleuring van western blots via *Serva Purple*

Methoden

- Alle stappen worden uitgevoerd in een container ter grootte van de blot op een schudplaat (Grant-Bio, Royston, UK)
- Reinig het membraan 3 maal gedurende 5 minuten met TBS-T (Trizma base (T6066-1KG, Sigma Life Science, Missouri, USA), NaCl (1.06404.1000, Merck, Darmstadt, Duitsland), H₂O, 1% Triton X-100 (X100-100ML, Sigma-Aldrich, Missouri, USA), pH 7,6), proteïnekant naar onderen gericht
- Verwijder de gebonden antilichamen met stripping buffer (46430, Thermo Scientific, Massachusetts, USA) gedurende 5 minuten

Stripping buffer is corrosief voor metalen, bij morsen onmiddellijk opkuisen en contact met metalen instrumenten vermijden

- Reinig de blot gedurende 5 minuten met TBS-T
- Ontdooi de *Serva Purple* kleurstof (43386.01, SERVA, Duisburg, Duitsland) tot kamertemperatuur gedurende minstens 15 minuten
- Bereid in een verduisterde falcontube van 50ml de *Serva Purple* werkreagens
 - 125µl *Serva Purple* in 50ml kleuringsbuffer II (H₂O, Boorzuur, Natriumhydroxide, pH > 9,4) voor elke blot



Het *Serva Purple* werkreagens is toxisch en kan de vruchtbaarheid schaden, kan ook voor ernstige brandwonden en oogletsel zorgen, werk onder een trekkast met handschoenen, en vermijd rechtstreeks contact en inademing.

- Was het membraan gedurende 5 minuten met MilliQ
- Voeg de *Serva Purple* werkreagens toe aan de blot in het donker, bedek met aluminiumfolie voor volledige verduistering en laat kleuren voor 30 minuten
- Was 3 maal met MilliQ in het donker
- Laat in een donkere droogkast de aangekleurde blots minstens 1 uur drogen, tot ze compleet droog zijn
- Maak een fluorescentieafbeelding met een illuminator (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Frankrijk) met een belichtingstijd van ongeveer 0,3 seconden

Bijlage 1.7 Protocol cDNA synthese met Promega A5001 GoScript reverse transcriptasekit

- Er wordt uitgegaan van een reactie met 400ng RNA
- Verdun de RNA stalen (met gekende concentratie) met MilliQ-water tot een totaalvolume van 19µl in een 250µl PCR-tube per staal
- Voeg 2µl van de Random Primers uit de kit (A5001, Promega, Wisconsin, USA) toe
- Meng voorzichtig en centrifugeer (galaxy mini, VWR, Radnor, USA) kort om alle vloeistof onderaan de tube te krijgen
- Incubeer in een PCR-thermocycler (Proflex PCR System, ThermoFischer, Massachusetts, USA) gedurende 5 minuten op 70°C
- Laat stalen afkoelen op ijs
- Centrifugeer kort om alle vloeistof onderaan de tube te krijgen
- Tijdens de incubatie, bereid de cDNA-mastermix op ijs met de producten uit de kit (A5001, Promega, Wisconsin, USA)

Hoeveelheid toe te voegen per staal :

- 8 µl 5x GoScript Reactiebuffer
 - 6 µl MgCl₂
 - 2 µl PCR nucleotide mix
 - 1 µl RNasin RNase inhibitor
 - 2 µl GoScript Reverse Transcriptase
- Voeg 19 µl van de mastermix toe aan elk staal → totaal reactievolume = 40µl
 - Meng voorzichtig en centrifugeer kort om alle vloeistof onderaan de tube te krijgen
 - Incubeer de stalen in een PCR-thermocycler volgens onderstaand schema
 - 5 minuten op 25°C
 - 60 minuten op 42°C
 - 15 minuten op 70°C
 - Bewaar tijdelijk op 4°C
 - Verdun 1/10 met steriel MilliQ
 - Bewaar de cDNA-stalen op -20°C

Bijlage 1.8 Protocol qPCR met Taqman primers en probes voor RotorGene

Uitvoering qPCR

- Ontdooi de cDNA stalen en 20x Taqman primers en probes mix (Applied Biosystems, Foster City, Californië, USA) op ijs
- Bereid mastermix voor 15µl per 100µl-tube volgens onderstaande verhoudingen:
 - 1µl 20x Taqman primers en probes mix
 - 10µl 2x Taqman Universal Mastermix 2 met Uracil-N glycosylase (UNG) (Applied Biosystems, Foster City, Californië, USA)
 - 4µl MilliQ



Taqman Universal Mastermix is irriterend voor huid en ogen en schadelijk wanneer ingeslokt. Draag handschoenen bij het gebruik van deze stof en vermijd contact met huid en ogen en inademing van dampen.

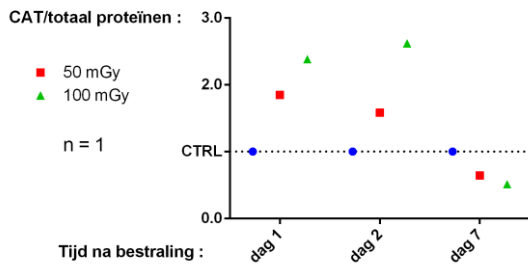
- Voeg 15µl mastermix toe per 100µl-tube voor een 72-tube rotor geschikt voor het RotorGene qPCR toestel (Qiagen, Hilden, Duitsland)
- Pipetteer 5µl cDNA per tube, zorg dat er zo min mogelijk luchtbelletjes aanwezig zijn
- Neem voor iedere tube een nieuwe pipettip, ook voor technische replicaten om contaminatie van het deppendorftube met cDNA-staal met probes te vermijden
- Sluit de tubes met de daar toe bestemde losse deksels
- Plaats de tubes in de rotorring
- Sluit af met de afsluitring, zorg dat deze goed vastzit
- Plaats de rotor in het RotorGene qPCR toestel
- Start de qPCR-run volgens onderstaand protocol :
 - 50°C voor 2 minuten
 - 95°C voor 10 minuten
 - cyclus 40x
 - 95° voor 15 seconden
 - 60°C voor 60 seconden
- Laat de meting gebeuren op het einde van de 60 seconden op 60°C per cyclus
- Laat het toestel een automatische meetoptimalisatie uitvoeren vóór de eerste cyclus

Bepaling van de threshold voor verdere verwerking data

- Open de RotorGene software (Qiagen, Hilden, Duitsland)
- Open het bestand met de metingen bekomen in het eerste deel van het protocol
- Selecteer 'Analysis' bij opties
- Selecteer het 'Quantitation'-tabblad, selecteer de data en klik 'Show'
- Zet de curve op lineaire schaal
- Zoom in
- Bepaal de threshold in de regio waar het signaal exponentieel begint te stijgen.
- Belangrijk! Hou de threshold hetzelfde voor alle qPCR-runs met dezelfde set primers en probes!

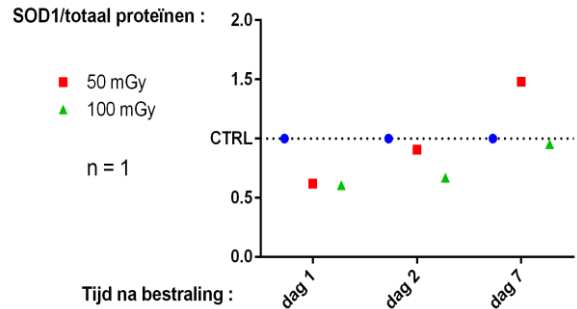
Bijlage 2: Grafieken western blot

Relatieve **Catalase** hoeveelheid in humane **DFSC** na X-bestraling



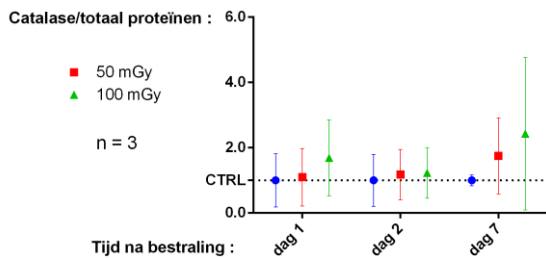
Figuur 2.1: Relatieve enzymconcentratie tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant catalase op stalen afkomstig van Dentale Follikel Stamcellen (DFSC). Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). Geen significantie tussen doses per tijdstip.

Relatieve **SOD1** hoeveelheid in humane **DFSC** na X-bestraling



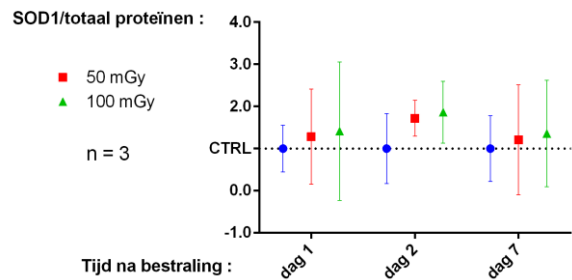
Figuur 2.4: Relatieve enzymconcentratie tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant SOD1 op stalen afkomstig van Dentale Follikel Stamcellen (DFSC). Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). Geen significantie tussen doses per tijdstip.

Relatieve **Catalase** hoeveelheid in humane **DPSC** na X-bestraling



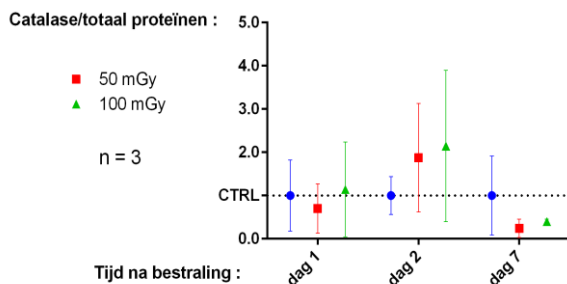
Figuur 2.2: Relatieve enzymconcentratie tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant catalase op stalen afkomstig van Dentale Pulpa Stamcellen (DPSC) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). Geen significantie tussen doses per tijdstip.

Relatieve **SOD1** hoeveelheid in humane **DPSC** na X-bestraling



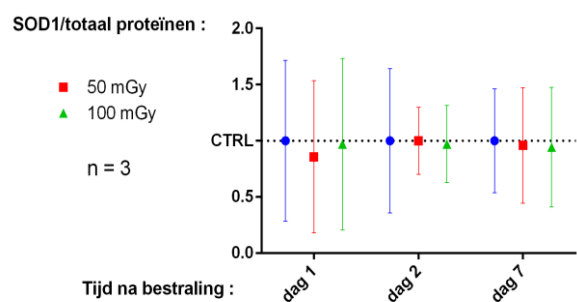
Figuur 2.5: Relatieve enzymconcentratie tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant SOD1 op stalen afkomstig van Dentale Pulpa Stamcellen (DPSC) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). Geen significantie tussen doses per tijdstip.

Relatieve **Catalase** hoeveelheid in humane **SCAP** na X-bestraling



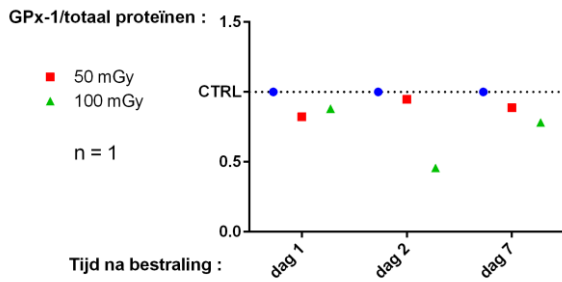
Figuur 2.3: Relatieve enzymconcentratie tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant catalase op stalen afkomstig van stamcellen van apicale papilla (SCAP) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). Geen significantie tussen doses per tijdstip.

Relatieve **SOD1** hoeveelheid in humane **SCAP** na X-bestraling



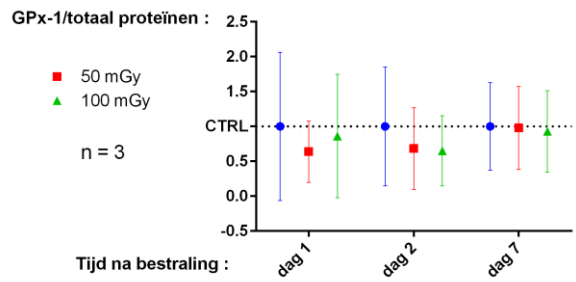
Figuur 2.6: Relatieve enzymconcentratie tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant SOD1 op stalen afkomstig van stamcellen van apicale papilla (SCAP) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). Geen significantie tussen doses per tijdstip.

Relatieve GPx-1 hoeveelheid in humane DFSC na X-bestraling



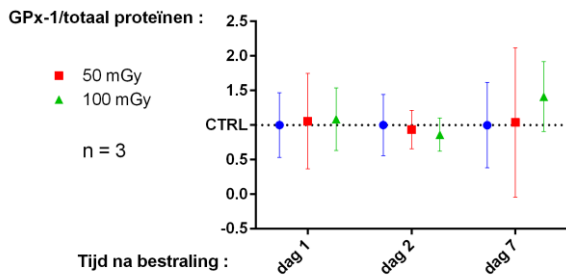
Figuur 2.7: Relatieve enzymconcentratie tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant GPx-1 op stalen afkomstig van Dentale Follikel Stamcellen (DFSC). Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). Geen significantie tussen doses per tijdstip.

Relatieve GPx-1 hoeveelheid in humane SCAP na X-bestraling



Figuur 2.9: Relatieve enzymconcentratie tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant GPx-1 op stalen afkomstig van stamcellen van apicale papilla (SCAP) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). Geen significantie tussen doses per tijdstip.

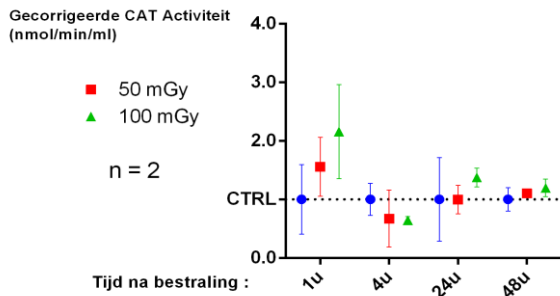
Relatieve GPx-1 hoeveelheid in humane DPSC na X-bestraling



Figuur 2.8: Relatieve enzymconcentratie tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant catalase op stalen afkomstig van Dentale Pulpa Stamcellen (DPSC) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). Geen significantie tussen doses per tijdstip.

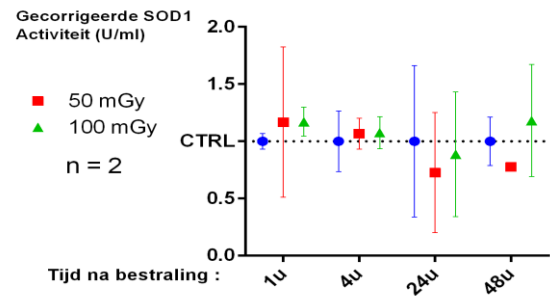
Bijlage 3: Grafieken enzymactiviteitsanalyses

Catalase activiteit in humane DFSC na X-bestraling



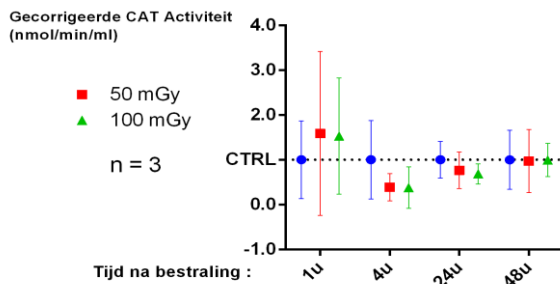
Figuur 3.1: Relatieve enzymconcentratie tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant catalase op stalen afkomstig van Dentale Follikel Stamcellen (DFSC) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). Geen significantie tussen doses per tijdstip. Voor het staal met een bestralingsdosis van 50mGy en een lyseringstijdstip van 48 uur is de n-waarde één door het ontbreken van dit staal van de donor Alto.

SOD1 activiteit in humane DFSC na X-bestraling



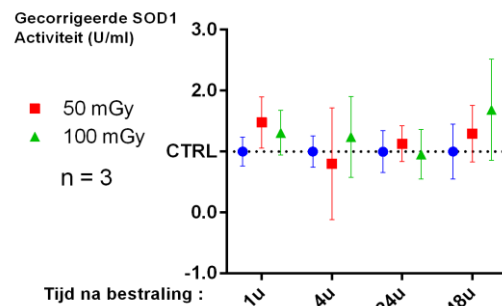
Figuur 3.4: Relatieve enzymconcentratie tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant SOD1 op stalen afkomstig van Dentale Follikel Stamcellen (DFSC) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). Geen significantie tussen doses per tijdstip. Voor het staal met een bestralingsdosis van 50mGy en een lyseringstijdstip van 48 uur is de n-waarde één door het ontbreken van dit staal van de donor Alto.

Catalase activiteit in humane DPSC na X-bestraling



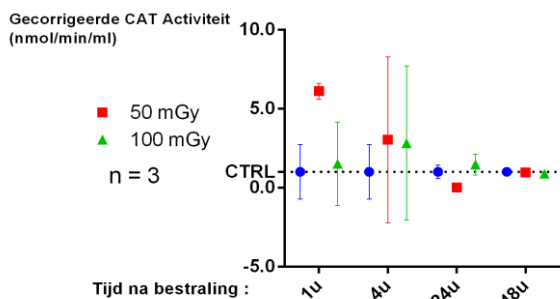
Figuur 3.2: Relatieve enzymconcentratie tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant catalase op stalen afkomstig van Dentale Pulpa Stamcellen (DPSC) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). Geen significantie tussen doses per tijdstip.

SOD1 activiteit in humane DPSC na X-bestraling



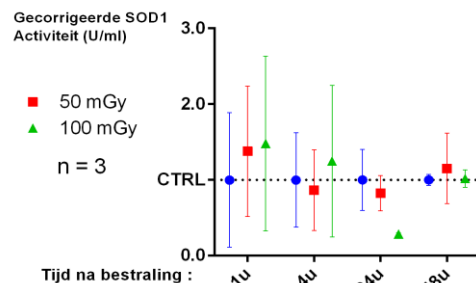
Figuur 3.5: Relatieve enzymconcentratie tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant SOD1 op stalen afkomstig van Dentale Pulpa Stamcellen (DPSC) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). Geen significantie tussen doses per tijdstip.

Catalase activiteit in humane SCAP na X-bestraling



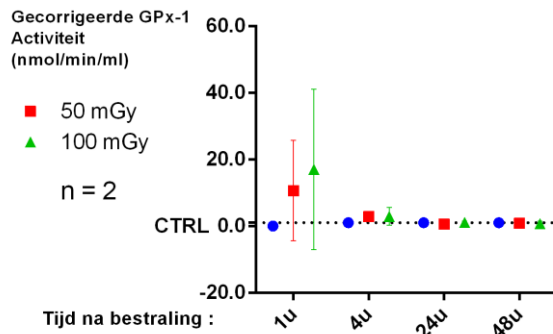
Figuur 3.3: Relatieve enzymconcentratie tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant catalase op stalen afkomstig van stamcellen van apicale papilla (SCAP) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). Geen significantie tussen doses per tijdstip.

SOD1 activiteit in humane SCAP na X-bestraling



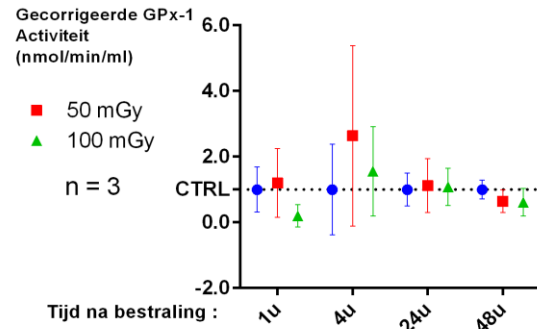
Figuur 3.6: Relatieve enzymconcentratie tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant SOD1 op stalen afkomstig van stamcellen van apicale papilla (SCAP) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). Geen significantie tussen doses per tijdstip.

GPx-1 activiteit in humane DFSC na X-bestraling



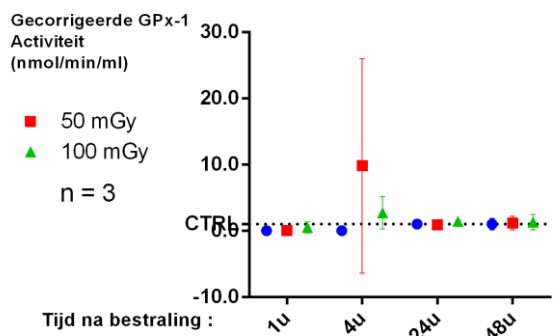
Figuur 3.7: Relatieve enzymconcentratie tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant GPx-1 op stalen afkomstig van Dentale Follikel Stamcellen (DFSC) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). Geen significantie tussen doses per tijdstip. Voor het staal met een bestralingsdosis van 50mGy en een lyseringstijdstip van 48 uur is de n-waarde één door het ontbreken van dit staal van de donor Alto.

GPx-1 activiteit in humane SCAP na X-bestraling



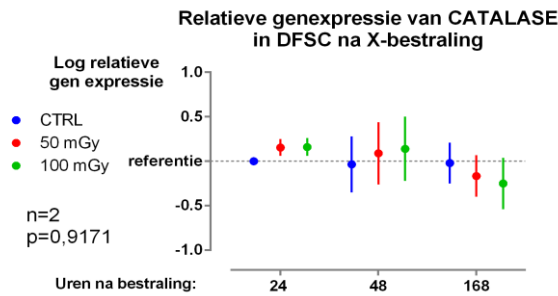
Figuur 3.9: Relatieve enzymconcentratie tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant GPx-1 op stalen afkomstig van stamcellen van apicale papilla (SCAP) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). Geen significantie tussen doses per tijdstip.

GPx-1 activiteit in humane DPSC na X-bestraling

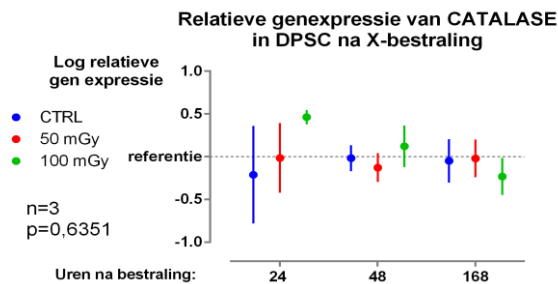


Figuur 3.8: Relatieve enzymconcentratie tegenover de controlestalen per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant GPx-1 op stalen afkomstig van Dentale Pulpa Stamcellen (DPSC) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle gelijkgesteld aan 1 (CTRL-lijn). Geen significantie tussen doses per tijdstip.

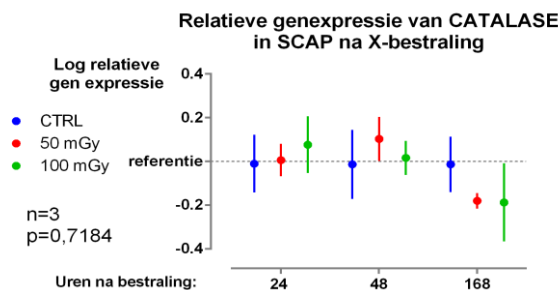
Bijlage 4: Grafieken qPCR



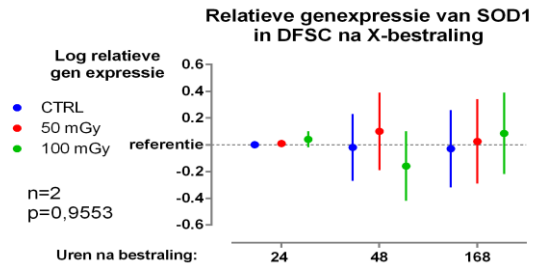
Figuur 4.1: Relatieve genexpressie genormaliseerd tegenover de controlestalen met referentiewaarde 0 per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant catalase in Dentale Follikel Stamcellen (DFSC) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle werd gelijkgesteld aan 1, van alle waarden werd de LOG2 genomen om een referentielijn van 0 te bekomen. Geen significantie met $P>0,05$. Voor de controlestalen gelyseerd na 24 uur, is de n-waarde twee aangezien er geen staal voor de donor Alto werd ingezet als biologisch replicaat.



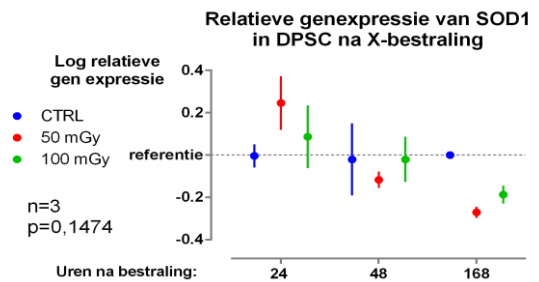
Figuur 4.2: Relatieve genexpressie genormaliseerd tegenover de controlestalen met referentiewaarde 0 per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant catalase in Dentale Pulpa Stamcellen (DPSC) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle werd gelijkgesteld aan 1, van alle waarden werd de LOG2 genomen om een referentielijn van 0 te bekomen. Geen significantie met $P>0,05$.



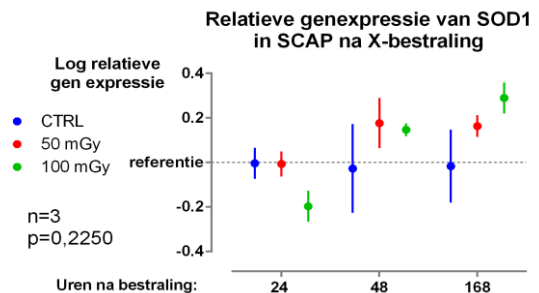
Figuur 4.3: Relatieve genexpressie genormaliseerd tegenover de controlestalen met referentiewaarde 0 per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant catalase in Stamcellen van Apicale Papilla (SCAP) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle werd gelijkgesteld aan 1, van alle waarden werd de LOG2 genomen om een referentielijn van 0 te bekomen. Geen significantie met $P>0,05$. Voor de stalen bestraald met 50mGy en gelyseerd na zeven dagen, is de n-waarde twee aangezien er geen staal voor de donor Alto werd ingezet als biologisch replicaat.



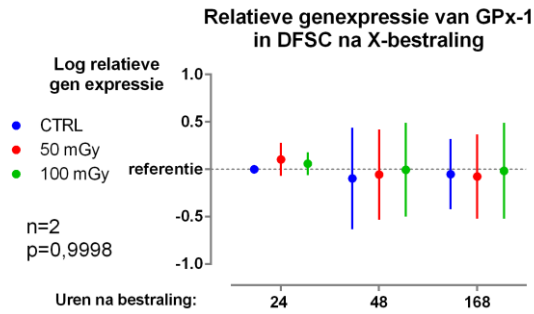
Figuur 4.4: Relatieve genexpressie genormaliseerd tegenover de controlestalen met referentiewaarde 0 per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant Superoxide Dismutase 1 (SOD1) in Dentale Follikel Stamcellen (DFSC) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle werd gelijkgesteld aan 1, van alle waarden werd de LOG2 genomen om een referentielijn van 0 te bekomen. Geen significantie met $P>0,05$. Voor de controlestalen gelyseerd na 24 uur, is de n-waarde twee aangezien er geen staal voor de donor Alto werd ingezet als biologisch replicaat.



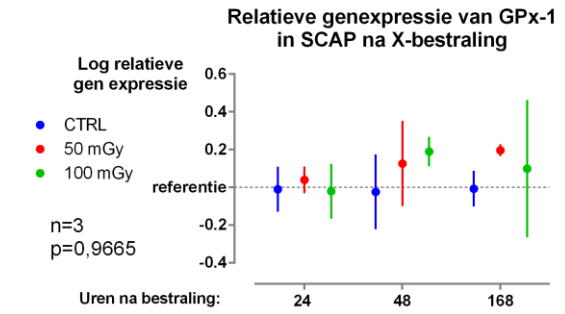
Figuur 4.5: Relatieve genexpressie genormaliseerd tegenover de controlestalen met referentiewaarde 0 per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant Superoxide Dismutase 1 (SOD1) in Dentale Pulpa Stamcellen (DPSC) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle werd gelijkgesteld aan 1, van alle waarden werd de LOG2 genomen om een referentielijn van 0 te bekomen. Geen significantie met $P>0,05$.



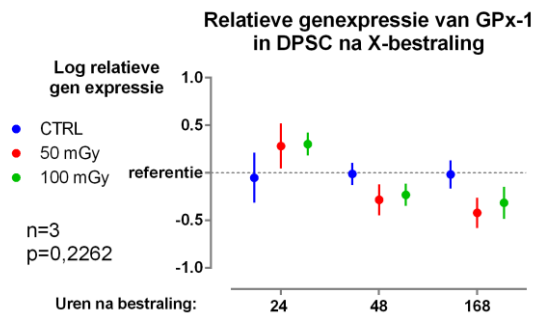
Figuur 4.6: Relatieve genexpressie genormaliseerd tegenover de controlestalen met referentiewaarde 0 per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant Superoxide Dismutase 1 (SOD1) in Stamcellen van Apicale Papilla (SCAP) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle werd gelijkgesteld aan 1, van alle waarden werd de LOG2 genomen om een referentielijn van 0 te bekomen. Geen significantie met $P>0,05$. Voor de stalen bestraald met 50mGy en gelyseerd na zeven dagen, is de n-waarde twee aangezien er geen staal voor de donor Alto werd ingezet als biologisch replicaat.



Figuur 4.7: Relatieve genexpressie genormaliseerd tegenover de controlestalen met referentiewaarde 0 per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant Glutathion Peroxidase 1 (GPx-1) in Dentale Follikel Stamcellen (DFSC) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle werd gelijkgesteld aan 1, van alle waarden werd de LOG2 genomen om een referentielijn van 0 te bekomen. Geen significantie met $P > 0,05$. Voor de controlestalen gelyseerd na 24 uur, is de n-waarde twee aangezien er geen staal voor de donor Alto werd ingezet als biologisch replicaat.



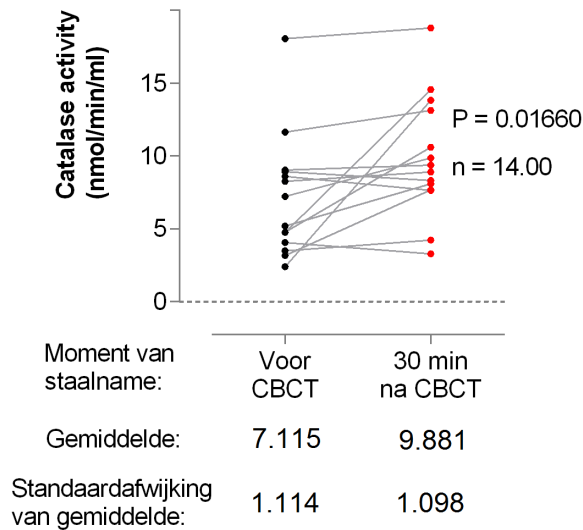
Figuur 4.9: Relatieve genexpressie genormaliseerd tegenover de controlestalen met referentiewaarde 0 per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant Glutathion Peroxidase 1 (GPx-1) in Stamcellen van Apicale Papilla (SCAP) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle werd gelijkgesteld aan 1, van alle waarden werd de LOG2 genomen om een referentielijn van 0 te bekomen. Geen significantie met $P > 0,05$. Voor de stalen bestraald met 50mGy en gelyseerd na zeven dagen, is de n-waarde twee aangezien er geen staal voor de donor Alto werd ingezet als biologisch replicaat.



Figuur 4.8: Relatieve genexpressie genormaliseerd tegenover de controlestalen met referentiewaarde 0 per dag en per bestralingsdosis voor het antioxidant Glutathion Peroxidase 1 (GPx-1) in Dentale Pulpa Stamcellen (DPSC) met hun standaardafwijkingen. Data werd gerelativeerd met de waarden van de controlestalen per dag. Controle werd gelijkgesteld aan 1, van alle waarden werd de LOG2 genomen om een referentielijn van 0 te bekomen. Geen significantie met $P > 0,05$.

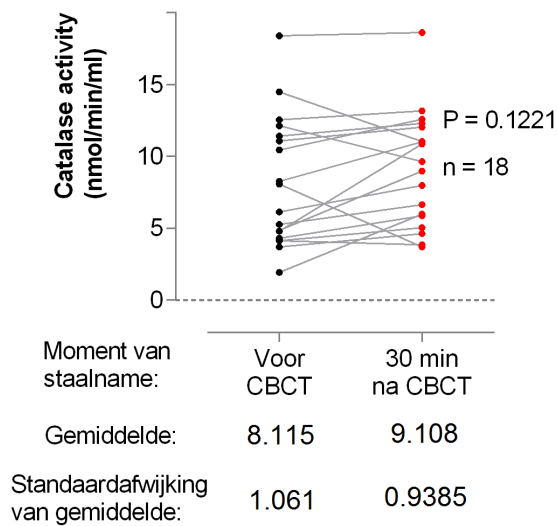
Bijlage 5: Grafieken enzymactiviteitsanalyses speekselstalen

Catalase activiteit in speekselstalen van mannelijke pediatrische patiënten na CBCT



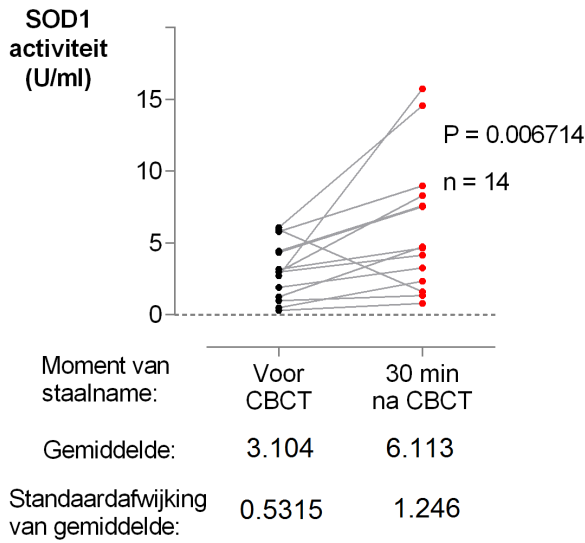
Figuur 5.1: Vergelijking tussen catalase activiteit in speekselstalen van pediatrische patiënten voor en 30 minuten na CBCT bij jongens. Data is niet normaal verdeeld. Wilcoxon signed rank test is significant op 5% met $P < 0,05$.

Catalase activiteit in speekselstalen van vrouwelijke pediatrische patiënten na CBCT



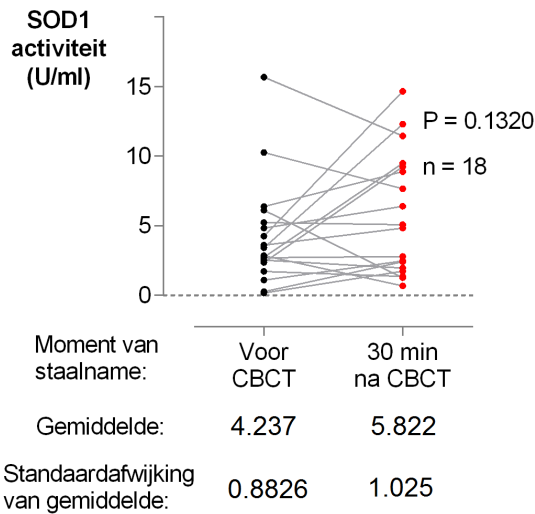
Figuur 5.2: Vergelijking tussen catalase activiteit in speekselstalen van pediatrische patiënten voor en 30 minuten na CBCT bij meisjes. Data is normaal verdeeld. Parametrische gepaarde t-test is niet significant op 5% met $P > 0,05$.

**SOD1 activiteit in speekselstalen van mannelijke
padiatrische patiënten na CBCT**



Figuur 5.3: Vergelijking tussen Superoxide Dismutase 1 (SOD1) activiteit in speekselstalen van pediatrie patiënten voor en 30 minuten na CBCT bij jongens. Data is normaal verdeeld. Wilcoxon signed rank test is significant op 5% met $P = 0,006714$.

**SOD1 activiteit in speekselstalen van vrouwelijke
padiatrische patiënten na CBCT**



Figuur 5.4: Vergelijking tussen Superoxide Dismutase 1 (SOD1) activiteit in speekselstalen van pediatrie patiënten voor (gemiddelde = 4,237; standaardafwijking van het gemiddelde = 0,8826) en 30 minuten na (gemiddelde = 5,822; standaardafwijking van het gemiddelde = 1,025) CBCT bij meisjes. $n = 18$ met normale verdeling. Parametrische gepaarde t-test is niet significant op 5% met $P = 0,1320$.