

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

deur

Gisela Käthe Joone

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

(PhD)

in die Fakulteit Gesondheidswetenskappe
Universiteit van Pretoria
Pretoria

Desember 2002



Bedankings

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

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

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

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

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

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

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

My eggenoot vir sy vertrou en voortdurende aanmoediging en bystand.

My familie en kollegas vir hulle aanmoediging en belangstelling.

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

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



INHOUDSOPGAWE

Opsomming	v
Summary	vii
Lys van afkortings	ix

HOOFSTUK 1: LITERATUUROORSIG: HUMIENSURE

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

HOOFSTUK 2: LITERATUUROORSIG: SELLE VAN DIE IMMUNSIESTEM

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

HOOFSTUK 3: LITERATUUROORSIG: IMMUNMODULASIE

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

HOOFSTUK 4: MATERIAAL EN METODEDES

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



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



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

HOOFSTUK 5: RESULTATE

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



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

OPSOMMING

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

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

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



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

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

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

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

SUMMARY

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

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

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

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

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

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

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

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



LYS VAN AFKORTINGS

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



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



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



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



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.

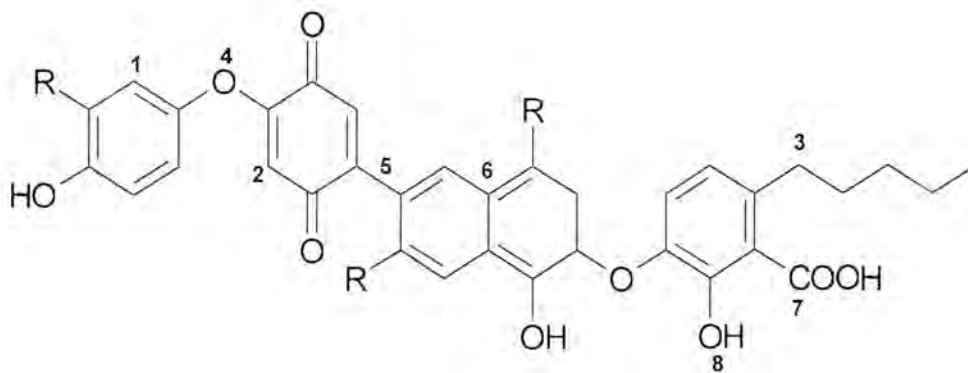
1.1.1 Humiensubstansie

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 membraandurlaatbaarheid 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 (Pálfı *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 chelasio (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 mutagenisiteite 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 vertraag 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 uriene 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, verslapping 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 neutrofielrespons, 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

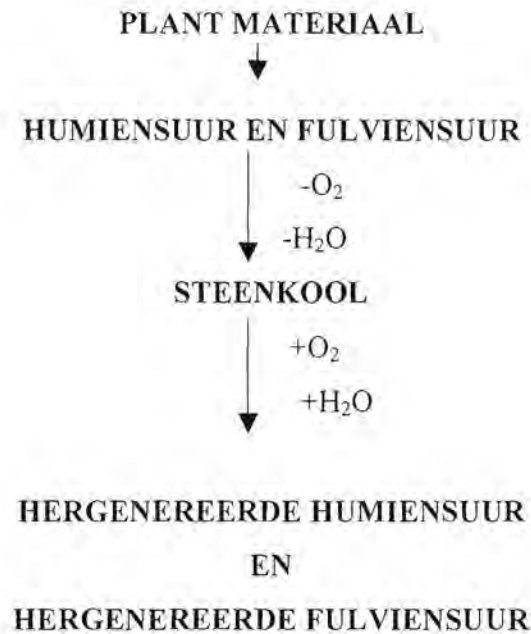
Die vorming van steenkool is die finale resultaat van 'n diagenetiese proses wat begin by lae molekulêre gewig substansie soos humien en fulviensure wat deur die verlies van funksionele groepe en kondensasiereaksies, tot die vorming van 'n onoplosbare tridimensionele netwerk lei (Rausa, 1994). Die organiese 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 (Bears *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 (Bears *et al.*, 1975; Wender *et al.*, 1981). Steenkool wat deur lug onder droë toestande geoksideer 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:

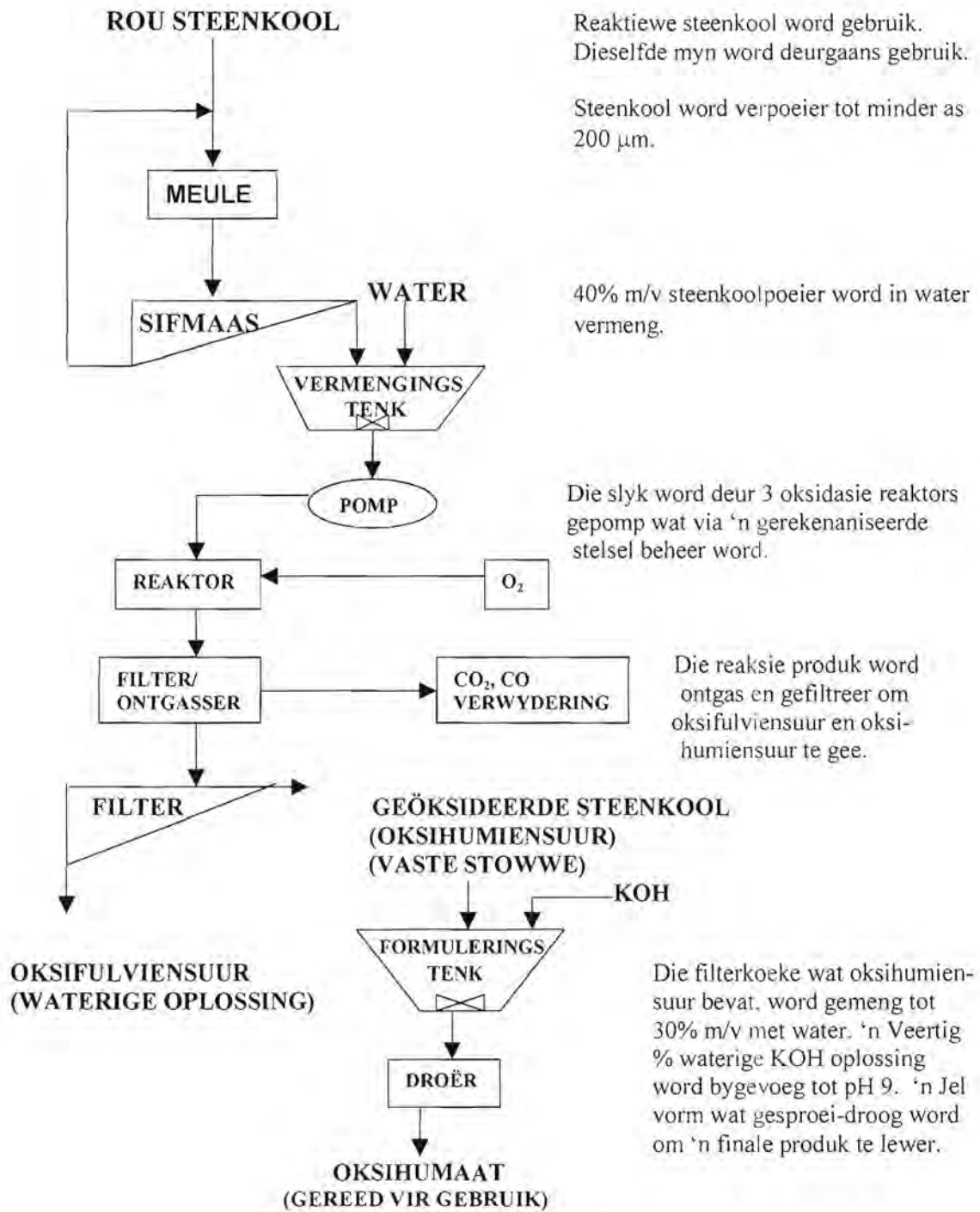
Verpoeierde bitumineuse steenkool (200 g) word deeglik met water (400 ml) vermeng om ‘n suspensie te vorm wat onder ‘n konstante druk (4 Mpa) vooraf verhit word. Wanneer die verlangde temperatuur (180⁰C) bereik word, word suurstof teen ‘n tempo van 8 L per minuut vir een uur lank deur die suspensie geborrel. 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 potensiëel 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 potensiële 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.



HOOFSUK 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 membraangebode 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 $\text{TNF-}\alpha$ en $\text{IFN-}\gamma$, maar nie $\text{TNF-}\beta$ 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 mikroörganismes. Wanneer hierdie selle met infekterende patogene gekonfronteer word, stel hulle verskeie proteolitiese ensieme uit hulle granules vry en genereer terselfdertyd 'n reeks antimikrobiële 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 ettervormende, 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 neutrofiele 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 neutrofiele*

Neutrofiele 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:

Neutrofiele 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 modulاسie 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 weefselloorplantings 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.

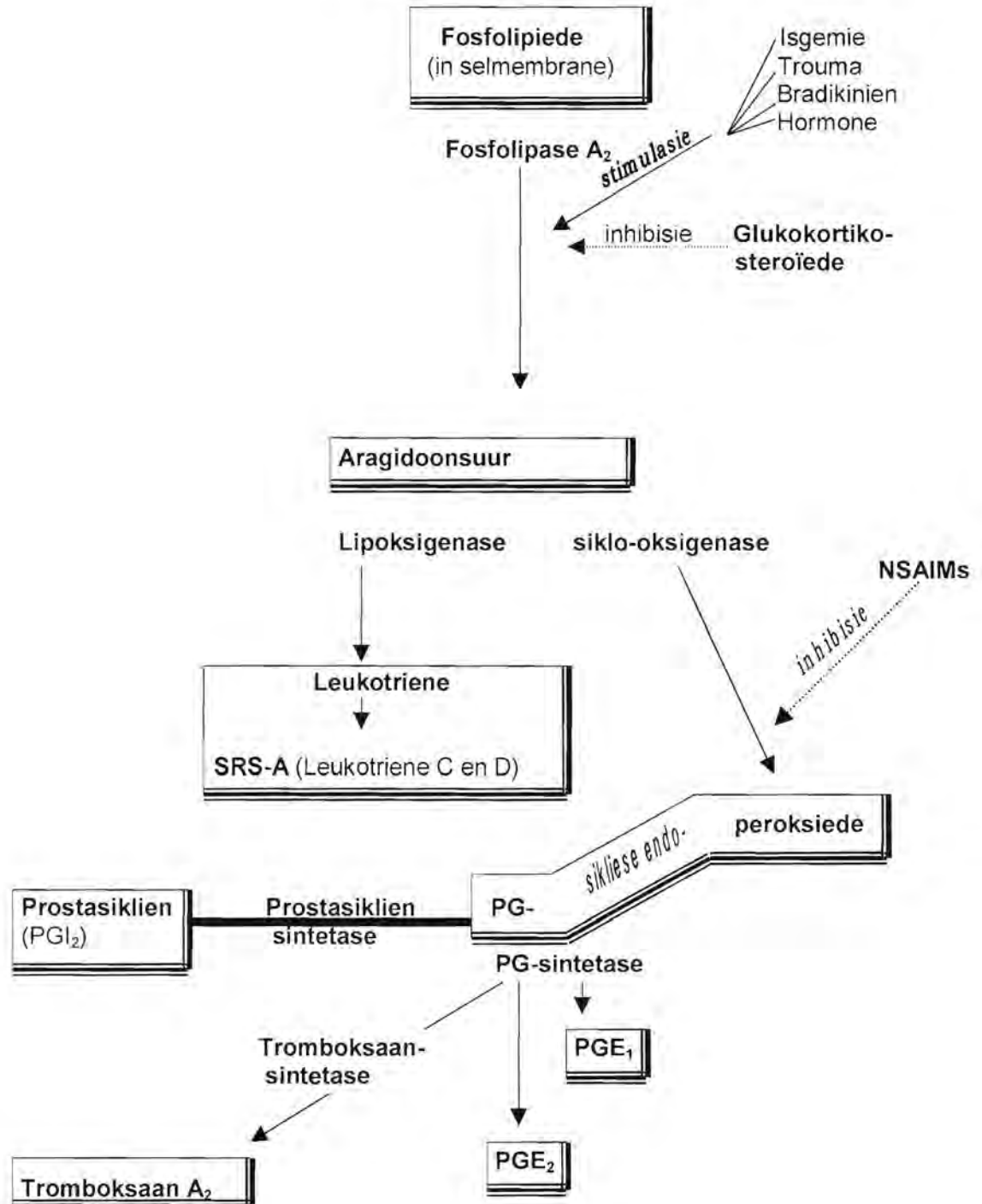
3.1.1 Anti-inflammatoriese geneesmiddels

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*

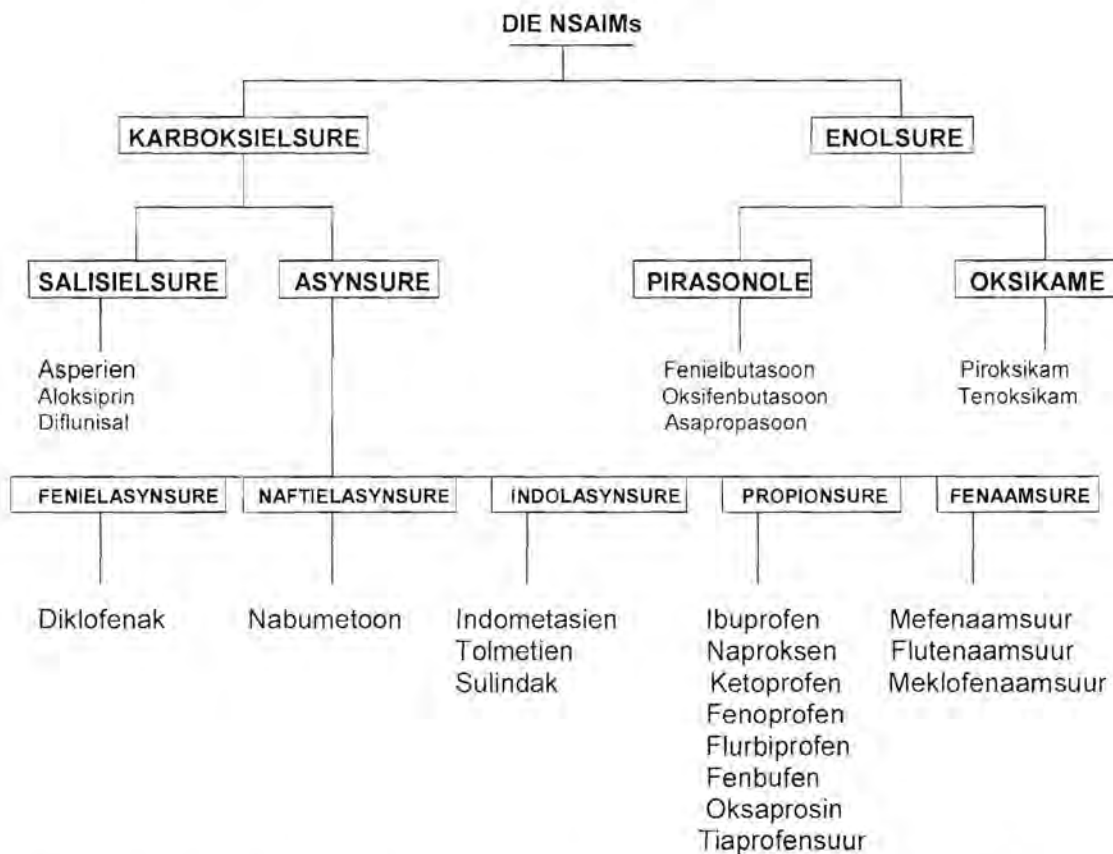
Aragidoonsuur, vrygestel vanuit die selmembraanfosfolipiede deur die werking van 'n fosfolipase, word deur die ensiem siklo-oksigenase na prostaglandienendoperoksiede omgesit, wat weer in stabiele prostaglandiene, soos PGE₂, verander kan word deur prostaglandiensintetase (Davies, 1988). PGE₂ bevorder 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 sensustelsel.

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 sitomegavirus, *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 immunoadjuvant 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 potensieële 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.



HOOFSTUK 4

MATERIAAL EN METODEDES

4.1. MEDIA EN REAGENSE

4.1.1 Ammoniumchloried-oplossing (0.83%)

8.3 g ammoniumchloried (Merck, Darmstadt, Germany)

1 g natriumbikarbonaat (Merck)

74 mg etileendiamientetra-asynsuur (EDTA) (Sigma Diagnostics, St Louis, MO, USA)

gedeïoniseerde water

4.1.2 3-[4,5-Dimetieltiazool-2-iel]-2,5-difeniel-tetrazolium bromied (MTT) oplossing

150 mg MTT-poeier (Sigma Diagnostics, St Louis, MO, USA) is in 30 ml fosfaat gebufferde sout-oplossing (FBS) (sien 4.1.5) opgelos. Die finale konsentrasie van hierdie oplossing was 5 mg/ml.

4.1.3 Dulbecco se fosfaat gebufferde sout-oplossing (Dulbecco's FBS)

Dulbecco's FBS sonder Mg^{2+} of Ca^{2+} (BBL Microbiology Systems, Becton Dickenson and Company, VSA)

1% hitte-geïnaktiveerde fetale kalfserum (Delta Bioproducts, Kempton Park SA)

0.09% natrium asied (Saarchem-Holpro Analytics [Pty] Ltd)

Filtreer met 'n 0.2 μ m porie membraan

Stoor by 4⁰C

4.1.4 Fetale kalfserum (FKS) gesupplementeerde RPMI 1640 medium

RPMI 1640 weefselkultuur medium (Bio Whittaker, Walkersville, Maryland) is met die volgende hoeveelheid antibiotikum (Bio Whittaker, Walkersville, Maryland) en hitte-geïnaktiveerde fetale kalfserum (Delta Bioproducts, Kempton Park SA)

gesupplementeer:

445 ml RPMI 1640 medium

5 ml antibiotikum (10 000 U penisillien/ml en 10 000 μ g streptomisien/ml)

50 ml hitte-geïnaktiveerde fetale kalfserum (HI FKS) (sien 4.1.8)

4.1.5 Fosfaat gebufferde sout-oplossing (FBS)

Die gedehidreerde FTA-buffer van BBL (BBL Microbiology Systems, Becton Dickenson and Company, VSA) is volgens die voorskrif van die vervaardigers gemaak.

4.1.6 Hanks se gebalanseerde sout-oplossing (HBSO)

Kleurstofvrye HBSO (pH 7.4) is van 'n kommersiële bron [Highveld Biologicals (Pty) Ltd, Johannesburg, SA] verkry.

4.1.7 Heparien-oplossing

'n Oplossing van 500 eenhede heparien (sonder preserveermiddels) (Sigma) per ml is berei en deur filtrasie gesteriliseer. Van hierdie oplossing is 0.1 ml by elke 10 ml pas getapte bloed gevoeg om stolling te voorkom.

4.1.8 Hitte-geïnaktiveerde fetale kalfserum (HI FKS)

Fetale kalfserum (Delta Bioproducts, Kemptonpark, SA) is vir 45 minute by 56°C geïnkubeer.

4.1.9 Sephadex voorbereiding

Vyftig milliliter (50 ml) HBSO [Highveld Biological (Pty) Ltd] is met 0.5% menslike albumien (Sigma) gesupplementeer. By 10 ml van laasgenoemde medium, bevattende kalsium, is 1.5 g Sephadex G15 krale (Sigma) gevoeg wat vir 15 min toegelaat is om te swel. Na spontane sedimentasie van die krale is die bostand versigtig afgegooi en 10 ml vars mensserum daarby gevoeg waarna dit vir 25 minute by 37°C geroteer is. Die geöpsoneerde krale is daarna drie maal gewas en in 10 ml inkubasie medium gehersuspendeer, verdeel in 3 ml hoeveelhede en by -70°C gevries.

4.1.10 Stop-oplossing (vir die bepaling van neutrofielvashegting)

28 ml H₂SO₄ [Saarchem-Holpro Analytics (Pty) Ltd, Krugersdorp, SA](1 mol/L)
1 L gedistilleerde water



4.1.11 Substraat-oplossing (o-Fenileendiamien)(OPD)

A) *Sitraat-fosfaat buffer:*

1) Sitroensuur [Saarchem-Holpro Analytics (Pty) Ltd] (35 mmol/L) 6.724 g

2) Na_2HPO_4 [Saarchem-Holpro Analytics (Pty) Ltd] (67 mmol/L) 9.514 g

Meng as volg:

Weeg reagentse 1) en 2) af en los elkeen afsonderlik op in 400 ml gedistilleerde water.

Voeg reagentse 2) bietjie vir bietjie by reagentse 1) terwyl die mengsel voortdurend geroer en ge-pH word. Die pH van die mengsel moet uiteindelik 5 wees waarna dit met gedistilleerde water na 1 L opgemaak word.

B) *Triton X-100* (Sigma)(0.1%)

1 ml Triton X-100

C) *o-Fenileendiamien (OPD)* (Sigma)

1 g

D) *Waterstofperoksied (H_2O_2)*

400 μl

Meng A + B + C + D saam en stoor in die donker.

4.1.12 Suur Sitraat Dekstrose (“Acid Citrate Dextrose”)

Die volgende reagentse is in 1L gedeïoniseerde water opgelos:

24.5 g Anhidriese dekstrose

8.0 g Sitroensuur

22.0 g Trinatrium sitraat

4.1.13 Toets buffer (vir die bepaling van neutrofielvashegting)

8.1816 g NaCl (Labchem Ltd)

0.3728 g KCl (Saarchem-Holpro Analytics Ltd)

0.2033 g MgCl (Saarchem-Holpro Analytics Ltd)

0.1110 g/L CaCl (BDH Ltd Poole England)

0.50445 g/L Glukose (BDH Ltd Poole Engeland)

2.383 g/L HEPES (Sigma)

30 mg menslike serumalbumien (Sigma)

62.9 mg/L MnCl₂ (Merck, Darmstadt, Germany)

Los alle chemikalieë op in 1L gedistilleerde water en pas die pH aan met 10 N

NaOH na 7.4

4.1.14 Witsel telvloeistof

Die volgende reagentie is met 100 ml gedeïoniseerde water gemeng:

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

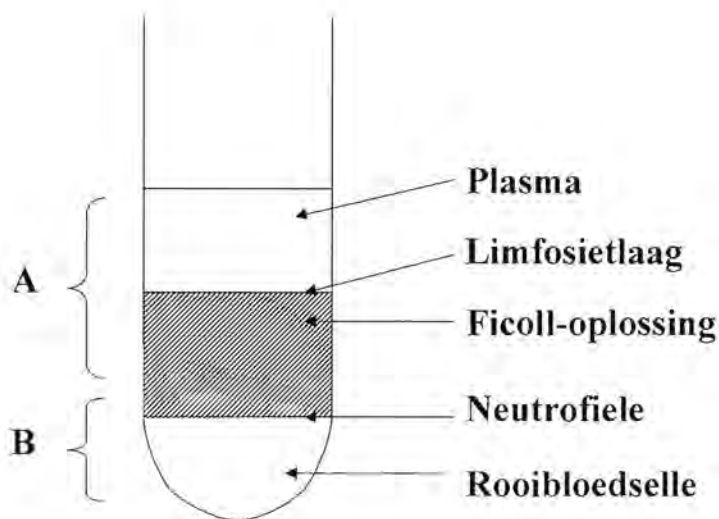
2 ml asynsuur (Saarchem-Holpro Analytics Ltd)

4.2 METODEDES

4.2.1. Voorbereiding van Menslike Neutrofiele

Veneuse mensbloed van gesonde persone is by heparien (5 eenhede per ml bloed) gevoeg om stolling te voorkom. Neutrofiele is met behulp van die "Ficoll-Hypaque"-tegniek, wat deur Böyum in 1968 beskryf is, geïsoleer. Twee volumes van die bloed is baie versigtig met 'n pipet op een volume van 'n ficoll-oplossing (Sigma Diagnostics, St Louis, MO, USA) geplaas en by kamertemperatuur vir 30 minute by 500 g (1600 revolusies per minuut [rpm]) in 'n Beckman TJ-6 sentrifugeerder gesentrifugeer. Na sentrifugasie was die bloedkomponente en ficoll in verskillende lae geskei, soos in Figuur 6 (bl. 61) aangetoon. Die gedeelte wat met A op die diagram aangedui word, is verwyder en die res (B) is behou. Die oorblywende rooibloedselle en neutrofiele (B) is hersuspendeer in 20 ml van 'n 3 % gelatienoplossing (Difco Laboratories, Detroit, USA) (opgelos in FBS). Die suspensie is daarna vir 20 minute by 37°C gelaat sodat die rooibloedselle kan sedimenteer. Die neutrofielryke boonste laag is verwyder en die oorblywende selle met 'n 0.83 % ammoniumchloried-oplossing by 4°C vir 10 minute behandel om die res van die

rooibloedselle te liseer. Die gesuiwerde neutrofiële is vir 10 minute by 500 g gesentrifugeer en gewas in FBS om moontlike sameklompings van neutrofiële te verhoed. Die suspensie wat sodoende verkry is, het uit meer as 90 % neutrofiële bestaan en is met gepaste medium na die verlangde selkonsentrasie verdun.



Figuur 6: Diagrammatiese voorstelling van die buis met Ficoll-oplossing en heparien behandelde bloed na sentrifugasie.

4.2.2. Voorbereiding van Menslike Mononukleêre Leukosiete

Steriele werksprosedures is deurgaans gevolg. Alle pipetpunte is geoutoklaveer en in geslote houers gestoor. Slegs steriele, wegdoenbare plastiese ware (soos eksperimentele buise, mikrotiterplate, ens.) is gebruik. Bottels met media is steriel gehou deur hulle slegs in 'n laminêre vloeikabinet te open en by 4⁰C te stoor. Wanneer onsteriele reagense of eksperimentele middels vir 'n eksperiment benodig is, is hulle deur middel van filtrasie gesteriliseer en slegs in 'n laminêre vloeikabinet gebruik. Eksperimente is deurgaans in 'n laminêre vloeikabinet uitgevoer wat gereeld gesteriliseer is deur dit met 70 % alkohol uit te vee.

Veneuse mensbloed is op 'n ficoll-oplossing gepipetteer soos in 4.2.1 beskryf is. Na die 30 minute sentrifugasie stap is die plasma verwyder en die MNL-band oorgedra na 50 ml polistireen sentrifugeerbuis. Die MNL-suspensie is met RPMI 1640 medium (Bio Whittaker, Walkersville, Maryland) gewas deur dit twee maal vir 10 min by 200 g (1000 rpm) te sentrifugeer. Laasgenoemde wasstappe is herhaal deur 'n 0.83% NH₄CL-oplossing by te voeg om alle moontlik kontaminerende eritosiete te liseer, waarna twee verdere wasstappe met RPMI 1640 medium gevolg het. Die suspensie wat sodoende verkry is, is in HI FKS gesupplementeerde RPMI medium na die gewenste konsentrasie hersuspendeer.

Voorbereiding van 'n monosiet-arme MNL-suspensie

Die MNL-suspensie wat in eersgenoemde prosedure voorberei is, is met 15 ml HI FKS gesupplementeerde RPMI medium verdun en in 'n 75 cm² weefselkultuurfles (Corning Costar Corporation, Cambridge, USA) vir 90 minute by 37⁰C in 'n 5 % CO₂-atmosfeer geïnkubeer. Tydens hierdie inkubasie tydperk kry die monosiete in die selsuspensie die geleentheid om aan die bodem van die weefselkultuurfles vas te heg ('n eienskap van monosiete). Na inkubasie word die medium met oorwegend limfosiete, na 'n steriele 15 ml polistireen proefbuis oorgedra en vir 10 minute teen 200 g gesentrifugeer waarna die bostand versigtig afgegooi is. Die suspensie wat sodoende verkry is, is in HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium na die gewenste konsentrasie hersuspendeer.

4.2.3 Bepaling van MNL-proliferasie

Steriele werksprosedures is deurgaans gevolg. MNL is voorberei soos in 4.2.2 beskryf is. Veneuse mensbloed is van normale, gesonde vrywilliges, maar ook van HIV-geïnfekteerde individue voor behandeling, asook na 'n 2-week lange behandeling met plasebo, 4 g of 8 g oksihumaat per dag, verkry. Pasiënte wat aan hierdie proef deelgeneem het, moes serologies as HIV-1 geïnfekteer bewys word. Hulle moes ook 18 jaar of ouer wees met CD4 positiewe limfosiettellings tussen 200 en 500 x 10⁶/liter en HIV-1 RNA tussen 500 en 500 000 kopieë/ml. Pasiënte moes 'n lewensverwachting van meer as drie maande gehad het, 'n Wêreld Gesondheids Organisasie prestasie status telling ("World Health Organization performance status score") van < 3 en 'n Karnofski indeks van > 80. Hierdie

ondersoek in ooreenstemming met die “World Medical Association Declaration of Helsinki” uitgevoer. Alle etiese en wettige standaarde, soos vasgestel deur die Universiteit van Pretoria sowel as die Medisyne Beheerraad van Suid Afrika, is nagekom. Skriftelike toestemming om aan hierdie proef deel te neem, is vooraf van die pasiënte verkry. Oksihumaat is in 500 mg kapsules beskikbaar gestel. Daar was 4 eksperimentele groepe in die oorspronklike studie: 2, 4, 6 en 8 gram oksihumaat per dag. Hierdie kliniese proef het nie deel uitgemaak van die PhD studie nie. Bloedmonsters is spesifiek van pasiënte versamel vir ‘n *ex vivo* studie. Vir hierdie studie is slegs die limfosiete van twee eksperimentele groepe gebruik, naamlik die 4 en 6 g groepe. In elke groep is pasiënte gerandomiseer sodat 7 pasiënte die aktiewe middel geneem het, terwyl 2 pasiënte plasebos ontvang het. Die plasebo groep het dieselfde aantal identiese kapsules geneem, maar in hierdie geval het dit laktose bevat.

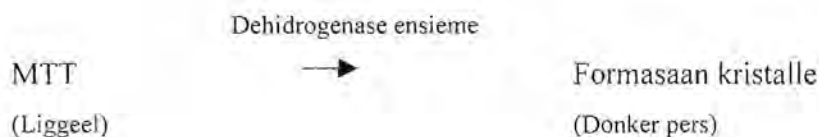
Die bepaling vir MNL-proliferasie is in ronde-bodem 96-putjie mikrotiterplate (Sterilin Ltd, Feltham, England), uitgevoer. Die totale volume per mikrotiterputjie was deurgaans 300 μ l (behalwe as anders vermeld word) en elke behandeling is in duplikaat uitgevoer. Honderd mikroliters MNL-suspensie (3×10^6 selle/ml) is by 140 μ l RPMI 1640 medium (gesupplementeer met 10 % HI FKS, 100 U penisilien/ml en 100 μ g streptomisien/ml) in putjies van ‘n mikrotiter plaat geplaas en vir 60 minute by 37⁰C in vogtige lug met ‘n inhoud van 5 % CO₂, geïnkubeer. Daarna is 30 μ l van die oksihumaat oplossing (5-100 μ g/ml) asook 30 μ l fitohemagglutiniën (PHA) (Murex Biotech Ltd., Dartford, England) met ‘n finale konsentrasie van 5 μ g/ml (optimale konsentrasie soos vooraf vasgestel), by die putjies gevoeg. Kontrole sisteme sonder eksperimentele middel en/of mitogeen is ingesluit. Die plate is vir ‘n verdere 72 ure onder dieselfde toestande geïnkubeer waarna die aantal lewensvatbare selle bepaal is. ‘n Kolorometriese, sitotoksiese MTT-bepaling is daarvoor gebruik.

‘n Vergelykende studie is ook tussen oksihumaat en humiensuur (natrium sout; Aldrich-Chemical Co., Inc., Milwaukee, WI USA) gedoen. Dieselfde metode soos vir die oksihumaat oplossing is hier gevolg.

Beginsels betrokke by die kolorometriese, sitotoksiese MTT-bepaling

Tydens die bepaling van die direkte sitotoksiese aktiwiteite van 'n verbinding, is dit nodig om die aantal lewensvatbare, metabolies aktiewe selle, wat na behandeling met die verbinding nog in die toets-sisteem aanwesig is, te kan bepaal. Verskeie tegnieke is beskikbaar om die aantal lewende selle in 'n toets-sisteem te bepaal. Hierdie tegnieke sluit onder andere die inkorporering van radio-aktief gemerkte nukleotiede, soos (^3H) timidien of (^{125}I) jodium-deoksi-uridien, in die DNA van verdelende selle, in. Alhoewel hierdie radio-aktiewe metodes gedeeltelik geoutomatiseer kan word, is die teenwoordigheid van die radio-aktiewe materiaal 'n groot nadeel en is hierdie tegnieke baie arbeid intensief. Mosman het in 1983 'n kolorimetriese MTT-bepaling, wat van mikrotiter plate gebruik maak, ontwikkel. Hierdie tegniek het daartoe bygedra dat 'n groot hoeveelheid monsters terselfdertyd vinnig en akkuraat geanaliseer kan word, sonder om van radio-aktief gemerkte materiaal gebruik te maak (Mosman, 1983).

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



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

Metode

Nadat die eksperimentele mikrotiter plaat vir 3 dae geïnkubeer is, is 30 µl van 'n 5 mg/ml MTT-oplossing by elke putjie gevoeg. Die plaat is vir 'n verdere 4 uur by 37⁰C in die teenwoordigheid van vog en CO₂ geïnkubeer. Die mikrotiter plate is na inkubasie met MTT vir 10 minute teen 850 g (2000 rpm) gesentrifugeer. Die medium in elke putjie is versigtig verwyder, sonder om die donker pers selkonsentraat onder in die putjie te versteur. Honderd-en-vyftig mikroliter (150 µl) FBS is by elke putjie gevoeg en die mikrotiter plaat is weer vir 10 minute teen 850 g (2000 rpm) gesentrifugeer. Die wasstap met FBS is nog een keer herhaal. Na die wasstappe met FBS, is die formasaaan kristalle opgelos deur 50 µl dimetiel sulfoksied (DMSO) (Sigma) in elke putjie te voeg. Die plate is voortdurend geskud totdat die kristalle volledig in die DMSO opgelos het en die mate van MTT reduksie is spektrofotometries met behulp van 'n Ceres UV 900 HDi multiskanderende plaatleser (Biotec Instruments) by 'n toets golflengte van 540 nm en 'n verwysings-golflengte van 620 nm, bepaal. Die resultate is as persentasie van kontrole (onbehandelde selle) aangedui.

4.2.4 Bepaling van Interleukien 2

Inleiding

Hierdie bepaling maak van die kwantitatiewe “toebroodjie” ensiem immuunbepalings-tegniek gebruik (sien Figuur 7, bl. 68). Die putjies van mikrotiterplate word bedek met antiliggame wat spesifiek is vir menslike IL-2. Monsters word tesame met 'n tweede antiliggam teen IL-2, in hierdie geval is dit 'n gebiotineerde antiliggam, in die putjies gevoeg. Indien IL-2 teenwoordig is, sal dit aan beide die gebiotineerde antiliggam sowel as die gebonde antiliggam bind. Nadat ongebonde monster proteïene en gebiotineerde antiliggame afgewas is, word 'n streptavidien-peperwortelperoksidase konjugaat by die putjies gevoeg. Interleukien 2 wat aan beide die gebiotineerde sowel as gebonde antiliggam gebind het, sal gevolglik deur die streptavidien konjugaat gebind word. 'n Verdere wasstap verwyder ongebonde konjugaat waarna 'n spesifieke substraat-oplossing vir streptavidien by die putjies gevoeg word. Die mate van kleur wat ontwikkel, is by 'n

golflengte van 450 nm gemeet en is direk eweredig aan die hoeveelheid IL-2 wat in die aanvanklike stap gebind is.

‘n Reeks putjies word ook voorberei waar bekende konsentrasies van die menslike IL-2 standaard gebruik word. ‘n Kurwe word getrek en deur die optiese digthede van die onbekende monsters daarmee te vergelyk, kan die konsentrasies van laasgenoemde bepaal word. Hiervoor is ‘n sagteware program “Graph Pad” (San Diego, USA) gebruik.

Metode

Die metode vir MNL-proliferasie soos in 4.2.3 bespreek is, is gevolg. Die effek van oksihumaat is slegs op gestimuleerde kulture getoets. Die mikrotiterplate is egter net vir 2 dae geïnkubeer. Volgens preliminêre studies het limfosiete IL-2 optimaal na 2 dae inkubasie by 37⁰C, geproduseer. Hierdie inkubasietydperk is daarna deurgaans vir hierdie eksperimente gebruik. Die plate is daarna vir 10 minute by 200 g gesentrifugeer. Die bostand is in ‘n ensiem immuunbepalingstegniek gebruik met behulp van ‘n toetspakket wat voorskrifte insluit (“[h] IL-2 ELISA system”; Amersham International Plc, Buckinghamshire, England) en sodoende is die onbekende konsentrasies van IL-2 bepaal. Die resultate is as pg IL-2/ml uitgedruk.

4.2.5 Uitdrukking van CD25, CD38 en HLA-DR.

‘n MNL-suspensie is vanaf gesonde skenkers voorberei soos beskryf in 4.2.2 en met HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium na 2×10^6 selle/ml hersuspendeer. Vyfhonderd mikroliter van die genoemde selsuspensie is met 100 µg/ml van die eksperimentele middel in steriele 5 ml polistireen proefbuis geplaas. PHA by ‘n finale konsentrasie van 5 µg/ml is by sommige sisteme gevoeg en die totale volumes van al die buise is met HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium na 1 ml aangepas. Kontrole sisteme sonder eksperimentele middel en/of mitogeen is ingesluit. Die propies van die buise is baie liggies terug geplaas om gasuitruiling tydens inkubasie toe te laat maar steeds onder steriele toestande te bly. Die buise is daarna vir 72 ure, in die geval van CD25 en CD38, en 48 ure, in die geval van HLA-DR, by 37⁰C in ‘n 5% CO²-atmosfeer geïnkubeer.

Voorlopige studies het bepaal dat hierdie inkubasie periodes optimaal is vir die uitdrukking van hierdie molekules in die teenwoordigheid van PHA.

Vloesitometriese analise is uitgevoer volgens die metode, met modifikasies, soos deur Rabinovitch & June (1990) beskryf is. 'n Coulter Epics XL-MLC vloesitometer (Coulter Corp, Miami, Florida, USA) wat met 'n 488 nm lug-verkoelde argon laser toegerus is, is vir die analise gebruik en die resultate is as die graad van fluoressensie intensiteit (mediaan kanaal getal; "median channel number") uitgedruk.

Daar is dwarsdeur slegs van enkel-kleur monoklonale antiligggame gebruik gemaak. Die afbakening van 'n selpopulasie in hierdie geval was uitsluitlik op die limfosiet populasie gemik. Al die monoklonale antiligggame preparate wat in hierdie studie gebruik is, is afkomstig vanaf Dako A/S, Glostrup, Denmark. Die uitdrukking van CD25, CD38 en HLA-DR is met behulp van 'n fluorochroom fluorosien isotiosinaat (FITC)-gekonjugeerde monoklonaal teen die betrokke merkers bepaal. Isotipiese kontroles (IgG1-FITC) om vir outofluoressensie en nie-spesifieke binding te kontroleer, is ook ingesluit.

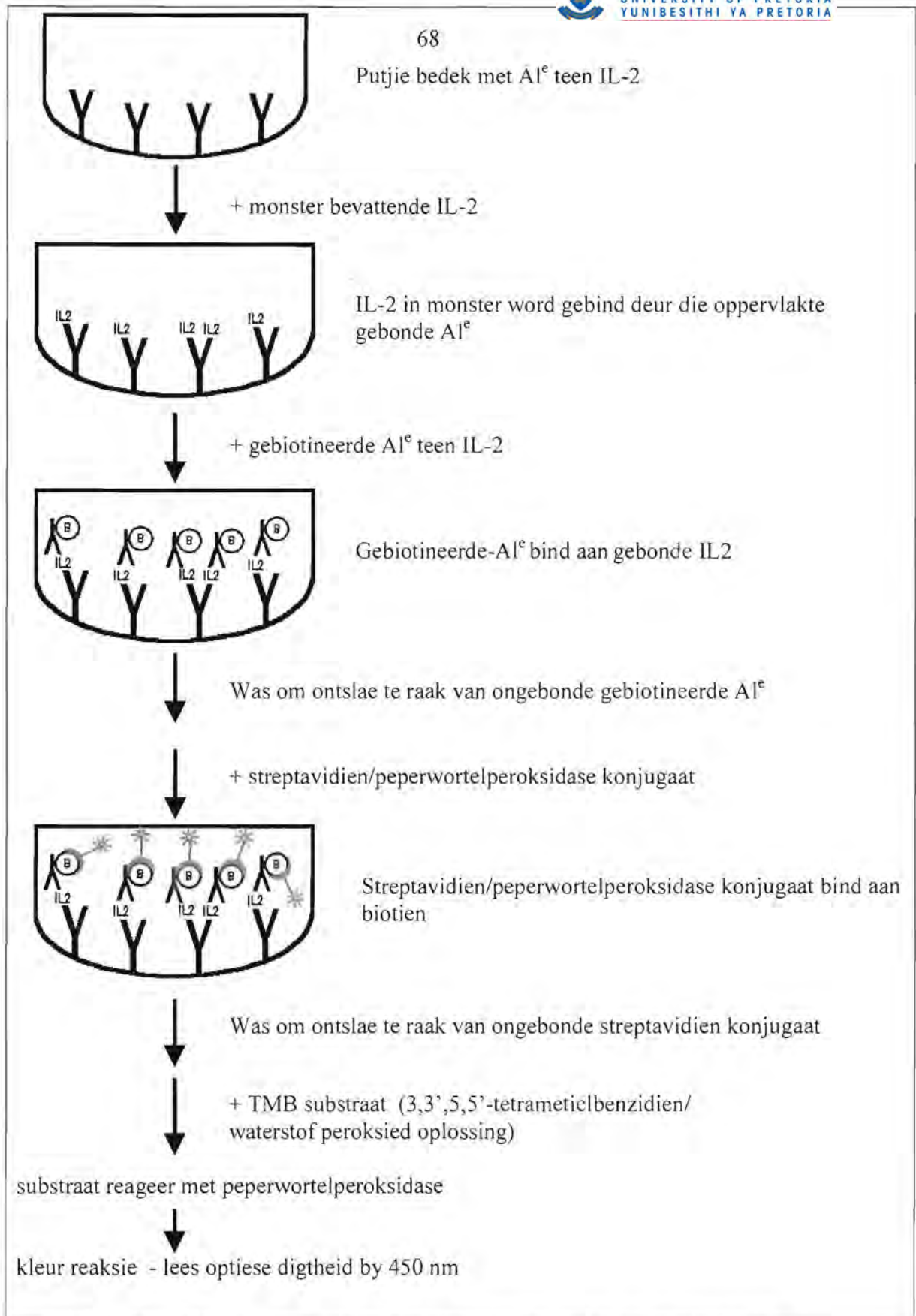
4.2.6 Bepaling van Interleukien 4

Inleiding

Dieselfde beginsel soos vir IL-2 (sien 4.2.4) is hier van toepassing.

Metode

Die hoeveelheid IL-4 wat deur oksihumaat-behandelde menslike limfosiete geproduseer is, is volgens die metode wat in 4.2.4 beskryf is, bepaal. Die konsentrasie van die selsuspensie is in hierdie geval egter na 4×10^6 selle/ml verhoog en die mikrotiterplate is slegs vir 24 ure (optimale produksie van IL-4 volgens voorlopige ondersoeke) onder genoemde toestande geïnkubeer. Die toetspakket in hierdie geval was 'n menslike IL-4 ("[h] IL-4 ELISA system"; Amersham) ELISA sisteem. Die resultate is as pg IL-4/ml uitgedruk.



Figuur 7: Grafiese voorstelling van die prosesse betrokke by die IL-2 ensiembepaling.

4.2.7. Bepaling van Interleukien 6

Inleiding

Dieselfde beginsel soos vir IL-2 (sien 4.2.4) is hier van toepassing.

Metode

Dieselfde prosedure soos vir IL-2 (sien 4.2.4) is gevolg behalwe vir die supernatante wat in hierdie geval as volg verdun is: Die supernatante van die rustende sisteme is 1/50 verdun terwyl die supernatante van die gestimuleerde sisteme 1/100 met RPMI medium verdun is voordat die bepaling van IL-6 volgens die voorskrifte in die toetspakket (“[h] IL-6 ELISA system”; Amersham International Plc) daarop uitgevoer is. Hierdie verdunnings was nodig aangesien van ‘n baie sensitiewe sisteem gebruik gemaak is. Preliminêre studies het getoon dat konsentrasies van IL-6 in die supernatante te hoog was en geskikte verdunnings is daarvolgens bepaal. Die resultate is as pg IL-6/ml uitgedruk.

4.2.8. Bepaling van Interleukien 10

Inleiding

In die geval van IL-10 bepaling is gebruik gemaak van ‘n “High sensitivity interleukin 10 ELISA system” wat aanbeveel word vir die analise van kultuur supernatante en serum monsters. Dieselfde beginsel soos vir IL-2 (sien 4.2.4), behalwe vir een bykomstige stap, is hier van toepassing. Nadat al die ongebonde gebiotineerde antiliggame afgewas is, word ‘n versterkingsreagens bygevoeg. Die versterkingsreagens verhoog die sensitiwiteit van die reaksie deurdat heelwat peperwortel peroksidase molekules asook streptavidien molekules daaraan bind. Die ongebonde versterkingsreagens word afgewas waarna die substraat bygevoeg word.

Metode

Vyfhonderd mikroliter van ‘n 2×10^6 /ml MNL-suspensie, word met 300 μ l HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium vir 15 min by 37°C in ‘n 5 % CO₂-atmosfeer, gepreïnkubeer. Daarna is 100 μ l van die geneesmiddel by ooreenstemmende buisies

gevoeg en vir 'n verdere 15 min onder soortgelyke toestande geïnkubeer. Na laasgenoemde inkubasie periode is 100 µl PHA met 'n finale konsentrasie van 5 µg/ml (optimale konsentrasie soos vooraf vasgestel) by die gestimuleerde sisteme en 100 µl HI FKS gesupplementeerde RPMI by die rustende sisteme, gevoeg. Die buise is vir 'n verdere 2 dae by 37°C in 'n 5% CO₂-atmosfeer geïnkubeer waarna hulle vir 10 min by 500 g gesentrifugeer is. Die bostande moes 1/100 met RPMI medium verdun word vir die finale analise. Hierdie verdunning was noodsaaklik aangesien preliminêre proewe wat uitgevoer is, getoon het dat hierdie spesifieke toetsstelsel te sensitief was vir die hoeveelheid IL-10 teenwoordig in die monsters. Die verdunde supernatante is verder met behulp van die toetspakket wat voorskrifte ingesluit het ("[h] IL-10 ELISA system"; Amersham International Plc), geprosesseer om die onbekende IL-10 waardes te bepaal. Die resultate is as pg IL-10/ml uitgedruk.

4.2.9 Bepaling van Tumor Nekrose Faktor α

Inleiding

Dieselfde beginsel soos vir IL-2 (sien 4.2.4) is hier van toepassing.

Metode

Limfositete is met 'n reeks verdunnings van oksihumaat (20-100 µg/ml) behandel om die effek daarvan op TNF- α -produksie te ondersoek. Dieselfde metode soos vir IL-6 beskryf (sien 4.2.7), is vir die bepaling van TNF- α gevolg. Die supernatante van die rustende sisteme is (volgens voorlopige studies vasgestel) ¹/₅₀ verdun terwyl die supernatante van die gestimuleerde sisteme ¹/₁₀₀ met RPMI medium verdun is, alvorens die bepaling met behulp van 'n toetspakket, wat voorskrifte insluit ("[h] TNF- α ELISA system"; Amersham International Plc), uitgevoer is. Die resultate is as pg TNF- α /ml uitgedruk.

4.2.10 Bepaling van Interferon γ

Inleiding

Dieselfde beginsel soos vir IL-2 (sien 4.2.4) is hier van toepassing.

Metode

Dieselfde prosedure soos vir IL-2 beskryf is (sien 4.2.4), met enkele uitsonderings, is vir die bepaling van IFN- γ gevolg. Die oksihumaat-behandelde MNL is vir 3 dae na stimulasie by 37⁰C in die teenwoordigheid van 5% CO₂ geïnkubeer. Volgens preliminêre studies is vasgestel dat limfosiete na 3 dae inkubasie by 37⁰C, IFN- γ maksimaal produseer. Die plate is daarna ook vir 10 minute by 200 g afgeswaai, maar die supernatante van die gestimuleerde sisteme is 1/100 (volgens voorlopige studies vasgestel) met RPMI medium verdun terwyl die rustende sisteme onverdund gebruik is. Die verdunning was nodig aangesien die sisteem wat gebruik is te sensitief was vir die groot mate van IFN- γ wat deur die gestimuleerde limfosiete geproduseer is. Die supernatante is met behulp van 'n toetspakket en volgens die voorskrifte van die vervaardiger ("[h] IFN- γ ELISA system"; Amersham International Plc) vir die teenwoordigheid van IFN- γ ondersoek. Die resultate is as pg IFN- γ /ml uitgedruk.

4.2.11 Bepaling van Prostaglandien E₂

Inleiding

Die PGE₂ kompeterende ensiem immuunbepalingssisteem deur Amersham International Plc is spesiaal vir navorsingsdoeleindes ontwerp en berus op die kompetisie tussen ongemerkte PGE₂ en 'n gefikseerde hoeveelheid van peroksidase-gemerkte PGE₂ vir 'n beperkte aantal bindingsareas op 'n PGE₂ spesifieke antiliggaam. Die toetspakket sluit protokolle in waar lisereagense gebruik word wat doeltreffende ekstraksie van PGE₂ vanuit selkulture bewerkstellig. In die eerste stap word 'n lisereagens by die selkultuur gevoeg wat die selmembraan hidroliseer om intrasellulêre PGE₂ vry te stel. Die tweede lisereagens sekwesteer die sleutelkomponent van die eerste lisereagens en verseker dat PGE₂ vry is vir

daaropvolgende analise sonder om met antigeen: antiliggaam binding in te meng. Die antisera en PGE₂ peroksidase konjugaat is by die tweede lisereagens ingesluit.

Bok anti-muis antiliggame is in die putjies van mikrotiterplate gefikseer. 'n Tweede antiliggaam, naamlik 'n muis anti-PGE₂ antiliggaam, sowel as óf verskillende bekende konsentrasies PGE₂ óf die monsters met onbekende hoeveelhede PGE₂, word by die putjies gevoeg. Die tweede antiliggaam bind aan die gefikseerde bok anti-muis antiliggaam terwyl PGE₂ in die monster weer aan die muis anti-PGE₂ bind. Daarna word 'n PGE₂ peroksidase konjugaat by die putjies gevoeg wat aan die oorblywende muis –anti-PGE₂ antiliggame sal bind. Enige ongebonde ligand kan maklik deur 'n wasprosedure verwyder word. Die hoeveelheid peroksidase gemerkte PGE₂ wat aan die antiliggaam gebind word, word deur die byvoeging van 'n TMB substraat (3,3',5,5'-tetrametielbenzidien/waterstof peroksied oplossing) bepaal waarna 'n suuroplossing die reaksie stop (sien Figuur 8, bl. 73). Die optiese digthede (OD) is spektrofotometries bepaal by 'n golflengte van 450 nm.

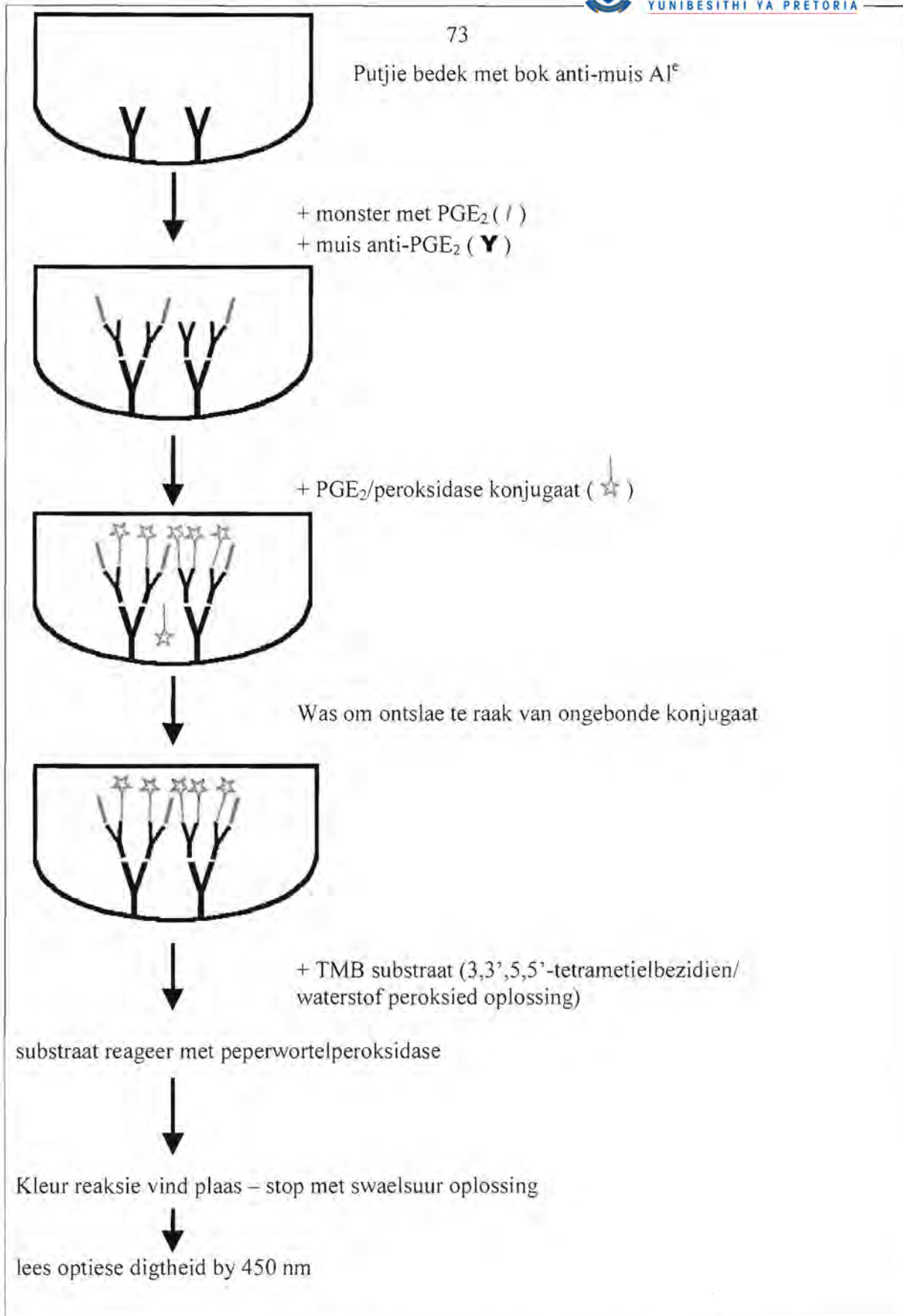
Resultate is as volg bereken: % Gebonde/ongebonde PGE₂ =

$$\frac{\text{OD van standaard of monster} - \text{OD van Nie-spesifieke-binding(NSB)}}{\text{OD van agtergrond PGE}_2 - \text{OD van NSB}} \times 100$$

'n Standaardkromme kan hiervolgens gegenerer word deur die persentasie gebonde/ongebonde PGE₂ as 'n funksie van die log PGE₂ konsentrasie te plot. Die pg/putjie waarde kan direk van die standaardkromme gelees word.

Metode

Mononukleêre leukosiete is in HBSO na 4×10^6 selle/ml hersuspendeer waarvan 500 µl hiervan asook 300 µl HBSO in 5 ml proefbuisie geplaas is en by 37°C in 'n 5% CO₂-atmosfeer gepreïnkubeer is. Daarna is 100 µl van die eksperimentele middel by ooreenstemmende buisies gevoeg en vir 'n verdere 15 minute onder soortgelyke toestande geïnkubeer. Die behandelde MNL is met 'n finale konsentrasie van 100 ng/ml forbol-12-miristaat-13-asetaat (FMA) gestimuleer terwyl rustende kontroles die ooreenstemmende



Figuur 8 : Grafiese voorstelling van die proses betrokke by die PGE₂ ensiembepaling waar PGE₂ wel teenwoordig is.

hoeveelheid HBSO ontvang het en vir 'n verdere 20 min geïnkubeer is. Al die proefbuis is daarna vir 10 minute by 500 g gesentrifugeer en 50 μ l van die supernatante is met behulp van 'n toetspakket wat voorskrifte insluit ("Prostaglandin E₂ ensymeimmunoassay"; Amersham International Plc) geprosesseer om die PGE₂ konsentrasies van elkeen te bepaal. Alhoewel hierdie metode optimaal was vir die bepaling van PGE₂ konsentrasies, is dieselfde supernatante vir die bepaling van LTB₄ konsentrasies gebruik (sien in 4.2.12). Die resultate word as pg PGE₂/putjie uitgedruk.

4.2.12 Bepaling van Leukotriene B₄

Inleiding

Dieselfde beginsel soos vir PGE₂ (sien 4.2.11) is hier van toepassing. In hierdie geval word egter van donkie anti-haas en haas anti-LTB₄ antiligggame gebruik gemaak. 'n Standaardkromme, wat ook die lineariteit van verdunnings van die standaard aantoon, word volgens die formule soos beskryf in 4.2.11 gegengereer en die pg/putjie waarde van die monsters kan direk van die standaardkromme geles word.

Metode

Dieselfde prosedure as in die geval met PGE₂ (sien 4.2.11) word gevolg om MNL te behandel en die supernatant vir die LTB₄ bepaling voor te berei wat ook met behulp van 'n toetspakket insluitende voorskrifte ("Leukotriene B₄ ensymeimmunoassay system"; Amersham International Plc), uitgevoer word. Die resultate word as pg LTB₄/putjie uitgedruk.

4.2.13 Bepaling vir CR3 Uitdrukking

Vars getapte veneuse mensbloed van gesonde persone is by K₃EDTA (10 μ l per ml bloed) gevoeg om stolling te voorkom. Agt honderd mikroliter (800 μ l) hoeveelhede van die bloed is in 5 ml polistireen proefbuis geplaas waarna die buise met NH₄CL oplossing (4.1.1) opgevolg en vir 10 minute op ys geplaas is. Die buise is vir 10 minute by 500 g (1600 rpm) gesentrifugeer en een maal met NH₄CL-oplossing gewas om te verseker dat

enige kontaminerende rooibloedselle deur lise verwyder is. Daarna is die selle twee maal met HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium vir 10 minute by 500 g gewas.

Sewehonderd mikroliter (700 μ l) HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium word by die gewaste selsuspensies gevoeg en vir 15 minute in 'n waterbad by 37⁰C geïnkubeer. Daarna word 100 μ l van die eksperimentele middel by die relevante buise gevoeg en weereens vir 15 minute in 'n waterbad by 37⁰C geïnkubeer. In hierdie proef word van twee stimulant gebruik gemaak waarvan elk se optimale konsentrasie deur preliminêre eksperimente vasgestel is, naamlik FMA by 'n finale konsentrasie van 100 ng/ml en N-formiel-metioniel-leusiel-feniellalanien:sitokalasien B mengsel (FMLF:SB) by 'n finale konsentrasie van 2 μ M:1 μ M. FMLF is 'n sterk sintetiese stimulant terwyl SB 'n fungale metaboliet is wat neutrofiel die vermoë om te fagositêer ontnem en daardeur word verseker dat die granule inhoud uitgeskei word. Die gestimuleerde sisteem het 100 μ l van genoemde stimulant ontvang terwyl rustende sisteme 100 μ l HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium ontvang het. Die FMA-gestimuleerde sisteem is vir 5 minute en die FMLF:SB-gestimuleerde sisteem vir 30 minute in 'n waterbad by 37⁰C geïnkubeer.

Vir die vloeisitometriese analise is 5 μ l van die monoklonale antiliggam [fluorochroom fluorosien isotiosianaat (FITC)-gekoppelde antiliggam teen CD11b] in nuut gemerkte buisies geplaas waarby 100 μ l behandelde selsuspensies gevoeg is vir die bepaling van CR3. IgG₁FITC (isotipiese kontrole) is vir die bepaling van nie-spesifieke binding ingesluit. Daar is dwarsdeur slegs van enkel-kleur monoklonale antiliggam gebruik gemaak. Die neutrofiel venster is opgestel gebaseer op ligverspreiding en die afbakening van die selpopulasie is volgens standaard prosedures uitgevoer. Analises is uitgevoer met behulp van 'n Coulter Epics XL-MLC vloeisitometer (Coulter Corp., Miami, Florida) voorsien van 'n lugverkoelde argon laser by 485 nm. Die resultate is as die graad van fluoressensie intensiteit (mediaan kanaal getal; "mean channel number") uitgedruk. Aangesien slegs van 'n enkele kleur fluoressensie gebruik gemaak is, was kompensasië vir kleur nie nodig nie.

4.2.14 Bepaling van Neutrofiel Vashegting aan E-selektien en ICAM-1 deur gebruik te maak van Getransfekteerde Fibroblast Sellyne

'n Metode wat die spesifieke bepaling van neutrofielvashegting aan die endoteliale sel vashegtingsreseptore E-selektien en ICAM-1 moontlik maak, is ontwikkel (Håkanson *et al.*, 1994). Vashegting van granulosite aan vaskulêre endoteliale selle word deur induksie en aktivering van vashegtingsmolekules op granulosite en endoteliale selle bemiddel. Neutrofiel granulosite besit die vermoë om aan die endoteliale vashegtingsmolekules E-selektien en ICAM-1 vas te heg (Albelda en Buck, 1990; Bevilacqua, 1993). ICAM-1 op endoteelselle is die ligand van die CD11a/CD18 en die CD11b/CD18 komplekse. Laasgenoemde kompleks is ook die C3bi-reseptor. Vashegting aan E-selektien word bemiddel deur sialiel-Lewis^x. Die hoeveelheid granulosite wat na behandeling vasgeheg het, is met behulp van 'n ensiematiese peroksidase metode, waar 1,2-fenileendiamien (OPD) as substraat aangewend word (Håkanson *et al.*, 1994), bepaal.

Om hierdie getransformeerde sellyne voor te berei, is van 'n baba hamster niersellyn (BHK-21) (ATCC CCL 10) gebruik gemaak (Chen en Okayama, 1987). Die getransformeerde selle is in 'n groeimedium, waarby metotreksaat gevoeg is, geselekteer.

Kweking en instandhouding van normale en getransformeerde BHK sellyne

Baba hamster nierfibroblaste, normaal (BHK) en getransformeerde sellyne, is onderhou in Dulbecco se gemodifiseerde Eagle se medium (DMEM) (Biowhittaker, Walkersville, Maryland) wat met 10 % HI FKS, 100 U penisillien/ml en 100 µg streptomisien/ml gesupplementeer is. Metotreksaat (Sigma) is by die medium van getransformeerde sellyne, by 'n finale konsentrasie van 1 µmol/L, gevoeg. Die getransformeerde sellyne het bestaan uit (i) BHK 126-16 wat menslike E-selektien op sy oppervlakte uitdruk en (ii) BHK 331-7 wat menslike ICAM-1 op sy oppervlakte uitdruk. Die oorspronklike sellyn, naamlik BHK-21, is as kontrole in die eksperimente gebruik.

Die fibroblaste is by 37⁰C in 'n 5 % CO₂-atmosfeer gekweek en elke derde of vierde dag gepasseer. Hierdie sellyne heg vas aan die bodem van die weefselkultuur fles en vorm 'n

“mat” wat met behulp van ‘n tripsien verseen oplossing (Biowhittaker, Walkersville, Maryland) verwyder word wanneer hulle gepasseer of vir eksperimente benodig word.

Die uitdrukking van ICAM-1 vashegtingsmolekules is vloesitometrië bevestig met behulp van ‘n fluoro-chroom fluorosien isotiosianaat (FITC)-gekonjugeerde monoklonale antiliggaam teen CD54. In die geval van E-selektien, is van CD62E ELAM-1 gebruik gemaak. Hierdie produk bestaan uit twee verskillende antiliggame, naamlik ‘n ongemerkte bok antiliggaam wat aan E-selektien op die fibroblast selle bind en ‘n tweede FITC-gekonjugeerde muis monoklonale antiliggaam (IgG [Fc]) wat gerig is teen bok F(ab’)₂ fragment en dus aan eersgenoemde bind. Die vloesitometriese prosedures wat gevolg is, is reeds volledig in 4.2.5 beskryf.

Die BHK-21 sellyn het 2.95 % ICAM-1 en 3.3 % E-selektien uitgedruk, die BHK 126-16 sellyn het 2.35 % ICAM-1 en 94.0 % E-selektien uitgedruk terwyl die BHK 331-7 sellyn 99.2 % ICAM-1 en 2.3 % E-selektien uitgedruk het.

Voorbereiding van fibroblast sellyne vir gebruik in eksperimente

Die medium van ‘n 75% volgegroeide fles is verwyder en vervang met 2 ml van ‘n 0.2 % steriele tripsien verseen oplossing. Die fles is versigtig geskud, die vloeistof is weereens verwyder en vervang met 4 ml tripsien verseen oplossing waarna dit vir 3-5 minute by 37⁰C geherinkubeer is. Die los selle is na ‘n 15 ml polistireen proefbuis oorgedra, opgevol met HI FKS gesupplementeerde DMEM en vir 10 minute teen 200 g (1000 rpm) gesentrifugeer. Die boonste medium is versigtig afgegooi en die selsuspensie is met HI FKS gesupplementeerde DMEM na 1x10⁵selle/ml hersuspendeer.

Bepaling van neutrofielvashegting

Steriele werksprosedures is deurgaans gevolg (sien 4.2.2). Hierdie tegniek is op rondobodem 96-putjie mikrotiterplate (Sterilin Ltd, Feltham, England) uitgevoer. Die totale volume per mikrotiterputjie was 200 µl en elke behandeling is in triplikaat uitgevoer. Elke putjie het 100 µl HI FKS gesupplementeerde DMEM medium asook 100 µl van ‘n 1x10⁵ fibroblaste/ml suspensie ontvang. Die plaat is vir 24 ure by 37⁰C in ‘n 5 % CO₂-atmosfeer

geïnkubeer. Die plaat is drie maal met die toetsbuffer gewas (met behulp van 'n multipipet) en deeglik droog geklad. Daarna is 140 µl toetsbuffer by al die putjies gevoeg asook 20 µl van die eksperimentele middel in bestemde putjies. Die plaat is vir 15 minute onder dieselfde toestande as voorheen geïnkubeer. Twintig mikroliter selsuspensie met 'n konsentrasie van 2.5×10^6 selle/ml is by elke putjie gevoeg, gevolg deur 20 µl FMA met 'n finale konsentrasie van 25 ng/ml wat by gestimuleerde sisteme gevoeg is, terwyl rustende sisteme 20 µl toetsbuffer ontvang het. Die verhouding van neutrofiele tot fibroblaste, naamlik 5:1, is vooraf vir optimale vashegting bepaal. Die plaat word vir 60 minute by 37°C in 'n 5 % CO₂-atmosfeer geïnkubeer waarna dit drie maal met toetsbuffer gewas en deeglik droog geklad is. Vervolgens is 100 µl OPD-substraatoplossing by al die putjies gevoeg, die plaat is vir 3-5 minute by kamertemperatuur gelaat en daarna is 100 µl stop-oplossing (H₂SO₄) by die putjies gevoeg. 'n Kleurreaksie ontstaan en die mate van MPO-produksie is spektrofotometries by 'n golflengte van 492 nm bepaal.

'n Reeks verdunnings (1-100%) van die neutrofielsuspensie wat vir bogenoemde bepaling gebruik is, is op dieselfde manier geprosesseer om die MPO-produksie met aantal neutrofiele te kontroleer.

4.2.15 Bepaling van Eosinofiliese Kationiese Proteïene (EKP) met behulp van Radio Isotoop Opname (RIO)

Inleiding

Eosinofielgranules bevat onder andere unieke eosinofiliese kationiese proteïene en die mate van vrystelling daarvan is 'n indikatie van eosinofiel degranulasie. 'n Preliminêre studie het getoon dat die Unicap EKP Fluoro-ensiem-immuunbepaling (Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Uppsala, Swede), as gevolg van oksihumaat se intensiewe kleur, nie geskik was nie. Vir hierdie bepaling is daar dus van 'n radio-aktiewe toetspakket (Pharmacia AB, Uppsala, Swede) gebruik gemaak wat twee verskillende antiliggame bevat het. EKP in die monsters het met 'n gefikseerde hoeveelheid ¹²⁵I-gemerkte EKP vir die bindingsareas van spesifieke antiliggame gekompeteer. Gebonde en vry EKP is geskei deur byvoeging van 'n tweede antiliggaam "immunesorbent" waarna die buisies afgeswaai

en die bostand versigtig afgegooi is. Die mate van radio-aktiwiteit is met behulp van 'n vaste fase gammateller (LKB Wallac) bepaal en is omgekeerd proporsioneel aan die hoeveelheid EKP in die monster.

Metode

Oorspronklik is eosinofiliese granulosiete vanuit perifere bloed volgens die metode van Egesten *et al.* (1998) geïsoleer, maar aangesien eosinofiele so 'n lae persentasie van die leukosiete, wat hoofsaaklik uit neutrofiële bestaan, uitmaak, was dit moeilik om voldoende selle vir die eksperiment te bekom. Granulosiete as 'n geheel is vervolgens geïsoleer volgens die standaard metode wat reeds beskryf is (sien 4.2.1) en bloed is vanaf persone met 'n eosinofielpersentasie van tussen 5-10% verkry. Die geïsoleerde granulosiete is met HBSO na 'n konsentrasie van 1×10^7 selle/ml hersuspendeer en 600 μ l daarvan is met 100 μ l van die eksperimentele middel (5 μ g – 100 μ g/ml) in verskillende polistireen buise gevoeg. Die volume van elke buis is met HBSO na 0.9 ml opgemaak. Die buise is vir 10 min by 37⁰C geïnkubeer. Honderd mikroliter (100 μ l) van die stimulant [FMLF (2 μ M) in kombinasie met SB (2 μ g/ml), of geïmponeerde Sephadex krale] is by die buise gevoeg en vir 'n verdere 15 minute by 37⁰C geïnkubeer. Kontroles (sonder eksperimentele middel) van rustende selle en gestimuleerde selle is by al die eksperimente ingesluit. Na die inkubasie periode is die buise vir 10 minute in 'n ysbad geplaas waarna hulle vir 5 minute by 700 g gesentrifugeer is. Die neutrofielvrye supernatante is daarna na skoon buise oorgedra. Die mate van EKP in die supernatante is volgens die voorskrifte van die vervaardiger bepaal. Die orige supernatante is by -70⁰C vir miëloperoksidase (MPO) analise gevries.

4.2.16 Bepaling van Miëloperoksidase

Neutrofiel degranulasie word bepaal volgens die mate van vrystelling van MPO vanaf die primêre granules.

Metode

Die MPO substraat guaiacol en H_2O_2 (finale konsentrasie by 10 mM en 5 mM respektiewelik) is by 'n finale reaksie volume van 250 μ l supernatant (verkry soos beskryf in 4.2.15) gevoeg en ensiemaktiwiteit is spektrofotometries by 'n golflengte van 450 nm gemonitor (Anderson *et al.*, 1981). Peperwortelperoksidase (Sigma) is as standaard gebruik om 'n kalibrasiekurve op te stel.

Die kleurintensiteit van oksihumaat het nie die MPO spektrofotometriese lesings beïnvloed nie. Daar is hiervoor gekontroleer deur die eksperimentele middel eers na degranulasie van die selle by die sisteem te voeg.

4.2.17 Bepaling van die Sitotoksiese Aktiwiteit van Oksihumaat-behandelde MNL

In hierdie studie word van 'n menslike lewerkanker sellyn sowel as van gesuiwerde MNL gebruik gemaak.

Kweking en Instandhouding van Lewerkanker Selle

'n Menslike lewerkanker sellyn (PLC) (ATCC CRL 8024) is in Earl se minimum essensiële medium (E MEM) (Biowhittaker, Walkersville, Maryland) onderhou. Die medium is met 5 % HI FKS, 100 U penissilien/ml en 100 μ g streptomisien/ml gesupplementeer. Die PLC selle is in laasgenoemde medium by 37⁰C in 'n 5 % CO₂-atmosfeer gekweek en elke derde of vierde dag gepasseer. Die selle heg vas aan die bodem van die weefselkultuur fles en vorm 'n mat wat met behulp van 'n tripsien verseen oplossing verwyder is wanneer hulle gepasseer of vir eksperimente nodig is.

Voorbereiding van PLC selle vir gebruik in eksperimente

Die medium van 'n 75 % volgegroeide fles is verwyder en vervang met 2 ml van 'n 0.2 % steriele tripsien verseen oplossing (Biowhittaker, Walkersville, Maryland). Die fles is versigtig geskud, die vloeistof is weereens verwyder en vervang met 4 ml tripsien verseen oplossing waarna dit vir 3-5 minute by 37⁰C geherinkubeer is. Die los selle is na 'n 15 ml polistireen proefbuis oorgedra, opgevol met HI FKS gesupplementeerde E MEM en vir 10

minute teen 200 g (1000 rpm) gesentrifugeer. Die boonste medium is versigtig afgegooi en die selsuspensie is met HI FKS gesupplementeerde E MEM na 2×10^5 selle/ml hersuspendeer.

MNL-suspensie

'n MNL-suspensie is voorberei soos in 4.2.2 beskryf en is na 1×10^6 selle/ml hersuspendeer.

Metode

Die totale volume per mikrotiterputjie was deurgaans 300 μ l en elke behandeling is in duplikaat uitgevoer. Honderd mikroliter PLC selle (2×10^5 selle/ml) is met 40 μ l HI FKS gesupplementeerde E MEM medium in putjies van 'n mikrotiterplaat geplaas en vir 30 minute by 37°C in vogtige lug met 5 % CO_2 geïnkubeer. Daarna is 100 μ l MNL-suspensie (1×10^6 selle/ml) by die putjies gevoeg en vir 'n verdere 30 minute onder dieselfde toestande geïnkubeer. Die verhouding tussen teikenselle:MNL was 1:5. Dertig mikroliter (30 μ l) van die eksperimentele middel (5-100 $\mu\text{g/ml}$) is in relevante putjies geplaas, die plaat is weereens vir 30 minute onder soortgelyke toestande geïnkubeer waarna 30 μ l fitohemagglutinien (PHA) (Murex Biotech Ltd., Dartford, England) met 'n finale konsentrasie van 5 $\mu\text{g/ml}$ (optimale konsentrasie soos vooraf vasgestel), by die putjies gevoeg is. Kontrole sisteme sonder eksperimentele middel en/of mitogeen is ingesluit asook PLC-selle, wat in die afwesigheid van MNL, op dieselfde wyse gekweek en behandel is. Die plate is vir 'n verdere 72 ure onder dieselfde toestande geïnkubeer. Die MNL is na die inkubasie tydperk verwyder deur die mikrotiterplate liggies te skud, die vloeistof uit te skud en 150 μ l HI FKS gesupplementeerde E MEM by alle putjies te voeg. Hierdie wasproses is drie maal herhaal en sodoende het slegs die vasgehegte PLC-selle in die putjies oorgebly. Daarna is 200 μ l HI FKS gesupplementeerde E MEM medium by al die putjies gevoeg en die mitokondriale aktiwiteit van die PLC-selle is met behulp van die MTT kleurmetode bepaal (sien 4.2.3).

4.2.18 Bepaling van NK-sel Aktiwiteit

Die NK-sel aktiwiteit is bepaal as die mate van ^{51}Cr wat in die supernatant deur die leukemie afkomstige K562 kanker sellyn (Pross & Jondal, 1975) vrygestel is. Hierdie sellyn is baie sensitief vir NK aktiwiteit. Die gewysigde metode is gevolg soos deur Bouic *et al.* (1996) beskryf is.

Kweking en instandhouding van K562 kankerselle

Hierdie kankersellyn groei as drywende aggregate in 75 cm² weefselkultuurflesse. Die selle is in RPMI 1640 medium (Biowhittaker, Walkersville, Maryland) onderhou wat met 10 % HI FKS, 100 U penisilien/ml en 100 µg streptomisien/ml gesupplementeer is. Die K562 selle is in laasgenoemde medium by 37⁰C in vogtige lug met 'n inhoud van 5 % CO₂ gekweek en is elke derde dag gepasseer.

MNL-suspensie

'n MNL-suspensie is voorberei soos in 4.2.2 beskryf is en hersuspendeer na 8x10⁷ selle/ml. Vyf-en-twintig mikroliter (25 µl) van die MNL-suspensie en 155 µl HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium is in putjies van 'n mikrotiter plaat geplaas. Daarna is 20 µl van die eksperimentele middel (40-100 µg/ml) by ooreenstemmende putjies gevoeg en die mikrotiter plaat is vir 16-18 ure by 37⁰C in vogtige lug met 'n inhoud van 5 % CO₂ geïnkubeer. Kontrole putjies vir die spontane vrystelling van die teikensel voorbereiding het 175 µl HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium ontvang terwyl putjies met 175 µl van 'n 5 % saponien oplossing (Sigma) as kontroles vir die maksimum vrystelling van die teikenselle gedien het.

Voorbereiding van K562 selle vir gebruik in eksperimente

Die K562 selle is steriel vanuit 'n 75 cm² weefselkultuurfles in 'n 15 ml polistireen proefbuis oorgegooi en vir 10 minute teen 200 g gesentrifugeer. Die boonste medium is versigtig afgegooi en die selle is weereens met HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium gewas. Na die laaste wasstap is die onderste sel-konsentraat in 1-2 ml HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium na 8 x 10⁵ selle/ml hersuspendeer. Vier milliliter

van laasgenoemde selsuspensie is met 40 μl ^{51}Cr (150 $\mu\text{Ci/ml}$) (as chromaat, spesifieke aktiwiteit 50-400 $\text{mCi/mg } ^{51}\text{Cr}$, Amersham International Plc) vir 90 minute by 37°C geïnkubeer terwyl dit stadig geroteer is. Die suspensie is daarna vir 10 minute by 200 g gesentrifugeer, die bostand is versigtig afgegooi en met yskoue HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium opgevol. Hierdie wasstap is vier maal herhaal om alle ongebonde ^{51}Cr te verwyder. Die gewaste selsuspensie is met 1 ml HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium hersuspendeer en was gereed vir gebruik in die eksperiment.

Na inkubasie van die behandelde MNL-selle, is 25 μl van die ^{51}Cr -gemerke K562 selsuspensie by al die putjies gevoeg. Die verhouding van effektor:teiken selle was 25:1. Die mikrotiterplaat is liggies geskud en vir 10 minute by 500 g (1600 rpm) gesentifugeer waarna dit vir 4 ure by 37°C in vogtige lug met 'n inhoud van 5 % CO_2 geïnkubeer is. Elke putjie het daarna 100 μl yskoue HI FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium ontvang en die plaat is weereens vir 10 minute by 500 g gesentrifugeer. Honderd mikroliter (100 μl) van die supernatante is in ooreenstemmende gemerkte polistireen buisies geplaas en die mate van ^{51}Cr is met 'n gamma spektrometer (LKB WALLAC) bepaal. Die resultate is uitgedruk as persentasie spesifieke lise wat as volg bepaal is:

$$\% \text{ Spesifieke Lise} = \frac{\text{Toets tellings per minuut (tpm)} - \text{Spontane tpm} \times 100}{\text{Maksimum tpm} - \text{Spontane tpm}}$$

4.2.19 Invloed van die Eksperimentele Middel op die Membraan Stabiliteit van Skaap Eritrosiete

Die membrane van eritrosiete word algemeen as model om die effek van verskeie faktore, soos temperatuur en geneesmiddels, op selmembrane te bestudeer, gebruik (Becker en Deamer, 1991). Die redes hiervoor is (1) dat eritrosiete maklik in groot hoeveelhede verkrygbaar is en (2) dat die selmembrane van eritrosiete relatiewe eenvoudige strukture is. Eritrosiet selmembrane kan daarom as model vir die meer komplekse membrane van ander selipes gebruik word. 'n Volwasse soogdier eritrosiet besit nie addisionele organelle nie

en verrig min metaboliese prosesse. Dit is essensiël 'n membraan-agtige sakkie hemoglobien (Becker en Deamer, 1991; Voet en Voet, 1995).

Hemoglobien is 'n rooi, suurstof-draende proteïen met 'n molekulêre massa van 64 450. Elke eritrosiet besit ongeveer 29 pg hemoglobien. Indien die selmembrane van eritrosiete deur geneesmiddels en/of fisiese hantering beskadig word, word die hemoglobien vanuit die selle vrygestel. Hierdie proses staan as hemolise bekend. Die vrygestelde hemoglobien is water-oplosbaar en kleur die omringende medium en/of buffer rooi (Ganong, 1991). Die kleur intensiteit van hierdie vrygestelde hemoglobien kan spektrofotometries by 415 nm bepaal word (Voet & Voet, 1995).

Metode

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

Perifere bloed is vanaf 'n skaap verkry. Honderd milliliter bloed is met 15 ml anti-koagulant, [suur sitraat dekstrose (ACD)], gemeng en by 4^oC gestoor.

Tydens 'n eksperiment is 2 – 3 ml van die ACD-skaapbloed in 'n 50 ml proefbuis gevoeg. Die proefbuis is met FBS gevul en vir 5 minute teen 850 g (2000 rpm) gesentrifugeer. Na sentrifugasie is die buffer versigtig afgetrek. Die wasstap is nog twee keer herhaal. Na die laaste wasstap is die eritrosiet konsentraat onder in die proefbuis tot 'n volume van 5 ml in Hanks gebalanseerde sout-oplossing (pH 7.4, HBSO; Highveld Biological Edm (Bpk) opgemaak. Die hematokrit (% eritrosiete in oplossing) is tot 0.5% in HBSO (pH 7.4) aangepas. Honderd mikroliter van die 0.5% eritrosiet-oplossing is in al die eksperimentele proefbuise gevoeg. Die verlangde konsentrasie van die eksperimentele middel (5 – 100 µg/ml) is by die eritrosiete in die onderskeie proefbuise gevoeg. Die volume in al die proefbuise is tot 0.9 ml met HBSO aangepas. Die eritrosiete is vir 30 minute by 37^oC in die teenwoordigheid van die eksperimentele middel geïnkubeer. 'n Kontrole waar 100% hemolise plaasgevind het, is by die eksperiment ingesluit deur eritrosiete te liseer met 'n

hoë konsentrasie van lisofosfatidielcholien (1 mg/ml). Na 30 minute, is die proefbuis vir 5 minute teen 850 g (2000 rpm) gesentrifugeer. Vyftig mikroliter van die supernatant is versigtig afgetrek en in die verlangde putjie van 'n 96-putjie mikrotiter plaat gevoeg. Die volume van die putjies is tot 200 μ l met FBS aangepas. Die mate van hemolise wat plaasgevind het is spektrofotometries by 415 nm bepaal.

Daar is ook gekorrekteer vir die kleurintensiteit van oksihumaat deur 'n soortgelyke eksperiment op te stel waarin slegs die verskillende konsentrasies van oksihumaat gebruik is. Die waardes hiervan is afgetrek van die oorspronklike eksperimentele waardes en is uiteindelik as 'n persentasie van die 100 % kontrole uitgedruk (% hemolise).

4.2.20 Statistiese bepalings

Die resultate van elke reeks eksperimente is as die gemiddelde waarde \pm die standaardfout uitgedruk. Statistiese bepalings binne 'n bepaalde eksperiment is met behulp van die Student t-toets vir gepaarde waardes gedoen. In die *ex vivo* eksperiment is ook van die nie-parametriese Wilcoxon-toets gebruik gemaak.



HOOFSTUK 5

RESULTATE

5.1 DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE PROLIFERASIE VAN MENSLIKE LIMFOSIETE.

Oksihumaat het tot 'n konsentrasie van 100 µg/ml geen effek op rustende limfosiete (beide monosiet-arme en monosiet-ryke) gehad nie. Die proliferatiewe respons van PHA-gestimuleerde, monosiet-ryke limfosiete is egter op 'n dosisafhanklike wyse verhoog en was by oksihumaat konsentrasies van 60 en 80 µg/ml, statisties betekenisvol verhoog ($p < 0.05$) (Figuur 9, bl. 89). 'n Meer opvallende effek is waargeneem wanneer van monosiet-arme PHA-gestimuleerde limfosiete gebruik gemaak is. In hierdie geval het oksihumaat by 40 µg/ml 'n betekenisvolle stimulasie veroorsaak ($p \leq 0.05$) terwyl die stimulasie by konsentrasies van 60-100 µg/ml, hoogs betekenisvol was ($p \leq 0.001$) (Figuur 9, bl. 89).

In 'n vergelykende studie is die effek van humiensuur (natrium sout) en oksihumaat op die proliferasie van monosiet-arme limfosiete ondersoek. Net soos in die geval van oksihumaat, het die kommersiële produk ook geen effek op rustende limfosiete tot 'n konsentrasie van 100 µg/ml gehad nie. In die geval van PHA-gestimuleerde monosiet-arme limfosiete, is die proliferatiewe respons deur al twee eksperimentele middels op 'n dosis-afhanklike wyse verhoog. Humiensuur het by 60 en 80 µg/ml 'n betekenisvolle stimulasie veroorsaak ($p < 0.05$) terwyl die stimulasie by 'n konsentrasie van 100 µg/ml, hoogs betekenisvol was ($p < 0.0005$). In die geval van oksihumaat was die stimulasie by 80 µg/ml betekenisvol ($p < 0.05$) verhoog en by 60 en 100 µg/ml was dit hoogs betekenisvol ($p < 0.005$ en $p < 0.0005$, respektiewelik) verhoog. Hierdie resultate word in Figuur 10 (bl. 90) weergegee.

Die proliferatiewe respons van PHA-gestimuleerde monosiet-ryke limfosiete vanaf HIV-geïnfekteerde persone [verkry vanaf pasiënte wat vir die Fase I studie gekeur was, maar voordat behandeling 'n aanvang geneem het], was statisties hoogs betekenisvol verhoog deur oksihumaat by 20-60 µg/ml ($p < 0.001$) en by 80 µg/ml was die verhoging effens minder betekenisvol ($p < 0.05$). Hierdie resultate word in Figuur 11 (bl. 91) weergegee. Tydens hierdie reeks eksperimente was daar weereens geen betekenisvolle verhoging van PHA-gestimuleerde monosiet-ryke limfosiete afkomstig van gesonde skenkers. Die PHA-

gestimuleerde MNL-proliferasie van HIV-geïnfekteerde individue was ook *ex vivo*, in vergelyking met die plasebo groep, statisties betekenisvol verhoog ($p < 0.05$) na mondelinge inname van 4 g (maar nie 6g) oksihumaat per dag vir twee weke (Figuur 12, bl. 92). Die behandeling van pasiënte met oksihumaat het geen betekenisvolle effek op rustende MNL kulture gehad nie. Die gemiddelde waarde (OD_{540}) vir rustende MNL voor behandeling met 4 g oksihumaat, was 0.2434 ± 0.0208 en die waarde na behandeling was 0.2839 ± 0.0325 . Wanneer pasiënte met 6 g oksihumaat behandel is, was die waardes (OD_{540}) vir rustende MNL voor behandeling 0.3099 ± 0.0814 en na behandeling 0.2077 ± 0.0643 . Die resultate weergegee in Figuur 12 (bl. 92) is bereken vanaf gestimuleerde - **minus** rustende waardes. Statistiese bepaling is met behulp van die Student t-toets vir gepaarde waardes gedoen en is met die nie-parametriese Wilcoxon-toets bevestig.

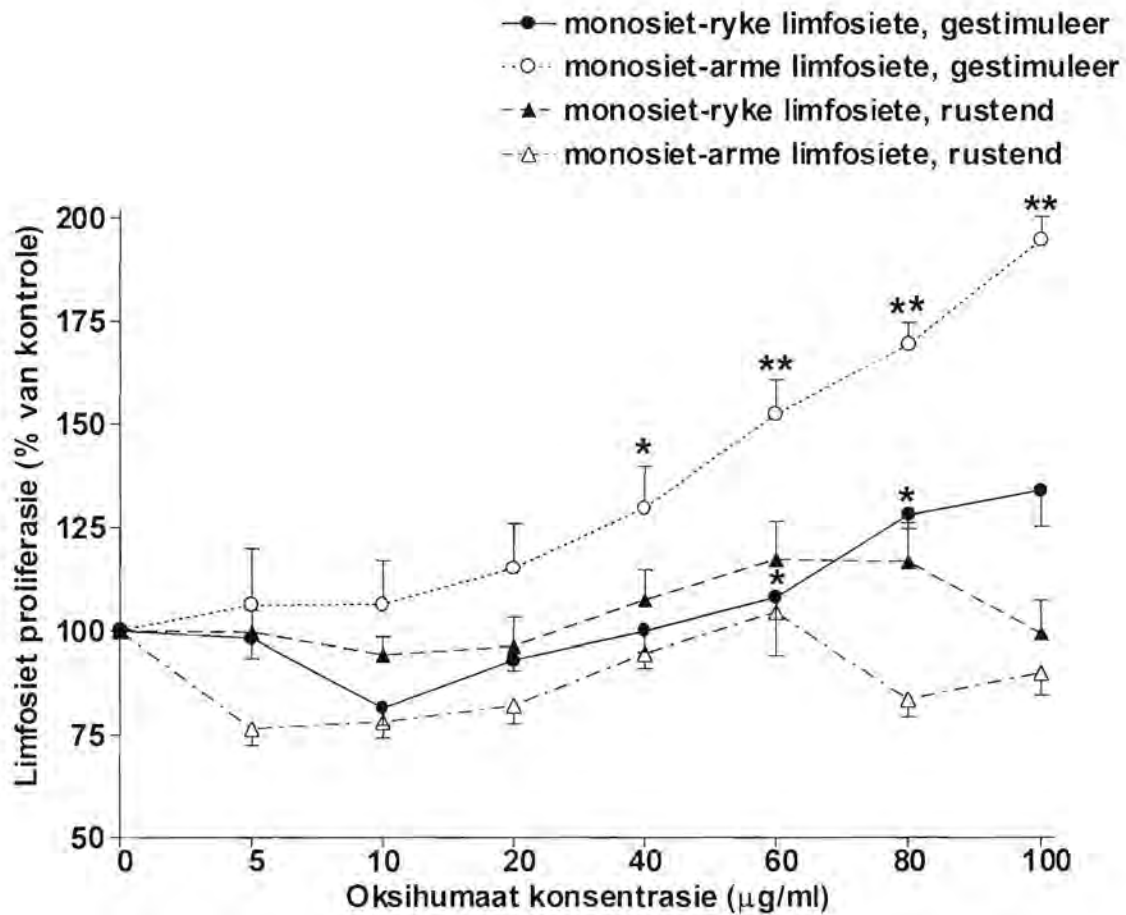
5.2. DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE PRODUKSIE VAN IL-2 DEUR MENSlike LIMFOSIETE.

Aangesien IL-2 vlakke in rustende limfosiete baie laag is en moeilik bepaal kan word, is slegs PHA-gestimuleerde limfosiete gebruik. Oksihumaat het 'n stimulerende invloed op die produksie van IL-2 deur PHA-gestimuleerde limfosiete gehad en was by 'n konsentrasie van 100 $\mu\text{g/ml}$ statisties betekenisvol verhoog ($p < 0.05$). Hierdie resultate word in Figuur 13 (bl. 93) weergegee.

5.3. DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE UITDRUKKING VAN CD25, CD38 EN HLA-DR OP MENSlike LIMFOSIETE.

Oksihumaat het tot 100 $\mu\text{g/ml}$ geen effek op die rangskikking van die verskillende sel populasies op die verspreidingsgrafiek gehad nie. In die geval van rustende limfosiete, het oksihumaat (100 $\mu\text{g/ml}$) geen effek op die uitdrukking van CD25 (die IL-2-reseptor), CD38 ('n molekule wat by sein transduksie en sellulêre vashegting betrokke is) sowel as HLA-DR getoon nie (Figuur 14, bl. 94). Die uitdrukking van CD25 deur PHA-gestimuleerde limfosiete wat met 100 $\mu\text{g/ml}$ oksihumaat behandel is, was egter statisties betekenisvol

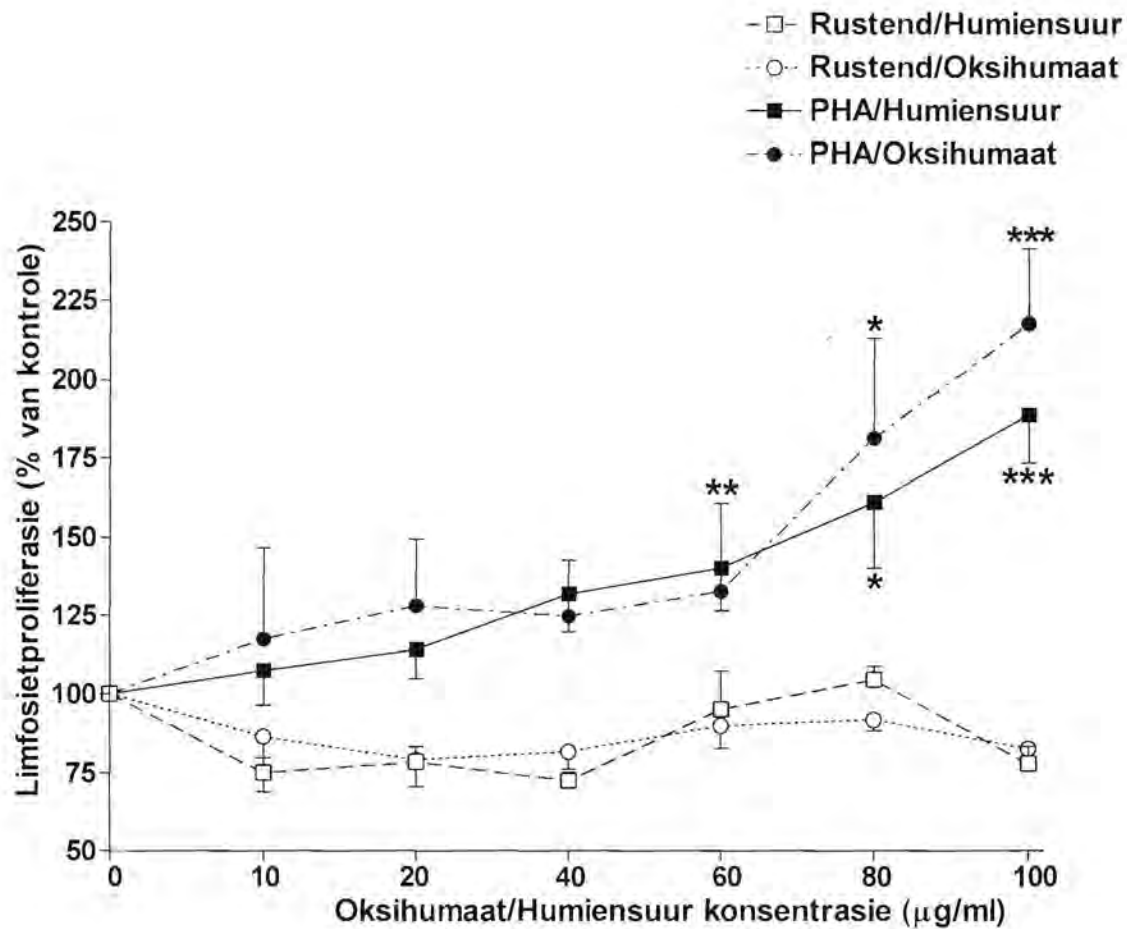
verhoog ten opsigte van onbehandelde kontrole waardes ($p < 0.05$), terwyl die uitdrukking van CD38 onveranderd gebly het. Daar was wel 'n verlaging in die uitdrukking van HLA-DR na oksihumaat behandeling. Hierdie verlaging was egter nie statisties betekenisvol nie.



Figuur 9: Die effek van 'n 72 uur lange behandeling van oksihumaat op die proliferatiewe respons van rustende- en PHA-gestimuleerde limfosiete (monosiet-ryke en monosiet-arme limfosiete). Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

* $p < 0.05$

** $p < 0.001$

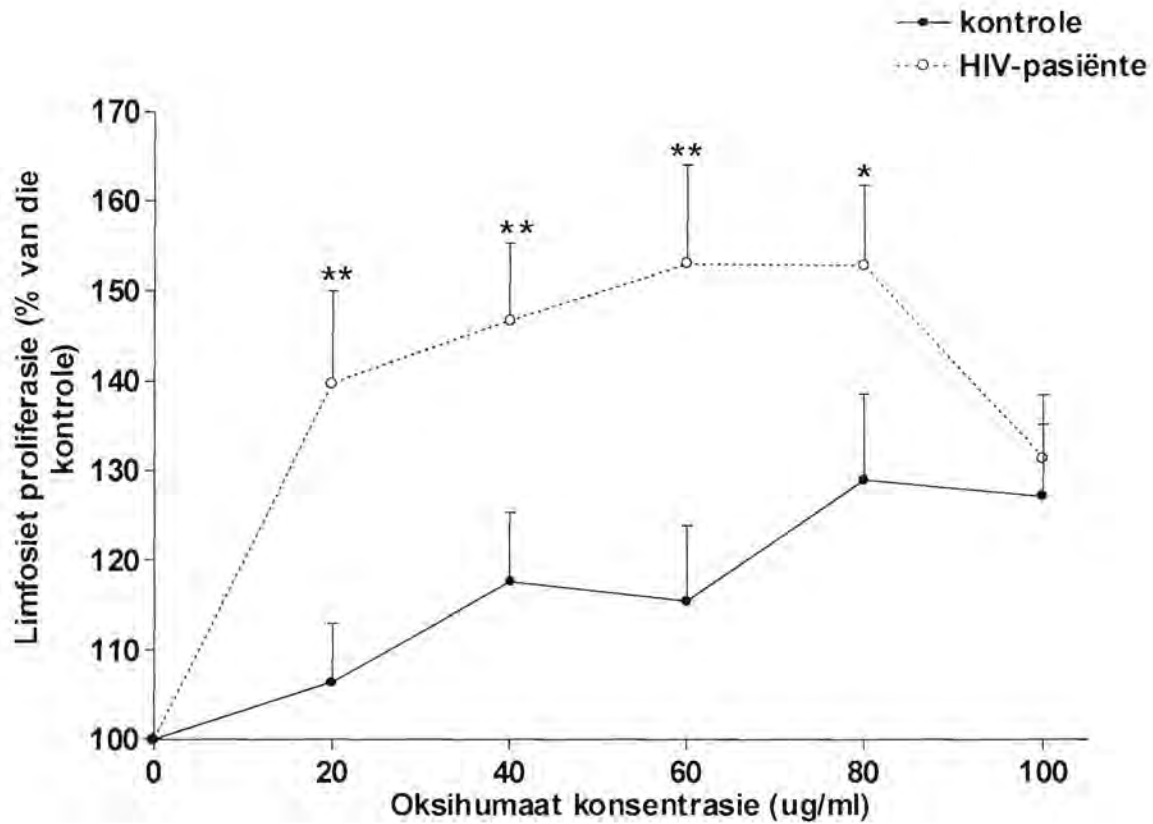


Figuur 10: Die effek van 'n 72 uur lange behandeling van oksihumaat (ENERKOM [Pty] Ltd) en humiensuur (natrium sout, Aldrich-Chemical Co., Inc., Milwaukee, WI USA) op die proliferatiewe respons van rustende- en PHA-gestimuleerde monosiet-arme limfosiete. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 8 herhalings met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

* $p < 0.05$

** $p < 0.005$

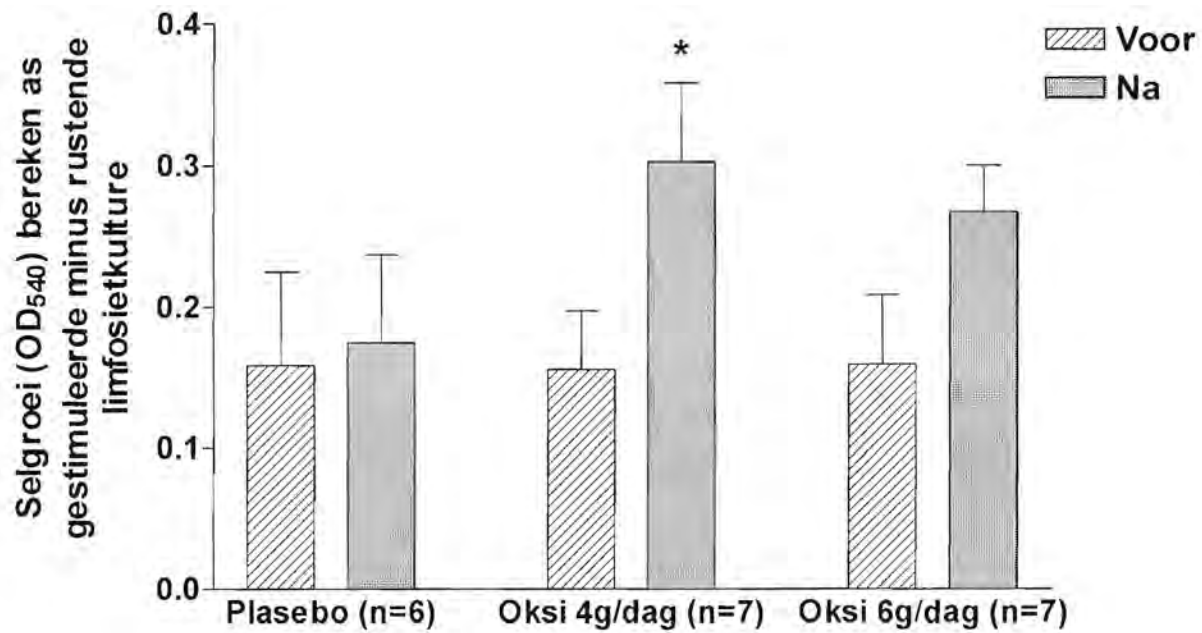
*** $p < 0.0005$



Figuur 11: Die effek van 'n 72 uur lange behandeling van oksihumaat op die proliferatiewe respons van PHA-gestimuleerde, monosiet-ryke limfosiëte van gesonde kontrole persone sowel as van HIV-geïnfekteerde pasiënte. Limfosiëte van 8 normale kontrole persone sowel as limfosiëte van 20 HIV-geïnfekteerde pasiënte is in hierdie eksperimente gebruik. Die resultate word uitgedruk as gemiddelde persentasie proliferasie ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

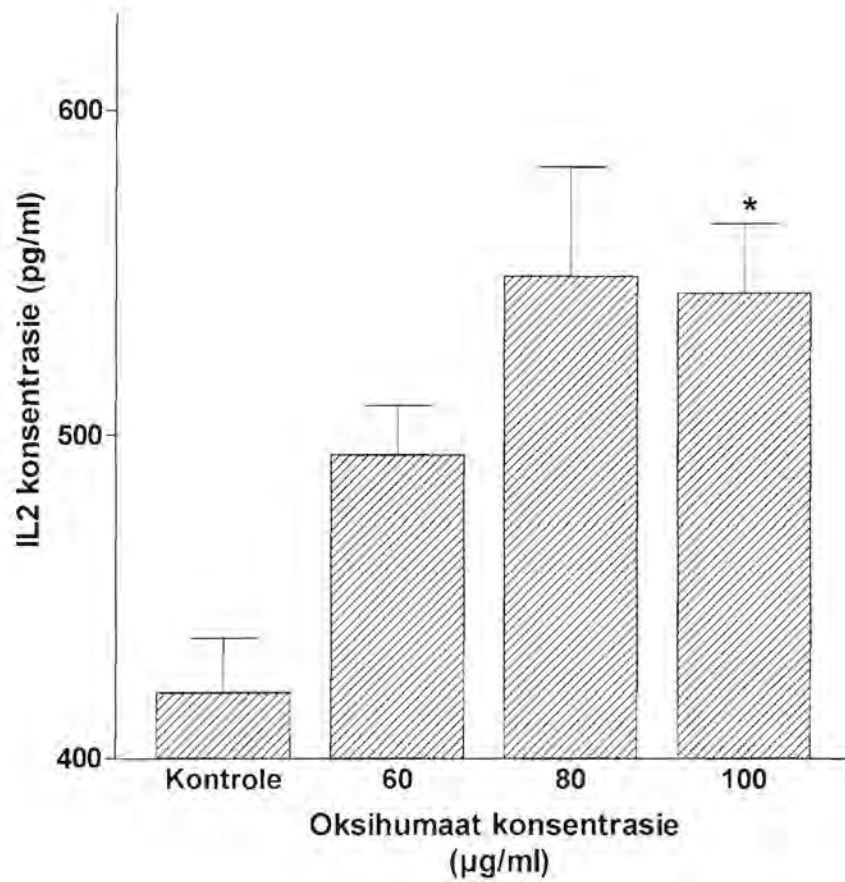
* $p < 0.05$

** $p < 0.001$



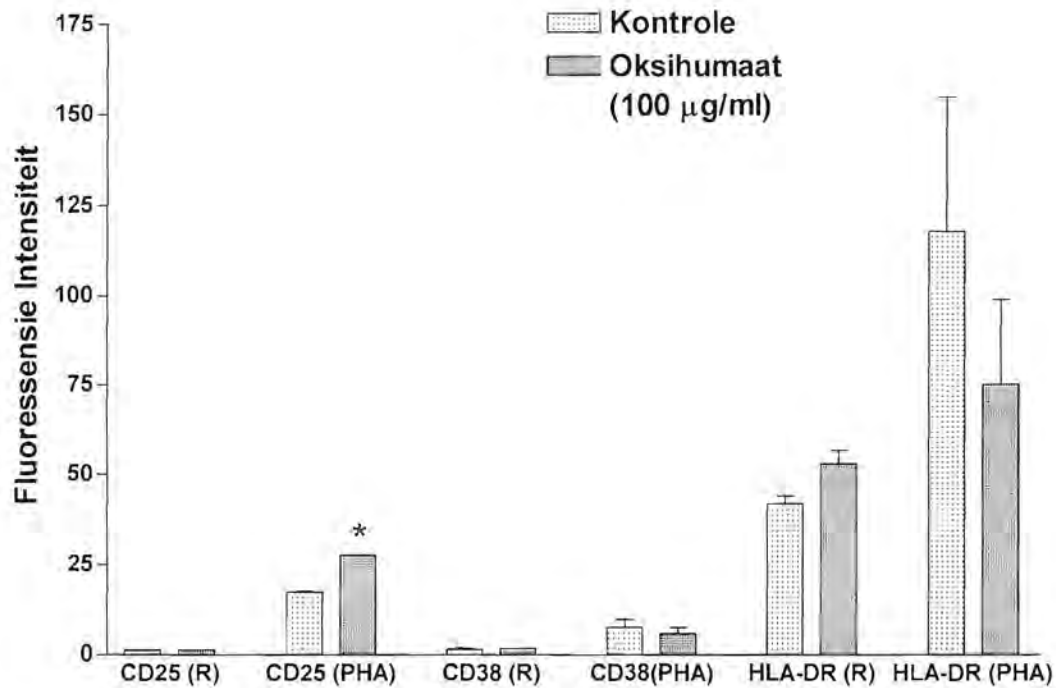
Figuur 12: Effek van 'n twee week lange behandeling met oksihumaat op die proliferatiewe respons van limfosiete vanaf HIV-positiewe pasiënte. Die resultate word uitgedruk as gemiddelde waardes met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

* $p < 0.05$



Figuur 13: Effek van 'n 48 uur lange behandeling met oksihumaat op interleukien 2 produksie deur PHA-gestimuleerde menslike limfosiete. Die resultate word weergegee as gemiddelde waardes van 4 verskillende eksperimente in duplikaat, met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

* $p < 0.05$



Figuur 14: Die effek van 'n 72 uur lange behandeling met oksihumaat op die uitdrukking van CD25, CD38 en HLA-DR op PHA-gestimuleerde menslike limfosiete. Die resultate is as die gemiddelde fluoressensie intensiteit (mediaan kanaal getal) met standaardfoutbalkies, wat in 3 eksperimente waargeneem is, uitgedruk. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

* $p < 0.05$

5.4. DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE PRODUKSIE VAN IL-4 DEUR MENSLIKE LIMFOSIETE.

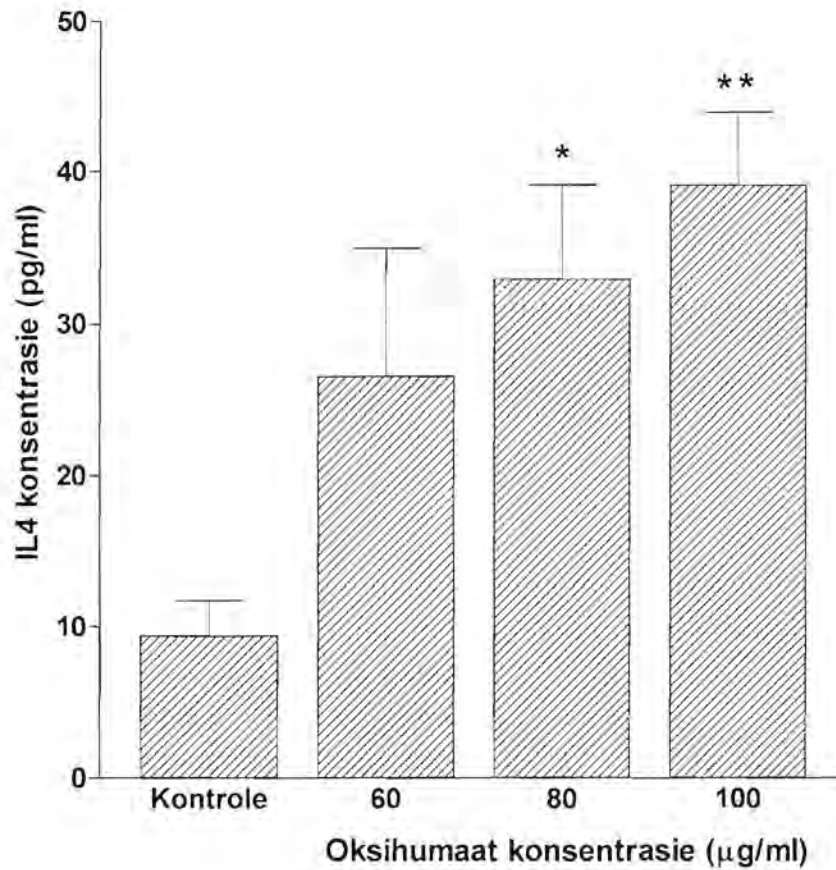
Slegs gestimuleerde limfosiete is gebruik as gevolg van die baie lae vlakke van IL-4 in rustende limfosiete. Die produksie van IL-4 deur PHA-gestimuleerde limfosiete is op 'n dosis-afhanklike manier deur oksihumaat gestimuleer (Figuur 15, bl. 96). Die stimulasie was, ten opsigte van onbehandelde kontrole waardes, statisties betekenisvol by oksihumaat konsentrasies van 80 µg/ml ($P < 0.05$) en 100 µg/ml ($P < 0.01$).

5.5. DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE PRODUKSIE VAN IL-6 DEUR MENSLIKE LIMFOSIETE.

Oksihumaat het geen effek op die produksie van IL-6 deur PHA-gestimuleerde limfosiete gehad nie. Die gemiddelde IL-6 waardes van rustende kontroles was 3287 ± 2681 pg/ml terwyl dit vir PHA-gestimuleerde kontroles 38420 ± 12020 pg/ml was. Die resultate van 3 verskillende eksperimente word in Figuur 16 (bl. 97) weergegee.

5.6. DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE PRODUKSIE VAN IL-10 DEUR MENSLIKE LIMFOSIETE.

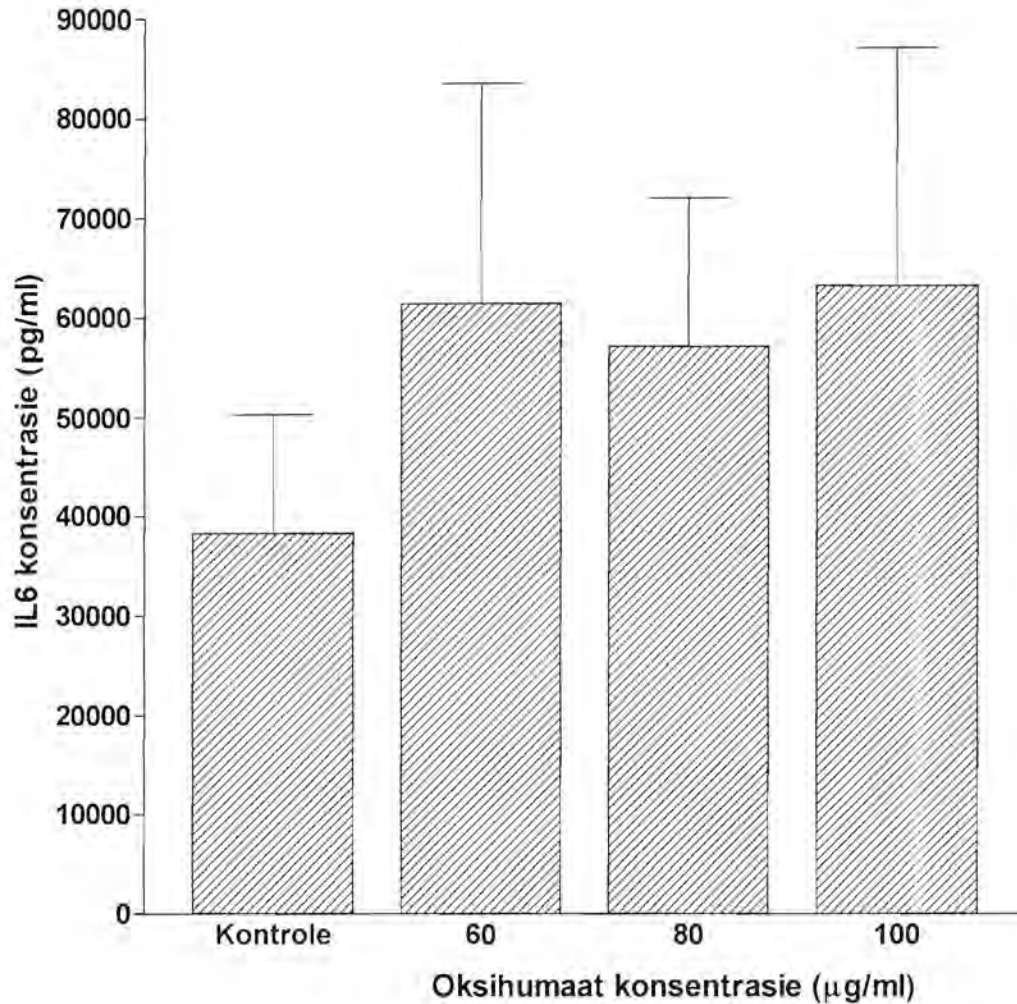
Die effek wat oksihumaat op die produksie van IL-10 deur PHA-gestimuleerde limfosiete gehad het, word in Figuur 17 (bl. 98) aangetoon. Oksihumaat (60, 80 en 100 µg/ml) het die produksie van IL-10 by al drie konsentrasies tot by die vlak wat met rustende selle waargeneem is, geïnhibeer. Hierdie inhibisie was by al die konsentrasies statisties betekenisvol ten opsigte van gestimuleerde onbehandelde kontroles ($P < 0.01$). Die gemiddelde waardes van rustende en gestimuleerde kontroles was onderskeidelik 0.7450 ± 0.0876 pg/ml en 3.301 ± 0.2785 pg/ml. Die resultate van 3 afsonderlike eksperimente word in Figuur 17 (bl. 98) weergegee.



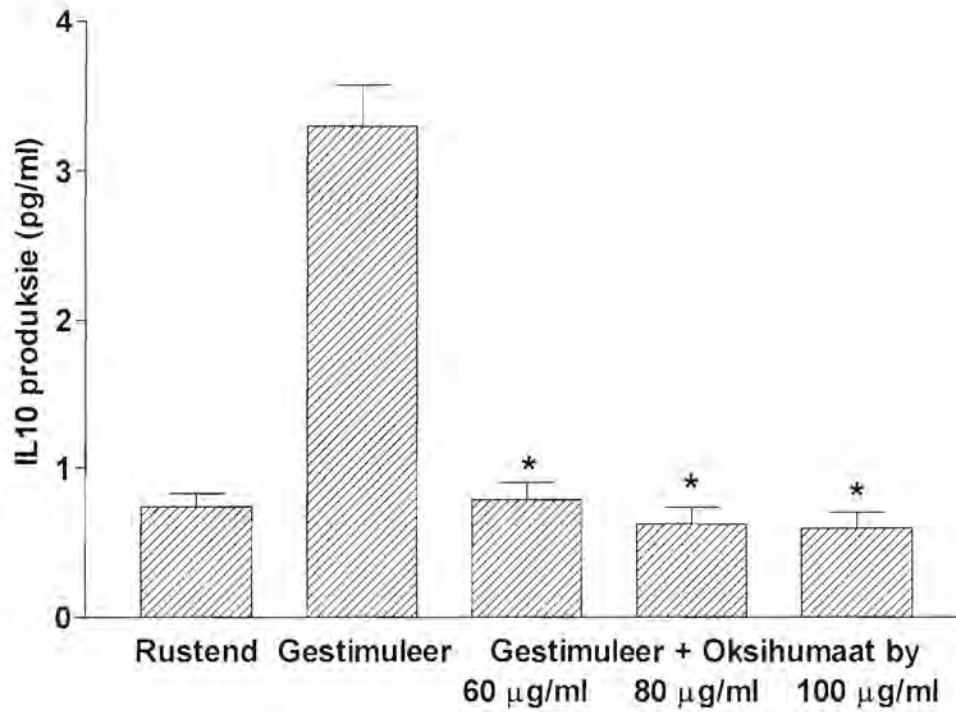
Figuur 15: Die effek van 'n 24 uur lange behandeling met oksihumaat op interleukien 4 produksie deur PHA-gestimuleerde menslike limfosiete. Die resultate word uitgedruk as gemiddelde waardes van 3 verskillende eksperimente, wat in duplikaat gedoen is, met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$



Figuur 16: Die effek van oksihumaat op interleukien 6 produksie deur PHA-gestimuleerde menslike limfosiete. Die resultate word uitgedruk as gemiddelde waardes van 3 verskillende eksperimente met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrolle waardes.



Figuur 17: Die effek van oksihumaat op interleukien 10 produksie deur PHA-gestimuleerde menslike limfositete. Die resultate word as gemiddelde waardes van 3 afsonderlike eksperimente, met standaardfoutbalkies, weergegee. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

* $p < 0.01$

5.7. DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE PRODUKSIE VAN TNF- α DEUR MENS LIKE LIMFOSIETE.

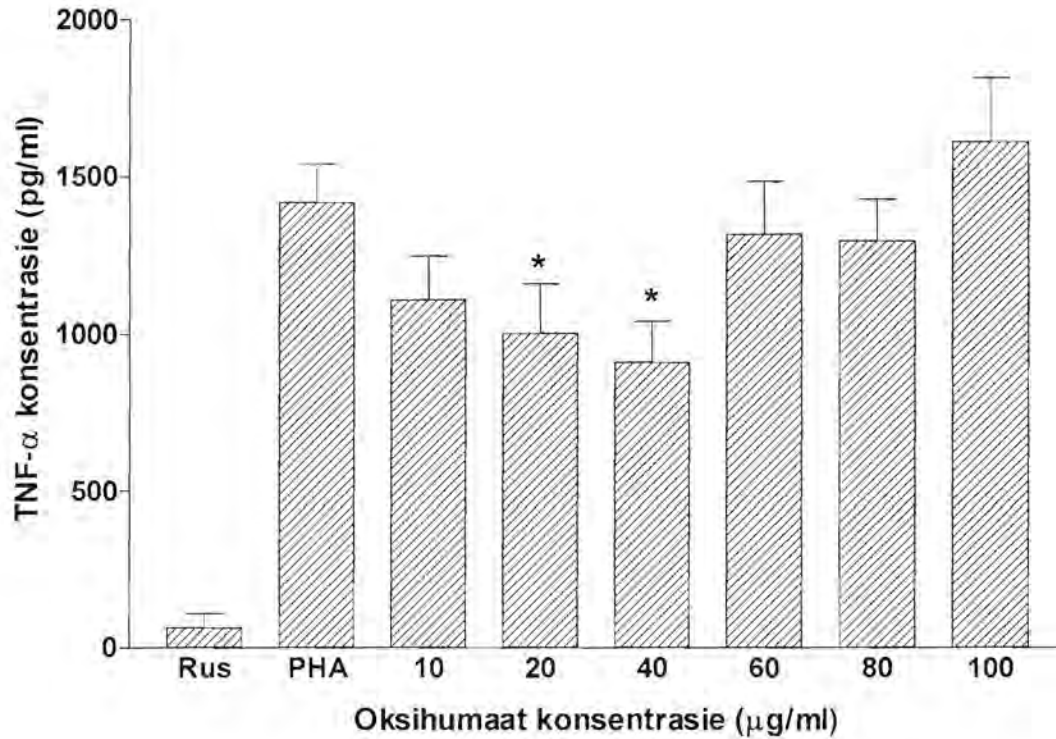
Die resultate verkry in 3 verskillende eksperimente, word in Figuur 18 (bl 100) aangetoon. Alhoewel oksihumaat by 20 en 40 $\mu\text{g/ml}$ 'n betekenisvolle inhibisie ($p < 0.05$) van PHA-gestimuleerde limfosiete veroorsaak het, is daar geen duidelike patroon met die ander konsentrasies ten opsigte van kontrole waardes, waargeneem nie. Die gemiddelde waardes van rustende en PHA-gestimuleerde kontrole sisteme was 18.59 ± 12.20 en 1383 ± 109.9 pg/ml TNF- α , respektiewelik.

5.8. DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE PRODUKSIE VAN IFN- γ DEUR MENS LIKE LIMFOSIETE.

Oksihumaat-konsentrasies van 20-100 $\mu\text{g/ml}$ het geen statisties betekenisvolle effek op die produksie van IFN- γ deur PHA-gestimuleerde limfosiete gehad nie. Mitogeen-gestimuleerde limfosiete het wel betekenisvol meer van die faktor vrygestel wanneer dit met rustende selle vergelyk is (sien Figuur 19, bl.101). Die IFN- γ waardes van rustende en PHA-gestimuleerde kontrole sisteme, was onderskeidelik 0.220 ± 0.079 pg/ml en 20.851 ± 8.716 pg/ml.

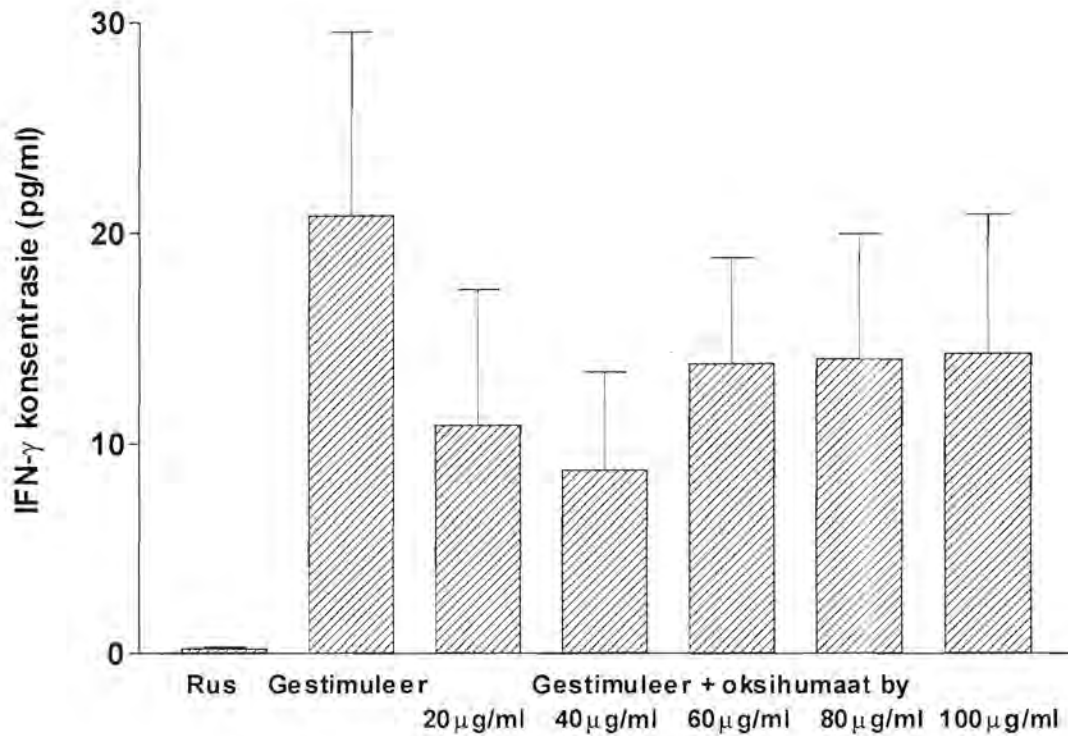
5.9. DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE PRODUKSIE VAN PGE₂ DEUR MENS LIKE LIMFOSIETE.

Die resultate in Figuur 20 (bl. 102) toon die gemiddelde waardes van agt herhalings. Oksihumaat (60, 80 en 100 $\mu\text{g/ml}$) het PGE₂-produksie deur FMA-gestimuleerde limfosiete met tussen 20-30% ten opsigte van die onbehandelde kontroles, geïnhibeer. Laasgenoemde inhibisie was egter nie betekenisvol nie. Onbehandelde kontrole limfosiete is met 400 % deur FMA gestimuleer. Die resultate vir die rustende kontrole sisteem en die

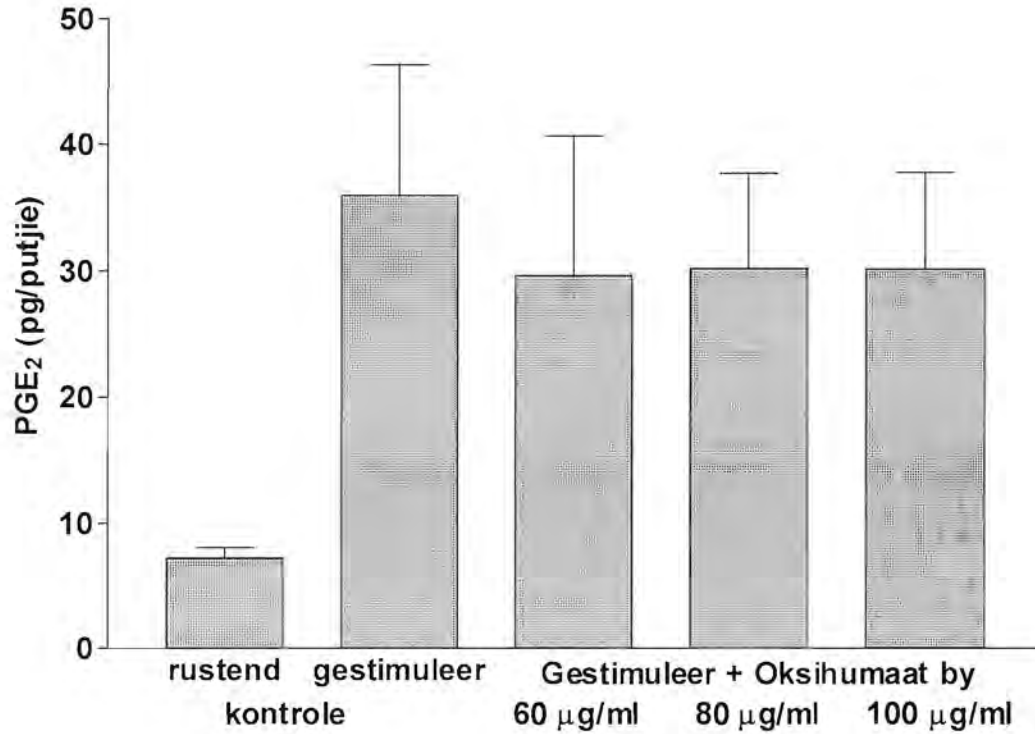


Figuur 18: Die effek van oksihumaat op die produksie van tumor nekrose faktor alfa deur PHA-gestimuleerde menslike limfositete. Die resultate word as gemiddelde waardes van 5 eksperimente met standaardfoutbalkies, weergegee. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

* $p < 0.05$



Figuur 19: Die effek van 'n 72 uur lange behandeling met oksihumaat op die produksie van interferon gamma deur PHA-gestimuleerde menslike limfosiete. Die resultate word uitgedruk as gemiddelde waardes van 4 afsonderlike eksperimente met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.



Figuur 20: Die effek van 'n 20 minuut lange behandeling met oksihumaat op die produksie van prostaglandien E₂ deur FMA-gestimuleerde limfosiete. Die resultate toon die gemiddelde waardes van vier herhalings met standaardfoutbalkies en word weergegee as pg/putjie. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

FMA-gestimuleerde kontrole sisteem, was onderskeidelik 7.20 ± 0.866 en 35.98 ± 10.35 pg/putjie.

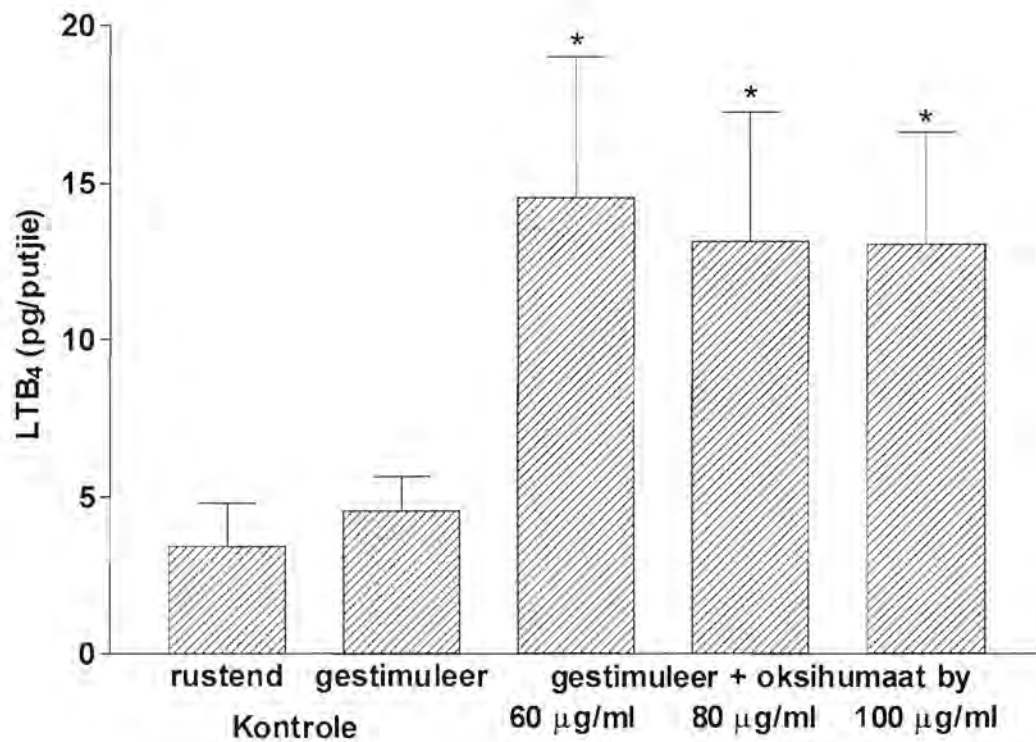
5.10 DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE PRODUKSIE VAN LTB₄ DEUR MENSLIKE LIMFOSIETE

Die resultate in Figuur 21 (bl 104) toon die gemiddelde waardes van vier herhalings. Oksihumaat het LTB₄-produksie deur FMA-gestimuleerde limfosiete met meer as 300% ten opsigte van die onbehandelde kontroles, gestimuleer. Hierdie stimulasie was by oksihumaat konsentrasies van 60, 80 en 100 µg/ml statisties betekenisvol verhoog ($p < 0.05$). Die gemiddelde waardes vir rustende kontroles en FMA-gestimuleerde kontroles was onderskeidelik $3,450 \pm 1.373$ en $4,550 \pm 1.108$ pg/putjie. Onbehandelde kontroles is slegs met 32% deur FMA gestimuleer en kan daaraan toegeskryf word dat die metode wat vir hierdie bepaling gebruik is, optimaal was vir PGE₂ produksie.

5.11 DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE UITDRUKKING VAN CR3-MOLEKULES OP MENSLIKE NEUTROFIELE.

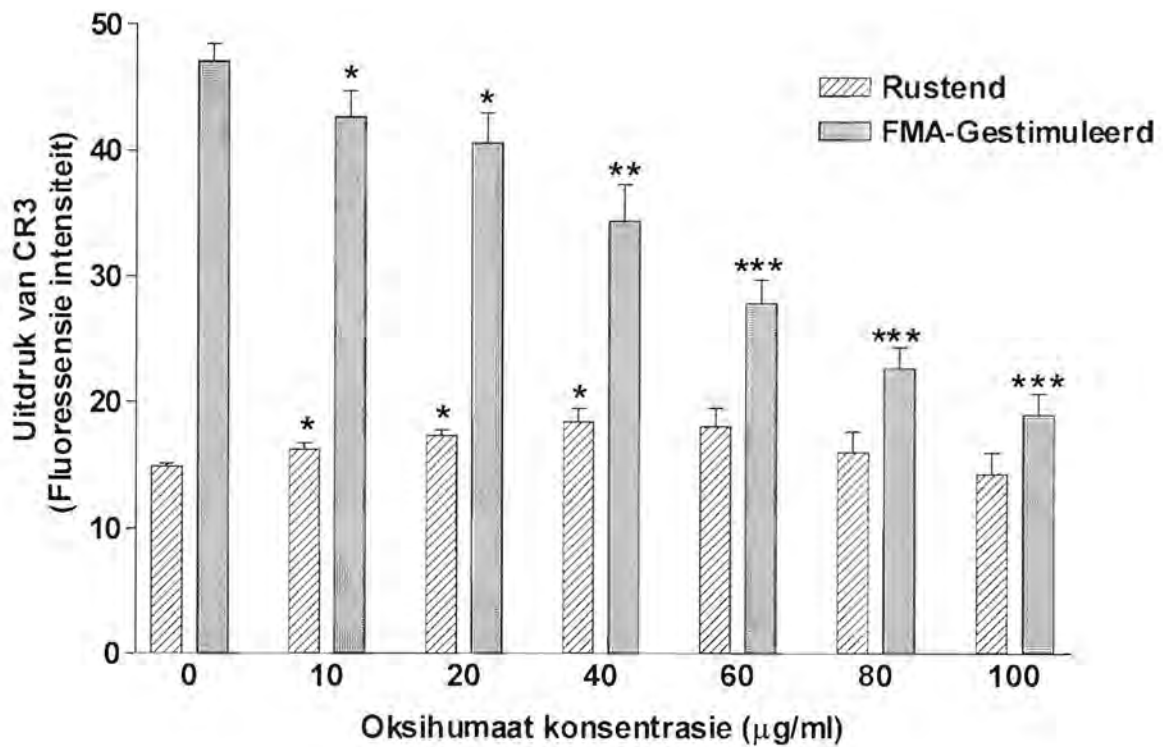
Oksihumaat het geen effek gehad op die rangskikking van die verskillende sel populasies op die verspreidingsgrafiek nie. Die uitdrukking van CR3 vashegtingsmolekules deur onbehandelde neutrofiele is met 218 % deur FMA gestimuleer. Oksihumaat (10 – 100 µg/ml) het die CR3 vashegtingsmolekules op FMA-gestimuleerde neutrofiele hoogs betekenisvol geïnhibeer, terwyl rustende neutrofiele effens gestimuleer is (Figuur 22, bl. 105). Oksihumaat het deurgaans 'n dosis-afhanklike inhibisie van CR3-uitdrukking op gestimuleerde, maar nie rustende neutrofiele, veroorsaak. In die geval waar 10 tot 40 µg/ml oksihumaat gebruik is, was die inhibisie statisties betekenisvol ($p < 0.05$ in die geval van 10 en 20 µg/ml en $p < 0.005$ in die geval 40 µg/ml) terwyl 60 tot 100 µg/ml oksihumaat die uitdrukking van CR3 ten opsigte van die kontroles, hoogs betekenisvol ($p < 0.0005$) geïnhibeer het. Die CR3-uitdrukking van rustende neutrofiele is by oksihumaat konsentrasies van 10 tot 40 µg/ml betekenisvol gestimuleer.

Soortgelyke resultate is met FMLF:SB as stimulant getoon en word in Figuur 23 (bl. 106) weergegee. In hierdie geval het oksihumaat ook die uitdrukking van CR3 deur gestimuleerde, maar nie rustende neutrofiële op 'n dosisafhanklike wyse geïnhibeer. Laasgenoemde inhibisie was egter slegs statisties betekenisvol laer as die onbehandelde kontroles by 'n oksihumaat-konsentrasies van 100 µg/ml ($p < 0.05$). 'n Konsentrasie van 10 µg/ml oksihumaat het egter 'n betekenisvolle stimulasie van CR3 op gestimuleerde neutrofiële veroorsaak. Oksihumaat het die CR3 uitdrukking van rustende neutrofiële ook effens gestimuleer, maar in hierdie geval was die stimulasie nie betekenisvol nie. Die uitdrukking van CR3 deur onbehandelde kontroles, is met 63% deur FMLF:SB gestimuleer.



Figuur 21: Die effek van 'n 20 minuut lange behandeling met oksihumaat op die produksie van leukotriene B₄ deur FMA-gestimuleerde limfosiete. Die resultate toon die gemiddelde waardes van vier herhalings met standaardfoutbalkies en word weergegee as pg/putjie. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

* $p < 0.05$

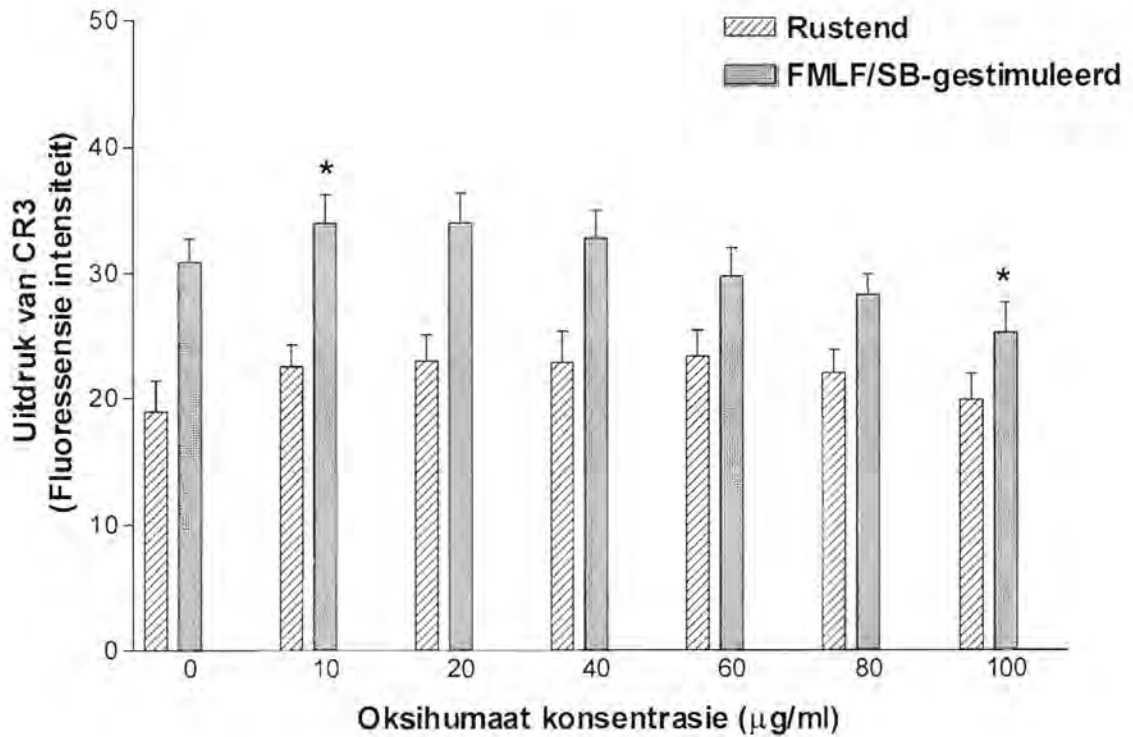


Figuur 22: Effek van 'n 30 minuut lange behandeling met oksihumaat op die uitdrukking van CR3 deur rustende en FMA-gestimuleerde menslike limfosiete. Die resultate is as die gemiddelde fluoressensie intensiteit (mediaan kanaal getal; "median channel number") met standaardfoutbalkies, wat in vyf eksperimente waargeneem is, uitgedruk. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

* p<0.05

** p<0.005

*** p<0.0005



Figuur 23: Die effek van 'n 30 minuut lange behandeling met oksihumaat op die uitdrukking van CR3 deur rustende sowel as FMLF:SB-gestimuleerde menslike neutrofiel. Die resultate is as die gemiddelde fluoressensie intensiteit (mediaan kanaal getal; “median channel number”) met standaardfoutbalkies, wat in vier eksperimente waargeneem is, uitgedruk. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

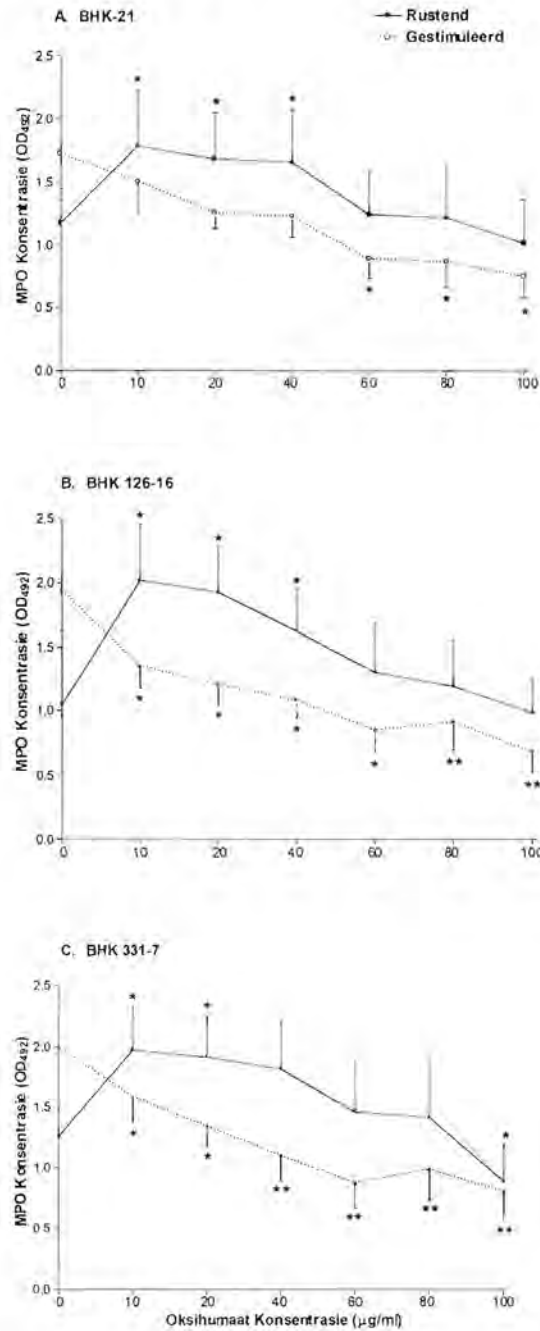
*p<0.05

5.12 EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP NEUTROFIEL VASHEGTING AAN NORMALE EN GETRANSFEKTEERDE FIBROBLAST SELLYNE.

Die effek wat oksihumaat op die vashegting van rustende sowel as FMA-gestimuleerde neutrofiële aan 'n normale baba hamster niersellyn (BHK-21) (uitgedruk as totale MPO-vrystelling nadat die selle geliseer is) uitgeoefen het, word in Figuur 24A (bl. 108) weergegee. Oksihumaat het die vashegting van rustende neutrofiële aan BHK-21-selle by konsentrasies van 10-40 $\mu\text{g/ml}$ betekenisvol verhoog ($p < 0.05$) terwyl die vashegting van FMA-gestimuleerde neutrofiële by 60-100 $\mu\text{g/ml}$ betekenisvol geïnhibeer is ($p < 0.05$). Die optiese digtheidslesing (OD-lesing) van rustende neutrofiële was 1.180 ± 0.267 terwyl hierdie lesing vir FMA-gestimuleerde neutrofiële, na 1.728 ± 0.376 verhoog is (68% stimulasie).

Oksihumaat het ook 'n inhibisie van neutrofiel vashegting aan die 2 verskillende getransfekteerde BHK-sellyne, naamlik BHK 126-16 en BHK 331-7, veroorsaak. Hierdie resultate verskyn in Figuur 24B en C (bl. 108). Die vashegting van rustende neutrofiële aan BHK 126-16 selle, wat menslike E-selektien op sy oppervlakte uitdruk, is ook deur oksihumaat konsentrasies van 10-40 $\mu\text{g/ml}$ gestimuleer ($p < 0.05$). Vashegting van FMA-gestimuleerde neutrofiële aan hierdie sellyn, is deur oksihumaat konsentrasies van 10-60 $\mu\text{g/ml}$ statisties betekenisvol ($p < 0.05$) geïnhibeer terwyl konsentrasies 80 en 100 $\mu\text{g/ml}$ die vashegting statisties hoogs betekenisvol geïnhibeer het ($p < 0.005$) (Figuur 24B). Die OD-lesing vir rustende onbehandeld neutrofiële was 1.044 ± 0.155 en hierdie lesing is vir FMA-gestimuleerde onbehandelde neutrofiële na 1.937 ± 0.305 verhoog (54 % stimulasie).

In die geval van BHK 331-7 selle, wat menslike ICAM-1 op sy oppervlakte uitdruk, het oksihumaat by konsentrasies van 10 en 20 $\mu\text{g/ml}$ die vashegting van rustende neutrofiële aan hierdie sellyn, gestimuleer ($p < 0.05$). Die vashegting van FMA-gestimuleerde neutrofiële aan hierdie sellyn was by oksihumaat konsentrasies van 10 en 20 $\mu\text{g/ml}$



Figuur 24: Die effek van oksihumaat op vashegting van rustende en FMA-gestimuleerde neutrofiële aan normale (A: BHK-21) en 2 getransfekteerde fibroblast sellyne (B: BHK 126-16 en C: BHK 331-7). Die resultate word uitgedruk as gemiddelde waardes van drie verskillende eksperimente met standaardfoutbalkies.

* $p < 0.05$

** $p < 0.005$

statisties betekenisvol geïnhibeer, terwyl konsentrasies van 40-100 µg/ml vashegting selfs hoogs betekenisvol geïnhibeer het ($p \leq 0.0001$) (sien Figuur 24C). Die OD-lesing vir rustende onbehandeld neutrofiele was 1.257 ± 0.223 en hierdie lesing is vir FMA-gestimuleerde onbehandelde neutrofiele na 2.005 ± 0.338 verhoog (63% stimulasie).

5.13 DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE VRYSTELLING VAN EOSINOFILIESE KATIONIESE PROTEÏENE (EKP) DEUR MENSLIKE EOSINOFIELE.

Die mate van vrygestelde eosinofiliese kationiese proteïene was 'n indikasie van eosinofiel degranulasie en die resultate van drie verskillende eksperimente word in Figuur 25 (bl. 111) weergegee. Oksihumaat het die vrystelling van EKP deur FMLF:SB- sowel as geöpsoneerde Sephadex-gestimuleerde eosinofiele op 'n dosisafhanklike manier geïnhibeer. Wanneer geöpsoneerde Sephadex krale as stimulant gebruik is, was die inhibisie statisties nie betekenisvol nie, maar EKP-vrystelling deur FMLF:SB-gestimuleerde eosinofiele is egter by oksihumaat konsentrasies van 80 en 100 µg/L wel betekenisvol geïnhibeer ($p < 0.05$). Die rustende kontrolewaardes waar FMLF:SB as stimulant gebruik is, was 9.125 ± 3.411 µg/L EKP, terwyl die rustende kontrolewaardes waar van geöpsoneerde Sephadex krale as stimulant gebruik gemaak is, 6.454 ± 1.425 µg/L was. Wanneer resultate verkry met FMLF:SB gestimuleerde eosinofiele met die rustende waardes vergelyk word, het oksihumaat by 'n konsentrasie van 100 µg/L die vrystelling van EKP deur gestimuleerde eosinofiele tot die vlak van rustende selle geïnhibeer.

5.14 DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE VRYSTELLING VAN MIËLOPEROKSIDASE (MPO) DEUR MENSLIKE NEUTROFIELE.

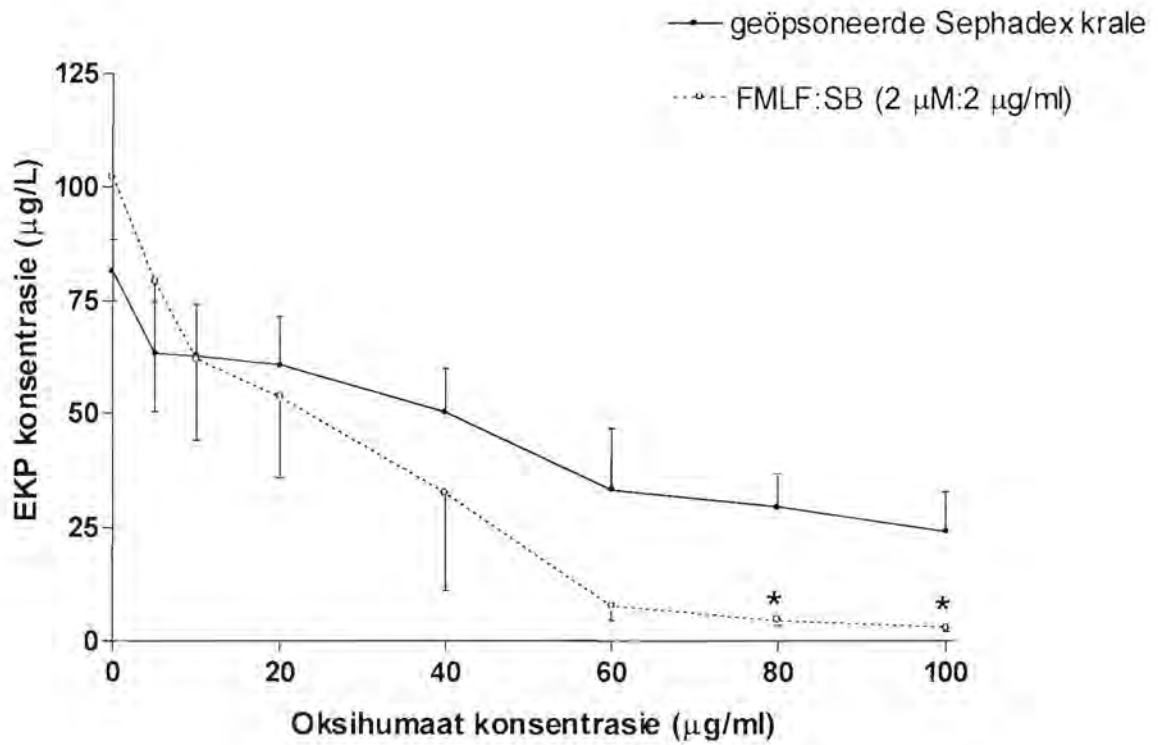
'n Standaard metode om die mate van MPO-vrystelling te bepaal, wat op neutrofiel degranulasie dui, is uitgevoer. 'n Kombinasie van twee stimulant, naamlik FMLF en SB, is deurgaans by konsentrasies van 2 µM en 2 µg/ml respektiewelik, gebruik.

Die MPO eksperiment is drie maal met geöpsoneerde Sephadex krale as stimulant herhaal, terwyl eksperimente waar FMLF:SB as stimulant gebruik is, twaalf maal gedoen is. Die spektrofotometriese lesings is in triplikaat gedoen.

Volgens Figuur 26 (bl. 112) kan duidelik waargeneem word dat oksihumaat die vrystelling van MPO deur FMLF:SB- sowel as geöpsoneerde Sephadex-gestimuleerde neutrofiële, op 'n dosisafhanklike wyse geïnhibeer het. Oksihumaat het die vrystelling van MPO deur FMLF:SB-gestimuleerde neutrofiële by konsentrasies van 40 en 60 µg/ml statisties betekenisvol ($p < 0.05$) geïnhibeer terwyl die inhibisie by konsentrasies van 80 en 100 µg/ml hoogs betekenisvol was ($p < 0.005$). Wanneer neutrofiële egter met Sephadex krale gestimuleer is, was die inhibisie nie betekenisvol nie. Die waardes vir rustende MPO vlakke van die FMLF:SB gestimuleerde eksperimente was 0.02214 ± 0.0019 mU en 0.0315 ± 0.0005 mU in die geval waar geöpsoneerde Sephadex krale as stimulant gebruik is.

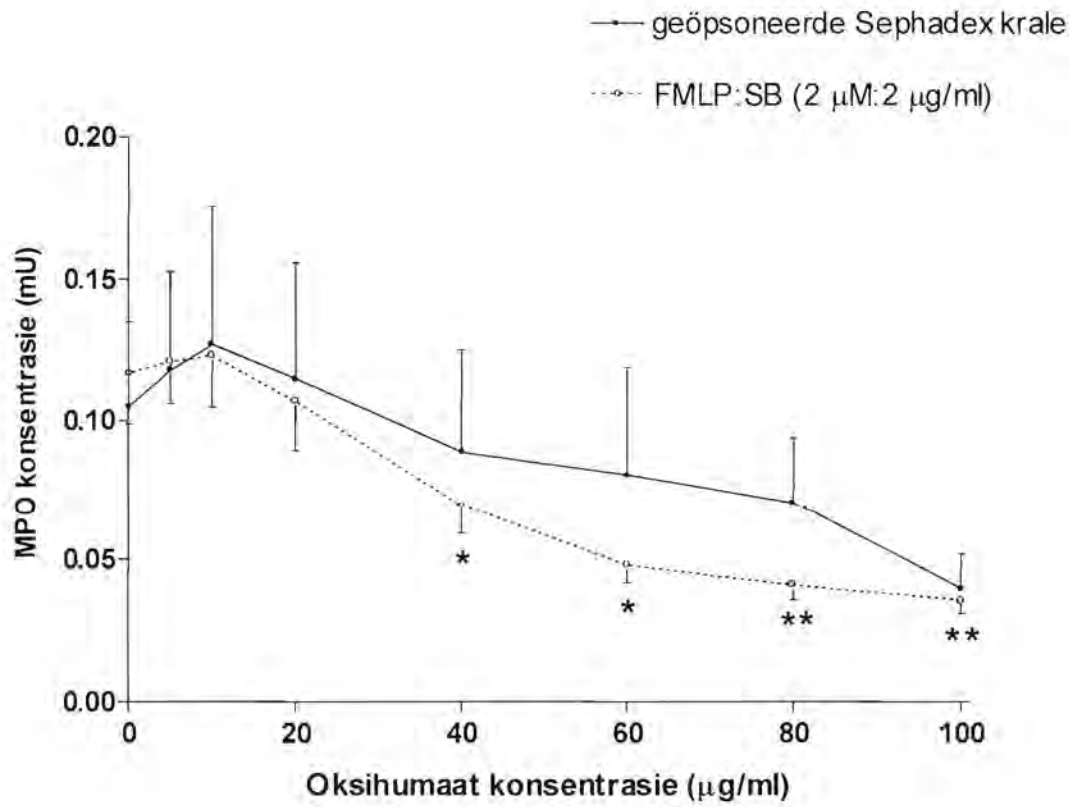
5.15 DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP DIE SITOTOKSIESE AKTIWITEIT VAN MENSLIKE LIMFOSIETE.

Die resultate van drie verskillende eksperimente word in Figuur 27 (bl. 113) aangetoon. Die groei van PLC-selle is op 'n dosisafhanklike wyse deur oksihumaat (10-100 µg/ml) geïnhibeer maar was slegs by 'n konsentrasie van 100 µg/ml statisties betekenisvol ($p < 0.05$). Wanneer menslike limfositete egter by die sisteem gevoeg is, is die mate van inhibisie indrukwekkend verhoog. In hierdie geval is die groei van PLC-selle by 'n oksihumaatkonsentrasie van 10 µg/ml statisties betekenisvol geïnhibeer ($p < 0.05$), terwyl konsentrasies van 20-100 µg/ml statisties 'n hoogs betekenisvolle inhibisie ($p < 0.005$) veroorsaak het.



Figuur 25: Die effek van 'n 15 minuut lange behandeling met oksihumaat op die vrystelling van eosinofiliese kationiese proteïene (EKP) deur FMLF:SB- sowel as geöpsoneerde Sephadex-gestimuleerde menslike eosinofiele. Die resultate word uitgedruk as gemiddelde waardes van drie verskillende eksperimente met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

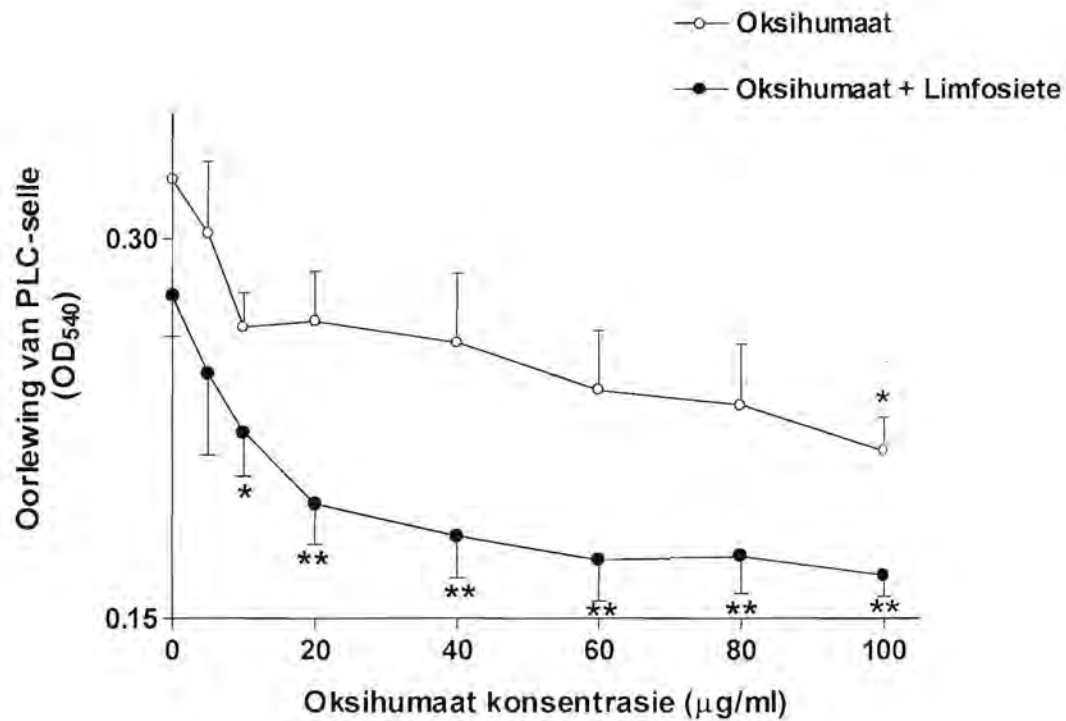
* $p < 0.05$



Figuur 26: Die effek van 'n 15 minuut lange behandeling met oksihumaat op die vrystelling van miëloperoksidase (MPO) deur FMLF:SB- sowel as geöpsoneerde Sephadex-gestimuleerde menslike neutrofiële. Die resultate word uitgedruk as gemiddelde waardes van twaalf herhalings met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

* $p < 0.05$

** $p < 0.005$



Figuur 27: Die effek van 'n 72 uur lange behandeling met oksihumaat op die groei van 'n lewercancer sellyn (PLC) in die teenwoordigheid of afwesigheid van menslike limfosiete. Die resultate word uitgedruk as gemiddelde waardes van ses tot nege herhalings met standaardfoutbalkies. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

* $p < 0.05$

** $p < 0.005$

5.16 DIE EFFEK VAN OKSIHUMAAT OP NK-SEL AKTIWITEIT.

Die NK-sel aktiwiteit, uitgedruk as spesifieke lise van ^{51}Cr -gelaaide K562 kankerselle wat met limfosiete geïnkubeer is, word in Tabel 2 aangetoon. Oksihumaat het by konsentrasies van 60 en 100 $\mu\text{g/ml}$ spesifieke lise van die teikenselle, ten opsigte van onbehandelde kontroles, betekenisvol geïnhibeer ($p < 0.005$).

Tabel 2: Die effek van 'n 16 uur lange behandeling met oksihumaat op NK-sel aktiwiteit soos bepaal deur persentasie spesifieke lise van K562 ^{51}Cr -gemarkte kankerselle.

SPESIFIEKE LISE (% VAN VOLLEDIGE ^{51}CR VRYSTELLING)				
Kontrole	Oksihumaat 40 $\mu\text{g/ml}$	Oksihumaat 60 $\mu\text{g/ml}$	Oksihumaat 80 $\mu\text{g/ml}$	Oksihumaat 100 $\mu\text{g/ml}$
62.5 \pm 12.4	65.3 \pm 4.4	45.4 \pm 2.2*	53.5 \pm 12.5	38.5 \pm 3.5*

Die resultate word as die gemiddelde waardes \pm standaardfout van ses herhalings uitgedruk. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.

* $p < 0.005$

5.17 INVLOED VAN OKSIHUMAAT OP DIE MEMBRAAN STABILITEIT VAN SKAAP ERITROSIEETE.

Die effek van oksihumaat (60-200 $\mu\text{g/ml}$) op die lise van skaap eritrosiete wat deur 'n bio-aktiewe fosfolipied (LPC) bemiddel is, word in Tabel 3 getoon. Geen statisties betekenisvolle effek ten opsigte van die onbehandelde kontroles, is by enige een van die konsentrasies wat getoets was, waargeneem nie.

Tabel 3: Die effek van oksihumaat (60-200 $\mu\text{g/ml}$) op lisofosfatidielcholien (LPC)-bemiddelde lise van skaap eritrosiete.

HEMOLISE VAN SKAAPROOIBLOEDSELLE (% VAN VOLLEDIGE LISE)				
Kontrole	Oksihumaat 60 $\mu\text{g/ml}$	Oksihumaat 80 $\mu\text{g/ml}$	Oksihumaat 100 $\mu\text{g/ml}$	Oksihumaat 200 $\mu\text{g/ml}$
39.72 \pm 2.33	43.42 \pm 2.28	41.52 \pm 1.10	41.83 \pm 2.28	40.12 \pm 1.03

Die gemiddelde waardes van vyf herhalings word as % hemolise \pm standaardfout uitgedruk. Die resultate toon die gemiddelde waardes van 5 herhalings met standaardfoutbalkies. P-waardes is uitgewerk ten opsigte van die onbehandelde kontrole waardes.



HOOFTUK 6

BESPREKING

6.1 BESPREKING

Inleiding

Humiensure is natuurlike molekules wat tydens die ontbinding van organiese stowwe gevorm word (Visser, 1982). Hulle besit lokale anti-inflammatoriese, hiperemiese en pynverliggende eienskappe (Motohisa *et al.*, 1973) en kon daarom met sukses as 'n anti-inflammatoriese middel (SALHUMIN®-Jel) gebruik word. Humiensure is ook sistemies aangewend om anemie en hipercholesterolemie te behandel (Soloveyva & Lotosh, 1984). Die antiseptiese eienskappe van veen, wat ryk is aan humiensure, is reeds tydens die Eerste Wêreldoorlog ontdek toe dit direk op oorlogswonde geplaas is om infeksie te voorkom (Haanel, 1924). Humiensure, verkrygbaar onder die handelsnaam Huminit®, word ook al vir baie jare lank gebruik om sooibrand en ander gastriese versteurings te behandel (Kinzlmeier, 1954; Reichert, 1966). Meer onlangs is Von Willebrand siekte behandel met humiensure (Lopez-Fernandez *et al.*, 1992).

'n Suid Afrikaanse maatskappy [Enerkom (Pty) Ltd] het 'n unieke proses ontwikkel om 'n sintetiese vorm van humiensuur wat wateroplosbaar is, naamlik oksihumaat, te sintetiseer (Cronjé *et al.*, 1991). Die belangstelling het ontstaan om moontlike ooreenkomste met die natuurlike humiensure, wat die effektiewe behandeling van 'n verskeidenheid siektetoestande betref, te ondersoek.

Uitgebreide farmakokinetiese en toksikologiese ondersoeke met oksihumaat is *in vivo* uitgevoer. Diere het dosisse van tot 1000 mg/kg oor 'n tydperk van 90 dae 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 limfosiettelting by die 1000 mg/kg vlak [Progress Report: Biocon (Pty) Ltd, Pretoria, Suid Afrika, Julie 1999]. Die hoogste konsentrasie waarvan in hierdie studie gebruik gemaak is, was heelwat laer as die konsentrasies waarby genoemde abnormaliteite waargeneem is.

Verder was die hoogste dosis wat in 'n Fase I kliniese proef toegedien is, 8 g/dag, wat op 'n dosis van 133 mg/kg (in die geval van 'n 60 kg persoon) neerkom (Botes *et al.* in druk).

Volgens 'n farmakokinetiese studie is gevind dat twaalf persent van ¹²³I-gemerkte oksihumaat wat oraal aan bobbejane toegedien is, in die bloed voorgekom het (Verslag deur: I Dormehl, Atomic Energy Corporation Institute for Life Sciences, Pretoria, Suid Afrika, Desember 1997). Hieruit kan aangeneem word dat 'n betekenisvolle serumvlak van hierdie middel (ongeveer 48 µg/ml in volwasse persone) opgebou sou kon word.

Die moontlike toepassing van steenkoolafkomstige humiensure as 'n antimikrobiële middel vir waterbehandling, is deur Cloete *et al.* (1990) ondersoek terwyl die groei van verskeie mikrobiële patogene effektief deur oksifulviensuur inhibeer is (Van Rensburg *et al.*, 2000). Oksifulviensuur het ook 'n betekenisvolle afname van die inflammatoriese response by diere veroorsaak (Van Rensburg *et al.*, 2001).

Invloed van oksihumaat op limfosietproliferasie

'n Deeglike studie van die effek van oksihumaat op die immuunsisteem is *in vitro* sowel as *in vivo* uitgevoer. Die resultate om hierdie studies dui daarop dat oksihumaat beskik oor indrukwekkende immuunmodulerende eienskappe *in vitro*. Aanvanklik is vasgestel dat oksihumaat die proliferatiewe respons van PHA-gestimuleerde menslike limfosiete, by konsentrasies van 20 µg/ml en hoër, gestimuleer het. Hierdie effek is gevind in die geval waar van 'n mengsel van monosiete en limfosiete gebruik gemaak was sowel as monosiet-arme limfosiete ($p < 0.05$ en $p \leq 0.001$ respektiewelik). 'n Soortgelyke stimulerende effek van limfosiet-proliferasie is ook deur die natrium sout van 'n kommersiële beskikbare humiensuur verkry, wat aantoon dat hierdie effek nie tot oksihumaat beperk is nie. Die kommersiële beskikbare preparaat is nog nie getoets vir toksisiteit en terapeutiese waarde nie. Die stimulerende effek op proliferasie was selfs meer betekenisvol verhoog in die geval waar limfosiete van HIV-geïnfekteerde individue ondersoek is ($p < 0.001$). HIV-geïnfekteerde individue word met 'n verswakte T-sel proliferasie geassosieer (Meygaard *et al.*, 1993). In hierdie studie is daar gevind dat die limfosiete van hierdie pasiënte duidelik meer vatbaar was vir stimulasie deur oksihumaat as die selle van normale individue wat 'n opwindende bevinding is en aantoon dat hierdie verskynsel wel omkeerbaar is. Die

bevinding dat monosiet-arme limfosiete meer ontvanklik is vir stimulasie deur oksihumaat toon aan dat óf die NADPH oksidase sisteem óf monosiet-afkomstige sitokiene moontlik wel 'n inhiberende effek op die werking van oksihumaat het. Hierdie bevindings behoort verder ondersoek te word. Verder het oksihumaat inhibisie van limfosiet-proliferasie veroorsaak by 10 µg/ml, en ook net by 'n monosiet-ryke limfosiet kultuur. Dit dui weereens daarop dat sitokiene wat deur monosiete geproduseer word moontlik 'n beskermende effek op hierdie selle het. Dit mag ook wees dat verskeie komponente van oksihumaat verskillende effekte op limfosiete het. Verdere studies word beplan om die effek van verskillende oksihumaat komponente op limfosiet-proliferasie te bepaal. Aan die ander kant, indien oksihumaat dalk 'n suurstof-opruimingsaktiwiteit sou besit, sou dit 'n stimulerende effek gehad het op die proliferasie van slegs die monosiet-ryke limfosietmengsel, wat nie die geval was nie. Dit is wel bemoedigend dat die oksihumaat-bemiddelde stimulasie wat verkry is met limfosiete van HIV-geïnfekteerde individue wel in die teenwoordigheid van monosiete plaasgevind het. Hierdie eksperiment is egter nie, weens veiligheidsredes, met monosiet-arme limfosiete herhaal nie en mens kan net spekulêr dat dit selfs meer effektief sou gewees het. Wat baie interessant was, was die bevinding dat oksihumaat ook 'n stimulasie van limfosiet-proliferasie *ex vivo* by HIV-geïnfekteerde individue, wat vir twee weke lank met 4 g oksihumaat per dag behandel is, veroorsaak wat aandui dat die middel wel biobeskikbaar is in die bloed.

Invloed van oksihumaat op IL-2 produksie en CD25 uitdrukking

Interleukien 2 is 'n belangrike groeifaktor (Abbas *et al.*, 1994) en daar is dus besluit om eerstens uit te vind of die verhoogde proliferasie van behandelde limfosiete nie toegeskryf kan word aan eerstens 'n stimulasie van hierdie groeifaktor en tweedens 'n stimulasie van CD25 wat die reseptor vir IL-2 is. Resultate dui daarop dat die oksihumaat-bemiddelde verhoogde proliferasie wel met 'n verhoogde uitdrukking van die IL-2 reseptor, naamlik CD25 ($p < 0.05$), sowel as met ekstrasellulêre produksie van IL-2 ($p < 0.05$) deur gestimuleerde limfosiete gekorreleer het. CD38 (Gallin & Snyderman, 1999) en HLA-DR ('n molekule wat 'n belangrike rol by selbemiddelde immuniteit speel, was nie deur oksihumaat behandeling geaffekteer nie. Verhoogde uitdrukke van CD38 word geassosieer met HIV infeksies (Gallin & Snyderman, 1999) terwyl verhoogde HLA-DR uitdrukking

verhoog word tydens inflammatoriese reaksies (Gallin & Snyderman, 1999). Die gebrek aan effektiwiteit deur oksihumaat op die uitdrukking van hierdie molekules toon dat oksihumaat 'n selektiewe uitwerking op slegs sekere oppervlakmolekules, naamlik CD25 (word verhoog) en CR3 (word verlaag) het.

Verhoogde IL-2 produksie dui op 'n verhoogde TH₁ aktiwiteit (Abbas *et al.*, 1994). Tydens 'n inflammatoriese reaksie differensieer T-limfosiete in óf TH₁ óf TH₂ selle en beide groepe produseer verskillende tipes sitokiene wat bepaal of die immuunrespons hoofsaaklik sel-bemiddeld (TH₁) of humoraal-bemiddeld (TH₂) sal wees (Mosman & Sad, 1996). Stimulasie van 'n TH₁ respons is belangrik om kanker, sowel as virale en opportunistiese infeksies, uit te wis (Peakman & Vergani, 1997). 'n TH₁ respons sal ook die aktiwiteit van TH₂ selle onderdruk en kan moontlik 'n nuwe benadering wees in die behandeling van kroniese, inflammatoriese toestande [soos byvoorbeeld asma, rumatoïede artritis en sistemiese lupus eritmatose (SLE)], waar skadelike antiligggame 'n belangrike rol speel (O'Garra, 1998).

Invloed van oksihumaat op IL-4, IL-6 en IL-10

Om te bepaal of oksihumaat slegs die stimulasie van sitokiene wat geassosieer is met TH₁ selle stimuleer, is ook bepalings op sitokiene wat geassosieer is met TH₂ selle nl. IL-10, IL-4 en IL-6 gedoen. Oksihumaat het 'n betekenisvolle inhibisie van IL-10 deur gestimuleerde menslike limfosiete veroorsaak ($p < 0.01$), wat die IL-2 resultate ondersteun aangesien IL-10 geassosieer word met die onderdrukking van die produksie van TH₁ geassosieerde sitokiene (Rengarajan *et al.*, 2000).

Produksie van IL-4 deur PHA-gestimuleerde menslike limfosiete, aan die ander kant, was weer statisties betekenisvol deur oksihumaat verhoog ($p < 0.01$), terwyl IL-6 slegs in 'n mindere mate en nie betekenisvol, verhoog is. Net soos IL-10, word hierdie twee sitokiene ook met 'n TH₂ sitokien profiel geassosieer (Rengarajan *et al.*, 2000). Die bevinding dat oksihumaat wel IL-4 produksie kan opreguleer terwyl IL-10 produksie geïnhibeer word, dui daarop dat hierdie verbinding sitokien produksie selektief kan beïnvloed en kan moontlik daaraan toegeskryf word dat, aangesien humiensure so 'n komplekse samestelling het (Stevenson, 1994), daar moontlik verskeie komponente kan wees wat afsonderlik op die

immuunsisteem kan inwerk en sodoende stimulerende effekte op beide seltepe het. 'n Verhoging van IL-4 produksie, wat geassosieer word met humorale immuniteit, sal voordelig wees in die bekamping van infeksies waar spesifieke antiliggame 'n rol speel. Lange *et al.* (1985) het wel 'n verhoging in globulienvlakke by rotte waargeneem na orale toediening van plaagdoders in kombinasie met humiensure wat op 'n stimulasie van die humorale immuunsisteem dui. So ook het Tolpa *et al.* (1983) aangedui dat lae dosisse van 'n peet ekstrak (TTP®) die produksie van immunoglobulene by netbalspelers verhoog het.

Die immuunstimulerende effekte van humiensure is deur Jankowski *et al.* (1993) gedemonstreer. Hierdie navorsers het gevind dat daar, onder pasiënte wat aan herhaalde lugweginfeksies gely het, na behandeling met 'n peetekstrak, betekenisvol minder gevalle van lugweginfeksies voorgekom het. Verder het Zbigniew *et al.* (1993) 'n groep gesonde vrywilligers met dieselfde peetekstrak behandel en 'n verhoogde CD4/CD8 verhouding saam met 'n verhoogde sitotoksiese aktiwiteit van groot granulêre limfosiete waargeneem, alhoewel hy geen verhoogde uitdrukking van IL-2 reseptore gevind het nie. Die rede hiervoor kan moontlik wees omdat hy met gesonde vrywilligers gewerk het met rustende sitokienvlakke.

Invloed van oksihumaat op LTB₄ en PGE₂ produksie

Omdat LTB₄, 'n produk van fosfolipase A₂ (PLA₂), sowel as 5'-lipoksigenase, 'n multifunksionele reguleerder van sitokienproduksie (veral IL-2) is, en omdat dit beide die TH₁ sowel as die TH₂ subpopulasies kan stimuleer (Alonso *et al.*, 1998), is die effek van oksihumaat op LTB₄ getoets. Daar is gevind dat oksihumaat die produksie van LTB₄ deur FMA-gestimuleerde menslike limfosiete statisties betekenisvol verhoog ($p < 0.05$). Dit is egter in teenstelling met die bevinding van Klöcking (1994) wat gevind het dat humiensure die lipoksigenase pad inhibeer. Die enigste verduideliking hiervoor is die komplekse samestelling van die verskillende humiensuurpreparate wat verskillende komponente kan bevat met teenoorgestelde werking op die ensiemsisteme. 'n Studie om die aktiwiteit van verskillende komponente van oksihumaat te ondersoek (wat meganismes insluit), het reeds begin. Die stimulasie van LTB₄ kan egter voordelig wees aangesien dit nie alleen 'n belangrike rol in die induksie van IL-2 produksie speel nie, maar verhoog ook die aktiwiteit

van sitotoksiese T-selle wat 'n moontlike verklaring is vir die verhoging in IL-2 produksie deur oksihumaat-behandelde limfosiete sowel as verhoogde sitotoksiteit van hierdie selle (Arcoleo *et al.*, 1995). Netso kan dit ook 'n rol speel by die stimulerende effek wat oksihumaat op die produksie van TH₂-geassosieerde sitokienproduksie het (Alonso *et al.*, 1998).

PGE₂ wat, net soos LTB₄, ook 'n aktiewe afbraakproduk van aragidoonsuur is, se produksie deur oksihumaat behandelde limfosiete, aan die ander kant, is in 'n mindere mate, maar nie betekenisvol, geïnhibeer. PGE₂ besit die vermoë om pyn en koors te induseer. Dit inhibeer T-sel proliferasie deur die produksie van TH₁-geassosieerde sitokiene (IFN- γ , TNF- β en IL-2) te beperk (Mosman & Coffman, 1989; Hendricks *et al.*, 2000). Alhoewel oksihumaat (tot en met 100 $\mu\text{g/ml}$) PGE₂ produksie slegs effens geïnhibeer het, kan 'n verlaagde vlak daarvan moontlik wel bydra tot 'n verhoging in limfosiet proliferasie sowel as die produksie van TH₁-geassosieerde sitokiene.

Omdat oksihumaat die produksie van LTB₄, wat geassosieer word met verhoogde sitotoksiese aktiwiteit, deur gestimuleerde limfosiete gestimuleer het, is die effek daarvan op die sitotoksiese aktiwiteit van menslike limfosiete ondersoek. Verder is die anti-tumor eienskappe van humiensure reeds deur Zsindely *et al.* (1971) en Adamek (1976) beskryf. Alhoewel oksihumaat op sy eie die groei van 'n menslike lewer kankersellyn op 'n dosis-afhanklike manier geïnhibeer het, was dit slegs statisties betekenisvol by 'n konsentrasie van 100 $\mu\text{g/ml}$ gewees ($p < 0.05$). Wanneer limfosiete egter by hierdie sisteem gevoeg is, is die mate van inhibisie deur oksihumaat by konsentrasies van 20-100 $\mu\text{g/ml}$, statisties hoogs betekenisvol verhoog ($p < 0.005$). Hierdie resultate dui op 'n moontlike rol van oksihumaat by die sitotoksiese aktiwiteit van limfosiete en kan moontlik verklaar word deur die verhoging van LTB₄ en IL-2 produksie.

Invloed van oksihumaat op TNF- α en IFN- γ produksie

Die invloed van oksihumaat is ook op die produksie van die pro-inflammatoriese sitokiene TNF- α en IFN- γ ondersoek. TNF- α is 'n sitokien wat deur 'n reeks verskillende tipes selle, insluitende NK-selle, sowel as sitotoksiese T limfosiete (CD8⁺ selle) geproduseer word en

stimuleer neutrofiële, NK-selle en die uitdrukking van vashegtingsmolekules, terwyl IFN- γ , wat deur veral TH₁ limfosiete, NK-selle en makrofage geproduseer word ook pro-inflammatoriese aktiwiteit besit deur die stimulasie van neutrofiële om reaktiewe suurstof spesies te produseer (Huang *et al.*, 1999). In hierdie studie is gevind dat oksihumaat by 20 en 40 $\mu\text{g/ml}$ die produksie van TNF- α deur gestimuleerde limfosiete statisties betekenisvol geïnhibeer het ($p < 0.05$). Geen inhibisie was egter by hoër konsentrasies gevind nie, wat moontlik verklaar kan word deur die komplekse samestelling van hierdie preparaat met verskillende komponente wat mekaar by spesifieke konsentrasies teenwerk. Verder het oksihumaat die produksie van IFN- γ deur gestimuleerde limfosiete in 'n mindere mate en nie betekenisvol nie, geïnhibeer. Die moontlikheid bestaan wel dat daar 'n korrelasie tussen hierdie afname en die inhibisie wat met die produksie van TNF- α waargeneem is, bestaan. Laasgenoemde waarneming dui op 'n anti-inflammatoriese aksie deur oksihumaat. In teenstelling met hierdie bevindings het Inglot *et al.* (1999) gevind dat 'n peet ekstrak (Tolpa® Torf Preparation) die produksie van beide hierdie sitokiene kan verhoog. Hierdie peet-afkomstige ekstrak bevat, behalwe humiensure, moontlik verskeie ander komponente met moontlike pro-inflammatoriese eienskappe. 'n Afname in IFN- γ kan egter 'n nadelige effek hê indien dit aangewend word vir die behandeling van virus-geïnfekteerde pasiënte (bv HIV pasiënte) aangesien IFN- γ anti-virale eienskappe besit (Abbas *et al.*, 1994) en sal dus nie anti-virale middels ondersteun nie.

Invloed van oksihumaat op CR3-uitdrukking en neutrofielvashegting

Die anti-inflammatoriese aktiwiteit van humiensubstansie en humiensure is reeds deur verskeie navorsers beskryf (Miehlke en Thürigen, 1961; Taugner, 1963; Klöcking *et al.*, 1968; Motohisa *et al.*, 1973; Salz, 1974; Kühnert *et al.*, 1982; Klöcking, 1994; Iubitskaia en Ivanov, 1999). Die inhibisie van TNF- α dui wel daarop dat oksihumaat ook moontlike anti-inflammatoriese eienskappe besit. So byvoorbeeld is TNF- α nodig vir die uitdrukking van die vashegtingsmolekule CR3 (Witko-Sarsat *et al.*, 1999), 'n molekule wat op gestimuleerde neutrofiële uitgedruk word en wat 'n noodsaaklike rol speel by die beskerming van die gasheer teen infektiewe organismes, alhoewel dit ook verantwoordelik is vir neutrofiel-bemiddelde inflammatoriese reaksies (Mukherjee *et al.*, 1998).

Oksihumaat behandeling van menslike neutrofiële het wel tot 'n betekenisvolle afname van

die uitdrukking van die CR3-vashegtingsmolekule gelei. Hierdie betekenisvolle afname in CR3-uitdrukking het by beide FMA- en FMLF-gestimuleerde neutrofiële voorgekom ($p < 0.0005$ en $p < 0.05$, respektiewelik). Aan die anderkant, in die geval van FMA- en FMLF-gestimuleerde neutrofiële, het $10 \mu\text{g/ml}$ oksihumaat 'n stimulasie van CR3-uitdrukking veroorsaak. Hierdie verskynsel kan moontlik weereens, soos in die geval van die produksie van LTB_4 , aan die komplekse samestelling van humiensure toegeskryf word. Inhibisie van die CR3-molekule word bevestig deur die oksihumaat-bemiddelde afname in neutrofielvashegting aan 'n oorspronklike baba hamster niersellyn (BHK-21) sowel as aan twee verskillende getransfekteerde BHK-sellyne, naamlik BHK 126-16 (wat menslike E-selektien uitdruk) en BHK 331-7 (wat menslike ICAM-1 uitdruk). Die vashegting van gestimuleerde neutrofiële aan al drie sellyne was betekenisvol geïnhibeer ($p < 0.05$), maar in die geval van die BHK 331-7 was die inhibisie by oksihumaatkonsentrasies van $40\text{-}100 \mu\text{g/ml}$ statisties hoogs betekenisvol ($p < 0.0001$). Oksihumaat het wel, tussen $10\text{-}40 \mu\text{g/ml}$, stimulasie van die vashegting van rustende neutrofiële aan al drie sellyne veroorsaak. Dit kan moontlik verduidelik word deur 'n verhoogde uitdrukking van CR3, soos gevind is by rustende neutrofiële, alhoewel hierdie verhoging nie betekenisvol was in die kort (15 minute) blootstellingstydperk wat in hierdie studie gebruik is nie. Gau et al. (2000) het gevind dat humiensuur proteïen sintese inhibeer met gevolglike inhibisie van die adhesie molekules, ICAM-1, VCAM-1 en E-selektien. Hierdie inhibisie korreleer wel met die inhibisie van NF- κB , wat moontlik ook 'n rol kan speel by die uitdrukking van CR3.

Invloed van oksihumaat op NK-sel aktiwiteit

Oksihumaat het 'n inhiberende effek op die aktiwiteit van NK-selle gehad, alhoewel dit slegs by 60 en $100 \mu\text{g/ml}$, maar nie by $80 \mu\text{g/ml}$, betekenisvol was. Verdere eksperimente mag egter nodig wees om betekenisvolheid aan te toon. Aangesien NK-selle IFN- γ vir optimale funksie benodig (Timonen *et al.*, 1982) en aangesien oksihumaat geen betekenisvolle effek op die produksie daarvan gehad het nie, is dit 'n moontlike rede waarom NK-sel aktiwiteit nie verhoog het nie. Die inhibisie van NK-selaktiwiteit moet verder ondersoek word. Die moontlikheid bestaan dat oksihumaat dalk noodsaaklike vashegtingsmolekules, nodig vir binding van NK-selle aan die teiken selle, inhibeer.

Invloed van oksihumaat op neutrofiel degranulasie

Degranulasie van fagosiete kan lei tot die vrystelling van pro-inflammatoriese ensieme en word geassosieer met die uitdrukking van CR3 op die oppervlakte van gestimuleerde fagosiete (Mukherjee *et al.*, 1998). Net soos neutrofiële, speel eosinofiele ook 'n regulerende funksie in immuunresponse (Egsten *et al.*, 1998) maar is ook belangrik by inflammatoriese allergieë (Gallin *et al.*, 1992). Om hierdie redes is besluit om die moontlike inhiberende aktiwiteit van oksihumaat op die degranulasie van gestimuleerde neutrofiële en eosinofiele te ondersoek. Oksihumaat het die vrystelling van MPO (deur neutrofiële) en EKP (deur eosinofiele) op 'n dosis-afhanklike manier geïnhibeer wanneer van 'n opgelosde, maar nie 'n gepartikuleerde stimulant, gebruik gemaak word. Hierdie resultate dui ook op 'n anti-inflammatoriese funksie van oksihumaat wat effektief behoort te wees ook in die geval van 'n allergiese respons, terwyl oksihumaat geen beskermende aktiwiteit op geopsoneerde patogene behoort te hê nie.

Invloed van oksihumaat op selmembrane van skaaprooibloedselle

Verdere meganistiese studies was daarop gerig om te bepaal of die effek van oksihumaat op die selle van die immuunsisteem nie weens 'n direkte destabiliseringseffek op selmembrane is nie. Skaaprooibloedselle is gebruik as sensitiewe indikator sisteem (Anderson *et al.*, 1996). Oksihumaat het geen effek op die lise van hierdie selle gehad nie.

Oksihumaat as moontlike behandeling vir HIV

Die groot verlies van CD4⁺ selle by HIV-geïnfekteerde individue, lei tot 'n verlies van sellulêre immuun funksies (Loso *et al.*, 2000). Interleukien 2, wat deur T-selle geproduseer word, se funksie is om die groei en rypwording van T-selle te bevorder. Alhoewel IL-2 nie virale replikasie *in vitro* (Kovacs *et al.*, 1996) verminder nie, mag dit egter die virus-geïnduseerde verlies van CD4⁺ selle by HIV-geïnfekteerde persone teenwerk deur die proliferasie van T-selle te verhoog. Die vermoë van sommige HIV-geïnfekteerde individue om normale TH₁ tipe respons in stand te hou, bied lang termyn beskerming aan hierdie pasiënte sodat hulle lewe verleng word, aangesien progressie van die siekte afhanklik is van 'n TH₁ na 'n TH₂ sitokien verskuiwing. Interleukien 2, wat in kombinasie met 'n retrovirale behandeling (HAART) toegedien word, veroorsaak 'n

dramatiese verhoging in CD4⁺ getalle in vergelyking met HAART-behandeling alleen (Shearer & Clerici, 1998; Davey *et al.*, 2000). Die stimulasie van IL-2 produksie kan dus 'n vername bydrae lewer om die pasiënt te help om opportunistiese infeksies te kan hanteer. Wat egter in ag geneem moet word is dat 'n verhoging van IL-2 saam met 'n verhoging van CD4⁺ selle ook 'n verhoging van virale groei tot gevolg kan hê (Davey *et al.*, 2000). Die toediening van IL-2 aan HIV-geïnfekteerde pasiënte moet dus saam met anti-retrovirale middels (HAART) toegedien word (Davey *et al.*, 2000). Oksihumaat, aan die ander kant, besit ook direkte anti-virale aktiwiteit (Van Rensburg *et al.*, 2002) en kan moontlik as enkel-middel terapie vir HIV-geïnfekteerde pasiënte oorweeg word.

Na aanleiding van hierdie bevindings is 'n Fase I studie met oksihumaat in HIV-geïnfekteerde persone aangepak (Botes *et al.* in druk). Resultate verkry uit hierdie studie toon dat oksihumaat, tot op 'n dosis van 8 g/dag, geen nadelige effek op enige biochemiese of hematologiese parameters van die pasiënte gehad het nie. Alhoewel die virus lading en CD4⁺ tellings nie noemenswaardig tussen die behandelde en plasebo groepe verskil het nie, het die liggaamsgewig van hierdie groepe betekenisvol gestyg, wat wel aandui dat hierdie middel 'n positiewe effek op die pasiënte gehad het. Die kliniese proef was hoofsaaklik beplan om te bepaal of hierdie middel enigsins 'n nadelige effek op die pasiënte het en het slegs oor twee weke gestrek, wat nie lank genoeg is om enige verbetering in effektiwiteitsmerkers (CD4 tellings en virus lading) te verwag nie.

Samevatting:

Oksihumaat is nie toksies nie

Geen betekenisvolle toksisiteite onder 350 mg/kg is by eksperimentele diere, wat aan oksihumaat blootgestel is, waargeneem nie [Progress Report: Biocon (Pty) Ltd, Pretoria, Suid Afrika, Julie 1999]. Dit het ook geen meetbare toksiese effekte op HIV-geïnfekteerde individue, wat vir twee weke lank orale dosisse van tot 8 g per dag geneem het, gehad nie. Hierdie waarnemings stem ooreen met studies wat voorheen op humiensure uitgevoer is (Golbs *et al.*, 1982; Kühnert *et al.*, 1989).

Oksihumaat besit immuunstimulerende eienskappe

Volgens hierdie studie is gevind dat oksihumaat die produksie van LTB₄, IL-2, IL-4, sowel as die sitotoksiese aktiwiteit van limfosiete stimuleer.

Oksihumaat besit anti-inflammatoriese eienskappe

Volgens hierdie studie is gevind dat oksihumaat neutrofiel vashegting en die degranulasie van neutrofiële en eosinofiele inhibeer.

Hierdie kombinasie van bogenoemde eienskappe in een middel blyk uniek te wees en behoort verder ondersoek te word vir die behandeling van pasiënte met immuun-abnormaliteite.

Toekomstige navorsing

Die anti-inflammatoriese en immuunstimulerende eienskappe van oksihumaat moet verder ondersoek word deur kliniese proewe op pasiënte met inflammatoriese siektes, bv. rumatoïede artritis, en infektiewe siektes, bv. tuberkulose, te beplan. Kombinasie behandeling van HIV geïnfekteerde pasiënte met antiretrovirale middels plus oksihumaat, moet ook sterk oorweeg word.



VERWYSINGS

VERWYSINGS

- Abbas AL, Lichtman AH, Pober JS. (1994) Cellular and Molecular Immunology – 2nd edition, WB Saunders.
- Adamek W. (1976) Introductory report on oncostatic and therapeutic nature of the peat preparation in human neoplastic disease. In: Peat and Peat-lands in the Natural Environment Protection. Proc 5th Int Congress, Poznam, Poland, Vol. I: 417-429.
- Addison T. (1855) On the Constitutional and Local Effects of Disease of the Suprarenal Capsules. *Samual Highley, London.*
- Albelda SM, Buck CA. (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* **4**: 4868-4874.
- Albrecht CF, Kruger PB, Smit BJ, Freestone M, Gouws L, Koch HP, Miller R, van Jaarsveld PP. (1995a) The pharmacokinetic behaviour af hypoxoside taken orally by patients with lung cancer in a phase I trial. *SA Med J* **85**: 861-865.
- Albrecht CF, Theron EJ, Kruger PB. (1995b) Morphological characterization of the cell-growth inhibitory activity of rooperol and pharmacokinetic aspects of hypoxoside as an oral prodrug for cancer therapy. *SA Med J* **85**: 853-860.
- Alonso A; Bayon Y; Mateos JJ; & Sanchez Crespo M. (1998) Signaling by leucocyte chemoattractant and Fcgamma receptors in immune-complex tissue injury. *Lab Invest* **78(4)**: 377-392.
- Anderson R, Gatner EMS, Van Rensburg CEJ, Grabow GK, Imkamp FMJH, Van Rensburg AJ. (1981) *In vitro* and *in vivo* effects of dapsone on neutrophil and lymphocyte functions

in normal individuals and patients with lepromatous leprosy. *Antimicrob Agents Chemother* **19**: 495-503.

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

Anderson R. (1991) Assessment of the roles of vitamin C, vitamin E and β -carotene in the modulation of oxidant stress mediated by cigarette smoke-activated phagocytes. *Am J Clin Nutr* **53**: 358S-361S.

Anderson R. (1995) The activated neutrophil: formidable forces unleashed. *SAMJ* **85(10)**: 1024-1028.

Ansorg R, Rochus W. (1978) Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit von natürlichen und künstlichen Huminsäuren. *Arzneim Forsch* **28**: 2195-2198.

Arcoleo F, Milano S, D'Agostino, Cillari E. (1995) Effect of exogenous leukotriene B₄ on Balb/c mice splenocyte production of Th₁ and Th₂ lymphokines. *Int J Immunopharmac* **17 (6)**: 457-463.

Baatz H. (1988) Moorthérapie en der Frauenheilkunde. In: W. Flaig, C.Goecke und W. Kauffels (Hrsg.), Moorthérapie: Grundlagen und Anwendungen, Ueberreuter, Wien-Berlin, P161-168.

Babior BM. (1984) Oxidants from phagocytes: agents of defence and destruction. *Blood* **64**: 950-966.

Bacon GE, Spencer ML. (1973) Pediatric uses of steroids. *Med Clin North Am* **57**: 1265-1276.

- Baeuerle PA, Baichwal VR. (1997) NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol* **65**: 111-137.
- Bartels KP. (1986) Bericht über die klinische Erprobung eines neuen Anti-diarrhoitikum auf Huminsäurebasis. *Prakt Tierarzt* **67**: 516-518.
- Batschelet E. (1979) Introduction to mathematics for life scientist. 3rd edition Springer, Berlin Heidelberg New York, P427-429.
- Baylink DJ. (1983) Glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med* **309**: 306-309.
- Bearse AE, Cox JL, Hillman M. (1975) Production of chemicals by oxidation of coal. Battelle Energy Program Report, 31 March.
- Becker WM, Deamer DW. (1991) The chemistry of the cell: The importance of selectively permeable membranes. *In: The world of the cell. 2nd edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.:* 24-31
- Bennet LR, Connon FE. (1957) Effects of lytic agents on plasma membranes of Ehrlich ascites-tumor cells and mouse erythrocytes. *J Nat Cancer Inst* **19**: 999-1011.
- Bergh JJ, Cronje IJ, Dekker J, Dekker TG, Gerritsma LM, Mienie LJ. (1997) Non-catalytic oxidation of water-slurried coal with oxygen: identification of fulvic acids and acute toxicity. *Fuel* **76**: 149-154.
- Berk PD, Jones EA, Plotz PH, Seef LB, Wright EC. (1976) Corticosteroid therapy for chronic active hepatitis. *Ann Intern Med.* **85**: 523-525.
- Bernacchi F, Ponzanelli I, Barale R, Loprieno N. (1996) Mutagenic activity of coal-derived humic compounds evaluated by the Ames test. *Mutation Research* **369**: 107-112.

Berzelius JJ. (1893) Lehrbuch der Chemie, vol 8, pp 13-16. Berzelius JJ (ed) Arnoldische Buchhandlung, Dresden-Leipzig, P384-392.

Beverly B, Kang S-M, Lenardo MJ, Schwartz RH. (1992) *Int Immunol* **4**: 661-671.

Bevilacqua MP. (1993) Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Ann Rev Immunol* **11**: 767-772.

Biber VA, Bogolyubova NS. (1952) Humic acid of estuarine mud and its biological activity. *Dokl Akad Nauk SSSR* **82**: 939-944.

Botes ME, Dekker J, Van Rensburg CEJ. (2002) Phase I trial with oral oxihumate in HIV-infected patients. *Drug Develop Res* **56**: 1-6.

Bouic PJ, Albrecht CF. (1993) Method and compositions for modulating or control of immune responses in humans. *S.A. Patent no.* 92/2125.

Bouic PJ, Clark A, Lamprecht J, Freestone M, Pool EJ, Liebenberg RW, Kotze D, van Jaarsveld PP. (1999) The effects of B-sitosterol (BSS) and B-sitosterol glucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: inhibition of post marathon immune suppression and inflammation. *Int J Sports Med* **20(4)**: 258-262.

Bouic PJ, Etsebeth S, Liebenberg RW, Albrecht CF, Pegel K, van Jaarsveld PP. (1996) Beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. *Int J Immunopharm* **18(12)**: 693-700.

Böyum A. (1968) Isolation of leucocytes from human blood. Further observations: Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyte aggregating agents. *Scand J Clin Lab Invest* **21**: 31-50.

Brandt H. (1964) Die Behandlung degenerativer Erkrankungen der Wirbelsäule und der Gelenke mit salizylierten Huminsäurebädern. *Fortschr Med* **82**: 1-10.

Breng R, Waldow R, Plötner. (1981) Hemmung der Prostaglandinsynthese durch wasserlösliche Huminstoffe *in vitro*. In: G. Plötner und U. Weber (Hrsg.), Torf in der Medizin, Symposium der Kommission VI der IMTG, Bad Elster: P97-104.

Brennan MJ. (1973) Corticosteroids in the treatment of solid tumors. *Med Clin North Am* **57**: 1225-1239.

Brooks PM, Day RO. (1991) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs – differences and similarities. *N Engl J Med* **324**: 1716-1725.

Burkat SE. (1965) Gigieničeskoe značenie adsorcpii joda guminovymi kislotami. *Gig Sanit* **30**: 97-98.

Cassatella MA. (1999) Neutrophil-derived proteins: Selling cytokines by the pound. *Adv Immunol* **73**: 369-509.

Chen C, Okayama H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biology* **7**: 2745-2748.

Cloete TE, Swart H, Cronjé IJ, Dekker J. (1990) "Oxidized coal products as industrial bactericides". Third International Symposium on Gas, Oil, Coal and Environmental Biotechnology. New Orleans, Louisiana, 3-5 Desember 1990.

Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. (1995) Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* **9**: 899-909.

Cronjé IJ, Cloete TE, Dekker J. (1991) US Patent No. 4 999 202.

Cronjé IJ. (1988) Process for the oxidation of coal. SA Patent No. 88/4770.

Davey RT, Murphy RL, Graziano FM, Boswell SL, Pavia AT, Cancio M, Nadler JP, Chaitt DG, Dewar RL, Sahner DK, Duliege AM, Capra WB, Leong WP, Giedlin MA, Lane HC, Kahn JO. (2000) Immunologic and virologic effects of subcutaneous interleukin 2 in combination with antiretroviral therapy: A randomized controlled trial. *JAMA* **284**: 183-189.

Davies G. (1996) Properties and functions of Humic Acids, Meeting Report. *The Nucleus*: 17-20.

Davies P. (1988) Lipoxygenase products in immunity. *Immunol Invest* **16**: 623-647.

Daynes RA, Araneo BA. (1989) Contrasting effects of glucocorticoids on the capacity of T cells to produce the growth factors interleukin 2 and interleukin 4. *Eur J Immunol* **19**: 2319-2325.

Dekker J, Cronjé IJ, Louwrens HB, Swart H. (1990) Non-catalytic oxidation of water-slurried coal with oxygen: A promising new route to oxihumic and oxifulvic acids. Proceedings of the 7th Annual International Coal Conference, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA.: 703-708.

DiDonato J, Mercurio F, Rosette C. (1996) Mapping of the inducible NF- κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* **16**: 1295-1304.

Diebler H, Eigen M, Matthies P. (1961) Kinetische Untersuchungen über die Bildung von p-Benzochinon aus Chinon und Hydrochinon in alkalischer Lösung. *Z Naturforschung* **16b**: 629-637.

Donald PR, Lamprecht JH, Freestone M, Albrecht CF, Bouic PJ, Kotze D, van Jaarsveld PP. (1997) A randomised placebo-controlled trial of the efficacy of beta-sitosterol and its glucoside as adjuvants in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* **2**(6): 522-523.

Dunsky EH, Zweiman B, Fishchler E, Levy DA. (1979) Early effects of corticosteroids on basophils, leukocyte histamine, and tissue histamine. *J All Clin Imm* **64**: 426-432.

Egesten A, Blom M, Calafat J, Janssen H, Knol EF. (1998) Eosinophil granulocyte interaction with serum-opsonized particles: Binding and degranulation are enhanced by TNF- α . *Int Arch Allergy Immunol* **115**: 121-128.

Eichelsdörfer D. (1976) Moor in der Heilkunde. In: Moor- und Torfkunde, Edit. K. Göttlich, Schweizerbart, Stuttgart.

Eichhorn U, Klöcking R, Helbig B. (1984) Anwendung von ⁵¹-markierten FL-Zellen zur Testung der antiviralen Aktivität von Phenolkörperpolymerisaten gegen Coxsackieviren *in vitro*. *Dt Gesundheitswesen* **39**: 1514-1519.

Estévez M, Juan R, Ruiz C en Andrés JM. (1990) Formation of humic acids in lignites and subbituminous coals by dry air oxidation. *Fuel* **69**: 157.

Farghali II, Masek K. (1998) Immunopharmacologic agents in the amelioration of hepatic injuries. *Int J Immunopharmacol* **20**: 125-139.

Fellinger K, Schmid J. (1953) Therapeutische und pathogenetische Fragen um das Rheumaproblem, *Med Klin* **48**: 949-954.

Flower RJ. (1988) Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. *Br J Pharmacol* **94**: 987-1015.

Fuchs V, Golbs S, Kühnert W, Schopeck W, Stier B. (1982) Untersuchungen zum Einfluss von Huminsäuren auf ausgewählte Spurenelemente bei Laboratoriumsratten. *Arch Exp Veterinaermed* **36**: 187-191.

Fuchs V, Kühnert M, Golbs S. (1986) Detoxifizierende Wirkung von Huminsäuren gegenüber ausgewählten Schadstoffen. *Monatsh Veterinaermed* **41**: 712-13.

Furter M, Dekker J, Henning JAG. (1996) Stimulation of seedling growth by coal-derived oxifulvic acid. Part I. *J SA Soc Hort Sci* **6 (2)**: 95-96.

Furter M, Dekker J, Henning JAG. (1997) Stimulation of seedling growth by coal-derived oxifulvic acid. Part II. *J SA Soc Hort Sci* **7 (1)**: 33-34.

Galčenko A. (1950) Endemičeskij zob v trechrečje i ego svjaz s boleznju Kašina-Beka. *Priroda (Mosc)* **39**: 73-74.

Gallin JL, Snyderman R. (1999) Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates – 3rd Edition, Raven Press – New York.

Ganong WF. (1991) Circulating Body Fluids: Red Blood Cells. *In: Review of Medical Physiology*. 15th edition. Appleton & Lange: P490-492.

Gau R, Yang H, Chow S, Suen J, Lu F. (2000) Humic acid suppresses the LPS-induced expression of cell-surface adhesion proteins through the inhibition of NF- κ B activation. *Toxicology and Applied Pharmacology* **166**: 59-67.

Gau R, Yang H, Suen J, Lu F. (2001) Induction of oxidative stress by humic acid through increasing intracellular iron: a possible mechanism leading to atherothrombotic vascular disorder in blackfoot disease. *Biochem Biophys Res Commun* **283 (4)**: 743-749.

Ghabbour EA, Khairy AH, Cheney DP, Gross V, Davies G, Gilbert TR, Zhang X. (1994) Isolation of humic acid from the brown alga *Pilayella littoralis*. *J Appl Phycol* **6**: 459-466.

Golbs S, Fuchs V, Kühnert M, Polo C. (1982) Pränatal-toxikologische testung von huminsäuren an laboratoriums-ratten. *Arch exper Vet med Leipzig* **36**: 179-185.

Golbs S, Kühnert M. (1986) Einsatz eines Tierarzneimittels auf Huminsäurebasis in der Schweineproduktion. *Monatsh Veterinaermed* **41**: 711-712.

Górniok A, Majewski C, Nowacka A. (1967) Der Einfluss von Moorbädern auf die atmungsprozesse in den Geweben von Meerschweinchen. *Z Angew Baeder Klimaheilkd* **14**: 265-270.

Guminski S, Sulej J, Glabiszewski J. (1983) Influence of sodium humate on the uptake of some ions by tomato seedlings. *Acta Soc Bot Pol* **52**: 149-164.

Haanel BF. (1924) Facts about Peat, Mines Branch Publ. No.614, Can. Dept. Mines, Ottawa.

Hahn S, Erb P. (1999) The immunomodulatory tole of CD4-positive cytotoxic T-lymphocytes in health and disease. *Int Rev Immunol* **18** (5-6): 449-464.

Håkansson L, Nielsen LS, Teder P. (1994) Measurement of neutrophil and eosinophil adhesion to E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 by the use of transfected fibroblast cell lines. *J Immun Methods* **176**: 53-66.

Hartman E. (1967) Ein neues Oestrogenpräparat für die gynäkologische Praxis. *Med Monatsschr* **21**: 565-566.

Hench PS, Kendall EC, Slocumb CH, Polley HF. (1949) The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary

adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Proc Staff Meet Mayo Clin* **24**: 181-197.

Hendricks A, Leibold W, Kaefer V, Schuberth HJ. (2000) Prostaglandin E2 is variably induced by bacterial superantigens in bovine mononuclear cells and has a regulatory role for the T cell proliferative response. *Immunobiology* **201(5)**: 493-505.

Hettche HO. (1955) Urochrom im Wasser als Ursache der endemischen Kropfes. *GWF, Gas Wasserfach* **96**: 660-666.

Hettche HO. (1956) Zur Ätiologie und Pathogenese der Struma endemica. *Zentralbl Allg Pathol Anat* **95**: 187-193.

Hiller E. (1952) Experimentelle Untersuchungen zum Problem der Wirkungsweise gewisser Huminsäuren aus dem Moor bei der Behandlung rheumatischer Erkrankungen. *Med Monatsschr* **6**: 302-306.

Hiller E. (1953a) Der Einfluss von Bädern mit salicylierten Huminsäuren auf den Serumspiegel einzelner freier Aminosäuren. *Arzneim Forschung* **3**: 83-86.

Hiller E. (1953b) Untersuchungen über die Beeinflussung der Oestrogenausscheidung im Urin nach Bädern mit salicylierten Huminsäuren. *Dtsch Med Wochenschr* **78**: 691-693.

Hils J, May A, Sperber M, Klöcking R, Helbig B, Sprössig M. (1986) Hemmung ausgewählter Influenzavirusstämme der Typen A und B durch Phenolkörperpolymerisate. *Biomed Biochim Acta* **45**: 1173-1179.

Hofmann K, Yajima H, Yanaihara N, Liu T, Lande S. (1961) Studies on polypeptides. XIII. The synthesis of a tricosapeptide possessing essentially the full biological activity of natural ACTH. *J Am Chem Soc* **83**: 487-489.

- Holcombe RF, Li A, Stewart RM. (1998) Levamisole and interleukin-2 for advanced malignancy. *Biotherapy* **11**: 255-258.
- Holcombe RF, Milovanovic T, Stewart RM, Brodhag TM. (2001) Investigating the role of immunomodulation for colon cancer prevention: results of an in vivo dose escalation trial of levamisole with immunologic endpoints. *Cancer Detect Prev* **25**: 183-191.
- Hoppe-Seyler F. (1889) Über Huminsubstanzen, ihre Entstehung und ihre Eigenschaften. Hoppe-Seylers *Z Physiol Chem* **13**: 66-122.
- Hosemann H. (1953) Untersuchungen über die hormonale Wirksamkeit von Moor- und Schlammhädern. *Dtsch Med Wochenschr* **78**: 687-689.
- Hseu YZ, Lu FJ, Engelking LR, Chen CL, Chen YH, Yang HL. (2000) Humic acid-induced echinocyte transformation in human erythrocytes: characterization of morphological changes and determination of the mechanism underlying damage. *J Toxicol Environ Health A* **60** (3): 215-230.
- Huang TJ, MacAry PA, Wilke T, Kemeny DM, Chung KF. (1999) Inhibitory effects of endogenous and exogenous interferon-gamma on bronchial hyperresponsiveness, allergic inflammation and T-helper 2 cytokines in Brown-Norway rats. *Immunology* **98**(2): 280-288.
- Inglot AD, Sobiech KA, Zielińska-Jencylik J, Sypula A, Majda J, Lorenc M. (1999) Development and disappearance of tolerance to induction of interferon and tumor necrosis factor response in athletes treated with natural immunostimulant. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* **47**: 237-244.
- Iubitskaia NS, Ivanov EM. (1999) Sodium humate in the treatment of osteoarthritis patients. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult* **5**: 22-24.

Janeček J, Chalupa J. (1969) Biological effects of peat water humic acids on warm-blooded organisms. *Arch Hydrobiol* 515-522.

Jankowski A, Nienartowicz B, Polańska B, Lewandowicz-Uszyńska A. (1993) A randomised, double-blind study on the efficacy of Tolpa® Torf Preparation (TTP®) in the treatment of recurrent respiratory tract infections. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* **41**: 95-97.

Kallus J. (1964) Gastritis, das gastroduodenale Ulkus und Neydhartinger Moor. *In*: Bericht über den 8. Internationalen Kongress für universelle Moor- und Torfforschung, Länderverlag, Linz P112-114.

Katsikis PD, Cohen SB, Londei M, Feldmann M. (1995) Are CD4+ cells pro-inflammatory or anti-inflammatory? The ratio of IL-10 to IFN-gamma or IL-2 determines their function. *Int Immun* **7** (8): 1287-1294.

Kappler M, Ziechmann W. (1969) Ein mathematisches Modell zur Beschreibung von Humifizierungsvorgängen. *Brennstoff-Chemie* **50**: 348-351.

Khristeva LA, Yarchuk II, Kotlyba VG. (1957) cited by SAVisser (1973) *Acta Biol Med Germ* **31**: 569-581.

Kingman JFC. (1969) Markov population processes. *J Appl Prob* **6**: 1-18.

Kinzlmeier H. (1954) Die beeinflussung der Superazidität durch Ionenaustauscher. *Arzneim Forsch* **4**: 394-396.

Klatte OJ, Helpap B. (1964) Untersuchungen über die strumigene Wirkung von Trinkwasserverfärbungen (Urochrome und Huminsäuren) bei Ratten. *Arch Hyg Bakteriol* **148**: 569-584.

Kleinschmidt J. (1988) Moorthérapie bei rheumatischen Erkrankungen. In: W. Flaig, C. Goecke und W. Kauffels (Hrsg.), Moorthérapie: Grundlagen und Anwendungen, Ueberreuter, Wien-Berlin, P216-224.

Klöcking H. (1994) Humic Substances in the Global Environment and Implication on Human Health Edited by N. Senesi and T.M. Miano: P1337-1340.

Klöcking R. (1994) Humic substances as potential therapeutics. In: Humic Substances in the Global Environment and Implication on Human Health Edited by N. Senesi and T. M. Miano: P1245-1257.

Klöcking R, Friemel H, Mücke D. (1967) Zur Biochemie der Huminsäuren V. Die Bindung der huminsäuren an Serumproteine *in vivo* (Qualitative und Halbquantitative elektrophoretische Untersuchungen). *Acta Biol Med Ger* **18**: 9-13.

Klöcking R, Helbig B. (1991) Interaction of humic acids and humic acid-like polymers with herpes simplex virus type 1. In: Allard B, Boren H en Grimvall A (eds.), Humic substances en the aquatic and terrestrial environment, Springer, Berlin-Heidelberg-New York: P407-412.

Klöcking R, Helbig B, Drabke P. (1977) Eine verbesserte Methode für die Isolierung wasserlöslicher Huminsäuren und enzymatisch oxydierter o-Diphenolverbindungen. *Pharmazie* **32**: 297.

Klöcking R, Hofmann R, Mücke D. (1968) Tierexperimentelle Untersuchungen zur entzündungshemmenden Wirkung von Humaten. *Arzneim Forsch* **18**: 941-942.

Klöcking R, Sprössig M. (1972) Antiviral properties of humic acids. *Experientia* **28**: 607-608.

Klöcking R, Sprössig M. (1975) Wirkung von Ammoniumhumat auf einige Virus-Zell-Systeme. *Z Allg Mikrobiol* **15**: 25-30.

Klöcking R, Sprössig M, Wutzler P, Thiel KD, Helbig B. (1983) Antiviral wirksame Huminsäuren und huminsäureähnliche Polymere. *Z Physiother* **33**: 95-101.

Klöcking R, Sprössig M, Wutzler P, Thiel KD, Helbig B. (1993) Antiviral wirksame Huminsäuren und huminsäureähnliche Polymere. *Z Physiother* **33**: 95-101.

Knorr M, Gräf W, Klatte OJ. (1963) Über Verfärbungen des Wassers, Huminsäuren und Urochrome. *Arch Hyg Bakteriol* **147**: 180-134.

Kotnik V, Stalc A. (1996) Potential therapeutic indications for synthetic desmuralmyl MDP analogue (LK-409). *Pflugers Arch* **431**: 235-236.

Kovacs JA, Vogel S, Albert JM, Falloon J, Davey RT Jr., Walker RE, Polis MA, Spooner K, Metcalf JA, Baseler M, Fyfe G, Lane HC. (1996) Controlled trial of interleukin 2 infusion in patients infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* **335**: 1350-1356.

Kovarik R. (1988) Über die Anwendung von Präparaten aus Torf, bzw. Huminstoffen bei gynäkologischen Erkrankungen. In: W. Flaig, C. Goecke und W. Kauffels (Hrsg.), Moorthérapie: Grundlagen und Anwendungen, Ueberreuter, Wien-Berlin. P177-197.

Kowalska M, Denys A, Bialek J. (1993) Influence of Tolpa Preparation on the phagocytic activity and bactericidal properties of granulocytes in healthy volunteers. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* **50**: 393-395.

- Kühnert M, Fuchs V, Golbs S. (1982) Chemische Charakterisierung und besondere pharmakologisch-toxikologische Eigenschaften von Huminsäuren. *Arch Exp Veterinaermed* **36**: 169-177.
- Kühnert M, Fuchs V, Golbs S. (1989) Pharmakologisch-toxikologische Eigenschaften von Huminsäuren und ihre Wirkungsprofile für eine veterinärmedizinische Therapie. *Dtsch tierärztl Wschr* **96**: 1-44.
- Kühnert M, Golbs S, en Fuchs V. (1980) Zur Anwendung von Huminsäuren in Therapie und Metaphylaxe bei Enteritis des Kalbes. *Monatsh Veterinaermed* **35**: 144-146.
- Lange N, Golbs S, Kühnert M. (1987) Grundlagenuntersuchungen zu immunologischen Reaktionen an der Laboratoriumsratte unter dem Einfluss von Huminsäuren. *Arch Exp Veterinaermed* **41**: 140-146.
- Lange N, Golbs S, Kühnert M, Herrmann G. (1985) Beeinflussung ausgewählter Parameter der Laboratoriumsratte unter Einwirkung von Pestiziden und Huminsäuren. *Z gesamt Hyg Grenzgeb.* **31**: 550-551.
- Lange N, Faqi AS, Kühnert M, Haase A, Höke H, Seubert B. (1996a) Untersuchungen zum Einfluss eines niedermolekularen synthetischen Huminstoffes auf die prä- und postnatale Entwicklung bei Ratten. *Dtsch tierärztl Wschr* **103**: 6-9.
- Lange N, Kühnert M, Haase A, Höke H, Seubert B. (1996b) Untersuchungen zum Resorptionsverhalten eines niedermolekularen synthetischen Huminstoffes nach einmaliger oraler Applikation an der Ratte. *Dtsch tierärztl Wschr* **103**: 134-135.
- Lee YS, Bartlet RJ. (1976) Stimulation of plant growth by humic substances. *J Soil Sci Soc Am* **40**: 876-879.

- Lent W. (1988) Bericht über die Moorforschung und –anwendung in der DDR, Polen, Tschechoslowakei und UdSSR. In: W. Flaig, C. Goecke und W. Kauffels (Hrsg.), Moorthérapie: Grundlagen und Anwendungen, Ueberreuter, Wien-Berlin. P169-176.
- Liou HC, Baltimor D. (1993) Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system. *Curr Opin Cell Biol* **5**: 477-487.
- Lopez-Fernandez MF, Blanco-Lopes MJ, Castineira MP, Batlle J. (1992) Further evidence for recessive inheritance of von Willebrand disease with abnormal binding of von Willebrand factor to factor VIII. *Am J Hematol* **40**: 20-27.
- Losso MH, Belloso WH, Emery S, Benetucci JA, Cahn PE, Lasala MC, Lopardo G, Salomon H, Saracco M, Nelson E, Law MG, Davey RT, Allende MC, Lane HC. (2000) A randomized, controlled, Phase II trial comparing escalating doses of subcutaneous interleukin 2 antiretrovirals versus antiretrovirals alone in human immunodeficiency virus-infected patients with CD4⁺ cell counts ≥ 350 /mm³. *J Infect Dis* **181**: 1614-1621.
- Lotmar R. (1960) Hyaluronidase hemmung durch Phenylbutazon, Prednisolon, Adrenalin und natürliche Moorsubstanz. *Z Rheumaforsch* **19**: 1-10.
- Lu FJ, Yamamura Y, Yamauchi H. (1988) Studies on fluorescent compounds in water of a well in Blackfoot disease endemic areas in Taiwan: Humic substances. *J Formosan Med Assoc* **87**: 66-71.
- Macias W. (1984) Effect of humic acid on tomato mosaic virus. *Zesz Probl Postepow Nauk Roln.* **298**: 143-159.
- Madej JA, Kuryszko J, Garbulinski T. (1993) The influence of long-term administration of Tolpa Peat Preparation on immune reactivity in mice. I. Morphological changes in the thymus. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug research* **50**: 397-404.

Maibach HI, Stoughton RB. (1973) Topical corticosteroids. *Med Clin North Am* **57**: 1253-1264.

Malik KA, Azam F. (1985) Effect of humic acid on wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling growth. *Envir Exp Bot* **25**: 245-252.

Mao J, Hu W, Schmidt-Rohr K, Davies G, Ghabbour EA, Xing B. (1998) Structure and elemental composition of humic acids: Comparison of solid-state ¹³C NMR calculations and chemical analyses. *In: Humic substances: Davies G, Ghabbour EA (eds.) Structures, properties and uses, Proc. 2nd Humic Substances Seminar, Northeastern University, Boston, Massachusetts: P79-90.*

Marx G, Heumann KG. (1999) Mass-spectrometric investigation of the kinetic stability of chromium and copper complexes with humic substances by isotope-labelling experiments. *Fresenius' J Anal Chem* **364 (5)**: 489-494.

Mathies H, Lutz D. (1960) Zur hyaluronidase-hemmende Wirksamkeit von Salicylsäure und Huminsäuren bei Applikation durch Bäder. *Arzneim Forsch* **10**: 689-690.

McFadden ER. (1998) Inhaled glucocorticoids and acute asthma: therapeutic breakthrough on non-specific effect?. *Am J Resp Crit Care Med* **157**: 677-678.

Meleżyńska-Matej M, Grzybek-Hryncewics K, Kotla-REK-Haus S, Kaiser A. (1981) Studies on phagocytosis in leukaemia. III. Phagocytosis inhibiting factor in sera of leukaemic patients. *Folia Haematol* **108**: 559-562.

Metz SA. (1981) Anti-inflammatory agents as inhibitors of prostaglandin synthesis in man. *Med Clin North Am* **65**: 713-757.

Meyaard L, Schuitemaker H, Miedema F. (1993) T-cell dysfunction in HIV infection: energy due to defective antigen-presenting cell function? *Immunology Today* **14** (4): 161-164.

Miehlke K, Thürigen G. (1961) Die wirkung von Salhuminbädern auf humorale Faktoren. *Z Rheumaforsch* **20**: 39-43.

Miller MJ. (1980) Use of levamisole in parasitic infections. *Drugs* **19**: 122-130.

Mosman TR. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 37-64,

Mosman TR, Coffman RL. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7**: 145-173.

Mosman TR, Sad S. (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th₁, Th₂ and more. *Immunol Today* **17**: 138-146.

Motohisa S, Yoshinori H, Shuzo K. (1973) Humic acids for treatment of skin disorders, In: C.A. 80 (1974), p. 283 # 100222u., Patent Japan. Kokai 7392, 524.

Mukherjee G, Rasmusson B, Linner JG, Quinn MT, Parkos CA, Magnusson KE, Jesaitis AJ. (1998) Organization and mobility of CD11b/CD18 and targeting of superoxide on the surface of degranulated human neutrophils. *Arch Biochem Biophys* **357**: 164-172.

Müller-Wegener U. (1982) Wechselwirkungen von Huminstoffe mit Aminosäuren. *Z Pflanz-Boden* **145**: 411-420.

Munteanu N. (1937) Über das Vorkommen östrogenen Wirkstoffe in therapeutischen Mooren. *Dtsch Med Wochenschr* **63**: 96-105.

- Nelson SR, Dick AR. (1975) Steroids in the treatment of brain edema. *In: Steroid Therapy.* (Azarnoff DL, ed.) WB Saunders Co., Philadelphia: P313-324.
- Neyts R, Snoeck P, Wutzler M, Cushman R, Klöcking R, Helbig B, Wang P, De Clercq E. (1992) *Antiviral Chem Chemother* **3**: 215-222.
- Nielsen KL, Lynch JP, Weiss HN. (1997) Fractal geometry of bean root systems: correlations between spatial and fractal dimension. *Am J Bot* **84(1)**: 26-33.
- Nifantéva TI, Shkinev VM, Spivakov BY, Burba P. (1999) Membrane filtration studies of aquatic humic substances and their metal species: a concise overview. Part 2. Evaluation of conditional stability constants by using ultrafiltration. *Talanta* **48**: 257-267.
- Obenaus R, Friemel H en Mücke D. (1965a) Zur Biochemie der Huminsäuren III. Die Bindung von Huminsäuren an Serumproteine *in vitro* (Papieroelektrophoretische Untersuchungen). *Acta Biol Med German* **15**: 9-13.
- Obenaus R, Friemel H, Mücke D. (1965b) Zur Biochemie der Huminsäuren IV. Die Bindung von Huminsäuren an Serumproteine *in vitro* (ein- und zweidimensionale agarelektrophoretische Untersuchungen). *Acta Biol Med German* **15**: 14-19.
- Obmińska-Domoradzka B. (1993) Restoration of cyclophosphamide-suppressed primary immune response in mice by Tolpa Peat Preparation (TPP) – comparison with calf thymus extract. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* **50**: 502-506.
- Obmińska-Domoradzka B, Dębowy J, Garbuliński T. (1993) The influence of long-term administration of Tolpa Peat Preparation on immune reactivity in mice. III. The effect on primary humoral response to sheep erythrocytes. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* **50**: 491-496.

O'Garra A. (1998) Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* **8**: 275-283.

Pagel H. (1960) Ueber den Einfluss von Humusstoffen auf das Pflanzenwachstum I. Einfluss von Humusstoffen auf Ertrag und Nährstoffaufnahme. *Albrecht-Thaer-Archiv* **4**: 492-506.

Pálfi G, Stecker O, Gubicza A. (1976) A biological activity, Bactericidal effect and structure of a medicinal effect and structure of a medicinal peat-bog mud (at Héviz). *Acta Biol Szeged* **22**: 57-71.

Parant M, Chedid L. (1985) Stimulation of non-specific resistance to infections by synthetic immunoregulatory agents. *Infection* **13**: 251-255.

Peakman M, Vergani D. (1997) Cellular immune responses: T lymphocytes, antigen presentation and natural killers. *In: Basic and Clinical Immunology*. Churchill Livingstone – New York. P80-109.

Peers SH, Flower RJ. (1990) The role of lipocortin in corticosteroid actions. *Am Rev Respir Dis* **141**: S18-S21.

Prescott SM. (1999) A thematic series on kinases and phosphatases that regulate lipid signaling. *J Biol Chem* **274(13)**: 8345-8346.

Priegnitz H. (1986) *Wasserkur und Badelust*, Koehler und Amelang, Leipzig.

Prosen H, Zupancic-Krajc L. (2000) The interaction of triazine herbicides with humic acids. *Chromatographia*, **51(Suppl.)**: S155-S164.

Pross HF, Jondal M. (1975) Cytotoxic lymphocytes from normal donors. A functional marker of human non-T lymphocytes. *Clin Exp Immunol* **21**: 226-230.

Rabinovitch PS, June CH. (1990) Intracellular ionized calcium, membrane potential and pH. *In: Flow cytometry: A clinical approach.* Ormerod MG, ed. IRL Press, Oxford University Press: P161-185.

Rausa R. (1994) Humic acids from coal. Production, characterization and utilization. *In: Senesi N, Miano TM. eds. Humic substances in the global environment and implications on human health: proceedings of the 6th international meeting of the International Humic Substances Society, Monopoli, Italy, September 20-25, 1992.* Elsevier: Amsterdam.

Rauthan BS, Schnitzer M. (1981) Effects of a soil fulvic acid on the growth and nutrient content of cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Plant and Soil* **63**: 491-495.

Re A, Gualtierotti R. (1964) Wirkung eines Moorextraktes auf das endokrine System. *Dtsch Med J* **15**: 838-842.

Reichert B. (1965) Neuere Erkenntnisse auf dem Gebiet salicylierter Humussäuren. *Arzneim Forsch* **15**: 457-458.

Reichert B. (1966) Huminsäuren und ihre Derivate in der modernen Therapie. *Dtsch Apoth* **18**: 658-687.

Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH. (2000) Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunology Today* **21**: 475-478.

Renoux G. (1980) The general immunopharmacology of levamisole. *Drugs* **19**: 89-99.

Riede N, Zeck-Kapp, Freudenberg N, Keller HU, Seubert B. (1991) Humate-induced activation of human granulocytes. *Virchows Archiv B Cell Pathol* **60**: 27-34.

Rojs OZ, Cerne M, Mrzel J, Urleb U, Muraoka S. (2000) Immunostimulatory effects of the muramyl dipeptide analogue LK415 in chickens immunized with a vaccine strain of infectious bursal disease virus. *Acta Vet Hung* **48**: 237-248.

Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM. (1986) A new approach to the therapy of cancer based on the systemic administration of autologous lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin 2. *Surgery* **100**: 262-271.

Rossi AG, Cousin JM, Dransfield I, Lawson MF, Chilvers ER, Haslett C. (1995). Agents that elevate cAMP inhibit human neutrophil apoptosis. *Biochim Biophys Res Comm* **217(3)**: 892-899.

Ruchaud-Sparagano MH, Walker TR, Rossi AG, Haslett C, Dransfield I. (2000). Soluble E-selectin acts in synergy with platelet-activating factor to activate neutrophil beta 2-integrins. Role of tyrosine kinases and Ca²⁺ mobilization. *J Biol Chem* **275(21)**: 15758-15764.

Salz G. (1974) Salhumin-Gel, ein Lokaltherapeutikum mit hyperämischer, entzündungshemmender und analgetischer Wirkung. *Med Monatsschr* **28**: 548-550.

Samson G, Visser SA. (1989) Surface-active effects of humic acids on potato cell membrane properties. *Soil Biol Biochem* **21**: 343-347.

Sato T, Ose Y, Nagase H. (1986) Desmutagenic effect of humic acid. *Mutation Research* **162**: 173-178.

Schierbaum L. (1966) Tierexperimenteller Beitrag zur Frage der Beziehungen zwischen Urochrome im Trinkwasser und endemischem Kropf. *Arch Hyg Bakteriol* **150**: 215-231.

Schiller F, Klöcking R, Wutzler P, Färber I. (1979) Ergebnisse einer orientierenden klinischen Prüfung von Ammoniumhumat zur Lokalbehandlung von Herpesvirus-hominis-(HVH)-Infektionen. *Dermatol Monatsschr* **165**: 505-509.

Schindler JE, Williams DJ, Zimmerman AP. (1976) Investigation of extracellular electron transport by humic acids, In: Environmental Biogeochemistry, Vol. 1, Edit. J.O. Nriagu, Ann Arbor Science, Ann Arbor. P109-115.

Schleimer RP. (1989) Glucocorticosteroids: their mechanisms of action and use in allergic diseases. In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, eds. *Allergy principles and practice*, vol 1, 3rd ed. St Louis: CV Mosby: P739-765.

Schleimer RP. (1990) Effects of glucocorticosteroids on inflammatory cells relevant to their therapeutic applications in asthma. *Am Rev Respir Dis* **141**: S59-S69.

Schlepper G. (1960) Betrachtungen zur Frage des Übereinstimmung experimenteller Ergebnisse mit klinischen Resultaten bei Superacidität. *Med Klin* **55**: 263-266.

Schmid J. (1953) Zum Wirkungsmechanismus der Huminsäurebäder. *Med Klin* **48**: 849-853.

Schmutzler W, Bent ST, Dräger A, Zwadlo-Klarwasser G. (1989) Pharmacological and therapeutic aspects of immunomodulators. *Allergologie* **12**: 198-203.

Schneider J, Weis R, Männer C, Kary B, Werner A, Seubert BJ, Riede U. (1996) Inhibition of HIV-1 in cell culture by synthetic humate analogues derived from hydroquinone: mechanism of inhibition. *Virolog*, **218**: 389-395.

Schols D, Wutzler P, Klöcking R, Helbig B, De Clercq E. (1991) Selective inhibitory activity of polyhydroxycarboxylates derived from phenolic compounds against human immunodeficiency virus replication. *J Acq Immun Defic Synd* **4(7)**: 677-685.

Schultz H. (1962) Beobachtungn über die Wirkung der Huminsäuren im Torfmull auf das Virus der Maul – und Klauenseuche. *Dtsch Tieraerztl Wochenschr* **72**: 270-271.

Schulze M, Wilkes H, Vereecken H. (1999) Direct determination of hydrophobic organic compounds in aqueous solution in the presence of dissolved organic carbon by high performance liquid chromatography. *Chemosphere* **39(13)**: 2365-2374.

Schwyzler R, Sieber P. (1963) Total synthesis of adrenocorticotropic hormone. *Nature* **199**: 172-1174.

Seleye H. (1951) Das allgemeine Adaptationssyndrom als Grundlage für eine einheitliche Theorie der Medizin. *Dtsch Med Wochenschr* **76**: 965-967.

Shearer GM, Clerici M. (1998) Cytokine profiles in HIV type 1 disease and protection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**: S149-S152.

Skopińska-Różewska E, Brajczewska-Fischer W, Żukowska M, Malkowska-Zwierz W, Polakowski I, Pazdur J, Radomska D, Mościcka M, Sokolnicka I, Kolewska D, Marczak M, Morawska I, Nowakowska E, Rzadkowska-Bodalska H, Olechnowics-Stępień W. (1991) Immunomodulujące działanie Preparatu Torfowego Tolpy (PTT). *Reumatologia* **29**: 162-171.

Sladky Z, Tichy V. (1959) Application of humus substances to overground organs of plants. *Biol Plant* **1**: 9-15.

Sladky Z. (1959a) The effect of extracted humus substances on growth of tomato plants. *Biol Plant* **1**: 142-150.

Sladky Z. (1959b) The application of extracted humus substances to overground parts of plants. *Biol Plant (Praha)* **1(3)**: 199-204.

- Snyman JR, Dekker J, Malfeld SCK, Van Rensburg CEJ. A pilot study to evaluate the safety and therapeutic efficacy of topical oxifulvic acid in atopic volunteers. *Drug Development Res* (in druk)
- Solovyeva VP, Lotosh TD, Sotnikova EP. (1983) Experimental substantiation for the usage of peat humic acid complex in veterinary practice. In: *Studies about Humus, Trans Int Symp Humus et Planta VIII, Prague, 1*: 159-161.
- Solovyeva VP, Lotosh TD. (1984) Biologically active peat substances body resistance stimulators, *Proc. 7th Int. Peat Congress, Dublin, 4*: 428-434.
- Sommers de K. (2000) *In: Sommers' Pharmacology - First English Edition.* UP Drukkers, Pretoria.
- Sprunt DH, McDearman S, Raper J. (1938) Studies on relationship of sex hormones to infection; effect of estrogenic and gonadotropic hormones on vaccinia and spreading factor. *J Exp Med* **67**: 159-168.
- St Georgiev V. (1988) New synthetic immunomodulating agents. *Trends Pharmacol Sci* **9**: 446-451.
- Stevenson FJ. (1994) Reactive functional groups of humic substances. In *Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions.* Wiley-Interscience, New York.
- Stewart M, Hogg N. (1996) Regulation of leucocyte integrin function: Affinity vs. avidity. *J Cell Biochem* **61**: 554-561,
- Suzuki Y, Nishio K, Takeshita K, Takeuchi O, Watanabe K, Sato N, Naoki K, Kudo H, Aoki T, Yamaguchi K. (2000) Effect of steroid on hyperoxia-induced ICAM-1 expression in pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* **278(2)**: L245-252.

Szeto C, Gillspie KM, Mathieson PW. (2000) Levamisole induces interleukin-18 and shifts type 1/type 2 cytokine balance. *Immunology* **100**: 217-224.

Tan KH, Nogamornbodi V. (1979) Effect of different levels of humic acids on nutrient content and growth of corn (*Zea mays* L.). *Plant Soil* **51**: 283-287.

Taugner G. (1963) Tierexperimentelle Untersuchungen über ein Natriumhuminat-Salicylsäure-Bad. *Arzneim Forsch* **13**: 329-333.

Thiel KD, Helbig B, Klöcking R, Wutzler P, Sprössig M, Schweizer B. (1981) Vergleich der in-vitro-Wirksamkeit von Ammoniumhumat und enzymatisch oxidiertes Chlorogen – und Kaffeesäure gegenüber Herpesvirus hominis Typ 1 und 2. *Pharmacie* **36**: 50-53.

Thiel KD, Klöcking R, Helbig B. (1976) *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt Orig A* **234**: 159-169.

Thiel KD, Klöcking R, Schweizer H, Sprössig M. (1977) Untersuchungen *in vitro* zur antiviralen Aktivität von Ammoniumhumat gegenüber Herpes simplex-Virus Typ 1 und Typ 2. *Zentralbl Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten Hygiene Abt 1*, **239**: 304-321.

Thurman EM, Malcolm RL. (1983) Structural study of humic substances. In: Aquatic and terrestrial humic materials. Christman RF, Gjessing ET (eds). Ann Arbor Science, Ann Arbor, P78-91.

Timonen T, Ortaldo JR, Herberman RB. (1982) Analysis by a single cell cytotoxicity assay of NK cell frequencies among human large granular lymphocytes and of the effects of interferon on their activity. *J Immunol* **128**: 2514-2521.

Tolpa S, Kukla S, Rzadkowska-Bodalska H, Olechnowicz-Stepien W, Czyzewski W, Adamek W, Dec J, Dudek Z, Wrobel-Pieciuk H. (1983) Antineoplastic preparation from the acidified alkaline hydrolyzate from peat. Polish Patent No. P-184 428.

Tseng WP, Chen WY, Sung JL. (1961) A clinical study of blackfoot disease in Taiwan, an endemic peripheral vascular disease. *Mem Coll Med Natl Taiwan Univ* **7**: 1-18.

Turk JL, Parker D. (1982) Effect of cyclophosphamide on immunological control mechanisms. *Immunol Rev* **65**: 99-113.

Van Beneden G. (1971) Les matières organiques dans les eaux et les agents de balnéothérapie, *Presse Therm Clim* **108**: 195-204.

Van de Venter HA, Furter M, Dekker J en Cronjé IJ. (1991) Stimulation of seedling growth by coal-derived sodium humate. *Plant and Soil* **138**: 17-21.

Van der Watt H.v.H, Barnard RO, Cronje IJ, Dekker J, Croft GJB, van der Walt MM. (1991a) Amelioration of subsoil acidity by application of a coal-derived calcium fulvate to the soil surface. *Nature* **350**: 146-148.

Van der Watt H.v.H, Dekker J, Barnard RO, Cronje IJ. (1991b) Improved plant microelement availability. S.Afr. Patent Application 91/1098, registered in the name of the National Energy Council, as well as corresponding foreign patent applications.

Van Rensburg CEJ, Dekker J, Weis R, Smith T-L, Janse van Rensburg E. Schneider J. (2001) Investigation of the Anti-HIV Properties of Oxihumate. *Chemotherapy* **48**: 138-143.

Van Rensburg CEJ, Malfeld SCK, Dekker J. (2001) Topical application of oxifulvic acid suppresses the cutaneous immune response in mice. *Drug Development Res* **53**: 29-32.

Van Rensburg CEJ, van Straten A, Dekker J. (2000) An *in vitro* investigation of the activity of oxifulvic acid. *J Antimicrob Chemother* **46**: 853-854.

Vane JR. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature (New Biol)* **231**: 232-237.

Varshney TN, Gaur AC. (1974) Effect of spraying sodium humate and hydroquinone on *Glycine max* var. Bragg and *Solanum lycopersicum* var. Heinz 1370. *Curr Sci* **43**: 95-96.

Vasterling HW. (1958) Die Hyaluronidaseinhibition während des Cyclus und in der Gravidität. *Klin Wochenschr* **36**: 489-491.

Vaughan D, Linehan DJ. (1976) The growth of wheat plants in humic acid solutions under axenic conditions. *Plant and Soil* **44**: 445-449.

Vaughan D, Malcolm RE. (1985) Influence of humic substances on growth and physiological processes. In: Soil Organic Matter and Biological Activity. Eds. D Vaughan and RE Malcolm: 37-76. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Vaughan D, Malcolm RE, Ord BG. (1985) Influence of humic substances on biochemical processes in plants. In: Soil Organic Matter and Biological Activity. Eds. D Vaughan and RE Malcolm: 77-108. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Visser SA. (1964) Oxidation-reduction potentials and capillary activities of humic acids. *Nature* (London) **204**: 581-586.

Visser SA. (1973) Some biological effects of humic acids in the rat. *Acta Biol Med Germ* **31(4)**: 569-581.

Visser SA. (1982) Surface active phenomena by humic substances of aquatic origin. *Rev Fr Sci Eau* **1**: 285-295.

Visser SA. (1986) Effects of humic substances on plant growth. In: Humic Substances, Effect on Soil and Plants, Reda, Rome: P89-135.

- Visser SA. (1987) Effect of humic substances on mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. *Sci Total Environ.* **62**: 347-354.
- Visser SA. (1988) Effects of humic substances on higher animals and man; the possible use of humic compounds in medical treatments. Presented at the International Humic Substance Society meeting, Sevilla, Spain.
- Voet C, Voet JC. (1995) *In: Biochemistry.* 2nd edition. John Wiley & Sons, Inc.: 2-28.
- Wagner H. (1990) Search for plant derived natural products with immunostimulatory activity (recent advances). *Pure Appl Chem* **62**: 1217-1222.
- Wall AJ. (1973) The use of glucocorticoids in intestinal disease. *Med Clin North Am.* **57**: 1241-1252.
- Wattenberg LW, Glick D. (1949) Mucolytic enzyme systems; effects of tissue extracts and body fluids, certain steroids, and hemoglobin derivatives on hyaluronidase activity. *J Biol Chem* **179**: 1213-1228.
- Wehefritz E, Gierhake E. (1933) Untersuchungen über das Pyrmonter Moor (Ein Beitrag zur Frage der Moorbadwirkung). *Arch Gynaekol* **154**: 384-389.
- Weiss SJ. (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* **320**: 365-376.
- Weithaler K. (1954) Experimental-klinischer Beitrag zur Anwendung von Kationenaustauschern bei Hyperazidität. *Medizinische* **17**: 625-628.
- Wender I, Heredy LA, Neuworth MB, Dryden IG. (1981) in *Chemistry of Coal Utilization*, Second supplementary volume, ed. M.A. Elliot. Wiley, New York: P455.
- Witko-Sarsat V, Cramer EM, Hieblot C, Guichard J, Nusbaum P, Lopez S, Lesavr P, Halbwachs-Mecarelli L. (1999) Presence of proteinase 3 in secretory vesicles: evidence of

- a novel, highly mobilizable intracellular pool distinct from azurophil granules. *Blood* **97(7)**: 2487-2496.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. (2000) Biology of Disease. Neutrophils: Molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* **80(5)**: 617-653.
- Woelki G, Friedrich S, Hanschmann G, Salzer R. (1997) HPLC fractionation and structural dynamics of humic acids. *Fresenius' J Anal Chem* **357 (5)**: 548-552.
- Wolfe F, Catney MA, Hawley DJ, Balsler JP, Schnidler JD. (1987) Clinical trial with R-IFN-gamma in rheumatoid arthritis. In: Pincus SH, Pisetsky DS, Rosenwasser LJ, eds. *Biologically based immunomodulators in the therapy of rheumatic diseases*. New York: Elsevier.
- Woodward RL. (1963) Review of the relation of water quality and simple goiter. *Am Water Works Assoc J* **55**: 887-896.
- Wurmbach H, Biwer A, Buckoteeg W, Thiele H. (1962) Schilddrüsenveränderungen und Kropfbildung durch antithyreoidale Substanzen, besonders durch Abwässer und Urochrome. Min. Ernährung, Landwirtschaft und Forsten Nordrhein-Westfalen: P1-58.
- Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. (1994) Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **269**: 4705-4708.
- Yang H, Chiu H, Lu F. (1996) Effects of humic acid on the viability and coagulant properties of human umbilical vein endothelial cells. *Am J Hematology* **51**: 200-206.
- Yount WJ, Utsinger PD, Puritz EM, Ortals DW. (1973) Corticosteroid therapy of the collagen vascular disorders. *Med Clin North Am* **57**: 1343-1355.

Zbigniew BAJ, Zeman K, Sulowska Z, Majewska E, Pokoca L, Kocur E, Kantorski J, Fornalczyk E, Banasik M, Tchorzewski H. (1993) Effect of tolpa peat preparation on some immune parameters in healthy volunteers. Preliminary data. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Res* **50**: 481-489.

Zhai Y, Ghobrial RM, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. (1999) TH₁ and TH₂ cytokines in organ transplantation: paradigm lost? *Crit J Rev Immun* **19** (2): 155-172.

Ziechmann W. (1980) Huminstoffe. Verlag Chemie, Weinheim-Deerfield Beach, Florida.

Ziechmann W. (1988) Evolution of structural models from consideration of physical and chemical properties. In: Frimmel FH, Christman RF (eds) Humic substances and their role in the environment. Wiley & Sons, New York, P113-132.

Ziechmann W. (1993) Humic substances: B1 Wissenschaftsverlag, Mannheim.

Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. (1992) Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signalling molecules. *Immunol Today* **13**: 93-99.

Zsindely A, Hofmann R, Klöcking R. (1971) Über den Einfluss oral applizierter Huminsäuren auf den Nukleinsäurestoffwechsel von Ascitis-tumorzellen bei Mäusen. *Acta Bio Debrecina* **9**: 71-77.