



HOOFSTUK 1

LITERATUUROORSIG: HUMIENSURE

1.1. INLEIDING

Humiensubstansie is chemiese verbindings wat in humus aangetref word en kom wyd verspreid in die natuur voor. (Berzelius, 1893; Hoppe-Seyler, 1889). Dit word gedurende die ontbinding van dooie, verrottende organiese materiaal gevorm en word dus in alle natuurlike omgewings, waar organiese materiaal en mikroorganismes teenwoordig is of was, aangetref (Visser, 1973).

Hierdie substansie kom veral in moerasturf voor wat al vanaf die vroegste tye vir terapeutiese gebruike aangewend is. Bewoners van Babilonië en die Romeinse Ryk was reeds bewus van die helende effek van modder (Priegnitz, 1986). Modderbaddens was in die 19de eeu by die gesondheidsklinieke in Europa in gebruik vir die behandeling van ginekologiese en rumatoïede siektes (Baatz, 1988; Kleinschmidt, 1988; Kovarik, 1988; Lent, 1988). Behalwe die tradisionele bad wat uit gekonsentreerde veen pulp bestaan, het dit geblyk dat baddens sowel as gesondheidsdrankies met verdunde veenmaterial ook van waarde is. Die drankies is veral aanbeveel in gevalle van gastriese, intestinale en hepatiese siektes (Kallus, 1964).

Veen vanaf die Spa gebied in België is gedurende die 1ste wêreldoorlog by veldhospitale gebruik om soldate met oorlogswonde en geamputeerde ledemate, te behandel (Van Beneden, 1971). Veen is direk op die oorlogswonde geplaas (Haanel, 1924) om veral infeksies te voorkom, maar ook pyn te verlig sowel as om die helingsproses van die wonde te bespoedig.

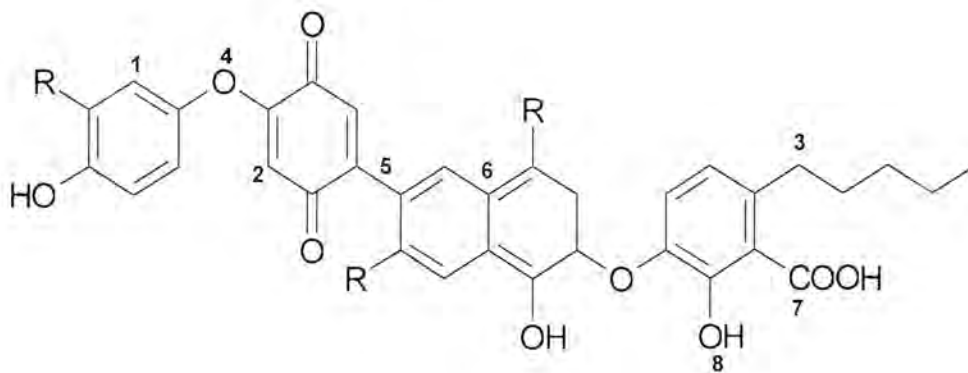
1.1.1 Humiensubstansie

Natuurlike humiensubstansie (Berzelius, 1893; Hoppe-Seyler, 1889) is donkerbruin van kleur en alhoewel dit hoofsaaklik gedurende humifikasie gevorm word, is dit ook al uit 'n lewende plant, *Pilayella littoralis*, geïsoleer (Ghabbour *et al.*, 1994). Sekere mikroorganismes (bakterieë, swamme) besit die vermoë om humiensubstansie intrasellulêr

te sintetiseer en eers nadat hierdie selle afgesterf het, die humiensubstansie en fulviensure vry te stel (Kühnert *et al.*, 1982).

Humiensubstansie bind chemies met ander nie-humiensubstansie sowel as chemies onaktiewe humiene wat stadig geïnkorporeer word in die verkolingsproses (Ziechmann, 1980; 1988). In vergelyking met die humiene en humiensure self, het die plantaardige uitgangstowwe 'n lae molekulêre massa (MM) van ongeveer 1 kD. Kappler en Ziechmann (1969) het 'n model van die uitgangstowwe se oorsprong matematies as 'n reeks verwante Markoff prosesse beskryf (Kingman, 1969; Batschelet, 1979). Die vorming van humiensubstansie word geïnisieer deur die outoëksidasie van multivalente fenole (Diebler *et al.*, 1961; Ziechmann, 1980) wat tydens natuurlike hidrolisasie van ligniene voorkom.

Die elektrofiliese reaksies wat deur 'n epsilon ontvanger (bv. molekulêre suurstof) op 'n verplaasbare elektron, veroorsaak word, vorm hoogs reaktiewe radikale. Hierdie radikale bevat gewoonlik slegs 'n enkele elektron. Die onstabiliteit van so 'n suurstof-radikaal word gedeeltelik verminder deur intramolekulêre mesomerisasie. Hierdie verhoging van intramolekulêre mesomerisasie fasiliteer die binding van twee C[•] radikale om 'n C-C verbinding, of 'n C[•] en 'n O[•] radikaal om 'n C-O verbinding te vorm. Sykettings kan gevorm word deur nukleofiliese substitusie deur die anioniese radikale. Sodoende kan groot molekules chemies bind om 'n baie meer komplekse struktuur te vorm (Ziechmann, 1988; Thurman & Malcolm, 1983). Die molekulêre verbindings wat gevorm word deur epsilon oordrag tussen individuele molekules, word verder gestabiliseer om na intermolekulêre mesomerisasie te lei. Sommige molekules tree op as epsilon ontvangers, ander weer as epsilon skenkers, en sodoende word epsilon skenker-ontvanger komplekse opgebou (Ziechmann, 1988). Uiteindelik verskyn karboksiel groepe, wat ontstaan as gevolg van die oksidasie van CH₃-groepe, of deur die splitsing van ringe wat deur oksidasie gevolg word (Ziechmann, 1980). Humiensubstansie bestaan dus uit talryke fenoliese en kinoon tipe ringe (Figuur 1, bladsy 4) wat verbind word deur -O-, -C- en -C-C- verbindings wat komplekse produkte vorm wat nie in klassieke chemiese terme gedefinieer kan word nie (Thurman en Malcolm, 1983; Ziechmann, 1988).



Figuur 1: Belangrike strukturele eienskappe van 'n humiensubstans model.

1. aromtiese ring; 2. kinfoiede ring; 3. alifatiese sy-ketting wat deur die oopmaak van 'n ringstruktuur geproduseer is; 4. O-bande; 5. C-bande; 6. C-C-bande; 7. karboksiel groepe; 8. fenoliese -OH groepe (R=1-8). Saamgestel volgens Riede (1990).

Hierdie produkte kan verder met aminosure, peptiede, koolhidrate en stereoiede bind deur middel van kovalente bindings, waterstof-bindings of epsilon skenker-ontvangerkompleks bindings (Müller-Wegener, 1982; Ziechmann, 1988). Op hierdie manier word humiene gevorm wat hul chemiese reaktiwiteit verloor en gelyktydig 'n toename in molekulêre massa (MM) toon. Hierdie polimere het 'n gemiddelde molekulêre massa van 1500 tot >100 000 Da en is bruin of swart van kleur. Humiensubstans, turf en steenkool ontstaan uit die polimerisasie van kleiner organiese molekules wat saam met die fisiese toestande tydens polimerisasie die finale struktuur bepaal (Ziechmann, 1993).

Vier hoof humiensubstans fraksies word op grond van oplosbaarheid onderskei:

- (i) **fulviensuur** wat in neutrale pH water en by hoë en lae pH oplos (MM is < 500 Da);
- (ii) **hematomelaniese suur** wat oplosbaar is in kort ketting alkohole (MM is tussen 5 000 en 11 000 Da);
- (iii) **huminsure** wat onoplosbaar is in suur waterige medium. Hulle is onoplosbaar in kort ketting alkohole en in water met 'n pH < 8 (MM is > 12 000 Da);
- (iv) **humien** wat onoplosbaar is in water by enige pH en wat 'n baie lae absorpsie vermoë as huminsure het (MM is > 70 000 Da) (Ziechmann, 1993).

1.1.1.1 Moontlike Aanwending van Humiensubstansie in Mediese Behandelings

Humiensure kan inwendig sowel as uitwendig aangewend word, en word hoofsaaklik deur Visser (1988) opgesom. Baie van die voordelige effekte kan toegeskryf word aan die humiensure self, as gevolg van oppervlakaktiwiteit en/of eienskappe soos chelasië (Nifantéva *et al.*, 1999; Marx & Heumann, 1999), adsorpsievermoë (Prosen & Zupancic-Krajl, 2000; Schulze *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 1997) poli-asidiese aard en die polifenoliese struktuur (Woelki *et al.*, 1997) asook interaksie met ander organiese molekules. Laasgenoemde molekules sluit proteïene, polisakkariede, ensieme en lipiede, in. Die reduserende eienskappe van humiensure word ook as voordelig beskou (Mao *et al.*, 1998). Soms kan die effek wat met humiensure waargeneem word, eerder aan meegaande produkte van mikrobiëse, plant of dierlike oorsprong, toegeskryf word (Van Beneden, 1971).

Effek van humiensure op die algemene metaboliese tempo

Górniok *et al.* (1967) het die uitwerking van modderbehandeling op die algemene metaboliese tempo ondersoek deur marmotte vir 40 dae lank, elke tweede dag vir 15 minute, in 'n modderbad by 42°C te plaas. Hierdie behandeling het gelei tot 'n aansienlike toename in suurstofopname deur die lewer- en nierweefsels (160% en 75% respektiewelik), asook 'n verhoging in velrespirasie (40%). Hulle was van mening dat hierdie verhoging in metabolisme moontlik as gevolg van die opname van spesifieke aktiewe substansie vanuit die modder is.

Visser (1987) het gevind dat humiensubstansie die respirasie van rotlewermitokondria stimuleer en doeltreffende oksidatiewe fosforilasie (adenosientrifostaat [ATP] produksie) bevorder. Hierdie verskynsel kan gedeeltelik toegeskryf word aan die vermoë van humiensure om die oordrag van elektrone vanaf gereduseerde materiaal na elektron ontvangers, te kataliseer (Schindler *et al.*, 1976).



Effek van humiensure op spysverteringstelsel – ongesteldhede

Die kalsiumsoute van humiensuur, verkrygbaar onder die handelsnaam Huminit®, word gebruik vir die behandeling van sooibrand en ander gastriese versteurings soos gastriese ulkuse en akute gastroënteritis (Kinzlmeier, 1954; Weithaler, 1954; Schlepper, 1960; Reichert, 1966). Die kalsium van die humaat word in die maag verruil vir H⁺ wat neutralisering van die maagsuur teweegbring. Hierdie produk is die sout van 'n swak suur en 'n sterk basis wat tot by 'n pH van ongeveer 4, optimaal aan suur bind (Schlepper, 1960). Aangesien min interaksie met minerale sure by 'n hoër pH plaasvind, is alkalose onwaarskynlik. Daar bly egter genoegsame suur in die maag oor wat belangrik is vir die verteringsproses. Baie geneesmiddels met ionuitruilingseienskappe is slegs vir ongeveer twee ure beskikbaar in die maag, terwyl humaat met die mukus van die maagwand verbind en baie stadig vrygestel word om 'n langdurige werking te verseker (Reichert, 1966). Geen nuwe effekte is tydens behandeling met humaat waargeneem nie. Produkte soos bismuthumaat en Gastrohumit® is vir soortgelyke toestande voorgeskryf (Reichert 1966).

Kühnert *et al.* (1989) het gevind dat metaboliese afwykings by veral ouer diere suksesvol met humiensure behandel kan word. Dit is 'n voordelige middel omdat dit maklik toegedien kan word (deur voer), baie veilig is en geen nuwe-effekte (byvoorbeeld allergie, weerstandigheid) het nie. Verder word geen humiensuur oorblyfsels agtergelaat in produkte wat vanaf behandelde diere afkomstig is nie.

Effek van humiensure op intestinale absorpsie

Humiensure bevorder die intestinale absorpsie van anorganiese ione. Visser (1973) het rotte met 0.1 % humiensure behandel en 'n toename van 50 – 100 % in die absorpsie van Co, Mg, Fe, Mn, Zn en SO in die dunderm waargeneem. Alhoewel chelasie van ione deur die humienmolekules aanleiding kan gee tot kation absorpsie, kan die oppervlakaktiwiteit van humiensure ook moontlik 'n verhoogde membraandeurlaatbaarheid induseer (Samson & Visser, 1989).

Effek van humiensure op disenterie en ander gastroïntestinale toestande

Humiensure is dikwels alleen of in kombinasie met ander aktiewe bestanddele gebruik om diarree en enteritis, veral in veeartsenykundige medisyne, te behandel of te voorkom (Kühnert *et al.*, 1980; Bartels, 1986; Golbs *et al.*, 1986). Die volgende handelsmerke is lankal reeds beskikbaar:

- i) Kalumin® bestaan hoofsaaklik uit Na-humaat en bevat 60% humiensure.
- ii) Sulumin® en Salhumin® bevat 70% gekonsentreerde humiensure.
- iii) Kalumat® bevat behalwe humiensure ook 5% Mg – Al – silikaat.

Die terapeutiese werking van hierdie middels kan toegeskryf word aan anti-inflammatoriese, adsorberende, bakterisidiese en anti-virale eienskappe. Die anti-inflammatoriese eienskappe dra by tot die beskerming van die mukusmembraan asook die mukosale selle, terwyl die middels se vermoë om byvoorbeeld toksiese substansie te adsorbeer, die absorpsie daarvan sal verminder.

Bartels (1986) het katte en honde wat aan akute gastroënteritis, diarree, kolitis en infeksies met parvovirus gelyk het, met Kalumat® behandel. Onderskeidelik is 97%, 88%, 80% en 60% beterskap van die spesifieke simptome by behandelde diere waargeneem. Die Kalumat® behandeling het die diarree net so vinnig, indien nie vinniger nie, as standaard antibiotika genees. Geen nadelige nuwe effekte tydens behandeling is waargeneem nie, selfs nie eers wanneer behandeling oor 'n tydperk van maande gestrek het nie.

Golbs *et al.* (1986) het varke met verteringsprobleme met die anti-diarree middel Sulumin® behandel terwyl Kühnert *et al.* (1980) enteritis by kalwers suksesvol met Kalumin® behandel het. Ook in hierdie gevalle is geen nadelige nuwe-effekte waargeneem nie.

Bakterisidiese- en fungisidiese eienskappe van humiensure

Moerasturf is wel bekend vir die bakterisidiese eienskappe daarvan (Pálfi *et al.*, 1976). Dit is reeds genoem dat veen gedurende die Eerste Wêreldoorlog direk op oorlogswonde geplaas is om infeksies te voorkom (Haanel, 1924). Eichelsdörfer (1976) het die effektiwiteit van veen teen bakteriële en fungale velinfeksies toegeskryf aan die



teenwoordigheid van humiensure. Ansorg en Rochus (1978) het rapporteer dat 57 uit 81 natuurlike humiensure asook twee sintetiese hidrokinoon humiensure (2500 – 1250 µg/ml) die groei van die volgende menslike patogene *in vitro* geïnhibeer het: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* en *Candida albicans*. Twee organismes wat in stoelgang, wat ryk aan humiensubstansie is, aangetref word, naamlik *Streptococcus faecalis* en *Escherichia coli*, word nie deur hierdie humiensuur konsentrasies beïnvloed nie. Hierdie outeurs het gevind dat natuurlike humiensure by laer konsentrasies antimikrobies aktief was, as wat die geval met standaard antibiotika is. Humiensure by 'n konsentrasie so laag as 40mg/L is selfs al teen *Streptococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* en *Proteus vulgaris* aktief getoets.

Die bakterisidiese en fungisidiese effek van humiensure kan toegeskryf word aan hul chelerende- en oppervlak-aktiwiteitseienskappe wat die voedingstatus sowel as die selwande van die mikroörganisme affekteer. Die bakterisidiese aksie van humiensure op *Pseudomonas aeruginosa* word byvoorbeeld toegeskryf aan die afbraak van die selwandstruktuur wat bewerkstellig word deur die verwydering van noodsaaklike divalente katione as gevolg van chelasië (Ansorg & Rochus, 1978).

Antivirale effekte van humiensure

Macias (1984) het gevind dat humiensure die tydperk verleng het waartydens tamatie-mosaïekvirus in 'n aktiewe toestand gestoor is. Hy het hierdie effek toegeskryf aan die feit dat die viruspartikels teen mikrobiële degradering beskerm word. Humiensure het egter die graad van infektiwiteit van die mosaïekvirus in die tamatieplant op 'n dosis-afhanklike wyse verlaag. Volgens die outeur kan hierdie verlaagde infektiwiteit die gevolg wees van interaksie tussen die virus en humiensure, alhoewel daar ook 'n moontlike humiensuur-geïnduseerde fisiologiese verandering in die plant kan ontstaan.

Humiensure het ook antivirale aktiwiteit teen dier- en menslike virusse getoon. Uitgebreide ondersoek op die antivirale effek van humiensure is onderneem ná die suksesvolle behandeling van bek-en-klou-seer by varke (Schultz, 1962). Reeds tydens die eerste *in*



in vitro studies op coxsackie A9 (Klöcking & Sprössig, 1972) en herpes simplexvirus (HSV)(Klöcking & Sprössig, 1975; Thiel *et al.*, 1977) is bewys dat humiensure effektief teen DNA virusse, met en sonder 'n lipiedmembraan, is. Dieselfde geld ook vir sintetiese humiensure (Thiel *et al.*, 1976; Klöcking *et al.*, 1983; Eichhorn *et al.*, 1984; Hils *et al.*, 1986) wat deels selfs beter effektiwiteit as die natuurlike substansie toon (Thiel *et al.*, 1981; Klöcking & Helbig, 1991). Hierdie sintetiese humiensure (fenoliese polimere) is deur middel van oksidatiewe polimerisasie van o- en p-difenole gesintetiseer (Klöcking *et al.*, 1977).

Neyts *et al.* (1992) beskryf die vermoë van humiensuuragtige polimere om sitomegaal- sowel as vaccinia virusse te inhibeer, terwyl dit onaktief is teen poliovirus tipe 1, parainfluenzavirus tipe 3, reovirus tipe 1 en sindbisvirusse. Hils *et al.* (1986) het die effektiwiteit van tien verskillende sintetiese polimere op verskeie stamme van influenza virus tipe A en B getoets en selektiewe aktiwiteit van die middels in al die stamme wat getoets is, gevind. Schols *et al.* (1991) het gerapporteer dat hierdie polimere die vermoë besit om die menslike immuungebrek virus ("human immuno deficiency virus") tipe 1 (HIV-1) en tipe 2 (HIV-2) te inhibeer.

Heelwat navorsing is reeds gedoen om die effektiwiteit van humiensubstansie teen HIV-1 en HIV-2 te ondersoek. Schneider *et al.* (1996) het 'n sintetiese humiensuuranalooë op die infektiwiteit van HIV partikels getoets en gevind dat dit inmeng met 'n V3-lus bemiddelde stap wat benodig word vir viruspenetrasie.

In die meeste gevalle inhibeer humiensure virusreplikasie in 'n vroeë stadium wanneer die virion vasheg aan selle, dit wil sê tydens adsorpsie (Klöcking & Sprössig, 1975; Klöcking & Helbig, 1991; Schols *et al.*, 1991; Neyts *et al.*, 1992). In die geval van sitomegaalvirus lyk dit asof die poli-anioniese humiensure positiefgelaaië gebiede van die virale kapselglikoproteïene beset wat noodsaaklik is vir virusvashegting aan die selwand (Neyts *et al.*, 1992).

Ammoniumhumaat het die replikasie van herpesvirus by konsentrasies van 0.5 mg/L en hoër inhibeer (Thiel *et al.*, 1977). By 'n konsentrasie van 20 mg/L het feitlik geen virus vermenigvuldiging meer plaasgevind nie. Klöcking *et al.* (1983) het gerapporteer dat herpesvirus hominis (herpes simplexvirus [HSV]), influenza- en coxsackievirusse onder humaat sensitiewe virusse tel. Die volgende konsentrasies word benodig vir inhibisie van die virusse (Klöcking & Sprössig, 1975): 21 mg/L vir HSV tipe 1, 40 mg/L vir influenzavirus B en 100 mg/L vir coxsackievirus A9. Vir 'n aantal ander virusse wat getoets is, soos echo-, adeno- en vacciniavirus, was die vereiste ammoniumhumaat konsentrasie wat benodig is vir virus-inhibisie, heelwat hoër as 1000mg/L. Die outeurs is van mening dat ammoniumhumaat se werking hoofsaaklik gerig is teen die vermenigvuldiging van HSV tipe 1 deurdat dit hoofsaaklik die adsorpsie aan die gasheersel blokkeer terwyl intrasellulêre virusreplikasie min geaffekteer word. Preïnkubasie van gasheerselle (konyn-nierselle) met ammoniumhumaat (>10 mg/L), het die sel teen infeksie met die virus beskerm. Ammoniumhumaat, wat *in vitro* reeds by 'n lae konsentrasie van 0.1 mg/L teen sekere virusse effektief was (Thiel *et al.*, 1981), is by 'n konsentrasie van 1% vir die behandeling van HSV-geïnduseerde velsiektes by mense, soos herpes facialis, herpes integumentalis en herpes labialis gebruik (Klöcking *et al.*, 1983). Uit 78 pasiënte wat met herpesvirus hominis (HSV) infekteer was, het 90% goed reageer op terapie met 'n 1% ammoniumhumaatoplossing wat daaglik verskeie kere aangewend is (Schiller *et al.*, 1979). Geen sekondêre newe-effekte is waargeneem nie.

Effek van humiensure op tumore

Humiensure wat verkry is uit gehumidifiseerde organiese materiaal (Sato *et al.*, 1986) of die oksidering van steenkool (Bernacchi *et al.*, 1996) tree nie op as mutagene nie maar kan desmutagenies (Sato *et al.*, 1986) wees en daardeur die mutagenisiteit van geselekteerde mutagene inhibeer.

Die antitumor eienskappe van humiensure is eerstens deur Zsindely *et al.* (1971) ondersoek en hulle het gevind dat muise wat 10-40 mg humiensure oraal vir 5 dae ontvang het nádat askitis sarkoma of limfoma intraperitoneaal toegedien is, betekenisvolle vermindering in die volume askitis vloeistof sowel as in die aantal tumorselle daarin, toon. Hulle het ook

gevind dat die humiensuurbehandeling 'n 20 – 25% afname van RNA en DNA in die tumorselle veroorsaak.

Die funksie en struktuur van maligne- en normale selle verskil dikwels van mekaar en daarom sal dit vir sekere verbindings moontlik wees om op spesifieke tipes karsinomas in te werk (Bennet & Connon, 1957). Dit kan dan ook die rede wees vir die suksesvolle beheer van kanker van die uterus by rotte (Davies, 1996) deur behandeling met humiensure wat hoogs oppervlak-aktief is (Visser, 1964; Visser, 1982).

Adamek (1976) het rapporteer dat 'n veenpreparaat wat oraal, rektaal of intramuskulêr in die omgewing van 'n tumor aangewend is, stuiting of regressie van die maligne proses veroorsaak.

Humiensure as detoksifiserende middels

Fuchs *et al.* (1982) het 1% humiensure by die kos van rotte gevoeg waarna 'n afname in die serumvlakke van Cu en Zn waargeneem is. Hierdie bevinding kan toegepas word by die behandeling van individue wat aan hoë vlakke toksiese stowwe blootgestel is. Omdat humiensure met verskeie tipes organiese verbindings kan reageer, sal hulle die skadelike effek van sekere endogeniese- en eksogeniese organiese toksiene sowel as hulle metaboliete reduceer. Solovyeva & Lotosh (1984) het byvoorbeeld gevind dat 70% van die muise wat met natriumhumaat behandel is, dodelike dosisse strignien oorleef het.

Dieselfde outeurs het rapporteer dat natriumhumaat die detoksifiserende funksie van die lewer, in die geval van koolstoftetrachloried-geïnduseerde hepatitis, stimuleer.

Die detoksifiserende werking van humiensure word veral in gevalle van sekere plaagdoders beskryf: die intestinale absorpsie van paratioon is byvoorbeeld verminder wanneer dit gelyktydig met humiensure aan rotte toegedien is (Fuchs *et al.*, 1986). Humiensure wat oraal of intradermaal toegedien is, het die asetielcholinesterase inhiberende aktiwiteit van die plaagdoder paratioon geneutraliseer (Kühnert *et al.*, 1982). Stimulasie in die produksie van antiliggamete teen die komplekse wat tussen humiensure en plaagdodermolekules

gevorm word, is waargeneem nadat die plaagdoder in kombinasie met humiensure aan rotte toegedien is (Lange *et al.*, 1985).

Effek van humiensure op littekenvorming en wondhelings

Dit is reeds genoem dat soldate met oorlogswonde in die 1ste Wêreldoorlog met veen vanaf die Spa-gebied in België behandel is (Van Beneden, 1971). Veen is direk op die wonde geplaas (Haanel, 1924) om infeksies te voorkom, maar ook pyn te verlig sowel as om die helingsproses van die wonde te bespoedig. Biber en Bogolyubova (1952) het gevind dat hase wat met humiensure ingespuut is, se wonde vinniger genees het. Faktore wat moontlik bydra tot die helingseffek van humiensure, is die anti-inflammatoriese eienskappe, bakteriostatiese werking sowel as die impak wat dit op die liggaam se steroïedproduksie het. Die bevinding deur Salz (1974) dat humiensure in baddens die bloedtoevoer na die vel verbeter het, kon ook bygedra het tot die suksesvolle terapie.

Effek van humiensure op bloed en bloedbestanddele

Solovyeva & Lotosh (1984) het anemie sowel as hipercholesterolemie effektief met humiensure behandel.

Obenaus *et al.* (1965b) het gevind dat humiensure met serumalbumien kan reageer (*in vitro*) en dat die teenwoordigheid van metale soos Pb en Fe die bindingsaffiniteit verbeter. Daar is immuno-elektroforeties bewys dat die immunologiese aktiwiteit van albumien nie deur genoemde reaksie affekteer word nie. Volgens Klöcking *et al.* (1967) vind die binding met albumien ook *in vivo* plaas: 69% van die humiensure wat intrakardiaal in rotte ingespuut is, was 20 minute later aan albumien gebind.

Poli-artritislyers wat behandel is deur te bad in humiensuurbaddens, se bloedalbumien vlakke was verlaag terwyl die globulienvlakke en die kortikosteroïedsekresie in die urine, verhoog was (Hiller, 1952; Hiller, 1953b). Hartman (1967) het waargeneem dat die albumien- en globulienvlakke aan die einde van die terapie weer na normale waardes teruggekeer het.

Humiensuurbaddens het ook verhoogde serum aminosuurvlakke by mense teweeggebring (Hiller, 1953a), waarskynlik as gevolg van die impak wat humiensure op die aminosuurpoel in die liggaam uitoefen. Daar is ook gevind dat hierdie baddens 'n verhoogde properdienvlak (serumproteïene wat reageer teen bakterieë en virusse maar ook 'n rol speel in die lise van eritosiete) tot gevolg gehad het (Reichert, 1966; Miehle & Thürigen, 1961).

Solovyeva *et al.* (1983) het gespekuleer dat die antitoksiese- en profilaktiese eienskappe van humiensure hoofsaaklik die gevolg was van die effek wat dit op die liggaam se immuunsisteem het. Omdat humiensure 'n fisiologiese uitwerking het op die immuunsisteem, hormoonproduksie sowel as op rumatoïede artritis, dui dit indirek op 'n opname daarvan deur die liggaam. Visser (1986) het aangevoer dat daar geen rede is waarom humiensure, ten spyte van hul hoë molekulêre massa, nie die sellulêre wande kan penetreer nie.

Klöcking (1994) het die invloed van 'n verskeidenheid sintetiese humiensuuragtige polimere (sintetiese fenoliese polimere) en humiensure op die fibrinolitiese- en koagulasiesisteme ondersoek. Sommige van hierdie verbindings het koagulasie verhoog terwyl ander dit weer stimuleer het. Hierdie studies is van belang omdat antivirale humiensure sowel as sintetiese humiensuuragtige polimere met geen of baie min antistollingseienskappe, geselekteer kan word. Aan die ander kant is daar weer van hierdie verbindings met profibrinolitiese en antistollingseienskappe wat moontlik getoets kan word om as potensiële antitrombotiese middels op te tree. Klöcking (1994) het ook gevind dat natrium humaat, ammonium humaat en 'n humiensuuragtige polimeer (5 en 10 mg/kg van elkeen) *in vivo* die aktiwiteit van die plasminogeen aktiveerder inhibeerder (PAI-1), wat 'n belangrike komponent van die fibrinolitiese sisteem is, in die bloed van rotte gereduseer het.

Volgens ondersoeke deur Yang *et al.* (1996) het natuurlike humiensure sowel as 'n sintetiese humiensuur wat met endoteelselle van menslike umbilikale arterieë geïnkubeer is, drasties verhoogde mRNA-vlakke van die weefselfaktor veroorsaak. Beide die verbindings (10-200 µg/ml) het ook die lewensvatbaarheid van gekweekte umbilikale arteriële



endoteelselle (UAES) inhibeer en ook oppervlak veranderinge daarin geïnduseer. Daar is ook gevind dat beide tipes humiensure die UAES gestimuleer het om plasminogeen aktiveerder inhibeerder (PAI-1) sowel as weefsel plasminogeen aktiveerder (w-PA) te produseer. Hierdie bevindings kan moontlike meganismes wees wat verantwoordelik is vir die trombotiese afwykings in swartvoetsiekte, 'n kroniese, perifere vasculêre siekte wat endemies is by inwoners aan die suidwestelike kus van Taiwan (Tseng *et al.*, 1961). Hierdie siekte veroorsaak swart verkleuring, ulsering, of gangreense veranderinge van die ledemate en Fau *et al.* (2000) het bevind dat humonsuur 'n potensiële toksien in die drinkwater van swartvoetsiekte-endemiese areas in Taiwan kan wees. Die bydrae wat humiensure tot die ontwikkeling van swartvoetsiekte lewer, word egter gekompliseer deur die teenwoordigheid van swaar metale, veral arseen, in die omgewing wat as 'n ander moontlike oorsaak van swartvoetsiekte beskou word. Aangesien humiensure 'n sterk chelator is, is dit volgens Gau *et al.* (2000) en Lu *et al.* (1988) moontlik dat humiensure gekonsentreerde arseen in 'n humiensure-metaal kompleks kan akkumuleer wat sinergisties meer ernstige effekte op endoteliale selle kan hê. Aangesien die uitdruk van adhesiemolekules sowel as die aktivering van nukleêre faktor kappa B (NF- κ B) 'n belangrike rol speel in die immuunrespons en inflammasie, is die effek van humiensure op die uitdruk van menslike vasculêre endoteliale-leukosiet vashegtingsmolekules en die aktivering van NF- κ B in menslike umbilicale arteriële endoteliale selkulture (UAES) ondersoek. Die uitdruk van intersellulêre adhesie molekule-1 (ICAM-1), vasculêre sel adhesie molekule-1 (VCAM-1) en E-seleksien is vloeisitometries bepaal. Humiensurebehandelde UAES het die lipopolisakkaried (LPS)-geïnduseerde uitdruk van al drie adhesiemolekules op 'n tyd- en dosisafhanklike manier inhibeer. Aangesien die uitdruk van hierdie adhesiemolekules deur NF- κ B gereguleer kan word, het hierdie outeurs die effek van humiensure op LPS-geaktiveerde NF- κ B bepaal en gevind dat dit op 'n dosis- en tydafhanklike manier geïnhibeer word. Al hierdie data dui daarop dat humiensure die LPS-geïnduseerde uitdruk van adhesie molekules deur inhibisie van NF- κ B-aktivering kan inhibeer en dat NF- κ B moontlik 'n kritiese rol in die patogenese van swartvoetsiekte speel. Soos reeds voorheen vermeld, is swaar metale, veral arseen, in die omgewing teenwoordig wat met humiensure kan komplekseer om sinergisties 'n meer ernstige effek op endoteliale selle te hê (Gau *et al.*, 2000).

Effek van humiensure op die adrenale korteks en die ovariale sisteem

Re & Gualtierotti (1964) het gedemonstreer dat intraperitoneale inspuiting met Salhumin® (bevat veenekstrak tesame met salisielsuur) estrogeenagtige eienskappe besit, wat die ryppwording van die follikels en vergroting van die ovaria by onvolwasse marmotte versnel. Hartman (1967) het ook 'n verhoging in die endokriene aktiwiteit van die ovariale sisteem, na orale toediening van die preparaat Gynasän® (bevattende estriol, humiensure en dimetiel-amino-ethanolbitarraat) aan vroue, waargeneem.

By meer as 50% van pasiënte wat 'n bad wat salisielsuur in kombinasie met veenhumiensuur bevat, geneem het, was die kortikosteroïede inhoud van die uriene die volgende dag met 50 – 100% verhoog (Hiller, 1953b). Hierdie effek is toegeskryf aan 'n stimulasie van die adrenale korteks deur die salisielsuur/humiensuur kombinasie wat ook 'n verhoging in die urien estrogeen by mans sowel as vroue, teweeggebring het. Ander navorsers het ook gevind dat humiensuurbaddens die produksie van glukokortikoïede verhoog het deur die aktiwiteit van die adrenale korteks te stimuleer (Hiller, 1953b; Reichert, 1965).

Aangesien veen klaarblyklik estrogeenagtige substansie bevat (Wehefritz & Gierhake, 1933; Munteanu, 1937; Van Beneden, 1971) is verdere navorsing belangrik om vas te stel of die fisiologiese effekte wat waargeneem is, aan hierdie substansie of aan humiensure toegeskryf kan word. Dit is wel moontlik dat die estrogene wat in modderekstrakte teenwoordig is, die menstruele siklus van vroulike pasiënte kan affekteer (Hosemann, 1953).

Effek van humiensure op die tiroïedklier

Dit lyk asof humiensure meestal oor voordelige fisiologiese eienskappe beskik. Daar is egter al na humiensure, tesame met urokrome ('n afbraakproduk van hemoglobien en verwant aan galpigmente) verwys as die moontlike oorsaak van endemiese goiter by die mens (Galčenko, 1950; Hettche, 1955; Hettche, 1956; Woodward, 1963; Burkat, 1965). Humiensure besit baie eienskappe wat baie na verwant is aan dié van urokrome en kan nie maklik van mekaar onderskei word nie (Knorr *et al.*, 1963). Die goitrogeniese werking van urokrome kan verduidelik word deur hul vermoë om Cu^{++} te komplekseer, wat verwant is

aan die effek wat hulle op tiroksiensintese het (Hettche, 1955; Hettche, 1956) en die fiksering van jodium deur hierdie substansie kan moontlik die werking van die tiroïedklier affekteer. Janeček & Chalupa (1969) sowel as Klatte & Helpap (1964) het rotte vir etlike weke met humiensure gevoer en geen goitrogeniese aktiwiteit, naamlik verandering in die grootte of histologiese eienskappe van die tiroïedklier, waargeneem nie. Die afwesigheid van goitrogeniese aktiwiteit by beide humiensure en urokrome is deur Wurmbach *et al.* (1962) en Schierbaum (1966) bevestig. Re & Gualtierotti (1964) het egter gevind dat veenekstrak die tiroïedklier stimuleer en die metamorfose van paddavissies na paddas bespoedig. Hartman (1967) het ook 'n stimulerende effek op die aktiwiteit van die tiroïedklier tydens humiensuur behandeling waargeneem, maar Khristeva *et al.* (1957) het 'n vertraging in die groei van rotte wat met humiensuur-ryke materiaal gevoer is, rapporteer.

Anti-inflammatoriese eienskappe van humiensure

Die doeltreffende anti-inflammatoriese eienskappe van humiensure is deur Klöcking *et al.*, (1968) uitgewys. Hulle het kunsmatig edeem by rotte aangebring deur een van twee metodes te volg: (a) 'n proteïenoplossing is in die agterbene gespuit of (b) 'n granuloomsak is onder die rugvel bewerkstellig deur eerstens lug onder die vel in te spuit waarna inflammasie en die vorming van 'n eksudaat aangemoedig is deur krotonolie in die lugsak in te spuit. Humiensure wat intraperitoneaal vir die rotte ingespuit is, het beide die volume van die edeem by die agterpote sowel as eksudaatvorming in die granuloomsak verminder en was selfs meer effektief en minder toksies as ander beproefde geneesmiddels waarmee dit vergelyk is. Taugner (1963) het gevind dat 'n intraveneuse inspuiting van natriumhumaat die vorming van edeem by rotte betekenisvol reduceer het. Salz (1974) het 'n humiensuur-bevattende preparaat met anti-inflammatoriese, hiperemiese (bloedvloei verhogende) en pynverliggende eienskappe ontwikkel, naamlik Salhumien®-jel wat uit die volgende bestaan het: Humiensure, 0.8%; salisielsuur, 0.2%; etileenglikolmonosalisielsuurester, 5.0%; bensielnikotiensuurester, 1.0%; kamfer, 0.5% en jel, 92.5%. Persone wat las het van edeem, flebitis (aaronsteking) of post-trombotiese toestande, het goed op terapie met Extranit® (hierdie produk bevat gekombineerde salisielsuur en humiensure) reageer. Hierdie behandeling het 'n langdurige hiperemiese en anti-



inflammatoriese werking getoon. Motohisa *et al.*, (1973) het veluitslag by mense suksesvol behandel deur gebruik te maak van Na-nitrohumaat-bevattende baddens.

Alhoewel terapeutiese baddens met veenekstrak reeds jare lank gebruik word om mediese probleme mee te behandel of te genees (Eichelsdörfer, 1976), is die terapeutiese werking daarvan steeds betwisbaar. Sommige navorsers meen die persoon word hoofsaaklik fisies gestimuleer terwyl ander weer glo dat komponente wat die vel binnedring, 'n fisiologiese respons teweegbring.

Tydens behandeling van rumatoïede artritis is die hoofkomponente in die baddens gewoonlik salisielsuur in kombinasie met humiensure (huminsure wat met behulp van waterstofbinding 'n kompleks met salisielsuur gevorm het). Hierdie produk word onder verskeie handelsname bemark, soos byvoorbeeld Kalumat®, Kalumin®, Salhumin® en Sulumin® vir die behandeling van rumatiek. Pasiënte met klagtes oor pyn betreffende die ruggraat en verskeie gewrigte, is vir 20 minute, 3 maal per week en oor 'n tydperk van 5 weke, met Salhumin® baddens by ongeveer 38^oC behandel. Pynverligting, verslappening in spanning van die rugspiere en vryer beweeglikheid was van die waarnemings waaroor pasiënte rapporteer het (Brandt, 1964). Die baddens het tydelike verligting vir mense wat aan osteochondrose (verbening van kraakbeen) en osteoartritis van die rugmurg en gewrigte ly, gebring. Salisielsuur/huminsure-baddens (2.5% huminsure en 47% salisielsuur) het 'n gunstige effek op pasiënte wat aan rumatoïede artritis ly, gehad (Miehlke & Thürigen, 1961). Salz (1974) het die volgende siektetoestande of beserings suksesvol met Salhumin®-jel behandel: spierverharding, ruggraatprobleme, osteochondrose, artrose (nie-inflammatoriese artritis), kneusplekke, distorsie, ligamentskeuring, hematoom (gelokaliseerde akkumulering van bloed), kroniese rumatoïede artritis, lumbago (rugjig) en heuppyn.

Dit lyk asof salisielsuur/huminsurebaddens weefsel meer vatbaar maak vir die werking van glukokortikoïede, wat dit moontlik maak om die ongewenste hoë dosisse kortison en adrenokortikotrope hormone (AKTH) wat dikwels in die behandeling van rumatoïede artritis gebruik word, te verminder (Fellinger & Schmid, 1953; Schmid, 1953). Die

verliggende effek op rumatiek wat deur terapeutiese baddens teweeggebring word, kan volgens Seleye (1951) moontlik via 'n verhoging in kortisoon formasie en stimulasie van die hipofiese-adrenale korteks, aanleiding gee tot verhoogde glukokortikoïede produksie (Hiller, 1953b).

Beide humiensuur en salisielsuur het volgens Mathies & Lutz (1960) hialuronidase inhiberende eienskappe getoon en moet die inhibisie van hialuronidase tydens salisielsuur/humiensuurbaddens dus aan beide komponente toegeskryf word. Die presiese rol van humiensure self tydens die behandeling van rumatoïede artritis, bly onseker. Sekere outeurs ontken selfs enige betrokkenheid van humiensure en skryf die response wat waargeneem is toe aan die meegaande salisielsuur komponent, die verhoogde temperatuur van die badwater of aan substansie van mikrobiale, plantaardige of dierlike oorsprong wat die humiensuur vergesel. Omdat die hialuronidase-inhiberende aksie van bloedserum deur estrogene verhoog word (Sprunt *et al.*, 1938; Wattenberg & Glick, 1949; Vasterling, 1958), meen Lotmar (1960) en Taugner (1963) dat die antirumatiese en anti-inflammatoriese werking van salisielsuur/veenhumiensure nie deur hierdie komponente nie, maar wel deur die estrogene wat hulle bevat, bewerkstellig word. Hiller (1953a; 1953b) het weer gemeen dat dit moontlik is dat die hialuronidase-inhiberende aksie die resultaat van 'n humiensuur-geïnduseerde verhoging in die interne sekresie van die estrogene estradiool en estroon, is. Dit lyk dus of die effek op die hialuronidase aktiwiteit in die liggaam waarskynlik nie die gevolg van 'n direkte interaksie tussen die ensiem en die humiensuur is nie, maar eerder die gevolg van 'n impak wat humiensuur op sekere kliere of ander fisiologiese liggaamsprosesse het om sodoende op 'n indirekte wyse, die hialuronidase aktiwiteit te affekteer.

Volgens Kühnert *et al.*, (1982) is die anti-inflammatoriese werking van humiensure ten minste net so effektief as die bekende anti-inflammatoriese middel dimetiel sulfoksied (DMSO), en Klöcking *et al.* (1968) voer aan dat dit hoofsaaklik aan die polifenoliese struktuur van die humiensuurmolekules toegeskryf kan word. Die bloedvloei-stimulerende eienskap van humiensuur mag moontlik ook tot die anti-inflammatoriese werking daarvan bydra (Salz, 1974).

Nadat die anti-inflammatoriese effekte van humiensure reeds vir baie jare lank ondersoek is, het Klöcking (1994) eers redelik onlangs 'n aanvaarbare biochemiese verduideliking daarvoor verskaf: Daar is gedemonstreer dat natrium- en ammoniumhumaat, en selfs in 'n groter mate 'n sintetiese humiensuur, die lipoksigenase pad (aragidoonsuur kaskade) inhibeer. Hierdie lipoksigenase pad word direk gekoppel aan die inflammatoriese aktiwiteit via die degradering na leukotriene vanaf vrygestelde aragidoonsuur as gevolg van letsels op die plasmamembraan. Leukotriene tree as inflammatoriese bemiddelaars op wat vaskulêre deurlaatbaarheid, vorming van edeem, leukosiet infiltrasie, ensiemvrystelling sowel as superoksiedproduksie bevorder. In teenstelling met die lipoksigenase pad, is prostaglandien sintese, wat die alternatiewe metabolisme van aragidoonsuur is, glad nie of slegs in 'n geringe mate deur die humiensubstansie beïnvloed. Volgens Breng *et al.* (1981) was byna 1100 µg/ml humiensuur nodig om die prostaglandien sintese van konyn nierhomogenate met 50% te inhibeer. Die deurdringingsvermoë van humiensure is uiters belangrik wanneer dit as 'n anti-inflammatoriese terapie aangewend word. Sintetiese humiensure is met radio-aktiewe koolstof gemerk en op *ex vivo* preparate van mensvel getoets. Daar is gevind dat 30 tot 60 % van 'n 1 gm/100 ml ¹⁴C-sintetiese humiensuursalf die horinglaag van die vel binnegedring het terwyl 1 tot 3 % daarvan die epidermidis en dermis binne 30 minute bereik het. Hierdie konsentrasie is voldoende om sekere terapeutiese effekte te verduidelik en kan dalk selfs deur variasie van die basiese room verbeter word.

Iubitskaia & Ivanov (1999) het rapporteer dat natrium humaat in balneoterapie vir osteoartrose pasiënte anti-inflammatoriese en lipied modulerende effekte getoon het, analgeties was en metaboliese prosesse bevorder het.

Gau *et al.* (2001) het in opvolgstudies die effek van humiensure op die generasie van reaktiewe suurstofspesies vloeisitometries ondersoek. Hulle het weereens van die UAES-model gebruik gemaak en bevind dat humiensure die akkumulاسie van yster in endoteliale selle verhoog. Hierdie data dui daarop dat humiensure die generasie van reaktiewe suurstofspesies kan stimuleer deur 'n verhoging in die akkumulاسie van intrasellulêre yster

en dat dit 'n moontlike meganisme kan wees wat lei tot die aterotrombotiese vaskulêre skade by pasiënte met swartvoetsiekte.

Hseu *et al.* (2000) het bevind dat humiensure eginosiet formasie van menslike eritosiete induseer deur die vervanging van geöksideerde normale membraan proteïene met hoë-molekulêre-gewig proteïene. Humiensure het ook hemoglobien oksidasie in eritosiete induseer en die skrywers het tot die gevolgtrekking gekom dat die oksidatiewe stres sowel as direkte effekte wat op die sitoskelet van eritosiete uitgeoefen word, betekenisvolle faktore in die etiologie van swartvoetsiekte kan wees.

Effek van humiensure op immuunstimulasie

Die profilaktiese en terapeutiese effekte wat met humate waargeneem is, kan volgens Solovyeva & Lotosh (1984) moontlik toegeskryf word aan die impak wat hulle op detoksifiserende lewerfunksies, op verskillende ensiemaktiwiteite en op die liggaam se immuunsisteem het.

Lange *et al.* (1987) het stimulasie van rotte se immuunsisteem waargeneem nadat humiensure intragastries toegedien is. Algemene leukosiet en differensiële bloedtellings is uitgevoer, die fagositiese aktiwiteit is bepaal en die plasmaproteïene is analiseer deur van radiochemikalieë gebruik te maak. In 'n ander ondersoek deur Lange *et al.* (1985) is hoër leukosietellings en 'n verhoging in globulienvlakke by rotte waargeneem na die orale toediening van plaagdoders in kombinasie met humiensure, wat ook op stimulasie van die immuunsisteem dui. Laasgenoemde stimulasie is aan verhoogde sintese van antiliggame toegeskryf in respons op die molekulêre komplekse wat tussen die pesdodermolekules en humiensure gevorm is. Volgens Obenaus *et al.* (1965a) is dit moontlik dat humiensure as antigene kan optree en gevolglik antiliggame sou kon produseer, maar die heterogene karakter van die humiensuurmolekule het verdere navorsing in hierdie verband gekompliseer.

Die effek van drie verskillende lae-molekulêre humiensubstansie (twee natuurlike humate en een sintetiese humaat) is deur Riede *et al.* (1991) op neutrofielfunksies getoets. Al drie



die verbindings het sekere funksies van menslike neutrofiële stimuleer, soos byvoorbeeld die respiratoriese uitbarsting wat produksie van toksiese suurstofkomponente tot gevolg het. Waterstofperoksied (H_2O_2) was die vernaamste produk van die humaat-geïnduseerde neutrofielrespon, terwyl geen aktivering van chemotakse of chemokinese waargeneem is nie. Dit is moontlik dat die lae-molekulêre humiensubstansie, afkomstig van verrotte organiese materiaal, chemiese verbindings kan bevat wat as seine optree om rustende neutrofiële te aktiveer.

Netbalspelers het mondelings lae dosisse van Tolpa® Torf Preparation (TTP®) vir twee 21-dae siklusse, met rusperiodes van 2 weke tussen-in, ontvang (Inglot *et al.*, 1999). TTP® word verkry deur 'n proses wat deur Professor Tolpa patenteer is (Tolpa *et al.*, 1983) en bestaan uit 'n mengsel van minerale soute en organiese verbindings (sakkariedes, aminosakkariedes, aminosure, uriensure en humien substansie) wat in Pole as immuunstimulant vir menslike gebruik geregistreer is. TTP® het die produksie van interferon (IFN), tumor nekrose faktor (TNF), die akute fase proteïene α_1 -antitripsien sowel as immunoglobuliene (Ig), veral IgM en IgG, verhoog. Geen respiratoriese- of ander ongesteldhede (dikwels 'n probleem onder sportmense wat baie hard oefen) is tydens TTP® behandeling rapporteer nie en 9 uit 15 spelers het fikser gevoel as voor die behandeling.

Jankowski *et al.* (1993) het 39 jong pasiënte wat las gehad het van herhaalde lugweginfeksies, in twee groepe verdeel en as volg behandel: 20 pasiënte het daaglik 5 mg TTP® mondelings ontvang terwyl die ander 19 pasiënte in die plek daarvan 'n plasebo preparaat ontvang het. Drie maande later is by 14 van die 20 TTP® behandelde pasiënte en by 8 van die 19 plasebo pasiënte, gunstige kliniese waarnemings rapporteer. Daar was betekenisvol minder gevalle van respiratoriese lugweginfeksies by die TTP® behandelde groep in vergelyking met die plasebo groep. By die eersgenoemde groep is ook 'n betekenisvol verhoogde fagosietaktiwiteit van hul perifere bloedgranulosiete, in vergelyking met die plasebo groep, waargeneem. Hierdie betekenisvolle verskille tussen die twee groepe is selfs nog ná 6 maande, tydens opvolgondersoeke, waargeneem. Volgens die outeurs het hierdie pasiënte voorheen gereeld respiratoriese lugweginfeksies opgedoen

en is met verskeie antibiotika, wat slegs kortstondige verligting gebied het en wat fagositose kon inhibeer (Melezyńska-Matej *et al.*, 1981), behandel. Nie een van die kinders wat aan hierdie proef deelgeneem het, hoef tydens behandeling gehospitaliseer word nie en geen ongunstige newe-effekte is waargeneem nie. Volgens Jankowski *et al.* (1993) is die moontlike oorsaak vir herhaalde respiratoriese lugweginfeksies by kinders, verswakte T-sel en B-sel funksies sowel as 'n verlaging in die T-sel subpopulasies. Dit is ook reeds in pre-kliniese ondersoeke bewys dat Tolpa® Torf Preparation immuunmodulerende aktiwiteite besit (Skopińska-Różewska *et al.*, 1991).

Zbigniew *et al.* (1993) het ook sekere immunologiese parameters in gesonde mense ondersoek wat dosisse van 'n Tolpa® Torf Preparation by konsentrasies van 50, 100, 300 en 600 mg per dag vir 14 dae, ontvang het. 'n Verlaagde produksie van interleukien (IL)-2 is met alle konsentrasies waargeneem, maar was meer prominent by hoër dosisse van TTP®. Terselfdertyd was die persentasie T-limfosiete aanvanklik verhoog en statisties betekenisvol by ≥ 100 mg dosisse van TTP®, maar na 28 dae het dit weer drasties verminder. Die vermoë van limfosiete om IL-1 te produseer, sowel as die spontane en fitohemagglutininien (PHA)-gestimuleerde uitdrukking van reseptore vir IL-2 en transferien reseptore, is ook ondersoek maar geen betekenisvolle veranderinge is waargeneem nie. Vrywillige deelnemers aan hierdie proef wat 600 mg TTP® daaglik ontvang het, het 'n verhoogde CD4/CD8 verhouding getoon en die sitotoksiese aktiwiteit van groot granulêre limfosiete ("natural killer cells", NK-selle) was ook verhoog. 'n Betekenisvolle afname is egter met die reaksie teen allo-antigene in gemengde limfosietreaksies, asook in die produksie van IL-2 en tumor nekrose faktor α (TNF- α) deur rustende sowel as gestimuleerde makrofage, waargeneem. Die vlakke van die immunoglobuliene IgG, IgM en IgA was onveranderd. Die outeurs beskou hierdie resultate egter slegs as voorlopige data, aangesien baie klein eksperimentele groepe gebruik is wat individuele verskille getoon het en omdat 'n plasebo groep nie ingesluit was nie, kan geen definitiewe gevolgtrekkings hieruit gemaak word nie.

Na aanleiding van pre-kliniese studies wat getoon het dat TTP® die fagositiese aktiwiteit sowel as die bakterisidiese eienskappe van muisgranulosiete stimuleer, is 'n soortgelyke

ondersoek op gesonde mense herhaal (Kowalska *et al.*, 1993). Daar is gevind dat daaglikse dosisse van 100-300 mg TTP® vir 14 dae, die fagositiese en bakterisidiese aktiwiteit van gesonde mense se granulose stimuleer terwyl 'n daaglikse dosis van 600 mg slegs 'n kortstondige en geringe stimulasie van hierdie aktiwiteite veroorsaak het. Volgens hierdie outeur kan dit dus aanvaar word dat TTP® vir die behandeling van infeksies, veral by pasiënte met 'n verlaagde fagositiese en bakterisidiese potensiaal, aangewend kan word.

Obmińska-Domoradzka *et al.* (1993) het Balb/c muise met Tolpa® Torf Preparation behandel en met behulp van 'n timus-afhanklike antigeen bepaal of die humorale respons daardeur beïnvloed is. Daaglikse dosisse van 1, 10 en 50 mg/kg TTP® is mondelings oortydperke van 3, 5, 7, 9 of 12 opeenvolgende weke vir die muise ingegee. Na elke bogenoemde periode is die primêre respons op skaaprooibloedselle (SRBS) ondersoek deur die persentasie splenosiet-vormende E-rosette, die aantal splenosiete wat anti-SRBS hemolisiene produseer en die vlak van serum hemagglutiniene teen SRBS, te bepaal. 'n Verhoogde humorale respons deur TTP® is by al drie dosisse waargeneem. Hierdie verhoging was egter dosis en tyd-afhanklik. So byvoorbeeld het 'n daaglikse TTP® dosis van 1 mg/kg die humorale respons vir die volle 12 weke gestimuleer, terwyl die 10 en 50 mg/kg dosisse slegs tydens die eerste 5 – 7 weke 'n effek gehad het.

Obmińska-Domoradzka (1993) het in 'n soortgelyke eksperiment 'n enkele dosis siklofosfamied (200 mg/kg) intraperitoneaal aan muise toegedien wat immuunonderdrukking tot gevolg gehad het. Die muise is óf 24 óf 144 uur daarna met SRBS geïmmuniseer en op dieselfde dag, asook vir drie opeenvolgende dae, is dosisse van 10 en 50 mg/kg TTP® intraperitoneaal toegedien. As 'n paralelle vergelykende kontrole vir TTP®, is kalf timus ekstrak in dosisse van 1 en 5 mg/kg aan muise toegedien. Laasgenoemde ekstrak is 'n biologies aktiewe immuunmodulator wat algemeen in menslike geneesmiddels gebruik word om eritrosiete, granulose en limfosiete mee te stimuleer. Die onderdrukte humorale immuunrespons van die muise is gedeeltelik of heeltemal deur TTP® herstel, maar die aktiwiteit was weereens dosisafhanklik en die tydberekening tussen toedienings van siklofosfamied en daaropvolgende immunisering met SRBS, was van belang. In teenstelling hiermee het die kalf timus ekstrak nie die onderdrukkende werking

van siklofosfamied verander nie, maar het wel die splenosiet-vormende E-rosette gestimuleer.

'n Morfologiese studie van die timus (die sentrale limfatisiese orgaan waar rypwording en differensiasie van T-limfosiete plaasvind) is deur Madej *et al.* (1993) uitgevoer om die timotropiese effek van langdurige TTP®-toediening aan muise, te ondersoek. Daaglikse dosisse van 1, 10 en 50 mg/kg TTP® is oor tydperke van 3, 5, 7, 9 en 12 weke in drinkwater aan muise gegee. Histopatologiese en ultrastrukturele studies het getoon dat al drie dosisse van TTP® morfologiese veranderinge, wat kenmerkend van timusaktiwiteit is, meegebring het. Die 10 en 50 mg/kg dosisse wat langer as 7 weke toegedien is, het egter aanleiding gegee tot sekondêre inhibisie van die timusfunksie wat nie met 1 mg/kg TTP® die geval was nie. Wanneer TTP® dus oor lang tydperke voorgeskryf word, sou dit volgens hierdie outeurs raadsaam wees om klein dosisse, met periodieke intervalle, te gebruik.

1.1.1.2 Toksikologiese Studies met Humiensure

Pre-natale toksikologiese ondersoeke van rotte wat met humiensure (natriumhumaaat) behandel is, het geen opsigtelike teratogeniese effekte getoon nie (Golbs *et al.*, 1982). Intraperitoneale toediening (50 mg/kg) het beter absorpsie van humiensure tot gevolg gehad in vergelyking met mondelinge toedienings (1000 mg/kg). Geen afwykings in ossifisering, sigbare mikroskopiese of makroskopiese misvorming of tekens van verstandelike vertraging is by die eksperimentele groep, in vergelyking met die onbehandelde kontrole groep, waargeneem nie. Volgens hierdie outeurs kan humiensure, sonder enige risiko, profilakties, terapeuties of metafilakties vir dragtige diere ingegee word.

In 'n soortgelyke studie het Lange *et al.* (1996a) die effek wat 'n lae molekulêre sintetiese humiensuur (HS 1500) op die pre- en postnatale ontwikkeling van rotte het, ondersoek. Nadat 1000 mg/kg en 2000 mg/kg HS 1500 mondelings op verskillende stadiums van swangerskap aan dragtige rotte gegee is, is geen nadelige effekte daarvan op moeders sowel as fetusse waargeneem nie. Die middel kan dus aan dragtige diere gegee word en

behandeling van byvoorbeeld gastroïntestinaleweg siektes tydens swangerskap kan as veilig beskou word.

Dit word ook deur Lange *et al.* (1996b) aangevoer dat 'n humiensuur dosis van 5 g/kg voer, wat oor 'n tydperk van 100 dae aan rotmannetjies gegee is, geen bewysbare effek op hul reproduksieparameter gehad het nie.

1.1.1.3 Farmakokinetika van Humiensure

Lange *et al.*, (1996b) het 'n sintetiese humiensuurverbinding (HS 1500) met radioaktiewe ^{14}C gemerk en 'n eenmalige mondelinge dosis daarvan vir rotte ingegee. Vir die spesifieke omstandighede is klein hoeveelhede van die lae molekulêre humiensure vir 'n kort tydperk uit die gastroïntestinale kanaal geabsorbeer. Die biobeskikbaarheid van die verbinding is baie laag aangesien minder as 0,1% van die hoë toegediende dosis uiteindelik in die sisteem beskikbaar was. Nadat die sintetiese humiensuur (500 mg/kg) mondelings toegedien is, was die halfleeftyd 1.5 ure en die maksimale vlakke daarvan in die plasma, 3 $\mu\text{g/ml}$. Hierdie resultate dui volgens Lange *et al.*, (1996b) daarop dat humiensure by hoë dosisse wat mondelings toegedien is, toksikologies veilig is en dat dit hoogs onwaarskynlik is dat enige substans in die weefsels sal agterbly.

1.1.1.4 Hergenerasie van Humien- en Fulviensure vanaf Steenkool

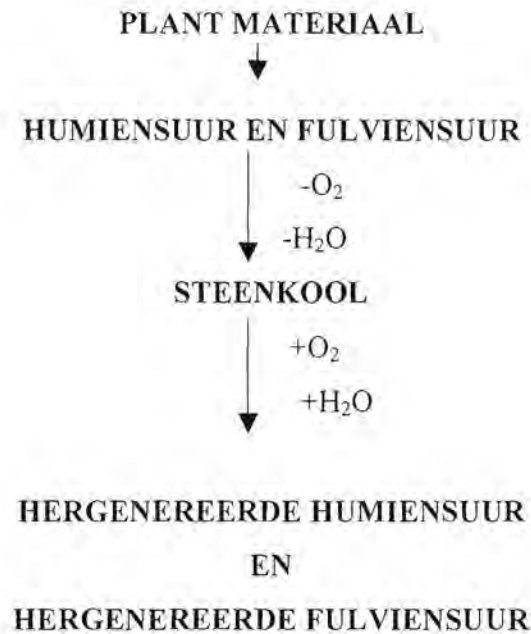
Die vorming van steenkool is die finale resultaat van 'n diagenetiese proses wat begin by lae molekulêre gewig substansie soos humien en fulviensure wat deur die verlies van funksionele groepe en kondensasiereaksies, tot die vorming van 'n onoplosbare tridimensionele netwerk lei (Rausa, 1994). Die organiese struktuur van hierdie netwerk en dus die kenmerke daarvan wat betref die aromatisiteit en inhoud van funksionele groepe, hang af van die spesifieke geskiedenis (bv. neerleggingstyd, temperatuur en aanvanklike samestelling) van die steenkool en het gewoonlik betrekking op die graad van die steenkool self. Medium graad steenkool kan spontaan lei tot depolimerisasie van die oorspronklike

struktuur en na die produksie van 'n substraat wat maklik in kleiner, oplosbare fragmente verander kan word (Rausa, 1994).

Laasgenoemde skrywer verduidelik verder dat hierdie transformasie teweeggebring kan word met behulp van 'n oksidasie proses, wat eintlik 'n omgekeerde diagenetiese proses genoem kan word, waartydens die molekules wat oorspronklik na die onoplosbare struktuur van die steenkool gelei het, hergenereer word.

In die natuur vind dieselfde proses oor langer tydperke plaas wanneer steenkool aan lug (suurstof) en water blootgestel word wat as verwerking bekend staan. Hierdie oksidatiewe steenkool omkeringsproses is dus soortgelyk aan die natuurlike verwerking van steenkool maar het die voordeel dat groot hoeveelhede oksihumien en oksifulviensure produseer word (Figuur 2, bladsy 27). Die chemiese oksidasie van steenkool lei tot fenoliese, karboksiliese, alifatiese en aromatiese sure (Bearse *et al.*, 1975; Wender *et al.*, 1981). Die samestelling van die produkmengsel hang af van die graad van die steenkool, die tipe oksidant en die toestande waaronder oksidering plaasvind (Bearse *et al.*, 1975; Wender *et al.*, 1981). Steenkool wat deur lug onder droë toestande geöksideer word, kan onder gekontroleerde toestande 'n produk met 'n hoë humiensuurinhoud vorm.

Rausa (1994) bevestig dat alhoewel steenkool-afkomstige humiensure chemies nie identies is aan die oorspronklike humiensure wat na steenkoolvorming gelei het nie en dat albei se presiese chemiese struktuur nog nie duidelik is nie, dit wel soortgelyke kenmerke en chemiese gedrag toon. Dit is 'n wateronoplosbare, swart amorfe vastestof waarvan die oplosbaarheid pH-afhanklik is.



Figuur 2: Skematiese voorstelling van die oksidatiewe proses waartydens die oorspronklike molekules, wat tot die vorming van steenkool lei, hergenereer word.

Een van die welbekende voordelige effekte van grondafkomstige humiensubstansie is dat hulle, onder sekere toestande, plantgroei kan stimuleer. Die groot volume literatuur wat oor hierdie onderwerp handel, is deur Vaughan & Malcolm (1985) opgesom. Stimulerende effekte waarvoor gerapporteer is, sluit die volgende in: Toename in die lengte van wortels en lote (Sladky, 1959a; Tan & Nopamornbodi, 1979; Rauthan & Schnitzer, 1981; Malik & Azam, 1985), toename in vars en droë massa van plante (Sladky & Tichy, 1959; Vaughan & Linehan, 1976), 'n toename in die aantal blare en blomme (Rauthan & Schnitzer, 1981) sowel as 'n toename in die opbrengs van oeste (Varshney & Gaur, 1974).

Humiensubstansie kan die metaboliese prosesse van plantweefsel *in vivo* (Vaughan & Malcolm, 1985) sowel as *in vitro* (Vaughan *et al.*, 1985) direk affekteer. Hierdie effekte hang waarskynlik in sommige gevalle af van (a) modifikasies van die

membraanvloeibaarheid en deurlaatbaarheid wat as gevolg van die interaksie tussen humienmolekules en die lipied matriks van die plasmamembraan ontstaan (Samson & Visser, 1989) en/of (b) inmenging met spesifieke ysterdraers (Vaughan & McDonald, 1971; Guminski *et al.*, 1983). Daar kan ook interaksies met metaboliese paaie na langdurige blootstelling aan humiensubstansie voorkom (Visser, 1987).

1.1.1.5 Oksihumaat

‘n Suid Afrikaanse maatskappy [Enerkom (Pty) Ltd] het enkele jare gelede ‘n unieke proses vir die nie-katalitiese oksidasie van ‘n waterige steenkoolsuspensie met suurstof of lug waardeur onder andere humien- en fulviensure verkry word, ontwikkel (Cloete *et al.*, 1990; Dekker *et al.*, 1990; Cronjé *et al.*, 1991; Bergh *et al.*, 1997). Die proses is relatief goedkoop en produksie op groot skaal is moontlik. Die vervaardigingsproses is die chemiese omkering van die verkolingsproses. Die vrygestelde humiensure is dus net so kompleks as die oorspronklike uitgangsmateriaal (Rausa, 1994). Om tussen hierdie steenkoolafkomstige produkte en die humien- en fulviensure wat natuurlik voorkom te onderskei, word die steenkool afkomstige produkte onderskeidelik **oksihumien-** en **oksifulviensure** genoem.

Die Enerkom Metode (SA patent 88/4770)

Geen skadelike chemikalieë word in die vervaardigingsproses gebruik nie, slegs water, suurstof en kaliumhidroksied (KOH). Daar is ook geen gevaar van skadelike of ongewenste afvalstowwe wat tydens die proses gevorm word nie. Die metode word kortliks as volg opgesom:

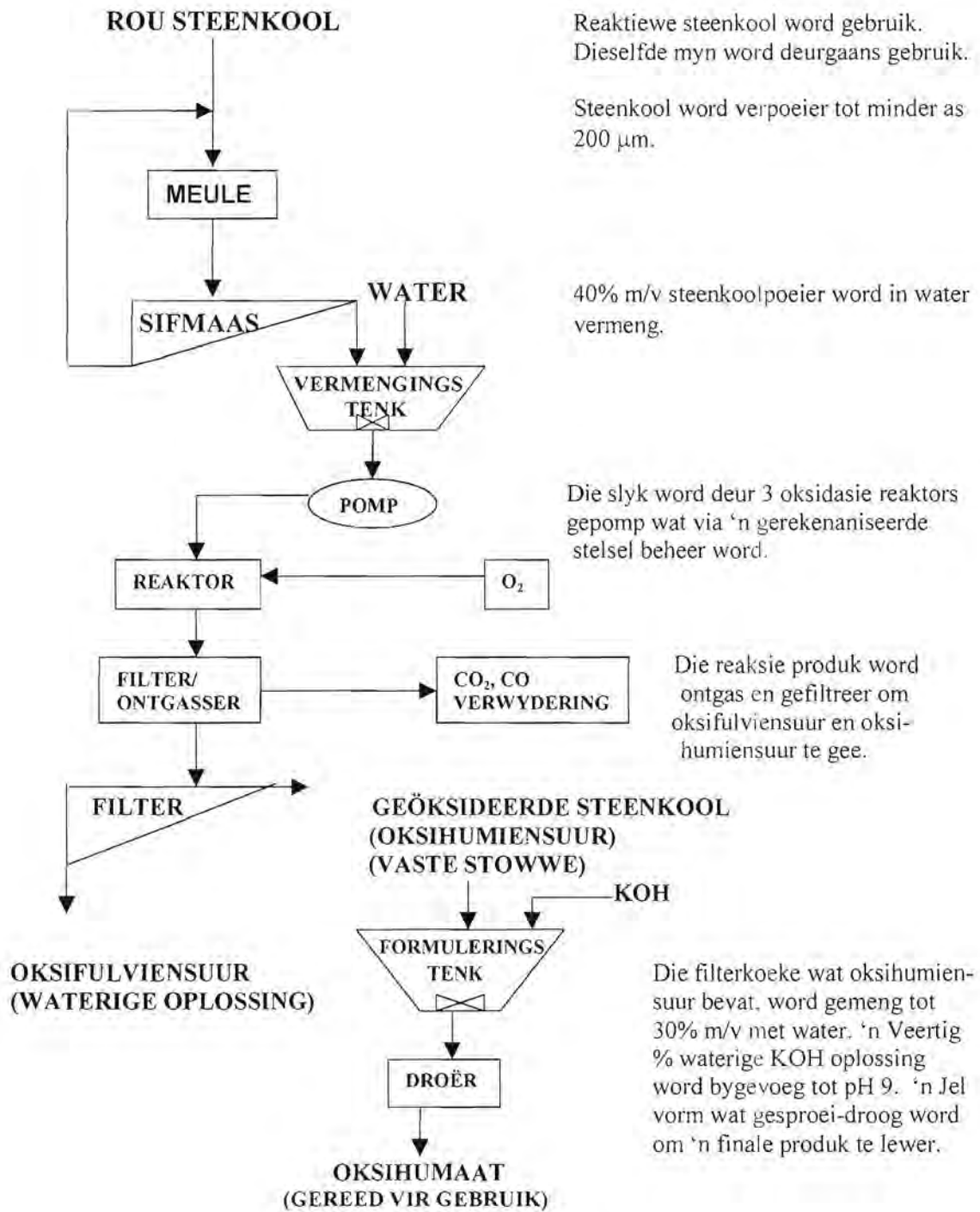
Verpoeierde bitumineuse steenkool (200 g) word deeglik met water (400 ml) vermeng om ‘n suspensie te vorm wat onder ‘n konstante druk (4 Mpa) vooraf verhit word. Wanneer die verlangde temperatuur (180⁰C) bereik word, word suurstof teen ‘n tempo van 8 L per minuut vir een uur lank deur die suspensie geborrel. Aangesien dit ‘n eksotermiese reaksie is, moet verkoeling toegepas word om die reaksiemengsel by 180⁰C te hou. Daarna word die reaksiemengsel na kamertemperatuur afgekoel en gefiltreer. Sodoende word die water-

onoplosbare gedeelte, wat humiensure bevat, van die water-oplosbare fulviensure geskei. Die Enerkom Metode word skematies in Figuur 3 (bladsy 30) voorgestel.

Volgens Dekker *et al.* (1990) is hierdie produkte potensieel bruikbaar om water mee te behandel en om grond fisies, chemies en biologies te verbeter.

Na aanleiding van genoemde en baie ander soortgelyke bevindings oor grondafkomstige humiensubstansie, het die vraag ontstaan of die steenkoolafkomstige produkte soortgelyke voordelige effekte op plantgroeï het. Daar is inderdaad gevind dat oksihumaat wat by ontkiemde sade in petribakkies gevoeg is, die groei van die saailinge stimuleer het (Van De Venter *et al.*, 1991). Nadat die loof van 15 spesies saailinge wat in grond gegroeï het, met steenkoolafkomstige natriumhumaat bespuit is, is groeistimulasie by 6 spesies waargeneem terwyl die groei by 2 spesies inhibeer is. Hierdie outeurs het tot die gevolgtrekking gekom dat faktore soos plantspesie, humaatkonsentrasie en die konsentrasie van makro-elemente in die groeimedia die potensiele groeistimulasie beïnvloed. Furter *et al.* (1996 + 1997) het groeimedia (sand sonder voedingstowwe) daagliks met oksifulviensuur-oplossing deurdrenk en gevind dat die lengte van die saailinge sowel as die vars massa van 'n verskeidenheid groente toegeneem het. Hierdie resultate korreleer goed met vorige studies in die literatuur waar humiensubstansie wat by grond met min organiese stowwe gevoeg is, 'n betekenisvolle respons getoon het (Pagel, 1960; Lee & Bartlet, 1976; Rauthan & Schnitzer, 1981).

Dit word deur van der Watt *et al.* (1991a) opgesom dat die ondergrondse suurgehalte 'n ernstige probleem in baie tropiese en subtropiese grond is. Die hoë suurgehalte, lae kalsiuminhoud en dikwels toksiese vlakke van oplosbare en/of ruilbare aluminium, benadeel die ontwikkeling van plantwortels in hierdie grond. Dit is bekend dat humiensubstansie komplekse met metale in die grond kan vorm. Van der Watt *et al.* (1991b) rapporteer dat 'n steenkoolafkomstige kalsiumfulvaat 'n hoogs doeltreffende draer van kalsium in die grondprofiel is en het ook 'n betekenisvolle toename in ondergrondse suurgehalte tot gevolg.



Figuur 3: 'n Skematiese voorstelling van die Enerkom Metode. Saamgestel volgens die SA patent 88/4770 (Cronjé, 1988).

Cloete *et al.* (1990) het elf bakteriële spesies uit industriële verkoelingssisteme geïsoleer waarop die effektiwiteit van geöksideerde steenkoolprodukte as bakterisidiese middels, getoets en met een-en-dertig kommersiële ontsmettingsmiddels, vergelyk is. Alhoewel sommige oksihumiensure ook belowende resultate gelewer het, was oksifulviensuur mees effektief as bakterisidiese middel. Die steenkool afkomstige bakterisidiese middels het goed met ander meer konvensionele produkte, wat tans in Suid Afrika gebruik word, vergelyk.

Die effek van oksifulviensuur verdunnings op die groei van agt mikrobiese patogene, is deur 'n groeimedium verdunningsmetode (Van Rensburg *et al.*, 2000) bepaal.

Streptococcus faecalis en *Klebsiella pneumoniae* was reeds by 'n konsentrasie van 5 g/L oksifulviensuur gevoelig, terwyl hierdie middel by 'n konsentrasie van 10 g/L teen *Pseudomonas aeruginosa* sowel as *Streptococcus pyogenes*, en 15 g/L teen *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* en *Candida albicans* aktief getoets is.

Anti-virale studies is suksesvol deur Van Rensburg *et al.* (2002) uitgevoer wat getoon het dat oksihumaat ook anti-HIV aktiwiteit besit. Die meganisme stem ooreen met dié van die sintetiese humiensuuranalooë wat deur Schneider *et al.* (1996) ondersoek is en op die inmenging met die V3-lus bemiddelde stap wat benodig word vir virus penetrasie, gedui het. Geen virale weerstandigheid het oor 'n tydperk van 12 maande *in vitro* ontstaan nie.

Na aanleiding van bogenoemde *in vitro* studies, het Botes *et al.* (2002) 'n fase I proef met orale oksihumaat in HIV-geïnfekteerde pasiënte uitgevoer wat veral gerig was op die veiligheids en toksisiteits profiel van die middel in hierdie pasiënte. Oksihumaat het geen meetbare toksiese effekte op HIV-geïnfekteerde individue gehad, wat vir 2 weke lank orale dosisse van 8 g per dag geneem het nie.

Beide oksihumaat en oksifulviensuur is op diere getoets [Progress Report: Biocon (Pty) Ltd, Pretoria, Suid Afrika, Julie 1999] en geen toksisiteit is tydens die subkroniese studies waargeneem nie. Diere het dosisse van tot 1000 mg/kg ontvang. Geen sterftes van diere as gevolg van die behandeling het voorgekom nie. Alhoewel klein veranderinge in die serum

proteïene en hematologiese parameters by diere wat meer as 100 mg/kg ontvang het, waargeneem is, was die enigste betekenisvolle abnormaliteit 'n verhoogde hematokrit by dosisse van 350 mg/kg en hoër en 'n afname in die limfosietelling by die 1000 mg/kg vlak. Diere wat kroniese langtermyn behandeling met hierdie middels ontvang het, het geen nuwe-effekte getoon nie.

Twaalf persent van ^{123}I – gemerkte oksihumaat wat oraal aan bobbejane toegedien is, het in die bloed voorgekom (Farmakokinetiese studie met oksihumaat op bobbejane: I Dormehl, Atomic Energy Corporation Institute for Life Sciences, Pretoria, Suid Afrika, Desember 1997). Daar kan dus aangeneem word dat 'n dosis van 2 gram, (m.a.w. 28.5 mg/kg) teoreties 'n serumvlak van 48 $\mu\text{g/ml}$ in volwasse mense sou kon produseer. Die toksisiteitsvlak van 100 mg/ml is farmakologiese betekenisvol, aangesien dit baie hoër is as die hoogste konsentrasie waarvan in hierdie studie (100 $\mu\text{g/ml}$) gebruik gemaak is. Die halfleeftyd van oksihumaat, soos deur farmakokinetiese studies aangedui, was 24 uur (Farmakokinetiese studie met oksihumaat op bobbejane: I Dormehl, Atomic Energy Corporation Institute for Life Sciences, Pretoria, Suid Afrika, Desember 1997).

Die *in vivo* effekte van oksifulviensuur is in twee loodsstudies, sowel as 'n fase I studie, ondersoek. Die middel het (i) kontak hipersensitiwiteit in 'n eksperimentele muis model asook (ii) ettervormende dermatitis by katte en honde effektief behandel (Van Rensburg *et al.*, 2001). Hierdie studies is respektiewelik by die Departement van Immunologie, Universiteit van Pretoria en die Hatfield Voël en Dier Hospitaal, Pretoria, uitgevoer. In beide gevalle het oksifulviensuur 'n betekenisvolle afname in die inflammatoriese respons getoon. Geen toksisiteit is gedurende akute sowel as sub-kroniese dermale blootstelling aan 5.3% oksifulviensuur room, waargeneem nie (Van Rensburg *et al.*, 2001). Snyman *et al.* (2002) het die veiligheid sowel as die terapeutiese effektiwiteit van oksifulviensuur room vergelyk met 1% hidrokortisoen en 'n plasebo room. Oksifulviensuur room (4.5% en 9%) het geen betekenisvolle effek op enige van die veiligheidsparameters gehad nie en het ook nie sensitisering induseer wanneer dit op die vel aangewend is nie. Oksifulviensuur het die inflammasie wat deur allergene teweeggebring is, in 'n geringe mate geïnhibeer. Hierdie effek van oksifulviensuur was dieselfde as wat deur hidrokortisoen veroorsaak is.



HOOFTUK 2

LITERATUUROORSIG: SELLE VAN DIE IMMUUNSISTEEM

2.1 INLEIDING

Die selle van die immuunsisteem kom normaalweg voor as sirkulerende selle in die bloed en limf, as gedefinieerde groepe selle in limfoïede organe en is ook wyd versprei in byna alle weefsels behalwe die sentrale senuweeweefsels. Die anatomiese organisasie van hierdie selle, hul vermoë om te sirkuleer en om tussen bloed, limf en weefsels uit te ruil is krities belangrik vir 'n immuunrespons. Immuunselle kan in vier funksionele groepe verdeel word, naamlik **mononukleêre fagosiete, limfosiete, granulosiete (fagosiete) en dendritiese selle**, wat strategies versprei is vir maksimum beskerming.

2.1.1 Mononukleêre fagosiete

Die oorsprong van alle mononukleêre fagosiete is in die beenmurg. Die eerste seltepe wat vanuit die beenmurg die bloedstroom binnegaan, is die **monosiete** (Abbas *et al.*, 1994). Die monosiet se primêre funksie is die fagositose en vernietiging van infektiewe organismes, maar dit kan ook as antigeenpresenterende selle optree. Die monosiete vestig hulle uiteindelik in die weefsel waar hulle “ryp” word en staan nou bekend as **makrofage**. Laasgenoemde selle word in alle organe en bindweefsel aangetref en hulle primêre funksie is om antigene, afkomstig vanaf infektiewe organismes soos bakteriee en protozoa, te fagositeer, te verwerk en aan CD4+ selle te presenteer. Makrofage is ook belangrike effektor selle vir die doding van hierdie mikro-organismes. Wanneer makrofage mikrobiese antigene aan sekere CD4+ T-selle presenteer, produseer laasgenoemde selle nie alleen sitokiene wat noodsaaklik is vir die funksionering van die selbemiddelde immuunstelsel nie, maar ook interferon γ wat makrofage stimuleer om mikro-organismes selfs meer doeltreffend te dood.

2.1.2 Limfosiete

Limfosiete word in drie funksionele groepe ingedeel:

- (i) **B-limfosiete** is die enigste selle wat verantwoordelik is vir die produksie van antiliggame en verteenwoordig die humorale immuniteit. Die antigeen reseptore van B-limfosiete is membraangebonde vorms van antiliggame (Abbas *et al.*, 1994). Interaksie van antigene met hierdie membraan antiliggaam molekules, lei tot die aktivering van die B-limfosiete. B-selle is ook baie doeltreffende antigeen-presenterende selle, veral met betrekking tot oplosbare antigene. Wanneer 'n individu aan 'n antigeen blootgestel word, bind die vreemde antigeen aan membraan Ig molekules op spesifieke B-selle. Die antigeen word verder opgeneem en geprosesseer, waarna peptied fragmente van die antigeen aan spesifieke CD4+ T-limfosiete presenter word. Hierdie T-selle word gevolglik gestimuleer om hul belangrike funksie, naamlik om groei en differensiasie van limfosiete te bevorder, uit te voer.
- (ii) **T-limfosiete:** Op die oppervlakte van T-limfosiete kom daar hoogs spesifieke T-sel reseptore voor wat uit twee verskillende tipes kettings bestaan, naamlik (a) $\alpha\beta$ en (b) $\gamma\delta$ kettings, waarvolgens T-limfosiete in twee groepe opgedeel word.

(a) *CD4+ limfosiete met $\alpha\beta$ T-sel reseptor:* T-limfosiete met die $\alpha\beta$ ketting is baie meer volop en bestaan uit CD4+ selle (helper T limfosiete; 70 %) en CD8+ selle (sitotoksiese T-limfosiete; 25 %) (Abbas *et al.*, 1994). In respons op 'n antigeniese stimulant, produseer en sekreter CD4+ selle proteïen hormone bekend as sitokiene. Hierdie sitokiene is verantwoordelik vir proliferasie en differensiasie van T-limfosiete sowel as ander selle, insluitende B limfosiete en makrofage. Sitokiene werf en aktiveer ook inflammatoriese leukosiete, soos makrofage en granulosiete. CD4+ selle kan verder in óf **T helper 1 selle (TH₁)** (belangrik tydens selbemiddelde immuniteit en aktivering van makrofage) óf **T helper 2 selle (TH₂)** (belangrik tydens humorale immuniteit en groei van mastselle sowel as eosinofiele) ontwikkel en word van mekaar onderskei deur verskillende sitokienprofile. Slegs TH₁ selle produseer interleukien (IL)-2, interferon (IFN)- γ en tumor nekrose faktor (TNF)- β , terwyl IL-4, IL-5, IL-6, asook IL-13 alleenlik deur TH₂ selle geproduseer en gesekreter word. Interleukien 10 word in muise slegs deur TH₂ selle geproduseer,

maar in die geval van mense word dit deur TH₁ sowel as TH₂ selle geproduseer (Katsikis *et al.*, 1995; Zhai *et al.*, 1999). Beide groepe produseer ook groeifaktore, naamlik IL-3 en granulosiet-makrofaag koloniestimulerende faktor (GM-CSF). Interleukien-10 inhibeer die produksie van TH₁ selle terwyl TH₂ selproliferasie deur IFN- γ geïnhibeer word. Wanneer TH₁ geassosieerde sitokiene in oormaat geproduseer word, kan dit tot outoïmmuunsiektes lei terwyl TH₂ geassosieerde sitokiene eosinofiele werf en mastselle aktiveer wat allergiese en inflammatoriese toestande tot gevolg kan hê (Rengarajan *et al.*, 2000).

Onder die CD4⁺ T-limfosiete bestaan 'n populasie wat sitolitiese aktiwiteit besit (**sitotoksiese CD4⁺ selle**). Hierdie “dodings” selle behoort aan die TH1 groep en as hulle geaktiveer word, druk hulle die Fas-ligand uit wat apoptose induseer in Fas-positiewe teikenselle. Die belangrikste teikens van CD4⁺ sitotoksiese T-limfosiete is selle van die immuunsisteem, soos T- en B-selle sowel as makrofage wat Fas tydens aktivering uitdruk (Hahn & Erb, 1999). CD4⁺ sitotoksiese T-limfosiete is baie belangrik tydens immuunregulering deur die eliminasië van geaktiveerde miëloïede en limfoïede selle tydens en na afloop van 'n immuunrespons. In sekere siektes, soos in HIV-infeksie en sommige outo-immuun gebreke, word die funksionele aktiwiteit van CD4⁺ sitotoksiese T-limfosiete, hoofsaaklik tydens Fas ligand – Fas interaksie, versteur en daardeur word hul belangrike immuunregulerende rol verder beklemtoon (Hahn & Erb, 1999).

Sitotoksiese CD8⁺ T-limfosiete produseer produkte soos perforien, wat teikenselle liseer. Voorbeelde van teikenselle is selle wat met virusse en ander intrasellulêre mikrobies geïnfekteer is asook die selle van oorgeplante weefsels. Wanneer CD8⁺ selle geaktiveer word, produseer hulle ook sekere sitokiene, veral IFN- γ , leukotriene (LT), TNF- α , - β en - γ en tot 'n mindere mate IL-2. Hierdie sitokiene sowel as die granule-inhoud, is moontlik direk by CD8⁺-bemiddelde lise van teikenselle betrokke.

(b) *CD4-, CD8-, CD3+ limfosiete met $\gamma\delta$ T-sel reseptor*: Hierdie groep T-selle met die $\gamma\delta$ ketting is by verre in die minderheid (4 %). Hulle is CD4- asook CD8- (dubbel negatiewe selle) maar druk wel die CD3 proteïene uit (Abbas *et al.*, 1994) Hierdie dubbel negatiewe selle is sitotoksies, maar die kombinasie repertoire vir T-sel reseptore is baie beperk. Hulle word waarskynlik deur sekere mikrobiale produkte, naamlik superantigene (byvoorbeeld stafilokokkale enterotoksien of sommige HIV proteïene) asook hitte spesifieke proteïene gestimuleer en is ook reaktief teen *Mycobacterium* antigeen.

- (iii) **Groot granulêre limfosiete** (“natural killer cells”, NK-selle) is in staat om sonder spesifieke antigeniese stimulasie ‘n verskeidenheid tumorselle sowel as virusgeïnfekteerde selle te liseer. Dieselfde dodingsmeganismes as wat by CD8+ selle gebruik word, is van toepassing by NK sel-bemiddelde doding. NK-selle produseer ook TNF- α en IFN- γ , maar nie TNF- β nie. Interferon- γ word veral in respons op IL-2 en IL-12 geproduseer en kan makrofage aktiveer om infektiewe organismes soos *Listeria monocytogenes* te dood (Abbas *et al.*, 1994).

Wanneer rustende limfosiete antigenies gestimuleer word, word hulle heelwat groter en staan as limfoblaste bekend. Limfoblaste prolifereer om in volwasse effektor selle te verander wat in staat is om antigene te elimineer.

Navorsers maak van verskeie stimuli gebruik om T selle *in vitro* te stimuleer en die response stem wel ooreen met wat normaalweg *in vivo* plaasvind. Mitogeniese lektiene (mitogene) veroorsaak nie-spesifieke stimulasie van limfosiete en word vanaf verskeie plante en bakterieë verkry. Dit is bewys dat die *in vitro* gebruik daarvan T- en B-selle stimuleer om sitokiene en sitokienreseptore te produseer wat saam vir die proliferasie en rypwording van die selle verantwoordelik is (Abbas *et al.*, 1994). T- en B selle word deur verskillende mitogene gestimuleer. Fitohemagglutinien (PHA) en Konkanavaliën A (Con A) stimuleer menslike sowel as muis T-selle, lipopolisakkariëde (LPS) stimuleer muis B selle terwyl “pokeweed”- mitogeen (PWM) beide menslike T- en B selle stimuleer.

Funksies van sitokiene

Sitokienfunksies word in vier kategorieë verdeel:

- (i) bemiddelaars van natuurlike immuniteit;
- (ii) reguleerders van limfosiet aktivering, groei en differensiasie;
- (iii) reguleerders van immuun-bemiddelde inflammasie; en
- (iv) stimuleerders van onvolwasse leukosiet groei en differensiasie.

Hierdie klassifikasie is gegrond op die hoofsaaklik biologiese aksies van 'n spesifieke sitokien, alhoewel baie sitokiene in meer as een van hierdie kategorieë kan funksioneer.

Vervolgens word voorbeelde uit elke kategorie kortliks bespreek (Abbas *et al.*, 1994):

- (i) Die eerste groep bestaan uit sitokiene wat natuurlike immuniteit bemiddel en sluit die antivirale IFN- α en die pro-inflammatoriese sitokiene in, naamlik TNF, IL-1, IL-6 en chemokiene. Hierdie sitokiene word hoofsaaklik deur mononukleêre fagosiete gesekreter.
- (ii) Die tweede groep sitokiene is hoofsaaklik afkomstig vanaf antigeen-gestimuleerde CD4⁺ T limfosiete en reguleer die aktivering, groei en differensiasie van B- en T selle. Hierdie groep sluit in: IL-2, die belangrikste T sel groeifaktor; IL-4, die belangrikste reguleerder van IgE sintese; en transformerende groeifaktor (TGF)- β wat limfosiet response inhibeer.
- (iii) Die derde groep sitokiene word deur antigeen geaktiveerde CD4⁺ en CD8⁺ T limfosiete geproduseer. Hulle aktiveer inflammatoriese leukosiete en hierdie effektor selle word onder die regulering van T selle geplaas. Hierdie groep sluit in: IFN- γ , die belangrikste aktiveerder van mononukleêre fagosiete; limfotoksien, 'n aktiveerder van neutrofiele; IL-10, 'n negatiewe reguleerder van mononukleêre fagosietfunksies; IL-5, 'n aktiveerder van eosinofiele; en IL-12 (geproduseer deur mononukleêre fagosiete), 'n stimuleerder van NK selle sowel as van T selle.
- (iv) Die vierde groep word kollektief die koloniestimulerende faktore genoem. Hierdie sitokiene ontstaan in die beenmurg stromale selle asook in T selle. Hulle stimuleer die

groeï van voorloper selle in die beenmurg en voorsien dus 'n bron van aanvullende inflammatoriese leukosiete.

Sitokiene beskik oor baie funksies wat krities is vir gasheerbeskerming teen patogene wat spesifieke en natuurlike immunteite met mekaar koördineer. Hulle reguleer ook die omvang en aard van immuunresponse deur die groei en differensiasie van limfosiete te beïnvloed. Ten slotte, sitokiene verskaf belangrike versterkingsmeganismes wat klein getalle limfosiete spesifiek vir 'n enkele antigeen, in staat stel om 'n verskeidenheid effektor meganismes te aktiveer om die antigeen uit te wis. Oormatige produksie van sitokiene kan lei tot inflammasie en weefselskade.

2.1.3 Granulosiete

Daar is drie tipes granulosiete wat volgens die kleuringskenmerke van hulle predominante granules geklassifiseer word: (a) neutrofiele; (b) eosinofiele; (c) basofiele. Die fagosiete, veral die **neutrofiele** wat ook die meeste voorkom, is die liggaam se eerste linie van sellulêre verdediging teen infekterende mikroorganismes. Wanneer hierdie selle met infekterende patogene gekonfronteer word, stel hulle verskeie proteolitiese ensieme uit hulle granules vry en genereer terselfdertyd 'n reeks antimikrobiese reaktiewe oksidantspesies (ROS) tydens die sogenaamde respiratoriese piek. Ongelukkig kan hierdie ensieme en ROS nie tussen teiken- en normale selle onderskei nie en sal, indien dit ekstrasellulêr vrygestel word, ook die gasheerweefsel beskadig (Babior, 1984; Weiss, 1989; Anderson, 1991). Hierdie weefselskade word normaalweg voorkom deurdat (i) die fagosiete die organismes fagositêer om blootstelling aan die biotoksiene tot die intrasellulêre milieu te beperk; (ii) akute inflammatoriese reaksies gewoonlik selfbeperkend is; en (iii) biologiese anti-oksidantmeganismes en ensiem-inhibeerders bestaan wat die oormaat ROS en ensieme neutraliseer. Tydens chroniese inflammasie vind migrasie en aktivering van opeenvolgende vlae van neutrofiele in die gasheerweefsel plaas. As hierdie situasie voortduur, mag die lokale anti-oksidantmeganisme en ensiem-inhibeerders deur 'n oormaat ROS en proteolitiese ensieme oorweldig word, sodat die gevaar van skade aan die gasheerweefsel ontstaan.

Cassatella (1999) en Witko-Sarsat *et al.* (2000) het onlangs beskryf dat neutrofiële 'n reeks pro-inflammatoriese sitokiene, veral IL-8 en TNF- α , produseer wat hierdie selle tydens inflammatoriese prosesse moontlik op 'n outokriniese wyse aktiveer.

(i) **Neutrofielgranules**

Neutrofielgranules bestaan uit vier verskillende groepe wat volgens die proteïeninhoud, grootte en digtheid, van mekaar onderskei word: primêre (asurofiële), sekondêre (spesifieke) en tersiêre (gelatinase) granules, sowel as sekreterende vesikels (Witko-Sarsat *et al.*, 2000).

Die groot **primêre granules** bevat miëloperoksidase (MPO), bakterisidiese faktore (lisosiem en defensiene), suur hidrolases en verskeie neutrale proteases (elastase, nie-spesifieke kollagenases en proteïnase 3). Die neutrale proteases besit die vermoë om verskeie ekstrasellulêre komponente, soos byvoorbeeld kollageen, basale membraan, fibrien, elastien en kraakbeen te degradeer, wat lei tot die kenmerkende etervormende, deformerende inflammatoriese prosesse as gevolg van weefselafbraak. Suzuki *et al.* (2000) het onlangs rapporteer dat die primêre granules moontlik bydra tot die opgradering van Sialyl Lewis^X, die ligand vir die endoteliale adhesiemolekules, E- en P-selektiene, wat op die seloppervlaktes van geaktiveerde neutrofiële voorkom. Die inhoud van die primêre granules word hoofsaaklik in die fagosoom vrygestel en slegs hoë vlakke van agoniste lei tot ekstrasellulêre vrystelling.

Die kleiner **sekondêre granules** bevat laktoferrin, lisosiem, alkaliese fosfatase, die komponente van NADPH oksidase, die intrasitoplasmiese poel van integriene en kollagenase. Die sekondêre granules word maklik met min stimulasie gesekreter.

Die **tersiêre en sekreterende granules** dra hoofsaaklik tot neutrofiëlfunksie by deurdat gelatinase ekstrasellulêr vrygestel word wat kollageen tipes IV (basale membraan) en V (interstisiële weefsel) klief en beweging van die selle deur basale membrane na die onderliggende weefsel, toelaat (Witko-Sarsat *et al.*, 2000).

Sekreterende vesikels bevat ook plasmaproteïene soos albumien asook proteïenase 3 en is die mees beweeglike kompartement van neutrofiele (Witko-Sarsat *et al.*, 1999).

(ii) ***Migrasie en chemotakse***

Beweging van neutrofiele uit die sirkulasie en migrasie na infeksiegebiede behels 'n komplekse, hoogs gekoördineerde reeks gebeurtenisse wat gelokaliseerde aktivering van vaskulêre endoteel, vashegting van neutrofiele, transendoteliale migrasie en chemotakse insluit.

Vashegting van neutrofiele aan geaktiveerde vaskulêre endoteel word bemiddel deur L-selektien op neutrofiele en P- en E-selektien op geaktiveerde vaskulêre endoteel (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). P-selektien bind met Sialyl Lewis^X-bevattende strukture op die neutrofiel plasmamembraan (Suzuki *et al.*, 2000) en hierdie interaksie lei tot verhoogde β_2 -integrien-bemiddelde adhesie sowel as reaktiewe oksidantproduksie (Ruchaud-Sparagano *et al.*, 2000). E-selektien verskyn eers 1-2 ure na blootstelling aan IL-1 en TNF- α op die endoteel waarna dit met die Sialyl Lewis^X-bevattende reseptore op die neutrofieloppervlakte reageer (Witko-Sarsat *et al.*, 1999). Laasgenoemde interaksie verhoog β_2 -integrien-bemiddelde vashegting, sowel as reaktiewe oksidantproduksie deur neutrofiele. Die immobilisasie van leukolokmiddels soos IL-8, plaatjie-aktiverende faktor (PAF) en leukotriene B₄ (LTB₄) lei tot die aktivering van β_2 -integriene wat verder met die intersellulêre adhesiemolekule-1 en -2 (ICAM-1 en ICAM-2) reageer (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). ICAM-2 word weer voortdurend uitgedruk terwyl ICAM-1 uitdrukking op ontsteekte endoteel die gevolg van IL-1 asook TNF- α is.

Lae vlakke CR3, een van die β_2 -integriene, kom op die oppervlak van rustende neutrofiele voor terwyl die blootstelling van neutrofiele aan aktiveringsseine (bv. leukolokmiddels soos PAF, N-formiel-L-metioniel-L-leusiel-L-fenielalanien (FMLF), LTB₄, C5a en IL-8, sowel as TNF- α en GM-CSF) tot die uitdrukking van hoë vlakke van hierdie oppervlakmolekules lei (Stewart & Hogg, 1996). Die

binding van geaktiveerde β_2 -integriene aan ooreenstemmende reseptore, ICAM-1 en ICAM-2, op vaskulêre endoteel, bemiddel hegte vashegting waarna die neutrofiële binne sekondes na plat, vasgehegte vorms verander en na die interstitium beweeg (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Laasgenoemde aksie staan as **diapedese** bekend.

Die nukleêre faktor kappa B (NF- κ B) is 'n dimetriese transkripsie faktor wat die uitdruk van baie gene, wat by immuun en inflammatoriese response betrokke is, reguleer. Hierdie faktor reguleer verder ook interleukiene (Liou & Baltimor, 1993), stikstofmonoksied sintase (Xie *et al.*, 1994) asook baie adhesiemolekules (Collins *et al.*, 1995). NF- κ B bestaan as 'n onaktiewe, sitosoliese vorm wat aan 'n inhiberende proteïen, naamlik inhiberende kappa B (I κ B) (Baeuerle & Baichwal, 1997), gebind is. NF- κ B kan deur baie verskillende stimuli geaktiveer word, soos byvoorbeeld reaktiewe suurstofspesies, inflammatoriese sitokiene, virusse of ioniserende bestraling (Gau *et al.*, 2000). Nadat die selle geaktiveer is, word I κ B gefosforileer, ge-ubiquitineer en uiteindelik gedegradeer (DiDonato *et al.*, 1996). Hierdie degradering van I κ B lei tot die vrystelling van die gebonde NF- κ B wat na die nukleus beweeg en van daar af uitdrukking van gene reguleer. NF- κ B in menslike vaskulêre endoteelselle speel waarskynlik 'n baie belangrike rol in die uitdrukking van ICAM-1, VCAM-1 en E-selektien (Collins *et al.*, 1995).

(iii) *Antimikrobiese meganismes van neutrofiële*

Neutrofiële maak van suurstof-afhanklike en -onafhanklike meganismes gebruik om mikrobiese patogene uit te wis. Laasgenoemde meganisme is reeds kortliks bespreek (*Neutrofielgranules*, bl 40) en vervolgens word slegs op die suurstof-afhanklike meganisme gefokus.

NADPH oksidase:

Neutrofiële se vermoë om indringende mikroörganismes te dood, hang tot 'n groot mate van die respiratoriese piek af. Laasgenoemde is 'n reeks gebeurtenisse waartydens die geaktiveerde fagosiet molekulêre suurstof reduseer na superoksied (O_2^-) as gevolg van die aktivering van 'n latente membraan-geassosieerde NADPH-

oksidase elektronvervoerkompleks. Die aanvanklike produk van die NADPH-oksidase sisteem na stimulasie, is die superoksied anioon (O_2^-), wat die voorloper van verskeie kragtige antimikrobiële oksidante is. Wanneer hierdie oksidante ekstrasellulêr gedurende hiperakute en/of kroniese aktivering van fagosiete vrygestel word, bestaan die potensiële gevaar van suurstoftoksisiteit vir naasliggende gasheerselle en weefsel in die omgewing van 'n inflammatoriese reaksie. In hierdie opsig is hulle potensiële sitotoksies vir eukariotiese selle. Verder is hulle potensiële karsinogene met proteolitiese en immuunonderdrukkende aktiwiteit (opgesom deur Anderson, 1995).

(iv) ***Sitokienproduksie deur neutrofiele***

Die konsep dat neutrofiele 'n bron van sitokiene kan wees, het eers onlangs ontstaan en is breedvoerig deur Cassatella (1999) en Witko-Sarsat *et al.* (2000) opgesom. Alhoewel die produksie van sitokiene deur neutrofiele besonder veelsydig is, blyk dit dat hoofsaaklik IL-8 en TNF- α geproduseer word wat op moontlike outokriene regulasie van neutrofielfunksies dui (Cassatella, 1999). TNF- α verhoog neutrofielvashegting, sensitiseer en aktiveer reaktiewe oksidantproduksie deur vasgehegte selle en induseer vrystelling van granule-ensieme deur hierdie selle (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Interleukin-8, 'n kragtige leukolokmiddel vir neutrofiele en 'n induseerder van degranulasie, word die meeste deur neutrofiele gesekreter (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Neutrofiele word ook, soos in die geval van ander inflammatoriese selle, aan negatiewe modulering deur sitokiene blootgestel. Die sitokiene wat die pro-inflammatoriese aktiwiteit van neutrofiele onderdruk, sluit veral IL-4 en IL-10, maar ook IL-13, in (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Die ontdekking dat neutrofiele sitokienproduserende selle is, kan belangrike implikasies vir neutrofiel-gerigte anti-inflammatoriese chemoterapie inhou. Kombinasies van middels wat vroeë aktivering van pro-inflammatoriese aktiwiteit (byvoorbeeld oksidantproduksie, sintese van eikosanoïede/prostanoïede en vrystelling van granule-ensieme) onderdruk met middels wat proteïensintese-afhanklike aktiwiteit, wat later plaasvind (soos sitokienproduksie) onderdruk, kan maksimaal effektief wees.

(v) ***Fosfolipase A₂ (PLA₂)-afkomstige bemiddelaars van inflammasie***

Neutrofiel aktivering gaan gepaard met Ca²⁺-afhanklike aktivering van PLA₂ wat lei tot kliewing van die integrale membraanfosfolipied, fosfatidielcholien, na aragidoonsuur en lisofosfatidielcholien (LPC). Laasgenoemde produkte besit pro-inflammatoriese aktiwiteite. Lisofosfatidielcholien word deur fosfolipase A₁ na biologies “trae” gliserofosfocholien en versadigde vetsuur (gewoonlik palmitaat) omgeskakel. Aragidoonsuur in neutrofiel word weer deur sikloöksigenase 1 en 2 na prostaglandien E₂ (PGE₂) en deur 5'-lipoksigenase na leukotriene B₄ (LTB₄) omgeskakel (Alonso *et al.*, 1998). PGE₂ besit die vermoë om die leeftyd van geaktiveerde neutrofiel te verleng deur apoptose te inhibeer (Rossi *et al.*, 1995) terwyl LTB₄ oor 'n reeks pro-inflammatoriese aksies (bv. mobilisering van intrasellulêre Ca²⁺ en verhoogde vashegting asook direkte migrasie van neutrofiel – Alonso *et al.*, 1998) beskik. Neutrofiel, asook ander inflammatoriese selle, produseer ook PAF wat ongetwyfeld die mees kragtige en veelsydige biologies aktiewe lipied is. Wanneer laasgenoemde ekstrasellulêr vrygestel word, kan dit inflammatoriese response versterk wanneer PAF aan G-proteïen/PLC-gekoppelde PAF reseptore op teikenselle, veral eosinofiele en neutrofiel, bind (Zimmerman *et al.*, 1992; Prescott *et al.*, 1999).

2.1.4 Dendritiese selle

Dendritiese selle word in die beenmurg gevorm waarna hulle na die milt en limfknope beweeg. Hulle kan nie fagositeer nie, maar kan proteïen antigene doeltreffend aan helper T-selle, insluitend naiewe T-selle (wat nie voorheen aan antigeen blootgestel was nie) aanbied. Dendritiese selle is verantwoordelik vir die induksie van 'n T-sel respons teen vreemde HLA molekules in weefseloorplantings en speel verder 'n belangrike rol by gemengde limfosiet reaksies. **Langerhans selle** is gespesialiseerde epidermale selle en is morfologies verwant aan dendritiese selle. Hulle is die enigste selle in die epidermis wat die vermoë besit om antigene te presenteer en is onder andere verantwoordelik vir kutane kontak sensitiwiteits reaksies (Abbas *et al.*, 1994).



HOOFTUK 3

LITERATUUROORSIG: IMMUUNMODULASIE

3.1 INLEIDING

Selektiewe modulasie van verskillende komponente van die immuunsisteem is van groot belang omdat dit die basis vorm vir behandeling van baie patologiese toestande, soos orgaanverwerping na oorplanting, infektiewe siektes, kanker, outo-immuunsiektes en primêre immuungebreke. Volgens Schmutzler *et al.* (1989) sluit die term “immuunmodulasie” ten minste drie terapeutiese doelwitte in - onderdrukking, stimulasie en herstel.

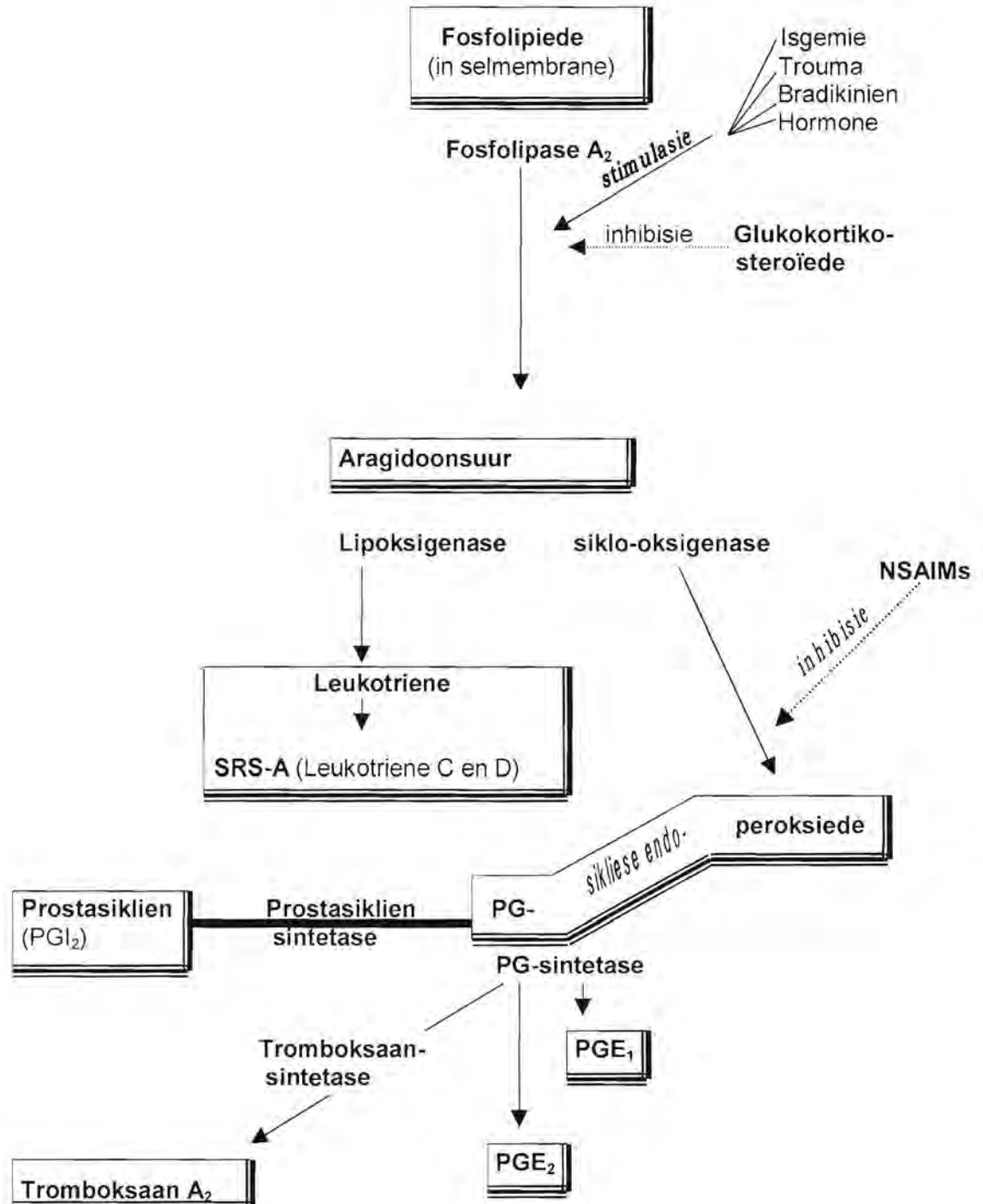
3.1.1 Anti-inflammatoriese geneesmiddels

Anti-inflammatoriese geneesmiddels kan in twee groepe geklassifiseer word, naamlik die **nie-steroïed anti-inflammatoriese geneesmiddels (NSAIMs)** en die **kortikosteroïede** (volledig opgesom deur Sommers, 2000).

❖ *Nie-steroïed Anti-inflammatoriese Geneesmiddels*

(i) *Meganisme*

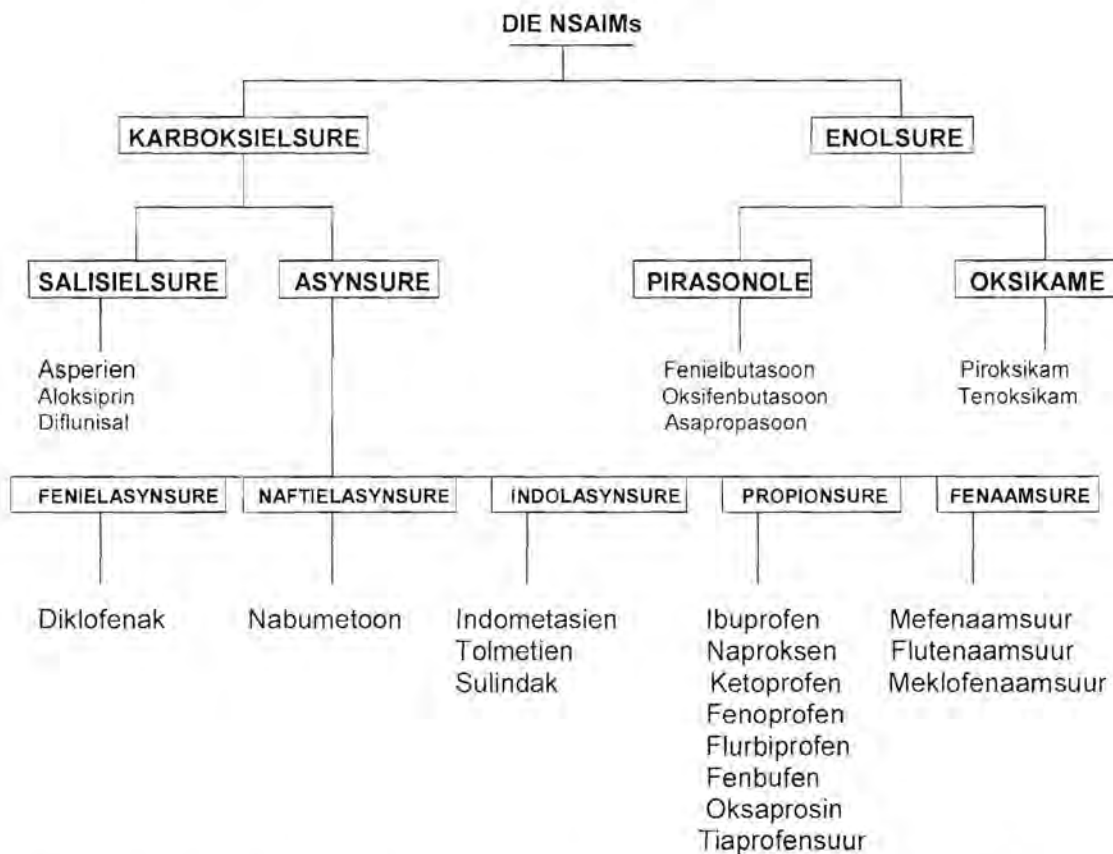
Aragidoonsuur, vrygestel vanuit die selmembraanfosfolipiede deur die werking van 'n fosfolipase, word deur die ensiem siklo-oksigenase na prostaglandienendoperoksiede omgesit, wat weer in stabiele prostaglandiene, soos PGE₂, verander kan word deur prostaglandiensintetase (Davies, 1988). PGE₂ bevorder inflammatoriese reaksies, sodat middels soos aspirien en die nie-steroïed anti-inflammatoriese middels wat bogenoemde ensieme rem, die ontstekingsproses kan demp (sien Figuur 4, bladsy 47). Siklo-oksigenase (COX) kom in twee vorms voor, naamlik COX-1 en COX-2. COX-1 kom in die meeste selle voor en die prostanoïede (d.w.s. die prostaglandiene en tromboksane) wat dit vorm, is by normale homeostase betrokke (bv. selbeskermend by die maagslymvlies). COX-2 word deur 'n inflammatoriese stimulus in inflammatoriese selle geïnduseer. COX-1 het dus 'n fisiologiese en COX-2 'n inflammatoriese funksie. Die NSAIMs se ongewenste newe-effekte volg op remming van COX-1. Aspirien, indometasien en piroksikam is kragtiger remmers van COX-1 as van COX-2 en dit verklaar hul meer uitgesproke gastrotoksisiteit.



Figuur 4: Skematiese voorstelling van die wisselwerking van die prostaglandiene en die nie-steroïed anti-inflammatoriese geneesmiddels (NSAIMs). Saamgestel volgens Sommers (2000).

Die middels se pynverdwoning berus waarskynlik ook op die remming van prostaglandiensintese, aangesien die prostaglandiene waarskynlik die perifere pynreseptore sensitiseer (Metz, 1981). Koors word veroorsaak deur pirogene wat deur granulose vrygestel word. Hierdie pirogene stimuleer die temperatuursentrum deurdat prostaglandiene daar vrygestel word (Brooks & Day, 1991). Antipiretika soos aspirien rem dus die sintese van prostaglandiene in die sentrale senustelsel.

Asetiëlsaliëlsuur (bv. aspirien) is 'n kragtige analgetikum en antipiretikum waarmee hoofpyn, gewrigspyn en spierpyn besonder goed behandel kan word, veral wanneer daar 'n inflammatoriese komponent teenwoordig is (Vane, 1971). Indometasien is ook 'n bekende voorbeeld van NSAIMs en is waardevol in die behandeling van rumatoïede artritis. Die NSAIMs word opgesom in Figuur 5.



Figuur 5: Klassifikasie van die nie-steroïed anti-inflammatoriese middels (NSAIMs).
Saamgestel volgens Sommers (2000).

❖ *Adrenokortikosteroïede*

Reeds in 1855 het Addison die fisiologiese belangrikheid van die adrenale kliere ontdek en besef dat hierdie kliere noodsaaklik vir oorlewing is. In die derde dekade van die twintigste eeu het navorsers tot die besef gekom dat die korteks, en nie die medulla nie, die lewe-
onderhoudende deel van die adrenale klier is. Die adrenokortikotropiese hormoon het
belangrike fisiologiese en farmakologiese uitwerkings en biologies aktiewe analoë daarvan
is vir die eerste keer deur Hofmann *et al.*, (1961) en Schwyzer & Sieber (1963)
gesintetiseer. Reeds in 1949 het Hench en medewerkers die dramatiese effek van
adrenokortikotropiese hormoon (AKTH) in die behandeling van rumatoïede artritis onthul.
Vir hierdie navorsing het Hench *et al.* (1949) en Kendall en Leichstein (wat vir die meeste
chemiese navorsing wat tot die sintetisering van die steroïede gelei het, verantwoordelik
was) die Nobel Prys in Medisyne ontvang. Sommige van die sintetiese kortikosteroïede
besit ook merkwaardige anti-inflammatoriese eienskappe en is feitlik onontbeerlik in die
behandeling van ernstige inflammatoriese toestande.

(i) *Meganisme*

By steroïedsensitiewe weefsel (teikenselle) is daar spesifieke kortikosteroïedbindende
proteïenreseptore gebonde aan kernchromatien. Die vetoplosbare steroïedmolekuul kruis
selmembrane geredelik en die steroïed-reseptorproteïenkompleks verbind met
deoksiribonukleïensuur (DNA) (Schleimer, 1989). Daar volg 'n toename in
ribonukleïensuur (RNA)-polimerase aktiwiteit en spesifieke boodskapper-RNA word
gevorm. Hierna volg die sintese van polipeptiede soos lipokortien wat anti-inflammatories
is. Die teiken van die steroïedhormone is dus die selkern waar hulle die sintese van
bemiddelaarproteïene affekteer. Dit is verder moontlik dat die steroïede ook as selektiewe
remmers van COX-2 optree.

(ii) *Effekte van kortikosteroïede op inflammatoriese en immunologiese bemiddelaars*

Glukokortikoïede is by suprafisiologiese (farmakologiese) doserings anti-inflammatories,
anti-allergies en anti-rumaties. Hul anti-inflammatoriese eienskappe kan waarskynlik aan
'n afname in die sintese van prostaglandiene en leukotriene toegeskryf word (Peers &
Flower, 1990). Die steroïede stimuleer die sintese van 'n polipeptied, lipokortien, wat die



ensiem fosfolipase A₂ rem (Flower, 1988) en sodoende word die vrystelling van aragidoonsuur uit membraanfosfolipied van inflammatoriese selle verhoed, sodat leukotriene en prostaglandiene nie gevorm word nie (sien Figuur 4). Remming van fosfolipase A₂ voorkom ook die vrystelling van liso-plaatjie-aktiverende-faktor (uit die membrane van veral eosinofiele) wat die voorganger is van 'n ander kragtige bemiddelaar van ontsteking, naamlik plaatjie-aktiverende-faktor (PAF) (Schleimer, 1990).

Selbemiddelde immuniteit word belemmer deurdat die steroïede lise van limfoïede weefsel veroorsaak (spesifiek sitotoksiese T-selle) en sodoende die aantal sirkulerende eosinofiele verminder. Groot doserings onderdruk anti-liggaamproduksie. Kortikosteroïede blokkeer ook transkripsie van sitokiengene in mononukleêre fagosiete, sowel as sitokiensekresie deur laasgenoemde selle (Daynes & Araneo, 1989). Inhibisie van IL-1, IL-6 en TNF sintese deur kortikosteroïede is *in vitro* sowel as *in vivo* gedemonstreer. 'n Tekort aan IL-1 en TNF sal die ontwikkeling van inflammatoriese prosesse beperk.

Kortikosteroïede word baie suksesvol gebruik vir die behandeling van respiratoriese siektes, soos brongiale asma en hooikoors (McFadden, 1998). Die steroïede se hoofeffek is waarskynlik die voorkoming van antigeen-geïnduseerde long-eosinofilie. Ander tipiese voorbeelde van siektetoestande wat met kortikosteroïede behandel word is rumatiesse en kollageensiektes (Yount *et al.*, 1973), velsiektes (Maibach & Stoughton, 1973), lewersiektes (Berk *et al.*, 1976) spysverteringskanaalsiektes (Wall, 1973), nefrotiese sindroom (Bacon & Spencer, 1973), breinedeem (Nelson & Dick, 1975), kanker (Brennan, 1973) en orgaanoorplanting. By orgaanoorplanting verminder hulle weefselverwerping deur onderdrukking van die ontstekings- en immuunmeganismes sowel as lise van sitotoksiese T-selle (Turk & Parker, 1982).

(iii) *Die ongewenste effekte van die kortikosteroïede*

Ten spyte daarvan dat kortikosteroïede klinies baie effektief is, moet hierdie middels met groot omsigtigheid voorgeskryf word. Wanneer hierdie middels langdurig gebruik word, bestaan die gevaar van ongewenste effekte wat die klein, maar nogtans betekenisvolle, effek van geïnhaleerde kortikosteroïede op die groei van kinders insluit, steroïedweerstandigheid (veral by asma), stadige aksie aan die begin van 'n behandeling en

die relatiewe ongevoeligheid van neutrofiële vir hierdie middels (McFadden, 1998). Die humorale of sel-bemiddelde immuniteit, soms albei, word deur kortikosteroïede onderdruk en hierdie pasiënte is dus blootgestel aan mikrobiële infeksies, veral opportuniste soos sitomegaviruses, *Pneumocystis carinii*, *Candida* en *Aspergillus*.

Die perifere organe, insluitende die vel, word sistematies van hul bestanddele beroof, sodat die by die funksies van ander organe gebruik kan word. Die limfatiese, been-, spier- en dermale weefsel verval, terwyl die lewer, wat hul afbraakprodukte ontvang, 'n verhoogde RNA-sintese toon. Metaboliese effekte sowel as endokriene afwykings ontstaan, die pasiënte verloor spiermassa, osteoporose ontwikkel en hulle vel word baie dun en kneus maklik (Baylink, 1983).

3.1.2 Immuunstimulasie

Om die immuunsisteem te stimuleer, is daar slegs enkele verbindings wat klinies suksesvol gebruik kan word. Makromolekules soos bacillus Calmette-Guerin (BCG) en muramiel dipeptied (MDP) wat as adjuvante dien om B-sel aktiwiteit te verhoog, word al jare lank gebruik. BCG stimuleer die immuunsisteem nie-spesifiek en aktiveer hoofsaaklik makrofage (Farghali & Masek, 1998). MDP is 'n sintetiese immuno-adjuvant wat ook die nie-spesifieke weerstandigheid teen bakteriële infeksies by muise kan verhoog, selfs wanneer hulle immuunsisteem gebrekkig is soos byvoorbeeld by pasgeborenes en diere wat met immuunonderdrukkende middels behandel word (Parant & Chedid, 1985).

Soortgelyke resultate is deur Kotnik & Stalc (1996) gerapporteer wat ook op stimulasie van die immuunrespons in geneesmiddel en tumor geïnduseerde immuunonderdrukking dui terwyl Rojs *et al.* (2000) indrukwekkende immuunstimulerende effekte van 'n MDP-analoog op die immuunsisteem van geïmmuniseerde hoenders gevind het.

Levamisool is die enigste sintetiese verbinding wat tot dusver in kliniese proewe as immuunstimulant vir T-sel aktiwiteit ondersoek is (Renoux, 1980; Holcombe *et al.*, 2001). Die gebruik daarvan was gerig op die herstel van 'n gebrekkige immuunsisteem deur middel van nie-antigenies-afhanklike stimulasie en kan dus ook as 'n immuunherstellende

middel beskou word. Alhoewel die werkingsmeganisme van levamisool steeds onbekend is, is hierdie middel gebruik om immuniteit tydens infektiewe siektes, insluitend leprose en sommige kankers, te versterk (Szeto *et al.*, 2000). 'n Wanbalans tussen TH₁ en TH₂ immuun response word dikwels in baie siektes waargeneem. Hierdie skrywers het bevind dat levamisool serum IFN- γ by rotte verhoog het met 'n gepaardgaande verlaging in die serum IgE vlak. Die sitokien geenuitdrukking van IFN- γ (TH₁-afhanklik) is verhoog terwyl die IL-4 (TH₂-afhanklik) verlaag is en 'n gelyktydige betekenisvolle verhoging van IL-18 (kragtige stimulant van IFN- γ produksie) waargeneem is. Hierdie data dui daarop dat levamisool die immuunbalans via IL-18, na 'n Th₁ respons omskakel. Holcombe *et al.* (1998) het levamisool met IL-2 kombineer om pasiënte met kolonkanker mee te behandel. Levamisool verhoog die aantal geaktiveerde T-selle en NK-selle, terwyl IL-2 weer die aktiwiteit van hierdie selle verhoog om tumorselle te dood. Hierdie kombinasie het wel sinergistiese aktiwiteit getoon met verhoogde immuunstimulasie by 75% van die pasiënte. Levamisool is ook as 'n voorkomende middel teen kolonkanker deur Holcombe *et al.* (2001) bestudeer. Hulle het gevind dat CD16 positiewe mononukleêre selle van gesonde vrywilligers wat met levamisool behandel is, betekenisvol verhoog was. Tydens hierdie studie het sitokienvlakke onveranderd gebly terwyl die Th₁ immuunfunksie slegs minimaal deur die middel affekteer is. Holcombe *et al.* (2001) het *in vitro* gevind dat levamisool sinergisties saam met IL-12, die TH₁ sitokienrespons by baie lae konsentrasies induseer het. Hierdie middel kan dus volgens Holcombe *et al.* (2001) as 'n potensiële chemo-voorkomende middel teen kolonkanker beskou word.

St Georgiev (1988) het 'n groot aantal sintetiese chemikalieë met immuunstimulerende of herstellende eienskappe hersien, maar nie een daarvan is verder ontwikkel om effektief in mense gebruik te word nie.

Omdat sitokiene spesifieke sowel as nie-spesifieke (inflammatoriese) immuunresponse kan aktiveer, word verskeie sitokiene, alleen of in kombinasie met ander vorms van behandeling, as immuunmodulerende middels aangewend. Die gebruik van IL-2 en IFN- α asook IFN- γ as immuunstimulerende agense, veral by die behandeling van kanker en rumatoïede artritis, is reeds intensief ondersoek (Rosenberg *et al.*, 1986; Wolfe *et al.*,

1987). Daar is egter ook aandag gegee aan TNF- α en hemapoïetiese groeifaktore GM-CSF en G-CSF. IFN- γ aktiveer NK-selle asook makrofage, verhoog uitdrukking van menslike leukosiet antigeen (HLA) molekules op tumorselle en is direk sitostaties (Wolfe *et al.*, 1987). Behalwe vir hulle pro-inflammatoriese effekte, kan sitokiene ook immuunherkenning van tumorselle verhoog. Interleukien 2 besit die vermoë om T-selle te aktiveer wat tumors in pasiënte kan vernietig (Rosenberg *et al.*, 1986), maar hierdie behandeling kan hoogs toksies wees, veroorsaak koors, pulmonêre edeem en dikwels skok.

Wagner (1990) het in 'n oorsigartikel plantafkomstige natuurlike produkte met immuunstimulerende aktiwiteite bespreek. Hulle sluit in alkaloiëde, kinone, terpenoïede, fenolkarboksiliese sure en hoë molekulêre massa verbindings soos polisakkariëde en glikoproteïene. Van laasgenoemde het arabinogalaktane vanaf *Echinacea* spesies betekenisvolle *in vitro* en *in vivo* immuunstimulerende eienskappe getoon. Albrecht *et al.* het in 1995(a) die *in vitro* sitotoksiese werking van diglukosied hipoksosied wat vanuit *Hypoxis* spesies geëkstraheer is, ondersoek en later 'n kliniese proef onderneem waarin longkanker pasiënte gestandaardiseerde ekstrakte van *Hypoxis* ekstrak ontvang het (Albrecht *et al.*, 1995b). Laasgenoemde ekstrak het uit 50% hipoksosied, 10% beta-sitosterol (BSS) en 0.1% beta-sitosterolglukosied (BSSG) bestaan. Hierdie navorsers het bevind dat die limfosiet proliferatiewe respons op fitohemagglutinien (PHA) as stimulant, by sommige pasiënte verhoog was en dat BSS en BSSG vir hierdie verskynsel verantwoordelik was. Hulle het tot die gevolgtrekking gekom dat sitosterole 'n soortgelyke werking as vitamien op die funksies van die immuunsisteem het maar dat hulle daagliks vir optimale funksionering geneem moet word. Bouic *et al.* (1996) het die *in vivo* en *in vitro* effekte van BSS en BSSG op menslike perifere limfosietproliferasie ondersoek en gevind dat dit *in vitro* by baie lae konsentrasies verhoog was. BSS en BSSG het ook IL-2 en IFN- γ sekresie sowel as die NK-selaktiwiteit van limfosiete, *in vitro*, verhoog. Alhoewel die twee genoemde sitosterole afsonderlik hierdie stimulasie uitgelok het, was die kombinasie daarvan, soos dit natuurlik in plantekstrakte voorkom, baie meer effektief (Bouic en Albrecht, 1993). Na aanleiding van hierdie resultate is hulle van mening dat die sitosterole oorweeg kan word om die immuunsisteem van HIV-geïnfekteerde pasiënte te stabiliseer.

Pasiënte wat aan pulmonêre tuberkulose gelei het, is deur Donald *et al.* (1997) met sitosterole, in kombinasie met 'n effektiewe antituberkulose middel, behandel. Die pasiënte het betekenisvolle gewigstoename en hoër limfosiet sowel as eosinofiel tellings getoon. Bouic *et al.* (1999) het verskeie immuunparameters van ultra-marathon atlete wat 'n BSS:BSSG mengsel geneem het, ondersoek. Die atlete wat die aktiewe mengsel ontvang het, het minder neutrofilie, limfopenie en leukositose getoon in vergelyking met 'n kontrole groep wat plasebo kapsules ontvang het. Die CD3+ selle sowel as die CD4+ selle was in die eksperimentele groep verhoog terwyl die IL-6 plasmavlakke en kortisol:dehidro-epiandrosteroon (DHEA) verhoudings verlaag was. Hierdie resultate dui daarop dat die eksperimentele groep 'n geringe immuunrespons ondervind het en was tydens die post-marathon herstelperiode minder immuunonderdruk.

3.1.3 Doelwitte van die studie

Humiensuur is een van baie komponente wat in veen, ook bekend as humus of turf, aangetref word. Veen word al sedert die Eerste Wêreldoorlog as antiseptiese en anti-inflammatoriese middel gebruik en vir baie jare al word die medisinale toepassing daarvan bestudeer en is dit in verskeie siektetoestande suksesvol aangewend. Heelwat van die waarnemings het daarop gedui dat humiensure, afkomstig vanaf veen, immuunmodulerende eienskappe besit. 'n Steenkool-afkomstige humaat, naamlik oksihumaat, is gesintetiseer. Die doel van hierdie studie is om die moontlikheid te ondersoek of oksihumaat, net soos plantafkomstige humiensure, ook immuunstimulerende sowel as anti-inflammatoriese eienskappe besit.

Die hoofdoelwitte van hierdie tesis was om die effek van oksihumaat op die volgende menslike normale limfosiet en neutrofiel funksies *in vitro* te bepaal:

- 1) limfosietproliferasie;
- 2) ekstrasellulêre produksie van die volgende sitokiene deur limfosiete: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α en IFN- γ deur limfosiete;
- 3) uitdruk van IL-2 reseptore (CD 25) deur limfosiete;

- 4) produksie van PGE₂ en LTB₄ deur limfosiete;
- 5) sitotoksiese aktiwiteit van limfosiete;
- 6) NK-sel aktiwiteit;
- 7) membraan destabiliseringsaktiwiteit;
- 8) uitdrukking van die vashegtingsmolekuul CR3 op neutrofiele;
- 9) neutrofielvashegting aan ICAM-1, VCAM-1 en E-selektien;
- 10) degranulasie van neutrofiele en eosinofiele.

Voorlopige studies het aangetoon dat oksihumaat die proliferasie van gestimuleerde limfosiete verhoog deur verhoogde produksie van IL-2. Hierdie bevinding, sowel as die anti-HIV eienskappe van oksihumaat, het ons gemotifeer om 'n Fase I studie op HIV geïnfekteerde pasiënte te doen. Hierdie Fase I kliniese proef vorm nie deel van die PhD studie nie. Bloedmonsters is slegs, met die goedkeuring van die betrokke Etiese Komitee, van die pasiënte versamel en 'n *ex vivo* studie is op hierdie pasiënte gedoen om die immuunstimulerende aktiwiteite wat *in vitro* bevind is, te bevestig.