

HOOFSTUK 7

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

7.1. Doelwitte

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

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

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

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

7.2. Media en Reagense

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

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

7.2.2. Fetale kalfserum gesupplementeerde RPMI 1640 medium

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

445 ml RPMI 1640 medium

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

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

7.2.3. Fosfaat gebufferde sout-oplossing (FBS)

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

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

7.2.4. Hitte-geïnaktiveerde fetale kalf serum

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

7.2.5. Kanker sellyne

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

7.2.6. K⁺-vrye Tris-buffer

Die volgende reagense is in 2 liter gedeïoniseerde water opgelos:

4.80 g Tris-buffer (Sigma Chemical Company)

1.80 g Glukose (BDH Laboratory Reagents)

12.0 g NaCl (Hopro Analytics (Pty) Ltd)

0.50 g MgSO₄ (BDH Laboratory Reagents)

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

7.2.7. 2 M NaOH-oplossing

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

7.2.8. Ouabain-oplossing

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

7.2.9. Telvloestof

Die volgende reagense is in 100 ml gedeïoniseerde water opgelos:

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

2 ml asynsuur (Holpro Analytics Ltd)

7.2.10. Tiazool oranje-oplossing

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

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

Die volgende reagense is in 50 ml gedeïoniseerde water opgelos:

1.0 ml Triton X-100 (Sigma Chemical Company)

2.5 ml 2 M NaOH-oplossing

7.2.12. Vinblastien oplossing

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

7.2.13. [^3H]Vinblastien/koue (nie radio-aktief) vinblastien-mengsel

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

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

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

7.3. Metodes

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

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

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

sellyne groei as drywende aggregate in 75 cm² weefselkultuur flesse. Die medium waarin die selle groei is weekliks met vars medium vervang. Die geneesmiddelweerstandbiedende selle, H69/LX4, is 48 uur voor gebruik in alle eksperimente, uit die doksorubisien-bevattende RPMI 1640 medium verwyder en in FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium, sonder doksorubisien, gevoeg.

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

Die weefselkultuur selle (H69/P of H69/LX4) is steriel vanuit 'n 75 cm² weefselkultuur fles in 'n 15 ml polistireen proefbuis oorgegooi en vir 10 minute teen 200 g (1000 rpm) gesentrifugeer. Die boonste medium is versigtig afgegooi en die selle is weereens met FKS gesupplementeerde RPMI 1640 medium gewas. Na die laaste wasstap is die onderste sel-konsentraat in 1-2 ml van die buffer of medium wat in die eksperiment gebruik is, hersuspendeer. Die sel-aggregate is tot 'n enkel selsuspensie opgebreek, deur dit herhalend met 'n steriele plastiese pasteurpipet op te suig. Die sel-suspensie is hierna tot die verlangde selkonsentrasie in die verlangde medium of buffer verdun.

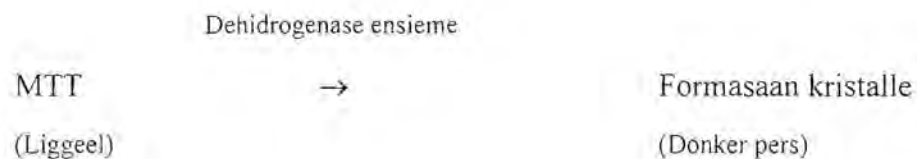
7.3.2. Direkte sitotoksiese aktiwiteit van vinblastien en ouabain sowel as die MDR omkerings-aktiwiteit van ouabain

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

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

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

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



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

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

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

Die mikrotiter plaat is vir 7 dae by 37 °C in 'n 5% CO₂-atmosfeer geïnkubeer, waarna 20 μ l van 'n 5 mg/ml MTT-oplossing by elke putjies gevoeg is. Die plaat is vir 'n verdere 4 uur by 37 °C geïnkubeer. Die mikrotiter plate is na inkubasie met MTT vir 10 minute teen 850 g (2000 rpm) gesentrifugeer. Die medium in elke putjie is versigtig verwyder, sonder om die donker pers selkonsentraat onder in die putjies te versteur. Honderd-en-vyftig mikroliter (150 μ l) FBS is by elke putjie gevoeg en die mikrotiter plate is weer vir 10 minute teen 850 g (2000 rpm) gesentrifugeer. Die wasstap met FBS is nog een keer herhaal. Na die wasstappe met FBS, is die formasaan kristalle opgelos deur 50 μ l DMSO in elke putjie te voeg. Die plate is voortdurend geskud totdat die kristalle volledig in die DMSO opgelos het en die mate van MTT reduksie is spektrofotometries by 'n toets golflengte van 540 nm en 'n verwysings-golflengte van 620 nm, bepaal. Die resultate is as persentasie van kontrole (onbehandelde selle) aangedui.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

7.3.5. Procedure wat gevolg is tydens die vloeisitometrie bepaling van die intrasellulêre akkumulering van die fluoresserende kleurstof, tiazool oranje, in H69/P en H69/LX4 selle sowel as die effek van ouabain daarop

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

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

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

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

7.3.6. Na^+, K^+ -ATPase aktiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle

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

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

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

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

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

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

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

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

Lipofiliese verbindings, soos sianien kleurstowwe, is in die meeste gevalle in staat om vrylik deur die lipiedlaag van die selmembraan te beweeg [Shapiro, 1990]. Die konsentrasie gradient van lipofiliese, kationiese sianien kleurstowwe, soos 3,3'-diheksieloksakarbosianien (DiOC₆(3)), oor die selmembraan, word volgens die Nerst vergelyking bepaal:

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

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

By lae konsentrasies van die 3,3'-diheksieloksakarbosianien kleurstof, DiOC₆(3), sal depolarisasie van selle (dit wil sê 'n afname in die membraan potensiaal) tot die vrystelling van die kleurstof vanuit die selle in die omringende medium lei [Shapiro, 1990]. Die vloeisitometer meet slegs die hoeveelheid kleurstof wat intrasellulêr in elke sel geakkumuleer het. Membraan depolarisasie sal dus as 'n afname in fluoressensie intensiteit deur die vloeisitometer waargeneem word,

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

Soos reeds genoem is 'n groot verskeidenheid verbindings in staat om as substrate vir P-gp op te tree [Gottesman & Pastan, 1993; Lum *et al*, 1993]. Dit is daarom belangrik om daarop te let dat die 3,3-dihexieloksakarbosianien kleurstof, DiOC₆(3), nie as substraat vir P-gp dien nie [Hasmann *et al*, 1989].

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

7.3.7.2.1. Voorbereiding van die vloeisitometer

Die plastiese buise van die vloeisitometer is, buiten die fluoresserende kleurstof wat gebruik is, net soos in 7.3.5.1. voorberei. 'n Vooraf verhitte (37 °C) 50 nM DiOC₆(3)-oplossing is in plaas van die 0.25 µg/ml tiazool oranje oplossing gebruik.

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

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

gewissel. Die selsuspensie is daarna vir 30 minute by 37 °C geïnkubeer. Vier milliliter (4 ml) van 'n vooraf verhitte (37 °C) oplossing van 50 nM DiOC₆(3) in 10% FKS-gesupplementeerde RPMI 1640 medium, is na die inkubasie tydperk by die selsuspensies gevoeg en die selle is vir 'n verdere 15 minute by 37 °C geïnkubeer. Die hoeveelheid DiOC₆(3) kleurstof wat deur die selle opgeneem is, is direk (sonder enige wasstappe) met behulp van die vloeisitometer (Epics, Profile II, Coulter, Miami, Florida, VSA) bepaal. Die verlangde kontroles is in hierdie eksperimente ingesluit. Die resultate is as graad van fluoressensie intensiteit (mediaan kanaan nommer) uitgedruk.

7.3.8. Statistiese bepalings

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

7.4. Resultate

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

Die IK₅₀-waardes dui op die inhiberende konsentrasie van vinblastien wat tot 50% seldoding in die MTT-toetssisteem gelei het. Die IK₅₀-waarde van vinblastien (IK₅₀ = 116.21 ± 7.07 ng/ml) was statisties betekenisvol hoër (P < 0.0001) in die geneesmiddel weerstandbiedende H69/LX4 selle as die IK₅₀ van vinblastien (IK₅₀ = 2.24 ± 1.03 ng/ml) wat vir die geneesmiddel-sensitiewe H69/P selle waargeneem is (Tabel 7.1).

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

Sellyn	IK ₅₀ (vinblastien)
H69/P	2.24 ± 1.03 ng/ml
H69/LX4	116.21 ± 7.07 ^a ng/ml

Vyf tot sewe eksperimente is in duplikaat gedoen.

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

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

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

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

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

Slegs een eksperiment is gedoen.

7.4.3. Na^+, K^+ -ATPase aktiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle

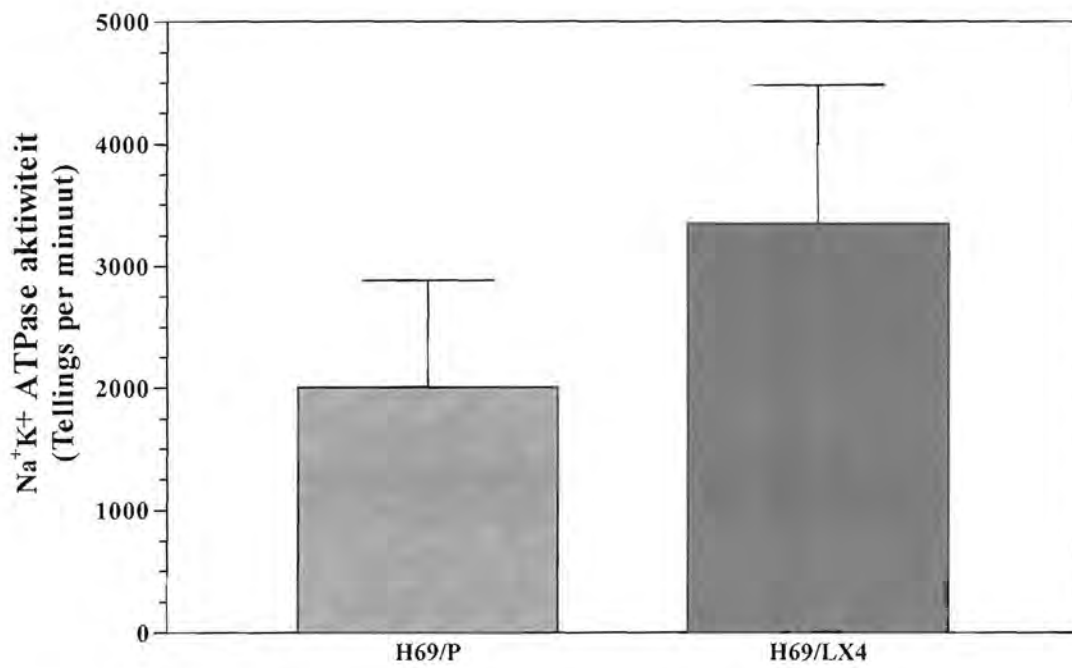
Geen statisties betekenisvolle verskille in Na^+, K^+ -ATPase aktiwiteit is tussen die twee sellyne waargeneem nie (Figuur 7.1). Die resultate is as radio-aktiewe tellings per minuut (tpm) uitgedruk. ^{42}K kalium het teen 2000.0 ± 883.0 tpm in die H69/P selle geakkumuleer, nadat die agtergrond waardes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

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

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

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

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



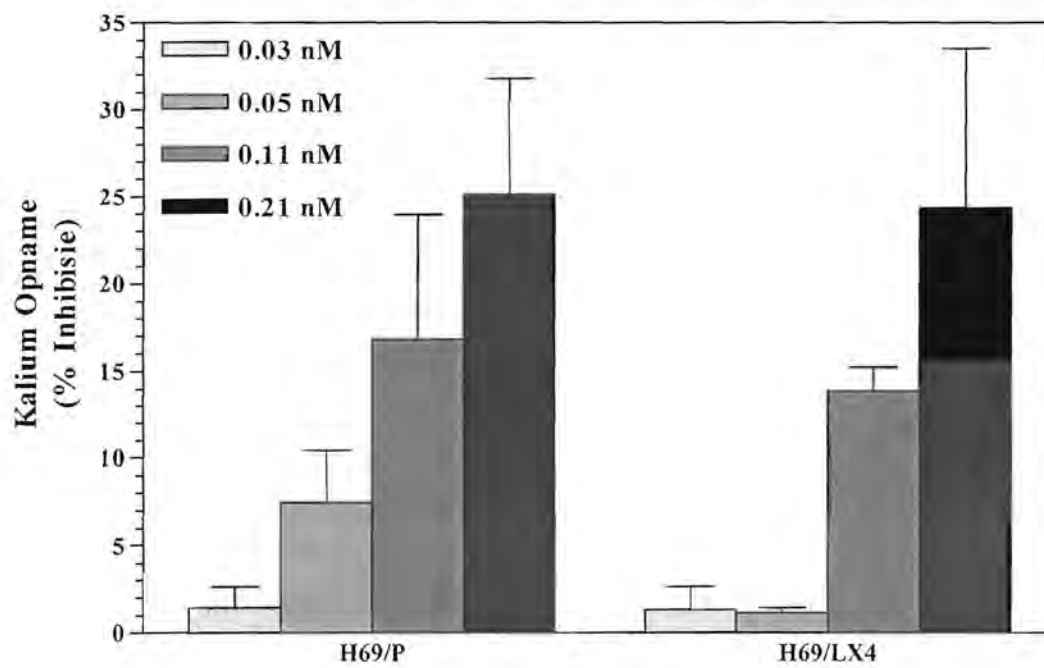
Figuur 7.1: Ouabain inhibeerbare ⁴²kalium opname deur die H69/P sellyn sowel as die H69/LX4 sellyn. Die resultate is as die gemiddelde radio-aktiewe tellings per minuut ± standaardfout, uitgedruk. Vyf eksperimente is gedoen.

Tabel 7.3: Akkumulasie van DiOC₆(3) in onderskeidelik die geneesmiddel-sensitiewe H69/P selle sowel as die veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende H69/LX4 selle

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

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

Vier tot vyf eksperimente is gedoen.



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

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

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

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

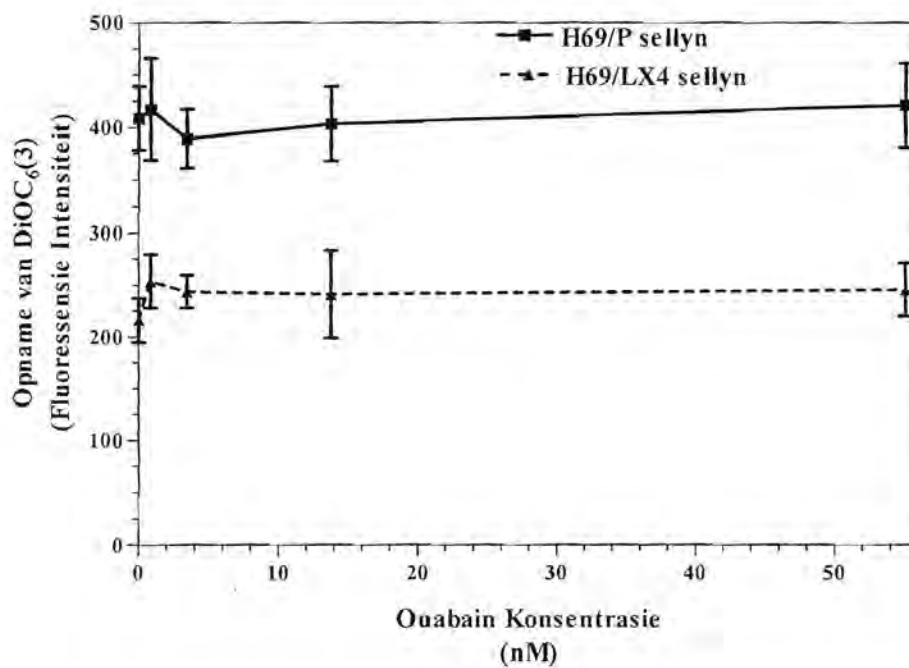
Die H69/LX4 selle was statisties betekenisvol meer weerstandbiedend teenoor die direkte sitotoksiese effekte van ouabain as die H69/P selle (Figuur 7.4). Die p-waardes het gewissel van $p < 0.05$ tot $p < 0.0001$. Die IK_{50} -waarde van ouabain vir die H69/P selle, was 0.008 ± 0.001 nM (Tabel 7.4).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

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

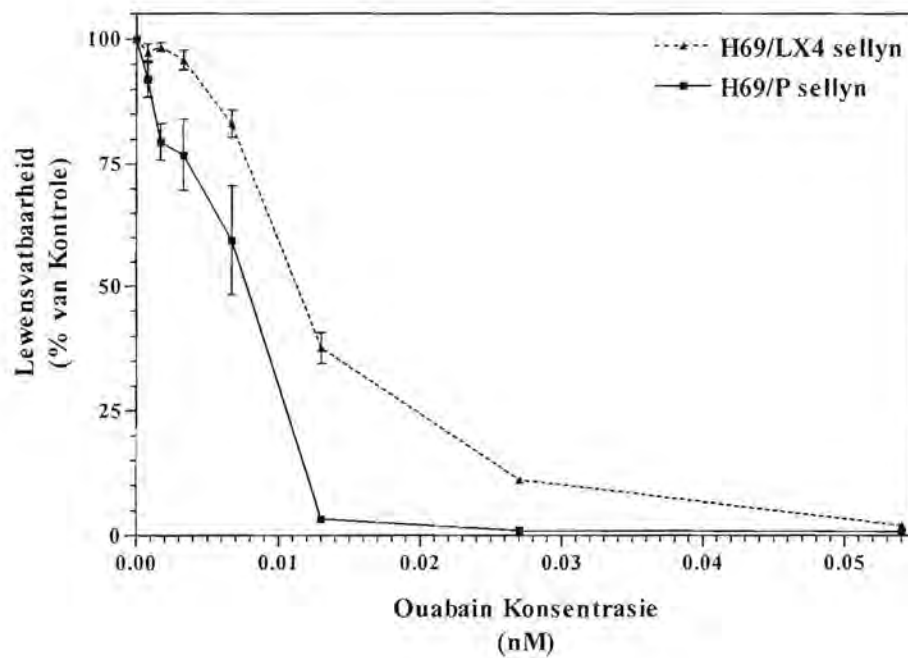
Ouabain het geen betekenisvolle effek op die sensitiwiteit van beide die H69/P selyn sowel as die H69/LX4 selyn vir vinblastien uitgeoefen nie (Figuur 7.5).

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

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



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

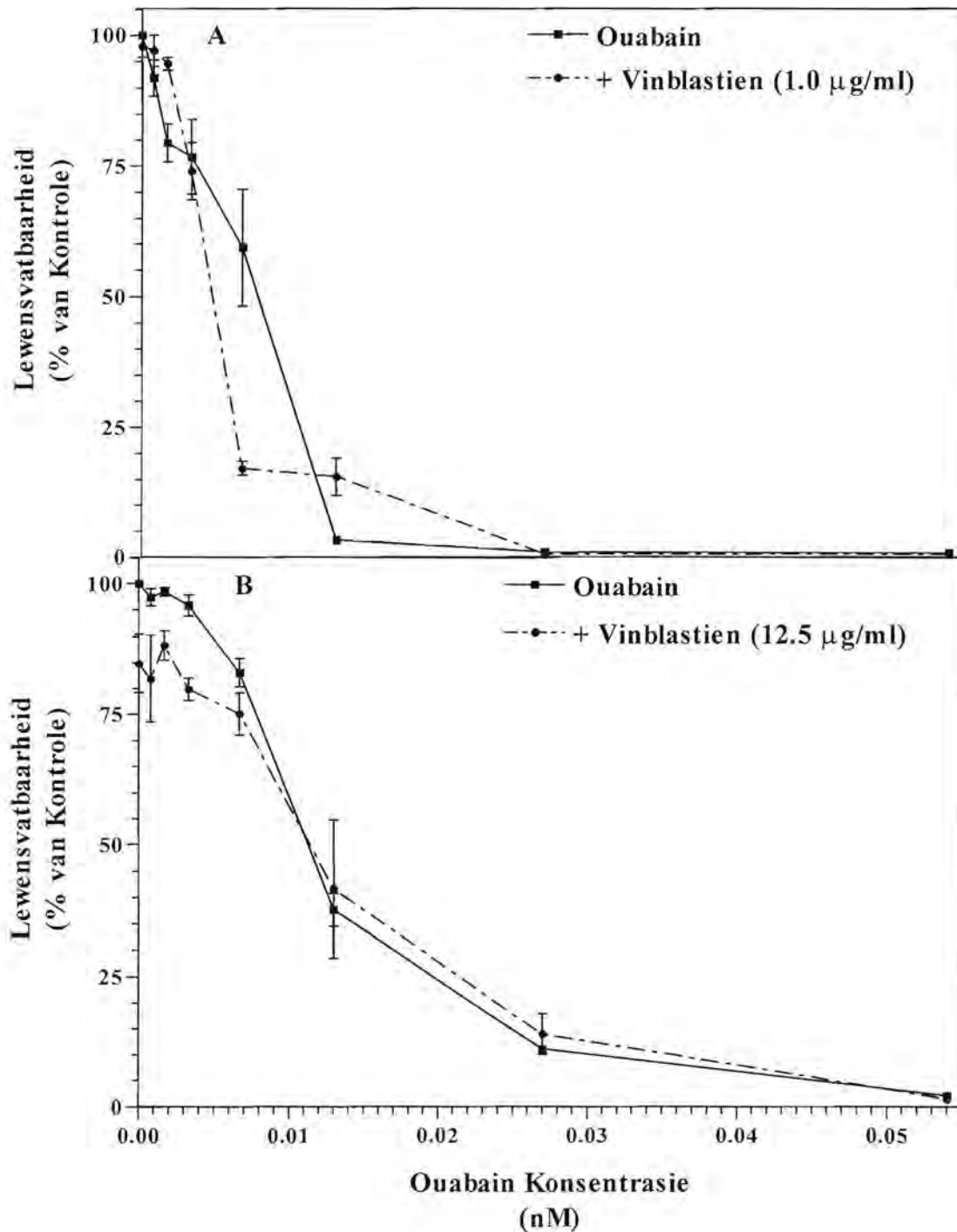


Figuur 7.4: Die direkte sitotoksiese aktiwiteit van die Na^+, K^+ -ATPase inhibeerder, ouabain, in die H69P sellyn sowel as die H69/LX4 sellyn. Vyf tot sewe eksperimente is in duplikaat gedoen. Die resultate is as die % van kontrole (onbehandelde selle) \pm standaardfout, uitgedruk.

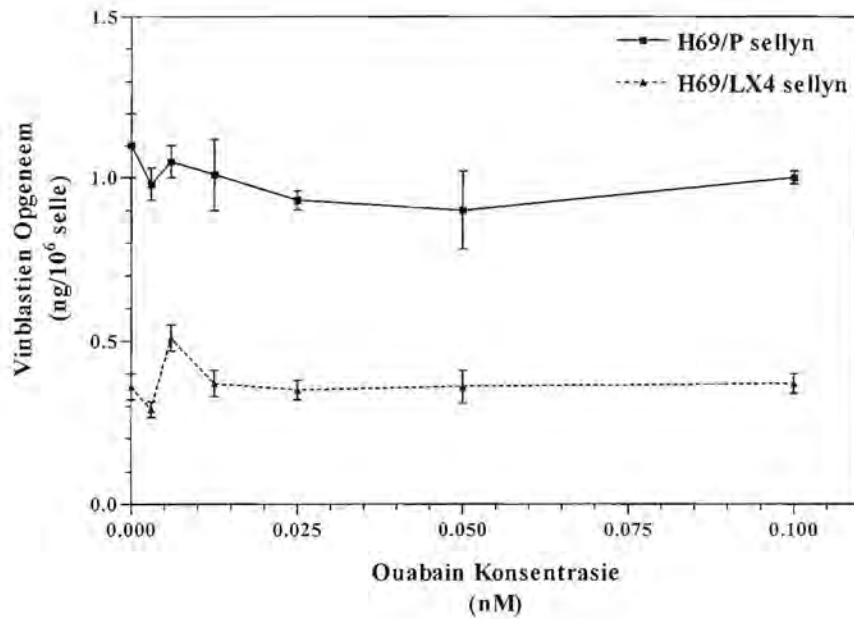
Tabel 7.4: Die inhiberende konsentrasies van ouabain wat, na 'n 7-dae blootstellings tydperk in die MTT-toetsstelsel, tot 50% seldoding van H69/P en H69/LX4 selle gelei het.

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

Vyf tot sewe eksperimente is in duplikaat gedoen.



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



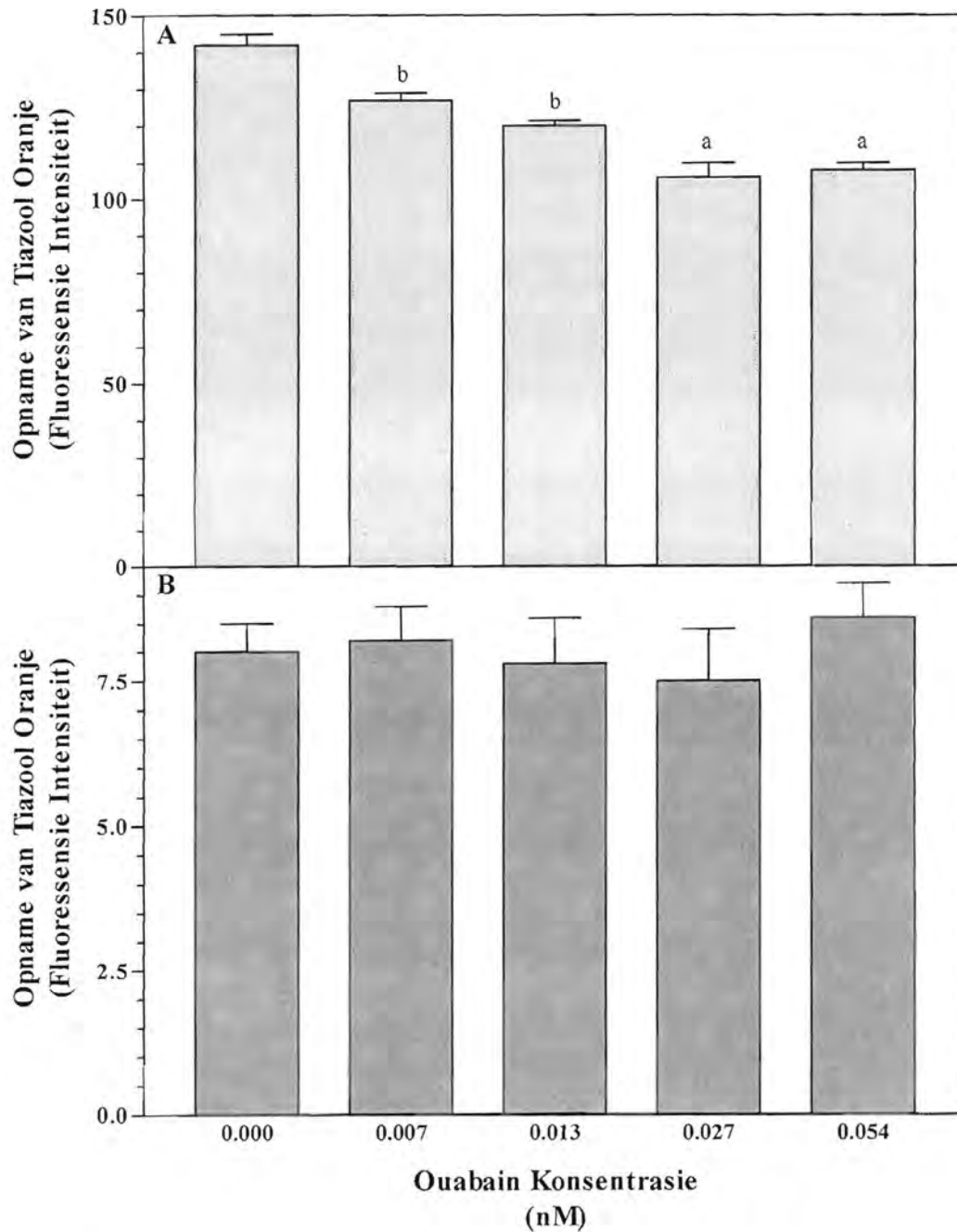
Figuur 7.6: Invloed van die Na⁺,K⁺-ATPase inhibeerder ouabain (0.003 nM - 0.10 nM), op die intrasellulêre akkumulering van [³H]vinblastien in die H69/P sellyn sowel as die H69/LX4 sellyn. Die resultate is as die gemiddelde vinblastien opname (ng/10⁶ selle) ± standaardfout, uitgedruk. Twee eksperimente is gedoen.

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

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

7.4.11. Bespreking

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



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

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

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

HOOFSTUK 8

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

8.1. Doelwitte

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

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

8.2. Media en Reagense

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

8.2.1. Riminofenasien verbindings

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

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

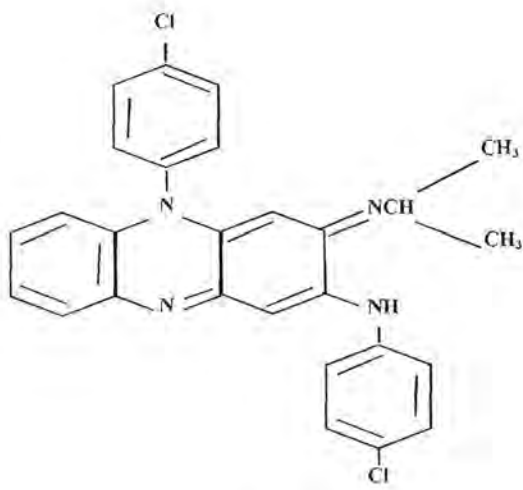
8.3. Metodes

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

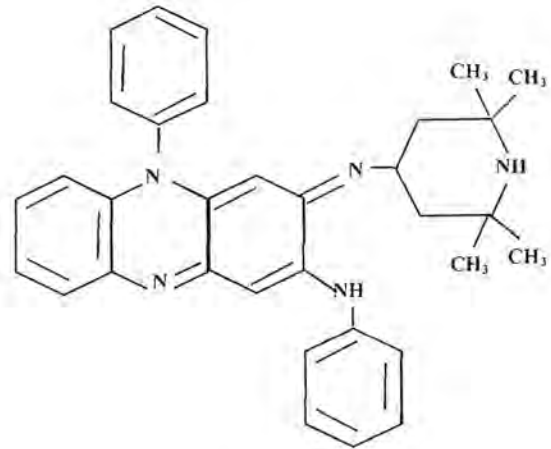
Sien Hoofstuk 7 (7.3.1.1. en 7.3.1.2)

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

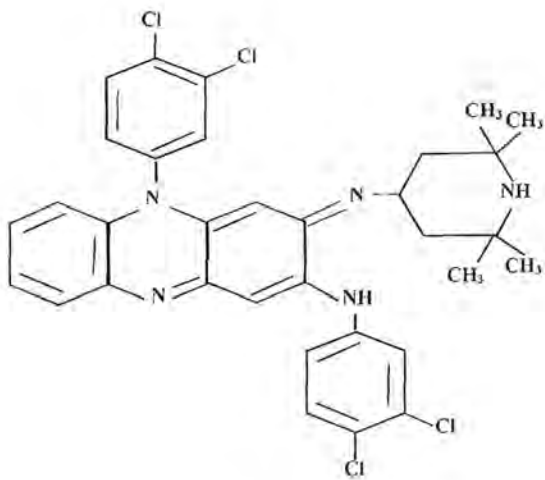
Dieselfde metode wat gebruik is om die direkte sitotoksiese aktiwiteit van ouabain en vinblastien te bepaal, is gebruik om die direkte sitotoksiese aktiwiteit van die riminofenasien verbindings sowel as die MDR-omkerings aktiwiteit daarvan te bepaal. Hierdie metode is volledig in Hoofstuk 7 (7.3.2.) beskryf. Die direkte sitotoksiese aktiwiteit van die riminofenasien verbindings vir die selle is kortliks as volg bepaal: Twintig mikroliter ($20\text{ }\mu\text{l}$) van die verlangde konsentrasie van die riminofenasien verbindings is by honderd mikroliter ($100\text{ }\mu\text{l}$) van 'n selsuspensie (H69/P of H69/LX4), in elke putjie van 'n 96 putjie mikrotiter plaat gevoeg. Die finale konsentrasie van die selsuspensie was 1×10^5 selle/ml. Die volume van elke putjie is, voordat die riminofenasien verbindings bygevoeg is, met gesupplementeerde RPMI 1640 medium to die verlangde volume aangevul. Die finale volume van elke putjie was $200\text{ }\mu\text{l}$. Die verlangde oplosmiddel (etanol) kontroles is ingesluit. Die mikrotiter plaat is vir 7 dae by $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 'n 5% CO_2 -atmosfeer geïnkubeer, waarna $20\text{ }\mu\text{l}$ van 'n



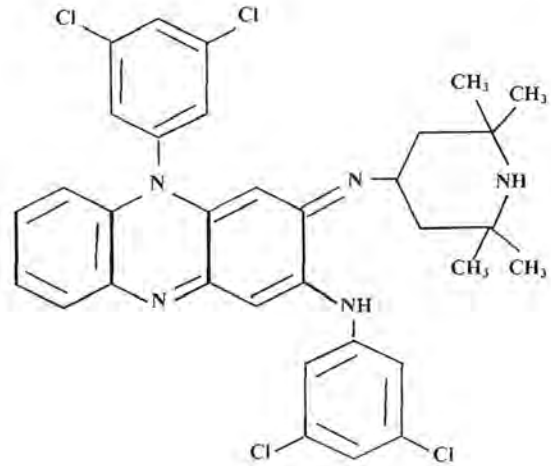
B663



B3962



B4100



B4121

Figuur 8.1: Molekulêre strukture van die eksperimentele riminofenasiën verbindings

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

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

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

Sien Hoofstuk 7 (7.3.4.)

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

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

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

8.3.3.2. Prosedure wat gevolg is tydens die vloeisitometriese bepaling van die invloed van die riminofenasien verbindings op die intrasellulêre akkumulering van die fluoresserende kleurstof, tiazool oranje, in H69/P en H69/LX4 selle

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

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

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

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

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

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

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

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

Sien Hoofstuk 7 (7.3.7.)

Die metode is gevolg soos in Hoofstuk 7 (7.3.7.2.) beskryf is. Kortliks is een 1 ml van die selsuspensies (H69/P en H69/LX4) in proefbuis gevoeg en vir 15 minute by 37 °C gepreïnkubeer. Die verlangde konsentrasies van die riminofenasien verbindings (1.25 µg/ml en 2.5 µg/ml) is na preïnkubasie by die onderskeie proefbuis gevoeg. Die selsuspensie is daarna vir 30 minute by 37 °C geïnkubeer. Vier milliliter (4 ml) van 'n vooraf verhitte (37 °C) oplossing van 50 nM DiOC₆(3) in 10% FKS-gesupplementeerde RPMI 1640 medium is na die inkubasie tydperk by die selsuspensies gevoeg en die selle is vir 'n verdere 15 minute by 37 °C geïnkubeer. Die hoeveelheid DiOC₆(3) kleurstof wat deur die selle opgeneem is, is direk (sonder enige wasstappe) met behulp van die vloeisitometer bepaal. Die verlangde kontroles is in hierdie eksperimente ingesluit. Die resultate is as graad van fluoressensie intensiteit (mediaan kanaal nommer) uitgedruk.

8.4. Resultate

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

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

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

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

Die resultate is as die IK₅₀, dit wil sê as die gemiddelde riminofenasien konsentrasie (µg/ml) ± standaardfout wat tot 50% seldoding in die MTT toetsstelsel gelei het, uitgedruk. Drie tot vyf eksperimente is in duplikaat gedoen. Statisties betekenisvolle verskille (P-waardes) tussen die sitotoksiese aktiwiteite van die verskillende riminofenasien verbindings, indien dit met die sitotoksiese aktiwiteit van B663 vergelyk is, was as volg:

a: P < 0.0001

b: P < 0.005

c: P < 0.05

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

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

Die resultate is as die IK₅₀, dit wil sê as die gemiddelde riminofenasien konsentrasie (µg/ml) ± standaardfout wat tot 50% seldoding in die MTT toetsstelsel gelei het, uitgedruk. Drie - vyf eksperimente is in duplikaat gedoen. Statisties betekenisvolle verskille (P-waardes) tussen die sitotoksiese aktiwiteite van die verskillende riminofenasien verbindings, indien dit met die sitotoksiese aktiwiteit van B663 vergelyk is, was as volg:

a: P < 0.0001

b: P < 0.005

c: P < 0.05

8.4.1.1. Geneesmiddel-sensitiewe H69/P sellyn

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

8.4.1.2. Veelvuldige geneesmiddel weerstandbiende H69/LX4 sellyn

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

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

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

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

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

8.4.3. Invloed van die onderskeie riminofenasien verbindings op die intrasellulêre akkumulering van radio-aktief gemerkte vinblastien in H69/P en H69/LX4 selle

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

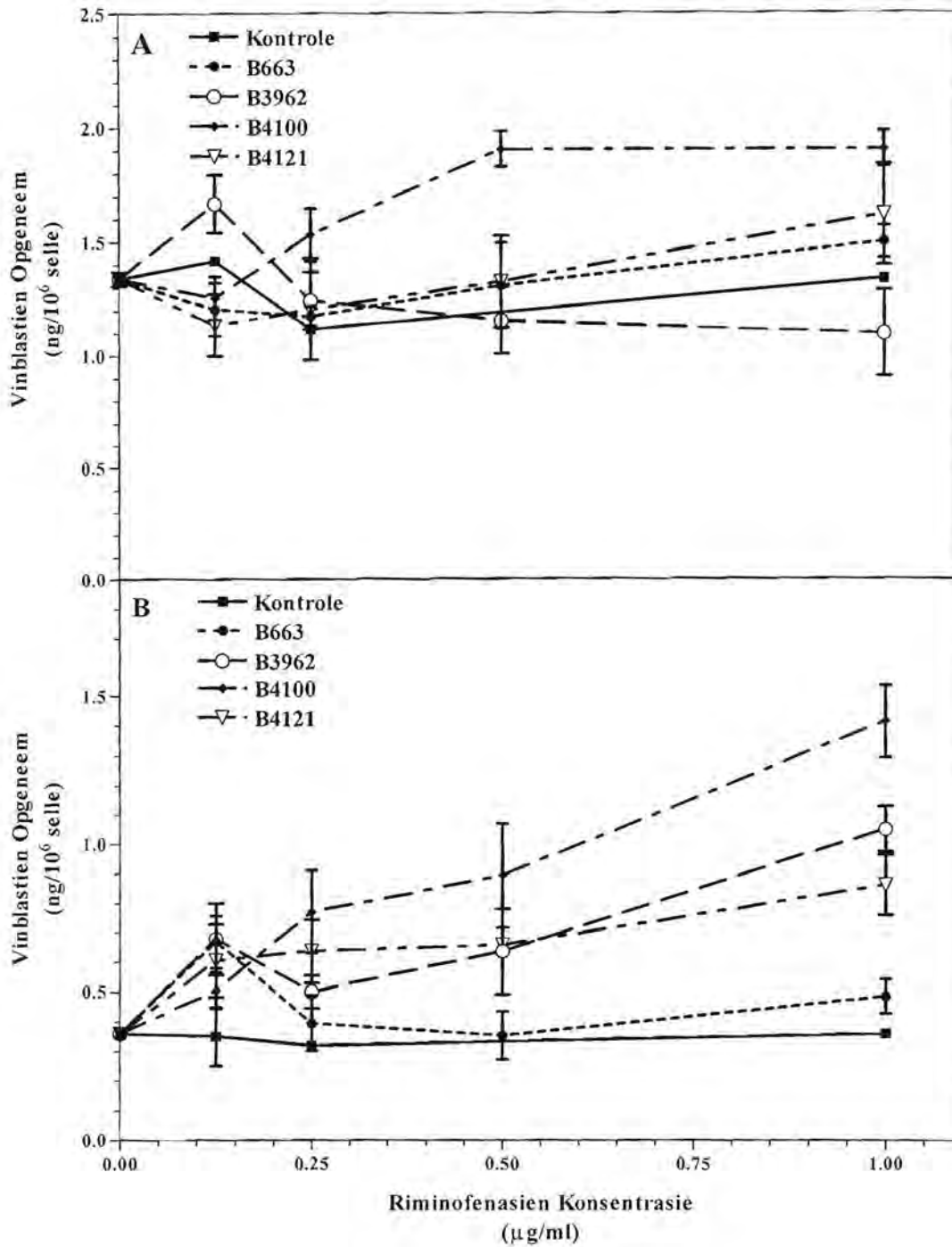
aktief deur selmembraan-geassosieerde P-gp molekules uit die H69/LX4 selle uitgepomp word. Verhoogde akkumulering van vinblastien in die H69/LX4 selle, nadat die selle aan die riminofenasien verbindings blootgestel is, dui daarop dat al vier riminofenasien verbindings (B663, B3962, B4100 en B4121), in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

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

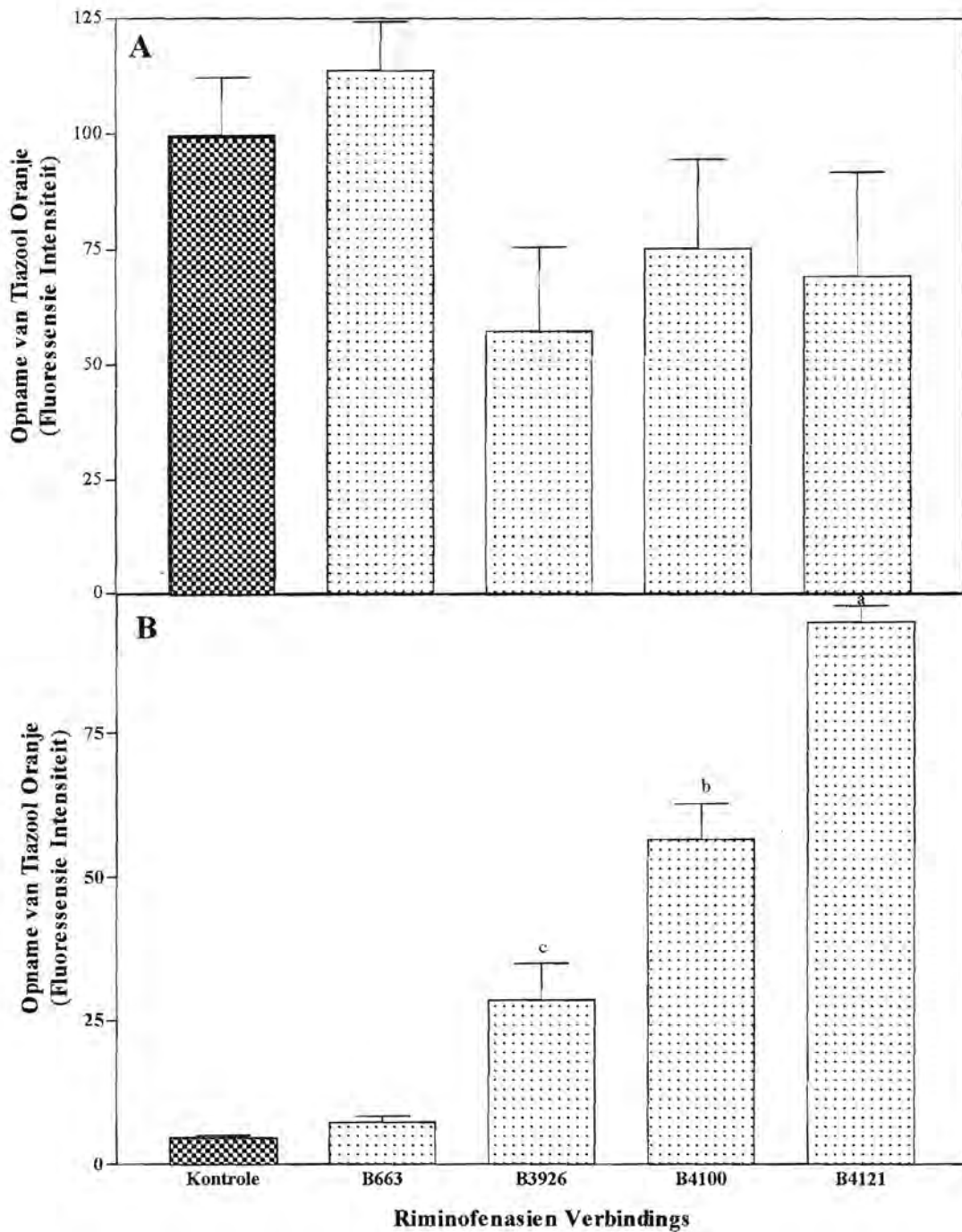
Die eksperimentele riminofenasien verbindings het egter by $1.0 \mu\text{g/ml}$ nie statistiese betekenisvolle verhogings in die akkumulering van vinblastien in die geneesmiddel-sensitiewe, H69/P sellyn, veroorsaak nie (Figuur 8.2A).

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

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



Figuur 8.2: Invloed van die verskillende riminofenasiens verbindings (0.125 µg/ml - 1.0 µg/ml) op die intrasellulêre akkumulering van [³H]vinblastien in die H69/P selyn (A) sowel as die H69/LX4 selyn (B). Die resultate is as die gemiddelde vinblastien opname (ng/10⁶ selle) ± standaardfout, uitgedruk. Drie tot vyf eksperimente is gedoen.



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

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

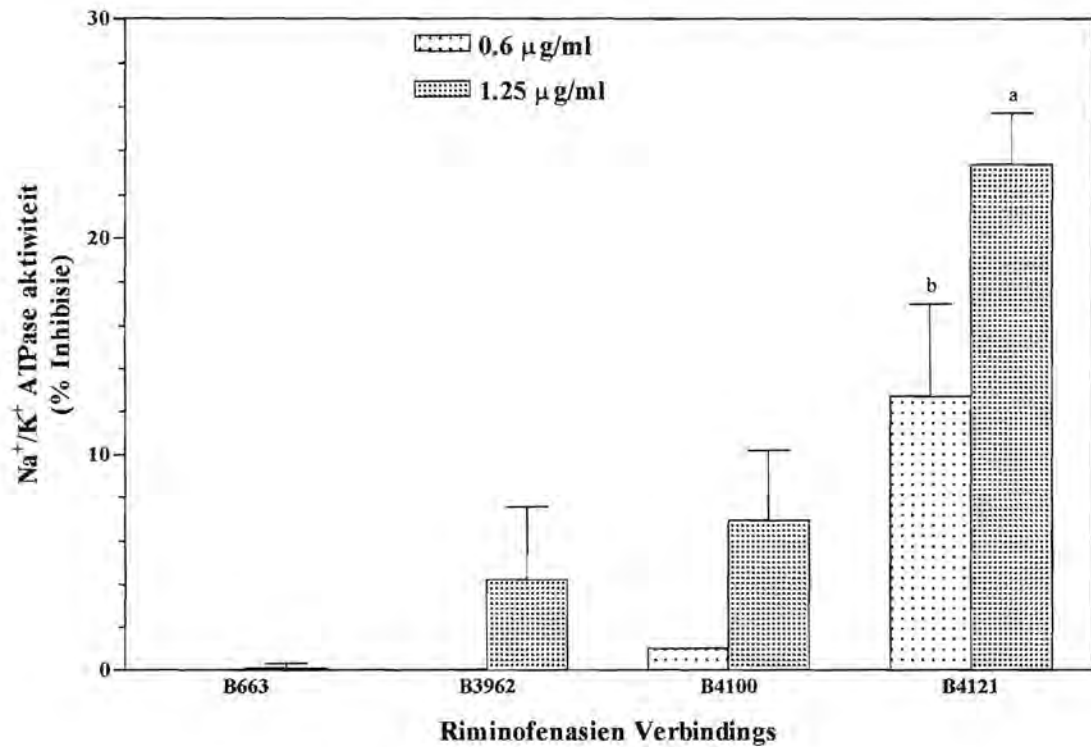
fluoresensie intensiteit (99.8 ± 12.0 ; mediaan kanaal nommer) vir die H69/P selle waargeneem is.

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

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

8.4.5. Invloed van die onderskeie riminofenasien verbindings op die Na^+, K^+ -ATPase aktiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle

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



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

a: $p < 0.01$

b: $p < 0.05$

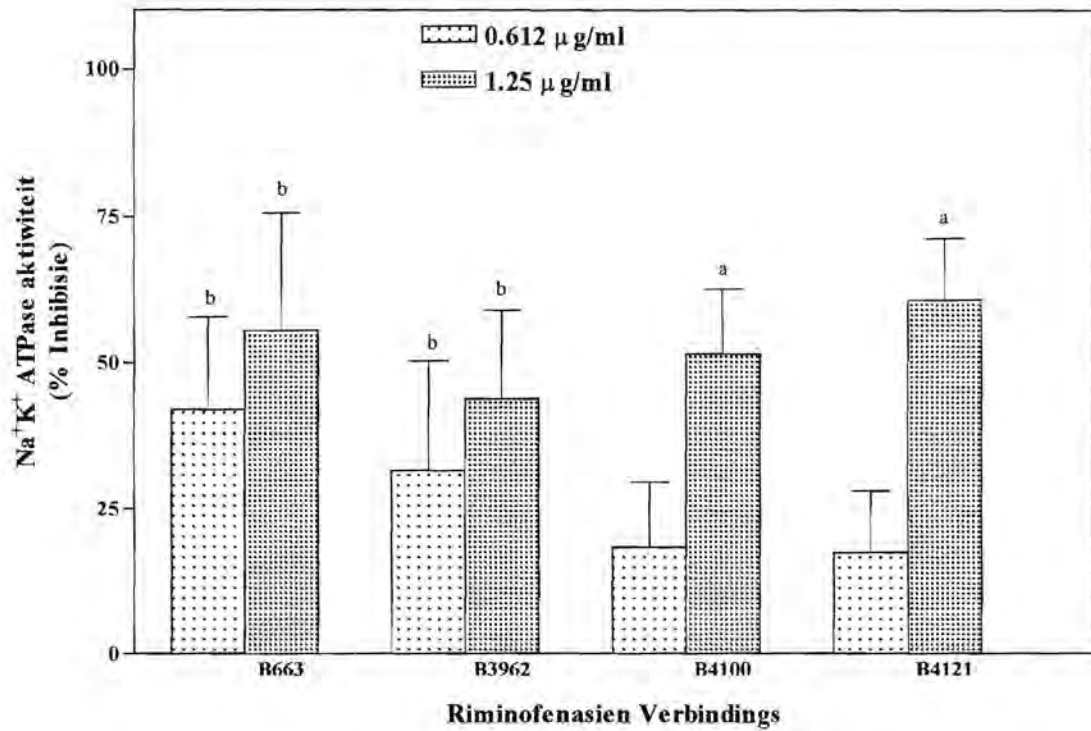
uitsondering van B4121 ($p < 0.01$), nie statisties betekenisvol nie, B4121 was ook in staat om by $0.6 \mu\text{g/ml}$ die Na^+, K^+ -ATPase aktiwiteit in die H69/P sellyn statisties betekenisvol ($p < 0.05$) te inhibeer (Figuur 8.4). B663 was by $0.6 \mu\text{g/ml}$ sowel as $1.25 \mu\text{g/ml}$ nie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

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

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

Al vier riminofenasien verbindings het die selmembrane van H69/P selle sowel as H69/LX4 selle statisties betekenisvol ($P < 0.0001$) gedepolariseer (Figuur 8.6A en B). Hierdie depolarisasie van die selmembrane is as 'n verlaging in die fluoressensie intensiteit van die fluoresserende kleurstof, DiOC₆(3), waargeneem. Die riminofenasien-geïnduseerde verlaging in die membraan potensiale was in albei sellyne dosis-afhanklik (Figuur 8.6A en B).

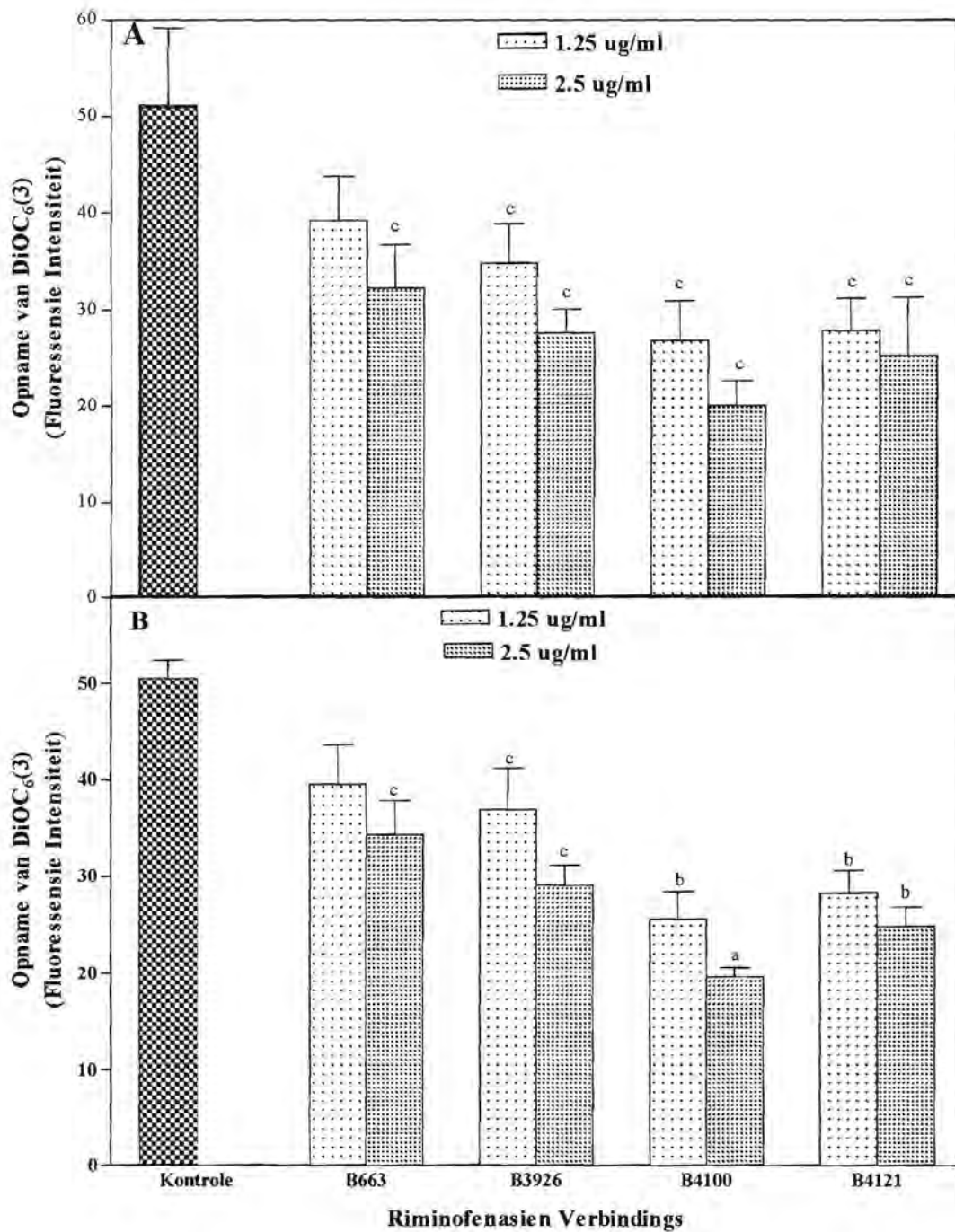
Geen betekenisvolle verskille is in die mate waarin die eksperimentele riminofenasien verbindings in staat was om die selmembrane van onderskeidelik die H69/P- en H69/LX4 selle te depolariseer, waargeneem nie (Figuur 8.6A en B). B4100 het die grootste invloed op die membraan potensiale van beide sellyne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



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

b: $p < 0.01$

c: $p < 0.05$



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

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

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

8.4.7. Bespreking

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

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

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

meer aktief was as klofasimien. In die geval van die H69/P sellyn was die volgorde van die riminofenasien verbindings ten opsigte van hul mate van direkte sitotoksiese aktiwiteit as volg: B4121 > B3926 > B4100 > B663, terwyl die volgorde in die H69/LX4 sellyn as volg was: B3926 > B4121 > B4100 > B663. Die H69/LX4 selle was ongeveer 2, 0.5, 2 en 3-voudig meer bestand teen B663, B3962, B4100 en B4121 respektiewelik, as die oorspronklike sellyn. Die verskil in sensitiwiteit van H69/P en H69/LX4 selle vir die antiproliferatiewe aksie van die riminofenasien verbindings kan egter nie aan verskille in die invloed op Na^+, K^+ -ATPase aktiwiteit toegeskryf word nie, aangesien die aktiwiteit van hierdie monovalente kation transporter in die P-gp sublyn meer sensitief was vir die inhiberende effekte van die eksperimentele riminofenasiene. In die geval van die H69/P selle was daar 'n duidelike assosiasie tussen die omvang van riminofenasien-bemiddelde inhibisie van Na^+, K^+ -ATPase aktiwiteit en inhibisie van proliferasie, soos voorheen deur ander navorsers gerapporteer is (**Van Rensburg *et al*, 1994; Van Rensburg *et al*, 1997**). Wat egter onverwags was, was die feit dat dieselfde verwantskap nie in die H69/LX4 selle waargeneem is nie. Na^+, K^+ -ATPase aktiwiteit in beide die H69/P en H69/LX4 selle was ewe sensitief vir inhibisie deur al die riminofenasien verbindings, ten spyte van die vooraf-genoemde verskille in sensitiwiteit vir die antiproliferatiewe effekte van hierdie verbindings. Hierdie waarnemings stel voor dat die antiproliferatiewe meganisme van die riminofenasien verbindings op die H69/LX4 selle baie meer ingewikkeld is as dié wat in aksie is in die oorspronklike sellyn. Ekstrapolering van data van die Na^+, K^+ -ATPase bepaling, wat oor 'n relatiewe kort (30min) inkubasie tydperk uitgevoer is, na die proliferasie bepaling wat 'n 7 dae inkubasie tydperk benodig, mag moontlik nie geskik wees vir H69/LX4 selle nie.

Die effek van die riminofenasien verbindings op die neutralisering van die werking van P-gp wat oor 'n kort tydperk strek, was gebaseer op die opname van tiazool oranje of vinblastien deur H69/LX4 selle. In hierdie studies het B3962, B4100 en B4121 die werking van P-gp baie beter as B663 geneutraliseer. In die tiazool oranje

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

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

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

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

HOOFSTUK 9

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

9.1. Doelwitte

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

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

9.2. Media en Reagense

9.2.1. Fetale Kalfserum Gesupplementeerde RPMI 1640 medium

Hoofstuk 7 (7.2.2)

9.2.2. Kanker sellyne

Sien Hoofstuk 7 (7.2.5)

9.2.3. Riminofenasien Verbindings

Sien Hoofstuk 8 (8.2.1.)

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

Die volgende reagense is in 1000 ml gedeïoniseerde water opgelos:

24.5 g Anhidriese dekstrose

8.0 g Sitroensuur

22.0 g Trinatrium sitraat

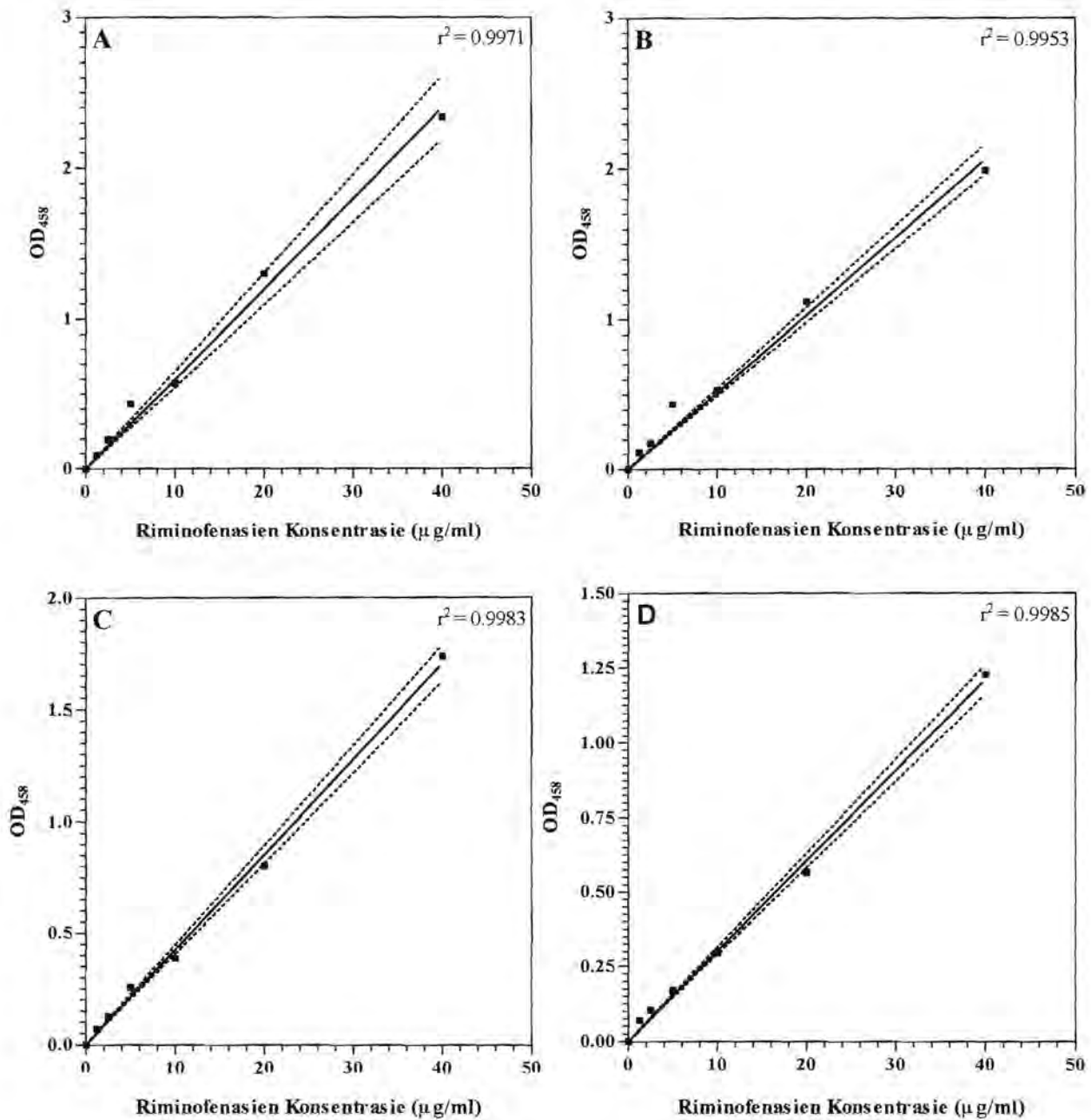
9.3. Metodes

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

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

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

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



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

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

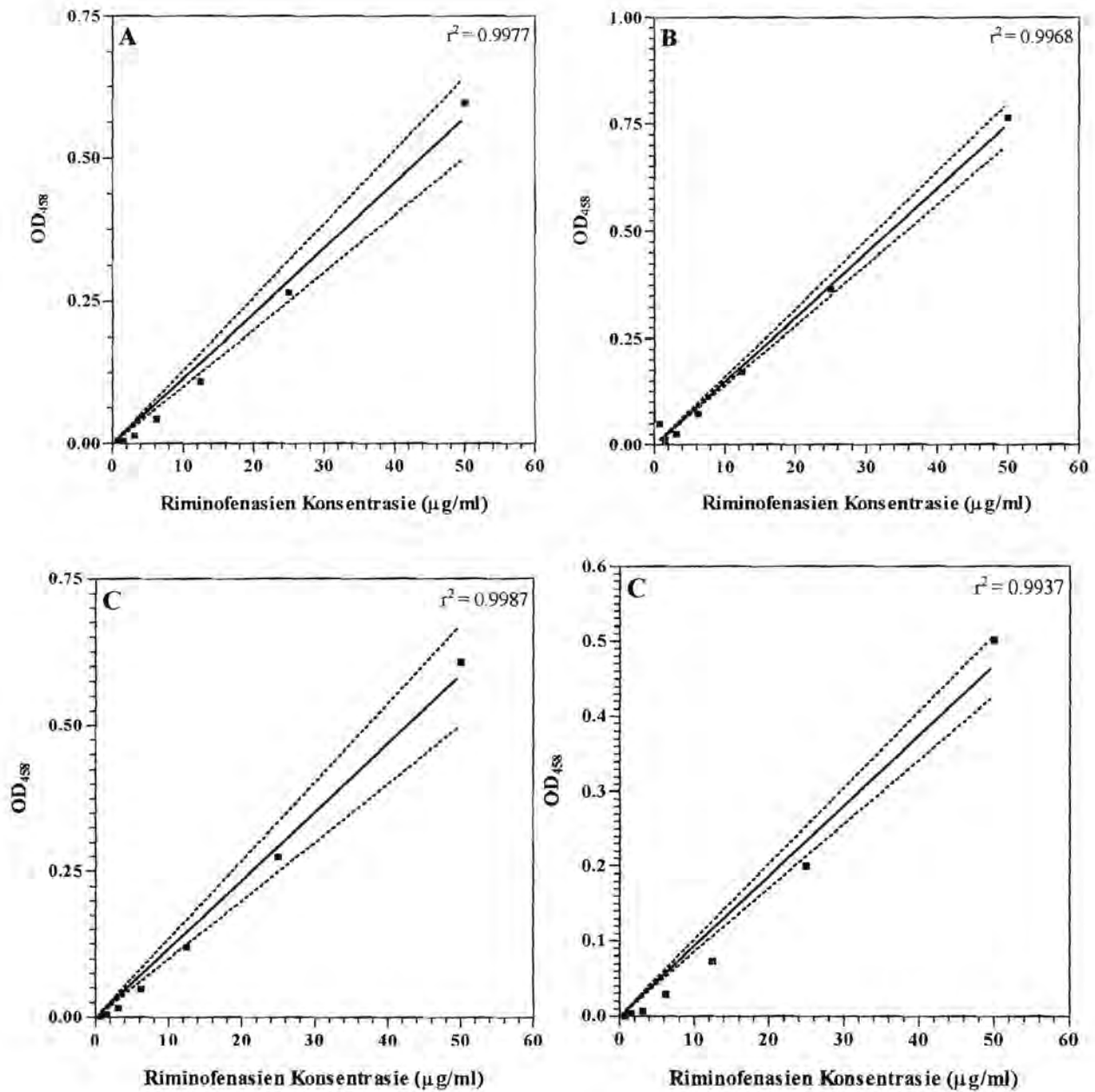
$$\text{Partissie Koëffisiënt} = \frac{\text{(konsentrasie in oktanol/volume van oktanol)}}{\text{(konsentrasie in water/volume van water)}}$$

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

9.3.3.2. Prosedure wat tydens die bepaling van die stabiliteit van skaap eritrosiet membrane in die teenwoordigheid van die riminofenasien verbindings, gevolg is

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

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

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

oplosmiddel kontroles sowel as 'n kontrole waar 100% hemolise plaasgevind het, is in die eksperiment ingesluit. Na 30 minute, is die 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. Die resultate is as % hemolise uitgedruk.

9.4. Resultate

9.4.1. Die partissie koëffisiënte van die onderskeie riminofenasien verbindings

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

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

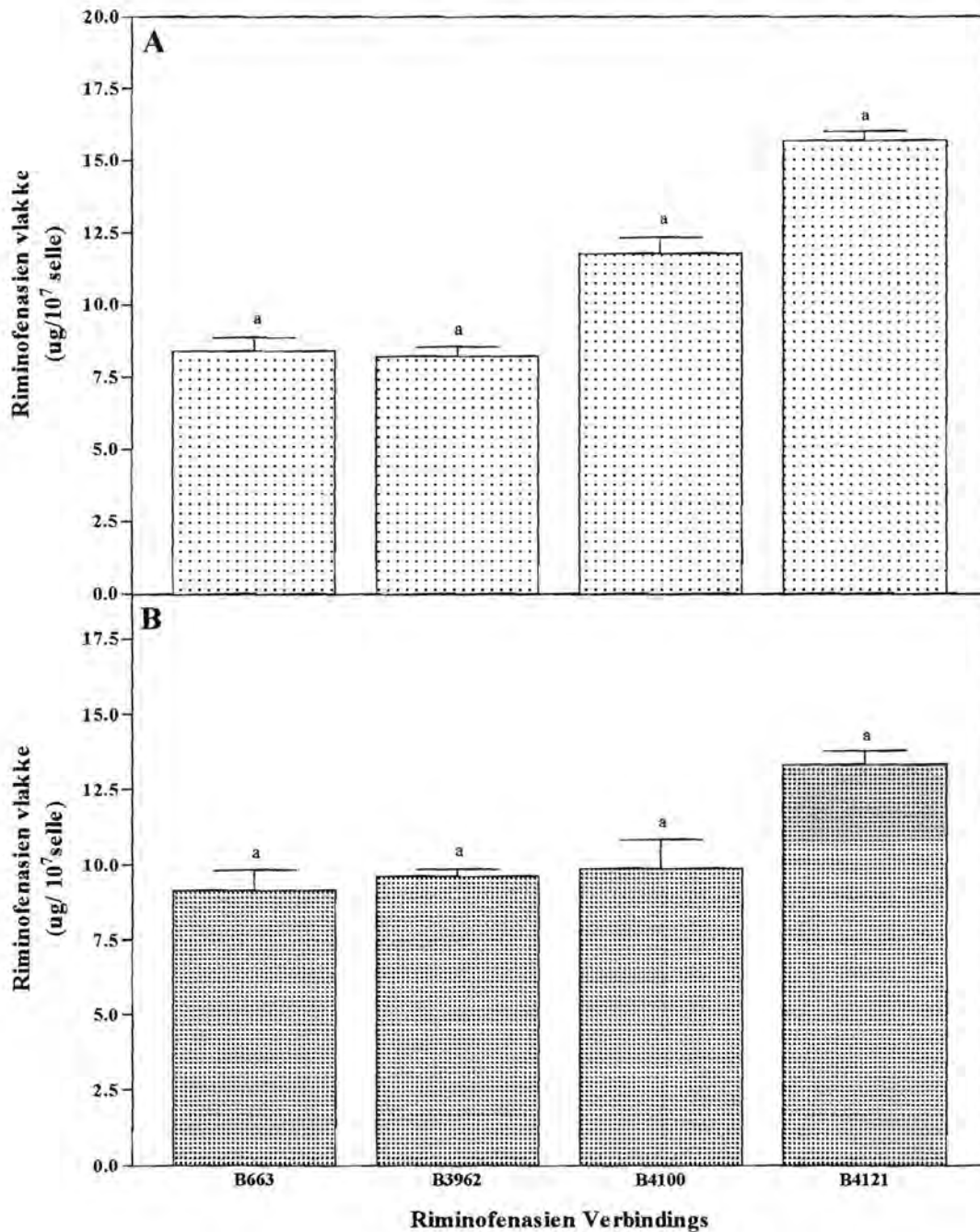
Al vier die eksperimentele riminofenasien verbindings het statisties betekenisvol ($P < 0.0001$) in die H69/P selle sowel as die H69/LX4 selle geakkumuleer (Figuur 9.3A en B). Die vlakke van die verskillende riminofenasien verbindings in die H69/P selle het nie betekenisvol ($P > 0.05$) van die vlakke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

Tabel 9.1: Die OD₄₅₈-waardes, afgeleide riminofenasien konsentrasies en partissie koeffisiënte van die verskillende riminofenasien verbindings.

	Riminofenasien Verbindings			
	B663	B3962	B4100	B4121
OD₄₅₈ in water	0.005	0.063	0.003	0.008
Afgeleide riminofenasien konsentrasie in water (µg/ml)	0.089	1.218	0.072	0.276
OD₄₅₈ in 1-oktanol	1.872	1.231	1.762	0.914
Afgeleide riminofenasien konsentrasie in 1-oktanol (µg/ml)	33.418	23.791	42.057	31.493
Partissie Koeffisiënte*	52.02	2.70	80.82	15.79

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

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



Figuur 9.3: *In vitro* opname van die verskillende riminofenasiens verbindinge, na 'n 30 minute blootstellings-tydperk, deur onderskeidelik die H69/P (A) en H69/LX4 (B) selle. Die resultate is die gemiddeld van 3 - 4 eksperimente. Die agtergrondwaardes, soos vir die onbehandelde H69/P selle (0.116 ± 0.051) sowel as H69/LX4 selle (0.131 ± 0.051) verkry is, is van bogenoemde resultate afgetrek. Die P-waardes ten opsigte van die kontrole (onbehandelde) selle was as volg:
a: $P < 0.0001$

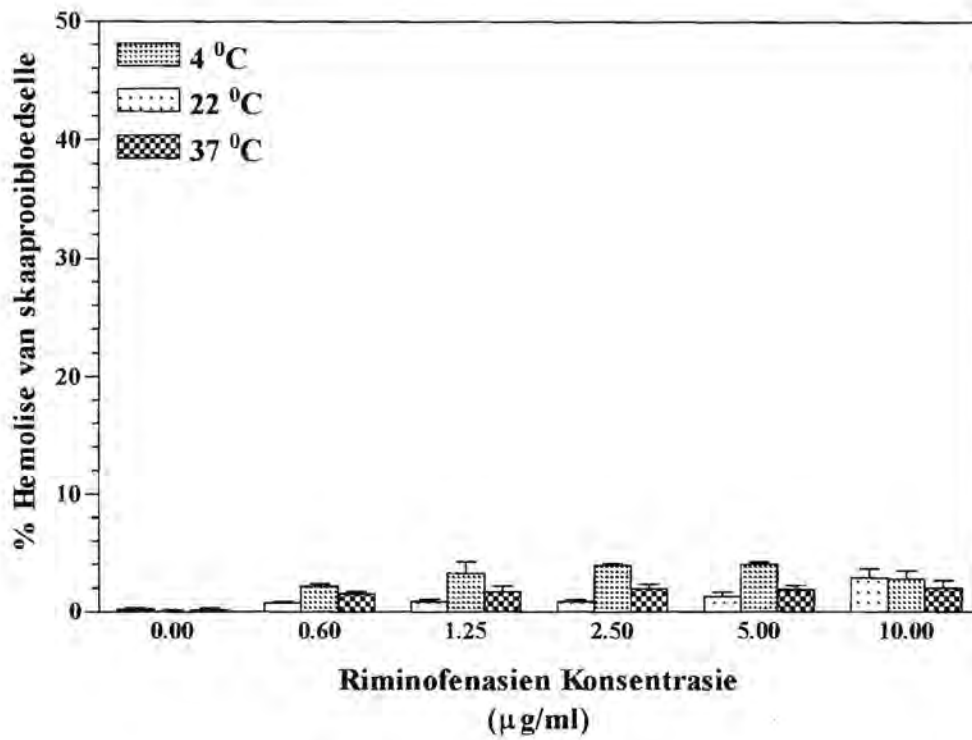
Die statisties betekenisvolle verskille (P-waardes) in die mate van akkumulering van die verskillende riminofenasiens verbindinge in die onderskeie selyne word volledig in die meegaande teks beskryf.

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

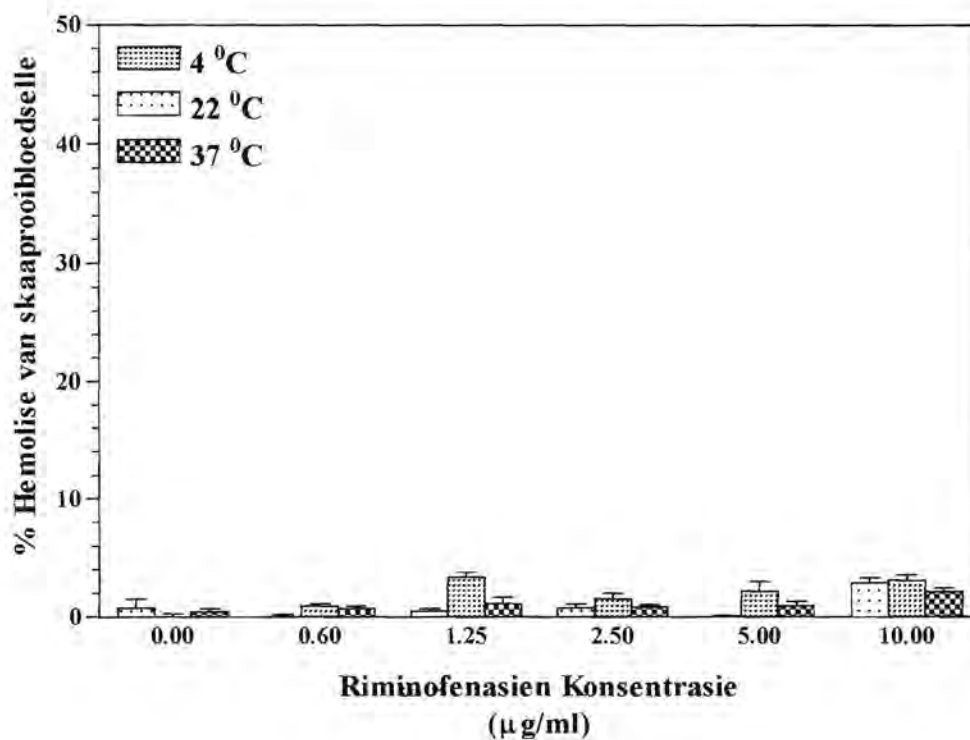
Alhoewel die waargeneemde vlakke vir B4121 in die H69/LX4 selle hoër was as die vlakke wat vir B4100 en B3962 in hierdie selle waargeneem is, was hierdie verskille nie statisties betekenisvol ($P > 0.05$) nie (Figuur 9.3B). Die waargeneemde B4121 vlakke in H69/LX4 selle was wel betekenisvol hoër ($P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

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

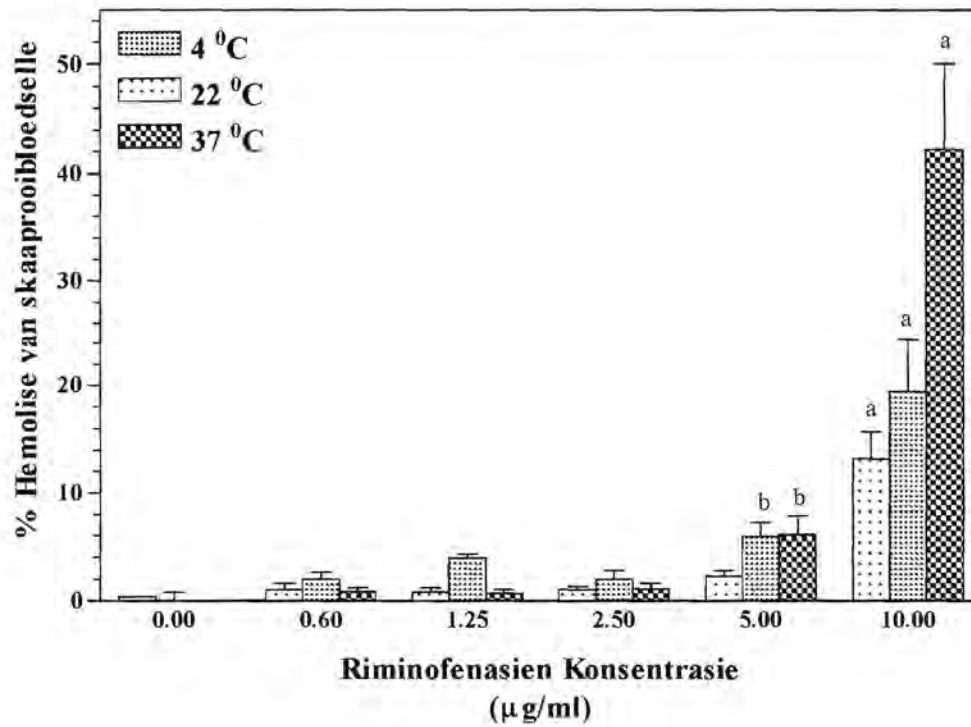
Al vier eksperimentele riminofenasien verbindings (B663, B3962, B4100 en B4121) het op hul eie, by die laer riminofenasien konsentrasies ($0.6 \mu\text{g/ml} - 2.5 \mu\text{g/ml}$), nie betekenisvolle lise van die skaap rooibloedselle by 4°C , 22°C of 37°C veroorsaak nie (Figuur 9.4; Figuur 9.5; Figuur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



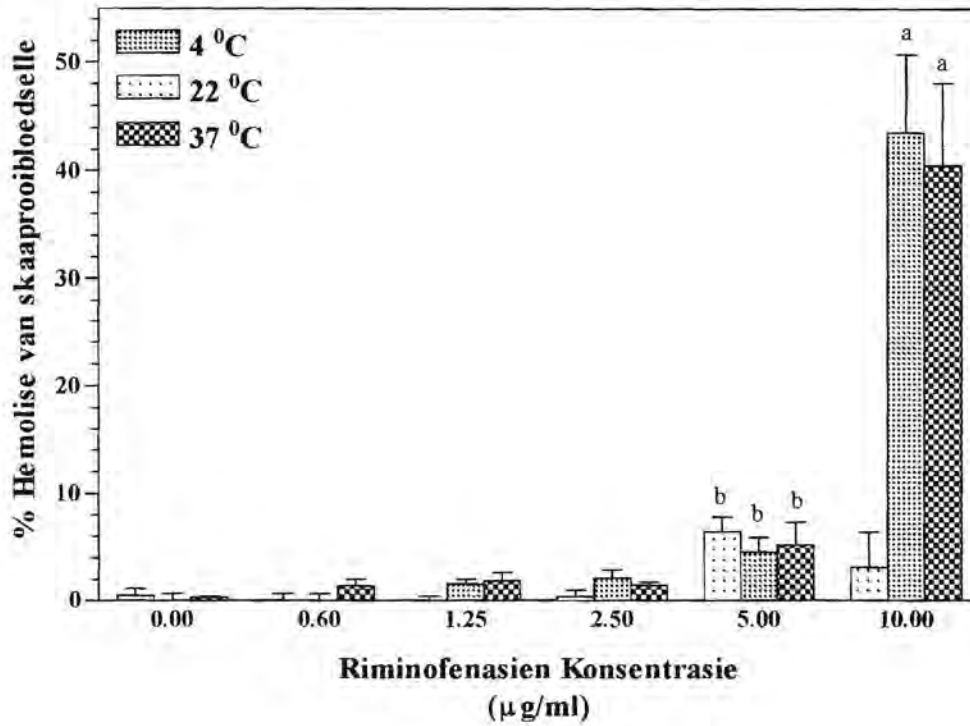
Figuur 9.4: Die effek van B663 by 4 °C, 22 °C en 37 °C, op die stabiliteit van skaap eritrosiet selmembrane. Die resultate is as % hemolise ± standaardfout, uitgedruk. Drie - vyf eksperimente is gedoen. Geen statisties betekenisvolle verskille is waargeneem nie.



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



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



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

a: $p < 0.0001$

b: $p < 0.01$

9.4.4. Bespreking

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

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

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

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

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

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

HOOFSTUK 10

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

10.1. Inleiding

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

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

10.2. Doelwitte

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

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

10.3. Materiale en Reagense

10.3.1. Eksperimentele diere

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

10.3.2. Riminofenasien verbindings

Sien Hoofstuk 8 (8.2.1)

10.4. Metodes

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

proefbuis gevoeg. Die ekstraksie prosedure is verder soos wat vir die ekstraksie van die riminofenasien verbindings vanuit die weefsel beskryf is, gevolg. Die resultate is uitgedruk as die hoeveelheid (in μg) riminofenasien verbindings teenwoordig in 1 ml serum.

10.4.5. Statistiese bepalings

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

10.5. Resultate

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

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

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

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

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

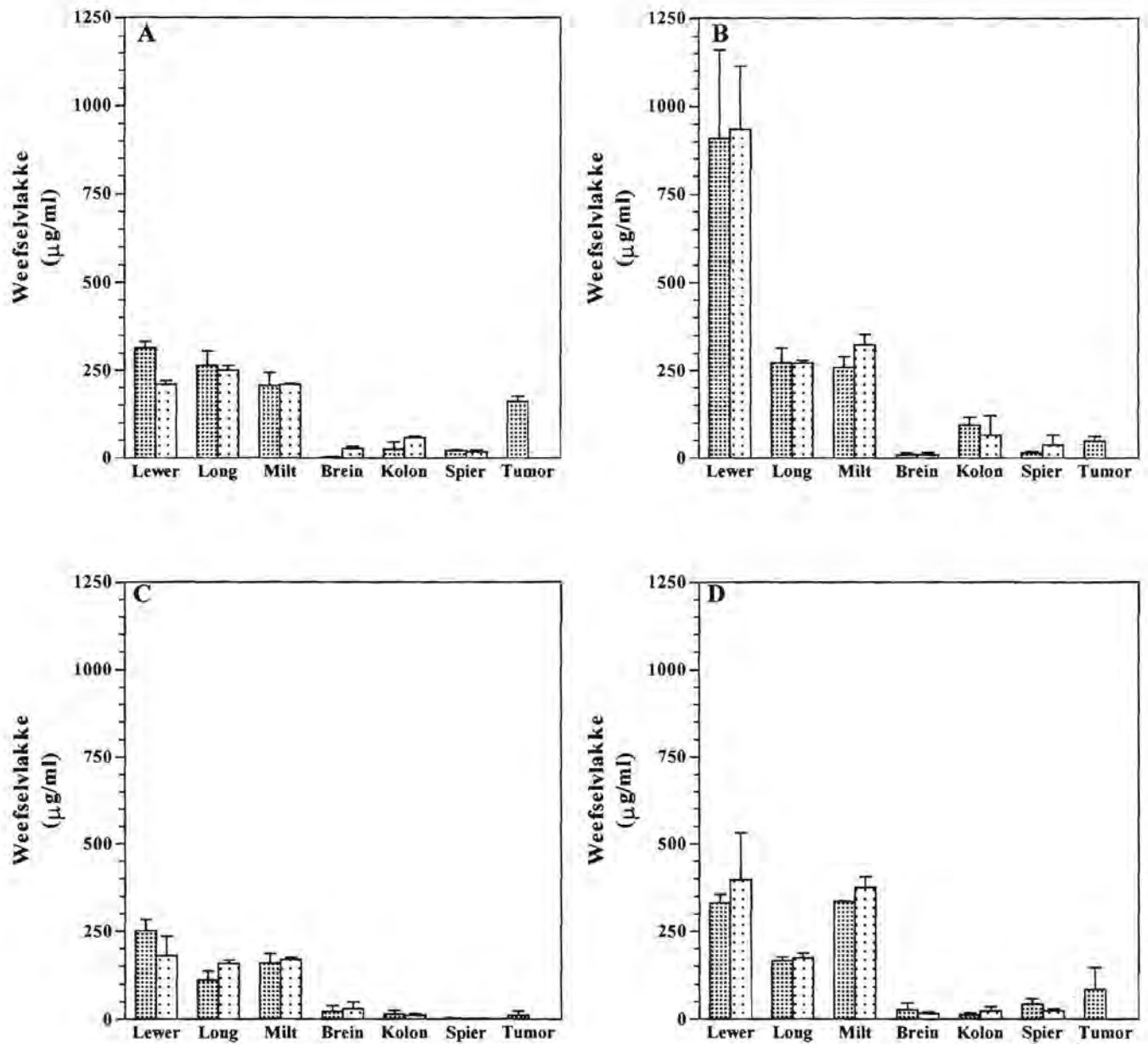
10.5.2. Weefselvlakke van die onderskeie riminofenasien verbindings in riminofenasien-behandelde Sprague-Dawley rotte

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10.5.4. Bespreking

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

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

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

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

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

HOOFSTUK 11

SAMEVATTENDE BESPREKING

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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