



**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 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -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 <sup>+</sup> -vrye Tris-buffer .....	84
7.2.7. 2 M NaOH-oplossing.....	84
7.2.8. Ouabain-oplossing .....	85
7.2.9. Telvloeistof.....	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. [ <sup>3</sup> 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 [ <sup>3</sup> 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 [ <sup>3</sup> 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 <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -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 <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -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

<b>7.4. Resultate.....</b>	<b>97</b>
<b>7.4.1. Sensitiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle vir die anti-kanker           geneesmiddels, vinblastien .....</b>	<b>97</b>
<b>7.4.2. Uitdrukking van P-gp deur H69/P en H69/LX4 selle.....</b>	<b>98</b>
<b>7.4.3. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase aktiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle.....</b>	<b>99</b>
<b>7.4.4. Akkumulاسie van DiOC<sub>6</sub>(3) deur H69/P en H69/LX4 selle .....</b>	<b>99</b>
<b>7.4.5. Invloed van ouabain op die opname van radio-aktiewe kalium deur           H69/P en H69/LX4 selle.....</b>	<b>99</b>
<b>7.4.6. Invloed van ouabain op die membraan potensiaal van H69/P sowel           as H69/LX4 selle.....</b>	<b>103</b>
<b>7.4.7. Die sensitiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle vir ouabain .....</b>	<b>103</b>
<b>7.4.8. Invloed van ouabain op die sensitiwiteit van H69/P en H69/LX4           selle vir vinblastien.....</b>	<b>103</b>
<b>7.4.9. Invloed van ouabain op die intrasellulêre akkumulering van           radio-aktief gemerkte vinblastien in H69/P sowel as H69/LX4 selle....</b>	<b>103</b>
<b>7.4.10. Invloed van ouabain op die intrasellulêre akkumulering van die           fluoreserende kleurstof, tiazool oranje in H69/P sowel as H69/LX4           selle .....</b>	<b>109</b>
<b>7.4.11. Bespreking .....</b>	<b>109</b>

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

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



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 [ <sup>3</sup> 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 <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -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 <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -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 <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -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 riminofenasien 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 riminofenasien verbindings op <i>in vivo</i> tumor groei .....	157
10.5.2. Weefselvlakke van die onderskeie riminofenasien verbindings in riminofenasien-behandelde Sprague-Dawley rotte .....	159
10.5.3. Serumvlakke van die onderskeie riminofenasien verbindings in riminofenasien-behandelde Sprague-Dawley rotte.....	161
10.5.4. Bespreking .....	162
<b>HOOFSTUK 11: SAMEVATTING BESPREKING .....</b>	<b>164</b>
<b>VERWYSINGS .....</b>	<b>168</b>
<b>ADDENDUM A: PEARSON KORRELASIES</b>	
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 rimi-nofenasien-geïnduseerde inhibisie van tumor groei, rimi-nofenasien tumorvlakke sowel as die rimi-nofenasien 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

**Sleutel terme:** Veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid; P-glikoproteïen; Riminofenasien verbindings; Tetrametielpiperidien-gesubstitueerde fenasiene; Membraan potensiaal; Membraan destabilisering; Lipofilisiteit;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -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)  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit. Die relatiewe sensitiwiteit van bogenoemde sellyne vir ouabain, 'n inhibeerder van  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -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  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit, geassosieer. Resultate verkry vanaf studies wat met ouabain gedoen is, het voorgestel dat die verandering in membraan potensiaal en  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit nie 'n rol speel in die effektiewe funksionering van P-gp nie. Die toename in  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -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<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. The relative sensitivity of these cell lines to ouabain, a potent inhibitor of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. Results obtained from studies with ouabain suggested that the altered membrane potential and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity are unrelated to the effective functioning of P-gp. However, the increase in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-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,  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -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  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -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

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



<b>BSA</b>	<b>beesserum albumien</b>
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<b>kalsium ioon</b>
<b>CA-DPH</b>	<b>1,6-fenielheksa-1,3,5-trien karboksielsuur</b>
<b>cDNA</b>	<b>komplementêre deoksiribonukleïensuur</b>
<b>CFTR</b>	<b>sistiese fibrose geen</b>
<b>CHO</b>	<b>chinese hamster ovarium</b>
<b>Ci</b>	<b>curie</b>
<b>Cl<sup>-</sup></b>	<b>chloried ioon</b>
<b>cm<sup>2</sup></b>	<b>kubieke sentimeter</b>
<b>CML</b>	<b>chroniese miëloïede leukemie</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>koolsuurgas</b>
<b>CTP</b>	<b>sistidientrifosfaat</b>
<b>DiOC<sub>6</sub>(3)</b>	<b>3,3'-diheksieloksakarbosianien</b>
<b>DMA-DPH</b>	<b>1-[4-(dimetielamino)feniel]-6-fenielheksa-1,3,5-trien</b>
<b>DMBA</b>	<b>dimetielbensatreen</b>
<b>DMSO</b>	<b>dimetiel sulfoksied</b>
<b>DNA</b>	<b>deoksiribonukleïensuur</b>
<b>DPH</b>	<b>difeniel heksatrien</b>
<b>F</b>	<b>Faraday konstante</b>
<b>FBS</b>	<b>fosfaat gebufferde sout-oplossing</b>
<b>FITC</b>	<b>fluorosien isotiosianaat</b>

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

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

PKC	proteïen kinase C
PMNL	polimorfonuklêre leukosiete
r	korrelasie koëffisiënt
R	gas konstante
r <sup>2</sup>	koëffisiënt van bepaling
Rb <sup>+</sup>	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

## HOOFSTUK 1

### GENEESMIDDEL WEERSTANDBIEDENDHEID

#### 1.1. Inleiding

Die ontwikkeling van weerstandbiedendheid teen geneesmiddels is een van die grootste oorsake waarom die behandeling van baie siektes soms nog deesdae misluk. Na ongeveer 'n eeu van moderne geneesmiddels, is siektes wat deur mikro-organismes en parasiete veroorsaak word nog nie heeltemal uitgeroei nie. Die vernaamste rede hiervoor is dat alle vorme van lewe die vermoë besit om by veranderde (soms baie ongunstige) omstandighede aan te pas om te oorleef. Weerstandbiedende stamme kom voortdurend te voorskyn. Dit vereis 'n voortdurende soektog na nuwe, meer effektiewe chemoterapeutiese geneesmiddels en antibiotikums. Geneesmiddel weerstandbiedendheid speel ook 'n baie belangrike en beperkende rol in die doeltreffende chemoterapeutiese behandeling van kanker. Kanker selle pas, net soos ander lewende organismes, ook by veranderde omstandighede aan, om te oorleef [Kellen, 1994].

Daar word jaarliks ongeveer 1 miljoen nuwe kanker gevalle wêreldwyd gediagnoseer. In ongeveer die helfte van hierdie gevalle is die tumore nog tot die gebied van oorsprong beperk en kan dit met behulp van chirurgie en bestraling genees word. Daarenteen is die enigste hoop op genesing van pasiente met kankers, soos leukemieë en limfome, chemoterapeutiese behandelings. Chemoterapeutiese geneesmiddels word ook in die behandeling van tumore wat deur metastase versprei het, gebruik [Gottesman & Pastan, 1993]. Kankers wat suksesvol met chemoterapeutiese geneesmiddels behandel kan word, sluit onder andere akute limfoblastiese leukemieë by kinders, Hodgkin se siekte, Burkitt se limfoom, Ewing se sarkoom ('n tipe beenkanker), Wilm se tumor ('n nier-kanker by kinders), rhabdomiosarkoom ('n kanker van die spierweefsel), choriokarsinoom ('n kankeragtige plasentale trofoblast), testikulêre kanker, sekere ovarium kankers en osteogeniese sarkoom in [Pratt *et al*, 1994a]. Ongelukkig veroorsaak die huidige beskikbare chemoterapeutiese behandelings slegs lang-termyn oorlewing in 'n klein gedeelte (5% - 10%) van die gevalle. In die meeste gevalle is hierdie kankers reeds metastaties tydens diagnose en/of toon dit kliniese



weerstandbiedendheid teen chemoterapeutiese geneesmiddels [**Gottesman & Pastan, 1993**].

Kliniese, sellulêre geneesmiddel weerstandbiedendheid word gedefinieer as die toestand waar 'n populasie kanker selle onsensitief is of verlaagde sensitiwiteit teen anti-kanker geneesmiddels, by 'n konsentrasies wat normaalweg seldoding sou veroorsaak, toon. Sellulêre weerstandbiedendheid in kanker kan in twee hoof groepe verdeel word, naamlik intrinsieke (primêre) geneesmiddel weerstandbiedendheid en verworwe (geïnduseerde) geneesmiddel weerstandbiedendheid [**Kellen, 1994**].

## 1.2. Intrinsieke vs verworwe weerstandbiedendheid

### 1.2.1. Intrinsieke weerstandbiedendheid

'n Populasie kanker selle is intrinsiek weerstandbiedend indien dit nie op inisiële chemoterapie met 'n anti-kanker geneesmiddel of 'n kombinasie van anti-kanker geneesmiddels reageer nie [**Pratt et al, 1994b**]. Kankers wat gewoonlik met intrinsieke weerstandbiedendheid geassosieer word sluit soliede tumore, soos nie-klein-sel long kanker, kolorektale kanker en ander kankers met hul oorsprong in die gastro-intestinale- en urinêre kanaal, kanker van die lewer, melanome sowel as tumore van die brein en sentrale senuwee stelsel, soos glioblastoom, in [**Lum et al, 1993**]. Alhoewel intrinsiek weerstandbiedende tumore nie van 'n spesifieke karakteristieke sellulêre oorsprong afkomstig is nie, ontstaan hierdie kankers in baie gevalle vanuit selle wat die vervoer-kanale, bloedare en uitskeidingsorgane uitvoer [**Fojo et al, 1987**]. Die normale fisiologiese funksie van hierdie selle is die vervoer, detoksifisering en uitskeiding van 'n verskeidenheid toksiese verbindings waaraan die liggaam blootgestel word. Die kanker selle behou waarskynlik hierdie normale fisiologiese funksie en lei gevolglik tot die detoksifikasie, uitskeiding en eliminering van die chemoterapeutiese geneesmiddels vanuit die selle [**Young, 1989**].

### 1.2.2. Verworwe weerstandbiedendheid

Sekere kanker-selle reageer aanvanklik goed op behandeling met anti-kanker

geneesmiddels, maar ontwikkel tydens verloop van die chemoterapeutiese behandeling weerstandbiedendheid teen die geneesmiddels waarteen dit aanvanklik sensitief was. Hierdie weerstandbiedendheid staan as verworwe geneesmiddel weerstandbiedendheid bekend [Pratt *et al*, 1994b]. Verworwe geneesmiddel weerstandbiedendheid kan in twee subklasse verdeel word. Eerstens kan die selle spesifieke weerstandbiedendheid teen slegs een klas van geneesmiddels, soos metotreksaat, ontwikkel [Nunberg *et al*, 1978]. Tweedens is verworwe geneesmiddel weerstandbiedendheid wat by sommige selle voorkom nie tot een spesifieke klas van geneesmiddels beperk nie, maar is die selle teen 'n groot verskeidenheid onverwante geneesmiddels kruis-weerstandbiedend. Hierdie tipe weerstandbiedendheid staan as veelvuldige geneesmiddel of pleiotropiese geneesmiddel weerstandbiedendheid bekend [Ling & Thompson, 1974; Fojo *et al*, 1985].

Kanker tipes wat gewoonlik met verworwe geneesmiddel weerstandbiedendheid geassosieer word, sluit sekere akute leukemieë, groot sel limfome, Hodgkin se siekte, testikulêre kanker, klein-sel long kanker, ovarium karsinoom en metastatiese bors kanker in. Tydens metastatiese bors kanker toon die pasiente aanvanklik 'n dramatiese respons op die chemoterapeutiese behandeling, maar weerstandbiedendheid ontwikkel onder die oorblywende (residuele) kankerselle en het tot gevolg dat baie min pasiente genees word [Lum *et al*, 1993].

### 1.3. Veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid (“multidrug resistance”; MDR)

Verskeie navorsers het gevind dat indien sommige weefselkultuur-selle *in vitro* vir weerstandbiedendheid teen 'n enkele geneesmiddel geselekteer word, die selle terselfdertyd kruis-weerstandbiedendheid teen verskeie ander lipofiliese, natuurlike produk geneesmiddels toon [Kessel *et al*, 1968; Biedler *et al*, 1975; Gottesman & Pastan, 1993; Lum *et al*, 1993; Sikic *et al*, 1997; Pallares-Trujillo *et al*, 2000] (Tabel 1.1).

**Tabel 1.1: Chemoterapeutiese Geneesmiddels wat met MDR geassosieer word.**

Geneesmiddels wat met MDR geassosieer word	
<b>Antrasikliene</b>	<b>DNA Interkaleerders</b>
Daunorubisien	Etidium Bromied
Doksoorubisien	
Epirubisien	<b>Toksiese Peptiede</b>
Idarubisien	Valinomisien
	Gramisidien
<b>Epipodofillotoksiene</b>	D,N-asetiel-leusiel-norleusinal (ALLN)
Etoposied	
Teniposied	<b>Proteïen sintese inhibeerders</b>
	Puromisien
<b>Vinka Alkaloïede</b>	
Vinblatien	<b>Taksane</b>
Vinkristien	Paklitaksel
Vinorelbien	Dokseltaksel
<b>Antibiotikums</b>	<b>Ander</b>
Aktinomisien D	Daktinomisien
	Plikamisien (mithramisien)
<b>Anti-mikrotubulêre geneesmiddels</b>	Amsakrien
Colchisien	Taksol
Podofillotoksiene	Mitomisien C
	Trimetreksaan
	Topotekan
	Mitramisien



Hierdie tipe weerstandbiedendheid staan as veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid (“multidrug resistance”; MDR) bekend [Endicott & Ling, 1989; Gottesman & Pastan, 1993]. Die anti-kanker geneesmiddels waarteen die MDR selle kruis-weerstandbiedendheid toon, verskil in ‘n groot mate ten opsigte van hul chemiese strukture sowel as hul meganismes van werking van mekaar [Lum *et al*, 1993]. Die enigste strukturele kenmerke wat hierdie geneesmiddels met mekaar deel, is dat hulle almal amfipatie, lipofiliese verbindings is wat in die meeste gevalle ‘n hidrofobiese aromatiese ring en ‘n positiewe lading by ‘n neutrale pH besit [Lum *et al*, 1993; Borst, 1984].

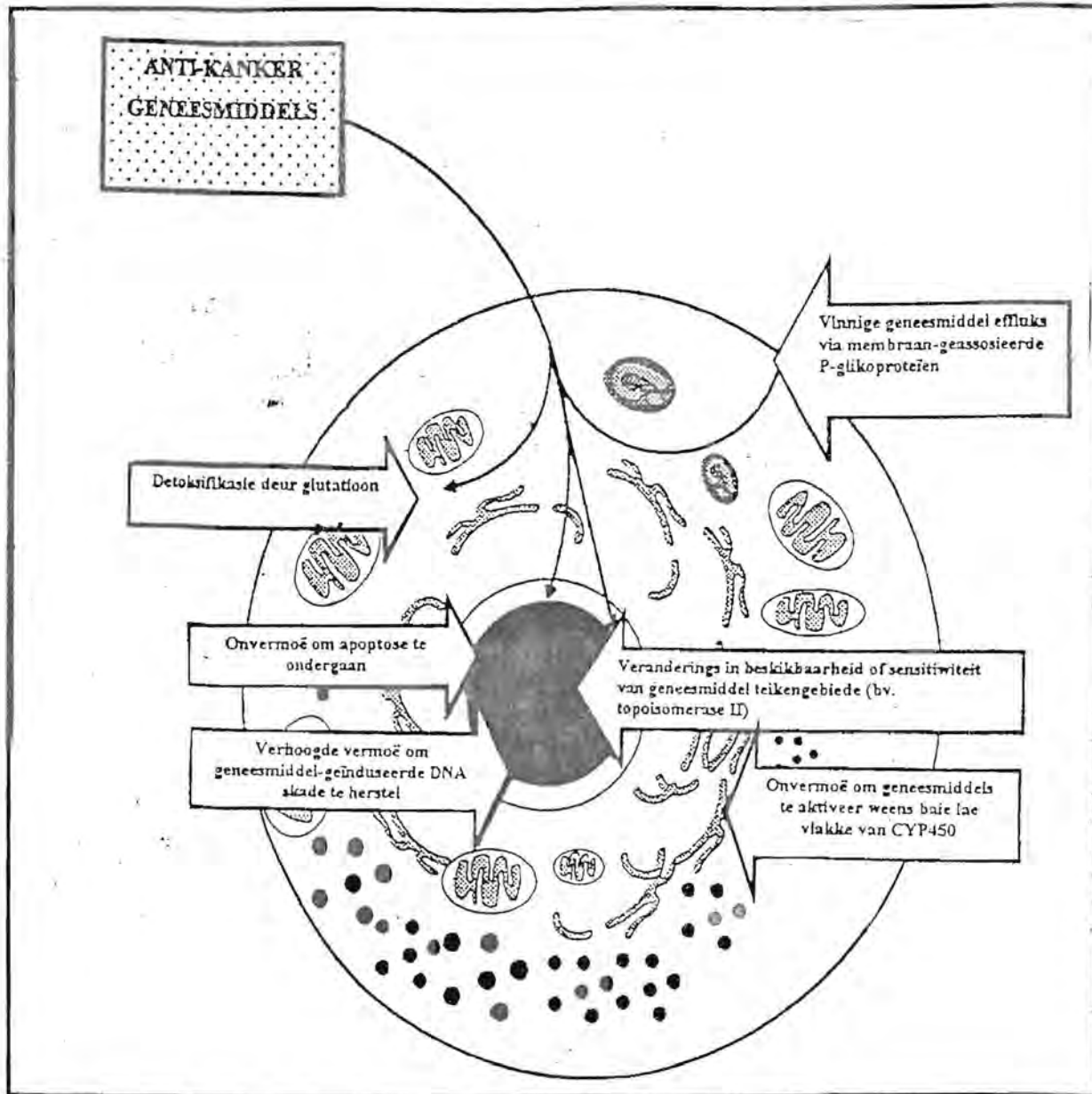
#### 1.4. Meganismes betrokke by geneesmiddel weerstandbiedendheid

Daar is verskeie meganismes by die ontwikkeling van geneesmiddel weerstandbiedendheid in kanker selle betrokke. Dit is nodig om hierdie meganismes te verstaan sodat dit voorkom kan word sowel as meer effektiewe anti-kanker geneesmiddels ontwikkel kan word. Meer effektiewe anti-kanker geneesmiddels kan tot ‘n verbetering in die prognose van baie kankers lei. Die meganismes wat by geneesmiddel weerstandbiedendheid in kanker betrokke is, vind hoofsaaklik op sellulêre vlak plaas. Die spesifieke meganismes wat by elke kanker tipe betrokke is, hang van verskeie veranderlikes, soos die immuun respons van die gasheer, die tumor tipe en die geneesmiddels wat gebruik word, af [Kellen, 1994].

Die groot verskeidenheid sellulêre meganismes wat tot geneesmiddel weerstandbiedendheid kan lei, word in Figuur 1.1 opgesom [Harrison, 1995; Stavrovskaya, 2000]. Die verskillende meganismes word vervolgens kortliks bespreek.

##### 1.4.1. Veranderinge in die geneesmiddel teiken

Die teikengebied van ‘n spesifieke anti-kanker geneesmiddel mag tydens die differensiasie en verdeling van kanker selle veranderinge ondergaan. Voorbeelde van geneesmiddel weerstandbiedendheid wat deur hierdie meganisme van werking veroorsaak word, sluit geneesmiddel weerstandbiedendheid teen metotreksaat as gevolg die oormatige produksie van die dihidrofolaat reductase



Figuur 1.1: 'n Skematiese voorstelling van die molekulêre meganismes van geneesmiddel weerstandbiedendheid in 'n kankersel.



ensiem in die kanker selle, asook die geneesmiddel weerstandbiedendheid teen 5-fluorourasiel as gevolg van die oormatige uitdrukking van die produksie van timidilaat ensiem in kanker selle, in [Berger *et al*, 1985; Pratt *et al*, 1994b]. Die oormatige uitdrukking van hierdie ensieme stel die kanker selle in staat om in die teenwoordigheid van anti-kanker geneesmiddels te oorleef.

#### 1.4.2. Mislukking van pro-geneesmiddel aktivering

'n Tweede meganisme van werking wat vir die ontwikkeling van geneesmiddel weerstandbiedendheid verantwoordelik kan wees, is die onvermoë van die tumor sel om pro-geneesmiddels, soos siklofosfamied, te aktiveer. Metaboliese aktiveringsreaksies wat vir die aktivering van pro-geneesmiddels verantwoordelik is, is grootliks van die werking van lede van die sitochroom P450 geen superfamilie afhanklik [Nebert *et al*, 1991]. Die pro-geneesmiddel, siklofosfamied, word byvoorbeeld hoofsaaklik deur die sitochroom P450 ensiem, CYP2B6, metabolies geaktiveer. 'n Verlaging in die CYP2B6 vlakke lei gevolglik tot die ondoeltreffende bio-aktivering van geneesmiddels, soos siklofosfamied. Die maksimale biologiese aktiwiteit van die geneesmiddel word dus nooit bereik nie [Harrison, 1995].

#### 1.4.3. Verhoogde detoksifikasie

'n Derde meganisme van werking wat by geneesmiddel weerstandbiedendheid betrokke mag wees, behels verhoogde detoksifikasie van chemoterapeutiese geneesmiddels vanuit die teikenselle. Die oormatige teenwoordigheid van glutatioon S-transferase-, glutatioon- sowel as glukuronsuur vlakke kan byvoorbeeld geneesmiddel weerstandbiedendheid tot gevolg hê, aangesien hierdie ensieme en verbindings die detoksifikasie en uitskeiding van geneesmiddels vanuit die kanker selle versnel [Morrow & Cowan, 1990; Harrison, 1995; Stavrovskaya, 2000].

#### 1.4.4. Verandering in DNA herstel

Sommige anti-kanker geneesmiddels, soos stikstof mostert en nitroso-urease, vorm kovalente bindings met DNA [Pratt *et al*, 1994b]. Hierdie kovalente bindings kan

deur DNA herstel sisteme, soos die uitsnyding van die DNA/geneesmiddel komplekse, uit die DNA van die soogdier selle verwyder word [Ewig & Kohn, 1977]. Indien hierdie DNA herstel sisteme nie doeltreffend funksioneer nie, kan dit tot geneesmiddel weerstandbiedendheid aanleiding gee.

Die vermoë van die sel om DNA wanparing te herstel, speel ook 'n belangrike rol in die instandhouding van die genomiese stabiliteit van die sel. DNA wanparings-herstel sisteme in 'n sel dien as 'n aanduiding van die teenwoordigheid van DNA skade in 'n sel. Indien die DNA wanparings-herstel sisteme in 'n sel nie doeltreffend funksioneer nie, is dit nie in staat om onder andere geneesmiddel-geïnduseerde DNA skade te herken nie. Die sel is gevolglik nie in staat om apoptose te induseer nie. Laasgenoemde kan tot geneesmiddel weerstandbiedendheid lei [Fink *et al*, 1998].

#### 1.4.5. Onvermoë om apoptose te induseer

'n Ander moontlike meganisme wat vir die ontwikkeling van geneesmiddel weerstandbiedendheid in kanker selle verantwoordelik mag wees, is die onvermoë van die kanker selle om apoptose te induseer [Stavrovskaya, 2000]. Die teenwoordigheid of afwesigheid van sekere onkogene in kanker selle kan 'n belangrike rol in die induksie van apoptose in die selle speel. So byvoorbeeld verhoed die oormatige uitdrukking van die *bcl2* onkogene in kanker selle, dat die selle apoptose ondergaan, selfs nadat geneesmiddel-geïnduseerde skade aan die selle aangerig is [Harrison, 1995; Reed, 1995; Piché *et al*, 1998]. Die oormatige produksie van die *bcl2* gekodeerde proteïen lei dus tot geneesmiddel weerstandbiedendheid. In teenstelling met *bcl2*, induseer die onkogene, p53, apoptose in selle [Clarke *et al*, 1993]. Die afwesigheid van p53 in muis timosiete het byvoorbeeld tot sellulêre weerstandbiedendheid teen die topoisomerase II inhibeerder, etoposied, in hierdie selle gelei. Baie menslike tumore het die funksie van p53 deur middel van mutasies of delesies verloor. Iwadata *et al* (1998) het getoon dat mutasies van die p53 geen in menslike astrosietiese tumore tot weerstandbiedendheid teen anti-kanker geneesmiddels wat DNA skade veroorsaak, aanleiding gee. Hierdie geen speel daarom moontlik 'n baie belangrike rol in kliniese



geneesmiddel weerstandbiedendheid [Harrison, 1995; Iwadata *et al*, 1998].

#### 1.4.6. Uitsluiting of sekwestrasie van geneesmiddels

Een van die vernaamste meganismes van werking wat vir die ontwikkeling van MDR verantwoordelik is, is die aktiewe uitsluiting of sekwestrasie van chemoterapeutiese geneesmiddels uit die tumor selle. Die oormatige uitdrukking van 'n 170 kDa proteïen, die P-glikoproteïen (P-gp) is in die meeste gevalle vir die aktiewe uitsluiting van chemoterapeutiese geneesmiddels vanuit die selle verantwoordelik. P-gp staan ook as 'n energie-afhanklike "geneesmiddel uitwaartse vloei pomp" bekend [Harrison, 1995; Bolhuis *et al*, 1997; Sharom *et al*, 1999]. Die rol van P-gp in MDR sal in die Hoofstuk 2 meer volledig bespreek word.

Sommige weefselkultuur sellyne toon wel kruis-weerstandbiedendheid teen 'n verskeidenheid anti-kanker geneesmiddels, maar druk nie P-gp oormatig op hul sel-oppervlaktes uit nie [Kellen, 1994]. Ander proteïene wat met hierdie tipe weerstandbiedendheid geassosieer word, sluit onder andere die veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende proteïen (MRP) en die long weerstandbiedende proteïen (LRP) in [Marsh *et al*, 1986; Scheper *et al*, 1996; Bolhuis *et al*, 1997; Twentyman, 1997; Den Boer *et al*, 1998; Hipfner *et al*, 1999; Scagliotti *et al*, 1999].

## HOOFSTUK 2

### P-GLIKOPROTEÏEN EN MDR

#### 2.1. Ontdekking van P-glikoproteïen

Veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid (MDR) is in die laat 1960's vir die eerste keer waargeneem [Kessel *et al*, 1968; Ling & Thompson, 1974; Biedler *et al*, 1975]. Kessel *et al* het in 1968 getoon dat indien 'n P388 leukemie sellyn *in vitro* vir weerstandbiedendheid teen vinblastien geselekteer word, hierdie selle kruisweerstandbiedendheid teen verskeie ander anti-kanker geneesmiddels, soos daktinomisien, vinkristien en daunorubisien, toon. Biedler *et al* (1975) het hierdie waarneming bevestig deur aan te toon dat die inisiële seleksie van Chinese hamster ovarium (CHO) selle vir weerstandbiedendheid teen daktinomisien, tot kruisweerstandbiedend teen verskeie ander lipofiliese natuurlike produk geneesmiddels, soos mithramisien, mitomisien C, daunorubisien en die vinka alkaloiëde, gelei het.

'n Verlaging in die intrasellulêre akkumulering van anti-kanker geneesmiddels is in die meeste MDR selle wat die 170 kDa membraan glikoproteïen, P-gp, oormatig op hul seloppervlaktes uitdruk, waargeneem. Die afname in geneesmiddel akkumulering in die MDR selle, is aan die teenwoordigheid en werking van hierdie P-gp toegeskryf [Ling & Thompson, 1974; Juliano & Ling, 1976]. P-gp tree as 'n energie-afhanklike uitwaartse vloeipomp op wat verbindingsaktief uit die MDR selle pomp [Dano, 1973; Skovsgaard, 1978a; Skovsgaard, 1978b]. Hierdie P-gp-bemiddelde verlaging in geneesmiddel akkumulering het tot gevolg dat die anti-kanker geneesmiddels minder sitotoksies vir die selle is.

Die mate van P-gp uitdrukking in die selmembraan korreleer met die graad van geneesmiddel weerstandbiedendheid [Juliano & Ling, 1976]. Hierdie direkte verband tussen die mate van P-gp uitdrukking in MDR selle en die graad van MDR in die selle, is in 'n reeks sub-populasies van 'n MDR menslike limfoïede sellyn (CEM/VLB<sub>100</sub>), getoon. Die CEM/VLB<sub>100</sub> sellyn is vanuit die oorspronklike geneesmiddel-sensitiewe CCRF/CEM sellyn ontwikkel en toon weerstandbiedendheid teen vinblastien by 'n konsentrasie van 100



ng/ml. Sub-populasies met 'n hoër mate van weerstandbiedendheid is geselekteer deur die selle aan toenemende konsentrasies (100, 200, 300, 500, 1000, 1800 en 2000 ng/ml) van vinblastien bloot te stel. Die mate van P-gp uitdrukking het in hierdie reeks sellyne toegeneem soos die graad van geneesmiddel weerstandbiedendheid in die selle verhoog het. 'n Soortgelyke verwantskap is ook tussen die relatiewe toename in P-gp uitdrukking en toename in weerstandbiedendheid vir aktinomisien D in MDR Chinese hamster long sellyne, waargeneem [Gerlach, 1989]. Mechetner *et al* (1998) het 'n sterk korrelasie tussen die mate van P-gp uitdrukking en die graad van *in vitro* weerstandbiedendheid teen taksol sowel as doksorubisien in kanker selle wat uit biopsies van borskankers geïsoleer is, waargeneem.

## 2.2. Strukturele eienskappe van P-gp

Verskeie molekulêre biologiese metodes is gebruik om die gene wat by veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid betrokke is, te identifiseer, te kloner en te karakteriseer [Schoenlein, 1994]. Dit het tot die isolering van vol-lengte cDNA's wat vir P-gp kodeer, gelei [Croop, 1994]. Die bestudering van die nukleïensuur volgordes van hierdie geïsoleerder *mdr* cDNA's, sowel as immunositochemiese lokaliserings-studies met monoklonale teenliggame wat teen P-gp gerig is, het getoon dat die grootste gedeelte van die P-gp molekule in die selmembraan geleë is [Riordan & Ling, 1979; Croop, 1994]. Slegs 'n klein gedeelte van die P-gp molekule word aan die ekstrasellulêre kant van die selmembraan aangetref [Riordan & Ling, 1979].

Die molekulêre massa van P-gp molekules in die onderskeie soogdier spesies wissel tussen 130 en 180 kDa. Die molekulêre massa van P-gp wat in menslike selle uitgedruk word, is ongeveer 140 kDa [Croop, 1994; Sharom *et al*, 1999]. Ongeveer 10 tot 15 kDa van die waargeneemde molekulêre massa van P-gp kan aan N-gekoppelde glikolisering toegeskryf word [Greenberger *et al*, 1988].

Verskeie strukturele eienskappe van P-gp is tydens die bestudering van die aminosuur volgordes van hierdie proteïen, geïdentifiseer [Croop, 1994]. Dit het tot die voorstelling van 'n algemeen aanvaarde model vir die struktuur van P-gp gelei. Volgens hierdie model

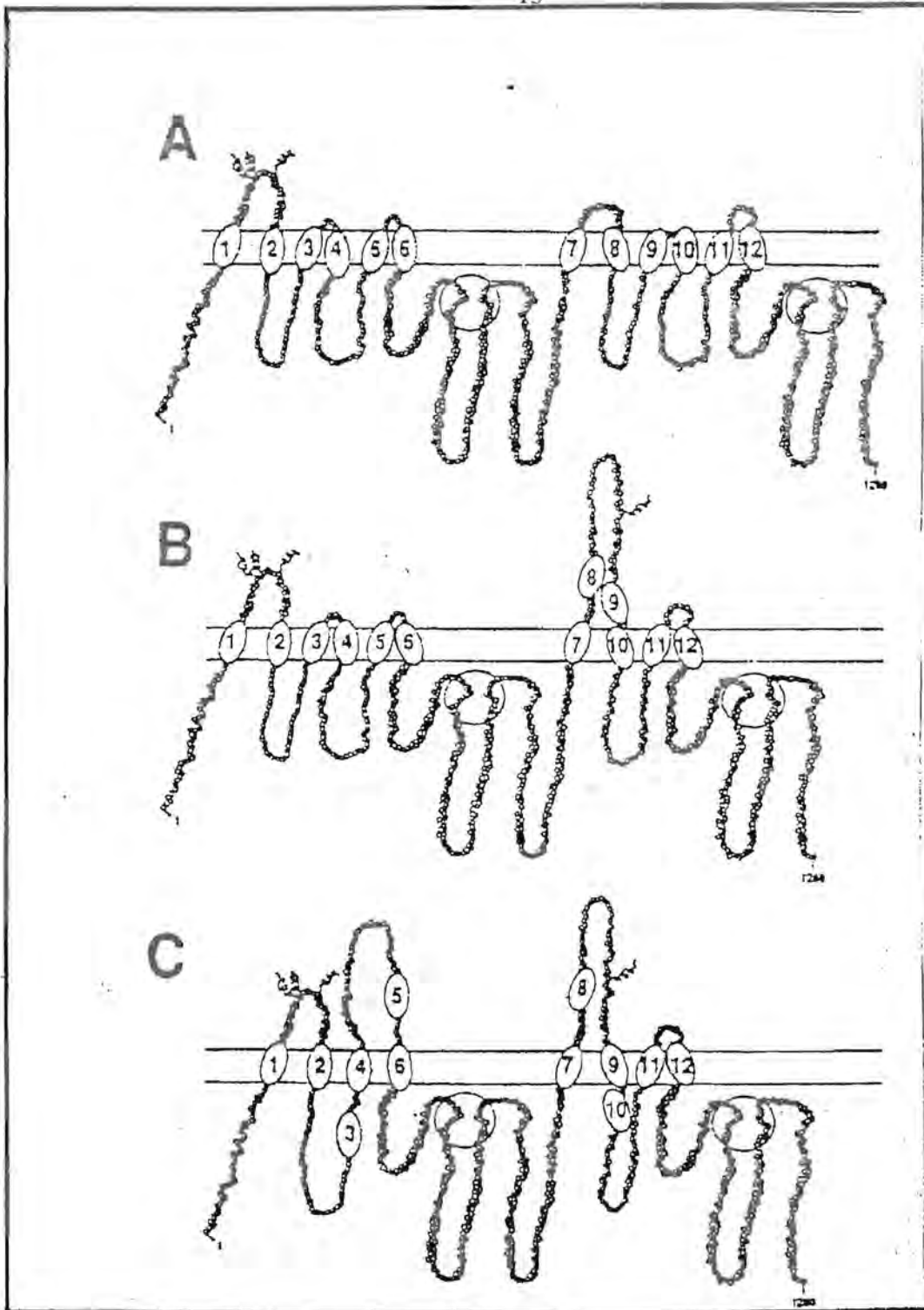
deurkruis die P-gp molekule die selmembraan 12 keer (Figuur 2.1A) [Chen *et al*, 1986; Gros *et al*, 1986]. Die P-gp molekule bestaan uit twee homoloë helftes wat onderskeidelik as die karboksi- en amino-helftes bekend staan. Elke helfte is uit drie transmembraan lusse saamgestel [Gerlach *et al*, 1986a; Gerlach, 1989]. Die eerte drie transmembraan lusse word deur 'n kort, hoogs gelaaiide sitoplasmiese gebied vooraf gegaan, terwyl die laaste drie transmembraan lusse deur 'n groot, gelaaiide sitoplasmiese gedeelte gevolg word. 'n Groep glikoliseringsgebiede word op die eerste eksterne lus van die P-gp molekule aangetref [Croop, 1994].

'n Groot sitoplasmiese gebied word tussen die twee helftes van die P-gp molekule aangetref (Figuur 2.1A) [Croop, 1994]. Hierdie sitoplasmiese gebied, sowel as die sitoplasmiese gebied wat na die laaste drie transmembraan lusse voorkom, bevat elk 'n gepaarde konsensus volgorde wat deur ongeveer 120 aminosure van mekaar geskei word om 'n ATP-bindingsvou te vorm [Walker *et al*, 1982; Croop, 1994]. Hierdie vou is in staat om ATP te bind en te hidroliseer [Ambudkar *et al*, 1992; Sarkadi *et al*, 1992].

Indien die twee helftes van die P-gp molekule teenoor mekaar gerig word, word 'n kort gedeelte wat nie met 'n ooreenstemmende gebied op die ander helfte ooreenstem nie, waargeneem [Van der Blik *et al*, 1987]. Hierdie gebied tree as brug tussen die amino- en karboksi-helftes van die P-gp molekule op en staan as die koppelingsgebied bekend [Van der Blik *et al*, 1987; Croop, 1994].

Die karboksi- en amino-helftes van 'n P-gp molekule stem in 'n groot mate (ongeveer 40%) met mekaar ooreen. Die grootste mate van aminosuur bewaring (ongeveer 60%) tussen die twee helftes word in die nukleotied bindingsvoue aangetref [Croop, 1994]. Aanvanklik is gedink dat 'n duplikasie gebeurtenis in die verlede tot die struktuur van P-gp aanleiding gegee het, maar die verlies aan homoloë plasing van intronne stel egter voor dat die twee helftes van die molekule óf onafhanklik van mekaar ontwikkel het óf dat 'n groot intron beweging na 'n duplisering gebeurtenis in die *mdr* geen plaasgevind het [Raymond & Gros, 1989; Chen *et al*, 1990; Gottesman & Pastan, 1993; Croop, 1994].





Figuur 2.1: Alternatiewe topologiese modelle vir die menslike veelvuldige geneesmiddel transporter.

- A: 'n 12-Transmembraan model. Die moontlike transmembraan gebiede word met genommere ovale aangedui. Die twee ATP-bindingsgebiede is omkring. Moontlike N-gekoppelde koolhidrate word deur die gekrulde lyne aangedui.
- B: 'n Alternatiewe 10-transmembraan model.
- C: 'n Alternatiewe 8-transmembraan model.

Die voorgestelde 12 transmembraan struktuur van P-gp, is die minimum vereistes waaraan die P-gp molekule moet voldoen om funksioneel te wees. Daar is aanvanklik aangeneem dat P-gp hoofsaaklik in hierdie monomeriese toestand funksioneer. Sommige navorsers het egter in teenstelling met hierdie stelling voorgestel dat P-gp as dimeer, of selfs as 'n oligomeer funksioneer [Germann, 1994]. Verskeie navorsers het getoon dat intramembraan partikels, met molekulêre massas wat tussen 250 kDa en 340 kDa wissel, in die selmembrane van MDR sellyne, voorkom [Sehested *et al*, 1989; Boscoboinik *et al*, 1990]. Hierdie molekulêre massa is ongeveer twee keer meer as die voorgestelde grootte van 'n monomeriese P-gp molekule [Boscoboinik *et al*, 1990]. Verskeie subeenhede van P-gp mag dus moontlik aan mekaar bind om 'n funksionele proteïen kompleks te vorm [Wright *et al*, 1985; Arsenaault *et al*, 1988]. Chemiese kruis-bindingstudies het die idee van 'n funksionele, aktiewe P-gp dimeer en/of oligomeer ondersteun [Naito & Tsuruo, 1992; Germann, 1994]. *In situ* behandeling van selle met 'n reagens wat kruis-bindings veroorsaak, het byvoorbeeld tot die identifisering van P-gp oligomere gelei. Die vorming en dissosiering van P-gp oligomere kan moontlik tot die doeltreffende funksionering van P-gp bydra. Hierdie hipotese moet egter nog eksperimenteel bevestig word, aangesien detergent-opgeloste P-gp wat vanuit plasmamembrane van MDR KB-V1 selle geïsoleer is, hoofsaaklik in die monomeriese vorm voorgekom het [Germann, 1994].

Verskeie navorsers het deur middel van gekoppelde transkripsie-translasie-translokasie bepalinge getoon dat alternatiewe topologiese vorme van P-gp ook moontlik mag bestaan [Zhang & Ling, 1991; Skach *et al*, 1993; Zhang *et al*, 1993]. Skach *et al* (1993) het getoon dat 'n menslike P-gp variant wat uit slegs 10 transmembraan gebiede bestaan, in menslike selle voorkom (Figuur 2.1B). Die struktuur van die eerste vier transmembraan gebiede van hierdie 10-transmembraan struktuur stem met dié van die oorspronklike 12-transmembraan model (Figuur 2.1A en B) ooreen [Germann, 1994]. In hierdie 10-transmembraan struktuur-model word die sitoplasmiese lus tussen die agste en negende transmembraan gebiede, in teenstelling met die oorspronklike 12-transmembraan struktuur-model, aan die ekstrasellulêre kant van die selmembraan aangetref (Figuur 2.1B) [Skach *et al*, 1993; Croop, 1994].



**Zhang en Ling (1991)** het 'n 8-transmembraan struktuur-model vir P-gp voorgestel (Figuur 2.1C). Hierdie navorsers het deur van 'n *in vitro* translasië bepaling gebruik te maak, bevestig dat 'n ekstrasellulêre gebied tussen die voorgestelde agste en negende transmembraan domeine, voorkom [**Zhang & Ling, 1991**]. Die amino-helfte van die 8-transmembraan P-gp bestaan egter slegs uit vier transmembraan segmente (Figuur 2.1C) [**Zhang et al, 1993**].

Die belangrikste verskil tussen die twee unieke 10- en 8-transmembraan P-gp struktuur modelle en die aanvanklik voorgestelde 12-transmembraan struktuur model, is die aantal hidrofobiese gebiede wat aan die ekstrasellulêre kant van die selmembraan voorkom. Hierdie verskille ten opsigte van die hoeveelheid ekstrasellulêre, hidrofobiese gebiede van P-gp, speel moontlik 'n rol tydens die herkenning, binding en vrystelling van anti-kanker geneesmiddel substrate deur P-gp. Dit is ook moontlik dat die binding en hidrolise van ATP die topologie van P-gp mag verander. Hierdie veranderde topologie is moontlik noodsaaklik vir die effektiewe meganisme van werking waartydens die geneesmiddel deur middel van die P-gp uitgepomp word. 'n Ander moontlikheid is dat die hidrofobiese gebiede 'n belangrike rol tydens proteïen-proteïen interaksies, soos tydens multimeer-vorming, mag speel. Dit is huidiglik onbekend of hierdie alternatiewe topologiese vorme van P-gp op funksionele bemiddelaars van verskillende funksionele fenotipes dui [**Germann, 1994**].

In beginsel word al drie hipotetiese modelle (agt-, tien- en twaalf- transmembraan gebiede) deur die bestaande data wat vanaf immunositochemiese lokaliseringstudies verkry is, ondersteun. Die monoklonale teenliggame wat in hierdie studies gebruik is, erken onder andere spesifiek die amino- en karboksi-terminale eindes, die twee ATP-bindings gebiede en die eerste en vierde ekstrasellulêre lus van die P-gp molekule. Die ligging van hierdie gebiede is dieselfde in al drie struktuurmodelle. Om meer duidelikheid te verkry oor watter topologiese vorm hoofsaaklik in soogdier selle voorkom, sal teenliggame wat spesifiek vir die polipeptied gebied wat aan verskillende kante van die plasma-membraan in die drie verskillende modelle voorkom, geproduseer moet word [**Germann, 1994**].

### 2.2.1. Homologie van P-gp met ander transport proteïene

Die bestudering van die cDNA's en genomiese klone wat vir verskeie ander transport proteïene in prokariotiese en eukariotiese selle kodeer, het getoon dat 'n hoë vlak van aminosuur ooreenstemming en strukturele bewaring tussen die verskillende transport proteïene, insluitend P-gp, oor die spesie-grense voorkom [Croop, 1994]. Hierdie hoë mate van ooreenstemming in die nukleïensuur en aminosuur volgordes van die verskillende transport proteïene het tot 'n hoë mate van strukturele bewaring tussen hierdie transport proteïene gelei [Gottesman, 1993; Croop, 1994]. Hierdie strukturele bewaring tussen die onderskeie transport proteïene van die verskillende spesies, stel 'n evolusionêre verwantskap tussen die proteïene voor [Gerlach *et al*, 1986b].

Die ATP-bindingsgebiede in die P-gp molekule korreleer tot 'n groot mate met die nukleïensuur volgordes van die nukleotied-bindingsvoue van die ander transport proteïene [Walker *et al*, 1982; Gottesman & Pastan, 1993; Gerlach, 1989]. Hierdie hoë mate van strukturele bewaring tussen die nukleotied bindingsvoue van die verskillende transport proteïene het daartoe gelei dat hierdie familie van proteïene as die ATP-bindingskasset (ABC) proteïen familie of vervoer ATPases bekend staan [Ames, 1986; Gottesman & Pastan, 1993]. Voorbeelde van ABC transport proteïene sluit proteïene wat in staat is om onder andere maltose, hemolisien B,  $\beta$ -hemolisien, leukotoksien, histidien, peptiede, polisakkariede en geneesmiddels in prokariotiese organismes te vervoer, in [Gerlach, 1989; Gottesman & Pastan, 1993]. Voorbeelde van ABC transport proteïene in eukariotiese selle sluit 'n pigment transporter in *Drosophila melanogaster*, 'n proteïen pomp wat chloroquine weerstandbiedendheid in *Plasmodium falciparum* bemiddel, die STE6 transporter wat die "a" peptied paringsfaktor in gis vervoer, die produk van die sistiese fibrose geen (CFTR), 'n peroksimale pomp wat indien dit muteer tot fatale serebro-hepato-renale disfunksie lei, asook twee gekoppelde gene, naamlik Tap-1 en Tap-2, wat met die vervoer van antigeniese peptiede tydens klas I antigeen presentering in die endoplasmiese retikulum, geassosieer word, in [Gottesman & Pastan, 1993].



### 2.3. Uitdrukking van P-gp in kanker sellyne en tumore

P-gp word veral teen hoë vlakke in MDR weefselkultuur sellyne en in sommige maligne weefsel uitgedruk [Croop, 1994]. Daar word drie *mdr* geen klasse in soogdiere aangetref [Gerlach, 1989]. Slegs die klas I en klas II *mdr* gene is in staat om veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid te veroorsaak [Gottesman & Pastan, 1988]. Sommige hoogs veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende sellyne druk beide die klas I en die klas II *mdr* gene terselfdertyd op hul sel-oppervlaktes uit. In ander MDR sellyne word slegs een van hierdie twee *mdr* geen klasse deur die selle uitgedruk. Die bydrae wat elk van hierdie klasse tot die weerstandbiedendheid lewer, is van die mate van selektiewe druk wat toegepas word, afhanklik. Die uitdrukking van die klas III P-gp varieer in 'n groot mate en korreleer nie met die graad van geneesmiddel weerstandbiedendheid nie [Croop, 1994].

Klas I en II P-gpe word ook gereeld in soogdier tumore uitgedruk, terwyl die klas III isovorm daarenteen in baie min soogdier tumore waargeneem word [Raymond *et al*, 1990; Nooter & Herweijer, 1991; Gottesman & Pastan, 1993; Croop, 1994; Chan *et al*, 1995]. Die uitdrukking van die klas III isovorm is hoofsaaklik tot sekere B-sel maligneiteite beperk. Die funksionele rol van die klas III P-gp in hierdie tipe kanker is nog onbekend [Nooter & Herweijer, 1991; Gottesman & Pastan, 1993].

P-gp word in beide intrinsieke sowel as verworwe geneesmiddel weerstandbiedende tumore uitgedruk [Lum *et al*, 1993]. In meeste van die intrinsiek weerstandbiedende kankers is die uitdrukking van P-gp 'n inhirente eienskap van die neoplasma, aangesien die tumor uit selle wat onder normale omstandighede lae vlakke van P-gp uitdruk, ontwikkel het [Schoenlein, 1994]. Hierdie inhirent weerstandbiedende tumore druk hoë vlakke van P-gp uit, al is die pasient nie voorheen aan chemoterapie blootgestel nie [Lum *et al*, 1993]. Voorbeelde van sulke kankers, is kankers wat hul oorsprong vanuit onder andere adrenale kortikale selle, renale proksimale tubulêre epiteel, biliêre hepatosiete, mukosale selle van die dun- en dikderm, asook kappilêre endoteel selle van die testis en die brein het [Schoenlein, 1994]. Ander P-gp-positiewe kankers wat ook onder die inhirente veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende fenotipe geklassifiseer kan word,

sluit eiland-sel karsinoom, karsinoïediese tumore, nie-klein sel long kanker met neuroendokrien kenmerke, adenokarsinoom, kankers van die maag en bors, chroniese leukemieë, non-Hodgkin se limfoom, chroniese mielogeneuse leukemie in blast krisis, sarkoom, astrositoom sowel as neuroblastoom in [Gottesman & Pastan, 1993; Lum *et al*, 1993]. In die geval van renale sel kanker, toon die meer gedifferensieërde tumore 'n hoër mate van P-gp uitdrukking. Dit wil daarom blyk asof die stadium van differensiasie in hierdie tumore 'n invloed op die mate van uitdrukking van P-gp uit oefen [Gottesman & Pastan, 1993]. Tishler *et al* (1992) het gevind dat 40% van nuut gediagnoseerde pediatriese primitiewe neuroektodermale tumore P-gp uitdruk. Hierdie tumore is hoogs weerstandbiedend teen chemoterapie [Lum *et al*, 1993]. Nabors *et al* (1991) het gevind dat 75% van gliomas, sowel as 25% van meningiomas by tye van diagnose P-gp uitdruk.

Sommige tumore, wat hul oorsprong uit weefsel het wat onder normale omstandighede nie P-gp uitdruk nie, druk wel P-gp uit [Gottesman & Pastan, 1993; Schoenlein, 1994]. P-gp word teen baie lae vlakke in hierdie tumore aangetref en kan selfs in sommige van hierdie kankers nie waargeneem word nie [Gottesman & Pastan, 1993; Lum *et al*, 1993; Ford & Hait, 1994]. Hierdie kankers sluit akute leukemieë, limfome, ovarium-, bors, gastriese- en long kankers, prostaat karsinome, klein sel long kankers en chroniese meïeloïede leukemieë (CML) in [Gottesman & Pastan, 1993; Lum *et al*, 1993; Ford & Hait, 1994]. 'n Hoogs betekenisvolle korrelasie is tussen die afwesigheid van waarneembare P-gp uitdrukking in ovarium en klein sel long kanker en die gunstige respons op chemoterapie waargeneem [Holzmayer *et al*, 1992]. Schwartzmann *et al* (1989) het gevind dat 83% van vel-biopsies van onbehandelde pasiente met Kaposi se sarkoom, P-gp uitdruk. Hierdie teenwoordigheid van P-gp uitdrukking het 'n negatiewe invloed op die behandeling van pasiente met Kaposi se sarkoom gehad [Schwartzmann *et al*, 1989].

Die hoë mate van P-gp uitdrukking in pediatriese neuroblastoom, korreleer met die onvermoë van hierdie kankers om op chemoterapeutiese behandeling te reageer [Gottesman & Pastan, 1993; Ford & Hait, 1994]. Byna alle pasiente met rhabdomiosarkoom en ongedifferensieerde sarkoom reageer aanvanklik goed op behandeling. Die teenwoordigheid of afwesigheid van P-gp uitdrukking in hierdie kankers



is daarom nie 'n aanduiding van die aanvanklike respons van hierdie pasiente op behandeling nie. Die mate van P-gp uitdrukking was egter 'n hoogs betekenisvolle voorspeller van lang terugval vrye periodes, sowel as algehele oorlewing in hierdie pasiente [Chan *et al*, 1990]. Die uitdrukking van P-gp voor behandeling is 'n prognostiese aanduiding van die sukses of mislukking van die behandeling van hierdie tipe kankers by kinders [Ford & Hait, 1994].

Baie kankers reageer aanvanklik goed op behandeling, maar die kanker keer dan op 'n latere stadium weer terug. Die uitdrukking van P-gp neem tydens hierdie terugval ("relapse") gebeurtenisse toe [Lum *et al*, 1993]. Kankers wat met verhoogde P-gp uitdrukking na 'n terugval geassosieer word, is onder andere akute nonlimfoblastiese leukemie (ANLL), pediatriese akute limfoblastiese leukemie (ALL), bors-kanker, veelvoudige mieloma, ovarium kanker, limfoom, rhabdomïeosarkoom sowel as neuroblastoom [Goldstein *et al*, 1989; Lum *et al*, 1993; Ford & Hait, 1994]. Daar was waarskynlik 'n klein aantal MDR-positiewe selle voor terapie in hierdie pasiente teenwoordig. Hierdie sel-populasie is in staat om die chemoterapeutiese behandeling te oorleef en is vir die terugval van die kanker verantwoordelik. 'n Ander moontlikheid is dat die chemoterapie die uitdrukking van die *mdr1* geen induseer [Gottesman & Pastan, 1993].

Verhoogde P-gp uitdrukking is in pasiente met verskeie hematologiese kankers, soos onder andere akute meïeloïede leukemie (AML), akute limfositiese leukemie (ALL) en kroniese meïeloïede leukemie (CML) in blast krisis waargeneem [Marie *et al*, 1991; Van den Heuvel-Eibrink *et al*, 2000]. Die mate van P-gp uitdrukking het na 'n terugval van een van bogenoemde kankers toegeneem. Daar was 'n betekenisvolle afname in die waarskynlikheid om 'n volledige respons in die teenwoordigheid van verhoogde P-gp uitdrukking te verkry [Marie *et al*, 1991]. Verhoogde P-gp uitdrukking is veral 'n ongunstige prognostiese faktor in AML [Rischin & Ling, 1993; Marie & Legrand, 1999]. Pirker *et al* (1991) het die P-gp vlakke in pasiente met onbehandelde *de novo* AML ondersoek en gevind dat 53% van die pasiente met waarneembare P-gp uitdrukking 'n volledige respons teenoor 'n antrasiklien-bevattende induksie protokol getoon het. In die

monsters wat nie waarneembare P-gp vlakke het nie, het 89% volledig op die behandeling gereageer [Pirker *et al*, 1991]. Siekte vrye asook algehele oorlewing was ook betekenisvol beter in die P-gp-negatiewe groep [Schoenlein, 1994].

Die uitdrukking van P-gp in ALL is tot 'n mindere mate ondersoek as wat die geval vir AML is. P-gp word minder algemeen in ALL as in AML uitgedruk [Schoenlein, 1994]. Die uitdrukking van P-gp is, net soos in AML, 'n negatiewe prognostiewe faktor in pasiente met *de novo* ALL [Goasguen *et al*, 1993]. 'n Statisties betekenisvolle verskil is in die induksie van remissie, gebeurtenis-vrye oorlewing asook betekenisvolle volledige respons na 'n terugval in pasiente waarvan minder as 1% van die leukemiese selle P-gp uitdruk, waargeneem [Ford & Hait, 1994].

#### 2.4. Die uitdrukking en funksie van P-gp in normale weefsel

Verskeie normale, “gesonde” selle druk ook P-gp op hul sel-oppervlak uit. Die mate van P-gp uitdrukking in hierdie selle is merkbaar laer as in veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende kanker selle [Kellen, 1994]. Die bestudering van die verspreiding van P-gp in normale menslike weefsel, het tot die identifisering van verskeie moontlike fisiologiese funksies vir hierdie proteïen gelei [Ford & Hait, 1994]. Die fisiologiese rol van P-gp in normale selle is waarskynlik om die liggaam teen endogene sowel as eksogene sitotoksiese verbindings te beskerm [Loo & Clarke, 1999].

Volwasse epiteel weefsels in die lewer, ingewande, nier, pankreas, kolon, vel, kappilêre bloedvate, gal, bronchiale mukosa, ovarium follikels, prostaat, bloed- brein en bloed-testikulêre skans druk P-gp uit [Kellen, 1994; Sikic *et al*, 1997]. P-gp word ook in die volwasse hormoon sekreterende organe, soos die adrenale korteks, uterus, endometriale selle en die plasentale trofoblaste uitgedruk [Arceci *et al*, 1988; Sugawara *et al*, 1988; Kellen, 1994]. Die maag, longe, oesofagus, bors, spier en blaas, sowel as haemopoïetiese voorloper selle in die beenmurg druk ook P-gp uit [Chin *et al*, 1989, Kellen, 1994; Sikic *et al*, 1997]. Die mees algemene isovorm wat in bogenoemde normale weefsel uitgedruk word, is MDR1 [Chin *et al*, 1989]. Die *mdr3* geen is huidiglik slegs in normale lewer, niere, adrenale kliere en milt waargeneem [Van der Blik *et al*, 1988; Chin *et al*, 1989].



P-gp word reeds vroeg (vanaf die sewende week van swangerskap) in sekere weefsels van die fetus uitgedruk. Die verspreidingspatroon van P-gp uitdrukking in die fetus verskil van die P-gp verspreidingspatroon wat in volwasse weefsel waargeneem word. P-gp word byvoorbeeld nie in die selle van die fetale sone van die adrenale korteks uitgedruk nie, maar neem wel in die definitiewe sone van die fetale adrenale korteks toe, soos die swangerskap vorder. In teenstelling met die uitdrukking van P-gp in die volwasse ingewande, druk die pre-natale ingewande van die fetus nie P-gp uit nie. Die respiratoriese epiteel van die hoof bronchi en farinks, wat gewoonlik by volwassenes nie P-gp uitdruk nie, druk in die fetus wel P-gp uit. Hierdie uitdrukking van P-gp is vanaf die sesde maand van 'n swangerskap waarneembaar. Die nier en die lewer van die fetus druk P-gp reeds vroeg in die fetale stadium uit [Kellen, 1994].

P-gp speel waarskynlik 'n belangrike rol in die vervoer van steroïede in die adrenale kliere, uterus en plasenta [Ueda *et al*, 1992]. Hierdie stelling is deur waarnemings dat verbindings wat in staat is om die werking van P-gp te inhibeer, die uitskeiding van

steroïede in muis adrenale Y1 selle blokkeer, ondersteun [Chin *et al*, 1992]. Hierdie funksie van P-gp in die hormoon-sekretierende organe word ook verder deur die waarnemings dat sommige van die hormone wat deur hierdie weefsels uitgeskei word as substrate vir P-gp kan optree, ondersteun. Estradiool, kortisol en aldosteroon kan as substrate vir P-gp optree [Ueda *et al*, 1992; Germann, 1994]. Die steroïede, kortikosteroon, deoksikortikosteroon en progesteron kan daarenteen nie as substrate vir P-gp optree nie [Germann, 1994]. Wolf en Horwitz (1992) het wel getoon dat sommige van die hidrofobiese steroïede, soos kortikosteroon en progesteron, met muis P-gp interreageer. Die P-gp molekules beskerm moontlik die membrane van die hormoon-sekretierende organe teen die toksiese effekte van die opgeloste steroïede, deur die steroïede uit die selle van hierdie organe te vervoer [Germann, 1994]. Bradley *et al* (1990) het gevind dat P-gp teen hoë vlakke in slegs die adrenale korteks van manlike hamsters uitgedruk word. P-gp is daarom moontlik ook by die vervoer van geslag-spesifieke hormone betrokke [Bradley *et al*, 1990].

Die apikale plasmamembrane van die dunderm mukosa selle, die jejunale- sowel as die

ileale borsel grens (“brush border”) membraan vesikels druk ook P-gp uit. Hierdie gebiede is direk aan toksiese en karsinogeniese verbindings blootgestel. Die uitdrukking van P-gp is moontlik een van die detoksifiseringsmeganismes wat in hierdie gebiede voorkom en beskerm waarskynlik hierdie gebiede teen moontlike skadelike eksogene verbindings [Kellen, 1994; Schinkel, 1997; Sikic *et al*, 1997]. Schinkel (1998) het gevind dat intestinale P-gp ’n belangrike rol in die verwydering van toksiese verbindings (insluitend geneesmiddels) vanuit die bloed speel. Die P-gp molekules in die lumen voorkom ook dat toksiese verbindings in die lumen weer deur die bloedstroom opgeneem word [Schinkel, 1998].

Die brein en kappilêre endoteel selle druk ook P-gp in hul selmembrane uit. P-gp speel daarom moontlik ook ’n rol in die uitsluiting van xenobiotikums vanuit die sentrale senuwee stelsel [Kellen, 1994; Schinkel, 1997; Sikic *et al*, 1997; Schinkel, 1998].

P-gp word ook in die selmembrane van veral CD34-positiewe stamselle uitgedruk [Chaudhary & Roninson, 1991; Kellen, 1994]. Die stamselle verloor tydens die differensiasie proses stelselmatig die uitdrukking van die CD34-molekule. Terselfdertyd druk dit ook al laer vlakke van P-gp uit [Kellen, 1994]. Dit verklaar moontlik waarom haemopoïetiese stamselle weerstandbiedend teen anti-kanker geneesmiddels is [Chaudhary & Roninson, 1991]. Drach *et al* (1992) het gevind dat rooibloedsel voorlopers sowel as monositiese voorloper selle (CD33<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>) nie P-gp uitdruk nie. Die vroeë mieloïede voorloper selle (CD33<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>), mieloïede selle (CD33<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>) asook vroeë (CD10<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>) en volwasse (CD10<sup>-</sup>/CD19<sup>+</sup>) B-selle in die beenmurg druk wel P-gp uit [Drach *et al*, 1992]. P-gp speel moontlik ’n fisiologiese rol in die beskerming van stamselle teen skadelike verbindings [Kellen, 1994]. Chaudhary en Roninson (1991) het voorgestel dat die uitdrukking van P-gp in haematopoïetiese stamselle ook ’n rol tydens regulering van molekules wat by die differensiering en prolifisering van die selle is, mag speel. Hierdie transport aktiwiteit moet nog eksperimenteel bewys word.

Drach *et al* (1992) het gevind dat normale sirkulerende granulose selle ook P-gp op hul seloppervlakte uitdruk. Monosiete druk daarenteen nie P-gp uit nie [Drach *et al*, 1992].



Verskeie teenstrydige resultate is egter vir die uitdrukking van P-gp in hierdie selle gerapporteer. **Gruber et al (1992)** het onder meer gerapporteer dat 50% van monosiete wel waarneembare vlakke van *mdr1* mRNA besit. Hierdie navorsers kon geen uitdrukking van P-gp in granulose selle aantoon nie [**Gruber et al, 1992**]. Die rol van P-gp in granulose selle is nog onbekend.

Sirkulerende limfosiete druk ook P-gp uit [**Chaudhary et al, 1992**]. 'n Hiërargie is in die mate waarteen sirkulerende limfosiete P-gp uitdruk waargeneem. Die volgorde van die mate waarteen P-gp in hierdie selle uitgedruk word, is as volg: Sitotoksiese/suppressor T-selle (CD8) > T-helper selle (CD4) > B-selle (CD20). Die hoogste mate van P-gp uitdrukking word dus in die sitotoksiese/suppressor T-selle aangetref, terwyl die B-selle die laagste vlakke van P-gp uitdrukking toon [**Drach et al, 1992; Kellen, 1994; Ludescher et al, 1998**]. Hoër vlakke van P-gp uitdrukking is in naïewe T-selle (CD45RA-positief) as in geheue (“memory”) T-selle (CD45RO-positief) waargeneem [**Ludescher et al, 1998**]. Die rol van P-gp uitdrukking in sirkulerende limfosiete is nog nie heeltemal bekend nie. **Schluesener et al (1992)** het voorgestel dat 'n P-gp transport sisteem in normale limfosiete teenwoordig is. Hierdie sisteem beskerm die selle waarskynlik teen toksiese verbindings.

Natuurlike doderselle druk ook P-gp uit [**Drach et al, 1992; Kellen, 1994; Sikic et al, 1997; Ludescher et al, 1998**]. *In vitro* eksperimente met P-gp positiewe natuurlike doderselle het getoon dat behandeling van hierdie selle met chemosensitiseringsmiddels, soos verapamil, die sel-bemiddelde sitolitiese aktiwiteit van natuurlike doderselle teen teikenselle inhibeer [**Ford & Hait, 1994**]. Die effektor- tot teiken-sel aktiwiteit word nie beïnvloed nie [**Chong et al, 1993**]. Hierdie resultate stel voor dat P-gp 'n aktiewe rol in die funksionering van perifere bloed limfosiete mag speel, deur sitotoksiese sowel as sitolitiese wat by natuurlike dodersel-bemiddelde sitotoksiese betrokke is, te vervoer [**Ford & Hait, 1994**]. Dit is moontlik dat natuurlike dodersel-bemiddelde sitotoksiese die uitdrukking van P-gp benodig [**Kellen, 1994**].

Die oormatige uitdrukking van P-gp in normale weefsel kan in sommige gevalle aan minimale weefsel beskadiging van die selle toegeskryf word [**Kellen, 1994**]. P-gp mag ook

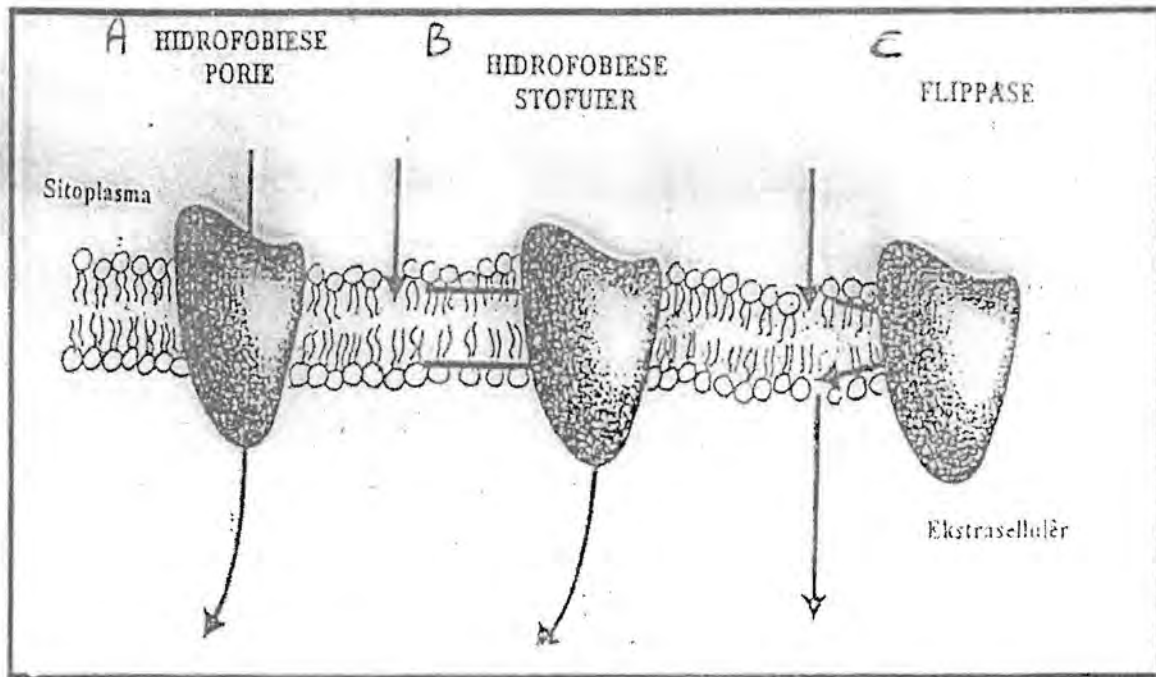
moontlik by verskeie ander funksies betrokke wees. **Gosland *et al* (1993)** het byvoorbeeld voorgestel dat P-gp by die uitskeiding van bilirubien betrokke is. Die assosiering van P-gp in die Golgi apparaat van persone met die bloed tipe A, stel voor dat P-gp moontlik 'n rol in die prosessering en vervoer van spesifieke bloedgroep antigene speel [**Kellen, 1994**].

Die uitdrukking van P-gp is nie net ekstrasellulêr op die selmembraan waargeneem nie, maar is ook in die membrane van sitoplasmiese organelle waargeneem [**Labroille *et al*, 1998; Malorni *et al*, 1998; Shapiro *et al*, 1998**]. Die funksie van die intrasellulêre uitdrukking van P-gp is nog nie heeltemal duidelik nie. **Labroille *et al* (1998)** het voorgestel dat die sitoplasmiese P-gp as reservoir dien om 'n konstante vlak van P-gp uitdrukking op die sel-oppervlakte in stand te hou.

## 2.5. Meganisme van werking van P-gp

Verskeie modelle is vir die werking van P-gp tydens veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid voorgestel [**Roepe, 1995; Gottesman *et al*, 1996; Wadkins & Roepe, 1997**]. Hierdie modelle kan breedweg in twee kategorieë verdeel word, naamlik die modelle waarin P-gp direk die anti-kanker geneesmiddels uit die MDR selle verwyder sowel as die modelle waar P-gp indirek tot die verlaging in die intrasellulêre akkumulering van die anti-kanker geneesmiddels in MDR selle, lei [**Wadkins & Roepe, 1997**]. Die modelle waarin P-gp 'n direkte rol in die uitsluiting van anti-kanker geneesmiddels uit die MDR selle speel, sluit die “aktiewe geneesmiddel pomp” model, die “hidrofobiese stofsuijer” model sowel as die “flippase” model, in (Figuur 2.2) [**Gottesman *et al*, 1996; Wadkins & Roepe, 1997**]. Die “veranderde partisie” model is as model voorgestel waar P-gp 'n indirekte rol in die verdeling en retensie van anti-kanker geneesmiddels in MDR speel, deurdat die oormatige uitdrukking van P-gp tot veranderings in die intrasellulêre pH, membraan potensiaal sowel as ander biochemiese/biofisiese veranderings in die MDR selle veroorsaak [**Roepe, 1995; Gottesman *et al*, 1996**].





Figuur 2.2: Moontlike roetes van P-glikoproteïen-bemiddelde geneesmiddel transport.

## 2.5.1. Direkte transport modelle

### 2.5.1.1. Modelle waarin P-gp die geneesmiddels vanuit die sitoplasma verwyder

#### 2.5.1.1.1. Die “aktiewe geneesmiddel pomp” model

Die aktiewe uitwaartse geneesmiddel pomp model word deur die meeste navorsers wat op die gebied van MDR werksaam is, ondersteun. Hierdie model stel voor dat P-gp as ‘n aktiewe transportproteïen in die selmembrane van MDR selle funksioneer. Die P-gp-bemiddelde uitwaartse transport (“pomp”) van anti-kanker geneesmiddels, lei tot ‘n verlaging in die intrasellulêre konsentrasies van hierdie geneesmiddels in MDR selle (Figuur 2.2 A). Die intrasellulêre anti-kanker geneesmiddel konsentrasies word tot so ‘n mate deur P-gp in MDR selle verlaag, dat dit nie meer toksies vir die selle is nie [Higgins & Gottesman, 1992]. Die kanker selle toon gevolglik sellulêre weerstandbiedendheid teen die anti-kanker geneesmiddels. Data wat hierdie model ondersteun, is onder andere vanuit geneesmiddel bindingstudies, foto-affiniteitsmerking eksperimente, studies wat van diskrete aminosuur substitusies in P-gp gebruik gemaak het, sowel as waarnemings dat P-gp ATPase aktiwiteit besit en dat hierdie ATPase aktiwiteit deur die geneesmiddels wat deur P-gp vervoer word, gestimuleer word, verkry [Gottesman *et al*, 1996].

Die presiese wyse waarop hierdie P-gp-bemiddelde pomp proses plaasvind, is nog nie heeltemal duidelik nie. Die meganisme van werking van die uitwaartse pomp-aksie van P-gp word huidiglik op veral drie aannames gebaseer. Volgens die eerste aanname word die substraat-spesifisiteit van P-gp, deur ‘n ensiem-agtige substraat herkenningsgebied op die P-gp molekule bepaal [Higgins & Gottesman, 1992]. Die MDR-geassosieerde sitotoksiese geneesmiddels bind waarskynlik intrasellulêr direk aan die spesifieke geneesmiddel bindingsgebiede op die P-gp molekules [Ford, Yang & Hait, 1996]. Na binding van die sitotoksiese geneesmiddels aan P-gp, ondergaan P-gp moontlik ‘n energie-afhanklike konformasie verandering wat toelaat dat die geneesmiddel aan die ekstrasellulêre kant

van die selmembraan vrygestel word [Roepe, 1995; Ford, Yang & Hait, 1996].

P-gp is baie minder selektief ten opsigte van substrate as enige ander biologiese draer molekule. Die identifisering en karakterisering van gebiede op die P-gp molekule wat vir die herkenning en binding van geneesmiddels aan P-gp verantwoordelik is, het getoon dat P-gp verskeie nie-oorvleulende of gedeeltelik oorvleulende geneesmiddel-bindings-gebiede besit [Ford, Yang & Hait, 1996]. Hierdie bindingsgebiede word tussen die vyfde en sesde sowel as die elfde en twaalfde transmembraan segmente van die P-gp molekule aangetref [Gottesman *et al*, 1996]. Elk van hierdie bindingsgebiede besit 'n unieke, spesifieke bindings-affiniteit vir verskillende geneesmiddels of klasse van geneesmiddels [Ford, Yang & Hait, 1996]. Die binding en transport van MDR-geassosieerde geneesmiddels deur P-gp, is onder andere deur van radio-aktief gemerkte MDR geneesmiddels (veral  $^3\text{H}$ -vinblastien) gebruik te maak, bestudeer. Daar is gevind dat die P-gp-bemiddelde transport van die radio-aktief gemerkte anti-kanker geneesmiddels deur die teenwoordigheid van 'n oormaat (koue) vinblastien sowel as ander geneesmiddels wat met MDR geassosieer word (soos vinkristien, daunorubisien, aktinomsien D en colchicien), geïnhibeer word. Verbindings, soos verapamil, wat in staat is om MDR om te keer, was ook in staat om die binding en transport van radio-aktief gemerkte geneesmiddels deur P-gp te inhibeer [Germann, 1994]. Uit bogenoemde waarnemings is afgelei dat die MDR-geassosieerde geneesmiddels, sowel as die verbindings wat in staat is om MDR om te keer, moontlik met mekaar om dieselfde en/of oorvleulende bindingsplekke op die P-gp molekule, kompeteer [Roepe, 1995]. Verskeie resultate dui egter daarop dat daar 'n meer komplekse verhouding tussen die omkeringsvermoë van verbindings en die vermoë van hierdie verbindings om vir die geneesmiddel bindingsgebiede op die P-gp te kompeteer, bestaan [Gerlach, 1989]. Gerlach *et al* (1986b) het voorgestel dat die



geneesmiddels deur middel van 'n hidrofobiese draer molekule wat nie-spesifiek aan P-gp bind, vervoer word. Daar is egter geen bewys dat so 'n draer molekule bestaan nie [Gerlach, 1989].

Foto-affiniteitsbindingstudies met radio-aktief gemerkte geneesmiddels in MDR selle, is deur verskeie navorsers gekritiseer. Die meeste foto-affiniteits studies is in MDR selle of MDR selmembraan fraksies met 'n baie hoë vlak van P-gp uitdrukking, uitgevoer. Baie min van hierdie studies is in selle of membraan fraksies met fisiologiese P-gp vlakke uitgevoer, aangesien dit baie moeilik of selfs onmoontlik is om hierdie studies in hierdie selle of membraan fraksies uit te voer. Die resultate wat vanuit die foto-affiniteits bindingstudies verkry is, is moontlik die gevolg van 'n statisties meer waarskynlike gebeurtenis. Met hierdie gebeurtenis word bedoel dat die oormatige uitdrukking van P-gp in die selmembraan, die waarskynlikheid dat 'n geneesmiddel of verbinding eerder in kontak met P-gp as enige ander proteïen in die selmembrane van MDR selle sal kom, tot 'n groot mate statisties verhoog. Die interaksie tussen P-gp en die anti-kanker geneesmiddels is daarom nie noodwendig 'n ensiem-substraat interaksie nie [Roepe, 1995].

Dit is ook moeilik om die substraat-spesifisiteit van P-gp bevredigend met behulp van die P-gp uitwaartse pomp model te verklaar. 'n Wye reeks chemiese onverwante verbindings is in staat om as substrate vir P-gp op te tree. Dit is moeilik om 'n ensiem-agtige substraat-bindingsgebied met hoë affiniteit vir 'n groot verskeidendheid verbindings, soos die antrasikliene, vinka alkaloidede, aktinomsien D, sikliese en linieëre peptiede en verskeie ander hidrofobiese en amfipatiese verbindings, maar met baie min of geen bindings-affiniteit vir die meeste normale sellulêre komponente, biologies te verklaar. Daar is aanvanklik voorgestel dat die MDR-geassosieerde verbindings moontlik chemiese modifikasies ondergaan (byvoorbeeld deur glutatioon konjugasie), voordat dit deur P-gp herken word. Hierdie

chemiese modifikasies lei moontlik tot groter chemiese ooreenstemming tussen die verskillende verbindings wat as substrate vir P-gp optree. Dit is nou duidelik dat baie van hierdie verbindings selfs in die afwesigheid van chemiese modifisering deur P-gp vervoer kan word [**Higgins & Gottesman, 1992**].

Die tweede aanname wat in die P-gp uitwaartse geneesmiddel pomp model gemaak word, is dat P-gp as 'n uitwaartse pomp funksioneer deur die anti-kanker geneesmiddels direk vanuit die sitoplasma van MDR selle te verwyder en dit in die waterige ekstrasellulêre omgewing van die selle vry te stel [**Higgins & Gottesman, 1992**]. Die tempo waarteen P-gp die geneesmiddels uit die selle uitpomp, hang van nie-versadigde toestande van die substraat konsentrasie in die sitoplasma af. Gevolglik word geïmpliseer dat die verwydering van geneesmiddels vanuit die sitoplasma slegs die effluks tempo beïnvloed, terwyl die passiewe influks van die geneesmiddels nie geaffekteer word nie [**Bolhuis et al, 1997**]. Hierdie hipotese is onder andere deur studies wat getoon het dat die tempo van uitwaartse transport van sekere anti-kanker geneesmiddels vinniger in MDR selle as in geneesmiddel-sensitiewe selle plaasvind, ondersteun [**Sirotnak et al, 1986**]. Daar is ook waargeneem dat P-gp tot veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid in selle bydra, deur 'n 1000-voudige toename in die ekstrasellulêre konsentrasie van sekere chemoterapeutiese geneesmiddels te veroorsaak. Dit is egter interessant om daarop te let dat die intrasellulêre konsentrasie van hierdie chemoterapeutiese geneesmiddels terselfdertyd slegs 5- tot 10-voudig afgeneem het. Verskillende uiteenlopende standpunte in die literatuur dui egter daarop dat P-gp nie soos 'n tipiese uitwaartse pomp optree nie [**Gottesman et al, 1996**]. **Sirotnak et al (1986)** het onder andere getoon dat die tempo van inwaartse vloei van  $^3\text{[H]}$ -vinblastien 24-voudig stadiger in MDR selle as in geneesmiddel-sensitiewe selle plaasvind. Ander navorsers het weer getoon dat intrasellulêre binding van chemoterapeutiese geneesmiddels 40-voudig minder effektief in MDR selle



as in geneesmiddel-sensitiewe selle plaasvind [Sirotnak *et al*, 1986]. Sekere MDR selle het op dieselfde tydstip, beide 'n afname in die inwaartse vloei van anti-kanker geneesmiddels sowel as 'n toename in die uitwaartse vloei van hierdie geneesmiddels getoon. Dit is vanuit bogenoemde waarnemings duidelik dat die verlaging in die intrasellulêre anti-kanker geneesmiddel konsentrasie in MDR selle, nie net aan 'n verhoogde aktiewe uitwaartse transport van anti-kanker geneesmiddels toegeskryf kan word nie, maar dat ander faktore soos 'n verlaging in die tempo van geneesmiddel opname sowel as 'n afname in die MDR sel se vermoë om die anti-kanker geneesmiddels doeltreffend te bind, ook vir die verlaging in die intrasellulêre akkumulering van die geneesmiddels verantwoordelik kan wees [Sirotnak *et al*, 1986; Roepe, 1995].

P-gp is in staat om  $^3\text{[H]}$ -vinblastien, teen 'n konsentrasie gradient, oor die selmembrane van MDR selle te vervoer. Hierdie transport proses is osmoties sensitief en is grootliks van die beskikbaarheid van 'n konstante, hidroliseerbare energiebron afhanklik. Die energiebron kan ATP of GTP wees. Die nie-hidroliseerbare analoë, naamlik ADP, AMP, CTP, UTP, ITP,  $\text{NAD}^+$ , NADH,  $\text{NADP}^+$  en NADPH, kan nie as energiebronne vir die P-gp-bemiddelde transport proses optree nie. 'n Soortgelyke transport proses is nie in selmembraan vesikels wat vanuit die geneesmiddel-sensitiewe selle voorberei is, waargeneem nie [Germann, 1994].

Verskeie studies het bevestig dat P-gp die hidrolise van ATP benodig om die anti-kanker geneesmiddels wat met MDR geassosieer word, doeltreffend uit die MDR selle uit te pomp [Germann, 1994; Roepe, 1995]. Daar is gevind dat indien die ATP voorsiening van MDR selle uitgeput word, deur byvoorbeeld die glukose en fosfate uit die omringende medium te verwyder en inhibeerders van energie produksie (soos 2-deoksi-glukose, azied, sianied, dinitrofenol en iodo-asetaat) by die medium te voeg, P-gp nie meer in staat is om te kan funksioneer nie [Gerlach, 1989]. Die

netto akkumulering van die intrasellulêre geneesmiddels het, in hierdie energie-uitgeputte, P-gp-positiewe MDR selle, tot soorgelyke geneesmiddel vlakke as wat in geneesmiddel-sensitiewe selle aangetref word, toegeneem [Germann, 1994; Roepe, 1995]. Die uitputting van die hidroliseerbare energiebron van die selle het 'n baie groter invloed op die geneesmiddel akkumulering in MDR selle as in geneesmiddel-sensitiewe selle gehad [Gerlach, 1989]. Indien die inhibeerders van energie produksie uit die medium verwyder is en die medium weer met glukose gesuplementeer is, is P-gp weer geaktiveer en was dit weer in staat om normaal te funksioneer. Die geneesmiddels wat in die energie-uitgeputte MDR selle geakkumuleer het, is deur hierdie hergeaktiveerde P-gp tot vlakke wat normaalweg met MDR selle geassosieer is, uitgedomp [Germann, 1994; Kellen, 1994]. Dit is vanuit bogenoemde waarnemings duidelik dat intrasellulêre ATP vlakke die doeltreffendheid van P-gp beïnvloed [Germann, 1994].

Die ATPase aktiwiteit van P-gp word slegs in die teenwoordigheid van MDR-geassosieerde anti-kanker geneesmiddels geaktiveer [Germann, 1994]. Die MDR-geassosieerde geneesmiddels kan volgens die invloed wat dit op die ATPase aktiwiteit van P-gp uitoefen, in drie verskillende klasse ingedeel word. Die eerste klas geneesmiddels sluit verbindings soos vinblastien, verapamil en taksol in. Hierdie verbindings stimuleer die ATPase aktiwiteit by lae konsentrasies, maar hoë konsentrasies van hierdie verbindings lei tot die inhibisie van die ATPase aktiwiteit. Die tweede klas verbindings stimuleer die ATPase aktiwiteit op 'n dosis-afhanklike wyse, sonder om op enige stadium en/of wyse die ATPase aktiwiteit van P-gp te inhibeer. Hierdie verbindings sluit bisantreen, valinomisien en diltiazem in. Die derde klas van verbindings sluit verbindings soos siklosporien A en rapamisien in en is in staat om die basale en verapamil-geaktiveerde ATPase aktiwiteit van P-gp te inhibeer [Gottesman *et al*, 1996].

Die grootste kritiek teen die P-gp geneesmiddel uitwaartse pomp model, is



die onvermoë om bepaling van die stoichiometrie van ATP hidrolise tydens die werking van P-gp, altyd betroubaar met die mate van P-gp-bemiddelde geneesmiddel uitwaartse transport te korreleer [Gottesman *et al*, 1996]. Verskeie teenstrydige resultate is tydens die bepaling van die stoichiometrie van P-gp-geassosieerde ATP hidrolise, verkry. Aanvanklike pogings om P-gp deur middel van affiniteitschromatografie te suiwer, het tot proteïen preparate met 'n lae mate van ATPase aktiwiteit (1-3 nmol ATP/min/mg) gelei. Die aktiwiteit van hierdie geïsoleerde ATPase ensiem was nie van die teenwoordigheid van MDR-geassosieerde anti-kanker geneesmiddels afhanklik nie en kon nie die hoë vlakke van ATP verbruiking tydens die geneesmiddel transport in MDR selle verklaar nie. In teenstelling hiermee is ongeveer 'n 1000-voudige hoër spesifieke ATPase aktiwiteit (3-5  $\mu$ mol ATP/min/mg) vir rekombinante P-gp, wat oormatig in insek selle uitgedruk is, waargeneem [Germann, 1994]. Verdere pogings om die stoichiometrie van ATP hidrolise met behulp van gedeeltelik of homogeen gesuiwerde P-gp in 'n gerekonstitueerde sisteem te bepaal, het aangedui dat  $10^4$  tot  $10^2$  ATP molekules vir elke substraat molekule wat deur P-gp vervoer word, gehidroliseer word [Wadkins & Roepe, 1997]. Hierdie waarde was te hoog en het nie met die waargeneemde vlakke van geneesmiddel weerstandbiedendheid in die selle gekorreleer nie [Gottesman *et al*, 1996]. Bogenoemde waargeneemde stoichiometrie is teenstrydig met die stoichiometrie wat vir ander ATP-aangedrewe pompe waargeneem is (tussen 1:1 en 1:3; ATP hidrolise: geneesmiddel molekules vervoer) [Wadkins & Roepe, 1997]. Eytan *et al* (1996) het deur van 'n indirekte metode gebruik te maak, getoon dat 0.5 - 0.8 valinomsien- $^{86}\text{Rb}^+$  kompleks molekules vir elke ATP molekule wat gehidroliseer is, vervoer word. Die resultate van die metode wat deur Eytan *et al* (1996) gevolg is, moet egter met groot versigtigheid geïnterpreteer word, aangesien 'n oormaat valinomsien in hierdie studie gebruik is. Dit is daarom moontlik dat sommige van die valinomsien molekules wat deur P-gp vervoer is, nie met  $^{86}\text{Rb}^+$  komplekse gevorm het nie. Die meetbare en weergegeede aantal

valinomisien molekules wat deur P-gp vervoer is, is daarom nie noodwendig 'n akurate weerspieëling van die werklike aantal valinomisien molekules wat deur P-gp vervoer is nie [Gottesman *et al*, 1996].

Die derde aanname wat in die P-gp geneesmiddel uitwaartse pomp model gemaak word, is dat die transmembraan domeine van P-gp, porie-agtige strukture in die selmembrane van MDR selle vorm. Hierdie porie-agtige strukture skep 'n diskrete, definitiewe hidrofobiese weg in die selmembrane van MDR selle, waardeur die substrate van P-gp kan beweeg, sonder om noodwendig in kontak met die lipied van die selmembrane te kom. Die porie-agtige strukture van die P-gp molekules verhoed dus dat die P-gp substrate direk in kontak met die hidrofobiese omgewing (lipied-lae) van die selmembraan, kom [Higgins & Gottesman, 1992].

Kinetiese studies van die transport van MDR-geassosieerde geneesmiddels in P-gp-positiewe MDR selle het verskeie diverse en teenstrydige resultate opgelewer, wat daarop dui dat P-gp nie soos 'n tipiese uitwaartse proteïen pomp optree nie [Roepe, 1995]. Hierdie ongewone kinetika het tot 'n alternatiewe hipotese vir die werking van P-gp gelei. Volgens hierdie hipotese herken P-gp die anti-kanker geneesmiddels direk in die selmembrane van MDR selle en verwyder P-gp hierdie geneesmiddels uit die selle nog voordat dit die sitoplasma bereik. Vanuit waarnemings wat hierdie alternatiewe hipotese ondersteun het, is twee alternatiewe modelle vir die meganisme van werking van die P-gp pomp voorgestel. Hierdie twee modelle staan onderskeidelik as die "hidrofobiese stofsuiër" model en die "flippase" model bekend [Gottesman *et al*, 1996; Roepe, 1995]. Beide hierdie modelle stel voor dat P-gp die anti-kanker geneesmiddels direk in die lipiedlaag van die selmembrane van MDR selle waarneem en uit die MDR selle verwyder [Gottesman *et al*, 1996].

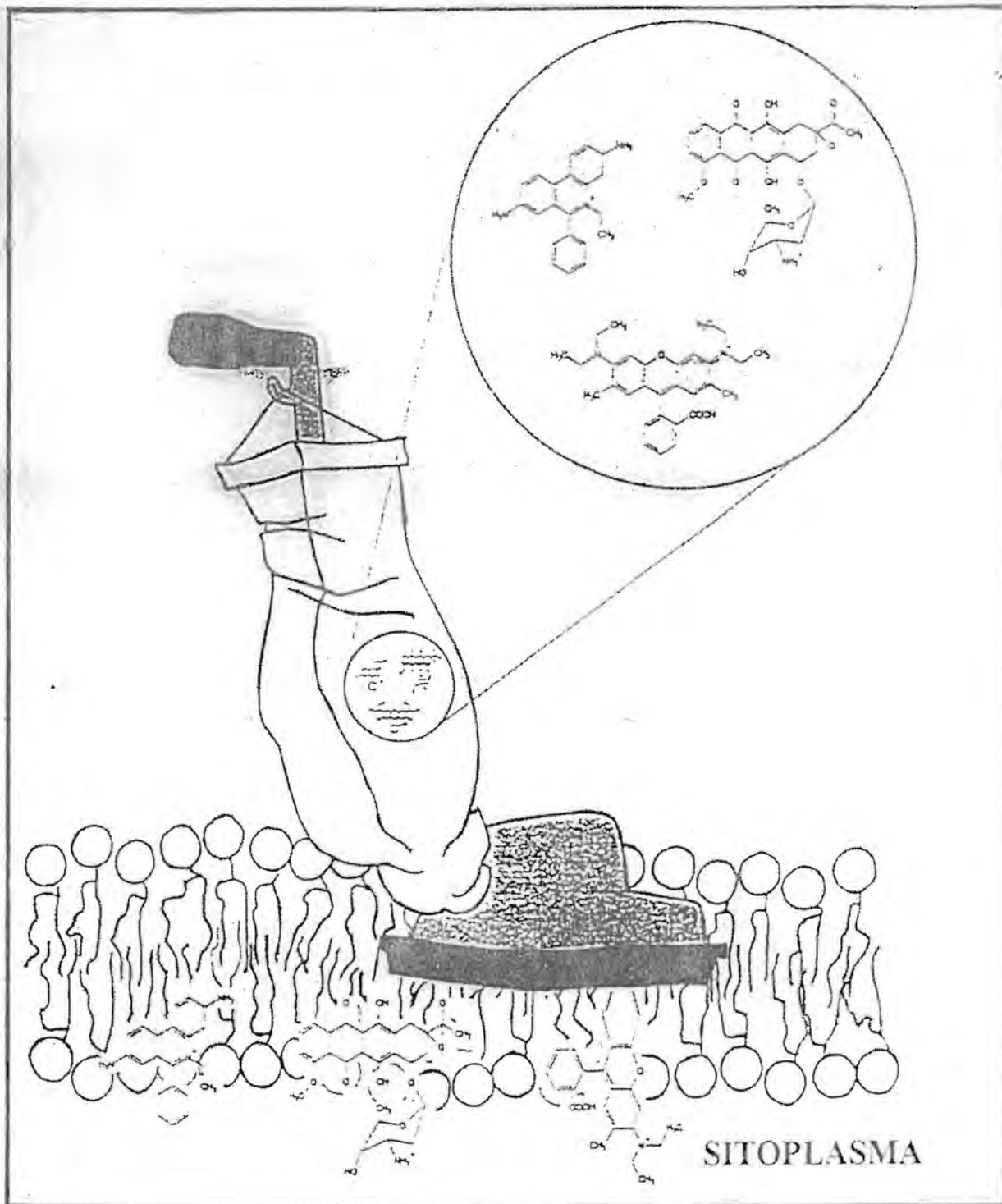


### 2.5.1.2. Modelle waarin P-gp die geneesmiddels vanuit die selmembraan verwyder

Soos reeds genoem, is anti-kanker geneesmiddels, wat in staat is om as substrate vir P-gp op te tree, hoofsaaklik kationiese, lipied oplosbare, planêre verbindings. Hierdie anti-kanker geneesmiddel molekules interkalleer, as gevolg van hul chemiese samestelling, maklik in die dubbel lipiedlae van selmembrane. Die interkallering van die anti-kanker geneesmiddels in die lipiedfases van die selmembrane, is feitlik 'n voorvereiste vir die geneesmiddel om sy intrasellulêre teikengebied te bereik. Op grond van hierdie affiniteit van anti-kanker geneesmiddels om met die selmembrane te interreageer, is twee verdere modelle vir die werking van P-gp voorgestel. In hierdie twee modelle bind die anti-kanker geneesmiddels direk aan P-gp in die selmembraan en word dan aktief deur die P-gp molekules uit die selmembrane verwyder. Hierdie twee modelle staan onderskeidelik as die “hidrofobiese stofsuiër” model sowel as die “flippase” model bekend (Figuur 2.2B en C). Die primêre interaksie in die “hidrofobiese stofsuiër” model sowel as die “flippase” model vind dus nie tussen die anti-kanker geneesmiddels en P-gp plaas nie, maar tussen die anti-kanker geneesmiddels en die selmembrane van die teikenselle [Higgins & Gottesman, 1992; Bolhuis *et al*, 1997]. In hierdie twee modelle interreageer P-gp met die MDR-geassosieerde anti-kanker geneesmiddels, nadat hierdie anti-kanker geneesmiddels in die selmembrane van MDR selle ingebed is en verwyder sodoende die geneesmiddels direk vanuit die selmembrane van MDR selle nog voordat dit die sitoplasma van die MDR selle kan bereik. Hiermee word nie geïmpliseer dat P-gp glad nie geneesmiddels vanuit die sitoplasma van MDR selle kan verwyder nie.

#### 2.5.1.2.1. Die hidrofobiese stofsuiër model

In hierdie model tree P-gp as 'n “hidrofobiese stofsuiër” in die selmembrane van MDR selle op deur anti-kanker geneesmiddels direk vanuit die binneste en/of buitenste lipiedlae van selmembrane van MDR selle “op te suig” en na die ekstrasellulêre medium te verwyder (Figuur 2.2B; Figuur 2.3) [Higgins & Gottesman, 1992; Bolhuis *et al*, 1997]. P-gp verhoed sodoende dat anti-



Figuur 2.3: Hidrofobiese stofsuiër model. Tydens hierdie model word hidrofobiese geneesmiddels vanuit die binneste lipiedlaag van die fosfolipied dubbellaag verwyder.



kanker geneesmiddels intrasellulêr in MDR selle akkumuleer [Raviv *et al*, 1990; Higgins & Gottesman, 1992]. Hierdie model is deur twee onafhanklike studies ondersteun [Raviv *et al*, 1990; Homolya *et al*, 1993].

Iodonaftaleen-1-azied (INA) is 'n lipofiliese verbinding wat in staat is om aan membraan proteïene wat in die lipiedfase van selmembrane ingebed is, te bind [Higgins & Gottesman, 1992]. [<sup>125</sup>I] INA word deur 'n spesifieke energie oordragsproses, wat as fotosensitiserings bekend staan, gefoto-aktiveer. 'n Groot verskeidenheid chromofore, insluitend doksorubisien en rodamiën 123, kan as foto-sensitiseerders vir hierdie proses optree. Deur van spesifieke chromofore gebruik te maak, kan hierdie tegniek (foto-gesensitiseerde [<sup>125</sup>I]INA merking) gebruik word om spesifieke chromofoor-bevattende proteïene in selmembrane te merk [Raviv *et al*, 1990]. Dieselfde outeurs het ook gevind dat doksorubisien-bemiddelde foto-aktivering van [<sup>125</sup>I]INA tot die spesifieke merking van P-gp in die selmembrane van MDR selle, lei. Verskeie membraan proteïene is daarenteen nie-spesifiek deur die foto-geaktiveerde INA in geneesmiddel-sensitiewe selle gemerk [Raviv *et al*, 1990].

Die mate waarteen die doksorubisien-geïnduseerde [<sup>125</sup>I]INA merking van P-gp in MDR selle plaasvind, is merkwaardig spesifiek (ongeveer 70%). 'n Moontlike verduideliking van hierdie hoë spesifieke geneesmiddel-geïnduseerde merking van P-gp deur INA, is dat die MDR-geassosieerde geneesmiddels, soos doksorubisien, feitlik altyd met die mees hidrofobiese gedeeltes van selmembrane assosieer. Dit is bekend dat die grootste gedeelte van die P-gp molekule hidrofobies is en in die lipied fase van die selmembraan ingebed is. Die geneesmiddel bindings-gebiede van P-gp besit ook 'n hoë bindingsaffiniteit vir hidrofobiese geneesmiddels. Hierdie hoë bindingsaffiniteit van P-gp vir hidrofobiese geneesmiddels veroorsaak dat die hidrofobiese anti-kanker geneesmiddels eerder aan P-gp as aan ander gebiede in die selmembraan, bind. Na binding van die geneesmiddels aan P-gp, verwyder die P-gp molekules die anti-kanker geneesmiddels uit die



selmembraan voordat dit die sitoplasma van die sel kan bereik. Laasgenoemde stelling is deur die waarneming dat verapamil, 'n MDR omkerings verbinding, in staat is om die geneesmiddel-spesifieke INA merking van P-gp te inhibeer, bevestig. P-gp tree dus as 'n "stofsuijer" in die selmembrane van MDR selle op, deurdat dit die hidrofobiese molekules direk vanuit die selmembrane van MDR selle verwyder. Die gevolg van hierdie "stofsuijer" werking van P-gp is dat baie lae vlakke van die anti-kanker geneesmiddels, soos doksorubisien, in die sitoplasma van MDR selle aangetref word [Raviv *et al*, 1990].

**Homolya *et al* (1993)** het die opname van die fluoresserende kleurstowwe, Fura-2 sowel as bis(karboksi-etiel)karboksiefluoressien (BCECF), deur MDR selle ondersoek. Fura-2 sowel as BCECF is lipofiliese kleurstowwe en in staat om maklik oor die selmembraan tot in die sitoplasma van selle te diffundeer, waar dit deur esterases tot ge-esterifiseerde derivate omgeskakel word. Hierdie ge-esterifiseerde verbindings besit groot elektriese ladings en diffundeer, as gevolg van hierdie ladings, baie moeilik terug oor die selmembraan. Die tempo waarteen hierdie ge-esterifiseerde derivate passief uit die selle diffundeer is byna dieselfde vir MDR sowel as geneesmiddel-sensitiewe selle. Die tempo van intrasellulêre akkumulering van die ge-esterifiseerde derivate is daarenteen, ten spyte van bogenoemde waarnemings, noemenswaardig laer in MDR as in die geneesmiddel-sensitiewe selle. 'n Moontlike verklaring vir hierdie waarneming is dat P-gp 'n groot bindingsaffiniteit vir hierdie lipofiliese kleurstowwe besit. Die kleurstowwe bind daarom moontlik direk aan die P-gp molekules in die selmembraan en word sodoende deur P-gp uit die selmembrane van MDR selle verwyder voordat dit die sitoplasma van die selle kan bereik. Verapamil was in hierdie studie in staat om die vermoë van MDR selle om die ge-esterifiseerde derivate intrasellulêr te akkumuleer, te herstel [Homolya *et al*, 1993].

#### 2.5.1.2.2. Die flippase model

In die "flippase" model word die aanname gemaak dat die spontane beweging

van molekules en membraan lipiede, van die een lipiedlaag na die ander lipiedlaag in die selmembraan (“flipping”), baie stadig plaasvind. Dit is ook heel waarskynlik die geval, aangesien dit bekend is dat die uitruiling van fosfolipiede en ander gelaaide molekules tussen die twee lipiedlae van selmembrane ‘n stadige proses is, met halfleef-tye in die orde van ure of selfs dae. Indien die tempo waarmee die geneesmiddels spontaan van die een lipiedlaag na die ander lipiedlaag beweeg stadig plaasvind en die anti-kanker geneesmiddels wat in elke lipiedlaag ingebed is, in ewilibrum met die naasliggende (ooreenstemmende) waterige fase van die lipiedlaag is, sal die netto resultaat van die P-gp-bemiddelde vervoer (“flipping”) van geneesmiddels van die binneste na die buitenste lipiedlaag van MDR selmembrane, ‘n verlaging van die intrasellulêre konsentrasie van die anti-kanker geneesmiddel in MDR selle tot gevolg hê. Hierdie verlaging in die intrasellulêre konsentrasie van die anti-kanker geneesmiddels lei gevolglik tot ‘n toename in die anti-kanker geneesmiddel konsentrasie in die eksterne medium [**Higgins & Gottesman, 1992**].

Daar is verskeie eksperimentele data wat die stelling dat anti-kanker geneesmiddels direk vanuit die lipiedfase van selmembrane met P-gp kan interreageer, ondersteun. Die data wat tot die “hidrofobiese stofsuijer” model aanleiding gegee het, ondersteun onder andere ook hierdie stelling. Buiten die data wat tot die “hidrofobiese stofsuijer” model aanleiding gegee het, het verskeie ander studies ook die “flippase” model as ‘n moontlike verklaring van die werking van P-gp, ondersteun. **Shapiro & Ling (1995)** het gevind dat fluoresserende MDR substrate, soos Hoechst 33342, aktief deur P-gp uit proteoliposomale membrane, wat gesuiwerde P-gp bevat, verwyder word. Hoechst 13342 bind spesifiek aan die fosfolipied dubbellaag van selmembrane [**Bolhuis et al, 1997**].

Daar is ook gevind dat dat verbindings, soos rhodamien 123 en daunorubisien, meestal in die lipiedfase van selmembrane van geneesmiddel-sensitiewe selle



aangetref word. In teenstelling hiermee word hierdie verbindings hoofsaaklik in die ekstrasellulêre waterige omgewing van die MDR selle aangetref. P-gp kan ook direk met hidrofobiese verbindings, soos radio-aktiewe forskolien, gemerk word. Weens forskolien se hoë mate van lipofilisiteit, los hierdie verbinding maklik in die lipiede van selmembrane op en is dit 'n effektiewe merker van die geneesmiddel bindingsgebiede op die P-gp molekule. Verder is gevind dat derivate van forskolien, met 'n hoër graad van lipofilisiteit, in staat is om baie meer effektief aan P-gp te bind [**Higgins & Gottesman, 1992**]. Die “flippase” model is ook deur 'n onlangse bevinding dat die MDR2 geen produk, 'n fosfatidielcholien translokase (flippase) is, ondersteun. Hierdie fosfatidielcholien translokase is noodsaaklik vir die uitskeiding van fosfatidielcholien vanuit die hepatiese selmembraan in die gal [**Gottesman et al, 1996**].

Die mees oortuigende bewyse dat die geneesmiddels direk vanuit die selmembrane deur MDR transporters, soos P-gp, verwyder word, is deur **Bolhuis et al (1996a,b)** verskaf. Hierdie navorsers het getoon dat die laktokokkale MDR transporters, Lmr A sowel as Lmr P, die hoogs hidrofobiese, kationiese, fluoresserende membraan merkers, 1-[4-(trimetielamino)feniel]-6-fenielheksa-1,3,5-trien (TMA-DPH) sowel as N-*p*-{6-feniel-[1,3,5-heksatrieniel(feniel-propiel)]}trimetielamonium (TMAP-DPH), direk vanuit die binneste lipiedlaag na die eksterne medium verwyder. Die neutrale difenielheksatrien (DPH) verbinding, 1-[4-dimetielamino)feniel]-6-fenielheksa-1,3,5-trien ) (DMA-DPH) sowel as die anioniese DPH derivaat 1,6-difenielheksa-1,3,5-trien karbosielsuur (CA-DPH), is egter nie deur die MDR transporters uit die selmembraan verwyder nie [**Bolhuis et al, 1997**].

Die ongewone groot verskeidenheid substrate wat in staat is om spesifiek aan P-gp te bind, kan moontlik deur die “flippase” model verklaar word. Volgens hierdie model is die primêre bepalende faktor vir P-gp substraat spesifisiteit, die vermoë van die substraat om genoegsaam in die lipied dubbellaag van



selmembrane te interkaleer. Tweedens is die interaksie van die substraat met die substraat-bindingsgebiede op P-gp, ook 'n belangrike bepalende faktor vir die substraat spesifisiteit van P-gp. Hierdie tweeledige herkenningse meganisme stel die substraat bindingsgebiede op P-gp in staat om relatief nie-spesifiek te wees, aangesien toegang tot die geneesmiddel bindingsgebied van P-gp tot substrate wat in staat is om genoegsaam in die lipied dubbelle van selmembrane te interkaleer, beperk sal wees [Higgins & Gottesman, 1992].

Die "flippase" model kan moontlik ook die ongewone kinetika van geneesmiddel transport in P-gp-positiewe MDR selle verklaar. Indien die anti-kanker geneesmiddels direk vanuit die selmembrane van MDR selle deur P-gp verwyder word, is die werklike konsentrasie van die anti-kanker geneesmiddels wat deur P-gp waargeneem word onbekend, aangesien die aantal anti-kanker geneesmiddel molekules wat in die selmembrane van MDR selle opgelos is en gevolglik deur P-gp vervoer kan word, van die konsentrasie van die anti-kanker geneesmiddel wat ekstern toegedien is, sal verskil. Die komplekse ewilibraria wat tussen geneesmiddels in die waterige fases (beide intra-sowel as ekstrasellulêr) en geneesmiddels in die lipied fase voorkom, lei tot komplekse kinetiese parameters. Hierdie komplekse kinetiese parameters bemoeilik die interpretasie van data wat vanaf P-gp-bemiddelde geneesmiddel transport studies verkry is. 'n Voorbeeld hiervan is dat, indien twee anti-kanker geneesmiddels se graad van lipied oplosbaarheid van mekaar verskil, die relatiewe konsentrasies van die onderskeie anti-kanker geneesmiddels wat by 'n toets sisteem gevoeg is nie noodwendig die relatiewe konsentrasie soos deur die P-gp waargeneem word, weergee nie. Verskille in die vermoë van anti-kanker geneesmiddels om in die lipiedlae van die selmembrane te akkumuleer, mag moontlik die verskille in weerstandbiedende profiele wat vir P-gp-bemiddelde MDR in verskillende sellyne waargeneem is, verklaar. Die rede hiervoor is dat die lipied samestelling van selmembrane tussen die verskillende sel tipes, varieer. Die lipied samestelling van selmembrane speel ook 'n rol in die mate van akkumulering van verbindings in die selmembrane. Verder bepaal

die lipied samestelling van die selmembrane ook die spesifieke aktiwiteit van P-gp. Indien menslike P-gp in inekselle, waarvan die membraan lipied samestelling van diè van soogdier selle verskil, uitgedruk word, kan P-gp nog steeds deur [<sup>3</sup>H]azidopien gemerk word, maar is die relatiewe vermoë van vinblastien en daunorubisien om vir die binding aan P-gp te kompeteer, omgekeerd as wat in menslike selle waargeneem is [Higgins & Gottesman, 1992].

Kritiek teen die “flippase” model is dat die oktanol/water partissie koëffisiënte, dit wil sê die lipofilisiteit van die anti-kanker geneesmiddels wat aktief deur P-gp uit die selle verwyder word, gewoonlik baie hoog is. Termodinamika van hierdie hoogs lipofiliese geneesmiddel-transport in MDR selle begunstig daarom eerder die terugwaartse beweging van die anti-kanker geneesmiddels, wat deur P-gp na die buitenste lipiedlaag van die selmembraan vervoer is, terug na die binneste lipiedlaag van die selmembraan eerder as die uitwaartse beweging van hierdie geneesmiddels na die ekstrasellulêre omgewing van die sel. 'n Verdere faktor wat hierdie terugwaartse beweging van die anti-kanker geneesmiddels na die intrasellulêre omgewing van die sel bevoordeel, is die feit dat die anti-kanker geneesmiddel konsentrasie waarskynlik hoër buite die sel as in die sel is [Roepe, 1995]. Die natuurlike neiging, tydens die beweging van verbindings, is om eerder van die hoër konsentrasie na die laer konsentrasie te beweeg.

## 2.5.2. Indirekte transport modelle

### 2.5.2.1. Die “veranderde partissie” model

Sommige navorsers het waargeneem dat die oormatige uitdrukking van P-gp in MDR selle, tot veranderings in die intrasellulêre pH en/of membraan potensiaal van hierdie selle lei. Hierdie waarnemings het tot die “veranderde partissie” model as meganisme van werking van P-gpe, aanleiding gegee [Roepe, 1995; Gottesman *et al*, 1996]. Volgens hierdie model beïnvloed die P-gp-geïnduseerde veranderings in die membraan potensiaal en/of intrasellulêre pH, die sellulêre



verdeling van die anti-kanker geneesmiddels in MDR selle. P-gp veroorsaak dus op 'n indirekte wyse 'n verlaging in die intrasellulêre akkumulering van anti-kanker geneesmiddels in MDR selle [**Gottesman *et al*, 1996**].

Sommige P-gp-positiewe geneesmiddel weerstandbiedende tumor selle (soos menslike long tumor selle), besit verhoogde intrasellulêre pH vlakke indien dit met die intrasellulêre pH vlakke van die geneesmiddel-sensitiewe selle vergelyk word. Die graad van MDR sowel as die mate van P-gp uitdrukking korreleer met hierdie relatiewe alkalinisering van MDR selle. Daar is voorgestel dat die oormatige uitdrukking van P-gp in MDR selle vir die verhoging in die intrasellulêre pH in die MDR selle verantwoordelik is, deurdat die P-gp molekules 'n indirekte of direkte rol tydens die regulering van die intrasellulêre pH van die MDR, speel. Navorsers het onder andere voorgestel dat P-gp 'n onbekende, geprotoneerde, endogene substraat oor die selmembrane van MDR selle vervoer. Hierdie P-gp-bemiddelde aktiewe uitwaartse transport van die endogene substraat uit die MDR selle, lei tot 'n netto uitvloei van  $H^+$  ione uit die selle, wat tot die intrasellulêre alkalinisering van die P-gp-positiewe MDR selle lei [**Roepe, 1995**].

'n Verhoogde intrasellulêre pH is egter nie in alle MDR selle waargeneem nie. Daar is ook gevind dat die intrasellulêre pH van sommige MDR selle verlaag is, indien dit met die intrasellulêre pH van die ooreenstemmende geneesmiddel-sensitiewe selle vergelyk word. In ander MDR sellyne is daar weer geen noemenswaardige verskille tussen die intrasellulêre pH van die MDR selle en geneesmiddel-sensitiewe selle waargeneem nie. Hierdie waarnemings stel voor dat sommige kanker selle, sonder enige veranderinge in hul intrasellulêre pH, veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid kan ontwikkel [**Roepe, 1995**].

**Hasmann *et al* (1989)** het gevind dat die membraan potensiale van geneesmiddel-sensitiewe en MDR selle van mekaar verskil. Die membraan potensiale van MDR selle was oor die algemeen laer as die membraan potensiale wat in geneesmiddel-



sensitiewe selle waargeneem is [Hasmann *et al*, 1989; Roepe, 1995]. Hierdie verlaging van die membraan potensiale van MDR selle korreleer met die graad van P-gp uitdrukking in hierdie selle. Eksperimente met MDR getransfekteerde selle, wat nie voorheen aan anti-kanker geneesmiddels blootgestel is nie, het getoon dat die verlaagde membraan potensiale van MDR selle, direk aan die oormatige uitdrukking van P-gp in die selmembrane van hierdie selle te danke is [Roepe, 1995].

Die verband wat tussen die verhoogde uitdrukking van P-gp en die verlaging in die membraan potensiaal van MDR selle waargeneem is, kan as volg verklaar word [Hasmann *et al*, 1989]. Dit is bekend dat die selektiewe deurlaatbaarheid van eukariotiese selle vir kalium ione een van die vernaamste faktore in die handhawing van die membraan potensiaal oor die selmembrane van eukariotiese selle is [Hasmann *et al*, 1989; Rabinovitch & June, 1990]. Dit is ook goed bekend dat 'n hoë intrasellulêre kalium konsentrasie tot 'n verlaging in die membraan potensiaal van eukariotiese selle lei. Dit is gevolglik moontlik dat die oormatige uitdrukking van P-gp in die selmembrane van P-gp-positiewe MDR selle tot 'n veranderde deurlaatbaarheid vir kalium ione in hierdie selle lei, wat weer tot die veranderings in die membraan potensiale van hierdie selle kan lei [Hasmann *et al*, 1989].

Die meganisme wat vir die P-gp-bemiddelde veranderings in die intrasellulêre pH en/of membraan potensiaal van MDR selle verantwoordelik is, is nog nie heeltemal duidelik nie. Die oormatige uitdrukking van P-gp kan op verskeie wyses tot veranderings in die biofisiese/biochemiese eienskappe van selle lei. Hierdie meganismes sluit direkte ioon transport deur P-gp, regulering van ioon transport deur P-gp, die betrokkenheid van P-gp in 'n outokriene pad wat die transport van ATP benodig en/of selfs lipied transport, in [Wadkins & Roepe, 1997].

Meeste van die verskeidenheid waarnemings wat tot die verskillende modelle

aanleiding gegee het, kan verklaar word indien P-gp meer as een meganisme van werking besit [Wadkins & Roepe, 1997]. Gill *et al* (1992) het getoon dat P-gp chloried-kanaal aktiwiteit besit. Verhoogde geleiding van chloried ione, kan ook tot 'n verlaging in die membraan potensiaal van selle lei. Die verband wat tussen die verlaging in die membraan potensiaal in MDR selle en die oormatige uitdrukking van P-gp in hierdie selle waargeneem is, kan daarom ook moontlik aan die chloried kanaal aktiwiteit van P-gp toegeskryf word. Daar is ook gevind dat die relatiewe Cl<sup>-</sup> spesifieke intrasellulêre pH regulerende meganismes in MDR selle van die ooreenstemmende Cl<sup>-</sup> spesifieke intrasellulêre pH regulerende meganismes in geneesmiddel-sensitiewe selle verskil. Die omvang van hierdie verskille tussen die Cl<sup>-</sup> spesifieke intrasellulêre pH regulerende meganismes van geneesmiddel-sensitiewe en MDR selle, het met die verskil in intrasellulêre pH wat tussen hierdie twee seltepes waargeneem is, gekorreleer. 'n Ander interessante waarneming wat in MDR selle gemaak is, is dat anioon uitruilers, soos Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, teen hoër vlakke in MDR selle as in geneesmiddel-sensitiewe selle uitgedruk word. Anioon uitruilers lei tot 'n verlaging in die intrasellulêre pH van selle [Roepe, 1995].

Baie anti-kanker geneesmiddels tree as hidrofobiese, kationiese swak basisse op. Dit is bekend dat die sellulêre verdeling en verspreiding van hidrofobiese, gelaaide swak basisse grootliks deur veranderings in die membraan potensiaal sowel as intrasellulêre pH van selle, beïnvloed word [Roepe, 1995]. Speeg *et al* (1992) het die intrasellulêre akkumulering van verskeie organiese katione in CHRC5 MDR selle ondersoek en gevind dat die organiese kationiese verbindings, soos proka-uramid, teen hoër vlakke in die geneesmiddel-sensitiewe selle as in MDR selle akkumuleer. Hierdie verskil in die intrasellulêre akkumulering tussen die geneesmiddel-sensitiewe en MDR selle is aan die hoër intrasellulêre pH van die MDR selle toegeskryf. In sommige gevalle kan veranderings in die intrasellulêre pH ook die hoeveelheid beskikbare teikengebiede waaraan anti-kanker geneesmiddels in die MDR selle bind, beïnvloed. Veranderings in oppervlak potensiale beïnvloed ook die tempo van binding van anti-kanker



geneesmiddels aan die selmembrane van teikenselle sowel as die diffusie van hierdie anti-kanker geneesmiddels oor die selmembrane [Roepe, 1995]. Die rede hiervoor is dat die elektries, negatiewe membraan potensiaal van eukariotiese MDR selle as dryfkrag vir die aantrekking en retensie van sekere lipofiliese, positief-gelaaide anti-kanker geneesmiddels in MDR selle, dien [Hasmann *et al*, 1989; Roepe, 1995]. Dit is dus moontlik dat veranderinge in die membraan potensiaal en/of intrasellulêre pH van MDR selle tot 'n verlaging in die akkumulering van positief-gelaaide geneesmiddels in MDR selle kan lei [Hasmann *et al*, 1989].

Al bogenoemde waarnemings het tot die “veranderde partissie” model, as alternatief vir die P-gp “geneesmiddel uitwaartse pomp” model, aanleiding gegee. Hierdie model argumenteer dat die P-gp “geneesmiddel uitwaartse pomp” model eerder 'n ooreenvoudiging, as 'n werklike fisiese verduideliking, van die meganisme van werking van P-gp is. Die oormatige uitdrukking van P-gp lei, volgens die “veranderde partissie” model, hoofsaaklik tot veranderinge in die membraan potensiaal en/of intrasellulêre pH van die P-gp-positiewe MDR selle. Hierdie veranderinge in die membraan potensiaal en/of intrasellulêre pH kan die intrasellulêre akkumulering van anti-kanker geneesmiddels in MDR selle op verskeie wyses beïnvloed. Dit kan tot (1) 'n toename in die tempo van uitwaartse transport van anti-kanker geneesmiddels lei, (2) veranderinge in die karakter-eienskappe van die selmembraan (soos verspreiding van lipiede in die selmembraan) veroorsaak, (3) die ewilibrum betrokke by die sellulêre verdeling en verspreiding van swak basis geneesmiddels in die selmembraan verander sowel as (4) 'n invloed op die hoeveelheid beskikbare anti-kanker geneesmiddel teikengebiede waaraan die anti-kanker geneesmiddels kan bind, hê. Veranderinge in die membraan potensiaal kan byvoorbeeld die organisering van tubulien naby die oppervlak van die selmembraan beïnvloed. Hierdie veranderinge in tubulien organisering kan die intrasellulêre akkumulering van anti-mitotiese geneesmiddels, soos colchisien en vinblastien, beïnvloed. Die netto resultaat van 'n kombinasie van hierdie gebeurtenisse in MDR selle, is 'n betekenisvolle



afname in die intrasellulêre akkumulering van anti-kanker geneesmiddels in die MDR selle. P-gp beïnvloed, dus volgens hierdie model, die transport van die anti-kanker geneesmiddels oor die selmembrane van MDR selle indirek, maar pomp nie die anti-kanker geneesmiddels direk uit die MDR selle uit nie [Roepe, 1995].

Verskille in geneesmiddel weerstandbiedende profiele in verskillende MDR sellyne kan moontlik deur die “veranderde partissie” model verklaar word. Veronderstel dat by ‘n gegewe graad van wilde-tipe P-gp uitdrukking in ‘n sekere MDR sel tipe die selmembraan met 15 mV depolariseer, dit wil sê die membraan potensiaal met 15 mV verlaag word. Terselfdertyd word die intrasellulêre pH in hierdie MDR selle met 0.15 pH eenhede verhoog. Daarenteen beïnvloed die oormatige uitdrukking van mutante P-gp hierdie parameters teen onderskeidelik 10 mV en 0.05 pH eenhede in ‘n ander MDR sel tipe. Die graad van uitdrukking van die mutante P-gp is dieselfde as die uitdrukking van die wilde-tipe P-gp in die onderskeie sellyne. Dit is bekend dat veranderinge in onderskeidelik die membraan potensiaal en intrasellulêre pH verskillende invloede op die transport van anti-kanker geneesmiddels oor selmembrane uitoefen. Veranderinge in die membraan potensiaal het byvoorbeeld ‘n groter uitwerking op die vervoer van vinka alkaloiëde as antrasikliene oor die selmembrane van MDR selle. Daarenteen het veranderinge in die intrasellulêre pH van selle weer ‘n groter invloed op die sellulêre verdeling van antrasikliene as vinka alkaloiëde in MDR selle. Indien veranderinge in beide die intrasellulêre pH en membraan potensiaal van selle tot geneesmiddel weerstandbiedendheid bydra, kan die verskillende invloede wat P-gp molekules op hierdie parameters (intrasellulêre pH en membraan potensiaal) uitoefen, tot verskillende geneesmiddel weerstandbiedende profiele in die verskillende tipes MDR sellyne lei [Roepe, 1995].

Soos reeds genoem, is P-gp-geïnduseerde veranderinge in die membraan potensiaal en/of intrasellulêre pH van MDR selle nie in alle MDR selle waargeneem nie. Dit is een van die vernaamste redes waarom navorsers die “veranderde partissie” model nie so goed soos die “geneesmiddel uitwaarde

pomp” model as meganisme van werking van P-gp, ondersteun nie. ‘n Ander rede waarom die “veranderde partissie” model minder gewild as die “geneesmiddel uitwaartse pomp” model is, is die waarneming dat die mate van intrasellulêre pH en/of membraan potensiaal veranderings in die MDR selle nie groot genoeg is om die graad van geneesmiddel weerstandbiedendheid in sommige van hierdie MDR selle te verklaar nie [Gottesman *et al*, 1996]. Daar is ook waargeneem dat MDR chemosensitiseerders geen invloed op die veranderings in die intrasellulêre pH wat in sommige MDR selle waargeneem is, het nie. Daar kan ook nie huidiglik met sekerheid gesê word dat die veranderings in die intrasellulêre pH van MDR selle, aan die oormatige uitdrukking van P-gp toegeskryf kan word nie [Roepe, 1995]. Die veranderings in die membraan potensiaal en die intrasellulêre pH van MDR selle mag moontlik die gevolg van die verlengde seleksie van die selle in die teenwoordigheid van sitotoksiese geneesmiddels wees [Gottesman *et al*, 1996]. Die veranderings in die intrasellulêre pH van MDR selle het dus nie noodwendig iets met die voorkoms van geneesmiddel weerstandbiedendheid in die MDR selle te doen nie [Roepe, 1995]. Die moontlikheid dat pH en membraan potensiaal veranderings in sommige selle wel tot MDR bydra kan egter nie heeltemal uitgesluit word nie [Gottesman *et al*, 1996].



## HOOFSTUK 3

### FARMAKOLOGIESE OMKERING VAN MDR

#### 3.1. Inleiding

MDR is 'n groot en belangrike struikelblok in die doeltreffende behandeling van kanker pasiente. Een van die vernaamste doelwitte tydens die bestudering van P-gp-bemiddelde MDR is om 'n spesifieke manier te vind om MDR te voorkom of te oorkom [Ford & Hait, 1994; Sonneveld & Wiemer, 1997]. Een so 'n wyse wat aktief nagevors word, is die farmakologiese omkering van MDR. Die ideale behandelingsprotokol vir kanker pasiente sal uit standaard chemoterapeutiese geneesmiddels sowel as geneesmiddels wat in staat is om MDR om te keer, bestaan [Fan *et al*, 1994; Sikic *et al*, 1997; Sonneveld & Wiemer, 1997]. Daar word daarom voortdurend gepoog om die bestaande chemoterapeutiese behandelingsprotokolle wat tydens die behandeling van kankers gebruik word, te verbeter.

Die ideale chemosensiteerder moet in staat wees om die sitotoksiteit van chemoterapeutiese geneesmiddels selektief vir die weerstandbiedende tumor selle te verbeter, sonder om die gasheer nadelig te beïnvloed. Verder sal 'n chemosensitiseerder slegs klinies bruikbaar wees indien dit MDR effektief by klinies haalbare konsentrasies kan omkeer. Dit is ook belangrik dat die chemosensitiseerder-bemiddelde verhoogde toksisiteit van anti-kanker geneesmiddels, nie met 'n soortgelyke verhoging in geneesmiddel toksisiteit vir normale selle gepaard gaan nie [Ford, 1995].

Die eerste stap in die ontwikkeling van geneesmiddels wat in staat is om MDR farmakologies om te keer, is die *in vitro* toetsing van potensiële verbindings deur van weerstandbiedende weefselkultuur sellyne gebruik te maak [Lum *et al*, 1993; Ford, 1995]. Indien die *in vitro* studies belowende resultate oplewer, word voort gegaan om die verbinding *in vivo* te toets. Die *in vivo* studies behels hoofsaaklik eksperimente met dierlike tumor modelle sowel as kliniese proewe met kanker pasiente. Die *in vivo* toetsing van verbindings verskaf meer inligting oor belangrike farmakologiese aspekte van die verbindings [Ford, 1995]. Die meeste farmakokinetiese eienskappe kan nie akkuraat in *in vitro* eksperimente ondersoek word nie. Hierdie farmakologiese aspekte behels onder



andere die bio-beskikbaarheid, die verspreiding, die plasma konsentrasie, die metabolisme, die uitskeiding en die toksokologiese spektrum van die verbinding. Farmakologiese faktore moet veral tydens die ekstrapolering van *in vitro* resultate na *in vivo* omstandigheide in ag geneem word [Lum *et al*, 1993].

**Tsuruo en medewerkers (1981)** was die eerste groep navorsers wat aangetoon het dat MDR *in vitro* farmakologies omgekeer kan word. Hierdie navorsers het gerapporteer dat die geneesmiddels, verapamil en trifluoperasien, die intrasellulêre akkumulering van vinkristien in 'n MDR muis leukemie sellyn verhoog. Die toename in die intrasellulêre akkumulering van vinkristien het daartoe bygedra dat die anti-proliferatiewe aktiwiteit van vinkristien in hierdie selle toegeneem het [Tsuruo *et al*, 1981; Ford & Hait, 1994]. Verapamil bly vandag steeds 'n belangrike standaard verbinding waarteen die doeltreffendheid van ander chemosensitiseerders asook die meganisme van werking van die ander chemosensitiseerders vergelyk kan word [Ford, Yang & Hait, 1996]. Sedert die waarneming deur Tsuruo *et al* (1981) is verskeie farmakologiese verbindings wat in staat is om MDR *in vitro* om te keer, geïdentifiseer [Ford & Hait, 1994; Sonneveld & Wiemer, 1997]. Hierdie verbindings staan ook as chemosensitiseerders of MDR moduleerders bekend [Ford, Yang & Hait, 1996]. Die meeste chemosensitiseerders is *in vitro* geïdentifiseer en kan breedweg in sewe kategorieë verdeel word. Hierdie kategorieë is: (a) kalsium kanaal blokkeerders, (b) kalmodulin antagonist, (c) nie-sitotoksiese antrasiklien en vinka alkaloid analoë, (d) steroïede en hormonale antagonist, (e) siklosporiene, (f) dipiridamol en (g) verskeie ander hidrofobiese, kationiese verbindings [Ford & Hait, 1994; Sonneveld & Wiemer, 1997]. Al hierdie chemosensitiseerders is lipofiliese verbindings en baie van hierdie verbindings is heterosikliese, positief gelaaiete verbindings by 'n neutrale pH [Ford, Yang & Hait, 1996]. Meeste van hierdie chemosensitiseerders verhoog die intrasellulêre akkumulering van die anti-kanker geneesmiddels in MDR selle, maar het min of geen effek op die intrasellulêre akkumulering van anti-kanker geneesmiddels in geneesmiddel-sensitiewe selle nie [Ford, 1995].

Die identifisering van farmakologiese verbindings wat in staat is om MDR *in vitro* om te

keer, het die hoop tussen navorsers en geneeshere laat opvlam dat kliniese weerstandbiedendheid in menslike tumore moontlik oorkom kan word deur die chemosensitiseerders saam met die standaard chemoterapeutiese geneesmiddels aan pasiente toe te dien [Ford, 1995]. Verapamil was die eerste MDR moduleerder wat klinies bestudeer is [Lum *et al*, 1993]. Verskeie ander chemosensitiseerders is ook daarna klinies vir hul vermoë om MDR in weerstandbiedende pasiente om te keer, bestudeer [Tsuruo, 1989; Fan *et al*, 1994]. Hierdie verbindings sluit dexverapamil, diltiazem, amiodaroon, quinidien, quiniën, trifluoperasien, prohorperasien, steroïede, tamoksifen, toremifeen en siklosporiene, in [Lum *et al*, 1993; Ford & Hait, 1994; Ford, Yang & Hait, 1996; Sonneveld & Wiemer, 1997].

Hierdie chemosensitiseerders is met gemengde sukses in kliniese proewe getoets [Ford, 1995; Sonneveld & Wiemer, 1997]. Daar bestaan hoofsaaklik twee redes vir die teleurstellende resultate wat *in vivo* verkry is. Eerstens kan die farmakokinetiese eienskappe van 'n verbinding nie in *in vitro* bepalings ondersoek word nie. Farmakokinetiese eienskappe kan tot groot verskille tussen *in vitro* en *in vivo* resultate lei. Die mate waarteen die chemosensitiseerders aan proteïene in die serum bind, speel byvoorbeeld 'n belangrike rol in die bio-beskikbaarheid van die chemosensitiseerders vir die teiken-sel. Weefselkultuur-media in *in vitro* eksperimente bevat gewoonlik geen of relatiewe lae (10% - 20% volume/volume) serum proteïen konsentrasies. Chemosensitiseerders, wat 'n lae graad van proteïen binding in menslike plasma toon, sal *in vitro* sowel as in *in vivo* omstandighede min of meer dieselfde mate van MDR omkerings aktiwiteit toon. Die rede hiervoor is dat verbindings wat 'n lae mate van proteïen binding toon in toestande waar geen serum aanwesig is nie, sowel as in 'n omgewing met 'n hoë serum konsentrasie, beskikbaar is om vrylik oor die selmembraan na die intrasellulêre omgewing van die sel te diffundeer. Hierdie geneesmiddels is ook vry om met P-gp in die selmembraan van MDR selle, te interreageer. Daarenteen is slegs 5 - 10 % van verbindings wat teen 'n hoë mate (90% of meer) aan die proteïene in die serum bind, by 'n hoë serum proteïen konsentrasie (*in vivo* omstandighede) beskikbaar om intrasellulêr te diffundeer en gevolglik aan P-gp in die selmembraan te bind. Verapamil en amiodaroon is voorbeelde van verbindings wat 'n hoë affiniteit vir serum proteïene besit.



Hierdie verbindings toon gewoonlik in *in vivo* omstandighede 'n afname in hul vermoë om MDR om te keer indien dit met resultate wat *in vitro* verkry is, vergelyk word [Lum *et al*, 1993].

Verapamil en amiodaroon veroorsaak in die teenwoordigheid van standaard weefselkultuur medium ('n lae serum proteïen konsentrasie), 'n 50% groter toename in die intrasellulêre akkumulering van doksorubisien in 'n rot MDR sellyn, in vergelyking met die toename in intrasellulêre akkumulering van doksorubisien wat tydens die behandeling met quinien of kinokonien verkry is. Indien hierdie weefselkultuur selle in rot serum geïnkubeer is, het die behandeling van die selle met quinien of kinokonien geen noemenswaardige invloed op die intrasellulêre akkumulering van doksorubisien in die selle gehad nie. Die intrasellulêre akkumulering van doksorubisien het daarenteen, na behandeling met verapamil of amiodaroon in rot serum, met tussen 25% en 66% afgeneem. Die teenwoordigheid van serum proteïene het dus 'n betekenisvolle invloed op die MDR omkerings aktiwiteit van verapamil en analoë daarvan gehad [Lum *et al*, 1993].

Tweedens is die chemosensitiseerder-bemiddelde verhoging in die sitotoksiese aktiwiteit van die chemoterapeutiese geneesmiddels in die meeste gevalle nie spesifiek vir die tumor nie, maar lei ook tot verhoogde sitotoksiteit van die chemoterapeutiese geneesmiddels vir normale weefsel [Ford, 1995]. Verskeie dosis-beperkende newe-effekte is vir verapamil en die ander chemosensiteerders tydens die toediening daarvan aan kanker pasiente, ondervind [Tsuruo, 1989]. Hierdie dosis-beperkende newe-effekte verhoed dat die chemosensitiseerder teen hoog genoeg dosisse aan die pasiente toegedien kan word. Die laer dosisse van die chemosensitiseerder lei tot onvoldoende serum konsentrasie van die chemosensitiseerder [Lum *et al*, 1993]. Die ideaal is dat konsentrasies wat in staat is om MDR doeltreffend *in vitro* om te keer, in die serum van kanker pasiente bereik sal word [Fan *et al*, 1994].

Ernstige, dosis-beperkende kardiaale newe-effekte, soos die blokkering van die antrioventrikulêre node, volledige hartblokkering en kongestiewe hartversaking, het tydens die toediening van verapamil aan kanker pasiente voorgekom [Lum *et al*, 1993]. Ander



neue-effekte wat tydens die gebruik van MDR chemosensitiseerders *in vivo* voorgekom het, sluit neurologiese neue-effekte, perifere edeem, vloeistof retensie, spierpyn, braking, naarheid, slaperigheid, kinavergiftiging, verlies van hare (alopesie), slymvliesontsteking (mukositis), beenmurg-onderdrukking, omkeerbare hipotensie, omkeerbare aritmie (ritme stoornis), gehoorverlies, suising in die ore (*idem*), duiseligheid, supraventikulêre hartslagversnelling (tagikardiale hartslag), stadige hartklop (bradikardie), droë mond, rusteloosheid, omkeerbare hiperbilirubinemia, 'n matige omkeerbare nefropatie, ernstige nefrotoksisiteit, krampe en hardlywigheid, in [ Lum *et al*, 1993; Ford & Hait, 1994; Ford, Yang & Hait, 1996].

Daar bestaan moontlik 'n verband tussen die toename in serum bilirubien in kanker pasiente en die serum konsentrasie van die MDR chemosensitiseerder, siklosporien A, wat tot bogenoemde neue-effek aanleiding gegee het. Bilirubien kan as 'n substraat vir P-gp optree [Ford & Hait, 1994]. Die toename in serum bilirubien kan daarom moontlik aan siklosporien A-geïnduseerde inhibisie van bilirubien transport deur P-gp, toegeskryf word. Hiperbilirubinemia is daarom moontlik 'n fisiologiese merker vir *in vivo* omkering van MDR. Die onvermoë om voldoende serum konsentrasies te bereik, is moontlik die rede waarom hierdie neue-effek nie tydens kliniese studies met ander chemosensitiseerders waargeneem is nie. Dit is ook moontlik dat verskeie ander faktore ook tot die siklosporien A-geïnduseerde hiperbilirubinemia bygedra het en dat hierdie effek nie slegs aan die werking van siklosporien A op die P-gp-bemiddelde transport toegeskryf kan word nie [Ford & Hait, 1994].

### 3.2. Struktuur-aktiwiteit verwantskappe van MDR chemosensitiseerders

Soos reeds genoem is 'n groot verskeidenheid chemiese verbindings in staat om MDR om te keer. Elkeen van die klasse van MDR omkerings verbindings is vir 'n unieke, spesifieke sellulêre effek verantwoordelik [Ford & Hait, 1994]. Hierdie sellulêre effekte wat die verskillende klasse van MDR chemosensitiseerders op MDR selle uitoefen, kan grootliks van mekaar verskil. Die sellulêre teikengebiede van hierdie verbindings verskil ook in 'n groot mate van mekaar [Ford & Hait, 1994; Ford, Yang & Hait, 1996]. Sommige MDR chemosensitiseerders interreageer byvoorbeeld nie met P-gp nie, maar met ander gebiede

van die MDR sel. Ten spyte van bogenoemde waarnemings stel die meerderheid data voor dat meeste MDR chemosensitiseerders 'n gemene teiken-gebied in die MDR sel, tydens hul meganismes van werking in die omkering van MDR, met mekaar deel [Ford & Hait, 1994]. 'n Mens sou verwag dat sekere gemene strukturele eienskappe wat vir die MDR omkeringsaktiwiteit van die verbindings verantwoordelik is, tussen die chemosensitiseerders wat dieselfde teiken-gebied op MDR selle met mekaar deel, sal voorkom [Ford & Hait, 1994; Ford, Yang & Hait, 1996]. Hierdie hipotese het daartoe gelei dat verskeie navorsers gepoog het om die chemiese strukturele eienskappe van chemosensitiseerders wat vir die omkeringsaktiwiteit van hierdie verbindings verantwoordelik is, te identifiseer [Lum *et al*, 1993]. Daar is gehoop dat die identifisering van hierdie gemene chemiese strukturele eienskappe van die MDR omkeringsverbindings, tot die ontwikkeling van meer doeltreffende chemosensitiseerders sal lei [Lum *et al*, 1993; Ford & Hait, 1994].

Die struktuur-aktiwiteit verwantskappe wat vir die MDR omkeringsaktiwiteit van verbindings verantwoordelik is, kan as volg opgesom word. Verbindings met tersiêre, kationiese amino-groepe wat in 'n sikliese struktuur met 'n spesifieke ruimtelike oriëntering geïnkorporeer is en wat 'n afstand van ten minste drie koolstowwe vanaf 'n hidrofobiese gekonjugeerde ring geleë is, besit optimale MDR omkerings aktiwiteit [Ford & Hait, 1994]. Die lipied oplosbaarheid, kationiese lading en molekulêre volume van chemosensitiseerders speel ook 'n belangrike rol in die mate van MDR omkeringsaktiwiteit wat die verbindings besit [Lum *et al*, 1993]. Alle chemosensitiseerders is lipofiliese verbindings en baie van die chemosensitiseerders is heterosikliese, positief gelaaiete verbindings [Ford, Yang & Hait, 1996].

### 3.3. Meganismes betrokke by die farmakologiese omkering van MDR

Die sellulêre teikengebiede van die groot verskeidenheid verbindings wat in staat is om MDR *in vitro* farmakologies om te keer, verskil onderlings grootliks van mekaar [Ford, Yang & Hait, 1996]. Die presiese meganisme van werking betrokke by die farmakologiese omkering van MDR is nog tot 'n groot mate onbekend en word tans aktief deur verskeie navorsers bestudeer. Daar word gehoop dat die identifisering van die presiese meganisme



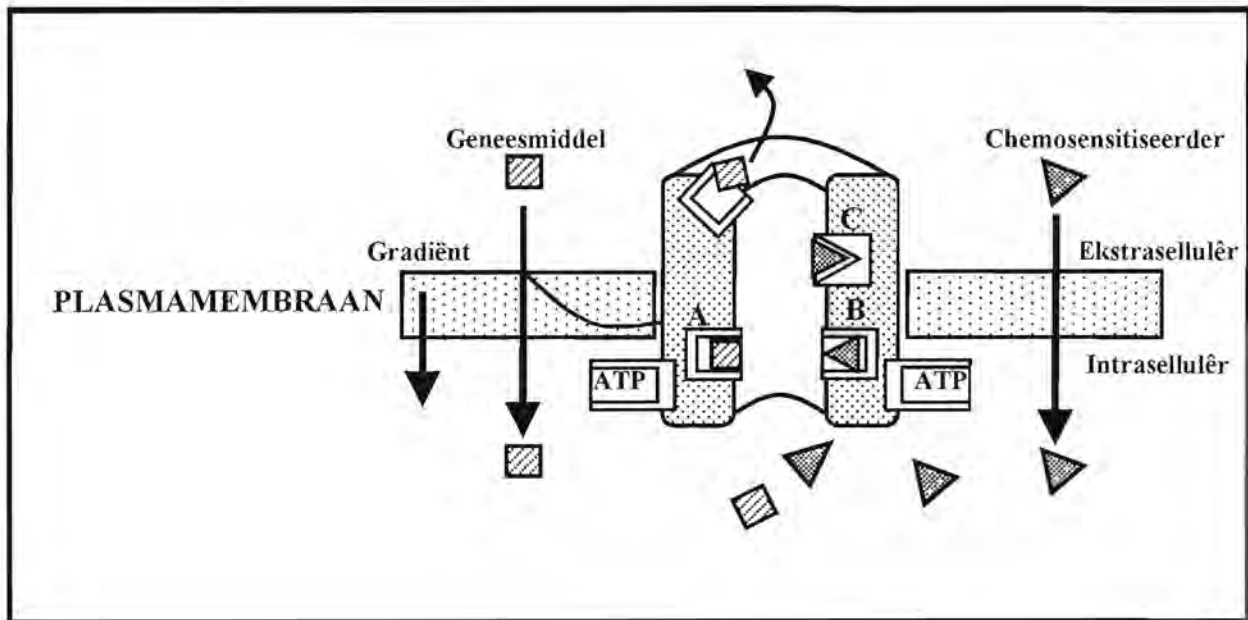
van werking van MDR chemosensitiseerders, tot die ontwikkeling en identifisering van nuwe, meer doeltreffende chemosensitiseerders sal lei.

Verskeie meganismes is vir die werking van MDR chemosensitiseerders voorgestel. Die primêre meganisme wat vir die farmakologiese omkering van MDR voorgestel is, behels die direkte inhibisie van die P-gp-bemiddelde uitwaartse transport van anti-kanker geneesmiddels uit MDR selle uit deur MDR chemosensitiseerders. 'n Vereenvoudigde model is vir hierdie moontlike meganisme van werking van MDR chemosensitiseerders, word in Figuur 3.1 aangetoon. Die MDR chemosensitiseerders inhibeer die uitwaartse transport van anti-kanker geneesmiddels uit die MDR selle, deur op 'n spesifieke en versadigbare wyse aan P-gp te bind. Sommige MDR chemosensitiseerders keer dus MDR moontlik om deur met die anti-kanker geneesmiddels om dieselfde geneesmiddel bindingsgebied op die P-gp molekule te kompeteer en verhoed sodoende dat die anti-kanker geneesmiddels aan P-gp bind. Hierdie direkte inhibisie van die P-gp-bemiddelde uitwaartse transport van anti-kanker geneesmiddels, lei tot die herstel van die intrasellulêre akkumulering van anti-kanker geneesmiddels in die selle. Die anti-kanker geneesmiddels kan dus weer sitotoksiese konsentrasies binne die selle bereik, wat tot seldoding lei [Ford, Yang & Hait, 1996].

Hierdie model as meganisme van werking van MDR chemosensitiseerders is deur 'n groot verskeidenheid geneesmiddel bindingstudies, ondersteun. In geneesmiddel bindingstudies met radio-aktief gemerkte MDR chemosensitiseerders, is getoon dat verskeie MDR chemosensitiseerders in staat is om as substrate vir P-gp op te tree. Daar is byvoorbeeld waargeneem dat sekere MDR chemosensitiseerders, soos verapamil, transfluopentiksol en siklosporien A, net soos sekere anti-kanker geneesmiddels, teen laer vlakke intrasellulêr in MDR selle as in die geneesmiddel-sensitiewe selle akkumuleer [Ford, Yang & Hait, 1996].

Dit is moontlik dat daar meer as een geneesmiddel bindingsgebied vir MDR chemosensitiseerders en anti-kanker geneesmiddels op die P-gp molekules kan voorkom, aangesien elke klas van MDR chemosensitiseerders moontlik unieke strukturele vereistes





**Figuur 3.1:** 'n Funksionele voorstelling van P-glikoproteïen. Die model verteenwoordig 'n transmembraan proteïen wat ATP energie gebruik om die geneesmiddels aktief oor die selmembraan te vervoer (A). Die chemosensitiseerder mag as 'n kompetiewe inhibeerder optree deur die geneesmiddel bindingsgebied te beset (B) of as 'n nie-kompetiewe inhibeerder te funksioneer deur 'n chemosensitiseerder bindingsgebied te beset (C).

vir doeltreffende binding aan P-gp besit [Ford, Yang & Hait, 1996; Garrigos *et al*, 1997]. Die binding van MDR chemosensitiseerders aan oorvleulende of afsonderlike geneesmiddel-spesifieke bindingsgebiede op P-gp, kan tot allosteriese veranderings op die P-gp molekule lei. Hierdie allosteriese veranderings kan verhoed dat die anti-kanker geneesmiddels aan P-gp bind en sodoende tot die direkte inhibering van die P-gp-bemiddelde uitwaartse transport van anti-kanker geneesmiddels, lei [Ford, Yang & Hait, 1996].

Die hipotese dat daar moontlik meer as een geneesmiddel bindingsgebied vir MDR chemosensitiseerders op die P-gp molekule mag voorkom, is deur verskeie waarnemings ondersteun. Daar is onder andere waargeneem dat die substitusie van 'n serien residue in die elfde transmembraan gebied van muis P-gp met enige van die ander ses aminosure, die omkeringsaktiwiteit van verskeie MDR chemosensitiseerders kan beïnvloed. Die bestudering van die binding van die radio-aktief gemerkte MDR chemosensitiseerder, azidopien, aan P-gp, het ook tot die identifisering van twee afsonderlike geneesmiddel bindingsgebiede op die P-gp molekule gelei. Die een bindingsgebied kom in die amino-helfte van die P-gp molekule voor, terwyl die tweede bindingsgebied in die karboksi-helfte van die proteïen voorkom [Ford, Yang & Hait, 1996]. Garrigos *et al* (1997) het verder gevind dat verapamil en vinblastien met mekaar kompeteer om aan dieselfde of oorvleulende bindingsgebiede op die P-gp molekule te bind, terwyl progesteron nie met hierdie twee verbindings om dieselfde bindingsgebied kompeteer om aan P-gp te bind nie. Dit dui daarop dat die bindingsgebied op P-gp vir progesteron waarskynlik heeltemal apart van die bindingsgebiede vir vinblastien of verapamil op die P-gp molekule voorkom. Vinblastien en verapamil bind waarskynlik op twee oorvleulende gebiede aan P-gp, aangesien hierdie twee geneesmiddels verskillende invloede op die basale ATPase aktiwiteit van P-gp uitoefen [Garrigos *et al*, 1997].

Daar bestaan egter nog groot onsekerhede oor verskeie aspekte van bogenoemde meganisme van werking van MDR chemosensitiseerders. Dit is byvoorbeeld onduidelik of die verskillende klasse van MDR chemosensitiseerders almal as inhibeerders van die uitwaartse transport van anti-kanker geneesmiddels optree, hoeveel bindingsgebiede vir



MDR chemosensitiseerders op P-gp voorkom en waar hulle op die P-gp molekule geleë is, en of alle MDR chemosensitiseerders bindingsgebiede met anti-kanker geneesmiddels op P-gp molekules deel [Ford, Yang & Hait, 1996].

Sommige MDR chemosensitiseerders kompeteer, ten spyte van hul vermoë om as substrate vir P-gp op te tree, nie met die anti-kanker geneesmiddels om aan P-gp te bind nie. Sommige weerstandbiedende sellyne toon ook geen korrelasie tussen die toename in MDR en die mate van P-gp uitdrukking van die selle nie. Hierdie waarnemings het tot die hipotese gelei dat die MDR chemosensitiseerders die werking van P-gp moontlik direk of indirek inhibeer deur nie direk met P-gp te interreageer nie, maar eerder nie-spesifiek met die selmembrane van die MDR selle te interreageer [Pajeva *et al*, 1996].

Baie MDR chemosensitiseerders is kationiese, lipofiliese verbindings [Kellen, 1994]. Meeste MDR chemosensitiseerders is weens hul chemiese samestelling, net soos anti-kanker geneesmiddels, in staat om in selmembrane te interkalleer en sodoende die karaktereienskappe van die selmembrane te beïnvloed en te verander [Kellen, 1994; Pajeva *et al*, 1996]. Die interkallering van MDR chemosensitiseerders kan onder andere die omset en vervoer van fosfolipiede in die selmembraan beïnvloed en verander [Kellen, 1994]. Daar is ook verder waargeneem dat die fosfolipied samestelling van die selmembrane van verskeie weerstandbiedende selle van die fosfolipied samestelling van die selmembrane van die ooreenstemmende geneesmiddel-sensitiewe selle, verskil [Bergelson *et al*, 1970; Pajeva *et al*, 1996]. Die unieke karakter-eienskappe van selmembraan fosfolipiede speel 'n belangrike rol in die regulering van die doeltreffende funksionering van die meganisme van werking van proteïene in die selmembraan, soos proteïen kinase C (PKC) en P-gp [Kellen, 1994; Ferte, 2000]. Sinicrope *et al* (1992) het byvoorbeeld getoon dat veranderings in die lipied vloeibaarheid die P-gp-bemiddelde transport in lewer kanalikulêre membraan vesikels, beïnvloed. Daar is ook gevind dat MDR chemosensitiseerder-geïnduseerde veranderings in die membraan vloeibaarheid van MDR selle, met die vermoë van hierdie MDR chemosensitiseerders om MDR om te keer, korreleer [Pajeva *et al*, 1996]. Die fosfolipied samestelling van MDR selle speel ook 'n belangrike rol in die katalitiese aktiwiteit van die ATPase gebiede van P-gp.



Fosfatidietanolamien is byvoorbeeld in staat om die P-gp ATPase aktiwiteit te aktiveer en P-gp teen termiese inaktivering te beskerm [Doige *et al*, 1993]. MDR chemosensitiseerders kan deur in die selmembrane van MDR selle te interkalleer, nie-spesifieke veranderings in die fosfolipied samestelling van MDR selle veroorsaak. Hierdie MDR chemosensitiseerder-bemiddelde veranderings in die fosfolipied samestelling van MDR selle kan verhoed dat proteïene in die selmembraan, soos P-gp, optimaal funksioneer deur byvoorbeeld die ATPase aktiwiteit van P-gp konformasioneel te inhibeer [Kellen, 1994]. Veranderings in die konformasie en funksionering van membraan-geassosieerde proteïene, soos P-gp, as gevolg van veranderings in die strukturele organisering van die lipied dubbelle van selmembrane, kan dus direk tot die omkering van MDR lei [Pajeva *et al*, 1996].

Geneesmiddel/membraan interaksies kan ook indirek tot die omkering van MDR lei. Hierdie indirekte meganisme is op die rol wat proteïen kinases, veral PKC, in die regulering van MDR speel, gebaseer. Die kalsium-geaktiveerde, fosfatidielserien-afhanklike PKC is vir die fosforilering van P-gp verantwoordelik. Hierdie PKC-bemiddelde fosforilering van P-gp speel 'n belangrike rol in die aktiwiteit van hierdie proteïen. Inhibeerders van PKC is daarom in staat om die funksie van P-gp in weerstandbiedende sellyne te verander [Pajeva *et al*, 1996]. Baie MDR chemosensitiseerders is in staat om as inhibeerders van PKC op te tree [Ford, Yang & Hait, 1996]. Sommige MDR chemosensitiseerders inhibeer daarom moontlik die werking van P-gp indirek, deur PKC te inhibeer en sodoende die fosforileringspatroon van P-gp te verander [Ford, Yang & Hait, 1996; Pajeva *et al*, 1996].

Hierdie hipotese vir die meganisme van werking van MDR chemosensitiseerders is deur 'n studie met katamfiliese verbindings, soos flupentiksol, ondersteun. Flupentiksol is in staat om MDR om te keer. Hierdie verbinding word by fisiologiese pH gedeeltelik geprotoneer. Positief gelaai flupentiksol verbindings is in staat om sterk met asidiese (suur) membraan fosfolipiede, soos fosfatidielserien en fosfatidielcholien te interreageer, aangesien die fosfaat- en karboksilaat groepe van asidiese fosfolipiede, soos fosfatidielserien, 'n negatiewe lading by fisiologiese pH besit. Buiten die ioniese

interaksies tussen flupentiksole en die asidiese membraan fosfolipiede, kan die ongelaaiede fraksies van die katamfiliese verbindings ook deur middel van hidrofobiese kragte aan selmembrane bind. Die katamfiliese verbindings is in staat om deur middel van hierdie interaksies met membraan fosfolipiede, soos fosfatidielserien, veranderings in die strukturele organisering van fosfolipiede, in die lipied dubbellaë te veroorsaak. Hierdie geneesmiddel-geïnduseerde veranderings in die fosfolipied samestelling van selmembrane het met die MDR omkeringsaktiwiteit van die katamfiliese verbindings, sowel as met die vermoë van hierdie verbindings om PKC te inhibeer, gekorreleer. Die geneesmiddel/fosfolipied interaksies beïnvloed die herverdeling van fosfatidielserien molekules in die selmembraan. Die herverdeling van fosfatidielserien molekules in die lipied dubbellaë van selmembrane is noodsaaklik vir die aktivering van PKC. Die interaksie van flupentiksole met die membraan fosfolipiede kan konformasionele veranderings in die proteïene wat in die selmembraan ingebed is, soos PKC en P-gp, veroorsaak. Soos reeds genoem, is PKC vir die fosforilering van P-gp verantwoordelik. MDR chemosensitiseerder-bemiddelde inhibisie van PKC kan dus tot veranderings in die fosforileringspatroon en gevolglik die aktiwiteit van P-gp lei. Die MDR chemosensitiseerders, trans- en cis-flupentiksol, is nie in staat om die binding van [<sup>3</sup>H]azidopien aan P-gp te inhibeer nie. Sommige MDR chemosensitiseerders inhibeer dus moontlik die P-gp-bemiddelde uitwaartse transport van anti-kanker geneesmiddels deur met die membraan fosfolipiede in die selmembrane van MDR selle te interreageer [Pajeva *et al*, 1996].



## HOOFSTUK 4

### RIMINOFENASIEN VERBINDINGS

#### 4.1. Inleiding

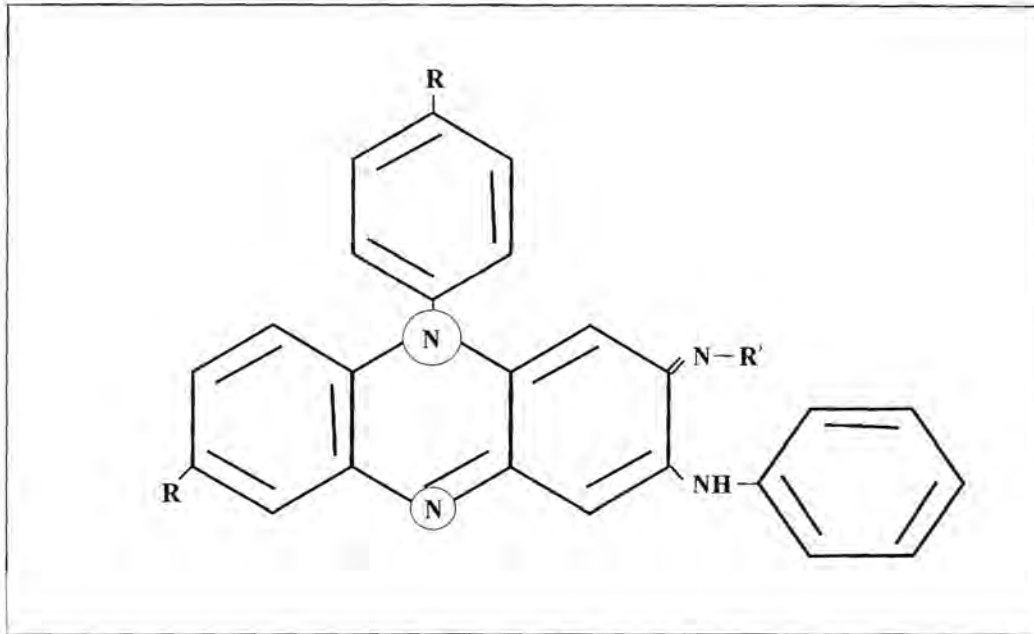
In die 1940's is 'n chemoterapie eenheid deur die Ierse Mediese Navorsingsraad op die been gebring. Die doel van hierdie eenheid was om 'n chemiese behandeling vir tuberkulose te vind. Een van die resultate wat die navorsing van hierdie eenheid opgelewer het, was die ontwikkeling van verskeie riminofenasien verbindings. Die basiese struktuur van die riminofenasien verbindings word in Figuur 4.1 getoon. Die bekendste van hierdie riminofenasien verbindings, is klofasimien [Durandt, 1994; O'Connor *et al*, 1995].

Klofasimien (B663) het *in vitro*, sowel as in eksperimentele muise, biologiese aktiwiteit teen tuberkulose getoon. Teleurstellende resultate is egter tydens die behandeling van tuberkulose in die aap en die mens met klofasimien, verkry [Barry & Conalty, 1965]. Die soeke na beter, meer effektiewe middels teen tuberkulose in die mens het gevolglik voortgeduur. In hierdie volgehoue poging in die soeke na nuwe anti-tuberkulose geneesmiddels, is verskeie ander, nuwe riminofenasien verbindings ook geïdentifiseer [O'Connor R, Dublin City University, Ierland, persoonlike kommunikasie].

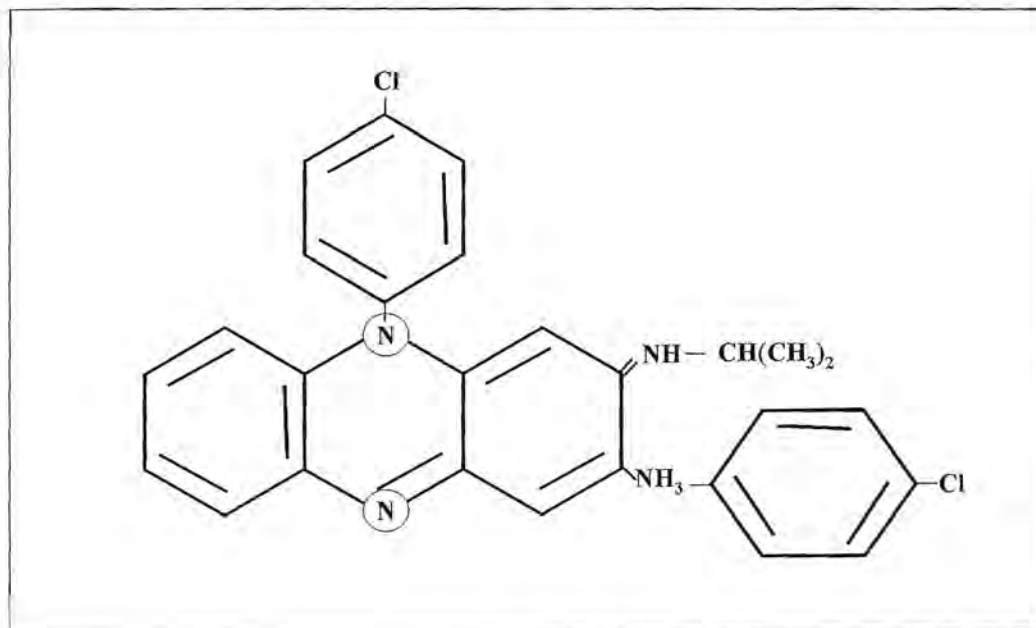
#### 4.2. Algemene kenmerke van klofasimien

Klofasimien(B663;3-[p-chloroanilino]-10-[p-chlorofeniel]-2,10-dihidro-2-[isopropielimino]fenasien) is huidiglik die enigste riminofenasien verbinding wat kommersieël beskikbaar is. Die chemiese struktuur van hierdie verbinding word in Figuur 4.2 getoon. Dit word deur die maatskappy, NOVARTIS Ltd, onder die handelsnaam Lamprene, bemark [Yawalkar & Vischer, 1979]. Hierdie middel word huidiglik primêr as 'n anti-leprose middel, hoofsaaklik as deel van kombinasie terapie, in die behandeling van leprose pasiente gebruik [World Health Organisation, 1987]. Klofasimien word ook suksesvol in die behandeling van ander mikobakteriële infeksies, soos *M. avium* kompleks, aangewend [Agins *et al*, 1989]. Klofasimien is 'n rooi riminofenasien kleurstof met 'n molekulêre massa van 473 g/mol. Dit is 'n hoogs lipofiliese verbinding en slegs oplosbaar in organiese oplosmiddels soos etanol, benseen en dimetiel sulfoksied (DMSO) [Garrelts,





Figuur 4.1: Basiese struktuur van riminofenasien verbindings



Figuur 4.2: Die chemiese struktuur van klofasimien (B663).

1991]. Verder besit klofasimien 'n redoks potensiaal van  $-0.18$  V by pH 7.0 [Barry *et al*, 1957]. Hierdie verbinding kan dus maklik geoksideer word.

#### 4.3. Die biologiese aktiwiteite van riminofenasien verbindings

Riminofenasien verbindings besit buiten anti-mikobakteriële aktiwiteit ook verskeie ander biologiese aktiwiteite. Hierdie biologiese aktiwiteite sluit onder andere anti-mikrobakteriële aktiwiteit, pro-oksidatiewe aktiwiteit, immuun-onderdrukkende aktiwiteit en anti-kanker aktiwiteit in [Durandt, 1994; Durandt *et al*, 1996].

##### 4.3.1. Die anti-tumor aktiwiteit van riminofenasien verbindings

Riminofenasien verbindings besit indirekte, sowel as direkte anti-tumor aktiwiteit [Anderson *et al*, 1988; Van Rensburg *et al*, 1993a; Van Rensburg *et al*, 1993b; Durandt *et al*, 1996].

###### 4.3.1.1. Indirekte anti-tumor aktiwiteit van riminofenasien verbindings

Riminofenasien verbindings prikkel polimorfonukleêre leukosiete (PMNL) in die teenwoordigheid van verskeie stimuli, tot verhoogde vrystelling van reaktiewe oksidante, deur met die membraan-geassosieerde suurstof-afhanklike sisteme van PMNL te interreageer [Savage *et al*, 1989; Durandt, 1994; Durandt *et al*, 1996]. Hierdie riminofenasien-bemiddelde verhoging in reaktiewe oksidant produksie deur die PMNL, is dosis-afhanklik [Mascellino *et al*, 1991; Durandt, 1994; Durandt *et al*, 1996]. Die reaktiewe oksidante besit sitotoksiese aktiwiteit en dra tot die indirekte anti-tumor aktiwiteit van die riminofenasien verbindings by [Van Rensburg *et al*, 1993a; Durandt *et al*, 1996].

###### 4.3.1.2. Direkte anti-tumor aktiwiteit van riminofenasien verbindings

Riminofenasien verbindings is ook in staat om die proliferering van verskeie weefselkultuur-sellyne *in vitro* direk te inhibeer [Van Rensburg *et al*, 1993a; Van Rensburg *et al*, 1993b; Durandt *et al*, 1996; Van Rensburg *et al*, 1996]. Hierdie direkte sitotoksiese aktiwiteit van die riminofenasien verbindings kom by fisiologies relevante konsentrasies ( $0.25$   $\mu\text{g/ml}$  -  $4.00$   $\mu\text{g/ml}$ ) van die

riminofenasien verbindings voor [Van Rensburg *et al*, 1993a]. Van Rensburg *et al* (1996) het gevind dat die riminofenasien verbindings selfs in staat is om die groei van verskeie inhirente veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende weefselkultuur sellyne *in vitro* direk te inhibeer.

Die riminofenasien verbindings, klofasimien en B669, besit ook *in vivo* direkte anti-tumor aktiwiteit [Van Rensburg *et al*, 1993b; Durandt *et al*, 1996]. Muise met plaveisel karsinoom en rotte met borskanker is met riminofenasien verbindings behandel. Behandeling van die eksperimentele muise voor die verskyning van die tumore, het geen effek op die tumor lading gehad nie [Van Rensburg *et al*, 1993b]. Dit is waarskynlik aan die immuun-onderdrukkende eienskappe van klofasimien en B669 te danke [Zeis & Anderson, 1986]. Behandeling van die diere direk nadat die eerste tumore verskyn het, het egter getoon dat beide hierdie riminofenasien verbindings tumor groei effektief *in vivo* onderdruk. Die riminofenasien verbindings het ook 'n verlenging in die gemiddelde oorlewingstyd van die diere veroorsaak. Van die muise onder behandeling, het 90% - 100% na tien weke nog geleef. Daarenteen het slegs 50% van die onbehandelde, kontrole muise na tien weke nog geleef [Van Rensburg *et al*, 1993b].

Ruff *et al* (1998) het in 'n fase II kliniese studie getoon dat klofasimien die oorlewingstydperk van pasiente met hepatosellulêre karsinoom verleng. Die prognose van hepatosellulêre karsinoom is baie swak, met 'n gemiddelde oorlewingstydperk van 6-8 weke [Okuda *et al*, 1984]. Dertig pasiente met hepatosellulêre karsinoom is met 600 mg klofasimien daaglik mondelings vir twee weke behandel, waarna dit met 'n dosis van 400 mg daaglik tot met dood opgevolg is. Die klofasimien behandeling het die siekte-toestand in dertien pasiente vir so lank as 25 maande gestabiliseer en 'n gemiddelde oorlewingstydperk van 14 weke is waargeneem [Ruff *et al*, 1998].

Uit bogenoemde waarnemings kan afgelei word dat die riminofenasien



verbinding nie net anti-tumor aktiwiteit teen 'n spesifieke tumor-model toon nie. Hierdie middels het in beide eksperimentele dierlike tumor modelle wat *in vivo* ondersoek is, sowel as in verskeie weefselkultuur sellyne wat *in vitro* getoets is, anti-tumor aktiwiteit getoon [Van Rensburg *et al*, 1993a; Van Rensburg *et al*, 1993b; Durandt *et al*, 1996; Van Rensburg *et al*, 1996].

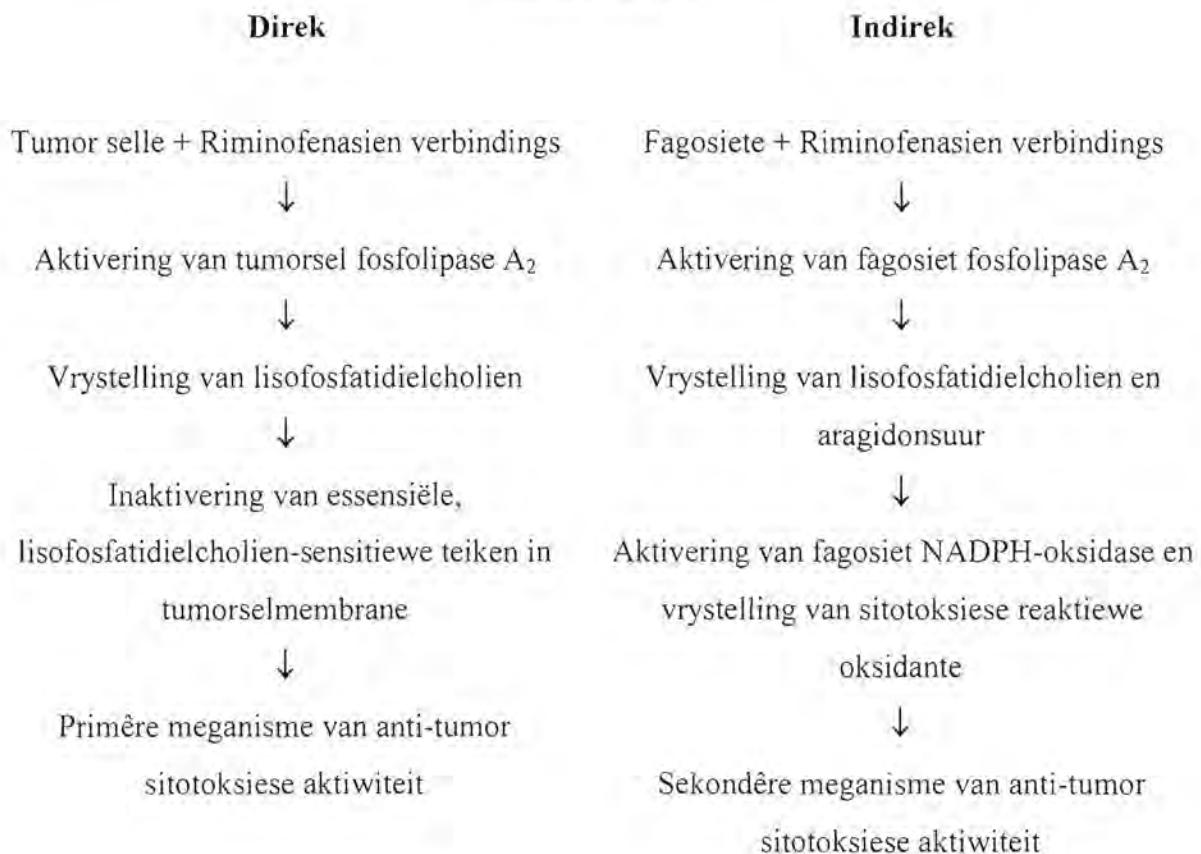
Die direkte riminofenasien-bemiddelde inhibering van die prolifisering van die verskeie tumor sellyne *in vitro*, vind deur middel van 'n unieke twee-ledige meganisme van werking plaas. Hierdie unieke twee-ledige meganisme van werking behels onderskeidelik 'n fosfolipase A<sub>2</sub>-afhanklike oksidatiewe en nie-oksidatiewe meganisme en word in Figuur 4.3 opgesom [Van Rensburg *et al*, 1993a].

Die pro-oksidatiewe meganisme is sekondêr en indirek. Dit behels 'n riminofenasien-bemiddelde aktivering van die fosfolipase A<sub>2</sub> ensiem in

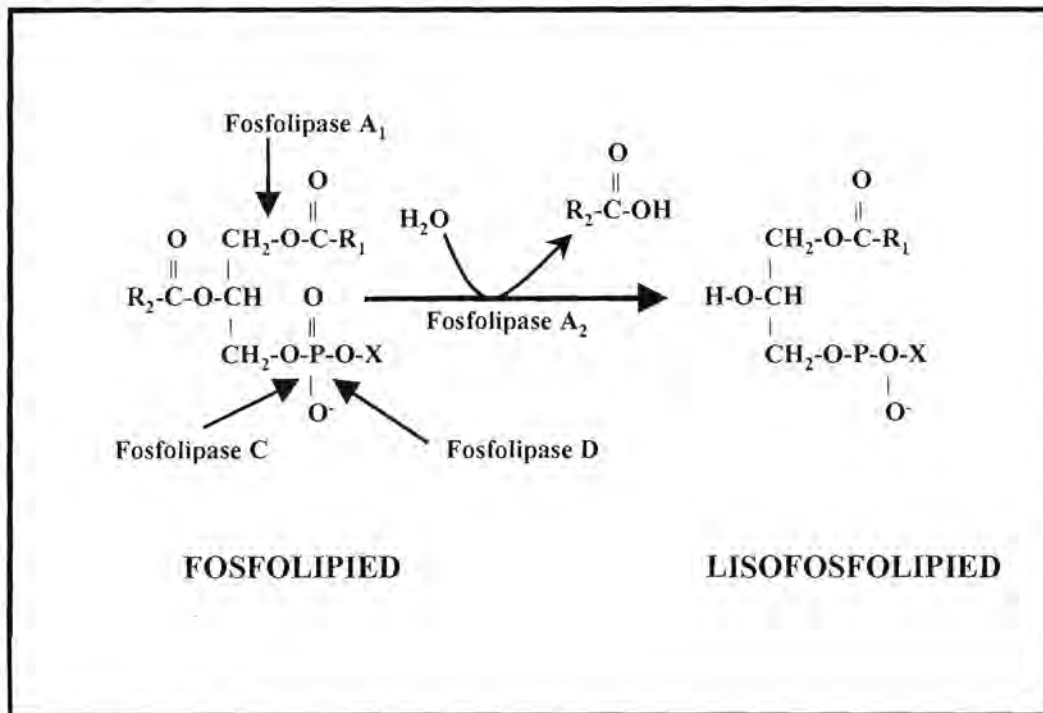
fagositiese selle [Krajewska & Anderson, 1993]. Fosfolipase A<sub>2</sub> kloop die vetsuur op koolstof 2 van fosfolipiede in die selmembraan met die gevolglike vrystelling van 'n vrye vetsuur en 'n lisofosfolipied (Figuur 4.4) [Voet & Voet, 1995a]. Aragidonsuur is een van die vernaamste vetsure wat tydens hierdie reaksie, vrygestel word. Lisofosfatidielcholien (LPC) is daarenteen een van die vernaamste lisofosfolipiede wat tydens die reaksie vrygestel word (Figuur 4.4) [Voet & Voet, 1995a]. Beide aragidonsuur en LPC is in staat om die superoksied-genererende ensiem, NADPH oksidase, te aktiveer [McPhail *et al*, 1984; Oishi *et al*, 1988]. Hierdie fosfolipase A<sub>2</sub>-bemiddelde aktivering van NADPH oksidase, lei tot die verhoogde generering van reaktiewe oksidante [Weiss & Slivka, 1982]. Soos reeds genoem is reaktiewe oksidante sitotoksies en kan dit indirek tot die anti-tumor aktiwiteit van verbinding lei [Anderson *et al*, 1988; Savage *et al*, 1989; Durandt *et al*, 1996].

Lisofosfatidielcholien is 'n baie doeltreffende detergent en membraan-destabiliseringsmiddel. Daar is aanvanklik gedink dat die direkte anti-

## MEGANISME VAN RIMINOFENASIEN-BEMIDDELDE ANTI-TUMOR AKTIWITEIT



**Figuur 4.3:** Fosfolipase A<sub>2</sub>-afhanklike, direkte nie-oksidatiewe sowel as indirekte oksidatiewe meganismes van riminofenasien-bemiddelde doding van tumorselle.



**Figuur 4.4:** Fosfolipase A<sub>2</sub> kooft die C2 vetsuur vanaf die triasiel gliserol en gee sodoende oorsprong aan 'n fosfolipied



proliferatiewe effek van die riminofenasien verbindings aan nie-spesifieke membraan skade, wat tydens die aktivering van fosfolipase A<sub>2</sub> deur die riminofenasien verbindings ontstaan het, en/of aan die detergent werking van lisofosfolipiede, toegeskryf kan word [Van Rensburg *et al*, 1993a]. Dit is moontlik dat bogenoemde meganisme van werking wel tydens die vinnige blootstelling van die tumor selle aan hoë konsentrasies van die riminofenasien verbindings mag voorkom. Dit is egter nou bekend dat by laer konsentrasies van riminofenasien verbindings, veranderings in die aktiwiteit van die membraan-geassosieerde Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase ensiem, seldoding vooraf gaan [Van Rensburg *et al*, 1996; Van Rensburg *et al*, 1997]. LPC is in staat om die werking van die membraan-geassosieerde Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase te inhibeer. Hierdie LPC-bemiddelde inhibisie van Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase is gevolglik vir die anti-proliferatiewe eienskappe van nie-litiese konsentrasies van LPC verantwoordelik [Anderson & Smit, 1993].

Die lipied-oplosbare anti-oksidadant,  $\alpha$ -tokoferol, is in staat om weefselkultuur-selle teen die direkte sitotoksiese effek van die riminofenasien verbindings te beskerm [Van Rensburg *et al*, 1993a]. Hierdie inhibisie van die riminofenasien-bemiddelde sitotoksiese aktiwiteit deur  $\alpha$ -tokoferol, hou nie met die klassieke oksidadant-opruimings eienskappe van hierdie middel verband nie. Geen kompleks vorming kom ook tussen riminofenasien verbindings en  $\alpha$ -tokoferol voor nie [Krajewska & Anderson, 1993].  $\alpha$ -Tokoferol is wel in staat om komplekse met lisofosfolipiede te vorm en is dus in staat om LPC te neutraliseer [Kagan, 1989].

Lisofosfolipase is ook in staat om die anti-proliferatiewe effek van die riminofenasien verbindings op kanker-selle, op te hef [Van Rensburg *et al*, 1993a]. Lisofosfolipase neutraliseer lisofosfolipiede deur dit verder af te breek tot gliserofosfochlolien en 'n vetsuur. Dit is uit bogenoemde waarnemings duidelik dat LPC die vernaamste bemiddelaar van die direkte sitotoksies aktiwiteit van riminofenasien verbindings is [Durandt, 1994].

#### 4.3.2. MDR omkerings aktiwiteit van riminofenasien verbindings

**Van Rensburg *et al* (1994)** het *in vitro* getoon dat die riminofenasien verbindings, klofasimien en B669, in staat is om MDR in 'n MDR, P-gp-positiewe klein sel long kanker karsinoom sellyn (H69P/LX4) om te keer, deur die intrasellulêre akkumulering van anti-kanker geneesmiddels, soos vinblastien en doksorubisien, in hierdie MDR sellyn te verhoog. Hierdie MDR omkeringsaktiwiteit van die riminofenasien verbindings is deur **Myer en Van Rensburg (1996)** in 'n MDR, P-gp-positiewe chroniese mïeloïede K562 leukemie sellyn bevestig.

#### 4.4. Struktuur-aktiwiteit verwantskappe van riminofenasien verbindings as MDR chemosensitiseerders

Die meeste riminofenasien verbindings is lipofiliese van aard [**Garrelts, 1991**]. Riminofenasien verbindings deel ook ander basiese strukturele eienskappe met verbindings wat bekend is om MDR om te keer. Hierdie strukturele kenmerke sluit 'n basiese stikstof en een of meer planêre, aromatiese ringe in [**Van Rensburg *et al*, 1994**]. Daar is getoon dat die tetrametielpiperidien (TMP)-gesubstitueerde fenasiene MDR beter omkeer as riminofenasien verbindings, soos B663 en B669, wat nie die TMP groepe besit nie. Alhoewel ongechlorineerde TMP-gesubstitueerde molekules meer sitotoksies as die gechlorineerde verbindings is, is die gechlorineerde TMP-gesubstitueerde fenasiene (veral die verbindings met chloried atome op posisie 2 van die anilien en feniel ringe) beter MDR omkeringsverbindings as die ongechlorineerde verbindings [**Van Rensburg *et al*, 1997**]. Baie riminofenasien verbindings besit dus die minimum stel strukturele en konformasionele vereistes wat deur verbindings benodig word, om MDR om te keer [**Pearson & Cunningham, 1993; Van Rensburg *et al*, 1997**]. Riminofenasien verbindings is verder ook relatiewe nie-toksiese, nie-karsinogeniese en nie-beenmurg onderdrukkende verbindings [**Moore, 1983; Van Rensburg *et al*, 1993b**]. Bogenoemde eienskappe tesame met die waarneming dat riminofenasien verbindings MDR by klinies haalbare konsentrasies kan omkeer, maak hierdie verbindings belowende verbindings vir evaluering as MDR omkeringsmiddels in eksperimentele dierlike tumor modelle, sowel as kliniese onkologie.



## HOOFSTUK 5

### DIE ROL VAN DIE SELMEMBRAAN TYDENS GENEESMIDDEL TRANSPORT

#### 5.1. Inleiding

Daar is verskeie strukturele-funksionele studies uitgevoer in 'n poging om die meganisme van werking van P-gp beter te verstaan. Dit is vanuit hierdie studies duidelik dat die selmembraan 'n baie belangrike rol tydens die transport van geneesmiddels na die teiken-gebiede in die selle en gevolglik ook tydens die funksionering van P-gp speel [Kellen, 1994; Bolhuis *et al*, 1997].

#### 5.2. Samestelling van die selmembraan

Alle eukariotiese selle word deur 'n selmembraan omring. Die selmembraan dien as 'n hidrofobiese, selektief deurlaatbare skeiding en is hoofsaaklik uit amfipatiese fosfolipiede, amfipatiese proteïene en cholesterol saamgestel [Becker & Deamer, 1991a]. Die benaderde samestelling van selmembrane is as volg: 55% proteïene, 25% fosfolipiede, 13% cholesterol, 4% ander lipiede en 3% koolhidrate [Guyton & Hall, 1996a].

Verskeie membraan proteïene is in die selmembraan ingebed of word daarmee geassosieer. Hierdie membraan-geassosieerde proteïene kan verskeie funksies in die selmembrane verrig. Sommige membraan proteïene tree as transport molekules in die selmembraan op en/of speel 'n belangrike rol in die regulering van die beweging van verbindings en ione oor die selmembrane. Hierdie membraan-geassosieerde transport proteïene vervoer spesifieke verbindings oor 'n grootliks ondeurlaatbare membraan [Becker & Deamer, 1991b]. Voorbeelde van sulke membraan-geassosieerde proteïene, sluit P-gp in die selmembrane van veelvuldige weerstandbiedende kanker selle sowel as  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPases in die selmembrane van meeste eukariotiese selle, in [Becker & Deamer, 1991c; Croop, 1994].

Fosfolipiede is die vernaamste komponent van alle biologiese membrane [Voet & Voet, 1995b]. Die fosfolipiede bestaan uit 'n gliserol ruggraat waaraan vetsure op posisies C1 en C2 geësterifiseer is. 'n Fosfaatgroep, waaraan 'n hidrofiliese alkohol-groep gekoppel



is, kom op posisie C3 voor. Die alkohol-groep is gewoonlik serien, etanolamien, cholien of inositol. Membraan fosfolipiede is dus amfipatiëse verbindings, dit wil sê bestaan uit polêre en nie-polêre gedeeltes [Becker & Deamer, 1991b]. Die vetsuur kettings van die fosfolipied molekule, vorm die nie-polêre gedeelte van die membraan fosfolipied molekules. Die primêre funksie van hierdie nie-polêre gedeeltes van die fosfolipiede in die selmembraan, is die vorming van 'n lipied dubbellaag. Die lipied dubbellaag vorm die basiese struktuur van alle biologiese membrane [Becker & Deamer, 1991b; Voet & Voet, 1995b]. Die funksie van die polêre gedeeltes van die fosfolipiede, naamlik die negatief gelaaië fosfaat-groep en die positief gelaaië amien-groep van die alkohol, is grootliks nog onbekend. Sommige polêre gedeeltes van die membraan fosfolipiede, soos inositol, is onder andere by die geleiding van intrasellulêre seine in die sel betrokke [Becker & Deamer, 1991c].

### 5.3. Funksies van die selmembraan

Selmembrane verrig verskeie verwante, maar tog baie spesifieke funksies in die sel. Die volgende funksies word onder meer deur die membrane van 'n sel verrig: (1) Dit definieer en onderverdeel die sel, (2) dit dien as die gebied (lokus) waar verskeie spesifieke sellulêre funksies uitgevoer word, (3) dit reguleer die beweging van verbindings in en uit die sel en sy kompartemente en (4) dit speel 'n rol in sel-tot-sel kommunikasie en die waarneming van ekstrasellulêre seine [Becker & Deamer, 1991c].

### 5.4. Membraan transport

Die beweging van molekules en ione oor die selmembraan, is krities vir die doeltreffende funksionering van die sel. Hierdie selektiewe beweging van verbindings en ione oor die selmembrane, sodat uitruiling tussen die sel se intrasellulêre inhoud en die ekstrasellulêre omgewing kan plaasvind, staan as membraan transport bekend [Becker & Deamer, 1991d]. Membraan transport kan op grond van verskeie faktore, in verskillende kategorieë verdeel word. Hierdie faktore behels onder meer die betrokkenheid van 'n sekondêre molekule wat die vervoer van die verbindings en ione oor die membraan fassiliteer, asook die energie vereistes van die transport prosesse [Becker & Deamer, 1991d; Voet & Voet, 1995c].

#### 5.4.1. Passiewe transport

Passiewe transport behels die spontane, lukrake molekulêre beweging van verbindings en ione, molekule vir molekule, oor die selmembraan. Hierdie tipe transport vind hoofsaaklik op drie wyses plaas. Eerstens kan die verbindings spontaan deur die intermolekulêre spasies in die selmembraan beweeg. Hierdie tipe passiewe transport staan as eenvoudige diffusie bekend [Guyton & Hall, 1996b]. Klein ongelaaiide molekules, gasse en water beweeg gewoonlik deur middel van eenvoudige diffusie oor die selmembraan [Becker & Deamer, 1991d]. Tweedens kan verbindings in kombinasie met 'n draer proteïen passief oor die selmembraan beweeg. Hierdie passiewe transport proses staan as gefassiliteerde diffusie bekend. Die lipied dubbellaag van selmembrane is grootliks ondeurlaatbaar vir groot molekules. Daarom maak groter molekules hoofsaaklik van gefassiliteerde diffusie gebruik om oor die selmembraan te beweeg. Derdens beweeg ione hoofsaaklik deur kanale, wat deur proteïene in die selmembraan gevorm word, oor die selmembraan [Guyton & Hall, 1996b]. Al bogenoemde passiewe transport prosesse benodig nie energie nie, aangesien dit die resultaat is van 'n spontane geneigdheid van molekules en ione, om van 'n hoër konsentrasie na 'n laer konsentrasie te beweeg in 'n poging om die ewewig tussen die twee konsentrasies te herstel [Becker & Deamer, 1991d; Voet & Voet, 1995c].

Passiewe transport vind nie net in een rigting oor die selmembraan plaas nie. Dit is belangrik om daarop te let dat verbindings en ione wat vanaf die ekstrasellulêre inhoud van die sel na die intrasellulêre omgewing van die sel diffundeer, ook in staat is om in die teenoorgestelde rigting, te diffundeer. Die netto tempo van diffusie van ione is daarom vir die sel belangrik, aangesien dit die oorheersende rigting waarin die onderskeie ione en/of molekules oor die selmembraan beweeg, bepaal [Guyton & Hall, 1996b].

Baie geneesmiddels is slegs in staat om deur middel van passiewe diffusie oor die selmembraan van die teikensel te beweeg [Tillement *et al*, 1984]. Hierdie passiewe



beweging van geneesmiddels oor die selmembraan van die teikensel word veral deur faktore, soos die lipofilisiteit van die geneesmiddel, die mate van proteïenbinding en die membraan potensiaal van die teikensel beïnvloed.

#### **5.4.1.1. Die invloed van die lipofilisiteit van verbindings op hul passiewe diffusie oor die selmembraan**

Een van die vernaamste faktore wat die tempo van beweging van verbindings oor die lipied dubbellaag bepaal, is die graad van lipied oplosbaarheid van die betrokke verbinding. Die tempo van diffusie van verbindings oor die selmembraan, is direk proporsioneel aan die oplosbaarheid van die verbindings in die lipiede van die selmembraan [Guyton & Hall, 1996b]. Hoe groter die mate van oplosbaarheid van die verbindings in die selmembraan, hoe meer is die betrokke verbinding in staat om passief oor die selmembraan te diffundeer [Chen *et al*, 1996]. Lipofiliese verbindings is tot 'n groter mate as hidrofiliese verbindings in staat om in die lipiede van die selmembraan op te los en diffundeer gevolglik vinniger as die hidrofiliese verbindings oor die selmembraan [Hudgins *et al*, 1995; Guyton & Hall, 1996b].

Hudgins *et al* (1995) het gevind dat daar 'n goeie korrelasie tussen die anti-tumor aktiwiteit van geneesmiddels en die mate van lipofilisiteit van hierdie verbindings bestaan. Lipofiliese antrasikliene toon onder andere 'n hoër mate van anti-tumor aktiwiteit as die meer hidrofiliese antrasikliene [Friche *et al*, 1993; Chen *et al*, 1996]. Rivory *et al* (1996) het byvoorbeeld waargeneem dat die relatief hidrofiliese antrasiklien, doksorubisien, swak deur tumore opgeneem word indien dit intra-peritoneaal toegedien word. Hierdie swak opname van doksorubisien deur die tumore, kan aan die onvermoë van hierdie hidrofiliese verbinding om met die selmembraan te interreageer en/of om passief oor die selmembraan te diffundeer, toegeskryf word [Chen *et al*, 1996].



#### 5.4.1.2. Die invloed van proteïenbinding op die passiewe transport van verbindings oor die selmembraan

Interaksie tussen serum-proteïene en die geneesmiddel is een van die belangrikste gebeurtenisse wat in die sel plaasvind, nadat 'n geneesmiddel die liggaam binne gegaan het. Hierdie geneesmiddel-proteïen interaksies het belangrike implikasies vir die opname en verspreiding van geneesmiddels in die liggaam [Tillement *et al*, 1984].

Die binding van verbindings aan serumproteïene vertraag byvoorbeeld die passiewe diffusie van die verbindings oor die selmembrane, aangesien die komplekse wat tussen die verbindings en die serumproteïene vorm te groot is om gemaklik oor die selmembrane te beweeg. Slegs die vrye verbinding, dit wil sê die fraksie van die verbindings wat nie aan die plasmaproteïene bind nie, is in staat om passief oor die selmembraan te diffundeer.

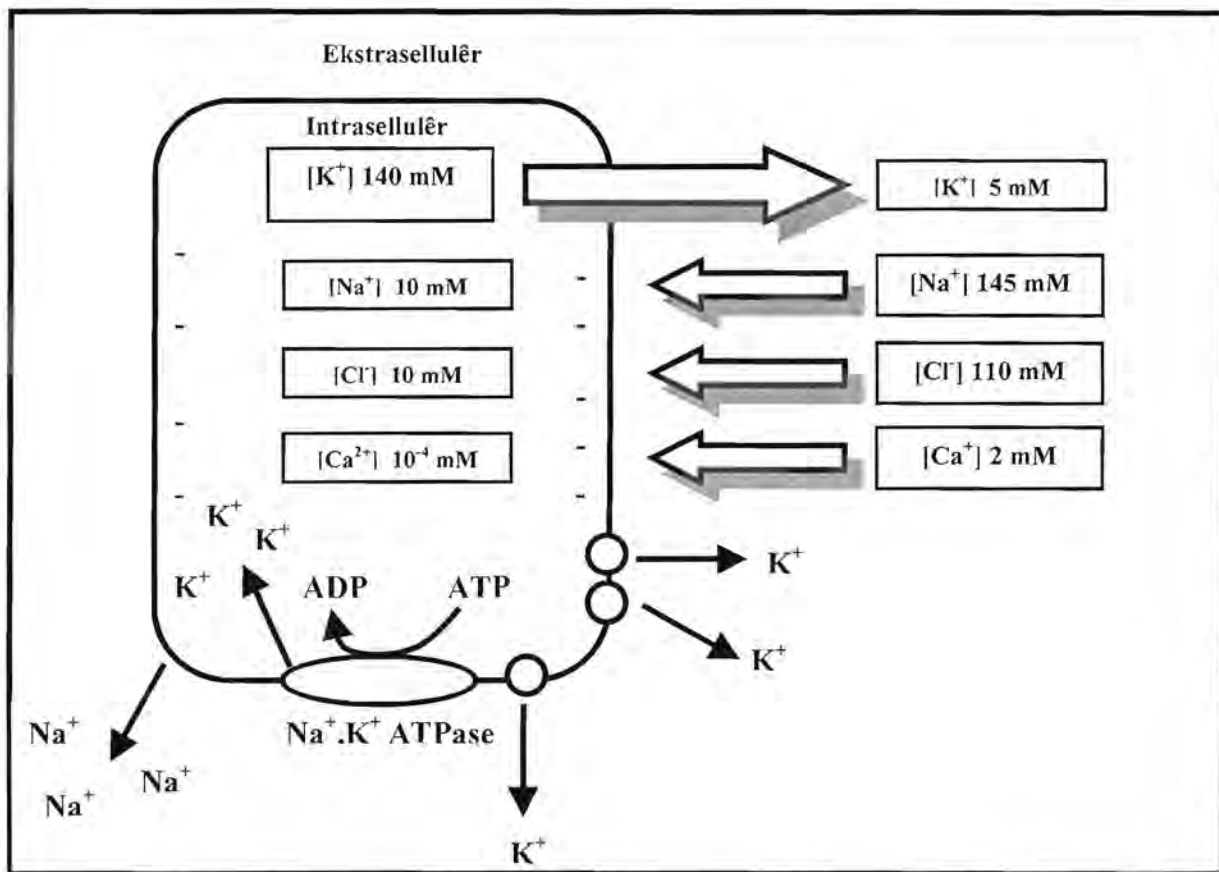
Daar bestaan ook 'n verband tussen die graad van lipofilisiteit van 'n verbinding en die mate waarmee die verbinding aan die plasmaproteïene bind. Lipofiliese verbindings is geneig om tot 'n groter mate as hidrofiliese verbindings aan die plasmaproteïene te bind [Tillement *et al*, 1984]. Rivory *et al* (1996) het getoon dat die lipofiliese antrasiklien, iododoksorubisien, in die afwesigheid van serum, baie vinniger deur selle opgeneem word, as die meer hidrofiliese antrasiklien, doksorubisien. In die afwesigheid van serum het die selle na 30 minute steeds doksorubisien opgeneem, terwyl die opname van iododoksorubisien na 2 minute voltooi was [Rivory *et al*, 1996]. Die teenwoordigheid van 4% bees serum albumien (BSA) in die inkubasie-medium het die opname van beide iododoksorubisien en doksorubisien verlaag. Die opname van die lipofiliese antrasiklien, iododoksorubisien, is egter tot 'n groter mate deur die teenwoordigheid van die proteïene in die inkubasie-medium, beïnvloed. Dit wil daarom voorkom asof die grootste beperkende faktor vir doksorubisien opname membraan deurlaatbaarheid is, terwyl die grootste beperkende faktor vir iododoksorubisien opname proteïenbinding is [Rivory *et al*, 1996]. Dit is dus

nodig om tydens die ontwikkeling van nuwe geneesmiddels 'n balans tussen die lipofiliese karakter-eienskappe van die geneesmiddel en die mate waarmee die geneesmiddel met serumproteïene interreageer te vind.

Geneesmiddel retensie, dit wil sê die terughouding van geneesmiddels deur die proteïene in die plasma of weefsel van die pasient, speel ook 'n baie belangrike rol in die farmakologiese aktiwiteit van die geneesmiddels. Die geneesmiddel word in die plasma terug gehou (plasma retensie), indien die geneesmiddel bindings-affiniteit van die serumproteïene hoër is as die bindings-affiniteit van die proteïene in die weefsel vir die geneesmiddel. Die geneesmiddel word daarenteen in die weefsel terug gehou (weefsel retensie), indien die affiniteit van die serumproteïene om die geneesmiddel te bind laer is as die geneesmiddel bindings-affiniteit van die proteïene in die weefsel. Geneesmiddels kan ook selektief deur sekere organe terug gehou word. Indien die plasma retensie van 'n geneesmiddel oor die algemeen hoër is as die bindings-affiniteit van die proteïene in die meeste organe, akkumuleer die geneesmiddel in dié organe wat 'n hoër bindings-affiniteit vir die geneesmiddel as die serumproteïene besit. Propranolol is so 'n verbinding wat selektief in sekere organe akkumuleer [Tillement *et al*, 1984].

#### **5.4.1.3. Die invloed van die membraan potensiaal op die passiewe transport van ione oor die selmembraan**

Biologiese membrane is selektief deurlaatbaar vir verskeie nutriente, molekules en ione, soos  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$  en  $Ca^{2+}$ . Die beweging van hierdie molekules en ione oor die selmembraan word deur spesifieke transport sisteme in die selmembraan gereguleer (Sien Figuur 5.1) [Becker & Deamer, 1991d; Voet & Voet, 1995c; Guyton & Hall, 1996b; Tanner & Welhausen, 1998]. Hierdie transport sisteme het tot gevolg dat meeste van die ione oneweredig in die intrasellulêre en ekstrasellulêre omgewing van rustende selle versprei is [Voet & Voet, 1995c; Guyton & Hall, 1996b]. Die oneweredige verspreiding van ione het tot gevolg dat groot gradient verskille tussen die intrasellulêre en ekstraselullêre konsentrasies van die verskillende ione oor die selmembrane van die selle,



**Figuur 5.1:** Kragte betrokke by die generering en instandhouding van die membraan potensiaal. Benaderde intrasellulêre en ekstrasellulêre ion konsentrasies van soogdierselle word in die blokke aangedui. Die wit pyle toon die rigting en sterkte van die elektrochemiese gradiënte van elke ion aan. Die negatiewe tekens verteenwoordig die lading van die selmembraan



voorkom. Die gevolg van die verskille in ioon konsentrasies oor die selmembrane, is 'n verskil in elektriese lading oor die selmembrane [**Rabinovitch & June, 1990; Roepe, 1995**]. Hierdie verskil in elektriese lading staan as die membraan potensiaal van die sel bekend [**Voet & Voet, 1995c**]. Die grootte en karakter van die membraan potensiaal hang van die grootte van die konsentrasie verskille van die verskillende ione af [**Roepe, 1995**].

Beide die passiewe en aktiewe transport van ione oor die selmembraan, speel 'n belangrike rol in die handhawing van die membraan potensiaal oor selmembrane [**Becker & Deamer, 1991d; Voet & Voet, 1995c; Tanner & Welhausen, 1998**]. Natrium- en kalium ione is van die vernaamste ione wat 'n rol in die ontwikkeling en instandhouding van die membraan potensiaal oor eukariotiese selmembrane speel [**Guyton & Hall, 1996b**].

Eukariotiese selmembrane is baie meer deurlaatbaar vir  $K^+$  ione as vir enige ander ioon [**Rabinovitch & June, 1990; Roepe, 1995**]. Verder is die intrasellulêre kalium konsentrasie van 'n sel, groter as die kalium konsentrasie wat ekstrasellulêr in die omringende omgewing van die sel voorkom [**Guyton & Hall, 1996b**]. Hierdie oneweredige verspreiding van kalium ione oor die selmembraan, die selektiewe deurlaatbaarheid van die membrane vir kalium ione, sowel as die handhawing van die konsentrasie gradient deur middel van eletrogeniese pompe, dra in 'n groot mate tot die instandhouding van die membraan potensiaal by [**Shapiro, 1990; Becker & Deamer, 1991d**]. Buiten die kalium ione, speel die oneweredige verspreiding van natrium ione oor die selmembraan ook 'n belangrike rol in die ontwikkeling en handhawing van 'n membraan potensiaal oor die selmembraan [**Guyton & Hall, 1996b**]. Die somtotaal van die passiewe diffusie van die kalium- en natrium ione dra daartoe by dat 'n netto negatiewe membraan potensiaal oor die selmembrane van soogdier selle gehandhaaf word [**Rabinovitch & June, 1990**]. Die meeste rustende eukariotiese selle handhaaf 'n negatiewe membraan potensiaal van tussen 10 en 90 mV oor hul selmembrane [**Shapiro, 1990; Becker & Deamer, 1991d**].

Baie van die anti-kanker geneesmiddels waarteen MDR selle weerstandbiedend is, is kationiese, hidrofobiese swak basisse. Dit is bekend dat die beweging van hidrofobiese, kationiese verbindings oor die selmembraan, sensitief vir verandering in die membraan potensiaal van die selle is. Die grootte van die verandering in die membraan potensiaal, het 'n groot invloed op die verspreiding van hierdie hidrofobiese ione oor die selmembrane. 'n Laer membraan potensiaal kan byvoorbeeld tot 'n afname in die akkumulasie tempo van MDR-geassosieerde geneesmiddels lei. Die grootte en karakter van die membraan potensiaal beïnvloed dus die relatiewe akkumulering, retensie en partisie (verdeling) van chemoterapeutiese geneesmiddels in MDR selle. Hierdie parameters speel waarskynlik ook 'n belangrike rol tydens die transport van MDR-geassosieerde geneesmiddels oor die selmembrane van MDR selle [Roepe, 1995].

#### 5.4.2. Aktiewe transport

Dit is in sommige gevalle noodsaaklik dat 'n hoë konsentrasie van 'n sekere ioon in die intrasellulêre inhoud van die sel gehandhaaf word, selfs al bevat die ekstrasellulêre omgewing van die sel baie min van hierdie ioon en is die natuurlike neiging, die passiewe diffusie van die ioon vanuit die omgewing met die hoë konsentrasie na die omgewing met die laer konsentrasie. Byvoorbeeld, sonder die handhawing van 'n hoë kalium konsentrasie in die intrasellulêre inhoud van eukariotiese selle, sal die selle nie doeltreffend kan funksioneer nie. Die teenoorgestelde is ook waar. Dit is byvoorbeeld noodsaaklik dat 'n baie lae konsentrasie van natrium ione in die intrasellulêre inhoud van eukariotiese selle gehandhaaf moet word, ten spyte van die hoë konsentrasie van hierdie ione wat in die ekstrasellulêre omgewing van die selle aangetref word. Beide hierdie vereistes kan nie deur eenvoudige diffusie gehandhaaf word nie. Verbindings is dus nie in staat om passief teen 'n konsentrasie gradient oor die selmembrane te diffundeer nie [Guyton & Hall, 1996b]. Indien molekules of ione teen die konsentrasie gradient van die spesifieke molekules of ione vervoer word, staan dit as aktiewe transport bekend [Becker & Deamer, 1991d; Guyton & Hall, 1996b].



Verskeie tipes aktiewe transport prosesse kom voor. Die meganisme betrokke by hierdie onderskeie aktiewe transport prosesse word grootliks deur die verbinding en/of ioon wat vervoer word, sowel as die bron van energie wat tydens die aktiewe transport proses benodig word, beïnvloed [Becker & Deamer, 1991d]. In die meeste aktiewe transport prosesse is die energie direk vanaf die afbraak (hidrolise) van adenosien trifosfaat (ATP) of 'n ander hoë-energie fosfaat verbinding, afkomstig [Becker & Deamer, 1991d; Guyton & Hall, 1996b].

Tydens die meeste aktiewe transport prosesse, bemiddel 'n draer proteïen gewoonlik die transport van die verbindings en/of ione oor die selmembraan. Hierdie draer proteïen tree as 'n gespesialiseerde membraan-geassosieerde ensiem op, wat die beweging van die verbinding en/of ione oor die selmembraan kataliseer. Hierdie ensieme staan ook as proteïen "pompe" bekend. Die natrium-kalium pomp is huidiglik die aktiewe transport sisteem wat die beste verstaan word [Becker & Deamer, 1991d].

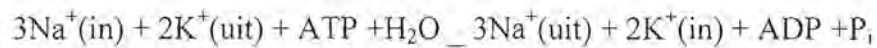
#### 5.4.2.1. Die natrium-kalium ATPase pomp

Een van die kenmerkendste eienskappe van meeste eukariotiese selle is, soos reeds genoem, die handhawing van 'n hoë intrasellulêre kalium ioon konsentrasie (100 - 150 mM) en 'n lae intrasellulêre natrium ioon konsentrasie in die selle. Die handhawing van hierdie eienskappe is noodsaaklik vir die doeltreffende funksionering van die sel, aangesien kalium vir verskeie sellulêre lewensproesse (soos ribosoom funksie en die aktivering van verskeie ensieme) benodig word [Becker & Deamer, 1991d]. Die natrium-kalium pomp is vir die handhawing van die kalium sowel as natrium ioon konsentrasies in die eukariotiese selle verantwoordelik. Hierdie pomp speel ook 'n belangrike rol in die instandhouding van die negatiewe membraan potensiaal van eukariotiese selle [Guyton & Hall, 1996b].

Die natrium-kalium pomp kom in alle soogdier selle voor en is huidiglik die aktiewe transport sisteem wat die beste verstaan word. Die natrium-kalium pomp



besit 'n vasgestelde inhirente rigting van werking, aangesien dit slegs in staat is om kalium ione in die sel in te pomp en natrium ione uit die sel uit te pomp. Beide die inwaartse pomp van die kalium ione sowel as die uitwaartse pomp van natrium ione is energie-vereisende prosesse en benodig die hidrolise van ATP om doeltreffend te kan funksioneer [Becker & Deamer, 1991d]. Die algehele stoichiometrie van die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase reaksie is:



Die werking van die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase pomp lei daartoe dat drie positiewe ladings die sel verlaat, vir elke twee positiewe ladings wat die sel binne kom. Hierdie netto uitdrywing van Na<sup>+</sup> ione stel die soogdier selle onder andere in staat om hul water inhoud osmoties te reguleer (Figuur 5.1) [Voet & Voet, 1995c; Tanner & Welhausen, 1998].

Kardiese glikosiede het grootliks tot die bestudering van die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase bygedra [Voet & Voet, 1995c]. Die kardiese glikosiede, soos ouabain, is natuurlike toksiese produkte wat van plante afkomstig is. Ouabain is in staat om die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase aktiwiteit te inhibeer, deur aan die ekstrasellulêre kant van die ensiem te bind en sodoende die defosforileringsreaksie tydens die werking van Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase te inhibeer [Becker & Deamer, 1991d; Voet & Voet, 1995c].

## HOOFSTUK 6

### DOELWITTE

Die drie hoofdoelwitte van hierdie tesis was:

- 1) **Om die membraan potensiaal en  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit van 'n P-gp positiewe en negatiewe klein sel long kanker selyn, sowel as 'n moontlike onderlinge verwantskap tussen hierdie sellyne, te bepaal.** Vir hierdie deel van die studie is van H69/P, en 'n P-gp-positiewe sublyn, H69/LX4, gebruik gemaak.
  
- 2) **Om die meganisme waarop die riminofenasien verbindings veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid omkeer, te ondersoek.** Na aanleiding van 'n langtermyn siftingsprogram van nuwe riminofenasien verbindings in die Departement Immunologie is verskeie verbindings geïdentifiseer wat of uitsonderlike direkte anti-tumor aktiwiteit of chemosensitiserings-eienskappe besit. Die meganisme waarop hierdie verbindings veelvoudige geneesmiddelbestandheid omkeer, was egter nooit ondersoek nie. Vir hierdie studie is 4 verbindings (Figuur 7.1) gesellekteer, naamlik:
  - a) B663, die oorspronklike verbinding wat minder effektief is as beide sitotoksiese middel sowel as chemosensitiseerder,
  - b) B3962, die TMP-gesubstitueerde fenasiene sonder halogene wat veral sitotoksies is, maar minder doeltreffend is as chemosensitiseerder,
  - c) B4100 en B4121, gehalogineerde TMP-gesubstitueerde fenasiene wat effektiewe chemosensitiseerders is, maar minder sitotoksies is.

Om te bepaal of die chemosensitiserings-eienskappe van die riminofenasien verbindings te wyte is aan nie-spesifieke interaksies met die selmembrane van MDR selle is die volgende bepalings gedoen:

- i) die lipofilisiteit van die verbindings,
- ii) die sensitiwiteit van rooibloedselmembrane vir die verbindings,
- iii) die effek van die verbindings op die membraan potensiaal,

- iv) die akkumulاسie van die verbindings in die selle,
- v) die invloed van die verbindings op membraan  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase.

**3) Om die verspreiding van die vier riminofenasien verbindings in verskillende weefsels van Sprague-Dawley rotte, met of sonder DMBA-geïnduseerde veelvuldige mamma-karsinome te ondersoek.**



## HOOFSTUK 7

### MEMBRAAN POTENSIAAL EN $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPASE AKTIWITEIT VAN 'N P-GLIKOPROTEÏEN-POSITIEWE EN -NEGATIEWE KLEIN SEL LONGKANKER SELLYN SOWEL AS DIE UITWERKING VAN OUABAIN OP DIE AKSIE VAN P-GLIKOPROTEÏEN

#### 7.1. Doelwitte

Soos reeds in my literatuurstudie genoem, is veranderinge in die membraan potensiaal van P-gp positiewe kanker selle in sommige, maar nie alle studies, beskryf. 'n Meganistiese verwantskap tussen membraan potensiaal en P-gp is wel voorgestel, maar nog nie bewys nie. Die meganisme van 'n verlaagde membraan potensiaal in P-gp positiewe kanker selle is ook nog nie vasgestel nie, alhoewel verskeie moontlikhede wel bestaan:

- i) P-gp mag as 'n kation invloei (bv  $\text{K}^+$ -ATPase) of anioon uitvloei (bv  $\text{Cl}^-$  uitvloei) kanaal funksioneer wat in beide gevalle tot depolarisasie sal lei.
- ii) Verlaagde  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit, 'n kation teen-transporter wat die membraan potensiaal van rustende selle in die meeste sel tipes in stand hou, sal ook tot depolarisasie lei.

Die laboratorium navorsing wat in die huidige hoofstuk beskryf word, is daarop gemik om die volgende in 'n kleinsel long kanker sellyn, H69/P, sowel as 'n veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende sublyn, H69/LX4, *in vitro* te ondersoek:

- i) Die vlak van P-gp uitdrukking.
- ii) Rustende membraan potensiaal.
- iii)  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit.
- iv) Die uitwerking van ouabain, 'n selektiewe inhibeerder van  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, op P-gp funksie.

## 7.2. Media en Reagense

### 7.2.1. 3-[4,5-Dimetieltiazool-2-iel]-2,5-difeniel-tetrazolium bromied (MTT) oplossing

150 mg MTT-poeier (Sigma Chemical Company, St Louis, MO) is in 30 ml fosfaat gebufferde sout-oplossing (FBS) (sien 7.2.3.) opgelos. Die finale konsentrasie van hierdie oplossing was 5 mg/ml.

### 7.2.2. Fetale kalfserum gesupplementeerde RPMI 1640 medium

RPMI 1640 weefselkultuur medium (Highveld Biological (Pty) Ltd, Johannesburg, Suid-Afrika) is met die volgende hoeveelhede antibiotikum (Highveld Biological (Pty) Ltd) en hitte-geïnaktiveerde fetale kalf serum (Highveld Biological (Pty) Ltd) gesupplementeer:

445 ml RPMI 1640 medium

5 ml antibiotikum (10 mg/ml penisillien en 10 mg/ml streptomisien)

50 ml hitte-geïnaktiveerde fetale kalfserum (FKS) (sien 7.2.4.)

### 7.2.3. Fosfaat gebufferde sout-oplossing (FBS)

Die gedehidreerde FTA gehemaglutineerde-poeier (BBL Microbiology Systems, Becton Dickinson and Company, VSA) is as volg opgemaak:

9.23 g van die FTA gehemaglutineerde-poeier is in 1 liter gedeïoniseerde water opgelos.

### 7.2.4. Hitte-geïnaktiveerde fetale kalf serum

Fetale kalf serum is vir 45 minute by 56 °C geïnkubeer.

### 7.2.5. Kanker sellyne

'n Menslike klein sel long kanker sellyn, H69/P, sowel as 'n veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende (MDR) sub-sellyn, H69/LX4, is in hierdie studie gebruik. Beide die sellyne is goedgevestig deur Dr PR Twentyman, MNR Kliniese Onkologie en Radioterapeutiese Eenheid (Hills Road, Cambridge, Verenigde Koningryk) verskaf. Die geneesmiddel weerstandbiedende sellyn, H69/LX4, is *in vitro* vir geneesmiddel weerstandbiedendheid geselekteer, deur die oorspronklike geneesmiddel sensitiewe selle, H69/P, stelselmatig aan toenemende konsentrasies van doksorubisien bloot te stel. Die H69/LX4 sellyn druk P-gp oormatig op hul sel-opervlaktes uit en is oorspronklik deur **Twentyman *et al* (1986)** as 'n sellyn met 'n defektiewe geneesmiddel akkumulerings-meganisme, beskryf.

### 7.2.6. K<sup>+</sup>-vrye Tris-buffer

Die volgende reagense is in 2 liter gedeïoniseerde water opgelos:

4.80 g Tris-buffer (Sigma Chemical Company)

1.80 g Glukose (BDH Laboratory Reagents)

12.0 g NaCl (Hopro Analytics (Pty) Ltd)

0.50 g MgSO<sub>4</sub> (BDH Laboratory Reagents)

Die pH van die buffer is net voor gebruik tot 7.4 aangepas.

### 7.2.7. 2 M NaOH-oplossing

Vier gram (4 g) NaOH-kristalle (Holpro Analytics (Pty) Ltd) is in 50 ml gedeïoniseerde water opgelos.



### 7.2.8. Ouabain-oplossing

75 mg ouabain-poeier is in 1 ml DMSO opgelos. Hierdie 75 mg/ml oplossing het as basis-oplossing gedien. Die basis-oplossing is by  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  geberg. Die ouabain basis-oplossing is tot die verlangde konsentrasie in die buffer of medium wat in die eksperimente gebruik is, verdun.

### 7.2.9. Telvloestof

Die volgende reagense is in 100 ml gedeïoniseerde water opgelos:

1 ml van 'n 0.1% Kristal Violet (Merck Chemical Company)-oplossing

2 ml asynsuur (Holpro Analytics Ltd)

### 7.2.10. Tiazool oranje-oplossing

Een milligram (1 mg) tiazool oranje-poeier is in een milliliter (1 ml) absolute metanol (BDH Laboratory Supplies) opgelos en by  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  geberg. Tydens die eksperimentele prosedure is die basis-oplossing tot 'n finale konsentrasie van  $0.25\text{ }\mu\text{g/ml}$  in FBS verdun.

### 7.2.11. 2% Triton X-100/ 0.1 M NaOH liseer-oplossing

Die volgende reagense is in 50 ml gedeïoniseerde water opgelos:

1.0 ml Triton X-100 (Sigma Chemical Company)

2.5 ml 2 M NaOH-oplossing

### 7.2.12. Vinblastien oplossing

2 mg vinblastien-poeier is in 1 ml DMSO opgelos. Hierdie oplossing het as basis-oplossing gedien. Die basis-oplossing is by  $-20^{\circ}\text{C}$  geberg. Die vinblastien basis-oplossing is tot die verlangde konsentrasie in die medium wat in die eksperimente gebruik is, verdun.

### 7.2.13. [ $^3\text{H}$ ]Vinblastien/koue (nie radio-aktief) vinblastien-mengsel

Oplossing A: 80  $\mu\text{l}$  van 'n 1  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]vinblastien-oplossing (spesifieke aktiwiteit: 11.2 Ci/mmol; Amersham, Bucks, Verenigde Koningryk) is by 2 ml FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium gevoeg.

Oplossing B: 10  $\mu\text{l}$  van 'n 1 mg/ml koue (nie radio-aktiewe) vinblastien-oplossing (Sigma Chemical Company, St Louis, MO) is by 4 ml FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium gevoeg.

Twee milliliter (2 ml) van oplossing A is by 2 ml van oplossing B gevoeg om 'n 250 ng/ml [ $^3\text{H}$ ]vinblastien/koue vinblastien mengsel te verkry.

## 7.3. Metodes

### 7.3.1. Kweking, instandhouding en voorbereiding van H69/P en H69/LX4 selle vir die gebruik in eksperimente

#### 7.3.1.1. Kweking en instandhouding van H69/P en H69/LX4 selle

Beide die sellyne is, soos deur **Twentyman *et al* (1992)** beskryf is, onderhou. Die H69/P selle is in FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium gekweek. Die genesmiddel weerstandbiedende selle, H69/LX4, is daarenteen in FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium, wat addisioneel met 100 ng/ml doksorubisien gesupplementeer is, gekweek. Beide die H69/P en die H69/LX4

sellyne groei as drywende aggregate in 75 cm<sup>2</sup> weefselkultuur flesse. Die medium waarin die selle groei is weekliks met vars medium vervang. Die geneesmiddelweerstandbiedende selle, H69/LX4, is 48 uur voor gebruik in alle eksperimente, uit die doksorubisien-bevattende RPMI 1640 medium verwyder en in FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium, sonder doksorubisien, gevoeg.

### **7.3.1.2. Voorbereiding van H69/P en H69/LX4 selle vir gebruik in eksperimente**

Die weefselkultuur selle (H69/P of H69/LX4) is steriel vanuit 'n 75 cm<sup>2</sup> weefselkultuur fles in 'n 15 ml polistireen proefbuis oorgegooi en vir 10 minute teen 200 g (1000 rpm) gesentrifugeer. Die boonste medium is versigtig afgegooi en die selle is weereens met FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium gewas. Na die laaste wasstap is die onderste sel-konsentraat in 1-2 ml van die buffer of medium wat in die eksperiment gebruik is, hersuspendeer. Die sel-aggregate is tot 'n enkel selsuspensie opgebreek, deur dit herhalend met 'n steriele plastiese pasteurpipet op te suig. Die sel-suspensie is hierna tot die verlangde selkonsentrasie in die verlangde medium of buffer verdun.

## **7.3.2. Direkte sitotoksiese aktiwiteit van vinblastien en ouabain sowel as die MDR omkerings-aktiwiteit van ouabain**

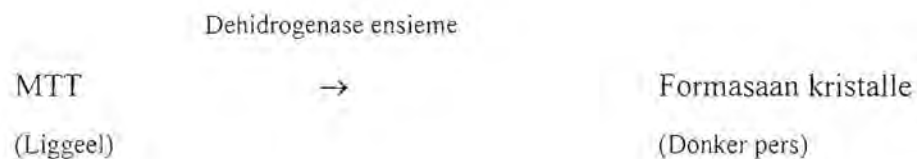
### **7.3.2.1. Beginsels betrokke by die kolorimetriese, sitotoksiese MTT-bepaling**

Tydens die bepaling van die direkte sitotoksiese en/of MDR omkerings-aktiwiteite van 'n verbinding, is dit nodig om die aantal lewensvatbare, metabolies aktiewe selle, wat na behandeling met die verbinding nog in die toets-sisteem aanwesig is, te kan bepaal. Verskeie tegnieke is beskikbaar om die aantal lewende selle in 'n toets-sisteem te bepaal. Hierdie tegnieke sluit onder andere die inkorporering van radio-aktief gemerkte nukleotiede, soos [<sup>3</sup>H]timidien of [<sup>125</sup>I]jodium-deoksiridien, in die DNA van verdelende selle, in. Alhoewel hierdie radio-aktiewe



metodes gedeeltelik geoutomatiseer kan word, is die teenwoordigheid van die radio-aktiewe materiaal 'n groot nadeel en is hierdie tegnieke baie arbeid intensief. **Mossman** het in **1983** 'n kolorimetriese MTT-bepaling, wat van multititer plate gebruik maak, ontwikkel. Hierdie tegniek het daartoe bygedra dat 'n groot hoeveelheid monsters terselfdertyd vinnig en akkuraat geanaliseer kan word, sonder om van radio-aktief gemerkte materiaal gebruik te maak [**Mossman, 1983**].

Die kolorimetriese MTT-bepaling is op die intrasellulêre omskakeling van die geel MTT-substraat na 'n donker pers produk (formasaan kristalle), gebaseer. Mitochondriale dehidrogenase ensieme in die sel is vir hierdie omskakeling verantwoordelik [**Mossman, 1983**].



Indien 'n homogene sel-populasie, soos weefselkultuur selle gebruik word, is die hoeveelheid formasaan kristalle wat in 'n putjie gegenereer word, direk eweredig aan die aantal lewensvatbare, metabolies aktiewe selle wat na behandeling nog in die putjie teenwoordig is. Die kleur intensiteit van die intrasellulêr geproduseerde formasaan kristalle in 'n putjie, is direk eweredig aan die aantal lewensvatbare selle wat in die putjie aanwesig is. Die omskakeling van MTT na formasaan kristalle kan nie deur dooie selle, eritrosiete en/of die weefselkultuur-medium geïnduseer word nie [**Mossman, 1983**]. Hierdie bepaling is dus spesifiek vir lewensvatbare, metabolies aktiewe selle.

### 7.3.2.2. Prosedure wat tydens die kolorimetriese, sitotoksiese MTT-bepaling gevolg is

Die eksperimente is heeltyd onder steriele toestande uitgevoer. Die metode wat gevolg is, is voorheen deur **Van Rensburg *et al* (1994)** beskryf. Die verlangde sel-suspensie (H69/P of H69/LX4) is soos in 7.3.1.2. bespreek is, vir die eksperimente voorberei. Die selsuspensie is daarna tot 'n finale konsentrasie van  $1 \times 10^5$  selle/ml in FKS gesupplementeerde RPMI 1640 opgemaak. Honderd mikroliter (100  $\mu$ l) van die sel-suspensie is in elke putjie van 'n 6-mm Linbro weefselkultuur-plaat met 96 putjies (Flow Laboratories, Inc., Rockville, Md, VSA) gevoeg. Die direkte sitotoksiese aktiwiteit van vinblastien en ouabain vir die selle is bepaal deur twintig mikroliter (20  $\mu$ l) van die verlangde konsentrasie van vinblastien of ouabain by die selle te voeg. Die volume van elke putjie is, voor die byvoeging van die middels, met gesupplementeerde RPMI 1640 medium aangevul. Die finale volume in elke putjie was 200  $\mu$ l. Die verlangde oplosmiddel (DMSO) kontroles is ingesluit.

Die mikrotiter plaat is vir 7 dae by 37 °C in 'n 5% CO<sub>2</sub>-atmosfeer geïnkubeer, waarna 20  $\mu$ l van 'n 5 mg/ml MTT-oplossing by elke putjies gevoeg is. Die plaat is vir 'n verdere 4 uur by 37 °C geïnkubeer. Die mikrotiter plate is na inkubasie met MTT vir 10 minute teen 850 g (2000 rpm) gesentrifugeer. Die medium in elke putjie is versigtig verwyder, sonder om die donker pers selkonsentraat onder in die putjies te versteur. Honderd-en-vyftig mikroliter (150  $\mu$ l) FBS is by elke putjie gevoeg en die mikrotiter plate is weer vir 10 minute teen 850 g (2000 rpm) gesentrifugeer. Die wasstap met FBS is nog een keer herhaal. Na die wasstappe met FBS, is die formasaan kristalle opgelos deur 50  $\mu$ l DMSO in elke putjie te voeg. Die plate is voortdurend geskud totdat die kristalle volledig in die DMSO opgelos het en die mate van MTT reduksie is spektrofotometries by 'n toets golflengte van 540 nm en 'n verwysings-golflengte van 620 nm, bepaal. Die resultate is as persentasie van kontrole (onbehandelde selle) aangedui.

Die invloed van ouabain op die sensitiviteit van die selle vir vinblastien is bepaal deur die selle met verskillende konsentrasies ouabain in die teenwoordigheid van 'n nie-toksiese vinblastien konsentrasie (25.5 ng/ml) te behandel.

### **7.3.3. Uitdrukking van P-gp deur H69/P en H69/LX4 selle**

#### **7.3.3.1. Prosedure gevolg om die uitdrukking van P-gp op die oppervlaktes van H69/P en H69/LX4 te bepaal**

Die verlangde sel-suspensie (H69/P of H69/LX4) is soos in 7.3.1.2. bespreek is, vir die eksperimente voorberei. Die sel-suspensie is daarna tot 'n finale konsentrasie van  $1 \times 10^6$  selle/ml in FKS gesupplementeerde RPMI 1640 opgemaak. Honderd mikroliter (100  $\mu$ l) van die verlangde sel-suspensie is by 10  $\mu$ l van die muis/anti-mens monoklonale P-glikoproteïen teenliggaam (MRK 16; Immunotech, Frankryk) in 'n proefbuis gevoeg. In die kontrole proefbuis is 100  $\mu$ l van die selsuspensie by 10  $\mu$ l FBS gesupplementeer met 0.5% bees serum albumien (BSA), gevoeg. Die sel-suspensie is vir 30 minute in die donker by kamertemperatuur, geïnkubeer. Die selle is twee keer met 0.5% BSA gesupplementeerde FBS gewas. Na die wasstappe is die selsuspensie in 100  $\mu$ l BSA gesupplementeerde FBS hersuspendeer en 50  $\mu$ l van 'n sekondêre bok/anti-muis teenliggaam wat met die fluorochroom fluorosien isotiosianaat (FITC) gemerk is, is bygevoeg. Die proefbuis is vir 'n verdere 30 minute in die donker by kamertemperatuur, geïnkubeer. Na inkubasie is die selle twee keer met 0.5% BSA gesupplementeerde FBS gewas. Die selle is na die laaste wasstap in 500  $\mu$ l 0.5% BSA gesupplementeerde FBS hersuspendeer en op die vloeisitometer (Epics, Profile II, Coulter) geanaliseer.



#### 7.3.4. Intracellulêre akkumulering van radio-aktief gemerkte vinblastien sowel as die fluoresserende kleurstof, tiazool oranje, in H69/P en H69/LX4 selle

##### 7.3.4.1. Beginsels betrokke by die P-gp-bemiddelde verlaging in die intracellulêre akkumulering van [<sup>3</sup>H]vinblastien sowel as tiazool oranje in veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende selle

Soos reeds genoem, pomp P-gp verskeie verbindings, insluitend vinblastien en tiazool oranje, aktief uit MDR selle uit [Bucana *et al*, 1990; Kessel *et al*, 1991; Ford, Yang & Hait, 1996]. Hierdie aktiewe P-gp-bemiddelde “uitpomp” van [<sup>3</sup>H]vinblastien sowel as tiazool oranje uit die MDR selle, het ‘n verlaging in die intracellulêre akkumulering van die verbindings in P-gp-positiewe MDR selle tot gevolg [Gottesman *et al*, 1996]. [<sup>3</sup>H]vinblastien sowel as die fluoresserende kleurstof, tiazool oranje, kan dus as indikaturs van die vermoë van potensiële MDR chemosensitiseerders om MDR om te keer, gebruik word [Bucana *et al*, 1990; Kessel *et al*, 1991].

##### 7.3.4.2. Prosedure wat gevolg is tydens die bepaling van die intracellulêre akkumulering van [<sup>3</sup>H]vinblastien in H69/P en H69/LX4 selle sowel as die effek van ouabain daarop

Die metode wat gevolg is, is oorspronklik deur Coley *et al* (1989) beskryf. Suspensies van H69/P of H69/LX4 selle is vir die eksperimente voorberei (sien 7.3.1.2.) en tot ‘n finale konsentrasie van  $3 \times 10^5$  selle/ml in FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium opgemaak. Een milliliter (1 ml) hoeveelhede van die selsuspensie is in 15 ml polistireenproefbuis gevoeg en vir 30 minute by 37 °C gepreïnkubeer. Die verlangde konsentrasies van ouabain is hierna by die onderskeie selsuspensies gevoeg. Die finale ouabain konsentrasies het tussen 0,003 nM en 0,10 nM gewissel. Die selle is daarna vir 60 minute by 37 °C, in die afwesigheid of die teenwoordigheid van ouabain, geïnkubeer. Na die inkubasie tydperk is 70 µl van ‘n 250 ng/ml [<sup>3</sup>H]vinblastien/koue vinblastien

mengsel by die selsuspensies gevoeg en is die selle vir 'n verdere 60 minute by 37 °C geïnkubeer. Die opname van [<sup>3</sup>H]vinblastien deur die selle is, deur die proefbuis met yskoue FBS te vul, getermineer. Die proefbuis is vir 5 minute teen 850 g (2000 rpm) gesentrifugeer en die wasproses is nog een keer met yskoue FBS herhaal. 1% Triton X-100/ 0.1 M NaOH liseer-oplossing (0.4 ml) is by die selkonsentraat gevoeg en die proefbuis is vir 'n paar sekondes gevorteks. Die geliseerde sel-konsentraat is versigtig na sintilasië glasbuis oorgedra en die hoeveelheid radio-aktiwiteit teenwoordig, is met behulp van 'n vloeistof sintilasië spektrofotometer bepaal. Die resultate is as tellings per minuut (tpm) verkry. Die ru data is daarna as persentasie van kontrole (onbehandelde selle) uitgedruk.

### **7.3.5. Procedure wat gevolg is tydens die vloeisitometrie 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**

#### **7.3.5.1. Voorbereiding van die vloeisitometer (Epics, Profile II, Coulter, Miami, Florida, VSA) vir tiazool oranje opname studies**

Die plastiese buise van die vloeisitometer is, soos deur **Rabinovitch & June (1990)** voorgestel is, vir die eksperimente voorberei. 'n Vooraf verhitte (37 °C) 0.25 µg/ml tiazool oranje-oplossing is vir 15 minute konstant deur die buise van die vloeisitometer laat vloei. Die adsorpsie van die tiazool oranje, aan die buise bereik baie stadig 'n ewewig. Dit kan 'n stadige verhoging in die basislyn van die sellulêre fluoressensie tydens die eksperiment tot gevolg hê. Die vooraf behandeling van die buise verseker dat adsorpsie van tiazool oranje aan die buise reeds 'n ewewig bereik het, voor met die eksperimente begin is. 'n Konstante basislyn word sodoende tydens die eksperiment verseker [**Rabinovitch & June, 1990**].



### 7.3.5.2. Vloeisitometriese bepaling van die opname van tiazool oranje deur H69/P en H69/LX4 selle

Die metode is, met modifikasies, gevolg soos deur **Rabinovitch & June (1990)** beskryf is. Suspensies van H69/P- of H69/LX4 selle is vir die eksperimente voorberei (sien 7.3.1.2) en tot 'n finale konsentrasie van  $4 \times 10^5$  selle/ml in FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium opgemaak. Een milliliter (1 ml) hoeveelhede van die selsuspensie is in proefbuis gevoeg en vir 15 minute by  $37^\circ\text{C}$  gepreïnkubeer. Die verlangde konsentrasies van ouabain is na preïnkubasie by die onderskeie proefbuis gevoeg. Die finale konsentrasies van ouabain wat in hierdie studie gebruik is, het tussen 0.003 nM en 0.1 nM gewissel. Die selsuspensie is daarna vir 30 minute by  $37^\circ\text{C}$ , in die teenwoordigheid of afwesigheid van ouabain geïnkubeer. Na die 30 minute inkubasie tydperk is 4 ml vooraf verhitte ( $37^\circ\text{C}$ ) tiazool oranje-bevattende FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium ( $0.25 \mu\text{g/ml}$ ) by die selle gevoeg en is die selle vir 'n verdere 15 minute by  $37^\circ\text{C}$  geïnkubeer. Die mate waarteen die fluoesserende kleurstof, tiazool oranje, deur die selle opgeneem is, is direk (sonder enige was-stappe) vloeisitometries (Epics, Profile II, Coulter) bepaal. Die verlangde oplosmiddel kontroles is in hierdie eksperimente ingesluit. Die resultate is as die graad van fluoressensie intensiteit (mediaan kanaal nommer) uitgedruk.

### 7.3.6. $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle

#### 7.3.6.1. Beginsels betrokke by die opname van radio-aktiewe kalium

Die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase ensiem word in alle soogdier selle aangetref. Hierdie ensiem besit 'n vasgestelde inhirente rigting van werking, aangesien dit slegs in staat is om kalium ione in die eukariotiese sel in te pomp en natrium ione uit die sel uit te pomp [**Becker & Deamer, 1991d**].



Die kardiëse glikosied, ouabain, is in staat om die werking van die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase ensiem te inhibeer, deur aan die ekstrasellulêre kant van die ensiem te bind [Voet & Voet, 1995c]. Ouabain is daarom as positiewe kontrole in die eksperimente ingesluit.

### 7.3.6.2. Prosedure wat gevolg is tydens die bepaling van $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle sowel as die effek van ouabain daarop

H69/P en H69/LX4 selle is vir die eksperimente soos in 7.3.1.2. beskryf is, voorberei. Die selsuspensie is tot 'n finale konsentrasie van  $5 \times 10^5$  selle/ml in  $\text{K}^+$ -vrye Tris buffer opgemaak. Twee milliliters (2 ml) van die selsuspensie is in proefbuis gevoeg en vir 30 minute by  $37^\circ\text{C}$  gepreïnkubeer. Na preïnkubasie is  $100 \mu\text{l}$  van die verlangde konsentrasies van ouabain by die verlangde proefbuis gevoeg. Die ouabain konsentrasies het tussen 0.03 nM en 0.21 nM gewissel. Die selle is hierna vir 'n verdere 30 minute by  $37^\circ\text{C}$ , geïnkubeer. Die betrokke oplosmiddel kontroles is in alle eksperimente ingesluit. Na inkubasie is  $200 \mu\text{l}$  fetale kalf serum (finale konsentrasie van FKS was 10%) sowel as  $100 \mu\text{l}$   $^{42}\text{K}^+$  (Atomiese Energie Koöperasie, Pretoria, Suid-Afrika, spesifieke aktiwiteit 3mCi/ml) by elke proefbuis gevoeg. Om totale ouabain-inhibeerbare  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPase aktiwiteit te bepaal, is  $25 \mu\text{l}$  ouabain (finale konsentrasie van 2 mM) vyf minute voor die byvoeging by die agtergrond kontrole proefbuis gevoeg. Die waardes wat hier verkry is, is uiteindelik by al die ander waardes afgetrek. Na die byvoeging van  $^{42}\text{K}^+$ , is die selsuspensies vir 'n verdere 45 minute by  $37^\circ\text{C}$  geïnkubeer. Die proefbuis is daarna op ys geplaas en die selle is twee keer met yskoue isotoniese Tris buffer gewas. Na die tweede wasstap is die selle in 0.4 ml van 'n 1% Triton X-100/0.1 M NaOH liseer-oplossing hersuspendeer. Die geliseerde selsuspensie is versigtig na sintilasië glasbuis oorgedra en die hoeveelheid radio-aktiwiteit, is met behulp van 'n vloeistof sintelasië

spektrofotometer bepaal. Die resultate is as tellings per minuut (tpm) verkry. Die resultate is as persentasie van kontrole (onbehandelde selle) uitgedruk.

### 7.3.7. Bepaling van die membraan potensiaal van H69/P en H69/LX4 selle

#### 7.3.7.1. Beginsels betrokke by die vloeisitometrie bepaling van die membraan potensiaal van selle

Lipofiliese verbindings, soos sianien kleurstowwe, is in die meeste gevalle in staat om vrylik deur die lipiedlaag van die selmembraan te beweeg [Shapiro, 1990]. Die konsentrasie gradient van lipofiliese, kationiese sianien kleurstowwe, soos 3,3'-diheksieloksakarbosianien (DiOC<sub>6</sub>(3)), oor die selmembraan, word volgens die Nerst vergelyking bepaal:

$$[C^+]_i/[C^+]_o = e^{-F\psi/RT}$$

waar  $[C^+]_i$  die intrasellulêre konsentrasie van die kleurstof,  $[C^+]_o$  die ekstrasellulêre konsentrasie van die kleurstof,  $\psi$  die membraan potensiaal, R die gas konstante, T die temperatuur in grade Kelvin en F die Faraday konstante is [Rabinovitch & June, 1990; Shapiro, 1990]. Geneesmiddel-geïnduseerde veranderinge in die membraan potensiaal kan dus vanuit die veranderinge in verspreiding van die lipofiliese sianien kleurstowwe tussen die selle en die omringende medium bepaal word [Shapiro, 1990].

By lae konsentrasies van die 3,3'-diheksieloksakarbosianien kleurstof, DiOC<sub>6</sub>(3), sal depolarisasie van selle (dit wil sê 'n afname in die membraan potensiaal) tot die vrystelling van die kleurstof vanuit die selle in die omringende medium lei [Shapiro, 1990]. Die vloeisitometer meet slegs die hoeveelheid kleurstof wat intrasellulêr in elke sel geakkumuleer het. Membraan depolarisasie sal dus as 'n afname in fluoressensie intensiteit deur die vloeisitometer waargeneem word,

terwyl hiperpolarisasie van selle (dit wil sê 'n toename in membraan potensiaal) in teenstelling tot 'n verhoogde opname van die sianien kleurstof deur die selle, sal lei.

Soos reeds genoem is 'n groot verskeidenheid verbindings in staat om as substrate vir P-gp op te tree [Gottesman & Pastan, 1993; Lum *et al*, 1993]. Dit is daarom belangrik om daarop te let dat die 3,3-dihexieloksakarbosianien kleurstof, DiOC<sub>6</sub>(3), nie as substraat vir P-gp dien nie [Hasmann *et al*, 1989].

### **7.3.7.2. Vloesitometriese bepaling van die membraan potensiaal van H69/P en H69/LX4 selle sowel as die effek van ouabain daarop**

#### **7.3.7.2.1. Voorbereiding van die vloesitometer**

Die plastiese buise van die vloesitometer is, buiten die fluoresserende kleurstof wat gebruik is, net soos in 7.3.5.1. voorberei. 'n Vooraf verhitte (37 °C) 50 nM DiOC<sub>6</sub>(3)-oplossing is in plaas van die 0.25 µg/ml tiazool oranje oplossing gebruik.

#### **7.3.7.2.2. Prosedure wat tydens die vloesitometriese bepaling van die membraan potensiale van H69/P sowel as H69/LX4 selle gevolg is**

Die metode is met modifikasies, soos deur Rabinovitch & June (1990) beskryf is, gevolg. H69/P of H69/LX4 sel-suspensies is vir die eksperimente voorberei (sien 7.3.1.2) en tot 'n finale konsentrasie van  $4 \times 10^5$  selle/ml in 10% FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium opgemaak. Een milliliter (1 ml) van die selsuspensie is in proefbuis gevoeg en vir 15 minute by 37 °C gepreïnkubeer. Die verlangde konsentrasies van ouabain is na preïnkubasie by die onderskeie proefbuis gevoeg. Die finale konsentrasies van ouabain wat in hierdie studie gebruik is, het tussen 0.86 nM - 55.0 nM



gewissel. Die selsuspensie is daarna vir 30 minute by 37 °C geïnkubeer. Vier milliliter (4 ml) van 'n vooraf verhitte (37 °C) oplossing van 50 nM DiOC<sub>6</sub>(3) in 10% FKS-gesupplementeerde RPMI 1640 medium, is na die inkubasie tydperk by die selsuspensies gevoeg en die selle is vir 'n verdere 15 minute by 37 °C geïnkubeer. Die hoeveelheid DiOC<sub>6</sub>(3) kleurstof wat deur die selle opgeneem is, is direk (sonder enige wasstappe) met behulp van die vloeisitometer (Epics, Profile II, Coulter, Miami, Florida, VSA) bepaal. Die verlangde kontroles is in hierdie eksperimente ingesluit. Die resultate is as graad van fluoressensie intensiteit (mediaan kanaan nommer) uitgedruk.

### 7.3.8. Statistiese bepalings

Die resultate van elke reeks eksperimente is as die gemiddelde waarde ± die standaardfout uitgedruk. Statistiese bepalings binne 'n bepaalde eksperiment is met behulp van die Student t-toets vir gepaarde waardes gedoen.

## 7.4. Resultate

### 7.4.1. Sensitiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle vir die anti-kanker geneesmiddel, vinblastien.

Die IK<sub>50</sub>-waardes dui op die inhiberende konsentrasie van vinblastien wat tot 50% seldoding in die MTT-toetssisteem gelei het. Die IK<sub>50</sub>-waarde van vinblastien (IK<sub>50</sub> = 116.21 ± 7.07 ng/ml) was statisties betekenisvol hoër (P < 0.0001) in die geneesmiddel weerstandbiedende H69/LX4 selle as die IK<sub>50</sub> van vinblastien (IK<sub>50</sub> = 2.24 ± 1.03 ng/ml) wat vir die geneesmiddel-sensitiewe H69/P selle waargeneem is (Tabel 7.1).

**Tabel 7.1: Die inhiberende konsentrasies van vinblastien wat, na 'n 7-dae blootstellings- tydperk in die MTT-toetsstelsel, tot 50% seldoding van H69/P en H69/LX4 selle gelei het.**

Sellyn	IK <sub>50</sub> (vinblastien)
H69/P	2.24 ± 1.03 ng/ml
H69/LX4	116.21 ± 7.07 <sup>a</sup> ng/ml

Vyf tot sewe eksperimente is in duplikaat gedoen.

a:  $P < 0.0001$  indien dit met die resultate van H69/P vergelyk word

#### 7.4.2. Uitdrukking van P-gp deur H69/P en H69/LX4 selle

Die mate van P-gp uitdrukking was betekenisvol hoër in die H69/LX4 selle as die H69/P selle (Tabel 7.2). 98.7 % van die geanaliseerde H69/LX4 selle het P-gp teen 'n relatiewe hoë fluoressensie intensiteit (95.84; relatiewe eenhede) uitgedruk, terwyl slegs 4.3% van die geanaliseerde H69/P selle P-gp teen 'n lae fluoressensie intensiteit (8.64; relatiewe eenhede) uitgedruk het (Tabel 7.2).

**Tabel 7.2: Die mate van P-gp uitdrukking deur die H69/P en H69/LX4 selle.**

Sellyn	P-gp uitdrukking	
	% Uitdrukking van P-gp	Fluoressensie Intensiteit (Mediaan kanaal nommer)
H69/P	4.3%	8.64
H69/LX4	98.7%	95.84

Slegs een eksperiment is gedoen.

#### 7.4.3. $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle

Geen statisties betekenisvolle verskille in  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit is tussen die twee sellyne waargeneem nie (Figuur 7.1). Die resultate is as radio-aktiewe tellings per minuut (tpm) uitgedruk.  $^{42}\text{K}$  kalium het teen  $2000.0 \pm 883.0$  tpm in die H69/P selle geakkumuleer, nadat die agtergrond waardes afgetrek is. Die ooreenstemmende waarde in die H69/LX4 selle was  $3343.5 \pm 1135.4$  tpm. Agtergrond waardes is verkry deur 'n oormaat ouabain by die selle te voeg. Die waardes verkry vir totale  $\text{K}^+$  opname (voordat die waardes verkry met 'n oormaat ouabain afgetrek is) was  $3472.6 \pm 705.4$  en  $5021.2 \pm 1103.2$  respektiewelik. Hierdie waardes het ook nie statisties betekenisvol van mekaar verskil nie.

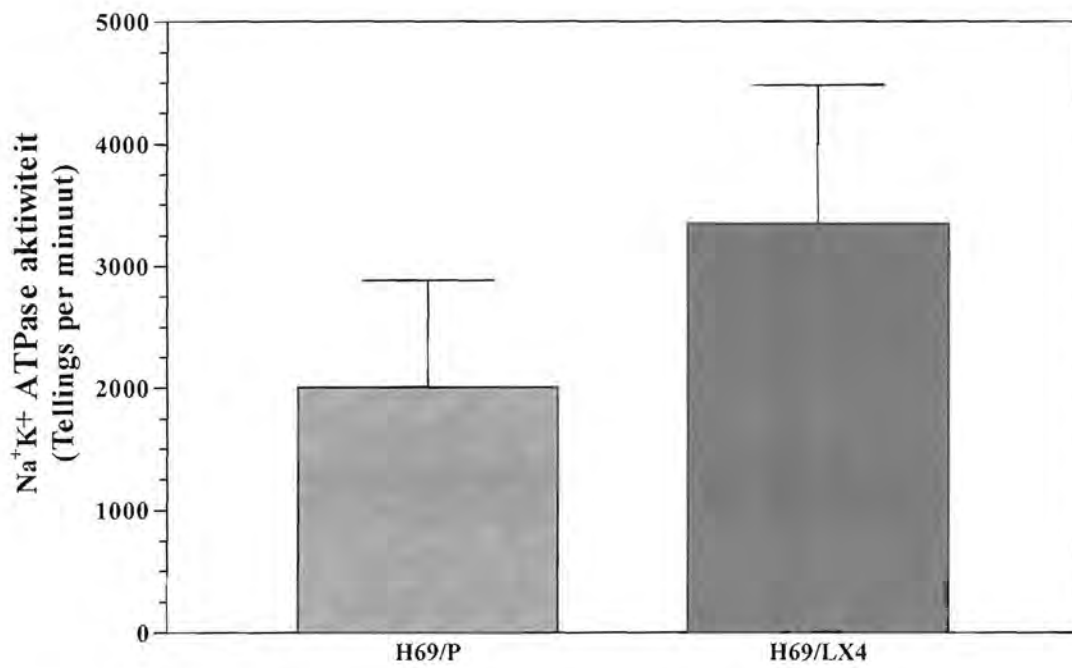
#### 7.4.4. Akkumulاسie van $\text{DiOC}_6(3)$ deur H69/P en H69/LX4 selle

Die mate van akkumulering van die fluoresserende 3,3'-diheksieloksakarbosianien kleurstof,  $\text{DiOC}_6(3)$ , was effens laer in die H69/LX4 selle as in die H69/P selle (Tabel 7.3). Hierdie verskille in akkumulering van  $\text{DiOC}_6(3)$  tussen die twee sellyne was egter nie statisties betekenisvol nie.

#### 7.4.5. Invloed van ouabain op die opname van radio-aktiewe kalium deur H69/P en H69/LX4 selle

Ouabain konsentrasies, tussen 0.05 nM en 0.21 nM, was in staat om die opname van kalium in die H69/P- sowel as die H69/LX4 sellyn te inhibeer. Geen statisties betekenisvolle verskille is onderlings in die sensitiwiteit van die H69/P selle en die H69/LX4 vir ouabain-bemiddelde inhibisie van kalium opname waargeneem nie (Figuur 7.2).





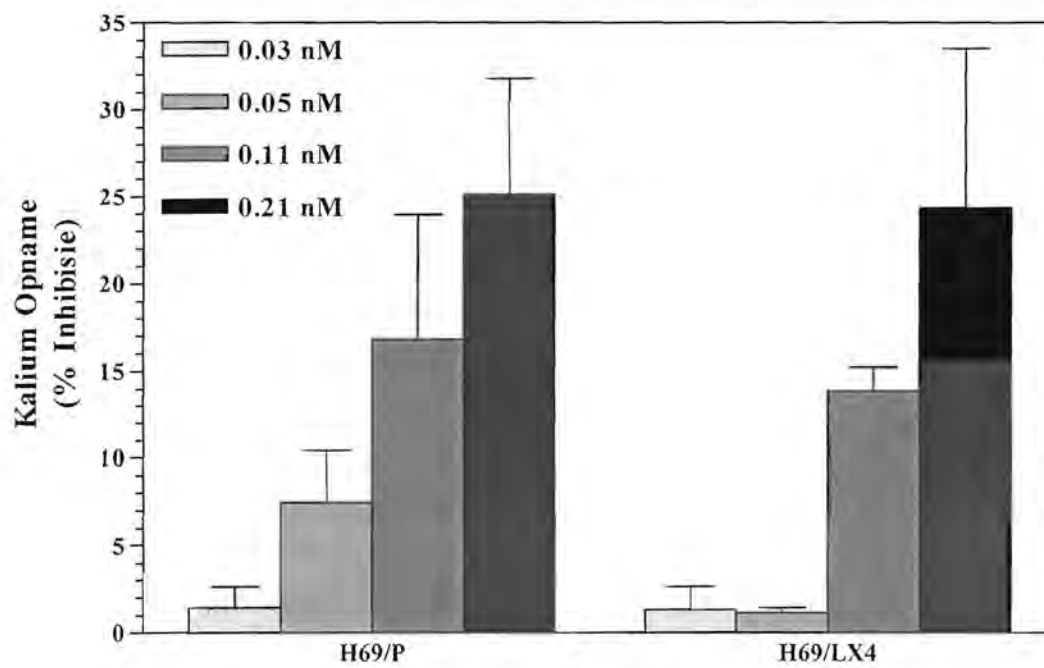
**Figuur 7.1:** Ouabain inhibeerbare <sup>42</sup>kalium opname deur die H69/P sellyn sowel as die H69/LX4 sellyn. Die resultate is as die gemiddelde radio-aktiewe tellings per minuut ± standaardfout, uitgedruk. Vyf eksperimente is gedoen.

**Tabel 7.3: Akkumulasie van DiOC<sub>6</sub>(3) in onderskeidelik die geneesmiddel-sensitiewe H69/P selle sowel as die veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende H69/LX4 selle**

	Fluoressensie Intensiteit (Mediaan Kanaal nommer)
<b>H69/P</b>	51.13 ± 7.98
<b>H69/LX4</b>	50.5 ± 1.83

Die resultate is as gemiddelde mediaan kanaal nommer ± standaardfout uitgedruk.

Vier tot vyf eksperimente is gedoen.



**Figuur 7.2:** Invloed van die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase inhibeerder ouabain, op die opname van kalium in die H69/P sellyn sowel as die H69/LX4 sellyn. Die resultate is as die gemiddelde % inhibisie  $\pm$  standaardfout, uitgedruk. Drie eksperimente is gedoen. Geen statisties betekenisvolle verskille (P-waardes) is ten opsigte van die kontrole (onbehandelde selle), waargeneem nie.



#### **7.4.6. Invloed van ouabain op die membraan potensiaal van H69/P sowel as H69/LX4 selle**

Die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibeerder, ouabain, het geen betekenisvolle invloed op die membraan potensiale van beide die H69/P sowel as die H69/LX4 selle uitgeoefen nie (Figuur 7.3).

#### **7.4.7. Die sensitiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle vir ouabain**

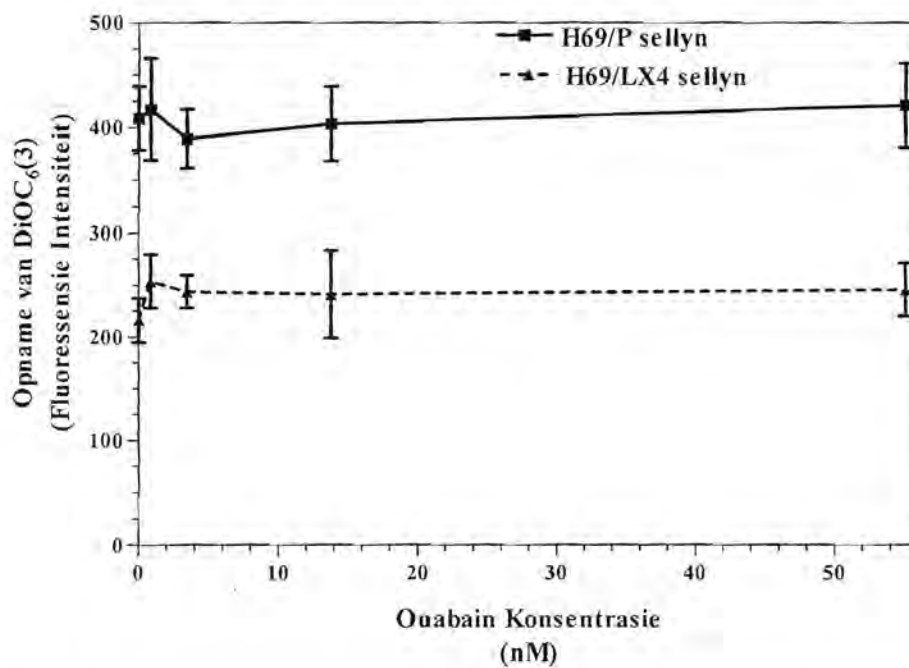
Die H69/LX4 selle was statisties betekenisvol meer weerstandbiedend teenoor die direkte sitotoksiese effekte van ouabain as die H69/P selle (Figuur 7.4). Die p-waardes het gewissel van  $p < 0.05$  tot  $p < 0.0001$ . Die  $IK_{50}$ -waarde van ouabain vir die H69/P selle, was  $0.008 \pm 0.001$  nM (Tabel 7.4). Daarenteen was die  $IK_{50}$ -waarde van ouabain vir die H69/LX4 selle  $0.011 \pm 0.008$  nM (Tabel 7.4). Hierdie verskille was egter nie statisties betekenisvol nie.

#### **7.4.8. Invloed van ouabain op die sensitiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle vir vinblastien**

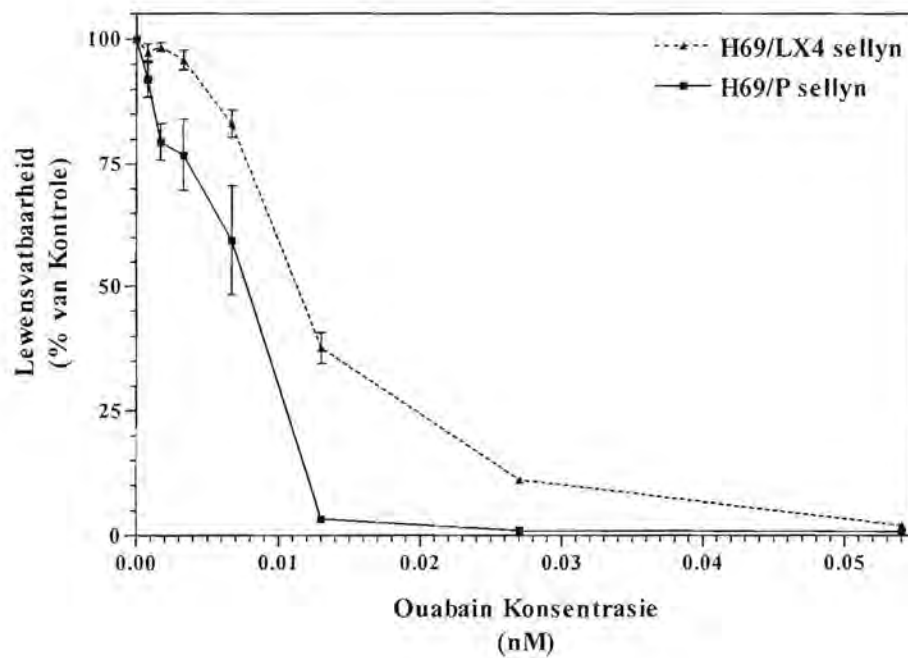
Ouabain het geen betekenisvolle effek op die sensitiwiteit van beide die H69/P selyn sowel as die H69/LX4 selyn vir vinblastien uitgeoefen nie (Figuur 7.5).

#### **7.4.9. Invloed van ouabain op die intrasellulêre akkumulering van radio-aktief gemerkte vinblastien in H69/P sowel as H69/LX4 selle**

Die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibeerder, ouabain (0.003 nM – 0.10 nM), het geen betekenisvolle invloed op die intrasellulêre akkumulering van vinblastien in die H69/P selyn sowel as die H69/LX4 selyn uitgeoefen nie (Figuur 7.6).



**Figuur 7.3:** Die invloed van die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase inhibeerder, ouabain, by 0.86 nM, 3.44 nM, 13.17 nM en 55.0 nM, op die membraan potensiale van onderskeidelik die H69P- en H69/LX4 sellyne. Die resultate is as die gemiddelde fluoressensie intensiteit (mediaan kanaal nommer)  $\pm$  standaardfout, wat in 3 - 5 eksperimente waargeneem is, uitgedruk. Geen statisties betekenisvolle verskille is waargeneem nie.



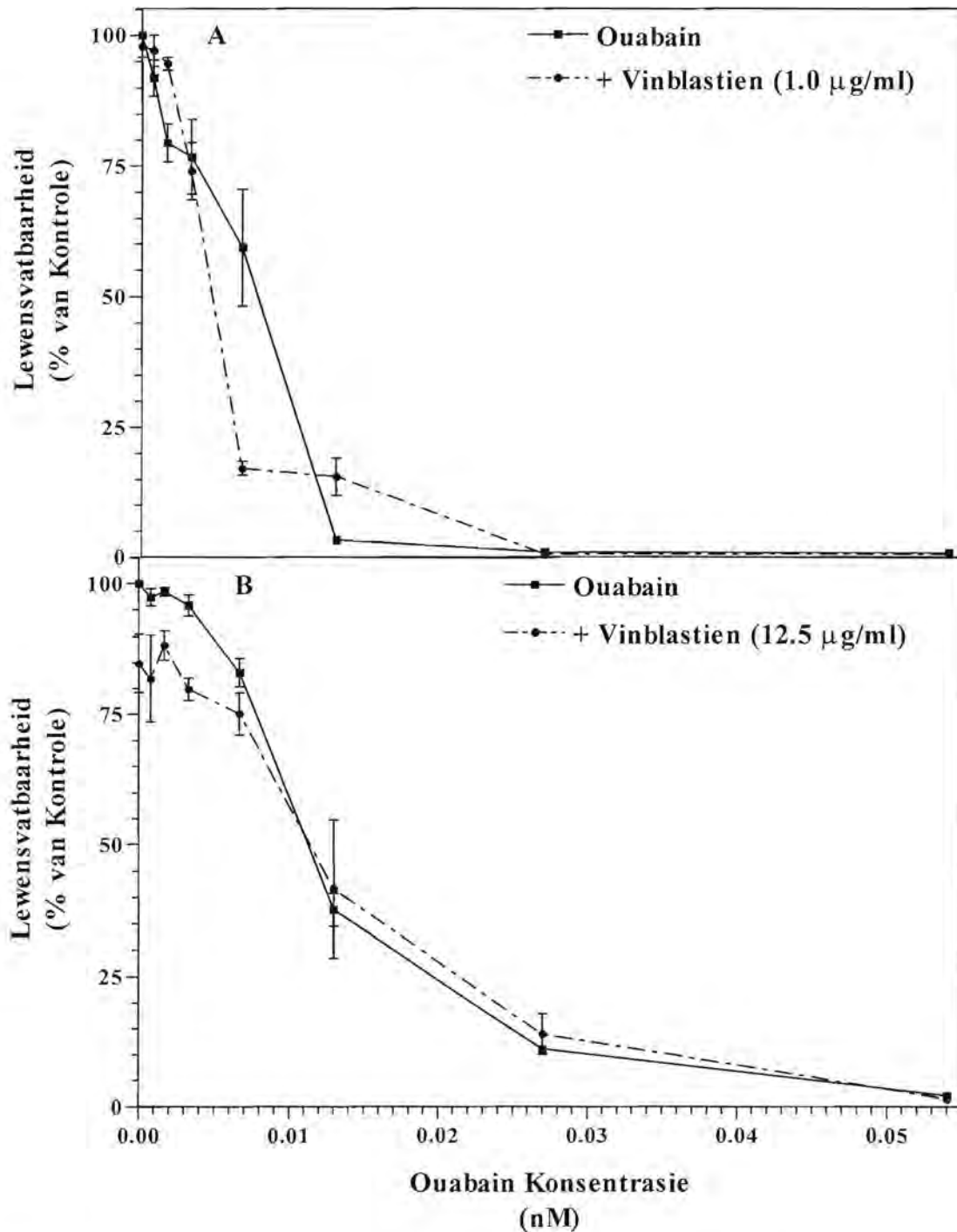
**Figuur 7.4:** Die direkte sitotoksiese aktiwiteit van die  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase inhibeerder, ouabain, in die H69P sellyn sowel as die H69/LX4 sellyn. Vyf tot sewe eksperimente is in duplikaat gedoen. Die resultate is as die % van kontrole (onbehandelde selle)  $\pm$  standaardfout, uitgedruk.



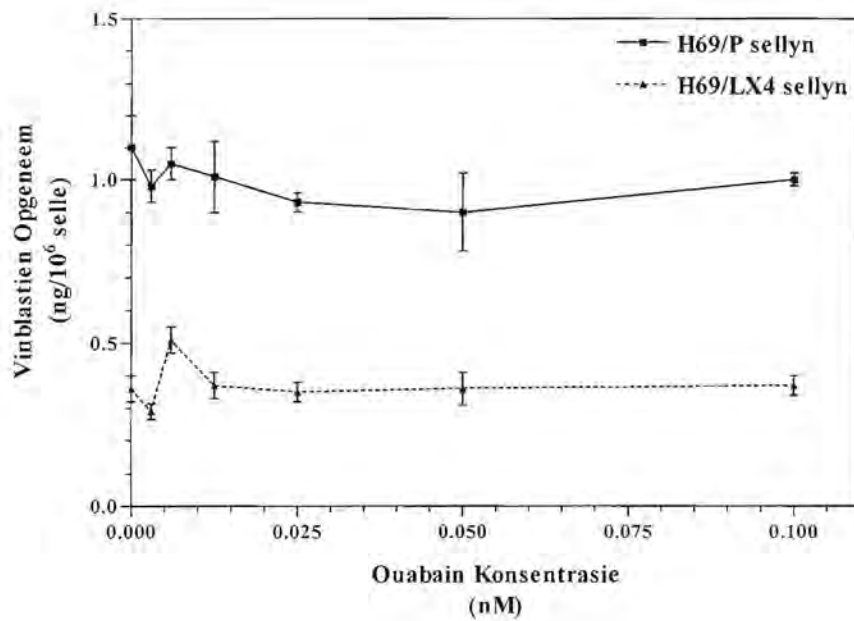
**Tabel 7.4: Die inhiberende konsentrasies van ouabain wat, na 'n 7-dae blootstellings tydperk in die MTT-toetsstelsel, tot 50% seldoding van H69/P en H69/LX4 selle gelei het.**

Sellyn	IK <sub>50</sub> (ouabain)
H69/P	0.008 ± 0.001 nM
H69/LX4	0.011 ± 0.008 nM

Vyf tot sewe eksperimente is in duplikaat gedoen.



**Figuur 7.5:** Die vermoë van die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase inhibeerder, ouabain, om die H69P sellyn (A) sowel as die H69/LX4 sellyn (B) vir die anti-kanker geneesmiddel, vinblastien, te sensitiseer. Drie tot vyf eksperimente is gedoen. Die resultate is as die % van kontrole (onbehandelde selle)  $\pm$  standaardfout, uitgedruk. Geen statisties betekensvolle verskille (P-waardes) is waargeneem nie.



**Figuur 7.6:** Invloed van die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase inhibeerder ouabain (0.003 nM - 0.10 nM), op die intrasellulêre akkumulering van [ $^3\text{H}$ ]vinblastien in die H69/P sellyn sowel as die H69/LX4 sellyn. Die resultate is as die gemiddelde vinblastien opname ( $\text{ng}/10^6$  selle)  $\pm$  standaardfout, uitgedruk. Twee eksperimente is gedoen.

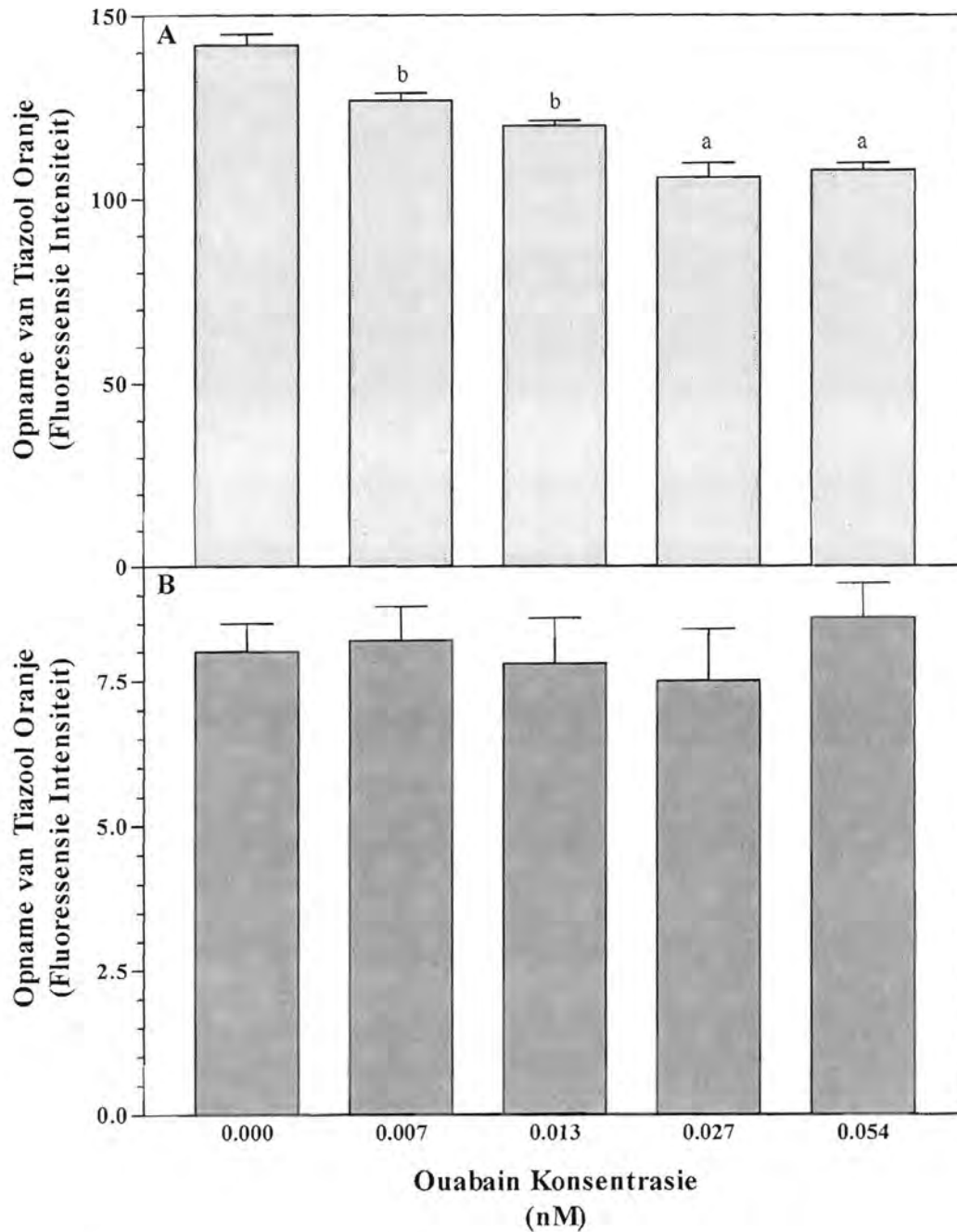


#### 7.4.10. Invloed van ouabain op die intrasellulêre akkumulering van die fluoresserende kleurstof, tiazool oranje in H69/P sowel as H69/LX4 selle

Al vier ouabain konsentrasies (0.007 nM – 0.054 nM) het die akkumulering van tiazool oranje in die P-gp-negatiewe H69/P selle statisties betekenisvol verlaag ( $p < 0.01$ ) (Figuur 7.7A). Ouabain het egter geen invloed op die akkumulering van die fluoresserende kleurstof, tiazool oranje, in die P-gp-positiewe H69/LX4 selle gehad nie (Figuur 7.7B).

#### 7.4.11. Bespreking

Die resultate wat in hierdie hoofstuk behandel is, dui daarop dat 'n betekenisvolle verhoging in P-gp uitdrukking moontlik 'n verlaging in rustende membraan potensiaal in die H69/LX4 sub-sellyn tot gevolg het. Die res van die eksperimente was daarop gemik om die verwantskap tussen veranderinge in  $K^+$  transport tussen die oorspronklike en P-gp positiewe sellyne as moontlike oorsaak van veranderde membraan potensiaal in H69/LX4 selle, te ondersoek. Ek was egter nie in staat om enige verskille tussen die twee sellyne in die mate van ouabain-onsensitiewe opname van  $K^+$  (dws geen bewys van die bestaan van 'n alteratiewe,  $Na^+,K^+$ -ATPase onafhanklike meganisme van  $K^+$  by H69/LX4 selle) aan te toon nie, wat 'n  $K^+$ -opname funksie vir P-gp uitsluit. 'n Interessante waarneming was wel die vlak van  $Na^+,K^+$ -ATPase aktiwiteit gemiddeld 67% in die H69/LX4 selle verhoog was. Alhoewel dit nie betekenisvol was nie, verteenwoordig dit 'n aansienlike verhoging van  $Na^+,K^+$ -ATPase aktiwiteit in hierdie selle. Die verhoogde  $Na^+,K^+$ -ATPase aktiwiteit kan egter nie die effens laer rustende membraan potensiaal in H69/LX4 selle verduidelik nie, aangesien dit eintlik tot repolarisasie behoort te lei. 'n Moontlike verklaring van hierdie bevindinge kan wees dat verhoogde  $Na^+,K^+$ -ATPase aktiwiteit in H69/LX4 selle moontlik 'n poging van die selle is, om 'n verlaging in membraan potensiaal teen te werk.



**Figuur 7.7:** Die invloed van die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase inhibeerder, ouabain (0.007 nM - 0.054 nM), op die akkumulering van die fluoreserende kleurstof, tiazool oranje, in die H69/P sellyn (A) sowel as die H69/LX4 sellyn (B). Die resultate is as die gemiddelde fluorensie intensiteit (mediaan kanaal nommer)  $\pm$  standaardfout, wat in vyf eksperimente waargeneem is, uitgedruk. Die P-waardes ten opsigte van die kontrole (onbehandelde selle) was as volg:  
a:  $p < 0.001$   
b:  $p < 0.01$

Om die moontlike verwantskap tussen verhoogde  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit en P-gp funksie te ondersoek het ek die invloed van ouabain op die opname van vinblastien by H69/P en H69/LX4 selle, sowel as die sensitiwiteit van hierdie selle vir die sitotoksiese effek van vinblastien, ondersoek. In 'n reeks voorlopige eksperimente is reeds vasgestel dat H69/P en H69/LX4 selle nie betekenisvol ten opsigte van hul sensitiwiteit vir die direkte sitotoksiese effekte van ouabain verskil nie. By die konsentrasies wat getoets is, was ek nie in staat om enige veranderinge in rustende membraan potensiaal oor 'n relatiewe kort tydperk (30 min) te bepaal nie. Dit weerspieël moontlik die uitgerekte periode wat deur ouabain benodig word, ten spyte van sy invloed op  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit, om meetbare verlagings in membraan potensiaal te veroorsaak (R Anderson, Departement Immunologie, Universiteit van Pretoria, persoonlike kommunikasie). Die moontlikheid dat verlaagde membraan potensiaal 'n vereiste is vir die optimale funksionering van P-gp kan egter nie van kort-termyn eksperimente (opname van tiazool oranje of vinblastien) afgelei word nie. Die gebrek aan effekte van hierdie verbinding op die sensitiwiteit van H69/LX4 selle vir vinblastien in langtermyn, sitotoksiese bepalings dui daarop dat 'n verdere vermindering in membraan potensiaal as gevolg van die inhibisie van  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, nie die effektiwiteit van P-gp verhoog nie. Hierdie punt word in die volgende hoofstuk aangespreek.

Om op te som, verhoogde uitdrukking van P-gp in H69/LX4 selle kan moontlik geassosieer word met 'n verlaging in rustende membraan potensiaal, wat nie deur veranderinge in  $\text{K}^+$  transport in hierdie selle bemiddel word nie. In teendeel, die verhoging van  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit wat wel voorgekom het, kan moontlik 'n poging van die sel wees om die afname in membraan potensiaal teen te werk. Die afwesigheid van effekte van ouabain op die sensitiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle vir vinblastien toon dat veranderde  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit in H69/LX4 selle nie tot die funksie van P-gp bydra nie.



## HOOFSTUK 8

### DIE DIREKTE SITOTOKSIESE AKTIWITEITE SOWEL AS DIE MDR OMKERINGS-AKTIWITEITE VAN DIE ONDERSKEIE RIMINOFENASIEN VERBINDINGS

#### 8.1. Doelwitte

Van Rensburg *et al.*, (1997) het getoon dat die proto-tipe riminofenasien verbinding, B663 (klofasimien), sowel as sy ongehalogineerde, sikloheksielimino derivaat, B669, in staat is om die werking van P-gp te neutraliseer en sodoende die sensitiwiteit van MDR kanker selle vir konvensionele anti-kanker geneesmiddels *in vitro* te herstel. Die laboratorium navorsing wat in hierdie hoofstuk bespreek word, was ontwerp om;

- i) die direkte sitotoksiese effekte van twee nuwe, tweede generasie riminofenasien verbindings, B4100 en B4121 (beide gehalogineerde, tetrametielpiperidien (TMP)-gesubsidieerde fenasiene) (sien Figuur 8.1) op H69/P en H69/LX4 selle, sowel as hul vermoë om die werking van P-gp te neutraliseer, te ondersoek. Hierdie verbindings is met B663 en B3962, 'n ongehalogineerde TMP-gesubstitueerde fenasiene, vergelyk.
- ii) die effekte van hierdie verbindings op die membraan potensiaal en  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit in H69/P en H69/LX4 selle te ondersoek.

#### 8.2. Media en Reagense

Media en reagense is opgemaak soos in Hoofstuk 7 (7.2.1. – 7.2.13) beskryf.

##### 8.2.1. Riminofenasien verbindings

Al vier riminofenasien verbindings (B663, B3962, B4100 en B4121) wat in hierdie studie gebruik is, is goedgunstiglik deur Dr JF O'Sullivan, Departement Chemie, Universiteit Kollege Dublin, Republiek van Ierland, verskaf. Die molekulêre

strukture van die riminofenasien verbindings word in Figuur 8.1 aangetoon. Die verbindings is in absolute etanol (Merck Chemical Company) tot 'n finale konsentrasie van 2 mg/ml opgelos. Hierdie riminofenasien oplossings het as basis-oplossings gedien en is by  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gestoor. Die riminofenasien verbindings is vir gebruik in die onderskeie eksperimente, verder tot die verlangde konsentrasies in die buffer of medium wat in die eksperimente gebruik is, verdun.

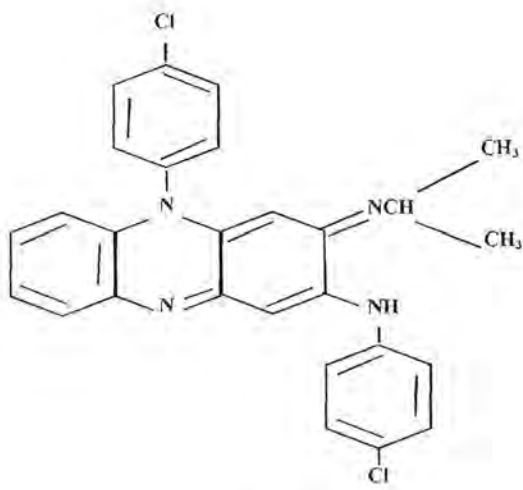
### 8.3. Metodes

#### 8.3.1. Kweking, instandhouding en voorbereiding van H69/P en H69/LX4 selle vir die gebruik in eksperimente

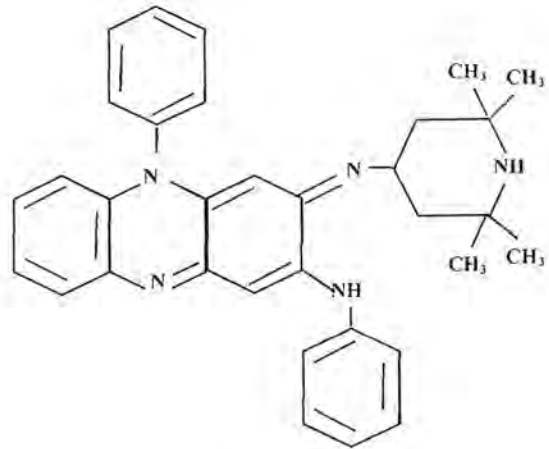
Sien Hoofstuk 7 (7.3.1.1. en 7.3.1.2)

#### 8.3.2. Direkte sitotoksiese aktiwiteit sowel as die MDR omkerings-aktiwiteit van die riminofenasien verbindings

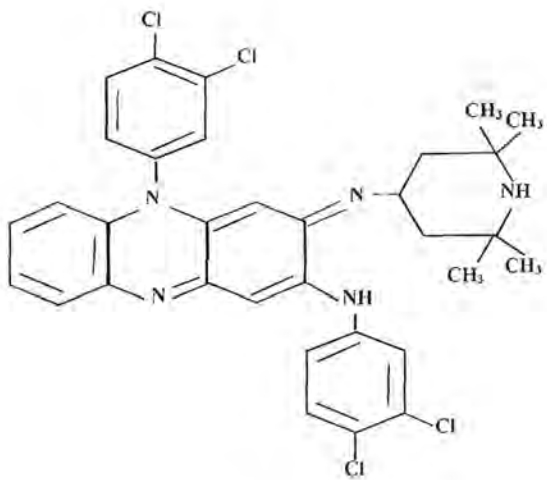
Dieselfde metode wat gebruik is om die direkte sitotoksiese aktiwiteit van ouabain en vinblastien te bepaal, is gebruik om die direkte sitotoksiese aktiwiteit van die riminofenasien verbindings sowel as die MDR-omkerings aktiwiteit daarvan te bepaal. Hierdie metode is volledig in Hoofstuk 7 (7.3.2.) beskryf. Die direkte sitotoksiese aktiwiteit van die riminofenasien verbindings vir die selle is kortliks as volg bepaal: Twintig mikroliter ( $20\text{ }\mu\text{l}$ ) van die verlangde konsentrasie van die riminofenasien verbindings is by honderd mikroliter ( $100\text{ }\mu\text{l}$ ) van 'n selsuspensie (H69/P of H69/LX4), in elke putjie van 'n 96 putjie mikrotiter plaat gevoeg. Die finale konsentrasie van die selsuspensie was  $1 \times 10^5$  selle/ml. Die volume van elke putjie is, voordat die riminofenasien verbindings bygevoeg is, met gesupplementeerde RPMI 1640 medium to die verlangde volume aangevul. Die finale volume van elke putjie was  $200\text{ }\mu\text{l}$ . Die verlangde oplosmiddel (etanol) kontroles is ingesluit. Die mikrotiter plaat is vir 7 dae by  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 'n 5%  $\text{CO}_2$ -atmosfeer geïnkubeer, waarna  $20\text{ }\mu\text{l}$  van 'n



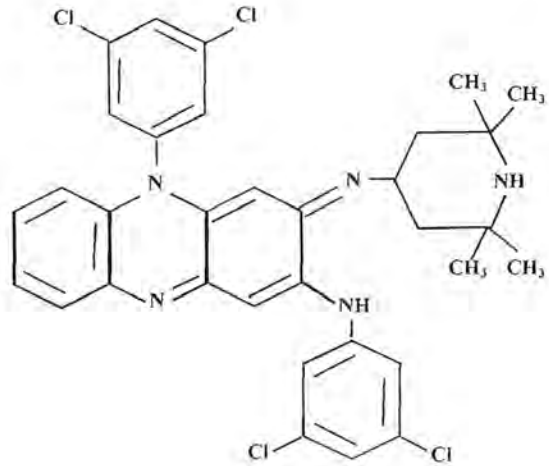
B663



B3962



B4100



B4121

Figuur 8.1: Molekulêre strukture van die eksperimentele riminofenasiën verbindings



5 mg/ml MTT-oplossing by elke putjies gevoeg is. Die mate van MTT reduksie is uiteindelik, na prosessering, spektrofotometries by 'n toets golflengte van 540 nm en 'n verwysings-golflengte van 620 nm, bepaal. Die resultate is as persentasie van kontrole (onbehandelde selle) aangedui.

Die invloed van die riminofenasien verbindings op die sensitiwiteit van die selle vir vinblastien is bepaal deur die selle met verskillende konsentrasies van die eksperimentele middels in die teenwoordigheid van 'n nie-toksiese vinblastien konsentrasie (25.5 ng/ml) te behandel.

### **8.3.3. Die invloed van die riminofenasien verbindings op die intrasellulêre akkumulering van radio-aktief gemerkte vinblastien sowel as die fluoresserende kleurstof, tiazoal oranje, in H69/P en H69/LX4 selle**

Sien Hoofstuk 7 (7.3.4.)

#### **8.3.3.1. Prosedure wat gevolg is tydens die bepaling van die invloed van die riminofenasien verbindings op die intrasellulêre akkumulering van [<sup>3</sup>H]vinblastien in H69/P en H69/LX4 selle**

Die metode wat gevolg is, is volledig in Hoofstuk 7 (7.3.4.2.) beskryf. Kortliks is een milliliter (1 ml) hoeveelhede van 'n selsuspensie (H69/P of H69/LX4) in 15 ml polistireen proefbuis gevoeg en vir 30 minute by 37 °C gepreïnkubeer. Die verlangde riminofenasien konsentrasie (1 µg/ml) wat in hierdie eksperimente gebruik is, is hierna by die onderskeie selsuspensies gevoeg. Die selle is daarna vir 60 minute by 37 °C geïnkubeer waarna 'n [<sup>3</sup>H]vinblastien/koue vinblastien mengsel by die selsuspensies gevoeg is. Die opname van [<sup>3</sup>H]vinblastien deur die selle is bepaal soos in 7.3.4.2. uiteengesit. Die verlangde oplosmiddel (etanool) kontroles is deurgaans ingesluit. Die resultate is as tellings per minuut (tpm)

verkry. Die ru data is daarna as persentasie van kontrole (onbehandelde selle) uitgedruk.

### **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 fluoresserende kleurstof, tiazool oranje, in H69/P en H69/LX4 selle**

Die metode is gevolg soos in Hoofstuk 7 (7.3.5) beskryf is. Kortliks is een milliliter (1 ml) hoeveelhede van die selsuspensie (H69/P en H69/LX4) in proefbuise gevoeg en vir 15 minute by 37 °C geïnkubeer. Die verlangde konsentrasie van die onderskeie rimnofenasien verbindings is na preïnkubasie by die onderskeie proefbuise gevoeg. Die finale konsentrasie van die riminofenasien verbindings wat in hierdie studie gebruik is, was 1.25 µg/ml. Die selsuspensie is daarna vir 30 minute by 37 °C geïnkubeer. Na die 30 minute inkubasie tydperk is 4 ml vooraf verhitte (37°C) tiazool oranje-bevattende FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium (0.25 µg/ml) by die selle gevoeg en is die selle vir 'n verdere 15 minute by 37 °C geïnkubeer. Die mate waarteen die fluoresserende kleurstof, tiazool oranje, deur die selle opgeneem is, is direk (sonder enige was-stappe) vloeisitometries (Epics, Profile II, Coulter) bepaal. Die verlangde oplosmiddel (etanol) kontroles is in hierdie eksperimente ingesluit. Die resultate is as die graad van fluoressensie intensiteit (mediaan kanaal nommer) uitgedruk.

### **8.3.4. Die invloed van die riminofenasien verbindings op die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase aktiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle**

#### **8.3.4.1. Beginsels betrokke by die opname van radio-aktiewe kalium**

Die membraan-geassosieerde werking van die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase ensiem is uiters sensitief vir lisofosfatidielcholien-bemiddelde inhibisie [Lijnen *et al*, 1990; Oishi *et al*, 1990]. Dit is dus moontlik dat die riminofenasien-bemiddelde aktivering van



die vrystelling van LPC tot die inhibering van die aktiwiteit van die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase ensiem kan lei. Hierdie inhibisie van die aktiwiteit van die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase ensiem kan as 'n verlaagde opname van  $\text{K}^+$ -ione deur die selle waargeneem word.

#### **8.3.4.2. Prosedure wat gevolg is tydens die bepaling van $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle sowel as die effek van die riminofenasien verbindings daarop**

Die metode is gevolg soos in Hoofstuk 7 (7.3.6) beskryf is. Kortliks is twee milliliter (2 ml) van die selsuspensie (H69/P en H69/LX4) in proefbuis gevoeg en vir 30 minute by  $37^\circ\text{C}$  gepreïnkubeer. Na preïnkubasie is  $100\ \mu\text{l}$  van die verlangde konsentrasies van die eksperimentele riminofenasien verbinding ( $0.6\ \mu\text{g}/\text{ml}$  en  $1.25\ \mu\text{g}/\text{ml}$  in die geval van die H69/LX4 sellyn en  $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$  en  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$  in die geval van die H69/P sellyn), by die verlangde proefbuis gevoeg. Die rede vir die verskil in konsentrasies van riminofenasien verbindings wat in die twee sellyne gebruik is, is toe te skryf aan die waarneming dat die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit van die H69/P sellyn baie minder sensitief is vir die riminofenasien verbindings, soos bepaal deur voorlopige eksperimente. Die selle is hierna vir 'n verdere 30 minute by  $37^\circ\text{C}$ , geïnkubeer. Die betrokke oplosmiddel (etanool) kontroles is in alle eksperimente ingesluit. Na inkubasie is  $200\ \mu\text{l}$  fetale kalf serum (finale konsentrasie van FKS was 10%) sowel as  $100\ \mu\text{l}$   $^{42}\text{K}^+$  (spesifieke aktiwiteit  $3\text{mCi}/\text{ml}$ ) by elke proefbuis gevoeg. Vyf minute voor die byvoeging van  $^{42}\text{K}^+$  is  $25\ \mu\text{l}$  ouabain (finale konsentrasie van 2 mM) by die verlangde proefbuis gevoeg. Die waardes wat hier verkry is, is uiteindelik by al die ander waardes afgetrek. Opname van  $^{42}\text{K}^+$ , deur die selle is verder bepaal soos in 7.3.6.2. uiteengesit. Die resultate is as tellings per minuut (tpm) verkry. Die resultate is as persentasie van kontrole (onbehandelde selle) uitgedruk.



### **8.3.5. Invloed van die riminofenasien verbindings op die membraan potensiale van H69/P en H69/LX4 selle**

Sien Hoofstuk 7 (7.3.7.)

Die metode is gevolg soos in Hoofstuk 7 (7.3.7.2.) beskryf is. Kortliks is een 1 ml van die selsuspensies (H69/P en H69/LX4) in proefbuis gevoeg en vir 15 minute by 37 °C gepreïnkubeer. Die verlangde konsentrasies van die riminofenasien verbindings (1.25 µg/ml en 2.5 µg/ml) is na preïnkubasie by die onderskeie proefbuis gevoeg. Die selsuspensie is daarna vir 30 minute by 37 °C geïnkubeer. Vier milliliter (4 ml) van 'n vooraf verhitte (37 °C) oplossing van 50 nM DiOC<sub>6</sub>(3) in 10% FKS-gesupplementeerde RPMI 1640 medium is na die inkubasie tydperk by die selsuspensies gevoeg en die selle is vir 'n verdere 15 minute by 37 °C geïnkubeer. Die hoeveelheid DiOC<sub>6</sub>(3) kleurstof wat deur die selle opgeneem is, is direk (sonder enige wasstappe) met behulp van die vloeisitometer bepaal. Die verlangde kontroles is in hierdie eksperimente ingesluit. Die resultate is as graad van fluoressensie intensiteit (mediaan kanaal nommer) uitgedruk.

## **8.4. Resultate**

### **8.4.1. Die direkte sitotoksiese aktiwiteite van die onderskeie riminofenasien verbindings vir H69/P en H69/LX4 selle**

Die sitotoksiese aktiwiteite van al vier bestudeerde riminofenasien verbindings (B663, B3962, B4100 en B4121), was statisties betekenisvol ( $p < 0.05$ ) hoër in die geneesmiddel-sensitiewe H69/P selle, indien dit met die ooreenstemmende sitotoksiese aktiwiteite in die H69/LX4 selle vergelyk word (Tabel 8.1; Tabel 8.2).

**Tabel 8.1: Die direkte sitotoksiese aktiwiteite van die verskillende eksperimentele riminofenasien verbindings vir die H69/P sellyn**

Riminofenasien Verbindings	IK <sub>50</sub> (µg/ml)
B663	1.52 ± 0.02
B3962	0.36 ± 0.03 <sup>a</sup>
B4100	0.41 ± 0.22 <sup>c</sup>
B4121	0.24 ± 0.10 <sup>b</sup>

Die resultate is as die IK<sub>50</sub>, dit wil sê as die gemiddelde riminofenasien konsentrasie (µg/ml) ± standaardfout wat tot 50% seldoding in die MTT toetsstelsel gelei het, uitgedruk. Drie tot vyf eksperimente is in duplikaat gedoen. Statisties betekenisvolle verskille (P-waardes) tussen die sitotoksiese aktiwiteite van die verskillende riminofenasien verbindings, indien dit met die sitotoksiese aktiwiteit van B663 vergelyk is, was as volg:

a: P < 0.0001

b: P < 0.005

c: P < 0.05

**Tabel 8.2: Die direkte sitotoksiese aktiwiteite van die verskillende eksperimentele riminofenasien verbindings, sowel as die invloed van die riminofenasien verbindings op die sensitiwiteit van die H69/LX4 sellyn vir die anti-kanker geneesmiddel, vinblastien.**

Riminofenasien Verbindings	IK <sub>50</sub> (µg/ml)	
	Slegs Riminofenasien Verbindings	+ Vinblastien (25.5 ng/ml)
<b>B663</b>	2.90 ± 0.17	0.36 ± 0.04
<b>B3962</b>	0.58 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.26 ± 0.02
<b>B4100</b>	0.88 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.11 ± 0.03
<b>B4121</b>	0.86 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.16 ± 0.02

Die resultate is as die IK<sub>50</sub>, dit wil sê as die gemiddelde riminofenasien konsentrasie (µg/ml) ± standaardfout wat tot 50% seldoding in die MTT toetsstelsel gelei het, uitgedruk. Drie - vyf eksperimente is in duplikaat gedoen. Statisties betekenisvolle verskille (P-waardes) tussen die sitotoksiese aktiwiteite van die verskillende riminofenasien verbindings, indien dit met die sitotoksiese aktiwiteit van B663 vergelyk is, was as volg:

a: P < 0.0001

b: P < 0.005

c: P < 0.05



#### 8.4.1.1. Geneesmiddel-sensitiewe H69/P sellyn

In die H69/P sellyn het B4121 die grootste mate van direkte sitotoksiese aktiwiteit getoon (Tabel 8.1). B3962 het ook 'n groot mate van direkte sitotoksiese aktiwiteit in die H69/P sellyn getoon. B3962 ( $P < 0.0001$ ), B4100 ( $P < 0.05$ ) sowel as B4121 ( $P < 0.005$ ) was statisties betekenisvol meer sitotoksies vir H69/P selle, indien dit met die sitotoksiese aktiwiteit van B663 in hierdie sellyn vergelyk is (Tabel 8.1). Die sitotoksiese aktiwiteite van B3962 sowel as B4121 het in die H69/P selle egter nie statisties betekenisvol van die sitotoksiese aktiwiteit van B4100 verskil nie (Tabel 8.1). B663 het die laagste mate van sitotoksiese aktiwiteit in beide die H69/P sellyn sowel as die H69/LX4 sellyn getoon. Die volgorde van die riminofenasien verbindings ten opsigte van hul vermoë om die groei van H69/P selle direk te inhibeer, was:  $B4121 > B3962 > B4100 > B663$  (Tabel 8.1).

#### 8.4.1.2. Veelvuldige geneesmiddel weerstandbiende H69/LX4 sellyn

B3962 het die grootste mate van direkte sitotoksiese aktiwiteit in die H69/LX4 sellyn getoon (Tabel 8.2). In die H69/LX4 selle het B3962 'n statisties betekenisvol hoër sitotoksiese aktiwiteit besit, indien dit met die sitotoksiese aktiwiteite van beide B663 ( $P < 0.005$ ) sowel as B4100 ( $P < 0.05$ ) vergelyk is (Tabel 8.2). B663 was ook statisties betekenisvol minder ( $P < 0.005$ ) sitotoksies vir H69/LX4 selle, indien dit met die sitotoksiese aktiwiteit van onderskeidelik B4100 sowel as B4121 vergelyk is. Die volgorde van die riminofenasien verbindings ten opsigte van hul vermoë om die groei van H69/LX4 selle te inhibeer, was:  $B3962 > B4121 > B4100 > B663$  (Tabel 8.2).

#### **8.4.2. Die MDR sensitiserings/omkerings-aktiwiteite van die onderskeie riminofenasien verbindings vir H69/LX4 selle**

Omdat die H69/P sellyn so gevoelig was vir die uitwerking van vinblastien alleen, is geen omkeringsstudies met hierdie sellyn gedoen nie.

Al vier riminofenasien verbindings (B663, B3962, B4100 en B4121) was in staat om die sensitiwiteit van H69/LX4 selle vir die anti-kanker geneesmiddel, vinblastien, in 'n mindere of meerdere mate te herstel (Tabel 8.2). B4100 sowel as B4121 het die H69/LX4 selle tot 'n groter mate as B3962 en B663 vir vinblastien, gesensitiseer.

Vinblastien het die H69/LX4 selle by 'n konsentrasie van 25.5 ng/ml, met  $10 \pm 4\%$  geïnhibeer. B4100 was in staat om die weerstandbiedendheid van H69/LX4 selle vir vinblastien die beste om te keer (by 'n konsentrasie van 0.11 µg/ml). B4121 het die weerstandbiedendheid van die H69/LX4 selle vir vinblastien ook in 'n groot mate omgekeer (by 'n konsentrasie van 0.16 µg/ml), terwyl B663 die sensitiwiteit van H69/LX4 selle vir vinblastien die minste beïnvloed het (by 'n konsentrasie van 0.36 µg/ml) (Tabel 8.2). Die riminofenasien verbindings het in die volgende volgorde tot die omkering van die weerstandbiedendheid van die H69/LX4 selle vir vinblastien, bygedra: B4100 > B4121 > B3962 > B663 (Tabel 8.2).

#### **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**

Vinblastien het teen baie laer vlakke in die P-gp-positiewe MDR long karsinoom (H69/LX4) sellyn ( $0.34 \pm 0.02$  ng/ $10^6$  selle) as in die H69/P sellyn ( $1.29 \pm 0.09$  ng/ $10^9$  selle) geakkumuleer (Figuur 7.6 en Figuur 8.2A en B). Hierdie verlaagde vlakke van vinblastien in die H69/LX4 selle, dui daarop dat vinblastien

aktief deur selmembraan-geassosieerde P-gp molekules uit die H69/LX4 selle uitgepomp word. Verhoogde akkumulering van vinblastien in die H69/LX4 selle, nadat die selle aan die riminofenasien verbindings blootgestel is, dui daarop dat al vier riminofenasien verbindings (B663, B3962, B4100 en B4121), in staat is om die werking van P-gp in hierdie selle te inhibeer (Figuur 8.2B).

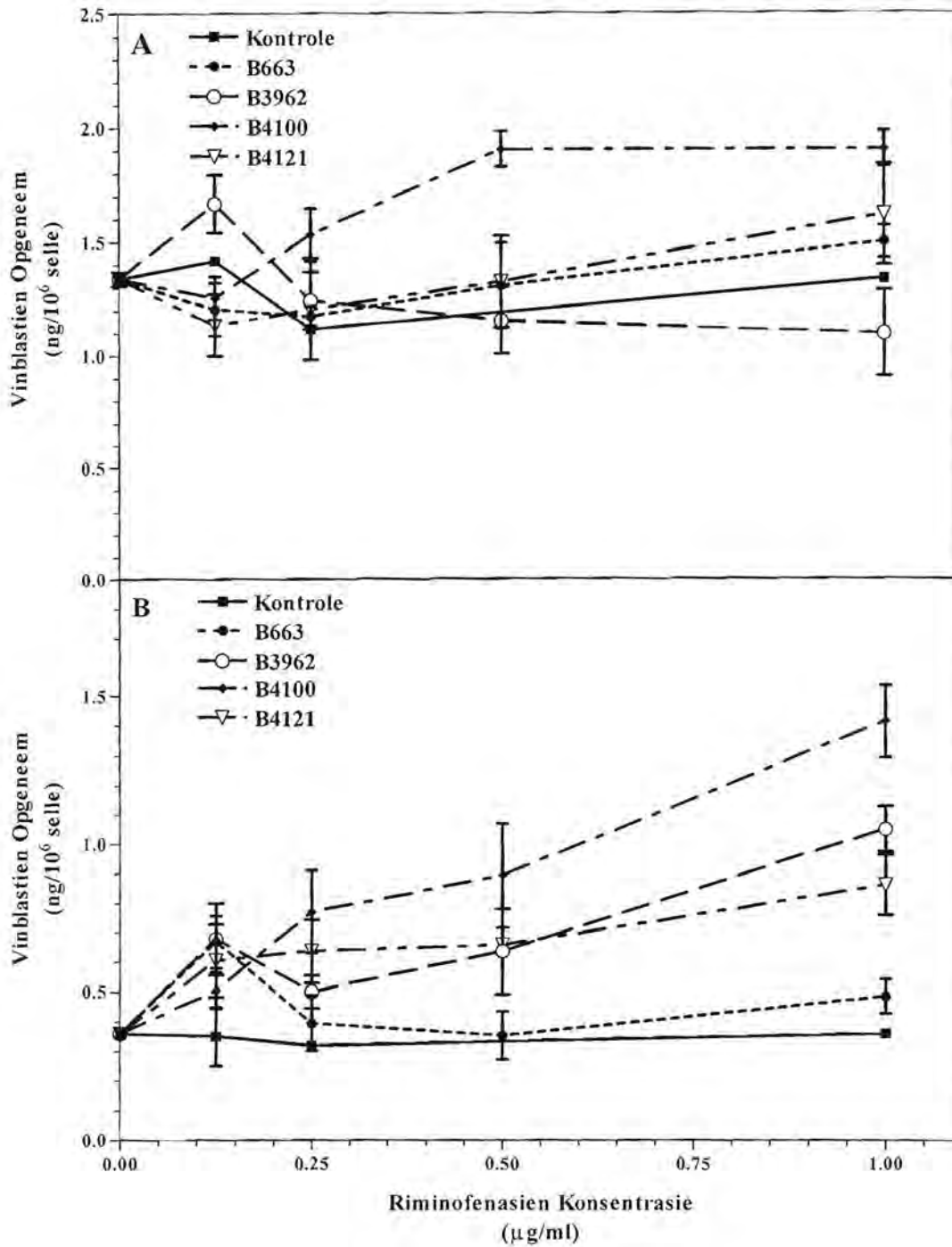
B4100 ( $P < 0.005$ ), B3962 ( $P < 0.005$ ) sowel as B4121 ( $P < 0.05$ ) het by  $1 \mu\text{g/ml}$ , die intrasellulêre akkumulering van vinblastien in die H69/LX4 selle statisties betekenisvol verhoog (Figuur 8.2B). B4100 het, van die vier riminofenasien verbindings wat bestudeer is, tot die beste herstel in die intrasellulêre akkumulering van vinblastien in die H69/LX4 selle, gelei. B663 het daarenteen die mate van vinblastien akkumulering in die H69/LX4 selle die minste beïnvloed (Figuur 8.2B).

Die eksperimentele riminofenasien verbindings het egter by  $1.0 \mu\text{g/ml}$  nie statistiese betekenisvolle verhogings in die akkumulering van vinblastien in die geneesmiddel-sensitiewe, H69/P selyn, veroorsaak nie (Figuur 8.2A).

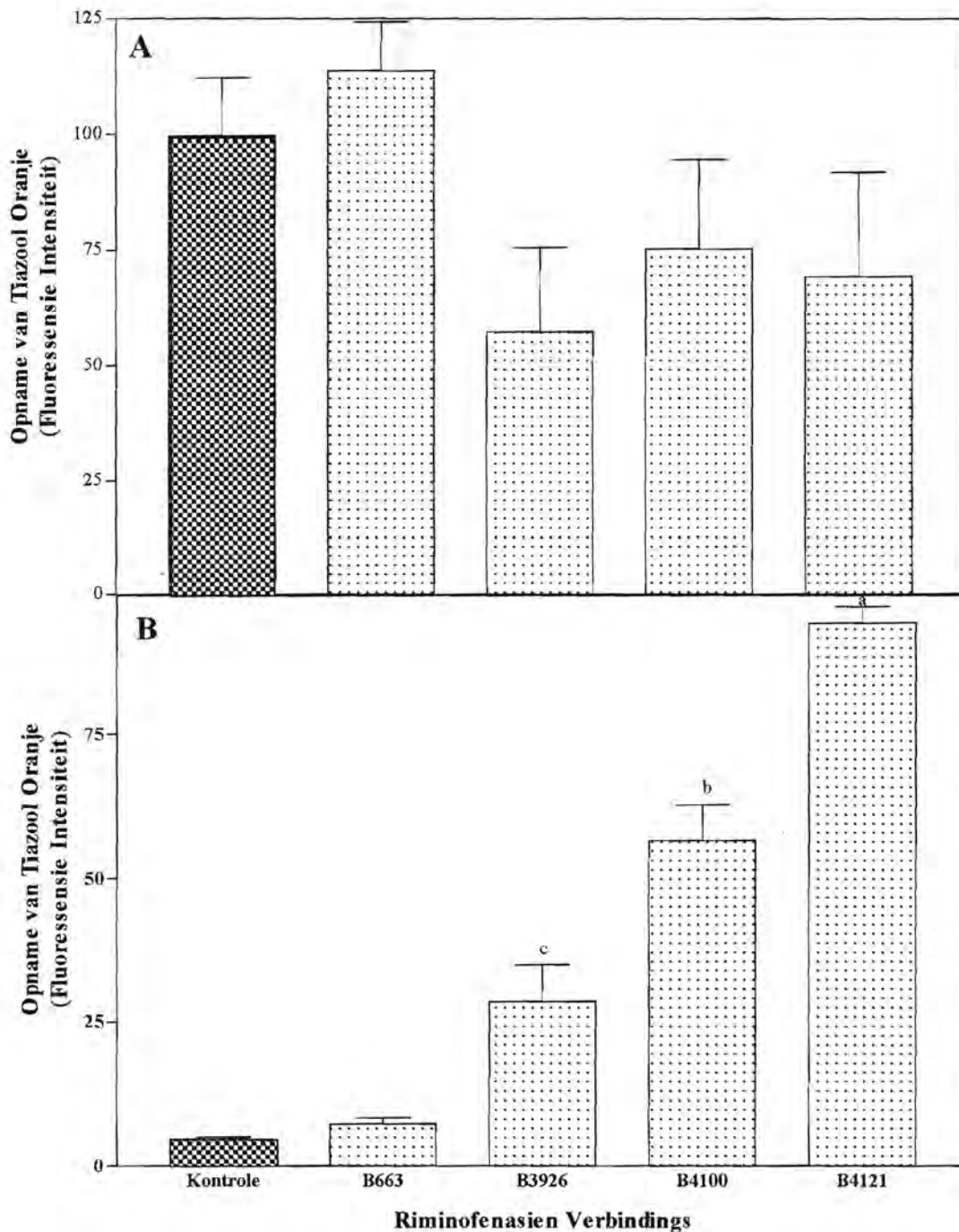
#### **8.4.4. Invloed van die onderskeie riminofenasien verbindings op die intrasellulêre akkumulering van die fluoresserende kleurstof, tiazool oranje in H69/P en H69/LX4 selle**

Tiazool oranje het teen betekenisvol laer ( $P > 0.05$ ) vlakke in die P-gp-positiewe H69/LX4 selle, as in die P-gp-negatiewe H69/P selle, geakkumuleer (Figuur 7.7 en Figuur 8.3A en B). Hierdie verlaging in intrasellulêre akkumulering van tiazool oranje in die H69/LX4 selle, is as 'n verlaging in die fluoressensie intensiteit van die kleurstof in hierdie selle waargeneem. Vir H69/LX4 selle was die waargeneemde fluoressensie intensiteit  $4.7 \pm 3.2$  (mediaan kanaal nommer), terwyl 'n baie hoër





**Figuur 8.2:** Invloed van die verskillende riminofenasiens verbindings (0.125 μg/ml - 1.0 μg/ml) op die intrasellulêre akkumulering van [<sup>3</sup>H]vinblastien in die H69/P selyn (A) sowel as die H69/LX4 selyn (B). Die resultate is as die gemiddelde vinblastien opname (ng/10<sup>6</sup> selle) ± standaardfout, uitgedruk. Drie tot vyf eksperimente is gedoen.



**Figuur 8.3:** Die invloed van die riminofenasiens verbindings, by  $1.25 \mu\text{g/ml}$ , op die akkumulering van die fluoresserende kleurstof, tiazool oranje, in H69P- (A) en H69/LX4 (B) selle. Die resultate is as die gemiddelde fluorensensie intensiteit (mediaan kanaal nommer) wat in 3 - 5 eksperimente waargeneem is, uitgedruk. Die P-waardes ten opsigte van die kontrole (onbehandelde selle) was as volg:

- a:  $P < 0.001$
- b:  $P < 0.01$
- c:  $P < 0.05$

fluoresensie intensiteit ( $99.8 \pm 12.0$ ; mediaan kanaal nommer) vir die H69/P selle waargeneem is.

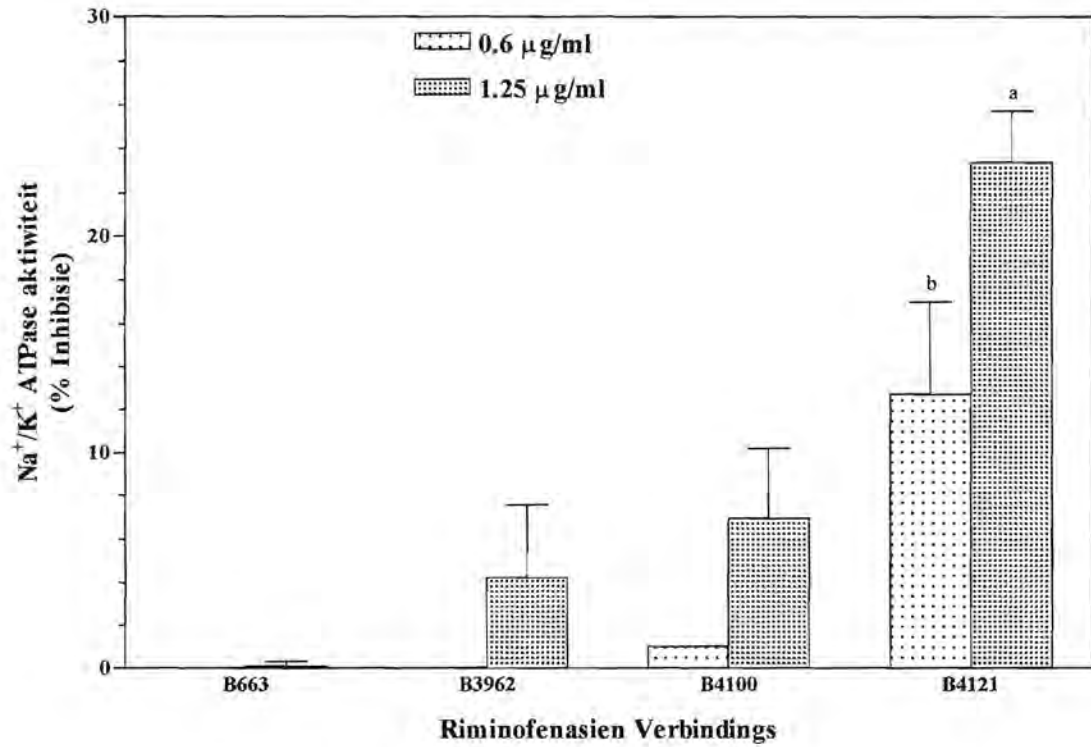
Al vier die riminofenasien verbindings het die intrasellulêre akkumulering van tiazool oranje, in die H69/LX4 selle, verhoog (Figuur 8.3B). Van die vier riminofenasien verbindings wat bestudeer is, het B663 die minste tot die verhoogde akkumulering van tiazool oranje in die H69/LX4 selle bygedra, terwyl B4121 in staat was om by  $1.25 \mu\text{g/ml}$  die intrasellulêre akkumulering van tiazool oranje in die H69/LX4 selle, tot 'n soortgelyke tiazool oranje vlak as wat in die H69/P selle waargeneem is, te herstel (Figuur 8.3A en B). B4121, B4100 sowel as B3962 het by  $1.25 \mu\text{g/ml}$  die intrasellulêre vlakke van tiazool oranje statisties betekenisvol in die H69/LX4 selle verhoog. Die volgorde van die riminofenasien verbindings ten opsigte van hul vermoë om die intrasellulêre akkumulering van tiazool oranje in die H69/LX4 selle te herstel, was:  $B4121 > B4100 > B3962 > B663$  (Figuur 8.3B).

Die behandeling van die H69/P selle met die verskillende riminofenasien verbindings het die akkumulering van tiazool oranje nie statisties betekenisvol beïnvloed nie (Figuur 8.3A). Alhoewel die behandeling van H69/P selle met B3962 daartoe gelei het dat tiazool oranje teen waarneembare laer vlakke in die selle geakkumuleer het, was hierdie B3962-bemiddelde verlaging nie statisties betekenisvol ( $p = 0.127$ ) laer as die tiazool oranje vlakke in die kontrole selle nie.

#### **8.4.5. Invloed van die onderskeie riminofenasien verbindings op die $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle**

B3962, B4100 sowel as B4121 was in staat om by  $1.25 \mu\text{g/ml}$  die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit in die H69/P sellen te inhibeer (Figuur 8.4). Hierdie riminofenasien-bemiddelde inhibisie van die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit by  $1.25 \mu\text{g/ml}$  was, met die





**Figuur 8.4:** Invloed van die verskillende riminofenasiens verbindings (0,6 µg/ml en 1,25 µg/ml) op die opname van kalium in die H69/P sellyn. Die resultate is as die gemiddelde % inhibisie ± standaardfout, uitgedruk. Drie tot vyf eksperimente is gedoen. Die volgende statisties betekenisvolle verskille (P-waardes) is ten opsigte van die kontrole (onbehandelde selle), waargeneem:

a:  $p < 0.01$

b:  $p < 0.05$

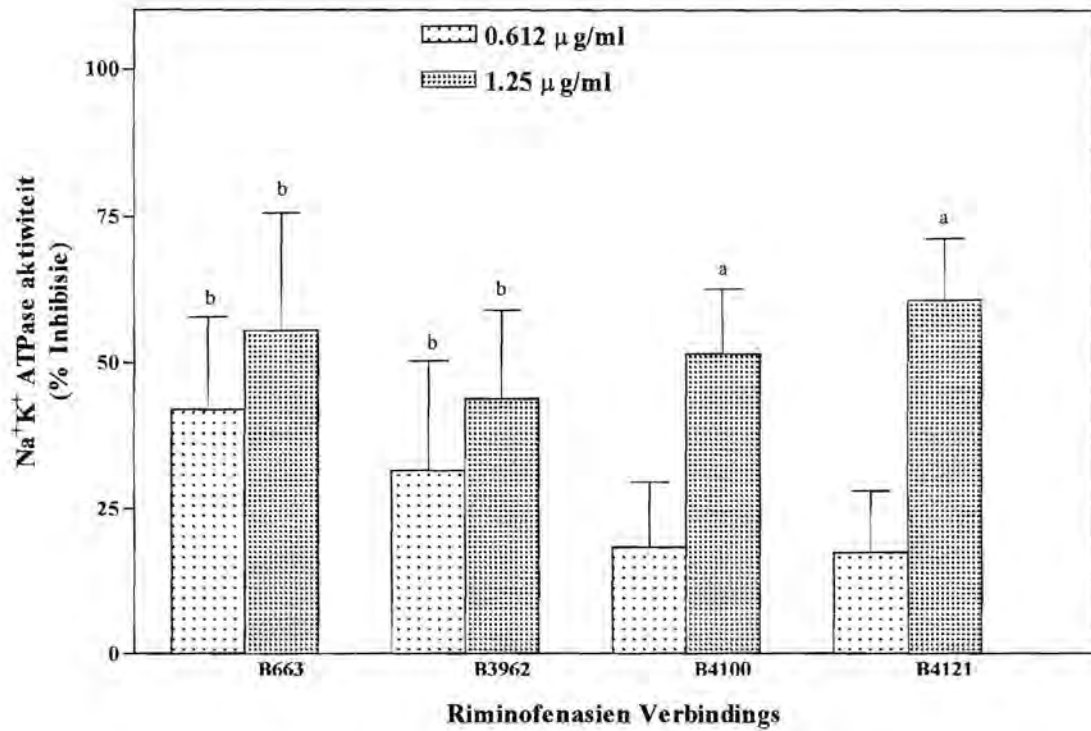
uitsondering van B4121 ( $p < 0.01$ ), nie statisties betekenisvol nie, B4121 was ook in staat om by  $0.6 \mu\text{g/ml}$  die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit in die H69/P sellyn statisties betekenisvol ( $p < 0.05$ ) te inhibeer (Figuur 8.4). B663 was by  $0.6 \mu\text{g/ml}$  sowel as  $1.25 \mu\text{g/ml}$  nie in staat om die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit te inhibeer nie (Figuur 8.4).

Die H69/LX4 selle was, in vergelyking met die H69/P selle, baie meer sensitief vir die riminofenasien-bemiddelde inhibisie van kalium opname (Figuur 8.4; Figuur 8.5). Al vier die eksperimentele riminofenasien verbindings het by  $1.25 \mu\text{g/ml}$  die opname van kalium in die H69/LX4 selle statisties betekenisvol ( $p < 0.05$ ) geïnhibeer (Figuur 8.5). B663 en B3962 het egter ook by  $0.6 \mu\text{g/ml}$  die opname van kalium in die H69/LX4 selle ook betekenisvol ( $p < 0.05$ ) geïnhibeer (Figuur 8.5).

#### **8.4.6. Invloed van die riminofenasien verbindings op die membraan potensiale van H69/P en H69/LX4 selle**

Al vier riminofenasien verbindings het die selmembrane van H69/P selle sowel as H69/LX4 selle statisties betekenisvol ( $P < 0.0001$ ) gedepolariseer (Figuur 8.6A en B). Hierdie depolarisasie van die selmembrane is as 'n verlaging in die fluoressensie intensiteit van die fluoresserende kleurstof, DiOC<sub>6</sub>(3), waargeneem. Die riminofenasien-geïnduseerde verlaging in die membraan potensiale was in albei sellyne dosis-afhanklik (Figuur 8.6A en B).

Geen betekenisvolle verskille is in die mate waarin die eksperimentele riminofenasien verbindings in staat was om die selmembrane van onderskeidelik die H69/P- en H69/LX4 selle te depolariseer, waargeneem nie (Figuur 8.6A en B). B4100 het die grootste invloed op die membraan potensiale van beide sellyne uitgeoefen. Die riminofenasien verbindings was in die volgende volgorde in staat om

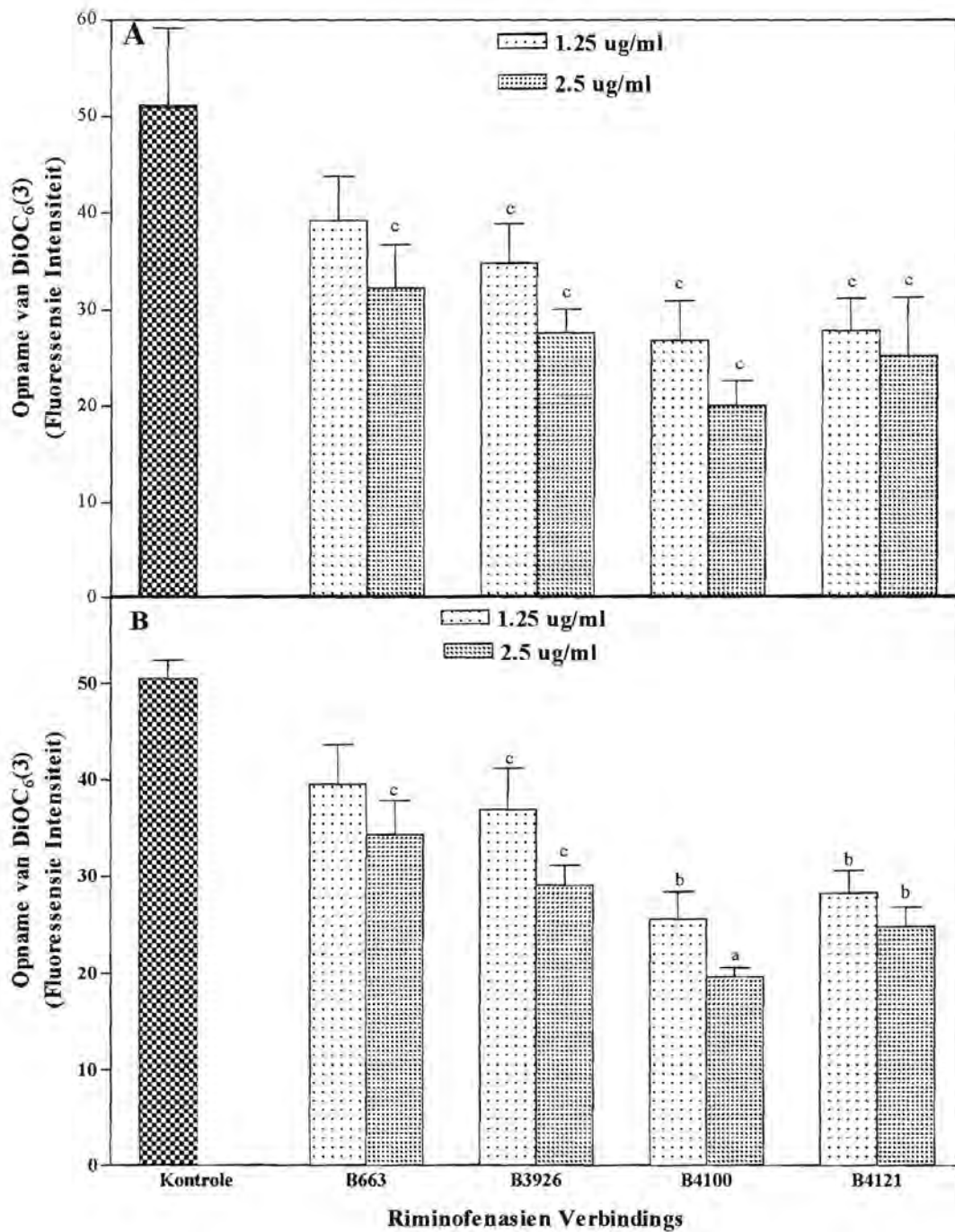


**Figuur 8.5:** Invloed van die verskillende riminofenasiens verbindings (0.6 µg/ml en 1.25 µg/ml) op die opname van kalium in die H69/LX4 sellyn. Die resultate is as die gemiddelde % inhibisie ± standaardfout, uitgedruk. Drie tot vyf eksperimente is gedoen. Die volgende statisties betekenisvolle verskille (P-waardes) is ten opsigte van die kontrole (onbehandelde selle), waargeneem:

b:  $p < 0.01$

c:  $p < 0.05$





**Figuur 8.6:** Die invloed van die riminofenasiens verbindinge, by 1.25  $\mu\text{g/ml}$  en 2.5  $\mu\text{g/ml}$ , op die membraan potensiaal van onderskeidelik die H69P- (A) en H69/LX4 (B) selle. Die resultate is as die gemiddelde fluorensie intensiteit (mediaan kanaal nommer) wat in 3 - 5 eksperimente waargeneem is, uitgedruk. Die p-waardes ten opsigte van die kontrole (onbehandelde selle) was as volg:

- a:  $p < 0.001$
- b:  $p < 0.01$
- c:  $p < 0.05$

die selmembrane van beide sellyne te depolariseer: B4100 > B4121 > B3962 > B663 (Figuur 8.6 A en B).

#### 8.4.7. Bespreking

Die resultate wat in hierdie hoofstuk aangebied is, bevestig en brei uit op vorige verslae deur **Van Rensburg en medewerkers (1994; 1997)** dat die riminofenasien verbindings die werking van P-gp neutraliseer en die chemosensitiwiteit van MDR kankerselle vir anti-kanker geneesmiddels *in vitro* herstel. Die eksperimente wat in die huidige studie beskryf is, verskil van die van Van Rensburg en medewerkers in die volgende opsigte:

- i) Nuwe TMP-gesubstitueerde fenasiene (B4100 en B4121) is vir hulle direkte sitotoksiese en P-gp neutraliserende eienskappe, bestudeer.
- ii) Vloeisitometriese sowel as radiometriese prosedures is gebruik om P-gp funksie te bepaal.
- iii) Die effekte van die eksperimentele riminofenasien verbindings op P-gp funksie, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase aktiwiteit en rustende membraan potensiaal, sowel as moontlike inter-verwantskap tussen bogenoemde faktore in die oorspronklike H69/P en P-gp positiewe klein sel longkanker sellyn (H69/LX4), is ondersoek.

In die aanvanklike eksperimente, wat ontwerp was om die sitotoksiese vermoëns van die eksperimentele verbindings te bestudeer, is waargeneem dat al vier die riminofenasien verbindings die proliferasie van H69/P selle sowel as die P-gp-positiewe H69/LX4 selle, inhibeer. Hierdie inhibisie van sel proliferasie is by terapeutiese relevante konsentrasies, ten minste in die geval van klofasimien (0.47 µg/ml – 1.4 µg/ml), waargeneem (**Yawalkar & Vischer, 1979**). 'n Interessante waarneming was, dat al drie die TMP- gesubstitueerde fenasiene baie



meer aktief was as klofasimien. In die geval van die H69/P sellyn was die volgorde van die riminofenasien verbindings ten opsigte van hul mate van direkte sitotoksiese aktiwiteit as volg: B4121 > B3926 > B4100 > B663, terwyl die volgorde in die H69/LX4 sellyn as volg was: B3926 > B4121 > B4100 > B663. Die H69/LX4 selle was ongeveer 2, 0.5, 2 en 3-voudig meer bestand teen B663, B3926, B4100 en B4121 respektiewelik, as die oorspronklike sellyn. Die verskil in sensitiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle vir die antiproliferatiewe aksie van die riminofenasien verbindings kan egter nie aan verskille in die invloed op  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit toegeskryf word nie, aangesien die aktiwiteit van hierdie monovalente kation transporter in die P-gp sublyn meer sensitief was vir die inhiberende effekte van die eksperimentele riminofenasiene. In die geval van die H69/P selle was daar 'n duidelike assosiasie tussen die omvang van riminofenasien-bemiddelde inhibisie van  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit en inhibisie van proliferasie, soos voorheen deur ander navorsers gerapporteer is (**Van Rensburg *et al*, 1994; Van Rensburg *et al*, 1997**). Wat egter onverwags was, was die feit dat dieselfde verwantskap nie in die H69/LX4 selle waargeneem is nie.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit in beide die H69/P en H69/LX4 selle was ewe sensitief vir inhibisie deur al die riminofenasien verbindings, ten spyte van die vooraf-genoemde verskille in sensitiwiteit vir die antiproliferatiewe effekte van hierdie verbindings. Hierdie waarnemings stel voor dat die antiproliferatiewe meganisme van die riminofenasien verbindings op die H69/LX4 selle baie meer ingewikkeld is as dié wat in aksie is in die oorspronklike sellyn. Ekstrapolering van data van die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase bepaling, wat oor 'n relatiewe kort (30min) inkubasie tydperk uitgevoer is, na die proliferasie bepaling wat 'n 7 dae inkubasie tydperk benodig, mag moontlik nie geskik wees vir H69/LX4 selle nie.

Die effek van die riminofenasien verbindings op die neutralisering van die werking van P-gp wat oor 'n kort tydperk strek, was gebaseer op die opname van tiazool oranje of vinblastien deur H69/LX4 selle. In hierdie studies het B3926, B4100 en B4121 die werking van P-gp baie beter as B663 geneutraliseer. In die tiazool oranje



vloesitometriese bepaling was B4121 duidelik die mees effektiefste verbinding om chemosensitiserings in H69/LX4 selle te herstel, terwyl B4100 die mees effektiefste verbinding in die radiometriese metode was. Die rede vir hierdie verskille in die resultate verkry met die twee verskillende bepalinge is egter nie duidelik nie. Nie teenstaande genoemde verskille was daar egter 'n sterk korrelasie tussen die vermoë van die verskillende verbindings om H69/LX4 selle vir vinblastien te sensitiseer en die opname van onderskeidelik tiazool oranje ( $r^2 = 0.7$ ;  $p = 0.19$ ) en [ $^3\text{H}$ ]vinblastien ( $r^2 = 0.7$ ;  $p = 0.17$ ) deur die selle.

Al vier die eksperimentele riminofenasien verbindings het ook 'n verlaging in membraan potensiaal in beide sellyne veroorsaak. Die membraan potensiaal van H69/LX4 selle was wel effens meer sensitief vir B4121, terwyl ongeveer gelyke sensitiwiteite waargeneem was vir die ander drie verbindings. Riminofenasien-bemiddelde inmenging met  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit is die mees waarskynlikste verklaring vir hierdie bevindings. Inhibisie van  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit lei tot 'n invloei van  $\text{Na}^+$ , 'n uitvloei van  $\text{K}^+$  en 'n reduksie in membraan potensiaal.

Om op te som, die resultate wat in hierdie hoofstuk gerapporteer is, demonstreer dat die nuwe TMP-gesubstitueerde fenasiene direkte sitotoksiese eienskappe besit, wat in die geval van H69/P selle, moontlik as gevolg van die riminofenasien-bemiddelde inhibisie van  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit mag wees, terwyl daar by H69/LX4 selle moontlik addisionele meganismes bestaan. Al drie die nuwe TMP-gesubstitueerde fenasiene is ook sterk (relatief tot klofasimien) inhibeerders van die werking van P-gp deur meganismes wat nog beskryf moet word, maar moontlik deur die inwerking daarvan op membraan strukture wat noodsaaklik is vir hierdie ATP-afhanklike, veelvuldige geneesmiddel uitvloei-sisteem. Die waargeneemde membraan depolarisasie effekte van die TMP-gesubstitueerde fenasiene vind heel waarskynlik plaas as gevolg van die inmenging van die verbindings met die selle se  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -

ATPase aktiwiteit. Ten slotte, wil dit blyk of die gehalogineerde TMP-gesubstitueerde fenasiene (B4100 en B4121) net effens meer aktief (moontlik glad nie) is as die ongehalogineerde TMP-gesubstitueerde fenasiene (B3962), wat betref sitotoksiese en P-gp neutraliserende eienskappe.

## HOOFSTUK 9

### DIE LIPOFILISITEIT, INTRASSELLULÊRE AKKUMULERING SOWEL AS DIE INVLOED VAN DIE RIMINOFENASIEN VERBINDINGS OP DIE SELMEMBRANE VAN SKAAP ERITROSIE TE

#### 9.1. Doelwitte

Die laboratorium navorsing wat in hierdie hoofstuk beskryf word, is daarop gemik om die relatiewe lipofilisiteit, membraan destabiliseringspotensiaal sowel as die vermoë van die vier verskillende riminofenasien verbindings om in selle te akkumuleer te ondersoek en om verder die verwantskap daarvan met die toksisiteit en P-gp neutraliserende eienskappe van die verbindings te bestudeer. Dit is gedoen deur:

- i) die mate van lipofilisiteit van die onderskeie riminofenasien verbindings te ondersoek,
- ii) om die vermoë van die riminofenasien verbindings om in die geneesmiddel-sensitiewe H69/P selle sowel as die veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende H69/LX4 selle te akkumuleer te ondersoek,
- iii) as om die invloed van die onderskeie riminofenasien verbindings op die membraan stabiliteit van skaap eritrosiete te ondersoek.

#### 9.2. Media en Reagense

##### 9.2.1. Fetale Kalfserum Gesupplementeerde RPMI 1640 medium

Hoofstuk 7 (7.2.2)

##### 9.2.2. Kanker sellyne

Sien Hoofstuk 7 (7.2.5)



### 9.2.3. Riminofenasien Verbindings

Sien Hoofstuk 8 (8.2.1.)

### 9.2.4. Suur Sitraat Dekstrose (“Acid Citrate Dextrose”)

Die volgende reagense is in 1000 ml gedeïoniseerde water opgelos:

24.5 g Anhidriese dekstrose

8.0 g Sitroensuur

22.0 g Trinatrium sitraat

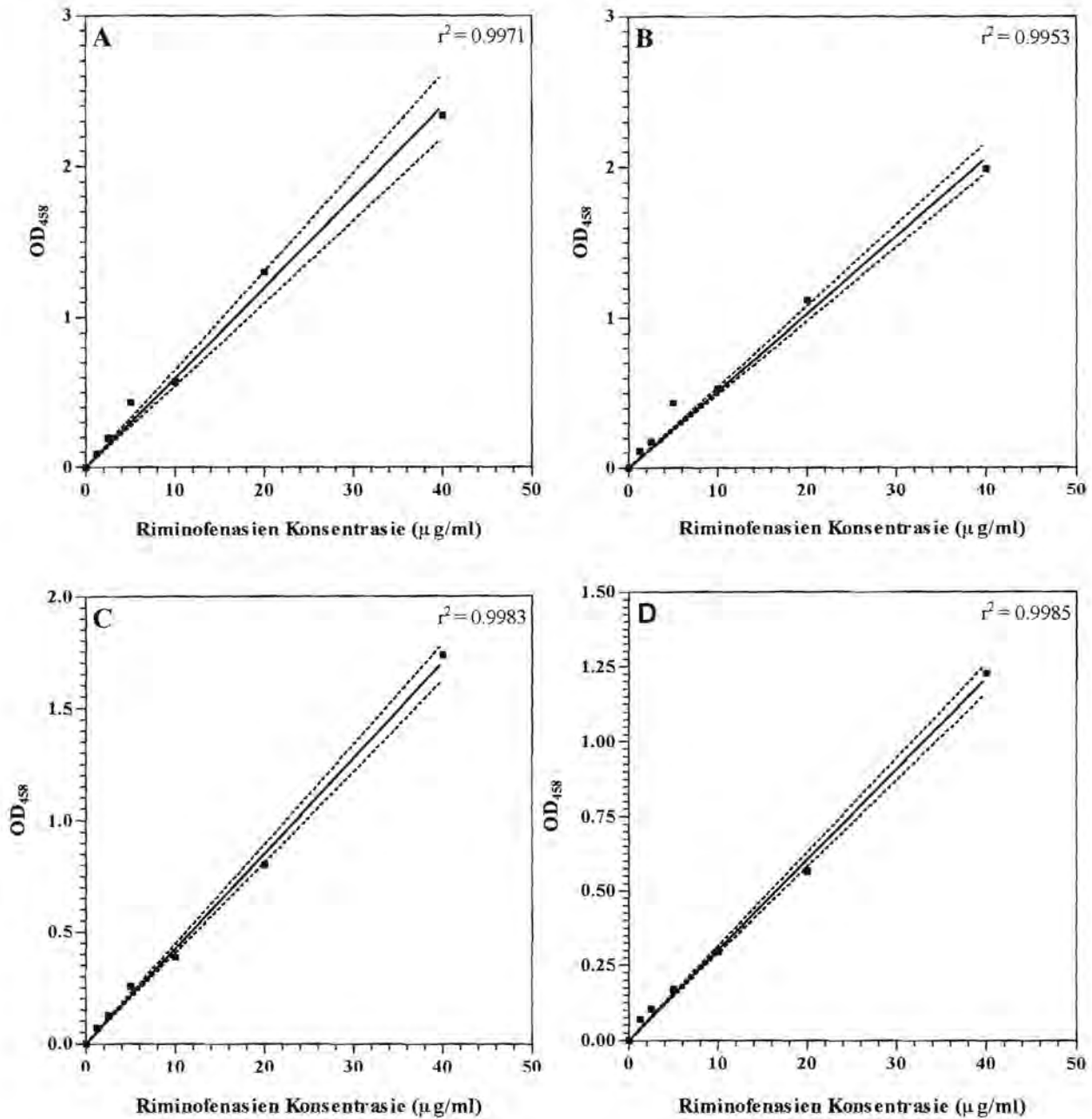
## 9.3. Metodes

### 9.3.1. Bepaling van die lipofiliese karakter-eienskappe (partissie koëffisiënte) van die onderskeie riminofenasien verbindings

Die onderskeie riminofenasien verbindings is in 1-oktanol (Sigma Chemical Company) tot ‘n finale konsentrasie van 40 µg/ml, opgelos. Die basis-oplossings is verder in 1-oktanol verdun (1:1; volume/volume). Die absorpsie waardes van verskeie van hierdie verdunnings (1.25 µg/ml; 2.5 µg/ml; 5.0 µg/ml; 10.0 µg/ml; 20.0 µg/ml en 40.0 µg/ml) is spektrofotometries by 458 nm bepaal.

Standaardkurwes, is vanuit die onderskeie absorpsie waardes, vir elk van die riminofenasien verbindings, opgestel.

Die standaardkurwes word in Figuur 9.1 aangetoon. Die korrelasie koëffisiënte ( $r$ -waardes) van die lineêre regressie lyne, word in elk van die grafieke aangedui (Figuur 9.1A-D). Die 95% vertrouiksheids intervale vir die regressie koëffisiënte word met stippellyne in die grafieke aangetoon (Figuur 9.1A-D).



**Figuur 9.1:** Standaardkurwes van die onderskeie rimonofenasien verbindings opgelos in 1-oktanol (A: B663; B: B3962; C: B4100; D: B4121). Die volgende korrelasie koëffisiënte is vir die onderskeie regressie lyne verkry: (A)  $r^2 = 0.9971$ , (B)  $r^2 = 0.9953$ , (C)  $r^2 = 0.9983$  en (D)  $r^2 = 0.9985$ .

Dieselfde metode soos deur **Franzblau *et al* (1989)** beskryf is, is in hierdie studie vir die bepaling van die partissie koëffisiënte van die onderskeie riminofenasien verbindings, gevolg. Die onderskeie riminofenasien verbindings is in 1-oktanol tot 'n finale konsentrasie van 40 µg/ml, opgelos. Vyf millilitre (5 ml) van die verlangde riminofenasien basis-oplossing (40 µg/ml), is by 40 ml gedeïoniseerde water in 'n 50 ml koniese polistireen proefbuis gevoeg. Die inhoud van die proefbuis is vir ongeveer honderd omwentelings by kamertemperatuur op 'n roteerder gemeng. Die proefbuis is daarna vir 5 minute teen 850 g (2000 rpm) gesentrifugeer, om te verseker dat die twee fases volledig van mekaar skei. Onderskeidelik een milliliter (1 ml) van die boonste oktanol fase sowel as een milliliter (1 ml) van die onderste waterige fase is versigtig met behulp van 'n pasteurpipet verwyder en die absorpsie waardes van die onderskeie fases is spektrofotometries by 458 nm bepaal. Die riminofenasien konsentrasie wat in elk van die fases teenwoordig is, is deur van vooraf opgestelde standaardkurwe gebruik te maak, bepaal. Die partissie koëffisiënte van die onderskeie riminofenasien verbindings is deur van die volgende vergelyking gebruik te maak, bepaal:

$$\text{Partissie Koëffisiënt} = \frac{\text{(konsentrasie in oktanol/volume van oktanol)}}{\text{(konsentrasie in water/volume van water)}}$$

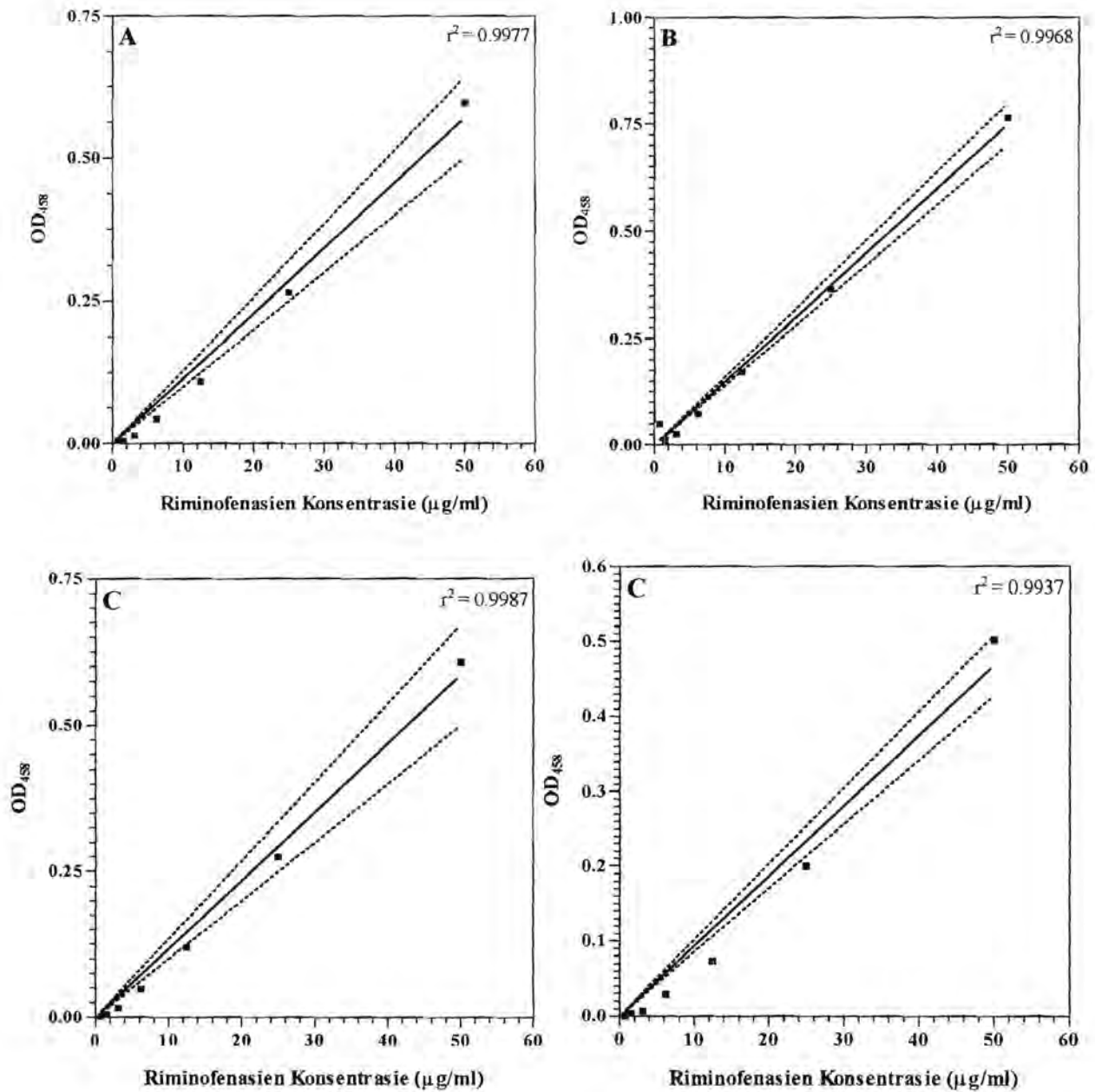
### 9.3.2. Bepaling van die mate waarteen die verskillende riminofenasien verbindings in die H69/P selle en H69/LX4 selle akkumuleer

Die onderskeie riminofenasien verbindings is tot 'n finale konsentrasie van 50 µg/ml in hekasaan (BDG Laboratory Supplies), opgelos. Hierdie basis-oplossings is verder in hekasaan verdun (1:1; volume/volume). Die absorpsie waardes van die volgende konsentrasies van die riminofenasien verbindings is spektrofotometries by 458 nm bepaal: 0.781 µg/ml; 1.562 µg/ml; 3.125 µg/ml; 6.25 µg/ml; 12.5 µg/ml; 25 µg/ml en 50 µg/ml. Standaardkurwes is vanuit die onderskeie absorpsie waardes vir elk van die riminofenasien verbindings opgestel.



Die standaardkurwes wat vir die verskillende riminofenasien verbindings opgestel is, word in Figuur 9.2 getoon. Die korrelasie koëffisiënte (r-waardes) van die linieëre regressie lyne, word in elk van die grafieke aangedui (Figuur 9.2:A-D). Die 95% vertroulikheidsintervalle vir die regressie koëffisiënte word met stippellyne in die grafieke aangetoon (Figuur 9.2: A-D).

Die metode wat in hierdie studie gebruik is, is uit twee metodes wat onderskeidelik deur **Desikan & Balakrishnan (1976)** en **O'Connor *et al* (1996)** beskryf is, saamgestel. H69/P en H69/LX4 selle is vir die eksperimente voorberei (sien 7.3.1.2) en in FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium (10% FKS) tot 'n finale konsentrasie van  $1 \times 10^7$  selle opgemaak. Vir elke behandeling is een milliliter (1 ml) van die selsuspensie in 15 ml polistireen proefbuis gevoeg. Nege milliliter (9 ml) gesupplementeerde RPMI 1640 medium is daarna by elke proefbuis gevoeg. Die inhoud van die proefbuis is vir 15 minute by 37 °C gepreïnkubeer. Die betrokke riminofenasien verbinding (finale konsentrasie van 5 µg/ml) is by die selsuspensies gevoeg en vir 30 minute by 37 °C geïnkubeer. Die proefbuis is deurentyd gedurende die inkubasie tye geroteer. Na die inkubasie-tydperk is die proefbuis vir 5 minute teen 850 g (2000 rpm) gesentrifugeer. Die selkonsentraat onder in die proefbuis is een keer met RPMI 1640 medium gewas, deur die proefbuis met medium te vul en vir 10 minute teen 200 g (1000 rpm) te sentrifugeer. Nadat die medium versigtig afgegooi is, is een milliliter (1 ml) gedeïoniseerde water, 1 ml 5 M NaOH en 2 ml hekasaan by die sel-suspensies in elk van die proefbuise gevoeg. Die inhoud van die proefbuis is vir 40 minute geroteer. Die proefbuis is daarna vir 10 minute teen 1850 g (3000 rpm) gesentrifugeer, om te verseker dat die twee fases volledig van mekaar skei. Die boonste hekasaan fase is versigtig verwyder. Twee milliliter (2 ml) gekonsentreerde HCl is by die verwyderde organiese hekasaan fase gevoeg. Die proefbuis is goed geskud en daarna weer vir 30 minute op 'n roteerder gemeng. Die proefbuis is weer vir 10 minute teen 1850 g (3000 rpm) gesentrifugeer. Die boonste helder, organiese fase is verwyder en weggegooi. Die onderste suur fase (2 ml) is



**Figuur 9.2:** Standaardkurwes van die onderskeie riminofenasien verbindings opgelos in heksaan (A: B663; B: B3962; C: B4100; D: B4121). Die volgende korrelasie koëffisiënte is vir die onderskeie regressie lyne verkry: (A)  $r^2 = 0.9977$ , (B)  $r^2 = 0.9968$ , (C)  $r^2 = 0.9987$  en (D)  $r^2 = 0.9937$ .

versigtig verwyder en met 2 ml FBS verdun. Die absorbansie waardes van die onderskeie geëkstraëerde riminofenasien verbindings is spektrofotometries by 458 nm bepaal. Die riminofenasien konsentrasies in die onderskeie oplossings is, deur van die vooraf opgestelde standaardkurwes gebruik te maak, bepaal. Die riminofenasien konsentrasie wat vir elk van die oplossings bepaal is, was verteenwoordigend van die hoeveelheid riminofenasien verbinding (in  $\mu\text{g}$ ) wat deur  $10^7$  selle opgeneem is.

### **9.3.3. Invloed van die onderskeie riminofenasien verbindings op die membraan stabiliteit van skaap eritrosiete**

#### **9.3.3.1. Beginsels betrokke by die bepaling van die invloed van die riminofenasien verbindings op die stabiliteit van skaap eritrosiete**

Die membrane van eritrosiete word algemeen as model om die effek van verskeie faktore, soos temperatuur en geneesmiddels, op selmembrane te bestudeer, gebruik [Becker & Deamer, 1991a]. Die redes hiervoor is (1) dat eritrosiete maklik in groot hoeveelhede verkrygbaar is en (2) dat die selmembrane van eritrosiete relatiewe eenvoudige strukture is. Eritrosiet selmembrane kan daarom as model vir die meer komplekse membrane van ander selteipes gebruik word. 'n Volwasse, soogdier eritrosiet besit nie addisionele organelle nie en verrig min metaboliese prosesse. Dit is essensieël 'n membraan-agtige sakkie hemoglobien [Becker & Deamer, 1991a; Voet & Voet, 1995d].

Hemoglobien is 'n rooi, suurstof-draende proteïen met 'n molekulêre massa van 64 450. Elke eritrosiet besit ongeveer 29 pg hemoglobien. Indien die selmembrane van eritrosiete deur geneesmiddels en/of fisiese hantering beskadig word, word die hemoglobien vanuit die selle vrygestel. Hierdie proses staan as hemolise bekend. Die vrygestelde hemoglobien is water-oplosbaar en kleur die omringende



medium en/of buffer rooi [Ganong, 1991]. Die kleur intensiteit van hierdie vrygestelde hemoglobien kan spektrofotometries by 415 nm bepaal word [Voet & Voet, 1995d].

### 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

Die membraan destabiliseringspotensiaal van die riminofenasien verbindings is met behulp van 'n hemolitiese bepaling gedoen. Hierdie bepaling is voorheen deur Anderson *et al* (1996) beskryf.

Perifere bloed is vanaf 'n skaap verkry. Honderd milliliter bloed is met 15 ml anti-koagulant, suur sitraat dekstrose (ACD) (sien 9.2.4), gemeng en by 4 °C gestoor.

Tydens 'n eksperiment is 2 - 3 ml van die ACD-skaapbloed in 'n 50 ml proefbuis gevoeg. Die proefbuis is met FBS gevul en vir 5 minute teen 850 g (2000 rpm) gesentrifugeer. Na sentrifugasie is die buffer versigtig afgetrek. Die wasstap is nog twee keer herhaal. Na die laaste wasstap is die eritrosiet konsentraat onder in die proefbuis tot 'n volume van 5 ml in HANKS gebalanseerde sout-oplossing (pH 7.4, H-BSS; Highveld Biological Pty (Ltd)) opgemaak. Die hematokrit (% eritrosiete in oplossing) is tot 0.5% in H-BSS (pH 7.4) aangepas. Honderd mikroliter van die 0.5% eritrosiet-oplossing is in al die eksperimentele proefbuise gevoeg. Die verlangde riminofenasien verbinding is by die eritrosiete in die onderskeie proefbuise gevoeg. Die riminofenasien konsentrasies wat gebruik is, het tussen 0.15 µg/ml - 10.0 µg/ml gewissel. Die volume in al die proefbuise is tot 0.9 ml met H-BSS aangepas. Die eritrosiete is vir 30 minute by 37 °C in die teenwoordigheid van die riminofenasien verbindings geïnkubeer. Die verlangde

oplosmiddel kontroles sowel as 'n kontrole waar 100% hemolise plaasgevind het, is in die eksperiment ingesluit. Na 30 minute, is die proefbuise vir 5 minute teen 850 g (2000 rpm) gesentrifugeer. Vyftig mikroliter van die supernatant is versigtig afgetrek en in die verlangde putjie van 'n 96-putjie mikrotiter plaat gevoeg. Die volume van die putjies is tot 200  $\mu$ l met FBS aangepas. Die mate van hemolise wat plaasgevind het is spektrofotometries by 415 nm bepaal. Die resultate is as % hemolise uitgedruk.

## 9.4. Resultate

### 9.4.1. Die partissie koëffisiënte van die onderskeie riminofenasien verbindings

Die partissie koëffisiënte van die onderskeie riminofenasien verbindings word in Tabel 9.1 weergegee. B4100 besit, van die vier riminofenasien verbindings wat bestudeer is, die hoogste partissie koëffisiënt, terwyl B3962 die laagste partissie koëffisiënt besit (Tabel 9.1). Die volgorde van lipofilisiteit (partissie koëffisiënte) van die bestudeerde riminofenasien verbindings is: B4100 > B663 > B4121 > B3962 (Tabel 9.1).

### 9.4.2. Die mate waarteen die onderskeie riminofenasien verbindings na *in vitro* blootstelling onderskeidelik in H69/P sowel as H69/LX4 selle geakkumuleer het

Al vier die eksperimentele riminofenasien verbindings het statisties betekenisvol ( $P < 0.0001$ ) in die H69/P selle sowel as die H69/LX4 selle geakkumuleer (Figuur 9.3A en B). Die vlakke van die verskillende riminofenasien verbindings in die H69/P selle het nie betekenisvol ( $P > 0.05$ ) van die vlakke van die ooreenstemmende riminofenasien verbindings in die H69/LX4 selle verskil nie (Figuur 9.3A en B). B4121 het teen die hoogste vlakke in beide sellyne geakkumuleer (Figuur 9.3A en B).

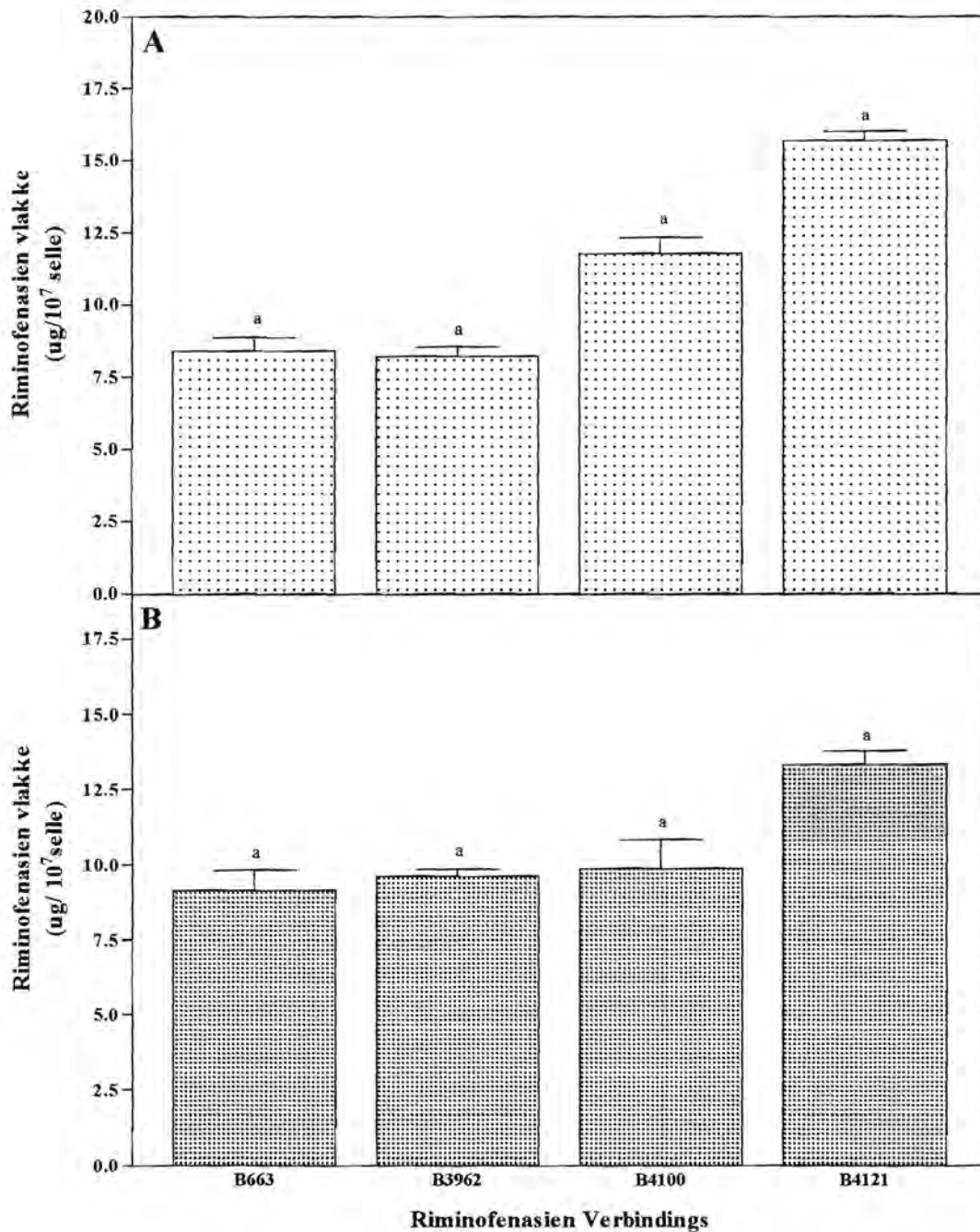
**Tabel 9.1: Die OD<sub>458</sub>-waardes, afgeleide riminofenasien konsentrasies en partissie koeffisiënte van die verskillende riminofenasien verbindings.**

	Riminofenasien Verbindings			
	B663	B3962	B4100	B4121
<b>OD<sub>458</sub> in water</b>	0.005	0.063	0.003	0.008
<b>Afgeleide riminofenasien konsentrasie in water (µg/ml)</b>	0.089	1.218	0.072	0.276
<b>OD<sub>458</sub> in 1-oktanol</b>	1.872	1.231	1.762	0.914
<b>Afgeleide riminofenasien konsentrasie in 1-oktanol (µg/ml)</b>	33.418	23.791	42.057	31.493
<b>Partissie Koeffisiënte*</b>	52.02	2.70	80.82	15.79

\*: Die partissie koeffisiënte van die riminofenasien verbindings is as volg bepaal:

$$\text{Partissie Koeffisiënt} = \frac{(\text{konsentrasie in oktanol/ volume in oktanol})}{(\text{konsentrasie in water/ volume in water})}$$





**Figuur 9.3:** *In vitro* opname van die verskillende riminofenasiens verbindinge, na 'n 30 minute blootstellings-tydperk, deur onderskeidelik die H69/P (A) en H69/LX4 (B) selle. Die resultate is die gemiddeld van 3 - 4 eksperimente. Die agtergrondwaardes, soos vir die onbehandelde H69/P selle ( $0.116 \pm 0.051$ ) sowel as H69/LX4 selle ( $0.131 \pm 0.051$ ) verkry is, is van bogenoemde resultate afgetrek. Die P-waardes ten opsigte van die kontrole (onbehandelde) selle was as volg:

a:  $P < 0.0001$

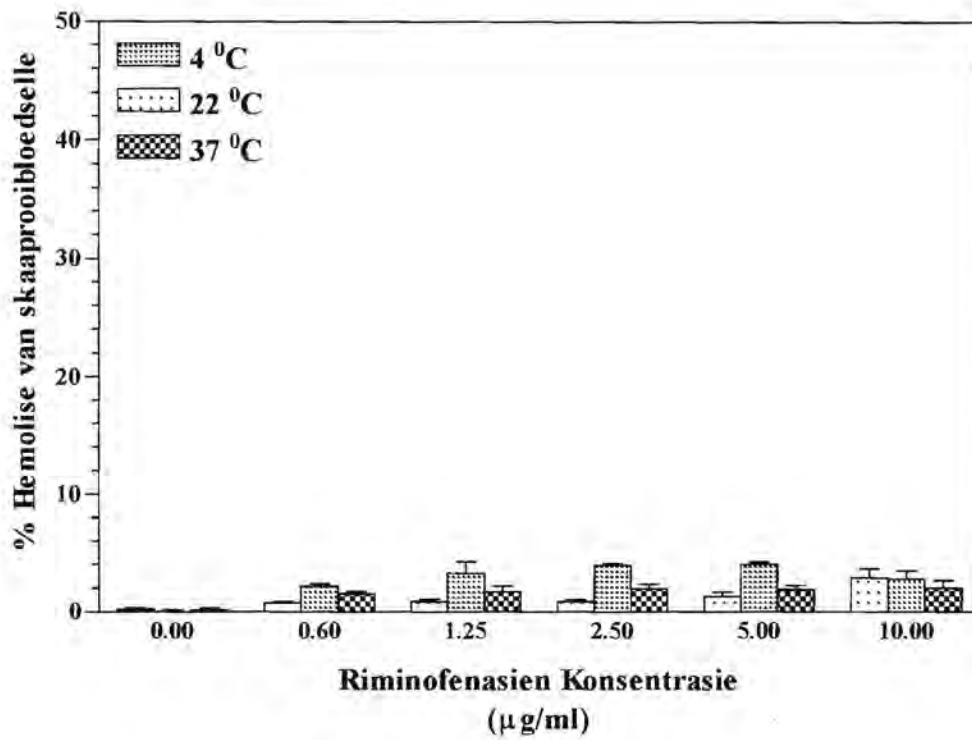
Die statisties betekenisvolle verskille (P-waardes) in die mate van akkumulering van die verskillende riminofenasiens verbindinge in die onderskeie selyne word volledig in die meegaande teks beskryf.

B4121 het statisties betekenisvol hoër ( $P < 0.01$ ) as die ander drie riminofenasien verbindings (B663, B3962 en B4100) in die H69/P selle geakkumuleer (Figuur 9.3A). Die vlakke wat vir B4100 in die H69/P selle waargeneem is, was ook statisties betekenisvol hoër ( $P < 0.05$ ) as die vlakke wat vir B663 en B3962 in hierdie selle waargeneem is (Figuur 9.3A).

Alhoewel die waargeneemde vlakke vir B4121 in die H69/LX4 selle hoër was as die vlakke wat vir B4100 en B3962 in hierdie selle waargeneem is, was hierdie verskille nie statisties betekenisvol ( $P > 0.05$ ) nie (Figuur 9.3B). Die waargeneemde B4121 vlakke in H69/LX4 selle was wel betekenisvol hoër ( $P < 0.05$ ) as die vlakke wat vir B663 in hierdie selle waargeneem is (Figuur 9.3B).

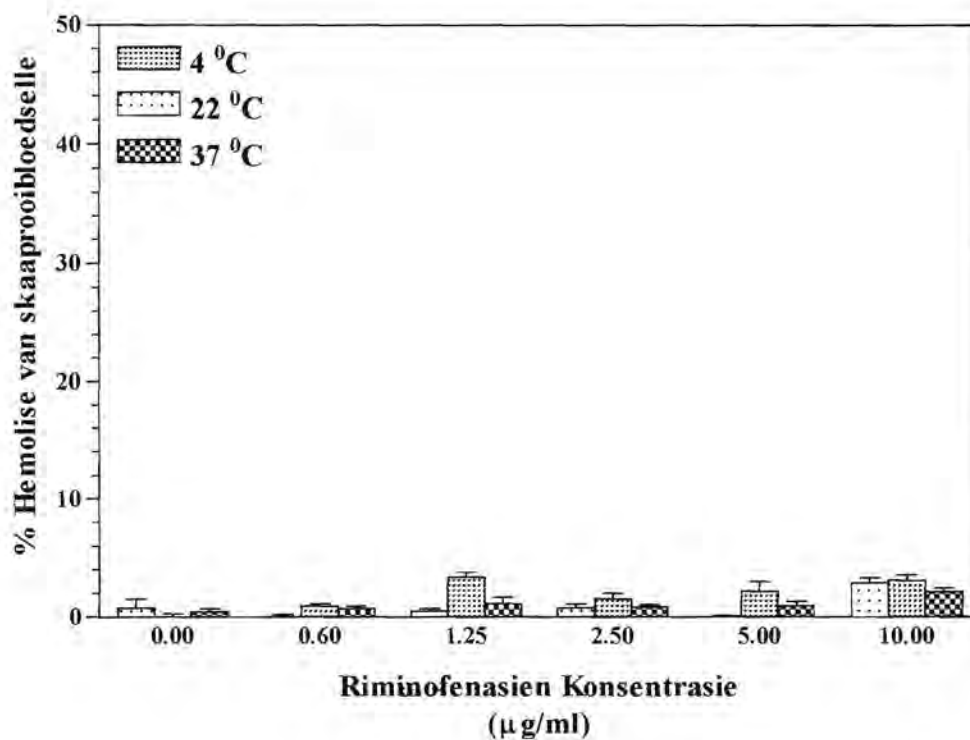
#### **9.4.3. Invloed van die onderskeie riminofenasien verbindings op die membraan stabiliteit van skaap eritrosiete**

Al vier eksperimentele riminofenasien verbindings (B663, B3962, B4100 en B4121) het op hul eie, by die laer riminofenasien konsentrasies ( $0.6 \mu\text{g/ml} - 2.5 \mu\text{g/ml}$ ), nie betekenisvolle lise van die skaap rooibloedselle by  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $22^{\circ}\text{C}$  of  $37^{\circ}\text{C}$  veroorsaak nie (Figuur 9.4; Figuur 9.5; Figuur 9.6; Figuur 9.7). By temperature van  $22^{\circ}\text{C}$  en  $37^{\circ}\text{C}$  het  $5.0 \mu\text{g/ml}$  B4100 wel die skaap rooibloedselle statisties betekenisvol ( $P < 0.05$ ) geliseer, terwyl  $10.0 \mu\text{g/ml}$  van hierdie verbinding die skaap rooibloedselle by al drie die temperature statisties betekenisvol ( $P < 0.01$ ) geliseer het (Figuur 9.6). B4121 het by 'n konsentrasie van  $5.0 \mu\text{g/ml}$  die skaap rooibloedselle by al drie die temperature statisties betekenisvol ( $P < 0.05$ ) geliseer, terwyl  $10.0 \mu\text{g/ml}$  van B4121 die rooibloedselle by  $22^{\circ}\text{C}$  en  $37^{\circ}\text{C}$  statisties betekenisvol ( $P < 0.01$ ) geliseer het (Figuur 9.7).

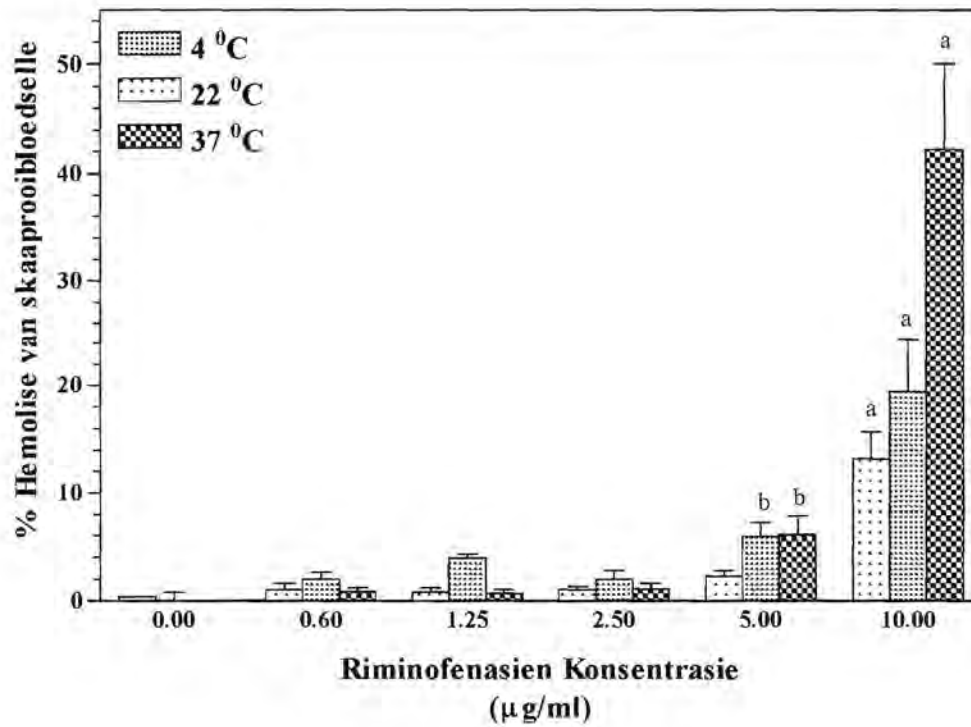


**Figuur 9.4:** Die effek van B663 by 4 °C, 22 °C en 37 °C, op die stabiliteit van skaap eritrosiet selmembrane. Die resultate is as % hemolise ± standaardfout, uitgedruk. Drie - vyf eksperimente is gedoen. Geen statisties betekenisvolle verskille is waargeneem nie.

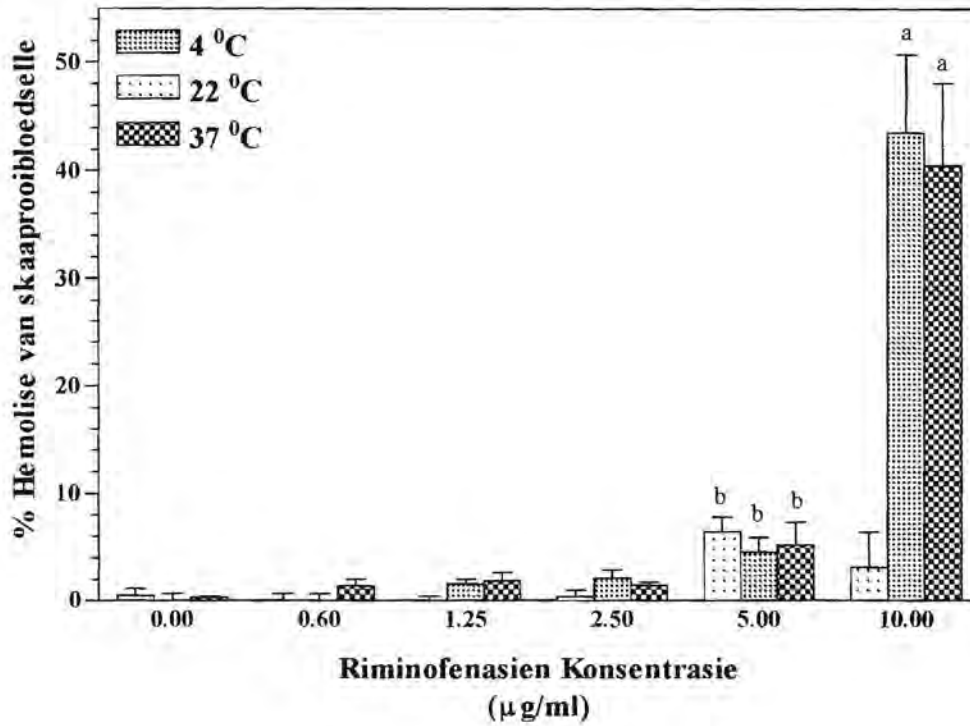




**Figuur 9.5:** Die effek van B3962 by 4 °C, 22 °C en 37 °C, op die stabiliteit van skaap eritrosiet selmembrane. Die resultate is as % hemolise ± standaardfout, uitgedruk. Drie - vyf eksperimente is gedoen. Geen statisties betekenisvolle verskille is waargeneem nie.



**Figuur 9.6:** Die effek van B4100 by 4 °C, 22 °C en 37 °C, op die stabiliteit van skaap eritrosiet selmembrane. Die resultate is as % hemolise ± standaardfout, uitgedruk. Drie -vyf eksperimente is gedoen. Die P-waardes ten opsigte van die kontrole (onbehandelde) selle was as volg:  
a:  $p < 0.01$   
b:  $p < 0.05$



**Figuur 9.7:** Die effek van B4121 by 4 °C, 22 °C en 37 °C, op die stabiliteit van skaap eritrosiet selmembrane. Die resultate is as % hemolise ± standaardfout, uitgedruk. Drie - vyf eksperimente is gedoen. Die P-waardes ten opsigte van die kontrole (onbehandelde) selle was as volg:

a:  $p < 0.0001$

b:  $p < 0.01$



#### 9.4.4. Bespreking

B4100 is die mees lipofiliese riminofenasien verbinding ( $pK = 80.82$ ) wat bestudeer is. Daarenteen is B3962 die mees hidrofiliese verbinding ( $pK = 2.70$ ) wat bestudeer is. Die volgorde van lipofilisiteit van die bestudeerde riminofenasien verbindings is: B4100 > B663 > B4121 > B3962.

Al vier die eksperimentele riminofenasien verbindings het statisties betekenisvol ( $P < 0.0001$ ) in die H69/P selle sowel as die H69/LX4 selle geakkumuleer. Geen statisties betekenisvolle verskille is in die mate waarin die verskillende riminofenasien verbindings in staat was om in die H69/P selle sowel as die H69/LX4 selle te akkumuleer, waargeneem nie. B4121 het teen die hoogste vlakke in beide sellerne geakkumuleer.

Alhoewel lipofilisiteit en sellulêre opname duidelik belangrike rolle in die sitotoksiteit en P-gp neutraliseringsaktiwiteit van die eksperimentele riminofenasiene speel, was ek nie in staat om verskille aan te toon wat die TMP-gesubstitueerde fenasiene se verhoogde aktiwiteit, in vergelyking met B663, verduidelik nie. Hierdie bevindings stel voor dat die tetrametielpiperidiel groep in B3962, B4100 en B4121, (by posisie 2 in die fenasiene nukleus), wat dit van B663, wat 'n isopropielimino groep by daardie posisie het, onderskei, aan hierdie groep fenasiene veranderde biologiese aktiwiteite gee wat nie slegs aan veranderde lipofilisiteit en/of sellulêre opname toegeskryf kan word nie.

Nie een van die eksperimentele riminofenasien verbindings het op hul eie by  $4^{\circ}\text{C}$  tot lise van skaap rooibloedselle gelei nie. B4100 en B4121 het teen hoë konsentrasies ( $5.0 \mu\text{g/ml}$  en  $10.0 \mu\text{g/ml}$ ) tot lise van skaap rooibloedselle by  $37^{\circ}\text{C}$  gelei, terwyl B663 en B3962 selfs by hierdie konsentrasies nie in staat was om rooibloedselle te

liseer nie. B4100 en B4121 was ook by 22 °C in staat om skaap rooibloedselle te liseer. Die mate van riminofenasien-geïnduseerde lise van skaap rooibloedselle was temperatuur-afhanklik. Die vermoë van die ekperimentele riminofenasien verbindings om skaap rooibloedselle te liseer, korreleer met die vermoë van die verbindings om die opname van vinblastien ( $r^2 = 0.8$ ;  $p = 0.08$ ) sowel as tiazool oranje opname ( $r^2 = 0.9$ ;  $p = 0.07$ ) in die H69/LX4 te herstel. Die riminofenasien-geïnduseerde veranderinge in die membraan potensiale van die H69/LX4 sellyn het ook met die vermoë van die riminofenasien verbindings om skaap rooibloedselle te liseer, gekorreleer ( $0.7 \geq r^2 \geq 0.4$ ;  $0.19 \leq p \leq 0.37$ ).

Hierdie bevindings stel voor dat 'n tetrametielpiperidiel groep by posisie 2 van die fenasiën nukleus in kombinasie met chlorinering van die gesubstitueerde groepe op posisie 3 en 10 van die fenasiën nukleus moontlik membraan destabiliseringseienskappe aan hierdie verbindings oordra, wat bydra tot beide hulle verhoogde (relatief tot klofasimien) sitotoksiteit en P-gp neutraliserende eienskappe. Die laer mate van membraan destabiliserings aktiwiteit van die ongehalogineerde, TMP-fenasiën, B3962, kan daaraan toegeskryf word dat hierdie verbinding stadiger op die membraan inwerk en gevolglik moeiliker oor so 'n kort tydperk (30 min) waargeneem word. Hierdie bewering word deur die waarneming dat B3962 die minste lipofilie was van die 4 verbindings wat getoets is, ondersteun.

## HOOFSTUK 10

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

#### **10.1. Inleiding**

'n Siekte-toestand, soos kanker, kan slegs suksesvol met 'n geneesmiddel behandel word, indien genoegsame hoeveelhede van die toegediende geneesmiddel die teikenweefsel bereik en daarin akkumuleer [Latham, 1996]. Die sleutel tot die bereiking van die verlangde geneesmiddel konsentrasie in die teikenweefsel, is genoegsame kennis oor die farmakokinetiese eienskappe van die betrokke geneesmiddel. Deeglike kennis en begrip van die farmakokinetiese eienskappe van 'n geneesmiddel speel ook 'n belangrike rol in die ontwerp en toetsing van nuwe, meer effektiewe geneesmiddels [Park, 1986]. Belangrike farmakokinetiese eienskappe van 'n geneesmiddel sluit die adsorpsie, verspreiding, binding, metabolisme en uitskeiding van die geneesmiddel in [Park, 1986; Latham, 1996].

Van Rensburg *et al* (1993a,b) het getoon dat die riminofenasien verbindings, B663 en B669, nie net in staat is om die prolifisering van verskeie tumor sellyne *in vitro* te inhibeer nie, maar dat hierdie verbindings ook tumor groei *in vivo* doeltreffend kan onderdruk.

#### **10.2. Doelwitte**

Preliminêre studies is *in vivo* op die riminofenasien verbindings gedoen om die direkte anti-tumor aktiwiteit sowel as die verspreiding daarvan in verskeie organe en weefsels van eksperimentele Sprague-Dawley rotte te ondersoek. Dit is belangrik om daarop te let dat die *in vivo* bestudering van die verspreiding van die riminofenasien verbindings



in die organe en weefsels op 'n baie klein aantal eksperimentele diere uitgevoer is. 'n Groter, meer volledige studie moet op 'n later stadium gedoen word.

### **10.3. Materiale en Reagense**

#### **10.3.1. Eksperimentele diere**

Vroulike, 6-7 weke oue, Sprague-Dawley rotte (Pretoria Biomediese Navorsings Instituut, Pretoria, Suid-Afrika) is in 'n humiditeit-, temperatuur- en lig (14 ure lig, 10 ure donker)-gereguleerde kamer aangehou. Die rotte is met 'n gesteriliseerde standaard dieet gevoer en onbeperk van water voorsien. Een rot is per hok aangehou.

#### **10.3.2. Riminofenasien verbindings**

Sien Hoofstuk 8 (8.2.1)

### **10.4. Metodes**

#### **10.4.1. Supplementering van die Sprague-Dawley rotte se voedsel met die onderskeie riminofenasien verbindings**

Die rot voedsel wat in die eksperimente gebruik is, was in poeier vorm. Dertig milligram (30 mg) van die verlangde riminofenasien verbindings is in 'n oormaat absolute etanol opgelos en met 1 kilogram van die rot voedsel gemeng. Die etanol is daarna toegelaat om te verdamp, terwyl dit dikwels gemeng is om 'n eweredige verspreiding van die riminofenasien verbindings in die voedsel te verseker. Hierdie dosis is gelykstaande aan 'n behandeling van 30 mg/kg/dag. Kontrole voedsel is op dieselfde wyse voorberei, maar geen riminofenasien verbindings is by die voedsel gevoeg nie.

#### **10.4.2. Induksie van veelvuldige mamma karsinome in Sprague-Dawley rotte**

Veelvuldige mamma karsinome is in Sprague-Dawley rotte geïnduseer deur 20 mg dimetielbensatreen (DMBA) wat in 1 ml sonneblom-olie opgelos is, eenmalig mondelings aan die rotte toe te dien. Die metode is voorheen deur **Hilgard *et al* (1988)** beskryf. Agt (8) tot tien (10) weke na induksie het die eerste tumore begin verskyn.

#### **10.4.3. Behandeling van die tumor-geïnduseerde Sprague-Dawley rotte met die riminofenasien verbindings**

Die rotte is in vyf groepe verdeel. Elke groep het twee rotte bevat. Elke groep is met een van die vier eksperimentele riminofenasien verbindings (B663, B3962, B4121 en B4100) behandel. Die vyfde groep het as kontrole groep gedien.

Veelvuldige mamma karsinome is slegs in een rot per groep geïnduseer. Alle behandelings van rotte waarin tumore geïnduseer is, het in aanvang geneem nadat die eerste tumor 'n deursnit van 10 - 15 mm bereik het. Die rotte is vir vier weke met die riminofenasien verbindings behandel en daarna getermineer. Die totale tumor massa per rot sowel as die betrokke riminofenasien vlakke is in die verskillende organe bepaal.

#### **10.4.4. Bepaling van riminofenasien vlakke in verskeie weefsels sowel as die serum van Sprague-Dawley rotte**

Die standaardkurwes wat in 9.3.2. opgestel is, is ook in hierdie bepaling gebruik (Figuur 9.2A-D).

Serum en weefsel monsters is van die rotte wat met die onderskeie riminofenasien verbindings behandel is, na terminering van die diere, verkry. Alle tumore is verwyder en die massa van die tumore is bepaal en genoteer. Kontrole serum en

weefsel monsters is ook verkry. Riminofenasien vlakke is in die volgende organe van die rotte bepaal: Lewer, long, kolon, tumor, milt, brein en spier.

'n Verteenwoordigende monster (0.1 g) is van die onderskeie organe geneem en baie fyn met 'n skapelmessie opgesny. Die fyn opgesnyde monster is versigtig na 'n 15 ml polistireen proefbuis oorgedra. Enige oorblywende deeltjies in die petribakkie is met 1 ml gedeïoniseerde water sowel as met 1 ml 5 M NaOH volledig uit die petribakkie uitgewas en by die res van die weefsel-inhoud gevoeg. Drie milliliter (3 ml) heksaan is by elke proefbuis gevoeg en daarna vir 30 minute op 'n roteerder gemeng. Hierna is die inhoud van die proefbuis vir 5 minute teen 'n hoë spoed gevorteks. Die proefbuis is vir 5 minute teen 1850 g (3000 rpm) gesentrifugeer, om te verseker dat die twee fases volledig van mekaar skei. Die boonste heksaan fase is versigtig met behulp van 'n glas pasteurpipet verwyder en drie milliliter (3 ml) heksaan is by die oorblywende waterige fase gevoeg. Die ekstraksie proses is nog twee keer herhaal. Die drie heksaan fraksies is bymekaar gevoeg. Die volume van die saamgevoegde heksaan fraksies was ongeveer nege milliliter (9 ml). Vier milliliter (4 ml) gekonsentreerde HCl is by die saamgevoegde heksaan fraksies gevoeg. Die proefbuis is teen 'n hoë spoed gevorteks, totdat die boonste heksaan fraksie heeltemal helder was (ongeveer 5 minute). Die proefbuis is vir 5 minute teen 1850 g (3000 rpm) gesentrifugeer. Twee milliliter (2 ml) van die onderste suur fraksies is versigtig met behulp van 'n pasteurpipet verwyder en met 2 ml gedeïoniseerde water verdun. Die absorpsie waardes van hierdie riminofenasien-bevattende oplossings is spektrofotometries by 458 nm bepaal. Die konsentrasie van die riminofenasien verbindings in die onderskeie oplossings is van die vooraf opgestelde standaardkurwes bereken. Die resultate is uitgedruk as die hoeveelheid (in  $\mu\text{g}$ ) riminofenasien verbindings teenwoordig in een gram (1 g) weefsel.

Die riminofenasien vlakke in die serum van die rotte, is ook bepaal. Een milliliter (1 ml) serum is saam met 1 ml gedeïoniseerde water sowel as 1 ml 5 M NaOH in 'n 15 ml polistireen proefbuis gevoeg. Drie milliliter (3 ml) heksaan is by die



proefbuis gevoeg. Die ekstraksie prosedure is verder soos wat vir die ekstraksie van die riminofenasien verbindings vanuit die weefsel beskryf is, gevolg. Die resultate is uitgedruk as die hoeveelheid (in  $\mu\text{g}$ ) riminofenasien verbindings teenwoordig in 1 ml serum.

#### 10.4.5. Statistiese bepalings

Die resultate van elke reeks eksperimente is as die gemiddelde waarde  $\pm$  die standaardfout uitgedruk. Statistiese bepalings binne 'n bepaalde eksperiment, is met behulp van die Student t-toets (gepaarde t-toets) gedoen.

### 10.5. Resultate

#### 10.5.1. Die effek van die verskillende riminofenasien verbindings op *in vivo* tumor groei

Al vier riminofenasien verbindings (B663, B3962, B4121 en B4121) het tot inhibisie van tumor groei in die rotte gelei (Tabel 10.1). Geen statistiese analyses kon vir hierdie studie bereken word nie, aangesien veelvuldige mamma karsinome slegs in een rot per groep geïnduseer is. Die anti-tumor aktiwiteit van die riminofenasien verbindings was as volg: B3962 > B4100 > B663 > B4121 (Tabel 10.1).

**Tabel 10.1: Die tumor massa van onbehandelde sowel as riminofenasien-behandelde Sprague-Dawley rotte met veelvuldige mamma karsinome.**

Riminofenasien Verbindings	Tumor Massa (gram)
Kontrole	17.511 g
B663	11.303 g
B3962	6.637 g
B4100	8.629 g
B4121	13.834 g

Veelvuldige mamma karsinome is slegs in een rot per groep geïnduseer.

### 10.5.2. Weefselvlakke van die onderskeie riminofenasien verbindings in riminofenasien-behandelde Sprague-Dawley rotte

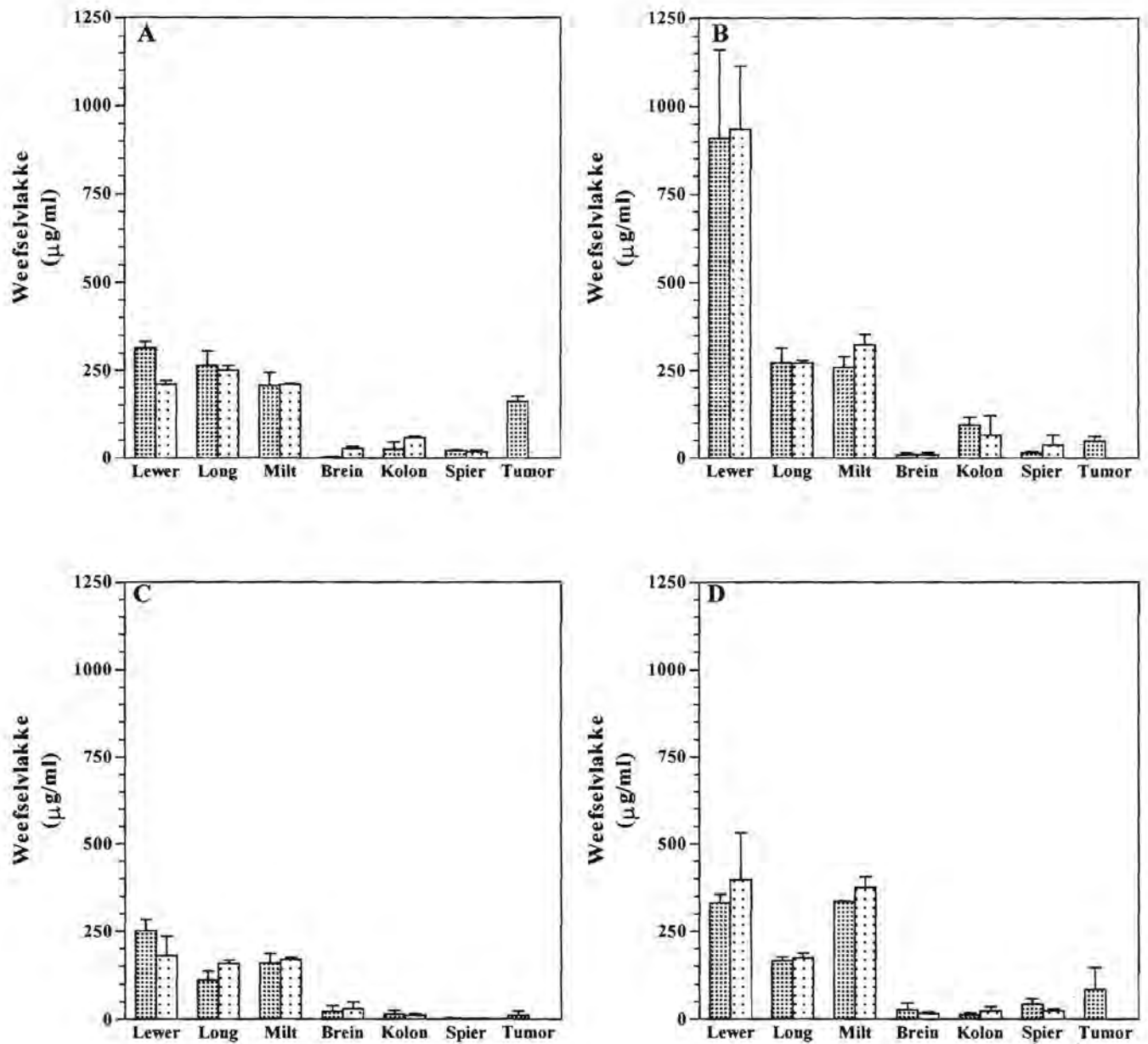
Geen verskille is tussen die mate van akkumulering van die verskillende riminofenasien verbindings in die weefsels van onderskeidelik rotte met veelvuldige mamma karsinome en rotte sonder enige tumore, waargeneem nie (Figuur 10.1A-D).

B663 het veral teen hoë vlakke in die lewer, long en milt van die rotte geakkumuleer (Figuur 10.1:A-D). Alhoewel B663 ook in die tumor, spier, kolon sowel as brein geakkumuleer het, was hierdie vlakke laer as die B663 vlakke wat onderskeidelik in die lewer, long en milt waargeneem is (Figuur 10.1A). Die waargeneemde vlakke van B663 in die tumor was laer as die vlakke wat vir B663 in onderskeidelik die lewer sowel as die long waargeneem is, terwyl die vlakke in die tumor hoër was as die vlakke wat in onderskeidelik die brein, kolon en spier waargeneem is (Figuur 10.1A).

B3962 het teen baie hoë vlakke in die lewer geakkumuleer (Figuur 10.1B). Die onderskeie B3962 vlakke wat in die long en die milt waargeneem is, was albei hoër as die vlakke wat vir hierdie riminofenasien verbinding in onderskeidelik die brein, kolon, spier en tumor waargeneem is (Figuur 10.1B).

B4100 het veral teen hoë vlakke in die lewer, long en milt geakkumuleer. Die vlakke wat in die lewer waargeneem is, was hoër as die vlakke wat onderskeidelik in die long en milt vir B4100 waargeneem is (Figuur 10.1C). Die B4100 vlakke wat onderskeidelik in die lewer, long en milt waargeneem is, was hoër as die vlakke wat in die brein, kolon, spier en





**Figuur 10.1:** Die weefselvlakke van die onderskeie rimonifenasien verbindings in Sprague-Dawley rotte. Die weefselvlakke soos in tumor-geïnduseerde Sprague-Dawley rotte (▨) sowel as Sprague-Dawley rotte sonder tumore (□) waargeneem is, word aangetoon. Die konsentrasies wat getoon word, is die gemiddeld van 2 - 3 herhalings. Die skale van die grafieke in hierdie figuur is gestandaardiseer, sodat die relatiewe vlakke van die verskillende rimonifenasien verbindings beter met mekaar vergelyk kan word. A: B663; B: B3962; C: B4100; D: B4121. Die statisties betekenisvolle verskille (p-waardes) in die mate van akkumulering van die rimonifenasien verbindings in die onderskeie weefsels word volledig in die meegaande teks beskryf.

tumor vir hierdie riminofenasien verbinding waargeneem is (Figuur 10.1C).

B4121 het teen hoë vlakke in die lewer en milt van die rotte geakkumuleer (Figuur 10.1D). Relatiewe hoë vlakke is ook in die longe waargeneem (Figuur 10.1D). Die B4121 vlakke wat onderskeidelik in die brein-, kolon, spier- en tumorweefsel waargeneem is, was laer as die vlakke wat in die lewer sowel as die milt waargeneem is (Figuur 10.1D).

Die skale van die y-as in Figuur 10.1A-D is gestandaardiseer, sodat die relatiewe akkumulering van die verskillende riminofenasien verbindings in die onderskeie organe makliker met mekaar vergelyk kan word. B3962 het teen statisties betekenisvol hoër vlakke ( $p < 0.05$ ) as die ander drie riminofenasien verbindings in die lewer geakkumuleer (Figuur 10.1A-D). Relatiewe hoë vlakke van B3962 sowel as B663 is in die longe waargeneem (Figuur 10.1A-D). B3962 sowel as B4121 het teen hoër vlakke as B4100 en B663 in die milt geakkumuleer (Figuur 10.1A-D). In die spiere het B4121 die hoogste vlakke getoon (Figuur 10.1A-D).

B663 het die hoogste vlakke in die tumore getoon (Figuur 10.1A). Die volgorde in die mate van akkumulering van die onderskeie riminofenasien verbindings in die tumore, was as volg: B663 > B4121 > B3962 > B4100 (Figuur 10.1A-D).

### **10.5.3. Serumvlakke van die onderskeie riminofenasien verbindings in riminofenasien-behandelde Sprague-Dawley rotte**

Aangesien onvoldoende volumes serum vanaf die afsonderlike rotte verkry is, is die serum-monsters wat vanaf die DMBA-geïnduseerde rot

met veelvuldige mamma karsinome sowel as die tumor-vrye rot van elke groep, saamgevoeg en geanaliseer. Die serumvlakke van al vier riminofenasien verbindings word in Tabel 10.2 weergegee. Die volgorde van die mate waarteen die vier riminofenasien verbindings in die serum van die riminofenasien-behandelde rotte geakkumuleer het, was as volg: B663 > B3962 > B4121 > B4100. Die serumvlakke van die verskillende riminofenasien verbindings verskil nie betekenisvol van mekaar nie.

**Tabel 10.2: Serumvlakke van die onderskeie riminofenasien verbindings in riminofenasien-behandelde Sprague-Dawley rotte.**

Riminofenasien Verbindings	Serumvlakke (in $\mu\text{g/ml}$ )
B663	$5.879 \pm 1.281$
B3962	$1.708 \pm 1.082$
B4100	$1.111 \pm 0.727$
B4121	$2.770 \pm 1.693$

Die konsentrasies wat getoon word, is die gemiddeld van 3 - 5 herhalings van dieselfde monster. Die agtergrond waarde wat vanaf die serum van onbehandelde rotte verkry is, was  $0.026 \pm 0.003$ .

#### 10.5.4. Bespreking

Al vier riminofenasien verbindings het tot inhibisie van tumor groei in die rotte gelei. B3962 het tumor groei in die eksperimentele rotte tot die



grootste mate geïnhibeer, terwyl B4121 tumor groei die minste beïnvloed het.

Riminofenasien vlakke kon in al die bestudeerde weefsels (lewer, long, milt, brein, kolon, spier en tumore) aangetoon word. Geen verskille is tussen die mate van akkumulering van die verskillende riminofenasien verbindings in die weefsels van onderskeidelik rotte met veelvuldige mamma karsinome en rotte sonder enige tumor, waargeneem nie.

Hoë vlakke van die eksperimentele riminofenasien verbindings is veral in die lewer, long en milt waargeneem. B3962 het veral teen baie hoë vlakke in die lewer geakkumuleer, terwyl B663 die hoogste vlakke in die tumore en serum getoon het. Die volgorde van die mate van akkumulering van die onderskeie riminofenasien verbindings in die tumore, was as volg: B663 > B4121 > B3962 > B4100, terwyl die volgorde van die mate waarteen die vier verbindings in die serum van die riminofenasien-behandelde rotte geakkumuleer het, as volg was: B663 > B3962 > B4121 > B4100.

Hierdie bevindings stel voor dat, alhoewel die TMP-gesubstitueerde fenasiene superior is in vergelyking met B663 ten opsigte van *in vitro* sitotoksiese aktiwiteit, hierdie verskille nie *in vivo* waargeneem kan word nie. Dit kan moontlik toegeskryf word aan verskille in adsorpsie en farmakokinetiese profiele. Dit moet egter beklemtoon word dat die *in vivo* studies slegs voorlopige studies is en gebaseer is op klein getalle eksperimentele diere. Verder moet optimale roetes van toediening, geskikte oplosmiddels sowel as die relatiewe *in vivo* P-gp neutraliseringspotensiaal van hierdie verbindings, nog bepaal word.

## HOOFSTUK 11

### SAMEVATTENDE BESPREKING

Een van die grootste struikelblokke in die behandeling van kanker, is die voorkoms van veelvuldige geneesmiddel-weerstandbiedendheid [Gottesman & Pastan, 1993]. Verskeie meganismes kan vir die ontwikkeling van MDR in kanker selle verantwoordelik wees [Harrison, 1995]. Een van die vernaamste en beste bestudeerde meganismes wat by verworwe geneesmiddel weerstandbiedendheid betrokke is, is die oormatige uitdrukking van P-gp op die oppervlakte van MDR selle [Harrison, 1995; Van Rensburg *et al*, 1997]. Die algemeen aanvaarde hipotese vir die werking van P-gp, is dat P-gp as 'n aktiewe uitwaartse geneesmiddel pomp in P-gp-positiewe geneesmiddel weerstandbiedende selle optree [Harrison, 1995; Skovsgaard, 1978a; Skovsgaard, 1978b]. Die uitwaartse pomp aksie van P-gp lei gevolglik tot 'n verlaging in die intrasellulêre akkumulering van anti-kanker geneesmiddels in die MDR selle [Gerlach, 1989].

Aangesien veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid 'n groot struikelblok in die suksesvolle behandeling van kanker is, is die bestudering van wyses om MDR om te keer en/of te verhoed, huidiglik een van die mees aktiewe en opwindende areas in kanker- navorsing. Huidige navorsing het tot verskeie strategieë vir die omkering van MDR gelei [Ford & Hait, 1994]. Hierdie strategieë sluit onder meer die omkering van MDR deur middel van farmakologiese verbindings, die gebruik van monoklonale teenliggame wat spesifiek aan P-gp bind en sodoende die werking van P-gp inhibeer, en genetiese regulering van die uitdrukking van die *mdr1* geen deur onder meer van antisens oligonukleotiede gebruik te maak, in [Ford & Hait, 1994; Liu *et al*, 1996; Sonneveld & Wiemer, 1997]. Die farmakologiese omkering van MDR is huidiglik die beste bestudeerde strategie vir die omkering van MDR [Ford & Hait, 1994; Goldstein, 1995].

'n Groot verskeidenheid struktureel-onverwante, chemiese verbindings is in staat om die werking van P-gp in veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid farmakologies te inhibeer [Ford, 1995; Ford, 1996]. Hierdie geneesmiddel-bemiddelde inhibisie van P-gp lei tot die herstel van die intrasellulêre akkumulering van anti-kanker geneesmiddels in die selle



[Ford, 1995]. Riminofenasien verbindings is ook in staat om veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid in P-gp-positiewe selle om te keer, dit wil sê om die akkumulering van die anti-kanker geneesmiddels sowel as ander substrate van P-gp in MDR selle te herstel [Van Rensburg *et al*, 1994; Myer & Van Rensburg, 1996].

Die presiese meganisme waartoe P-gp tot veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid bydra word tans aktief nagevors. Hierdie navorsing het daartoe gelei dat verskeie modelle vir die werking van P-gp voorgestel is [Roepe, 1995; Gottesman *et al*, 1996]. Hierdie modelle kan hoofsaaklik in twee kategorieë verdeel word [Robinson & Roepe, 1996]. Die eerste kategorie sluit die modelle waarin P-gp 'n direkte rol in veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid speel, in. In hierdie modelle bind die anti-kanker geneesmiddels direk aan die P-gp molekules, waarna die P-gp molekules die anti-kanker geneesmiddels aktief uit die sel en/of selmembrane verwyder [Higgins & Gottesman, 1992; Gottesman & Pastan, 1993]. Hierdie meganisme van werking is aanvanklik algemeen aanvaar as die wyse waarop P-gp funksioneer, maar word deesdae om verskeie redes meer en meer bevraagteken. Die tweede kategorie sluit die modelle wat daarop berus dat die oormatige uitdrukking van P-gp op die sel-oppervlak tot veranderinge in die membraan potensiaal, volume en/of intrasellulêre pH lei, in. Hierdie P-gp-bemiddelde veranderinge in die membraan potensiaal en/of intrasellulêre pH sal indirek daartoe lei dat die anti-kanker geneesmiddels nie doeltreffend oor die selmembraan kan diffundeer nie en gevolglik nie doeltreffend in die selle kan akkumuleer nie [Roepe, 1995].

Die resultate wat in die eerste gedeelte van hierdie tesis aangebied is, demonstreer die verhoogde vlakke van P-gp in H69/LX4 selle relatief tot die oorspronklike sensitiewe sellyn (H69/P) wat met die verkryging van veelvuldige geneesmiddelbestandheid gekorreleer het. Verhoogde P-gp uitdrukking was met 'n effens laer rustende membraan potensiaal en verhoogde  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase aktiwiteit geassosieer. Gebasseer op resultate verkry met ouabain blyk dit egter dat nie een van laasgenoemde egter bydra tot P-gp funksie nie. 'n Moontlike verwantskap tussen verlaagde membraan potensiaal en P-gp funksie kan egter nie uitgeskakel word op grond van die data wat in my tesis aangebied is nie. Addisionele eksperimente, wat daarop gemik is om P-gp funksie onder kondisies waar die rustende membraan potensiaal in



H69/LX4 selle verhoog word tot vlakke wat in die oorspronklike sellyn voorkom, moet egter nog gedoen word. Slegs indien P-gp funksie onder hierdie toestande onveranderd bly, kan 'n meganistiese verwantskap tussen verlaagde membraan potensiaal en P-gp aktiwiteit uitgeskakel word. In so 'n eksperiment kan daar van die kort-termyn radiometriese/vloeisitometriese vinblastien/tiazool oranje opname studies gebruik gemaak word om die funksie van P-gp te bepaal en van 'n  $K^+$  ionofoor soos valinomisien of 'n selsuspensie medium met hoë  $K^+$  konsentrasie gebruik gemaak om die rustende membraan potensiaal te verhoog.

Die biochemiese meganisme van verlaagde membraan potensiaal in die P-gp- positiewe sellyn moet ook nog vasgestel word. Ek was nie in staat om in hierdie studie 'n verhoogde  $K^+$  invloei by die H69/LX4 te demonstreer wat nie aan  $K^+$ -ATPase toegeskryf kan word nie, wat aandui dat P-gp nie  $Na^+,K^+$ -ATPase aktiwiteit besit nie. Verhoogde  $Na^+,K^+$ -ATPase aktiwiteit in H69/LX4 selle verteenwoordig 'n moontlike poging van die selle om membraan potensiaal te herstel. Chloried uitvloei deur P-gp (of enige ander metode van uitvloei) is wel 'n alternatiewe meganisme om membraan potensiaal te verlaag [Maftah *et al*, 1993; Guyton & Hall, 1996b].

Die nuwe TMP-gesubstitueerde fenasiene besit sitotoksiese en P-gp neutraliserings eienskappe wat superior tot die prototipe riminofenasiene, B663, is. Al vier riminofenasiene, insluitend B663 [Van Rensburg *et al*, 1996], het 'n verdere verlaging in die membraan potensiaal van beide sellyne, moontlik deur die effek wat dit op  $Na^+,K^+$ -ATPase aktiwiteit het [Hasmann *et al*, 1989], veroorsaak. Wat interessant is, is dat, ten spyte van die lipofilisiteit en sellulêre opname van die verbindings, blyk dit wel dat hulle membraan destabiliseringsaktiwiteit geassosieer is met hul verbeterde sitotoksiese en P-gp neutraliseringseienskappe. Hierdie verbeterde eienskappe word bepaal deur die teenwoordigheid van 'n TMP groep sowel as chlorinering van die gesubstitueerde groepe op posisie 3 en 10 van die fenasiene nukleus. Hierdie laaste modifikasie, wat afwesig was in B3962, verbeter die lipied oplosbaarheid van die riminofenasiene verbindings (J.F. O'Sullivan, University College, Dublin – persoonlike kommunikasie). Dit lyk dus of die TMP groep membraan destabilisasie verhoog.

Wat egter terleurstellend is, is dat die TMP-gesubstitueerde fenasiene, ten spyte van hulle verhoogde *in vitro* aktiwiteit bo B663 wat betref sitotoksisiteit en P-gp neutraliseringsaktiwiteit, minder indrukwekkend is as die eerste generasie riminofenasien (B663) wat betref serum vlakke, weefsel verspreiding en anti-tumor effektiwiteit. 'n Aansienlike hoeveelheid addisionele werk moet egter nog gedoen word, veral om die optimale oplosmiddel, roete van administrasie en dosis te bepaal.

## VERWYSINGS

AGINS BD, BERMAN DS, SPICEHANDLER D, EL-SADR W, SIMBERKOFF MS, RAHAL JJ. Effect of combined therapy with ansamycin, clofazimine, ethambutol, and isoniazid for *Mycobacterium avium* infection in patients with AIDS. *Journal of Infectious Diseases* 159: 784-787. **1989.**

AMBUDKAR SV, LELONG IH, ZHANG J, CARDARELLI CO, GOTTESMAN MM, PASTAN I. Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: Characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 8472 - 8476. **1992.**

AMES GF. Bacterial periplasmic transport systems: Structure, mechanism and evolution. *Annual Review of Biochemistry* 55: 397-425. **1986.**

ANDERSON R, ZEIS BM, ANDERSON IF. Clofazimine-mediated enhancement of reactive oxidant production by human phagocytes as a possible therapeutic mechanism. *Dermatologica* 176: 234-242. **1988.**

ANDERSON R, SMIT MJ. Clofazimine and B669 inhibit the proliferative responses and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> adenosine triphosphatase activity of human lymphocytes by a lysophospholipid-dependent mechanism. *Biochemical Pharmacology* 46: 2029-2038. **1993.**

ANDERSON R, THERON AJ, FELDMAN C. Membrane-stabilizing, anti-inflammatory interactions of macrolides with human neutrophils. *Inflammation* 20(6):693-705. **1996.**



ARCECI RJ, CROOP JM, HORWITZ SB, HOUSMAN D. The gene encoding multidrug resistance is induced and expressed at high levels during pregnancy in the secretory epithelium of the uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 4350-4354. **1988.**

ARSENAULT AL, LING V, KARTNER N. Altered plasma membrane ultrastructure in multidrug-resistant cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 938: 315-321. **1988.**

BARRY VC, BELTON JG, CONALTY ML, DENNENY JM, EDWARD DW, O'SULLIVAN JF, TWOMEY D, WINDER F. A new series of phenazines (rimino-compounds) with high antituberculosis activity. *Nature (London)* 179: 1013-1015. **1957.**

BARRY VC, CONALTY ML. The antimycobacterial activity of B663. *Leprosy Review* 36: 3-7. **1965.**

BECKER WM, DEAMER DW. The chemistry of the cell: The importance of selectively permeable membranes. *In: The world of the cell. Second edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Pp 24 - 31. 1991a.*

BECKER WM, DEAMER DW. Cells and organelles: The plasma membrane. *In: The world of the cell. Second edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Pp 83 - 85. 1991b.*

BECKER WM, DEAMER DW. Membranes: Their structure and chemistry. *In: The world of the cell. Second edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Pp 158 - 192. 1991c.*

BECKER WM, DEAMER DW. Transport across membranes: Overcoming the permeability barrier. *In: The world of the cell*. Second edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Pp 193-219. **1991d**.

BERGELSON LD, DYATLOVITSKAYA EV, TORKHOVSKAYA TI, SOROKINA IB, GORKOVA NP. Phospholipid composition of membranes in the tumor cell. *Biochimica et Biophysica Acta* 210: 287 - 298. **1970**.

BERGER SH, JEHN CH, JOHNSON LF, BERGER FG. Thymidylate synthase overproduction and gene amplification in fluorodeoxyuridine-resistant human cells. *Molecular Pharmacology* 28: 461- 467 . **1985**.

BIEDLER JL, RIEHM H, PETERSON RHF, SPENGLER BA. Membrane-mediated drug resistance and phenotypic reversion to normal growth behavior of Chinese hamster cells. *Journal of the National Cancer Institute* 55: 671-680. **1975**.

BOLHUIS H, VAN VEEN HW, MOLENAAR D, POOLMAN B, DRIESSEN AJM, KONINGS WN. Multidrug resistance in *Lactococcus lactis*: Evidence for ATP-dependent drug extrusion from the inner leaflet of the cytoplasmic membrane. *EMBO Journal* 15: 4239 - 4249. **1996a**.

BOLHUIS H, VAN VEEN HW, BRANDS JR, PUTMAN M, POOLMAN B, DRIESSEN AJM, KONINGS WN. Energetics and mechanism of drug transport mediated by the lactococcal MDR transporter LmrP. *Journal of Biological Chemistry* 271: 24123 - 24128. **1996b**.

BOLHUIS H, VAN VEEN HW, POOLMAN B, DRIESSEN AJ, KONINGS WN.

Mechanisms of multidrug transporters. *FEMS Microbiology Reviews* 21: 55-84. **1997.**

BORST P. DNA amplification and multidrug resistance. *Nature* 309: 580. **1984.**

BOSCOBOINIK D, DEBANNE MT, STAFFORD AR, JUNG CY, GUPTA RS, EPLAND RM. Dimerization of the P-glycoprotein in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1027: 225 - 228. **1990.**

BRADLEY G, GEORGES E, LING V. Sex-dependent and independent expression of the P-glycoprotein isoforms in Chinese hamster. *Journal of Cellular Physiology* 145: 398-408. **1990.**

BUCANA CD, GIAVAZZI R, NAYAR R, O'BRIAN CA, SEID C, EARNEST LE, FAN D. Retention of vital dyes correlates inversely with the multidrug-resistant phenotype of adriamycin-selected murine fibrosarcoma variants. *Experimental Cell Research* 190: 69-75. **1990.**

CHAN HS, THORNER PS, HADDAD G, LING V. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: Prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *Journal of Clinical Oncology* 8: 689-704. **1990.**

CHAN HS, DE BOER G, HADDAD G, GALLIE BL, LING V. Multidrug resistance in pediatric malignancies. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 9: 275-318. **1995.**



CHAUDHARY PM, RONINSON IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 66: 85-94. **1991**.

CHAUDHARY PM, MECHETNER EB, RONINSON IB. Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 80: 2735-2739. **1992**.

CHEN CJ, CHIN JE, UEDA K, CLARK DP, PASTAN I, GOTTESMAN MM, RONINSON IB. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47: 381 - 389. **1986**.

CHEN CJ, CLARK D, UEDA K, PASTAN I, GOTTESMAN MM, RONINSON IB. Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry* 265: 506 - 514. **1990**.

CHEN X, BASTOW K, GOZ B, KUCERA LS, MORRIS-NATSCHKE SL, ISHAQ KS. Synthesis and evaluation of novel thymidine analogs as antitumor and antiviral agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 39: 3412-3417. **1996**.

CHIN JE, SOFFIR R, NOONAN KE, CHOI K, RONINSON IB. Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein) gene family. *Molecular & Cellular Biology* 9: 3808-3820. **1989**.

CHIN K-V, CHAUHAN SS, ABRAHAM I, SAMPSON KE, KROLCZYK AJ, WONG M, SCHIMMER P, PASTAN I, GOTTESMAN MM. Reduced mRNA levels for the multidrug-resistance genes in cAMP-dependent protein kinase mutant cell lines. *Journal of Cellular Physiology* 152: 87-94. **1992**.

CHONG ASF, MARKHAM PN, GEBEL HM, BINES SD, COON JS. Diverse-multidrug-resistance-modification agents inhibit cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 36: 133-139. **1993.**

CLARKE AR, PURDIE CA, HARRISON DJ, MORRIS RG, BIRD CC, HOOPER ML, WYLLIE AH. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362: 849 - 852. **1993.**

COLEY HM, TWENTYMAN PR, WORKMAN P. Improved cellular accumulation is characteristic of anthracyclines which retain high activity in multidrug resistant cell lines, alone or in combination with verapamil or cyclosporin A. *Biochemical Pharmacology* 38: 4467-4475. **1989.**

CROOP JM. P-glycoprotein structure and evolutionary homologies. *In: Multiple drug resistance in cancer: Cellular, molecular and clinical approaches.* (Reprinted from *Cytotechnology*, volume 12, 1993). Clynes M, ed. Kluwer Academic Publishers. Pp 1-32. **1994.**

DANO K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 323: 466 - 483. **1973.**

DEN BOER ML, PIETERS R, KAZEMIER KM, ROTTIER MM, ZWAAN CM, KASPERS GJ, JANKA-SCHAUB G, HENZE G, CREUTZIG U, SCHEPER RJ, VEERMAN AJ. Relationship between major vault protein/lung resistance protein, multidrug resistance-associated protein, P-glycoprotein expression, and drug resistance in childhood leukemia. *Blood* 91: 2092-2098. **1998.**

DESIKAN KV, BALAKRISHNAN S. Tissue levels of clofazimine in case of leprosy.

*Leprosy Review* 47: 107 - 113. **1976.**

DOIGE CA, YU X, SHAROM FJ. The effects of lipids and detergents on ATPase-active P-glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1146: 65-72. **1993.**

DRACH D, ZHAO S, DRACH J, MAHADEVIA R, GATTRINGER C, HUBER H, ANDREEFF. Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype. *Blood* 80: 2729-2734. **1992.**

DURANDT C, VAN RENSBURG CEJ, THERON AJ, CHASEN M. Novel riminophenazine compounds with improved anti-tumour properties. *South-African Journal of Sciences* 92: 257-259. **1996.**

DURANDT C. Immuunregulerende, anti-mikrobiëse en anti-tumor aktiwiteit van nuwe riminofenasiene. Voorgelê te vervulling van die vereistes vir die graad M.Sc (Geneeskundige Immunologie), Universiteit van Pretoria. **1994.**

ENDICOTT JA, LING V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annual Review of Biochemistry* 58: 137-171. **1989.**

EWIG RAG, KOHN KW. DNA damage and repair in mouse leukemia L1210 cells treated with nitrogen mustard, 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, and other nitroureas. *Cancer Research* 37: 2114 - 2122. **1977.**



EYTAN GD, REGEV R, ASSARAF YG. Functional reconstitution of P-glycoprotein reveals an apparent near stoichiometric drug transport to ATP hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry* 271: 3172 - 3178. **1996.**

FAN D, BELTRAN PJ, O'BRIAN CA. Reversal of multidrug resistance. *In: Reversal of multidrug resistance in cancer.* Kellen JA, ed. CRC Press. Pp 93-125. **1994.**

FERTE J. Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *European Journal of Biochemistry* 267(2): 277-294. **2000**

FINK D, NEBEL S, NORRIS PS, KIM HK, HAAS M, HOWELL SB. The effect of different chemotherapeutic agents on the enrichment of DNA mismatch repair-deficient tumour cells. *British Journal of Cancer* 77: 703-708. **1998.**

FOJO AT, WHANG-PENG J, GOTTESMAN MM, PASTAN I. Amplification of DNA sequences in human multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the of the United States of America* 82: 7661-7665. **1985.**

FOJO AT, UEDA K, SLAMON DJ, POPLACK DG, GOTTESMAN MM, PASTAN I. Expression of multidrug resistance gene in human tumors and tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the of the United States of America* 84: 265-269. **1987.**

FORD JM, HAIT WN. Pharmacologic circumvention of multidrug resistance. *In: Multiple drug resistance in cancer: Cellular, molecular and clinical approaches.* (Reprinted from *Cytotechnology*, volume 12, 1993). Clynes M, ed. Kluwer Academic Publishers. Pp 171-212. **1994.**

FORD JM. Modulators of multidrug resistance: Preclinical studies. *Hematology/ Oncology Clinics of North America* 9: 337-361. **1995.**

FORD JM. Experimental reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by pharmacological chemosensitisers. *European Journal of Cancer* 32A: 991 - 1001. **1996.**

FORD JM, YANG J-M, HAIT WN. P-glycoprotein-mediated multidrug resistance: Experimental and clinical strategies for its reversal. *In: Drug resistance. Hait WN, ed. Cancer Treatment and Research. Freireich EJ, Series Editor. Kluwer Academic Publishers. Pp 3-38. 1996.*

FRANZBLAU SG, WHITE KE, O'SULLIVAN JF. Structural-activity relationships of tetramethylpiperidine-substituted phenazines against *Mycobacterium leprae in vitro*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 33: 2004 - 2005. **1989.**

FREUND JE, SIMON GA. The coefficient of correlation. *In: Statistics: A first course. Sixth edition. Prentice Hall, Inc. Pp. 461 – 467. 1995.*

FRICHE E, DEMANT EJ, SEHESTED M, NISSEN NI. Effect of anthracycline analogs on photolabelling of P-glycoprotein by [<sup>125</sup>I]iodomycin and [<sup>3</sup>H]azidopine: Relation to lipophilicity and inhibition of daunorubicin transport in multidrug resistant cells. *British Journal of Cancer* 67: 226-231. **1993.**

GANONG WF. Circulating Body Fluids: Red Blood Cells. *In: Review of Medical Physiology. Fifteenth Edition. Appleton & Lange. Pp 490 – 492. 1991.*

GARRELTS JC. Clofazimine: A review of its use in leprosy and *Mycobacterium avium* complex infection. *DICP* 25: 525-531. **1991**.

GARRIGOS M, MIR LM, ORLOWSKI S. Competitive and non-competitive inhibition of the multidrug-resistance-associated P-glycoprotein ATPase: Further Experimental evidence for a multisite model. *European Journal of Biochemistry* 244: 664-673. **1997**.

GERLACH JH, KARTNER N, BELL DR, LING V. Multidrug resistance. *Cancer Surveys* 5: 25-46. **1986a**.

GERLACH JH, ENDICOTT JA, JURANKA PF, HENDERSON G, SARANGI F, DEUCHARS KL, LING V. Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* 324: 485-489. **1986b**.

GERLACH JH. Structure and function of P-glycoprotein. *In: Drug resistance in cancer therapy*. Ozols RF, ed. Kluwer Academic Publishers. Pp 37-53. **1989**.

GERMANN UA. Molecular analysis of the multidrug transporter. *In: Multiple drug resistance in cancer: Cellular, molecular and clinical approaches* (Reprinted from *Cytotechnology*, volume 12, 1993). Clynes M, ed. Kluwer Academic Publishers. Pp 33 - 62. **1994**.

GILL DR, HYDE S, HIGGINS CF, VALVERDE MA, MINTENIG GM, SEPULVEDA FV. Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Cell* 71: 23 - 32. **1992**.



GOASGUEN JE, DOSSOT J-M, FARDEL O, LE MEE F, LE GALL E, LEBLAY R, LEPRISE PY, CHAPERON J, FAUCHET R. Expression of the multidrug resistance-associated P-glycoprotein (P-170) in 59 cases of *de novo* acute lymphoblastic leukemia: Prognostic Implications. *Blood* 81: 2394 - 2398. **1993**.

GOLDSTEIN LJ, GALSKI H, FOJO A, WILLINGHAM M, LAI S-L, GAZDAR A, PIRKER R, GREEN A, CRIST W, BRODEUR GM, LIEBER M, COSSMAN J, GOTTESMAN MM, PASTAN I. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 81: 116-124. **1989**.

GOLDSTEIN LJ. Clinical reversal of drug resistance. *Current Problems in Cancer* 19: 65 - 124. **1995**.

GOSLAND MP, VORE M, GOODIN S, TSUBOI C. Estradiol-17 $\beta$ -( $\beta$ -D-glucuronide): a cholestatic organic anion and substrate for the multidrug resistance transporter. *Proceedings of the American Association of Cancer Research* 34: 1842. **1993**.

GOTTESMAN MM, PASTAN I. The multidrug transporter, a double-edged sword. *Journal of Biological Chemistry* 263: 12163-12166. **1988**.

GOTTESMAN MM. How cancer cells evade chemotherapy: Sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Research* 53: 747 - 754. **1993**.

GOTTESMAN MM, PASTAN I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual Review of Biochemistry* 62: 385 - 427. **1993**.

GOTTESMAN MM, PASTAN I, AMBUDKAR SV. P-glycoprotein and multidrug resistance. *Current Opinion in Genetics & Development* 6: 610-617. **1996.**

GREENBERGER LM, LOTHSTEIN L, WILLIAMS SS, HORWITZ SB. Distinct P-glycoprotein precursors are overproduced in independently isolated drug-resistant cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 3762 - 3766. **1988.**

GROS P, CROOP J, HOUSMAN D. Mammalian multidrug resistance gene: Complete cDNA sequence indicates homology to bacterial transport proteins. *Cell* 47: 371 - 380. **1986.**

GRUBER A, VITOLS S, NORGREN S, ARESTROM I, PETERSON C, BJORKHOLM M, REISENSTEIN P, LUTHMAN H. Quantitative determination of *mdr1* gene expression in leukaemic cells from patients with acute leukemia. *British Journal of Cancer* 66: 266-272. **1992.**

GUYTON AC, HALL JE. The cell and its function. *In: Textbook of medical physiology.* Ninth edition. WB Sanders Company. Pp 11-14. **1996a.**

GUYTON AC, HALL JE. Transport of ions and molecules through the cell membrane. *In: Textbook of medical physiology.* Ninth edition. WB Sanders Company. Pp 43-55. **1996b.**

HARRISON DJ. Molecular mechanisms of drug resistance in tumours. *Journal of Pathology* 175: 7-12. **1995.**

HASMANN M, VALET GK, TAPIERO H, TREVORROW K, LAMPIDIS T. Membrane potential differences between adriamycin-selected and -resistant cells as measured by flow cytometry. *Biochemical Pharmacology* 38: 305-312. **1989**.

HIGGINS CF, GOTTESMAN MM. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends in Biochemical Sciences* 17: 18-22. **1992**.

HILGARD P, STEKAR J, VOEGELI R, ENGEL J, SHUMACKER W, EIBL H, UNGER C, BERGER MR. Characterization of the anti-tumor activity of hexadecylphosphocholine (D18506). *European Journal of Cancer & Clinical Oncology* 24: 1457 - 1461. **1988**.

HIPFNER DR, DEELEY RG, COLE SP. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochimica et Biophysica Acta* 1461(2): 359 – 376. **1999**.

HOLZMAYER TA, HILSENBECK S, VON HOFF DD, RONINSON IB. Clinical correlates of MDR1 (P-glycoprotein) gene expression in ovarian and small-cell lung carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute* 84: 1486-1491. **1992**.

HOMOLYA L, HOLLO Z, GERMANN UA, PASTAN I, GOTTESMAN MM, SARKADI I. Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein. *Journal of Biological Chemistry* 268: 21493 - 21496. **1993**.

HUDGINS WR, SHACK S, MYERS CE, SAMID D. Cytostatic activity of phenylacetate and derivatives against tumor cells: Correlation with lipophilicity and inhibition of protein penylation. *Biochemical Pharmacology* 50: 1273-1279. **1995**.



IWADATE Y, TAGAWA M, FUJIMOTO S, HIROSE M, NAMBA H, SUEYOSHI K, SAKIYAMA S, YAMAURA A. Mutation of the p53 gene in human astrocytic tumours correlates with increased resistance to DNA-damaging agents but not to anti-microtubule anti-cancer agents. *British Journal of Cancer* 77: 547-551. **1998**.

JOHNSON AG. Correlation: How strong is the relationship? *In: Statistics*. Merton RK, ed. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers. Pp. 171 – 180. **1988**.

JULIANO RL, LING V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* 455: 152-162. **1976**.

KAGAN VE. Tocopherol stabilizes membranes against phospholipase A, free fatty acids and lysophospholipids. *Annals of the New York Academy of Sciences* 570: 121-135. **1989**.

KELLEN JA. Multidrug resistance: Introduction. *In: Reversal of multidrug resistance in cancer*. Kellen JA, ed. CRC Press. Pp 1-19. **1994**.

KESSEL D, BOTTERILL V, WODINSKY I. Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response. *Cancer Research* 28: 938-941. **1968**.

KESSEL D, BECK WT, KUKURUGA D, SCHULTZ V. Characterization of multidrug resistance by fluorescent dyes. *Cancer Research* 51: 4665 - 4670. **1991**.

KRAJEWSKA MM, ANDERSON R. An *in vitro* comparison of the effects of the prooxidative riminophenazines clofazimine and B669 on neutrophil phospholipase A<sub>2</sub> activity and superoxide generation. *Journal of Infectious Diseases* 167: 899-904. **1993**.

LABROILLE G, BELLOC F, BILHOU-NABERA C, BONNEFILLE S, BASCANS E, BOISSEAU MR, BERNARD P, LECOMBE F. Cytometric study of intracellular P-gp expression and reversal of drug resistance. *Cytometry* 32:86 – 94. **1998**.

LATHAM PM. The pharmacokinetics basis of therapeutics. *In: Pharmacology: An illustrated review with questions and explanations*. Third edition. Ebadi M, ed. Little, Brown and Company. Pp 3-12. **1996**.

LIJNEN P, HUYSECOM J, FAGARD P, STAESSEN J, AMERY A. Inhibition of human erythrocyte and leucocyte Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-pump activity by lysophosphatidylcholines. *Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology* 12: 281-286. **1990**.

LING V, THOMPSON LH. Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *Journal of Cellular Physiology* 83: 103-116. **1974**.

LIU C, QURESHI IA, DING X-J, SHAN Y-F, HUANG Y-W, XIE Y, JI MR. Modulation of multidrug resistance gene (*mdr1*) with antisense oligodeoxynucleotides. *Clinical Science* 91: 93 - 98. **1996**.

LOO TW, CLARKE DM. Merck Frost Award Lecture 1998. Molecular dissection of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Biochemistry & Cell Biology* 77(1): 11 – 23. **1999**

LUDESCHER C, PALL G, IRSCHICK EU, GASTL G. Differential activity of P-glycoprotein in normal blood lymphocytes subsets. *British Journal of Haematology* 101:722 – 727. **1998**.

LUM BL, GOSLAND MP, KAUBISCH S, SIKIC BI. Molecular targets in oncology: Implications of the multidrug resistance gene. *Pharmacotherapy* 13: 88-109. **1993**.

MAFTAH A, HUET O, GALLET P-F, RATINAUD M-H. Flow cytometry's contribution to the measurement of cell functions. *Biology of the Cell* 78: 85 - 93. **1993**.

MALORNI W, LUCIA MB, RAINALDI G, CAUDA R, CIANFRIGLIA M, DONELLI, G, ORTONA, L. Intracellular expression of P-170 glycoprotein in peripheral blood mononuclear cell subsets from healthy donors and HIV-infected patients. *Haematologica* 83:13 – 20. **1998**.

MARIE J-P, ZITTOUN R, SIKIC PI. Multidrug resistance (*mdr1*) gene expression in adult acute leukemias: Correlations with treatment outcome and *in vitro* drug sensitivity. *Blood* 78: 586 - 592. **1991**.

MARIE JP, LEGRAND O. MDR1/P-gp expression as a prognostic factor in acute leukemias. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 457: 1 – 9. **1999**

MARSH W, SICHERI D, CENTER MS. Isolation and characterization of adriamycin-resistant HL60 cells which are not defective in the initial intracellular accumulation of drug. *Cancer Research* 46: 4055 - 4057. **1986**.

MASCELLINO MT, IONA E, FATTORINI L, DE GREGORIS P, HU CQ, SANTORO C, OREFICI G. *In vitro* activity of clarithromycin alone or in combination with other micobacterial agents against *Mycobacterium avium-intracellulare* complex strains isolated from AIDS patients. *Journal of Chemotherapy* 3: 357-362. **1991**.



McPHAIL LC, CLAYTON CL, SNYDERMAN RA. A potential messenger role for unsaturated fatty acids: Activation of  $Ca^{2+}$ -dependent protein kinase. *Science* 224: 622-625. **1984.**

MECHETNER E, KYSHTOOBAYEVA A, ZONIS S, KIM H, STROUP R, GARCIA R, PARKER RJ, FRUEHAUF JP. Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with *in vitro* resistance to taxol and doxorubicin. *Clinical Cancer Research* 4:389 – 398. **1998.**

MOORE VJ. A review of side-effects experienced by patients taking clofazimine. *Leprosy Review* 54: 327-335. **1983.**

MORROW CS, COWAN KH. Glutathion-S-transferases and drug resistance. *Cancer Cells* 2: 15 - 22. **1990.**

MOSSMAN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Applications to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 37-64. **1983.**

MYER MS, VAN RENSBURG CEJ. Chemosensitizing interactions of clofazimine and B669 with human K562 erythroleukaemia cells with varying levels of expression of P-glycoprotein. *Cancer Letter* 99: 73-78. **1996.**

NABORS MW, GRIFFIN CA, ZEHNBAUER BA, HRUBAN RH, PHILLIPS PC, GROSSMAN SA, BREM H, COLVIN OM. Multidrug resistance gene expression in human brain tumors. *Journal of Neurosurgery* 75: 941-946. **1991.**

NAITO M, TSURUO T. Functionally active homodimer of P-glycoprotein in multidrug-resistant tumor cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 185: 284-290. **1992.**

NEBERT DW, NELSON DR, COON MJ, ESTABROOK RW, FEYEREISEN R, FUNJII-KURIYAMA Y, GOZALEZ FJ, GUENGERICH FP, GUNSALUS IC, JOHNSON EF. The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping and recommended nomenclature. *DNA & Cell Biology* 10: 1-14. **1991.**

NOOTER K, HERWEIJER H. Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer. *British Journal of Cancer* 63: 663-669. **1991.**

NUNBERG JH, KAUFMAN RJ, SCHIMKE RT, URLAUB G, CHASIN LA. Amplified dihydrofolate reductase genes are localized to a homogeneously staining region in a single chromosome in a methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75: 5553 - 5556. **1978.**

O'CONNOR R, O' SULLIVAN JF, O'KENNEDY R. The pharmacology, metabolism and chemistry of clofazimine. *Drug Metabolism Reviews* 27: 591-614. **1995.**

O'CONNOR R, O'SULLIVAN JF, O'KENNEDY R. Determination of serum and tissue levels of phenazines including clofazimine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* 681: 307 - 315. **1996.**

OISHI K, RAYNOR RL, CHARP PA, KUO JF. Regulation of protein kinase C by lysophospholipids: Potential role in signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* 263: 6865-6871. **1988.**

OISHI K, ZHENG B, KUO JF. Inhibition of Na, K-ATPase and sodium pump by protein kinase C regulators sphingosine, lysophosphatidylcholine and oleic acid. *Journal of Biological Chemistry* 265: 70-75. **1990**.

OKUDA K, OBATA H, NAKAJIMA Y, OHTSUKI T, OKAZAKI N, ONHISHI K. Prognosis of primary hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 4: 3S-6S. **1984**.

PAJEVA IK, WIESE M, CORDES HP, SEYDEL JK. Membrane interactions of some catamphilic drugs and relation to their multidrug-resistance-reversing ability. *Journal of Cancer Research & Clinical Oncology* 122: 27 - 40. **1996**.

PALLARES-TRUJILLO J, LOPEZ-SORIANO FJ, ARGILES JM. Lipids: A key role in multidrug resistance? *International Journal of Oncology* 16(4): 783-798. **2000**

PARK GD. Pharmacokinetics. *In: The scientific basis of clinical pharmacology: Principles and examples*. Spector R, ed. Little, Brown and Company. Pp 67-12. **1986**.

PEARSON CK, CUNNINGHAM C. Multidrug resistance during cancer chemotherapy - biotechnological solutions to a clinical problem. *Trends in Biotechnology* 11: 511-516. **1993**.

PICHÉ A, GRIM J, RANCOURT C, GÓMEZ-NAVARRO J, REED JC, CURIEL DT. Modulation of Bcl-2 protein levels by an intracellular anti-Bcl-2 single-chain antibody increases drug-induced cytotoxicity in the breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Research* 58: 2134-2140. **1998**.



PIRKER R, WALLNER J, GEISSLER K, LINKESH W, HAAS CA, BETTELHEIM P, HOPFNER M, SCHERRER R, VALENT P, HAVELEC L, *et al.* MDR1 gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Journal of the National Cancer Institute* 83: 708-712. **1991.**

PRATT WB, RUDDON RW, ENSMINGER WD, MAYBAUM J. The cancer problem. *In: The anticancer drugs. Second edition. Oxford University Press. Pp 3-16. 1994a.*

PRATT WB, RUDDON RW, ENSMINGER WD, MAYBAUM J. Resistance to anticancer drugs. *In: The anticancer drugs. Second edition. Oxford University Press. Pp 50 - 66. 1994b.*

RABINOVITCH PS, JUNE CH. Intracellular ionized calcium, membrane potential and pH. *In: Flow cytometry: A clinical approach. Ormerod MG, ed. IRL Press, Oxford University Press. Pp 161-185. 1990.*

RAVIV Y, POLLARD HB, BRUGGEMANN EP, PASTAN I, GOTTESMAN MM. Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells. *Journal of Biological Chemistry* 265: 3975 - 3980. **1990.**

RAYMOND M, GROS P. Mammalian multidrug-resistance gene: Correlation of exon organization with structural domains and duplication of an ancestral gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 6488 - 6492. **1989.**

RAYMOND M, ROSE E, HOUSMAN D, GROS P. Physical mapping, amplification and overexpressing of the mouse *mdr* gene family in multidrug resistant cells. *Molecular & Cellular Biology* 10: 1642-1651. **1990.**

REED JC. BCL-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance.

*Hematology/Oncology Clinics of North America* 9: 451 - 473. **1995**.

RIORDAN JR, LING V. Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *Journal of Biological Chemistry* 254: 12701 - 12705. **1979**.

RISCHIN D, LING V. Multidrug resistance in leukemia. *Cancer Treatment & Research* 64: 269- 293. **1993**.

RIVORY LP, AVENT KM, POND SM. Effects of lipophilicity and protein binding on the hepatocellular uptake and hepatic disposition of two anthracyclines, doxorubicin and iododoxorubicin. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology* 38: 439-445. **1996**.

ROBINSON LJ, ROEPE PD. Effects on membrane potential versus  $pH_i$  on the cellular retention of doxorubicin analyzed via a comparison between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CTR) and multidrug resistance (MDR) transfectants. *Biochemical Pharmacology* 52: 1081 - 1095. **1996**.

ROEPE PD. The role of the MDR protein in altered drug translocation across tumor cell membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1241: 385-405. **1995**.

RUFF P, CHASEN MR, VAN RENSBURG CEJ. A phase II study of oral clofazimine in unresectable and metastatic hepatocellular carcinoma. *Annals of Oncology* 9: 217-219. **1998**.

SARKADI B, PRICE EM, BOUCHER RC, GERMANN UA, SCARBOROUGH GA. Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 267: 4854 - 4858. **1992.**

SAVAGE JE, O'SULLIVAN JF, ZEIS BM, ANDERSON R. Investigation of structural properties of dihydrophenazines which contribute to their pro-oxidative interactions with human phagocytes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 23: 691-700. **1989.**

SCAGLIOTTI GV, NOVELLO S, SELVAGGI G. Multidrug resistance in non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology* 10 Suppl 5: S83 -86. **1999**

SCHEPER RJ, SCHEFFER GL, FLENS MJ, VAN DER VALK P, BROXTERMAN HJ, IZQUIERDO MA. Transporter molecules in multidrug resistance. *Cytotechnology* 19: 187 - 190. **1996.**

SCHINKEL AH. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Seminars in Cancer Biology* 8: 161-170. **1997.**

SCHINKEL AH. Pharmacological insights from P-glycoprotein knockout mice. *International Journal of Clinical Pharmacology & Therapeutics* 36: 9-13. **1998.**

SCHLUESENER HJ, KOEPEL C, JUNG S. Multidrug transport in human autoimmune T line cells and peripheral blood lymphocytes. *Immunopharmacology* 23: 37-48. **1992.**

SCHOENLEIN PV. Molecular cytogenetics of multiple drug resistance. *In: Multiple drug resistance in cancer: Cellular, molecular and clinical approaches.* (Reprinted from *Cytotechnology*, volume 12, 1993). Clynes M, ed. Kluwer Academic Publishers. Pp 63-89. **1994.**



SCHWARTZMANN G, CERSKI CT, SANDER E, SPRINZ E, KRONFELD M. P-glycoprotein expression in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Journal of the National Cancer Institute* 81: 1755 - 1756. **1989**.

SEHESTED M, SIMPSON D, SKOVSGAARD T, BUHL-JENSON P. Freeze-fracture study of plasma membranes in wild type and daunorubicin-resistant Ehrlich ascites tumor and P388 leukemia cells. *Virchows Archiv. B. Cell Pathology Including Molecular Pathology* 56: 327-335. **1989**.

SHAPIRO HM. Cell membrane potential analysis. *In: Methods of cell biology: Flow cytometry*. Darzynkiewicz Z, Crissman HA, ed. Academic Press Inc. Pp 25-35. **1990**.

SHAPIRO AB, LING V. Using purified P-glycoprotein to understand multidrug resistance. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes* 27: 7 - 13. **1995**.

SHAPIRO AB, FOX K, LEE P, YANG YD, LING V. Functional intracellular P-glycoprotein. *International Journal of Cancer* 76: 857 - 864. **1998**.

SHAROM FJ, LIU R, ROMSICKI Y, LU P. Insights into the structure and substrate interactions of the P-glycoprotein multidrug transporter from spectroscopic studies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1461(2): 327 - 345. **1999**.

SIKIC BI, FISHER GA, LUM BL, HALSEY J, BEKETIC-ORESKOVIC L, CHEN G. Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology* 10(Supplement): S13 - S19. **1997**.

SINICROPE FA, DUDEJA PK, BISSONNETTE BM, SAFA AR, BRASITUS TA. Modulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by alterations in lipid fluidity of rat liver canalicular membrane vesicles. *Journal of Biological Chemistry* 267: 24995-25002. **1992.**

SIROTNAK FM, YANG CH, MINES LS, ORIBE E, BIEDLER JL. Markedly altered membrane transport and intracellular binding of vincristine in multidrug-resistant Chinese hamster cells selected for resistance to vinca alkaloids. *Journal of Cellular Physiology* 126: 266 - 274. **1986.**

SKACH WR, CALAYAG MC, LINGAPPA VR. Evidence for an alternate model of human P-glycoprotein structure and biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 268: 6903-6908. **1993.**

SKOVSGAARD T. Mechanisms of resistance to daunorubicin in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Research* 38: 1785 - 1791. **1978a.**

SKOVSGAARD T. Mechanism of cross-resistance between vincristine and daunomycin in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Research* 38: 4722 - 4727. **1978b.**

SONNEVELD P, WIEMER E. Inhibitors of multidrug resistance. *Current Opinion in Oncology* 9: 543 - 548. **1997.**

SPEEG KV, DELEON C, McGUIRE WL. Uptake of the noncytotoxic transport probe prokainamide in the Chinese hamster ovary model of multidrug resistance. *Cancer Research* 52: 3539-3546. **1992.**

STAVROVSKAYA AA. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Moscow)* 65(1): 95-106. **2000**.

SUGAWARA I, NAKAHAMA M, HAMADA H, TSURUO T, MORI S. Apparent stronger expression in the human adrenal cortex than in the human adrenal medulla of Mr 170,000 - 180,000 P-glycoprotein. *Cancer Research* 48: 4611-4614. **1988**.

TANNER MK, WELLHAUSEN SR. Flow cytometric detection of fluorescent redistributional dyes for measurement of cell transmembrane potential. *In: Methods in molecular biology: Volume 91: Flow cytometric protocols*. Jaroszeski MJ, Heller R, ed. Humana Press. Pp 85 - 95. **1998**.

TILLEMENT JP, HOUIN G, ZIN R, URIEN S, ALBENGRES E, BARRE J, LECOMTE M, D'ATHIS P, SEBILLE B. The binding of drugs to biological macromolecules in plasma. *Advances in Drug Research* 13: 59-94. **1984**.

TISHLER DM, WEINBERG KI, SENDER LS, NOLTA JA, RAFFEL C. Multidrug resistance gene expression in pediatric primitive neuroectodermal tumor of the central nervous system. *Journal of Neurosurgery* 76: 507-512. **1992**.

TSURUO T, IIDA H, TSUKAGOSHI S, SAKURAI Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Research* 41: 1967-1972. **1981**.

TSURUO T. Circumvention of drug resistance with calcium channel blockers and monoclonal antibodies. *In: Drug resistance in cancer therapy*. Ozols RF, ed. Kluwer Academic Publishers. Pp 73-95. **1989**.



TWENTYMAN PR, FOX NE, WRIGHT KA, BLEEHEN NM. Derivation and preliminary characterisation of adriamycin resistant lines of human lung cancer cells. *British Journal of Cancer* 53: 529-537. **1986.**

TWENTYMAN PR, WRIGHT KA, WALLACE HM. Effects of cyclosporin A and a non-immunosuppressive analogue, O-acetyl cyclosporin A, upon the growth of parent and multidrug resistant human lung cancer cells *in vitro*. *British Journal of Cancer* 65: 335-340. **1992.**

TWENTYMAN PR. Transport proteins in drug resistance: Biology and approaches to circumvention. *Journal of Internal Medicine. Supplement.* 740: 133-137. **1997.**

UEDA K, OKAMURA N, HIRAI M, TANIGAWARA Y, SAEKI T, KIOKA N, KOMANO T, HORI R. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *Journal of Biological Chemistry* 267: 24248-24252. **1992.**

VAN DEN HEUVEL-EIBRINK MM, SONNEVELD P, PIETERS R. The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins in leukemia. *International Journal of Clinical Pharmacology & Therapeutics* 38(3):94-110. **2000**

VAN DER BLIEK AM, BAAS F, VAN DER VELDE-KOERTS T, BIEDLERS JL, MEYERS MB, OZOLS RF, HAMILTON TC, JOENJE H, BORST P. Genes amplified and overexpressed in human multidrug-resistant cell lines. *Cancer Research* 48: 5927-5932. **1988.**

VAN RENSBURG CEJ, VAN STADEN AM, ANDERSON R. The riminophenazine agents clofazimine and B669 inhibit the proliferation of cancer cell lines *in vitro* by phospholipase A<sub>2</sub>-mediated oxidative and non-oxidative mechanisms. *Cancer Research* 53: 318-323. **1993a**.

VAN RENSBURG CEJ, DURANDT C, GARLINSKI PJ, O'SULLIVAN JF. Evaluation of the antineoplastic activities of the riminophenazine agents clofazimine and B669 in tumor-bearing rats and mice. *International Journal of Oncology* 3: 1011-1013. **1993b**.

VAN RENSBURG CEJ, ANDERSON R, MYER MS, JOONE GK, O'SULLIVAN JF. The riminophenazine agents clofazimine and B669 reverse acquired multidrug resistance in a human lung cancer cell line. *Cancer Letters* 85: 59-63. **1994**.

VAN RENSBURG CEJ, THERON AJ, CHASEN M. The riminophenazine agents clofazimine and B669 inhibit the proliferation of intrinsically multidrug resistant carcinoma cell lines. *Oncology Report* 3: 103-106. **1996**.

VAN RENSBURG CEJ, ANDERSON R, O'SULLIVAN JF. Riminophenazine compounds: Pharmacology and anti-neoplastic potential. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 25: 55-67. **1997**.

VOET D, VOET JC. Lipid metabolism. *In: Biochemistry*. Second edition. John Wiley & Sons. Pp 662-728. **1995a**.

VOET D, VOET JC. Lipids and membranes. *In: Biochemistry*. Second edition. John Wiley & Sons. Pp 277-329. **1995b**.

VOET D, VOET JC. Transport through membranes. *In: Biochemistry*. Second edition. John Wiley & Sons. Pp 513-537. **1995c**.

VOET D, VOET JC. Life. *In: Biochemistry*. Second edition. John Wiley & Sons, Inc. Pp 2-28. **1995d**.

WADKINS RM, ROEPE PD. Biophysical aspects of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Internal Review of Cytology* 171: 121 - 165. **1997**.

WALKER JE, SARASTE M, RUNSWICK MJ, GAY NJ. Distantly related sequences in the a and b subunits of ATP synthetase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO Journal* 1: 945 - 951. **1982**.

WEISS SJ, SLIVKA A. Monocytes and granulocytes-mediated tumor cell destruction. *Journal of Clinical Investigations* 69: 255-262. **1982**.

WOLF DC, HORWITZ SB. P-glycoprotein transports corticosterone and is photoaffinity-labeled by the steroid. *International Journal of Cancer* 52: 141-146. **1992**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly Epidemiological Report 62: 101-108. **1987**.

WRIGHT LC, DYNE M, HOLMES KT, MOUNTFORD CE. Phospholipid content and ether linked phospholipid content alter with cellular resistance to vinblastine. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 133: 539-545. **1985**.



YAWALKAR SJ, VISCHER W. Lamprene (clofazimine) in leprosy. *Leprosy Review* 50: 135-144. **1979**.

YOUNG RC. Drug resistance: The clinical problem. *In: Drug resistance in cancer therapy*. Ozols RF, ed. Kluwer Academic Publishers. Pp 1-12. **1989**.

ZEIS BM, ANDERSON R. Clofazimine-mediated stimulation of prostaglandin synthesis and free radical production as a novel mechanism of drug-induced immunosuppression. *International Journal of Immunopharmacology* 8: 731-739. **1986**.

ZHANG J-T, LING V. Study of membrane orientation and glycosylated extracellular loops of mouse P-glycoprotein by *in vivo* translation. *Journal of Biological Chemistry* 266: 18224 - 18232. **1991**.

ZHANG J-T, DUTHIE M, LING V. Membrane topology on the N-terminal half of the hamster P-glycoprotein molecule. *Journal of Biological Chemistry* 268: 15101-15110. **1993**.

## ADDENDUM A

### PEARSON KORRELASIES

#### 1. Doelwit

In hierdie byvoegsel is die verskillende eksperimentele bepalings met mekaar vergelyk, om uit te vind tot watter mate die veranderlikes in een bepaling die veranderlikes in die ander bepalings beïnvloed het.

#### 2. Inleiding

Die korrelasie koëffisiënt ( $r$ ) word gebruik om die verband tussen twee reekse veranderlikes te bepaal. Die rigting en grootte van die korrelasie tussen die twee reekse veranderlikes word deur  $r$  gekwantifiseer [Johnson, 1988; Freund & Simon, 1995].

Die waarde van  $r$  varieer tussen  $-1.0$  en  $1.0$ . Indien  $r = 0$  is, dui dit daarop dat daar geen korrelasie tussen die veranderlikes, waargeneem is nie. Indien  $r$  'n positiewe waarde besit, dui dit daarop dat die twee veranderlikes wat met mekaar vergelyk word, gesamentlik toeneem of afneem. Indien  $r = +1.0$  is, dui dit daarop dat die data 'n perfekte reguit lyn, met 'n opwaartse (positiewe helling), vorm. Daarenteen dui  $r = -1.0$  daarop dat die data 'n perfekte reguit lyn, met 'n afwaartse (negatiewe) helling, vorm. 'n Negatiewe waarde van  $r$  dui daarop dat die een veranderlike toegeneem het, terwyl die ander veranderlike afgeneem het [Johnson, 1988; Freund & Simon, 1995]. Afhangende van die waarde van  $r$ , kan die korrelasie tussen twee reekse veranderlikes as 'n sterk korrelasie, matige korrelasie of swak korrelasie geïnterpreteer word. Dit is egter 'n baie objektiewe wyse van interpretering. Verder beteken 'n betekenisvolle  $r$ -waarde nie noodwendig dat die data wat met mekaar vergelyk is, lineêr met mekaar korreleer nie [Freund & Simon, 1995].

Die verband (korrelasie) tussen twee veranderlikes kan meer duidelik gekwantifiseer word, indien die  $r^2$  bepaal word. Dit staan as die koëffisiënt van bepaling ("correlation of determination") bekend. Die waarde van  $r^2$  wissel tussen  $0$  en  $1$  en dui die sterkte van die

linieëre korrelasie tussen die veranderlikes aan [Johnson, 1988]. Byvoorbeeld, indien  $r^2 = 0.59$  is, dui dit daarop dat 59% van die variasie in die een veranderlike (X) direk lineêr verband hou met die waargeneemde variasie van die tweede veranderlike (Y) of dat 59% van die variasie in Y direk lineêr verband hou met die waargeneemde variasie in X [Freund & Simon, 1995].

In hierdie addendum is die koeffisiënt van bepaling ( $r^2$ -waarde) in tabel vorm opgesom. Die  $r^2$ -waardes is in drie groepe verdeel, naamlik sterk korrelasies ( $r^2 \geq 0.8$ ), matige korrelasies ( $0.8 > r^2 \geq 0.6$ ) en swak korrelasies ( $0.6 > r^2 \geq 0.4$ ). Die ooreenstemmende  $r$ -waarde is in hakies onder elk van bogenoemde  $r^2$ -waardes aangedui. Hierdie  $r$ -waarde toon of 'n positiewe of negatiewe korrelasie waargeneem is. Om interpretering van die resultate te vergemaklik, is bogenoemde drie groepe korrelasies as volg in die tabelle aangedui. Die  $p$ -waarde sowel as die aantal punte wat met mekaar gekorreleer is, is ook in die tabel aangedui.

$r^2 \geq 0.8$
$0.8 > r^2 \geq 0.6$
$0.6 > r^2 \geq 0.4$
$r^2 < 0.4$



### 3. Resultate

#### 3.1. Pearson korrelasies tussen die verskillende eksperimentele bepaling wat met die genesmiddel-sensitiewe H69/P selle gedoen is

**Tabel 1A: Pearson korrelasies tussen verskillende eksperimentele bepaling gedoen op genesmiddel-sensitiewe H69/P selle**

		7-DAE MTT BEPALING	
		DIREKTE SITOTOKSISITEIT (IK <sub>50</sub> )	SENSITISERINGS VERMOË VIR VINBLASTIEN (IK <sub>50</sub> )
7-DAE MTT BEPALING	DIREKTE SITOTOKSISITEIT (IK <sub>50</sub> )	-	r <sup>2</sup> = 0.6 (r = 0.7) (p = 0.25) (n = 4)
	SENSITISERINGS VERMOË VIR VINBLASTIEN (IK <sub>50</sub> )	r <sup>2</sup> = 0.6 (r = 0.7) (p = 0.25) (n = 4)	-
[ <sup>3</sup> H]VINBLASTIEN OPNAME BEPALING	1.0 µg/ml	r <sup>2</sup> = 0.0	r <sup>2</sup> = 0.0
TIAZOOLO ORANJE OPNAME BEPALING	1.25 µg/ml	r <sup>2</sup> = 0.9 (r = 0.9) (p = 0.05) (n = 4)	r <sup>2</sup> = 0.6 (r = 0.8) (p = 0.22) (n = 4)

Tabel 11.1A vervolg . . .

Tabel 11.1A vervolg . . .

		7-DAE MTT BEPALING	
		DIREKTE SITOTOKSISITEIT (IK <sub>50</sub> )	SENSITISERINGS VERMOË VIR VINBLASTIEN (IK <sub>50</sub> )
INHIBISIE VAN KALIUM OPNAME	2.5 µg/ml	r <sup>2</sup> = 0.4 (r = -0.6) (p = 0.40) (n = 4)	r <sup>2</sup> = 0.0
	5.0 µg/ml	r <sup>2</sup> = 0.4 (r = -0.6) (p = 0.36) (n = 4)	r <sup>2</sup> = 0.2
	10.0 µg/ml	r <sup>2</sup> = 0.0	r <sup>2</sup> = 0.0
VERANDERING IN MEMBRAAN POTENSIAAL	1.25 µg/ml	r <sup>2</sup> = 0.0	r <sup>2</sup> = 0.4 (r = 0.6) (p = 0.42) (n = 4)
	2.5 µg/ml	r <sup>2</sup> = 0.0	r <sup>2</sup> = 0.6 (r = 0.8) (p = 0.22) (n = 4)
LIPOFILISITEIT (PARTISSIE KOEFFISIËNTE)		r <sup>2</sup> = 0.1	r <sup>2</sup> = 0.0
IN VITRO AKKUMULERING VAN RIMINOFENASIEN VERBINDINGS		r <sup>2</sup> = 0.3	r <sup>2</sup> = 0.0
HEMOLISE VAN SKAAP ROOIBLOEDSELLE	5 µg/ml	r <sup>2</sup> = 0.1 (r = 1.0) (p = 0.002) (n = 4)	r <sup>2</sup> = 0.0
	10 µg/ml	r <sup>2</sup> = 0.2	r <sup>2</sup> = 0.1

**Tabel 1B: Pearson korrelasies tussen verskillende eksperimentele bepalinge  
gedoen op geneesmiddel-sensitiewe H69/P selle**

		[ <sup>3</sup> H]VINBLASTIEN OPNAME BEPALING (1.0 µg/ml)	TIAZOOLO ORANJE OPNAME BEPALING (1.25 µg/ml)
[ <sup>3</sup> H]VINBLASTIEN OPNAME BEPALING	1.0 µg/ml	-	$r^2 = 0.0$
TIAZOOLO ORANJE OPNAME BEPALING	1.25 µg/ml	$r^2 = 0.0$	-
INHIBISIE VAN KALIUM OPNAME	2.50 µg/ml	$r^2 = 0.2$	$r^2 = 0.1$
	5.0 µg/ml	$r^2 = 0.6$ ( $r = 0.8$ ) ( $p = 0.22$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.1$
	10.0 µg/ml	$r^2 = 0.9$ ( $r = 0.9$ ) ( $p = 0.06$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.0$
VERANDERING IN MEMBRAAN POTENSIAAL	1.25 µg/ml	$r^2 = 0.4$ ( $r = 0.6$ ) ( $p = 0.40$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.0$
	2.50 µg/ml	$r^2 = 0.3$	$r^2 = 0.1$
LIPOFILISITEIT (PARTISSIE KOEFFISIËNTE)		$r^2 = 0.7$ ( $r = 0.8$ ) ( $p = 0.19$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.2$
IN VITRO AKKUMULERING VAN RIMINOFENASIEN VERBINDINGS		$r^2 = 0.3$	$r^2 = 0.1$

Tabel 11.1B vervolg ...



Tabel 11.1B vervolg . . .

		<sup>3</sup> H]VINBLASTIEN OPNAME BEPALING (1.0 µg/ml)	TIAZOOLO ORANJE OPNAME BEPALING (1.25 µg/ml)
HEMOLISE VAN SKAAP ROOIBLOEDSELLE	5 µg/ml	$r^2 = 0.0$	$r^2 = 0.9$ ( $r = 0.9$ ) ( $p = 0.04$ ) ( $n = 4$ )
	10 µg/ml	$r^2 = 0.4$ ( $r = 0.7$ ) ( $p = 0.33$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.0$

Tabel 1C: Pearson korrelasies tussen verskillende eksperimentele bepalinge gedoen op geneesmiddel-sensitiewe H69/P selle

		INHIBISIE VAN KALIUM OPNAME			VERANDERING IN MEMBRAAN POTENSIAAL	
		2.5 µg/ml	5.0 µg/ml	10.0 µg/ml	1.25 µg/ml	2.5 µg/ml
INHIBISIE VAN KALIUM OPNAME	2.5 µg/ml	-	-	-	$r^2 = 0.6$ ( $r = 0.8$ ) ( $p = 0.23$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.7$ ( $r = 0.8$ ) ( $p = 0.14$ ) ( $n = 4$ )
	5.0 µg/ml	-	-	-	$r^2 = 0.3$	$r^2 = 0.4$ ( $r = 0.6$ ) ( $p = 0.36$ ) ( $n = 4$ )
	10.0 µg/ml	-	-	-	$r^2 = 0.6$ ( $r = 0.8$ ) ( $p = 0.20$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.7$ ( $r = 0.8$ ) ( $p = 0.16$ ) ( $n = 4$ )
VERANDERING IN MEMBRAAN POTENSIAAL	1.25 µg/ml	$r^2 = 0.6$ ( $r = 0.8$ ) ( $p = 0.23$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.3$	$r^2 = 0.6$ ( $r = 0.8$ ) ( $p = 0.20$ ) ( $n = 4$ )	-	-
	2.50 µg/ml	$r^2 = 0.7$ ( $r = 0.8$ ) ( $p = 0.14$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.4$ ( $r = 0.6$ ) ( $p = 0.36$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.7$ ( $r = 0.8$ ) ( $p = 0.16$ ) ( $n = 4$ )	-	-
LIPOFILISITEIT (PARTISSIE KOEFFISIËNTE)		$r^2 = 0.0$	$r^2 = 0.1$	$r^2 = 0.3$	$r^2 = 0.0$	$r^2 = 0.0$
IN VITRO AKKUMULERING VAN RIMINOFENASIEN VERBINDINGS		$r^2 = 1.0$ ( $r = 1.0$ ) ( $p = 0.01$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.7$ ( $r = 0.9$ ) ( $p = 0.14$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.6$ ( $r = 0.8$ ) ( $p = 0.21$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.6$ ( $r = 0.8$ ) ( $p = 0.21$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.8$ ( $r = 0.9$ ) ( $p = 0.12$ ) ( $n = 4$ )

Tabel 11.1C vervolg . . .

Tabel 11.1C vervolg . . .

		INHIBISIE VAN KALIUM OPNAME			VERANDERING IN MEMBRAAN POTENSIAAL	
		2.5 µg/ml	5.0 µg/ml	10.0 µg/ml	1.25 µg/ml	2.5 µg/ml
HEMOLISE VAN SKAAP ROOIBLOEDSELLE	5 µg/ml	$r^2 = 0.4$ ( $r = -0.6$ ) ( $p = 0.39$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.4$ ( $r = -0.6$ ) ( $p = 0.39$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.0$	$r^2 = 0.0$	$r^2 = 0.0$
	10 µg/ml	$r^2 = 0.9$ ( $r = 1.0$ ) ( $p = 0.04$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.8$ ( $r = 0.9$ ) ( $p = 0.11$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.8$ ( $r = 0.9$ ) ( $p = 0.13$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.7$ ( $r = 0.8$ ) ( $p = 0.17$ ) ( $n = 4$ )	$R^2 = 0.8$ ( $r = 0.9$ ) ( $p = 0.09$ ) ( $n = 4$ )

Tabel 1D: Pearson korrelasies tussen verskillende eksperimentele bepalinge  
gedoen op geneesmiddel-sensitiewe H69/P selle

		LIPOFILISITEIT (PARTISSIE KOEFFISIËNTE)	<i>IN VITRO</i> AKKUMULERING VAN RIMINOFENASIEN VERBINDINGS
LIPOFILISITEIT (PARTISSIE KOEFFISIËNTE)		-	$r^2 = 0.0$
<i>IN VITRO</i> AKKUMULERING VAN RIMINOFENASIEN VERBINDINGS		$r^2 = 0.0$	-
HEMOLISE VAN SKAAP ROOIBLOED- SELLE	5 µg/ml	$r^2 = 0.2$	$r^2 = 0.3$
	10 µg/ml	$r^2 = 0.0$	$r^2 = 1.0$ ( $r = 1.0$ ) ( $p = 0.01$ ) ( $n = 4$ )



3.2. Pearson korrelasies tussen die verskillende eksperimentele bepaling wat met die veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende H69/LX4 selle gedoen is

Tabel 2A: Pearson korrelasies tussen verskillende eksperimentele bepaling gedoen op veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende H69/LX4 selle

		7-DAE MTT BEPALING	
		DIREKTE SITOTOKSISITEIT (IK <sub>50</sub> )	SENSITISERINGS VERMOË VIR VINBLASTIEN (IK <sub>50</sub> )
7-DAE MTT BEPALING	DIREKTE SITOTOKSISITEIT (IK <sub>50</sub> )	-	r <sup>2</sup> = 0.6 (r = 0.8) (P = 0.25) (n = 4)
	SENSITISERINGS VERMOË VIR VINBLASTIEN (IK <sub>50</sub> )	r <sup>2</sup> = 0.6 (r = 0.8) (p = 0.25) (n = 4)	-
[ <sup>3</sup> H]VINBLASTIEN OPNAME BEPALING	1.0 µg/ml	r <sup>2</sup> = 0.6 (r = -0.8) (p = 0.22) (n = 4)	r <sup>2</sup> = 0.7 (r = -0.8) (p = 0.17) (n = 4)
TIAZOOLO ORANJE OPNAME BEPALING	1.25 µg/ml	r <sup>2</sup> = 0.4 (r = -0.6) (p = 0.38) (n = 4)	r <sup>2</sup> = 0.7 (r = -0.8) (p = 0.19) (n = 4)

Tabel 11.2A vervolg . . .

Tabel 11.2A vervolg . . .

		7-DAE MTT BEPALING	
		DIREKTE SITOTOKSISITET (IK <sub>50</sub> )	SENSITISERINGS VERMOË VIR VINBLASTIEN (IK <sub>50</sub> )
INHIBISIE VAN KALIUM OPNAME	0.6 µg/ml	r <sup>2</sup> = 0.6 (r = 0.8) (p = 0.24) (n = 4)	r <sup>2</sup> = 1.0 (r = 1.0) (p = 0.02) (n = 4)
	1.25 µg/ml	r <sup>2</sup> = 0.1	r <sup>2</sup> = 0.1
VERANDERINGS IN MEMBRAAN POTENSIAAL	1.25 µg/ml	r <sup>2</sup> = 0.4 (r = 0.6) (p = 0.40) (n = 4)	r <sup>2</sup> = 1.0 (r = 1.0) (p = 0.02) (n = 4)
	2.5 µg/ml	r <sup>2</sup> = 0.5 (r = 0.7) (p = 0.29) (n = 4)	r <sup>2</sup> = 1.0 (r = 1.0) (p = 0.01) (n = 4)
LIPOFILISITEIT (PARTISSIE KOEFFISIËNTE)		r <sup>2</sup> = 0.1	r <sup>2</sup> = 0.1
IN VITRO AKKUMULERING VAN RIMINOFENASIEN VERBINDINGS		r <sup>2</sup> = 0.2	r <sup>2</sup> = 0.5 (r = -0.7) (p = 0.28) (n = 4)
HEMOLISE VAN SKAAP ROOIBLOEDSELLE	5 µg/ml	r <sup>2</sup> = 1.0 (r = 1.0) (p = 0.02) (n = 4)	r <sup>2</sup> = 0.7 (r = -0.8) (p = 0.18) (n = 4)
	10 µg/ml	r <sup>2</sup> = 0.1	r <sup>2</sup> = 0.8 (r = -0.9) (p = 0.08) (n = 4)

**Tabel 2B: Pearson korrelasies tussen verskillende eksperimentele bepalinge  
gedoen op veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende H69/LX4 selle**

		<sup>3</sup> H]VINBLASTIEN OPNAME BEPALING (1.0 µg/ml)	TIAZOOL ORANJE OPANME BEPALING (1.25 µg/ml)
<sup>3</sup> H]VINBLASTIEN OPNAME BEPALING	1.0 µg/ml	-	$r^2 = 0.1$
TIAZOOL ORANJE OPANAME BEPALING	1.25 µg/ml	$r^2 = 0.1$	-
INHIBISIE VAN KALIUM OPNAME	0.6 µg/ml	$r^2 = 0.5$ ( $r = -0.7$ ) ( $p = 0.11$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.8$ ( $r = -0.9$ ) ( $p = 0.08$ ) ( $n = 4$ )
	1.25 µg/ml	$r^2 = 0.2$	$r^2 = 0.3$
VERANDERING IN MEMBRAAN POTENSIAAL	1.25 µg/ml	$r^2 = 0.5$ ( $r = -0.7$ ) ( $p = 0.27$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.7$ ( $r = -0.8$ ) ( $p = 0.17$ ) ( $n = 4$ )
	2.5 µg/ml	$r^2 = 0.8$ ( $r = -0.9$ ) ( $p = 0.11$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.5$ ( $r = -0.7$ ) ( $p = 0.029$ ) ( $n = 4$ )
LIPOFILISITEIT (PARTISSIE KOEFFISIËNTE)		$r^2 = 0.1$	$r^2 = 0.0$
IN VITRO AKKUMULERING VAN RIMINOFENASIEN VERBINDINGS		$r^2 = 0.0$	$r^2 = 0.8$ ( $r = 0.9$ ) ( $p = 0.08$ ) ( $n = 4$ )
HEMOLISE VAN SKAAP ROOIBLOEDSELLE	5 µg/ml	$r^2 = 0.5$ ( $r = -0.7$ ) ( $p = 0.31$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.6$ ( $r = -0.8$ ) ( $p = 0.24$ ) ( $n = 4$ )
	10 µg/ml	$r^2 = 0.0$	$r^2 = 0.9$ ( $r = 0.9$ ) ( $p = 0.07$ ) ( $n = 4$ )



**Tabel 2C: Pearson korrelasies tussen verskillende eksperimentele bepalinge  
gedoen op veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende H69/LX4  
selle**

		INHIBISIE VAN KALIUM OPNAME	
		0.6 µg/ml	1.25 µg/ml
INHIBISIE VAN KALIUM OPNAME	0.6 µg/ml	-	-
	1.25 µg/ml	-	-
VERANDERING IN MEMBRAAN POTENSIAAL	1.25 µg/ml	$r^2 = 0.9$ ( $r = 1.0$ ) ( $p = 0.04$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.1$
	2.5 µg/ml	$r^2 = 0.9$ ( $r = 0.9$ ) ( $p = 0.07$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.0$
LIPOFILISITEIT (PARTISSIE KOEFFISIËNTE)		$r^2 = 0.0$	$r^2 = 0.0$
<i>IN VITRO</i> AKKUMULERING VAN RIMINOFENASIEN VERBINDINGS		$r^2 = 0.5$ ( $r = -0.7$ ) ( $p = 0.32$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.4$ ( $r = 0.7$ ) ( $p = 0.33$ ) ( $n = 4$ )
HEMOLISE VAN SKAAP ROOIBLOEDSELLE	5 µg/ml	$r^2 = 0.7$ ( $r = 0.8$ ) ( $p = 0.17$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.0$
	10 µg/ml	$r^2 = 0.7$ ( $r = -0.8$ ) ( $p = 0.18$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.6$ ( $r = 0.8$ ) ( $p = 0.23$ ) ( $n = 4$ )

**Tabel 2D: Pearson korrelasies tussen verskillende eksperimentele bepalinge gedoen op veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende H69/LX4 selle**

		VERANDERING IN MEMBRAAN POTENSIAAL		LIPOFILISITEIT (PARTISSIE KOEFFISIËNTE)	IN VITRO AKKUMULERING VAN RIMINOFENASIEN VERBINDINGS
		1.25 µg/ml	2.50 µg/ml		
VERANDERING IN MEMBRAAN POTENSIAAL	1.25 µg/ml	-	-	$r^2 = 0.1$	$r^2 = 0.3$
	2.5 µg/ml	-	-	$r^2 = 0.1$	$r^2 = 0.1$
LIPOFILISITEIT (PARTISSIE KOEFFISIËNTE)		$r^2 = 0.1$	$r^2 = 0.1$	-	$r^2 = 0.1$
IN VITRO AKKUMULERING VAN RIMINOFENASIEN VERBINDINGS		$r^2 = 0.3$	$r^2 = 0.1$	$r^2 = 0.1$	-
HEMOLISE VAN SKAAP ROOIBLOEDSELLE	5 µg/ml	$r^2 = 0.4$ ( $r = 0.7$ ) ( $p = 0.34$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.5$ ( $r = 0.7$ ) ( $p = 0.29$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.2$	$r^2 = 0.4$ ( $r = -0.6$ ) ( $p = 0.40$ ) ( $n = 4$ )
	10 µg/ml	$r^2 = 0.7$ ( $r = -0.8$ ) ( $p = 0.19$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.4$ ( $r = -0.6$ ) ( $p = 0.37$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.0$	$r^2 = 0.8$ ( $r = 0.9$ ) ( $p = 0.13$ ) ( $n = 4$ )

**3.3. Pearson korrelasies tussen verkeie eksperimentele bepalings en die riminofenasien-geïnduseerde inhibisie van tumor groei, riminofenasien tumorvlakke sowel as die riminofenasien serum vlakke waargeneem tydens *in vivo* studies met eksperimentele rotte**

**Tabel 3: Pearson korrelasies tussen verskillende eksperimentele bepalings en die riminofenasien-geïnduseerde inhibisie van tumor groei, riminofenasien tumorvlakke sowel as riminofenasien serumvlakke**

		RIMINOFENASIEN-GEÏNDUSEERDE INHIBISIE VAN TUMOR GROEI	<i>IN VIVO</i> TUMORVLAKKE	<i>IN VIVO</i> SERUMVLAKKE
<i>IN VITRO</i> SITOTOKSISITEIT	H69/P sellyn	$r^2 = 0.0$	$r^2 = 0.7$ ( $r = 0.8$ ) ( $p = 0.19$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.8$ ( $r = 0.9$ ) ( $p = 0.10$ ) ( $n = 4$ )
	H69/LX4 sellyn	$r^2 = 0.1$	$r^2 = 0.7$ ( $r = 0.9$ ) ( $p = 0.13$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.9$ ( $r = 0.9$ ) ( $p = 0.06$ ) ( $n = 4$ )
RIMINOFENASIEN-GEÏNDUSEERDE INHIBISIE VAN TUMOR GROEI		-	$r^2 = 0.3$	$r^2 = 0.2$
<i>IN VIVO</i> SERUMVLAKKE		$r^2 = 0.2$	$r^2 = 1.0$ ( $r = 1.0$ ) ( $p = 0.02$ ) ( $n = 4$ )	-

Tabel 3 vervolg . . .



Tabel 3 vervolg . . .

		RIMINOFENASIEN- GEÏNDUSEERDE INHIBISIE VAN TUMOR GROEI	<i>IN VIVO</i> TUMORVLAKKE	<i>IN VIVO</i> SERUMVLAKKE
LIPOFILISITEIT (PARTISSIE KOEFFISIËNTE)		$r^2 = 0.0$	$r^2 = 0.0$	$r^2 = 0.0$
<i>IN VITRO</i> AKKUMULERING VAN RIMINOFENASIEN VERBINDINGS		$r^2 = 0.5$ ( $r = 0.7$ ) ( $p = 0.30$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.0$	$r^2 = 0.1$
HEMOLISE VAN SKAAP ROOIBLOEDSELLE	5 $\mu\text{g/ml}$	$r^2 = 0.0$	$r^2 = 0.1$	$r^2 = 0.8$ ( $r = 0.9$ ) ( $p = 0.13$ ) ( $n = 4$ )
	10 $\mu\text{g/ml}$	$r^2 = 0.5$ ( $r = 0.7$ ) ( $p = 0.28$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.5$ ( $r = 0.7$ ) ( $p = 0.31$ ) ( $n = 4$ )	$r^2 = 0.0$

#### 4. Samevatting

Die eksperimentele bepalinge wat sterk korrelasies ( $0.8 \leq r^2 \leq 1.0$ ) met mekaar getoon het, kan as volg opgesom word:

##### 4.1. *In vitro* studies met H69/P selle

Die direkte *in vitro* sitotoksiteit van die eksperimentele riminofenasien verbindings het met die riminofenasien-bemiddelde opname van tiazool oranje sowel as hemolise van skaap rooibloedselle, gekorreleer.

Die vermoë van die riminofenasien verbindings om die H69/P sellyn vir vinblastien te sensitiseer het met die vermoë van die verbindings om die selle vir doksorubisien te

sensitiseer, riminofenasien-bemiddelde [ $^3\text{H}$ ]vinblastien opname sowel as die lipofilisiteit van die verbindings, gekorreleer.

Die riminofenasien-bemiddelde opname van [ $^3\text{H}$ ]vinblastien het met die riminofenasien-bemiddelde inhibisie van kalium opname, die lipofilisiteit van die eksperimentele riminofenasien verbindings, die riminofenasien-geïnduseerde verandering in die membraan potensiaal, die *in vitro* akkumulering van die verbindings sowel as die riminofenasien-geïnduseerde hemolise van skaap rooibloedselle, gekorreleer.

Die opname van tiazool oranje in die teenwoordigheid van die eksperimentele riminofenasien verbindings het met die riminofenasien-geïnduseerde verandering in die membraan potensiaal gekorreleer.

Riminofenasien-bemiddelde inhibisie van kalium opname het met riminofenasien-geïnduseerde verandering in die membraan potensiaal, *in vitro* akkumulering van die riminofenasien verbindings sowel as riminofenasien-geïnduseerde hemolise van skaap rooibloedselle gekorreleer.

Riminofenasien-geïnduseerde verandering in membraan potensiale het met die *in vitro* akkumulering van die eksperimentele riminofenasien verbindings sowel as riminofenasien-geïnduseerde hemolise van skaap rooibloedselle gekorreleer.

Die *in vitro* akkumulering van riminofenasien verbindings het met die riminofenasien-geïnduseerde hemolise van skaap rooibloedselle, gekorreleer.

#### **4.2. *In vitro* studies met H69/LX4 selle**

Die direkte *in vitro* sitotoksisiteit van die eksperimentele riminofenasien verbindings het met die vermoë van die riminofenasien verbindings om die H69/LX4 sellen vir doksorubisien te sensitiseer, die riminofenasien-bemiddelde opname van [ $^3\text{H}$ ]vinblastien, riminofenasien-geïnduseerde inhibisie van kalium opname,

riminofenasien-geïnduseerde veranderings in die membraan potensiaal sowel as riminofenasien-bemiddelde hemolise van skaap rooibloedselle, gekorreleer.

Die vermoë van die riminofenasien verbindings om die H69/P sellyn vir vinblastien te sensitiseer het met die vermoë van die verbindings om die selle vir doksorubisien te sensitiseer sowel as die lipofilisiteit van die verbindings gekorreleer.

Die vermoë van die riminofenasien verbindings om die selle vir doksorubisien te sensitiseer het met die opname van [ $^3\text{H}$ ]vinblastien in die teenwoordigheid van die riminofenasien verbindings gekorreleer.

Die riminofenasien-bemiddelde opname van [ $^3\text{H}$ ]vinblastien het met die riminofenasien-bemiddelde inhibisie van kalium opname, die riminofenasien-geïnduseerde veranderings in die membraan potensiale sowel as die riminofenasien-geïnduseerde hemolise van skaap rooibloedselle, gekorreleer.

Die opname van tiazool oranje in die teenwoordigheid van die eksperimentele riminofenasien verbindings het met die riminofenasien-geïnduseerde veranderings in die membraan potensiaal, die *in vitro* akkumulering van die verbindings, sowel as die vermoë van die verbindings om skaap rooibloedselle te liseer, gekorreleer.

Riminofenasien-bemiddelde inhibisie van kalium opname het met riminofenasien-geïnduseerde veranderings in die membraan potensiaal, *in vitro* akkumulering van die riminofenasien verbindings sowel as riminofenasien-geïnduseerde hemolise van skaap rooibloedselle, gekorreleer.

Riminofenasien-geïnduseerde veranderings in membraan potensiale het met die riminofenasien-geïnduseerde hemolise van skaap rooibloedselle, gekorreleer.

Die *in vitro* akkumulering van riminofenasien verbindings het met die riminofenasien-geïnduseerde hemolise van skaap rooibloedselle, gekorreleer.



### 4.3. *In vivo* studies

Die riminofenasien-geïnduseerde inhibisie van tumor groei het met die *in vitro* akkumulering van die eksperimentele riminofenasien verbindings sowel as die riminofenasien-bemiddelde hemolise van skaap rooibloedselle, gekorreleer.

Die riminofenasien vlakke wat in die tumore waargeneem is, het met die direkte *in vitro* sitotoksiteit, die riminofenasien vlakke in die serum sowel as die riminofenasien-bemiddelde hemolise van skaap rooibloedselle, gekorreleer.

Die riminofenasien vlakke in die serum, het met die direkte *in vitro* sitotoksiteit, sowel as die riminofenasien-bemiddelde hemolise van skaap rooibloedselle, gekorreleer.