

**DIE IMMUUNMODULERENDE EIENSKAPPE VAN
OKSIHUMAAT: 'n *IN VIVO* EN *IN VITRO* ONDERSOEK**

deur

Gisela Käthe Joone

Voorgelê ter vervulling van 'n deel
van die vereistes vir die graad
Philosophiae Doctor

(PhD)

in die Fakulteit Gesondheidswetenskappe
Universiteit van Pretoria
Pretoria

Desember 2002

Bedankings

“Op hom het ek vertrou.
Hy het my gehelp.
Daarom is ek bly en wil ek Hom loof met my lied.”
Psalm 28:7

Ek wil my opregte dank en waardering teenoor die volgende persone betuig:

Prof CE Medlen, my promotor, onder wie se uiters bekwame leiding hierdie werk voltooi is. Haar inisiatief en geduld het vir my as groot aansporing gedien. Ek waardeer haar aanmoediging en hulp tydens die uitvoering van die onderskeie projekte.

Prof A Theron wat met die proeflees van die proefskrif gehelp het sowel as vir haar gewaardeerde ondersteuning.

Chrisna Durandt en Susan Malfeld wat met sekere tegniese aspekte van die projek behulpsaam was.

Dr ME Botes vir die kliniese gedeelte van die Fase I proef wat sy behartig het.

Martie Madgwick en Duncan Cromarty vir hulle waardevolle hulp, veral tydens die finale afronding van die verhandeling.

My eggenoot vir sy vertrou en voortdurende aanmoediging en bystand.

My familie en kollegas vir hulle aanmoediging en belangstelling.

Martie van der Walt en haar kollegas vir hulle altyd vriendelike hulp met die opsporing van die literatuur.

Die *Departement Immunologie*, Universiteit van Pretoria, vir die gebruik van hulle fasiliteite wat gedurende die afhandeling van hierdie studie benodig was.



INHOUDSOPGAWE

Opsomming	v
Summary	vii
Lys van afkortings	ix

HOOFSTUK 1: LITERATUUROORSIG: HUMIENSURE

1.1	Inleiding	2
1.1.1	Humiensubstansie	2
1.1.1.1	Moontlike aanwending van humiensubstansie in mediese behandelings	5
1.1.1.2	Toksikologiese studies met humiensure	24
1.1.1.3	Farmakokinetika van humiensure	25
1.1.1.4	Hergenerasie van humien- en fulviensure vanaf steenkool	25
1.1.1.5	Oksihumaat	28

HOOFSTUK 2: LITERATUUROORSIG: SELLE VAN DIE IMMUNSIESTEM

2.1	Inleiding	34
2.1.1	Mononukleêre fagosiete	34
2.1.2	Limfosiete	34
2.1.3	Granulosiete	39
2.1.4	Dendritiese selle	44

HOOFSTUK 3: LITERATUUROORSIG: IMMUNMODULASIE

3.1	Inleiding	46
3.1.1	Anti-inflammatoriese geneesmiddels	46
3.1.2	Immuunstimulasie	51
3.1.3	Doelwitte van die studie	54

HOOFSTUK 4: MATERIAAL EN METODEDES

4.1	Media en reagense	57
-----	-------------------	----



4.1.1	Ammoniumchloried-oplossing	57
4.1.2	3-[4,5-Dimetieltiazool-2-iel]-2,5-difeniel-tetrazolium bromied (MTT) oplossing	57
4.1.3	Dulbecco se fosfaat gebufferde sout-oplossing (Dulbecco's FBS)	57
4.1.4	Fetale kalfserum (FKS) gesupplementeerde RPMI 1640 medium	57
4.1.5	Fosfaat gebufferde sout-oplossing (FBS)	58
4.1.6	Hanks se gebalanseerde sout-oplossing (HBSO)	58
4.1.7	Heparien-oplossing	58
4.1.8	Hitte-geïnaktiveerde fetale kalfserum (HI FKS)	58
4.1.9	Sephadex voorbereiding	58
4.1.10	Stop-oplossing (vir die bepaling van neutrofielvashegting)	58
4.1.11	Substraat-oplossing (o-Fenileendiamien)(OPD)	59
4.1.12	Suur sitraat dekstrose ("Acid citrate dextrose")	59
4.1.13	Toets buffer (vir die bepaling van neutrofielvashegting)	59
4.1.14	Witsel telvloeistof	60
4.2	Metodes	60
4.2.1	Vorbereiding van menslike neutrofiel	60
4.2.2	Vorbereiding van menslike mononukleêre leukosiete	61
4.2.3	Bepaling van MNL-proliferasie	62
4.2.4	Bepaling van interleukien 2	65
4.2.5	Uitdrukking van CD25, CD38 en HLA DR	66
4.2.6	Bepaling van interleukien 4	67
4.2.7	Bepaling van interleukien 6	69
4.2.8	Bepaling van interleukien 10	69
4.2.9	Bepaling van tumor nekrose faktor α	70
4.2.10	Bepaling van interferon γ	71
4.2.11	Bepaling van prostaglandien E ₂	71
4.2.12	Bepaling van leukotriene B ₄	74
4.2.13	Bepaling vir CR3 uitdrukking	74
4.2.14	Bepaling van neutrofiel vashegting aan E-selektien en ICAM-1 deur gebruik te maak van getransfekteerde	



fibroblast sellyne	76
4.2.15 Bepaling van eosinofiliese kationiese proteïene (EKP) met behulp van radio isotoop opname (RIO)	78
4.2.16 Bepaling van miëloperoksidase	79
4.2.17 Bepaling van die sitotoksiese aktiwiteit van oksihumaat-behandelde MNL	80
4.2.18 Bepaling van NK-sel aktiwiteit	82
4.2.19 Invloed van die eksperimentele middel op die membraan stabiliteit van skaap eritrosiete	83
4.2.20 Statistiese bepalings	85

HOOFSTUK 5: RESULTATE

5.1 Die effek van oksihumaat op die proliferasie van menslike limfosiete	87
5.2 Die effek van oksihumaat op die produksie van IL-2 deur menslike limfosiete	88
5.3 Die effek van oksihumaat op die uitdrukking van CD25, CD38 en HLA-DR op menslike limfosiete	88
5.4 Die effek van oksihumaat op die produksie van IL-4 deur menslike limfosiete	95
5.5 Die effek van oksihumaat op die produksie van IL-6 deur menslike limfosiete	95
5.6 Die effek van oksihumaat op die produksie van IL-10 deur menslike limfosiete	95
5.7 Die effek van oksihumaat op die produksie van TNF- α deur menslike limfosiete	99
5.8 Die effek van oksihumaat op die produksie van IFN- γ deur menslike limfosiete	99
5.9 Die effek van oksihumaat op die produksie van PGE ₂ deur menslike limfosiete	99
5.10 Die effek van oksihumaat op die produksie van LTB ₄ deur menslike limfosiete	103
5.11 Die effek van oksihumaat op die uitdrukking van CR3-molekules op menslike neutrofiele	103
5.12 Die effek van oksihumaat op neutrofiel vashegting aan normale en getransfekteerde fibroblast sellyne	107
5.13 Die effek van oksihumaat op die vrystelling van eosinofiliese	



kationiese proteïene (EKP) deur menslike eosinofiele	109
5.14 Die effek van oksihumaat op die vrystelling van miëloperoksidase (MPO) deur menslike neutrofiële	109
5.15 Die effek van oksihumaat op die sitotoksiese aktiwiteit van menslike limfosiete	110
5.16 Die effek van oksihumaat op NK-sel aktiwiteit	114
5.17 Invloed van oksihumaat op die membraan stabiliteit van skaap eritrosiete	115
HOOFSTUK 6: BESPREKING	117
VERWYSINGS	129

OPSOMMING

Sleutel terme: Humiensubstansie; Oksihumaat; Immuunmodulering; TH₁ en TH₂response; Limfosietproliferasie; Sitokienproduksie; Oppervlakmerkers op menslike limfosiete; Anti-inflammatoriese eienskappe; Adhesiemolekules op menslike neutrofiële; Sitotoksiteit.

'n Unieke proses is ontwikkel om harsagtige steenkool deur gekontroleerde nat oksidasie, gevolg deur behandeling met 'n basis, om te skakel na wateroplosbare humaat wat oksihumaat genoem word. Intensiewe studies met proefdiere het getoon dat oksihumaat by dosisse van minder as 350 mg/kg, nie toksies is nie. In hierdie studie is die immuunmodulerende potensiaal van oksihumaat ondersoek. Aanvanklike studies het getoon dat oksihumaat die groei van gestimuleerde, maar nie rustende, monosiet-arme en in 'n mindere mate monosiet-ryke menslike limfosiete, verhoog het. Hierdie respons was selfs meer indrukwekkend in die geval waar limfosiete van HIV-geïnfekteerde pasiënte ondersoek is. Oksihumaat het nie alleen limfosietproliferasie van HIV-geïnfekteerde individue *in vitro* verhoog nie, maar ook *ex vivo* ná 'n nie-toksiese toediening van oksihumaat (4 g oksihumaat per dag vir twee weke).

Die produksie van beide TH₁ (IL-2, TNF- α en IFN- γ) sowel as TH₂ (IL-4 en IL-10) geassosieerde sitokiene is ondersoek. Die produksie van IL-2, sowel as die uitdrukking van CD25 (IL-2 reseptor) deur PHA-gestimuleerde limfosiete is verhoog. So ook is die produksie van IL-4 verhoog. Aan die ander kant is 'n inhibisie van IL-10 waargeneem. Behalwe vir laasgenoemde, wil dit dus voorkom of oksihumaat 'n stimulerende effek op beide TH₁ en TH₂ funksies het. Behalwe vir CD25 (die oppervlakmerker vir IL-2), is die uitdrukking van twee addisionele oppervlakmerkers, wat ook met geaktiveerde limfosiete geassosieer word, naamlik CD38 en HLA-DR, ondersoek. Oksihumaat het die



uitdrukking van beide laasgenoemde oppervlakmerkers verlaag, alhoewel dit nie betekenisvol was nie. Die CD38 molekule speel 'n belangrike rol in sein transduksie sowel as selvashegting. Daar is egter ook bewys dat CD38 'n belangrike negatiewe prognostiese merker in die ontwikkeling van HIV-infeksie is. Die onderdrukking van hierdie molekule saam met 'n gelyktydige stimulasie van die TH₁ selaktiwiteit, mag die ontwikkeling van hierdie siekte vertraag.

In hierdie studie is ook gevind dat die produksie van LTB₄ deur gestimuleerde limfosiete betekenisvol deur oksihumaat verhoog is. Leukotriene B₄ speel 'n belangrike rol in die induksie van IL-2 produksie sowel as die aktiwiteit van sitotoksiese T-selle en verklaar moontlik die verhoging van beide hierdie funksies deur oksihumaat.

Die moontlike anti-inflammatoriese eienskappe van oksihumaat is ook *in vitro* ondersoek. Die uitwerking wat oksihumaat op die uitdruk van CR3, sowel as op die vashegting van FMA-gestimuleerde neutrofiele aan twee getransfekteerde sellyne (wat óf ICAM-1 óf E-selektien uitdruk) sowel as 'n normale baba hamster niersellyn het, is ondersoek. Volgens die resultate wat verkry is, word vashegting aan al drie sellyne, asook uitdrukking van CR3 op neutrofiele, deur oksihumaat-behandeling onderdruk. Verder is gevind dat oksihumaat degranulasie van neutrofiele en eosinofiele, wat met geopsoneerde Sephadex of FMLF/SB gestimuleer is, onderdruk. Hierdie resultate dui op 'n moontlike anti-inflammatoriese rol van oksihumaat.

Volgens die resultate wat tydens hierdie studie verkry is, tesame met die Fase I kliniese studie wat aandui dat die middel goed verdra word, besit oksihumaat 'n kombinasie van eienskappe wat daarop dui dat dit in die toekoms as 'n belowende immuunmodulerende middel ontwikkel sal kan word.

SUMMARY

Key Words: Humic substances; oxihumate; Immuno-modulating; TH₁ and TH₂ responses; Lymphocyte proliferation; Cytokine production; Human lymphocyte surface markers; Anti-inflammatory effects; Human neutrophil adhesion molecules; cytotoxicity.

Oxihumate is a humic acid produced by a unique, recently developed process by which a water-soluble compound is generated by a mild, controlled wet oxidation of bituminous coal followed by treatment with an alkali. Intensive toxicity studies on this compound have shown no toxic effect at concentrations of less than 300 mg/kg.

In this study the immuno-modulating potential of oxihumate have been investigated. Preliminary studies demonstrated that oxihumate increased the proliferation of stimulated, but not resting, monocyte-depleted human neutrophils. Similar, but less striking effects were observed with monocyte-replete mononuclear cell suspensions. Oxihumate enhancement of lymphocyte mitogen-activated lymphocyte-proliferative response, was even more apparent with lymphocytes from HIV positive patients. This effect was observed *vitro* and *ex vivo* after oral administration of 4 grams oxihumate per day for two weeks.

The effects of oxihumate on the TH₁ (IL-2, TNF- α and IFN- γ) as well as TH₂ (IL-4 and IL-10) associated cytokines were also investigated. Interleukin 2 production as well as the expression of CD25 (IL-2 receptor) by PHA-stimulated lymphocytes were increased by oxihumate. The production of IL-4 by stimulated lymphocytes was also increased, here IL-10 production appeared to be inhibited. It appears, with the exception of IL-10, that oxihumate has a stimulatory effect on both TH₁ and TH₂ responses of human lymphocytes.

In addition to CD25 the expression of HLA-DR and CD38 were investigated. Oxihumate resulted in a slight, but not significant, inhibition of both HLA-DR and CD38. CD38 has an important role in signal transduction and in cellular adhesion but has also been shown to be an important negative prognostic marker in the development of full-blown AIDS. Down-regulation of this molecule, together with the upregulation of TH₁ cell activity might delay the progression of this disease.

Furthermore it was also found that LTB₄ production by stimulated lymphocytes was significantly increased by oxihumate. Leukotriene B₄ is an inducer of IL-2 production and also stimulates cytotoxic T-cells. The effect that oxihumate has on stimulated lymphocytes may therefore be due to a stimulation of LTB₄

The possible anti-inflammatory properties of oxihumate were also investigated *in vitro*. The effect of oxihumate on the expression of CR3, as well as the adherence of PMA-stimulated neutrophils to two transfected cell lines (expressing either ICAM-1 or E-selectin respectively) as well as to a normal baby hamster kidney cell line was also investigated. It was found that neutrophil adhesion to all three cell lines as well as expression of CR3 molecules were inhibited by oxihumate treatment. Degranulation of neutrophils and eosinophils, that were stimulated with opsonised Sephadex or FMLP/CB, was also suppressed by oxihumate treatment. These results indicate possible anti-inflammatory role of oxihumate.

According to the results of this study, together with the results obtained from the Phase I study indicating that oxihumate is well tolerated, it appears as though oxihumate has a unique combination of properties and that it is a promising immuno-modulating compound.



LYS VAN AFKORTINGS

μCi	mikrocurie
μg	mikrogram
μl	mikroliter
μM	mikromolaar
$^{\circ}\text{C}$	grade Celsius
ACD	suur sitraat dekstrose
AKTH	adrenokortikotrope hormoon
ATCC	American Tissue Culture Collection
ATP	adenosientrifosfaat
BCG	bacillus Calmette-Guerin
BHK	baba hamster niersellyn
BSS	beta-sitosterol
BSSG	beta-sitosterolglukosied
Ci	Curie
CO₂	koolsuurgas
Con A	konkanavalien A
COX	sikloöksigenase
DHEA	dehidro-epi-androsteroon
DMSO	dimetiel sulfoksied
DNA	deoksiribonukleïensuur
EDTA	etileendiamientetra-asynsuur



EKP	eosinofiliese kationiese proteïene
FBS	fosfaat gebufferde sout-oplossing
FITC	fluorochroom fluorosien isotiosianaat
FKS	fetale kalfserum
FMA	forbol-12-miristaat-13-asetaat
FMLF	N-formiel-L-metioniel-L-leusiel-L-fenielalanien
g	gram of gravitasiekrag
GM-CSF	granulosiet-makrofaag koloniestimulerende faktor
H₂O₂	waterstofperoksied
HBSO	Hanks gebalanseerde soutoplossing
HI FKS	hitte-geïnaktiveerde kalfserum
HIV	“human immuno deficiency virus”
HOCl	hipochloorsuur
HS	humieusuur
HSV	herpes simplex virus
IκB	inhiberende kappa B
ICAM	intersellulêre adhesie molekule
IFN	interferon
Ig	immunoglobuliene
IL	interleukien
kg	kilogram
L	liter
LPC	lisofosfatidielcholien
LPS	lipopolisakkaried



LT	leukotriene
LTB₄	leukotriene B ₄
MDP	muramiel dipeptied
mg	milligram
MHC	major histo compatibility
ml	milliliter
mM	millimolaar
MNL	mononukleêre leukosiete
MPO	miëloperoksidase
MTT	3-[4,5-Dimetieltiazool-2-iel]-2,5-difeniel-tetrazolium bromied
NADPH	dihidronikotienamied adenien dinukleotied fosfaat
NF-κB	nukleêrefaktor kappa B
ng	nanogram
NK-selle	groot granulêre limfosiete, "natural killer cells"
nm	namometer
NSAIM	nie-steroïed anti-inflammatoriese geneesmiddel
OD	optimale digtheid
OPD	0-fenileendiamien
PAF	plaatjie-aktiverende faktor
PAI	plasminogeen aktiveerder inhibeerder
pg	pikogram
PGE₂	prostaglandiene E ₂
PHA	fitohemagglutininien
PLA₂	fosfolipase A ₂
PLC	menslike lewerkanker sellyn



PWM	“Pokeweed”-mitogeen
RIO	radio isotoop opname
RNA	ribonukleïensuur
ROS	reaktiewe oksidantspesie
rpm	revolusies per minuut
SB	sitokalasiën B
SRBS	skaaprooibloedselle
TH	T limfosiet helper selle
TNF	tumor nekrose faktor
TTP®	Tolpa® Torf Preparation
U	eenhede, “units”
UAES	umbilikale arteriële endoteelselle
VCAM	vaskulêre sel adhesiemolekule
w-PA	weefsel plasminogeen aktiveerder