

**P-GLIKOPROTEÏEN NEUTRALISERINGS-
POTENSIAAL EN WEEFSEL VERSPREIDING
VAN TETRAMETIEL-PIPERIDIEN
DERIVATE VAN KLOFASIMIEN**

deur

CHRISNA DURANDT

**P-GLIKOPROTEÏEN NEUTRALISERINGS-
POTENSIAAL EN WEEFSEL VERSPREIDING VAN
TETRAMETIEL-PIPERIDIEN DERIVATE VAN
KLOFASIMIEN**

deur

CHRISNA DURANDT

**VOORGELÊ TER VERVULLING VAN 'N DEEL VAN DIE VEREISTE VIR DIE
PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph.D.) GRAAD IN GENEESKUNDIGE
IMMUNOLOGIE**

**DEPARTEMENT IMMUNOLOGIE
FAKULTEIT GENEESKUNDE
UNIVERSITEIT VAN PRETORIA
SUID-AFRIKA**

OKTOBER 2000

Dankbetuigings

- i. Eerstens my Hemelse Vader vir die genade en liefde wat ek so mildelik van Hom ontvang.
- ii. Prof. Medlen vir haar getroue ondersteuning en leiding gedurende hierdie studie.
- iii. Prof. Anderson vir die raad en ondersteuning gedurende die studie.
- iv. My ouers, broers en suster vir hul geduldige oor en voortdurende belangstelling, ondersteuning en aanmoediging.
- v. Vriende en familie vir hul voortdurende belangstelling en ondersteuning.
- vi. Oom Mike en Tannie Moonyene vir al die belangstelling en ondersteuning.

Oppedra aan:
WILLEM

INHOUDSOPGAWE

Opsomming.....	xi
Summary.....	xii
Lys van afkortings.....	xiii

HOOFSTUK 1: GENEESMIDDEL WEERSTANDBIEDENDHEID

1.1. Inleiding.....	1
1.2. Intrinsieke vs verworwe weerstandbiedendheid.....	2
1.2.1. Intrinsieke weerstandbiedendheid.....	2
1.2.2. Verworwe weerstandbiedendheid.....	2
1.3. Veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid (“multidrug resistance”:MDR).....	3
1.4. Meganismes betrokke by geneesmiddel weerstandbiedendheid.....	5
1.4.1. Verandering in die geneesmiddel teiken.....	5
1.4.2. Mislukking van pro-geneesmiddel aktivering.....	7
1.4.3. Verhoogde detoksifikasie.....	7
1.4.4. Verandering in DNA herstel.....	7
1.4.5. Onvermoë om apoptose te induseer.....	8
1.4.6. Uitsluiting of sekwestrasie van geneesmiddels.....	9

HOOFSTUK 2: P-GLIKOPROTEÏEN EN MDR

2.1. Ontdekking van P-glikoproteïen.....	10
2.2. Strukturele eienskappe van P-gp.....	10
2.2.1. Homologie van P-gp met ander transport proteïene.....	16
2.3. Uitdrukking van P-gp in kanker sellyne en tumore.....	17
2.4. Die uitdrukking en funksie van P-gp in normale weefsel.....	20
2.5. Meganisme van werking van P-gp.....	24
2.5.1. Direkte transport modelle.....	24

2.5.1.1. Modelle waarin P-gp die geneesmiddels vanuit die sitoplasma verwyder.....	24
2.5.1.1.1. Die “aktiewe geneesmiddel pomp” model	24
2.5.1.2. Modelle waarin P-gp die geneesmiddels vanuit die selmembraan verwyder.....	33
2.5.1.2.1. Die hidrofobiese stofuij model.....	34
2.5.1.2.2. Die flippase model.....	37
2.5.2. Indirekte transport modelle	41
2.5.2.1. Die “veranderde partissie” model.....	41

HOOFSTUK 3: FARMAKOLOGIESE OMKERING VAN MDR

3.1. Inleiding	48
3.2. Struktuur-aktiwiteit verwantskappe van MDR chemosensitiseerders.....	52
3.3. Meganismes betrokke by die farmakologiese omkering van MDR.....	53

HOOFSTUK 4: RIMINOFENASIEN VERBINDINGS

4.1. Inleiding	60
4.2. Algemene kenmerke van klofasimien.....	60
4.3. Die biologiese aktiwiteite van riminofenasien verbindings	62
4.3.1. Die anti-tumor aktiwiteit van riminofenasien verbindings	62
4.3.1.1. Indirekte anti-tumor aktiwiteit van riminofenasien verbindings .	62
4.3.1.2. Direkte anti-tumor aktiwiteit van riminofenasien verbindings	62
4.3.2. MDR omkerings aktiwiteit van riminofenasien verbindings	67
4.4. Struktuur-aktiwiteit verwantskappe van riminofenasien verbindings as MDR chemosensitiseerders	68

HOOFSTUK 5: DIE ROL VAN DIE SELMEMBRAAN TYDENS GENEESMIDDEL TRANSPORT

5.1. Inleiding	69
5.2. Samestelling van die selmembraan.....	69
5.3. Funksies van die selmembraan	70
5.4. Membraan transport	70
5.4.1. Passiewe transport.....	70
5.4.1.1. Die invloed van die lipofilisiteit van verbindings op hul passiewe diffusie oor die selmembraan	72
5.4.1.2. Die invloed van proteïenbinding op die passiewe transport van verbindings oor die selmembraan	72
5.4.1.3. Die invloed van die membraan potensiaal op die passiewe transport van ione oor die selmembraan	74
5.4.2. Aktiewe transport.....	77
5.4.2.1. Die natrium-kalium ATPase pomp.....	78

HOOFSTUK 6: DOELWITTE.....	80
----------------------------	----

HOOFSTUK 7: MEMBRAAN POTENSIAAL EN Na⁺,K⁺-ATPase AKTIWITEIT VAN 'N P-GLIKOPROTEÏN-POSITIEWE EN –NEGATIEWE KLEIN SEL LONGKANKER SELLYN SOWEL AS DIE UITWERKING VAN OUABAIN OP DIE AKSIE VAN P-GLIKOPROTEÏN

7.1. Doelwitte	82
7.2. Media en Reagense.....	83
7.2.1. 3-[4,5-Dimetieltiazool-2-iel]-2,5-difeniel-tetrazolium bromied (MTT)-oplossing.....	83
7.2.2. Fetale kalfserum gesuplementeerde RPMI 1640 medium.....	83
7.2.3. Fosfaat gebufferde sout-oplossing (FBS).....	83

7.2.4. Hitte-geïnaktiveerde fetale kalfserum	83
7.2.5. Kanker sellyne	84
7.2.6. K ⁺ -vrye Tris-buffer	84
7.2.7. 2 M NaOH-oplossing.....	84
7.2.8. Ouabain-oplossing	85
7.2.9. Telvloeastof.....	85
7.2.10. Tiazool oranje-oplossing.....	85
7.2.11. 2% Triton X-100/0.1 M NaOH liseer-oplossing	85
7.2.12. Vinblastien oplossing	86
7.2.13. [³ H]Vinblastien/koue (nie radio-aktief) vinblastien-mengsel.....	86
7.3. Metodes	86
7.3.1. Kweking, instandhouding en voorbereiding van H69/P en H69/LX4 selle vir die gebruik in eksperimente.....	86
7.3.1.1. Kweking en instandhouding van H69/P en H69/LX4 selle.....	86
7.3.1.2. Voorbereiding van H69/P en H69/LX4 selle vir gebruik in eksperimente	87
7.3.2. Direkte sitotoksiese aktiwiteit van vinblastien en ouabain sowel as die MDR omkerings-aktiwiteit van ouabain.....	87
7.3.2.1. Beginsels betrokke by die kolorimetriese, sitotoksiese MTT-bepaling.....	87
7.3.2.2. Prosedure wat tydens die kolorimetriese, sitotoksiese MTT-bepaling gevolg is	89
7.3.3. Uitdrukking van P-gp deur H69/P en H69/LX4 selle.....	90
7.3.3.1. Prosedure gevolg om die uitdrukking van P-gp op die oppervlakte van H69/P en H69/LX4 te bepaal.....	90
7.3.4. Intracellulêre akkumulering van radio-aktief gemerkte vinblastien sowel as die fluoresserende kleurstof, tiazool oranje, in H69/P en H69/LX4 selle	91

7.3.4.1. Beginsels betrokke by die P-gp-bemiddelde verlaging in die intrasellulêre akkumulering van [³ H]vinblastien sowel as tiazool oranje in veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende selle.....	91
7.3.4.2. Prosedure wat gevolg is tydens die bepaling van die intrasellulêre akkumulering van [³ H]vinblastien in H69/P en H69/LX4 selle sowel as die effek van ouabain daarop	91
7.3.5. Prosedure wat gevolg is tydens die vloeisitometriese bepaling van die intrasellulêre akkumulering van die fluoresserende kleurstof, tiazool oranje, in H69/P en H69/LX4 selle sowel as die effek van ouabain daarop	92
7.3.5.1. Voorbereiding van die vloeisitometer (Epics, Profile II, Coulter, Miami, Florida, VSA) vir tiazool oranje opname studies	92
7.3.5.2. Vloeisitometriese bepaling van die opname van tiazool oranje deur H69/P en H69/LX4 selle	93
7.3.6. Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase aktiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle	94
7.3.6.1. Beginsels betrokke by die opname van radio-aktiewe kalium	94
7.3.6.2. Prosedure wat gevolg is tydens die bepaling van Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase aktiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle sowel as die effek van ouabain daarop.....	94
7.3.7. Bepaling van die membraan potensiaal van H69/P en H69/LX4 selle .	95
7.3.7.1. Beginsels betrokke by die vloeisitometriese bepaling van die membraan potensiaal van selle	95
7.3.7.2. Vloeisitometriese bepaling van die membraan potensiaal van H69/P en H69/LX4 selle sowel as die effek van ouabain daarop .	96
7.3.7.2.1. Voorbereiding van die vloeisitometer	96
7.3.7.2.2. Prosedure wat tydens die vloeisitometriese bepaling van die membraan potensiale van H69/P sowel as H69/LX4 selle gevolg is	97
7.3.8. Statistiese bepalings	97

7.4. Resultate.....	97
7.4.1. Sensitiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle vir die anti-kanker geneesmiddels, vinblastien	97
7.4.2. Uitdrukking van P-gp deur H69/P en H69/LX4 selle.....	98
7.4.3. Na⁺,K⁺-ATPase aktiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle.....	99
7.4.4. Akkumulاسie van DiOC₆(3) deur H69/P en H69/LX4 selle	99
7.4.5. Invloed van ouabain op die opname van radio-aktiewe kalium deur H69/P en H69/LX4 selle.....	99
7.4.6. Invloed van ouabain op die membraan potensiaal van H69/P sowel as H69/LX4 selle.....	103
7.4.7. Die sensitiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle vir ouabain	103
7.4.8. Invloed van ouabain op die sensitiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle vir vinblastien.....	103
7.4.9. Invloed van ouabain op die intrasellulêre akkumulering van radio-aktief gemerkte vinblastien in H69/P sowel as H69/LX4 selle....	103
7.4.10. Invloed van ouabain op die intrasellulêre akkumulering van die fluoreserende kleurstof, tiazool oranje in H69/P sowel as H69/LX4 selle	109
7.4.11. Bespreking	109

HOOFSTUK 8: DIE DIREKTE SITOTOKSIESE AKTIWITEITE SOWEL AS MDR OMKERINGS-AKTIWITEITE VAN DIE ONDERSKEIE RIMINOFENASIEN VERBINDINGS

8.1. Doelwitte	112
8.2. Media en Reagense.....	112
8.2.1. Riminofenasien verbindings.....	112
8.3. Metodes	
8.3.1. Kweking, instandhouding en voorbereiding van H69/P en H69/LX4 selle vir die gebruik in eksperimente.....	113

8.3.2. Direkte sitotoksiese aktiwiteit sowel as die MDR omkerings- aktiwiteit van die riminofenasien verbindings	113
8.3.3. Die invloed van die riminofenasien verbindings op die intrasellulêre akkumulering van radio-aktief gemerkte vinblastien sowel as die fluoesserende kleurstof, tiazool oranje, in H69/P en H69/LX4 selle...	115
8.3.3.1. Prosedure wat gevolg is tydens die bepaling van die invloed van die riminofenasien verbindings op die intrasellulêre akkumulering van [³ H]vinblastien in H69/P en H69/LX4 selle	115
8.3.3.2. Prosedure wat gevolg is tydens die vloeisitometriese bepaling van die invloed van die riminofenasien verbindings op die intrasellulêre akkumulering van die fluoesserende kleurstof, tiazool oranje, in H69/P en H69/LX4 selle.....	116
8.3.4. Die invloed van die riminofenasien verbindings op die Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase aktiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle.....	116
8.3.4.1. Beginsels betrokke by die opname van radio-aktiewe kalium	116
8.3.4.2. Prosedure wat gevolg is tydens die bepaling van Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase aktiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle sowel as die effek van die riminofenasien verbindings daarop	117
8.3.5. Invloed van die riminofenasien verbindings op die membraan potensiale van H69/P en H69/LX4 selle	118
8.4. Resultate.....	119
8.4.1. Die direkte sitotoksiese aktiwiteite van die onderskeie riminofenasien verbindings vir H69/P en H69/LX4 selle	119
8.4.1.1. Geneesmiddel-sensitiewe H69/P sellyn	121
8.4.1.2. Veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende H69/LX4 sellyn....	121
8.4.2. Die MDR sensitiserings/omkerings-aktiwiteite van die onderskeie riminofenasien verbindings vir H69/LX4 selle.....	122
8.4.3. Invloed van die onderskeie riminofenasien verbindings op die intrasellulêre akkumulering van radio-aktief gemerkte vinblastien in H69/P en H69/LX4 selle	122

8.4.4. Invloed van die onderskeie riminofenasien verbindings op die intrasellulêre akkumulering van die fluoresserende kleurstof, tiazool oranje, in H69/P en H69/LX4 selle	123
8.4.5. Invloed van die onderskeie riminofenasien verbindings op die Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase aktiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle.....	126
8.4.6. Invloed van die riminofenasien verbindings op die membraan potensiale van H69/P en H69/LX4 selle	128
8.4.7. Bespreking	131

HOOFSTUK 9: DIE LIPOFILISITEIT, INTRASSELLULÊRE

AKKUMULERING SOWEL AS DIE INVLOED VAN DIE RIMINOFENASIEN VERBINDINGS OP DIE SELMEMBRANE VAN SKAAP ERITROSIEETE

9.1. Doelwitte	135
9.2. Media en Reagense.....	135
9.2.1. Fetale kalfserum gesupplementeerde RPMI 1640 medium.....	135
9.2.2. Kanker sellyne	135
9.2.3. Riminofenasien verbindings.....	136
9.2.4. Suur sitraat dekstrose (“Acid citrate dextrose”).....	136
9.3. Metodes	136
9.3.1. Bepaling van die lipofiliese karakter-eienskappe (partissie koëffisiënte) van die onderskeie riminofenasien verbindings.....	136
9.3.2. Bepaling van die mate waarteen die verskillende riminofenasien verbindings in die H69/P en H69/LX4 selle akkumuleer	138
9.3.3. Invloed van die onderskeie riminofenasien verbindings op die membraan stabiliteit van skaap eritrosiete	141
9.3.3.1. Beginsels betrokke by die bepaling van die invloed van die riminofenasien verbindings op die stabiliteit van skaap eritrosiete	141

9.3.3.2. Prosedure wat tydens die bepaling van die stabiliteit van skaap eritrosiet membrane in die teenwoordigheid van die riminofenasien verbindings, gevolg is	142
9.4. Resultate.....	143
9.4.1. Die partissie koeffisiënte van die onderskeie riminofenasien verbindings	143
9.4.2. Die mate waarteen die onderskeie riminofenasien verbindings na <i>in vitro</i> blootstelling onderskeidelik in H69/P sowel as H69/LX4 selle geakkumuleer het.....	143
9.4.3. Invloed van die onderskeie riminofenasien verbindings op die membraan stabiliteit van skaap eritrosiete	146
9.4.4. Bespreking	151

HOOFSTUK 10: *IN VIVO* ANTI-TUMOR AKTIWITEIT SOWEL AS VERSPREIDING VAN RIMINOFENASIEN VERBINDINGS IN VERSKEIE ORGANE VAN SPRAGUE-DAWLEY ROTTE

10.1. Inleiding	153
10.2. Doelwitte	153
10.3. Materiale en Reagense	154
10.3.1. Eksperimentele diere.....	154
10.3.2. Riminofenasien verbindings.....	154
10.4. Metodes	154
10.4.1. Supplementering van die Sprague-Dawley rotte se voedsel met die onderskeie riminofenasien verbindings	154
10.4.2. Induksie van veelvuldige mamma karsinome in Sprague-Dawley rotte	155
10.4.3. Behandeling van die tumor-geïnduseerde Sprague-Dawley rotte met die riminofenasien verbindings	155

10.4.4. Bepaling van rimi-nofenasien vlakke in verskeie weefsels sowel as die serum van Sprague-Dawley rotte	155
10.4.5. Statistiese bepalings	157
10.5. Resultate.....	157
10.5.1. Die effek van die verskillende rimi-nofenasien verbindings op <i>in vivo</i> tumor groei	157
10.5.2. Weefselvlakke van die onderskeie rimi-nofenasien verbindings in rimi-nofenasien-behandelde Sprague-Dawley rotte	159
10.5.3. Serumvlakke van die onderskeie rimi-nofenasien verbindings in rimi-nofenasien-behandelde Sprague-Dawley rotte.....	161
10.5.4. Bespreking	162
HOOFSTUK 11: SAMEVATTING BESPREKING	164
VERWYSINGS	168
ADDENDUM A: PEARSON KORRELASIES	
1. Doelwit	197
2. Inleiding	197
3. Resultate.....	199
3.1. Pearson korrelasies tussen die verskillende eksperimentele bepalings wat met die geneesmiddel-sensitiewe H69/P selle gedoen is.....	199
3.2. Pearson korrelasies tussen die verskillende eksperimentele bepalings wat met die veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende H69/LX4 selle gedoen is	205

3.3. Pearson korrelasies tussen verskeie eksperimentele bepalinge en die riminofenasien-geïnduseerde inhibisie van tumor groei, riminofenasien tumorvlakke sowel as die riminofenasien serumvlakke waargeneem tydens <i>in vivo</i> studies met eksperimentele rotte	210
4. Samevatting	211
4.1. <i>In vitro</i> studies met H69/P selle	211
4.2. <i>In vitro</i> studies met H69/LX4 selle	212
4.3. <i>In vivo</i> studies.....	214

OPSOMMING

Sleuteltermes: Veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid; P-glikoproteïen; Riminofenasien verbindings; Tetrametielpiperidien-gesubstitueerde fenasiene; Membraan potensiaal; Membraan destabilisering; Lipofilisiteit; Na^+ , K^+ -ATPase; Ouabain; Weefsel vlakke

Die eerste doelwit van hierdie studie was om die geneesmiddel-sensitiewe menslike klein sel longkanker sellyn (H69/P) met die veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende (MDR) H69/LX4 sublyn te vergelyk ten opsigte van die volgende membraan funksies se rol in MDR:

- (i) Uitdrukking van P-glikoproteïen (P-gp)
- (ii) Rustende membraan potensiaal
- (iii) Na^+ , K^+ -ATPase aktiwiteit. Die relatiewe sensitiwiteit van bogenoemde sellyne vir ouabain, 'n inhibeerder van Na^+ , K^+ -ATPase aktiwiteit, is ook ondersoek.

Die H69/LX4 sellyn het P-gp teen baie hoër vlakke as die oorspronklike H69/P sellyn uitgedruk. Hierdie toename in P-gp uitdrukking is met 'n effense verhoging in membraan potensiaal sowel as 'n toename in Na^+ , K^+ -ATPase aktiwiteit, geassosieer. Resultate verkry vanaf studies wat met ouabain gedoen is, het voorgestel dat die verandering in membraan potensiaal en Na^+ , K^+ -ATPase aktiwiteit nie 'n rol speel in die effektiewe funksionering van P-gp nie. Die toename in Na^+ , K^+ -ATPase aktiwiteit mag egter 'n kompenserings meganisme verteenwoordig, waartydens die selle probeer om veranderinge in die membraan potensiaal te neutraliseer.

Die tweede doelwit van hierdie studie was om die *in vitro* anti-tumor aktiwiteite van die prototipe riminofenasien, klofasimien (B663), en drie nuwe derivate van hierdie verbinding in bogenoemde sellyne, te ondersoek. Klofasimien het 'n isopropielimino groep op posisie 2 van die fenasiën kern en is ingesluit as verwysings molekule, aangesien die biologiese aktiwiteite van hierdie prototipe riminofenasien reeds goed bestudeer is. Die drie derivate het 'n tetrametielpiperidien (TMP) substituent op posisie 2 van die fenasiën kern en verskil van mekaar ten opsigte van die aantal en posisie van die chloride atome op die feniel groepe, wat op posisies 3 en 10 van die fenasiën kern voorkom. B3962 is ongechlorineerd, terwyl beide B4100 en B4121 twee chloried atome op elk van die feniel ringe besit. Die posisie van

hierdie twee chloride atome verskil egter tussen die twee verbindings. Die toets verbindings is ten op sigte van hul invloed op die proliferasie van bogenoemde sellyne sowel as die werking van P-gp, Na⁺,K⁺-ATPase aktiwiteit en membraan potensiaal, ondersoek. Die membraan destabiliserings aktiwiteite van die verbindings is ook ondersoek, deur van 'n konvensionele hemolitiese sisteem gebruik te maak.

Al vier die eksperimentele verbindings het die membraan potensiaal van beide sellyne verlaag, waarskynlik deur die Na⁺,K⁺-ATPase aktiwiteit te inhibeer. Al vier bestudeerde verbindings het ook membraan destabiliserings aktiwiteit besit, wat met die sitotoksiese en MDR omkerings aktiwiteite van die verbindings geassosieer is. Die teenwoordigheid van 'n TMP groep sowel as chloride atome op die feniel groepe, het bygedra tot anti-tumor aktiwiteit, deur by te dra tot die membraan destabiliserings aktiwiteit van die verbindings.

In 'n beperkte reeks eksperimente is die serumvlakke en weefsel verspreiding van die eksperimentele verbindings ondersoek. Al vier verbindings het hoofsaaklik in die lewer, long en milt geakkumuleer. B3962 het veral teen hoë vlakke in die lewer geakkumuleer.

Die nuwe gedichlorineerde TMP-fenasiene (B4100 en B4121) besit MDR omkering aktiwiteite wat superior is tot die van die prototipe riminofenasien, B663. Hierdie verbetering in MDR omkerings aktiwiteit is waarskynlik te danke aan die membraan destabiliserings aktiwiteit van die TMP groep.

SUMMARY

Key words: Multiple drug resistance; P-glycoprotein; Riminophenazines; Tetramethylpiperidine-substituted phenazines; Membrane potential; Membrane destabilizing; Lipophilicity; Na⁺,K⁺-ATPase; Ouabain; Tissue levels

The first objective of this study was to compare the drug-sensitive human small cell lung cancer parent cell line (H69/P) with the multiply drug resistant (MDR) H69/LX4 cell line with respect to the following membrane functions as possible determinants of MDR:

- (i) Levels of P-glycoprotein (P-gp) expression
- (ii) Resting membrane potential
- (iii) Na⁺,K⁺-ATPase activity. The relative sensitivity of these cell lines to ouabain, a potent inhibitor of Na⁺,K⁺-ATPase activity, was also compared.

The H69/LX4 cell line was found to express a higher level of P-gp than the H69/P parent cell line. This increase in P-gp expression was associated with a slight decrease in membrane potential and an increase in Na⁺,K⁺-ATPase activity. Results obtained from studies with ouabain suggested that the altered membrane potential and Na⁺,K⁺-ATPase activity are unrelated to the effective functioning of P-gp. However, the increase in Na⁺,K⁺-ATPase activity may simply represent a compensation mechanism by which the cells neutralize changes in the membrane potential.

The second objective of this study was to compare the *in vitro* anti-tumour efficiency of the prototype riminophenazine, clofazimine (B663), and three novel derivatives of this agent against above mentioned cell lines. Clofazimine has an isopropylimino group on position 2 of the phenazine nucleus and was included as reference molecule, as the biological activities of this prototype riminophenazine are well established. The three derivatives have a tetramethylpiperidine (TMP) substituent on position 2 of the phenazine nucleus and differ from one another with respect to the number and position of chlorine atoms present on the phenyl groups at position 3 and 10 of the phenazine nucleus. B3962 is unchlorinated, while B4100 and B4121 each have two chlorine atoms present on each of the phenyl rings. The position of these chlorine atoms differs between these two agents. These test agents were

compared primarily with respect to their effects on the proliferation of the above mentioned cell lines as well as P-gp function, Na⁺,K⁺-ATPase activity and membrane potential. The membrane destabilizing activities of these agents were also investigated using a conventional haemolytic system.

All four test riminophenazines decreased the membrane potential of both cell lines, apparently by inhibiting the Na⁺,K⁺-ATPase activity. All four reagents possessed membrane destabilizing activity which was associated with their cytotoxic and MDR reversal activities. The presence of a TMP group as well chlorine atoms on the phenyl groups at position 3 and 10 of the phenazine nucleus of these agents contributed to the enhancement of anti-tumour activity, by potentiating the membrane destabilizing activity of these compounds.

In a limited series of experiments serum levels and tissue distribution of the test agents were investigated. All four test agents accumulated mainly in the liver, lung and spleen with particularly high levels of B3962 in the liver.

In conclusion, the novel dichlorinated TMP-phenazines (B4100 and B4121) possess MDR reversal properties superior to those of the prototype riminophenazine, B663. This improvement in MDR reversal activity is probably due to the membrane destabilizing properties of the TMP group.

Lys van afkortings

ψ	membraan potensiaal
μCi	mikrocurie
μg	mikrogram
μl	mikroliter
$[\text{C}]_i$	intraselulêre konsentrasie
$[\text{C}]_o$	ekstraselulêre konsentrasie
$^{\circ}\text{C}$	grade Celsius
ABC	adenosientrifosfaat (ATP)-bindingskasset
ACD	suur sitraat dekstrose
ADP	adenosiendifosfaat
ALL	akute limfoblastiese leukemie
ALLN	D,N-asetiel-leusiel-norleusinal
AML	akute meïeloïede leukemie
AMP	adenosienmonofosfaat
ANLL	akute nonlimfoblastiese leukemie
ATP	adenosientrifosfaat
ATPase	adenosientrifosfatase
BCECF	bis(karboksi-etiel)karboksiefluoressien

BSA	beesserum albumien
Ca²⁺	kalsium ioon
CA-DPH	1,6-fenielheksa-1,3,5-trien karboksielsuur
cDNA	komplementêre deoksiribonukleïensuur
CFTR	sistiese fibrose geen
CHO	chinese hamster ovarium
Ci	curie
Cl⁻	chloried ioon
cm²	kubieke sentimeter
CML	chroniese miëloïede leukemie
CO₂	koolsuurgas
CTP	sistidientrifosfaat
DiOC₆(3)	3,3'-diheksieloksakarbosianien
DMA-DPH	1-[4-(dimetielamino)feniel]-6-fenielheksa-1,3,5-trien
DMBA	dimetielbensatreen
DMSO	dimetiel sulfoksied
DNA	deoksiribonukleïensuur
DPH	difeniel heksatrien
F	Faraday konstante
FBS	fosfaat gebufferde sout-oplossing
FITC	fluorosien isotiosianaat

FKS	fetale kalfserum
g	gram of gravitasiekrag
GTP	guanosientrifosfaat
H⁺	waterstof ioon
H-BSS	HANKS gebalanseerde sout-oplossing
IK₅₀	inhiberende konsentrasie wat tot 50% seldoding lei
INA	iodonaftaleen-1-azied
ITP	inosientrifosfaat
K⁺	kalium ioon
kDa	kilodalton
LPC	lisofosfatidielholien
LRP	long weerstandbiedende proteïen
M	molaar
mCi	millicurie
MDR	veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid (“multidrug resistance”)
mg	milligram
min	minuut

ml	milliliter
mm	millimeter
mM	millimolaar
mmol	millimol
mRNA	boodskapper ribonukleïensuur
MRP	veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende proteïen
MTT	3-[4,5-dimetieltiazool-2-iel]-2,5-difeniel-tetrazolium bromied
mV	millivolt
Na⁺	natrium ioon
NAD⁺	nikotienamied adenien dinukleotied
NADH	dihidronikotienamied adenien dinukleotied
NADP⁺	nikotienamied adenien dinukleotiedfosfaat
NADPH	dihidronikotienamied adenien dinukleotiedfosfaat
ng	nanogram
nm	nanometer
nM	nanomolaar
OD₄₅₈	optimale digtheid by 458 nanometer
pg	pikogram
P-gp	P-glikoproteïen
P_i	anorganiese fosfaat

PKC	proteïen kinase C
PMNL	polimorfonuklêre leukosiete
r	korrelasie koeffisiënt
R	gas konstante
r^2	koeffisiënt van bepaling
Rb ⁺	rubidium
rpm	rondtes per minuut
T	temperatuur in grade Kelvin
TMA-DPH	1-[4-(trimetielamino)feniel]-6-fenielheksa-1,3,5-trien
TMAP-DPH	N- <i>p</i> -{6-feniel-[1,3,5-heksatrieniel(feniel-propiel)}}trimetielamonium
TMP	tetrametielpiperidien
UTP	uridientrifosfaat