

**ONTWIKKELING VAN 'N SIFTINGSTEGNIEK
WAARMEE PORIEVORMING, ALFA-EFFEKTE EN
LISE VAN DIE VENOOM VAN DIE
SKERPIOENGENUS, *PARABUTHUS*, ONDERSKEI
KAN WORD**

Catharina Maria Theresia Fourie

B.Soc.Sc. Honns., B.Sc. Honns.

Verhandeling voorgelê vir gedeeltelike nakoming van die vereistes vir die graad Magister Scientiae in die vakgroep Fisiologie in die Skool vir Fisiologie, Voeding en Verbruikerswetenskappe aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys.

Studieleier: Dr. K. Dyason

Hulpleier: Prof. J.J. van der Walt

Potchefstroom

2000

INHOUDSOPGAWE

LYS VAN FIGURE EN TABELLE	iv
LYS VAN AFKORTINGS	vi
OPSOMMING	vii
SUMMARY	ix
HOOFSTUK 1	
INLEIDING.....	1
1.1 DOELSTELLING EN MOTIVERING	3
HOOFSTUK 2	
LITERATUURSTUDIE	5
2.1 MEDIESE BELANG VAN SKERPIOENVENOOM	5
2.2 KARDIALE MIOSIETE	6
2.2.1 Kalsiumhomeostase	6
2.2.2 Na ⁺ /Ca ²⁺ -uitruiler	9
2.2.3 Invloed van intrasellulêre natriumkonsentrasie	11
2.3 DIE NATRIUMKANAAL	11
2.3.1 Invloed van toksiene op die Na ⁺ -kanaal	14
2.3.1.1 Skerpioentoksiene	15
2.3.1.2 Veratridine	15
2.4 PORIEVORMING.....	16
2.4.1 Die rol van Ca ²⁺	19
2.4.2 Porievorming deur natuurlike toksiene.....	20
2.4.2.1 Skerpioenvenoom.....	20
2.4.2.1.1 Parabutoporin	21
2.4.2.2 Mastoparan.....	22

2.4.2.3 Melittin	23
------------------------	----

HOOFSTUK 3

EKSPERIMENTELE METODES	24
3.1 ENSIEMATIESE ISOLERING VAN MIOSIETE	24
3.2 SELTELTEGNIK GEBASEER OP DIE MORFOLOGIE VAN KARDIALE MIOSIETE	25
3.3 GEBRUIK VAN SKERPIOENVENOOM TYDENS EKSPERIMENTERING	26
3.4 OPLOSSINGS	27
3.5 BEPALING VAN HEMOLITIESE AKTIWITEIT	27
3.6 VERWERKING EN STATISTIESE ANALISE VAN RESULTATE	28

HOOFSTUK 4

RESULTATE EN BESPREKING	29
4.1 EKSPERIMENTELE VARIASIES	29
4.1.1 Betroubaarheid van die selteltegniek	30
4.1.2 Variasie in venoomkomponente	31
4.2 ONTWIKKELING VAN DIE SIFTINGSTEGNIK	33
4.2.1 Veratridinemodel	35
4.2.2 Mastoparan (melittin)-model	36
4.2.2.1 Porievorming	36
4.2.2.2 Fosfolipase C-effek	37
4.2.3 Sellise	41
4.4 SAMEVATTING VAN RESULTATE	43

HOOFSTUK 5

EVALUERING, GEVOLGTREKKINGS EN AANBEVELINGS	45
---	----

BYLAE.....	48
BRONNELYS.....	55
BEDANKINGS.....	63

LYS VAN FIGURE EN TABELLE

FIGURE

FIGUUR 2.1	Die intrasellulêre meganismes wat 'n rol speel in Ca^{2+} homeostase tydens rustoestand.....	7
FIGUUR 2.2	Skematiese voorstelling van 'n Na^+ -kanaal α -subeenheid...	12
FIGUUR 3.1	Seltelkamer met 4 telbadjies.....	25
FIGUUR 4.1	Die variasie in persentasie seldood tussen verskillende miosietbereidings.....	30
FIGUUR 4.2	Die invloed van bevriesing op <i>P. schlechteri</i> venoom.....	32
FIGUUR 4.3	Die persentasie seldood van miosiete met veratridine en <i>P. granulatus</i> venoom.....	36
FIGUUR 4.4	Die persentasie seldood van miosiete met mastoparan en melittin.	38
FIGUUR 4.5	Die persentasie seldood van miosiete met <i>P. schlechteri</i> en <i>P. transvaalicus</i> venoom.....	39
FIGUUR 4.6	Die persentasie seldood van miosiete met parabutoporin-fragment en parabutoporin.	41
FIGUUR 4.7	Hemolise van eritrosiete	42

BYLAE

FIGUUR 1.1	Persentasie seldood van miosiete in verskillende badjies vir bereidings van dag 1-5	48
------------	---	----

TABELLE

TABEL 3.1	loonsamestelling van ekstrasellulêre badoplossings	27
TABEL 4.1	Persentasie seldood van kardiaale miosiete in verskillende badoplossings.....	34

BYLAE

TABEL 2.1	Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings sonder venoom.....	49
TABEL 2.2	Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met veratridine.....	49
TABEL 2.3	Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met <i>P. granulatus</i>	50
TABEL 2.4	Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met <i>P. neglectus</i>	50
TABEL 2.5	Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met <i>P. villosus</i>	50
TABEL 2.6	Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met mastoparan.....	51
TABEL 2.7	Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met melittin.....	51
TABEL 2.8	Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met <i>P. raudus</i>	51
TABEL 2.9	Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met <i>P. laevifrons</i>	52
TABEL 2.10	Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met <i>P. transvaalicus</i>	52
TABEL 2.11	Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met parabutoporin.....	53
TABEL 2.12	Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met parabutoporinfragment.....	53
TABEL 2.13	Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met <i>P. schlechteri</i>	54

LYS VAN AFKORTINGS

Na^+	Natriumioon
K^+	Kaliumioon
Ca^{2+}	Kalsiumioon
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Kalsiumioonkonsentrasie intrasellulêr
$[\text{Na}^+]_i$	Natriumioonkonsentrasie intrasellulêr
$[\text{Ca}^{2+}]_e$	Kalsiumioonkonsentrasie ekstrasellulêr
SR	Sarkoplasmiese retikulum
ATP	Adenosientrifosfaat
DAG	Diasielgliserol
PLC	Fosfolipase C
InsP_3	Inositoltrifosfaat
PKC	Proteïenkinase C
O_2	Suurstof
NaCl	Natriumchloried
CaCl_2	Kalsiumchloried
KCl	Kaliumchloried
MgCl_2	Magnesiumchloried
NiCl_2	Nikkelchloried
NaOH	Natriumhidroksied
HEPES	Hidroksie-etiel-etaansulfoonsuur, buffersubstans
Tris	Hidroksiemetielaminmetaan
EGTA	Etileenglikool-(amino-etieleter) tetra-asynsuur
0 Ca^{2+}	Nominale kalsium
KH_2PO_4	Kaliumdihidrogeenfosfaat
MgSO_4	Magnesiumsulfaat
α	Alfa
β	Beta

OPSOMMING

Skerpioene van die genus *Parabuthus* Pocock, 1890, waaronder *Parabuthus granulatus* (Ehrenberg, 1831) wat as die giftigste in die land beskou word, kom wydverspreid in Suid-Afrika voor. Hierdie skerpioene se venoom is saamgestel uit verskeie aktiewe komponente met verskillende effekte. Die mees bestudeerde komponente is die neurotoksiene wat aanleiding gee tot die α -effek, 'n effek wat in kardiale miosiete Ca^{2+} -oorbelading induseer deur die omkeer van die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -uitruiler. Ca^{2+} -oorbelading veroorsaak selfdood en hiperkontraktuur wat maklik onder 'n mikroskoop waargeneem kan word. 'n Ander effek wat met venome van die genus *Parabuthus* waargeneem is, is membraandestabilisering of porievorming. Laasgenoemde effek het baie belangstelling by navorsers ontlok, aangesien daar toenemend bakteriële weerstand teen konvensionele antibiotika is en 'n nuwe generasie porievormende peptiede moontlik geneeskundige potensiaal het.

Die sellulêre effekte van skerpioenvenome word meestal met gespesialiseerde en duur elektrofisiologiese tegnieke ondersoek en hoewel daar die afgelope 3-4 jaar aktief navorsing op die gebied gedoen word, is alle spesies wat in Suid-Afrika voorkom nog nie ondersoek nie. Dit het gelei tot die behoefte aan 'n siftingstegniek waarmee effekte soos die α -effek, porievorming of destabilisering van die selmembraan, onderskei kan word. Venome waarin hierdie effekte met die siftingstegniek geïdentifiseer word kan dan met gespesialiseerde tegnieke soos heelselspanningsklemming verder ondersoek word.

Die manuele tel van lewende miosiete is aangewend in die siftingstegniek en 'n veratridine- en mastoparan (melittin)-model is gebruik om tussen die verskillende effekte te onderskei. Variasies wat die tegniek kan beïnvloed is ondersoek, die seltel-tegniek is as betroubaar bewys en met hemolise van eritrosiete is

onderskeid getref tussen sellise as gevolg van die disintegrering van die selmembraan en koloïedosmotiese lise wat volg na porievorming.

Die resultate het getoon dat die veratridinemodel suksesvol gebruik kan word om die α -effek te onderskei, terwyl onderskeiding van porievorming met die mastoparanmodel bemoeilik is deur fosfolipase C aktiwiteit.

Hierdie studie het gelei tot die ontwikkeling van 'n nuttige, koste-effektiewe siftingstegniek met verskeie toepassings.

Sleutelwoorde:

Siftingstegniek, α -effek, porievorming, *Parabuthus*, Ca^{2+} -oorbelading, kardiaal miosiete, hemolise.

SUMMARY

Scorpions of the genus *Parabuthus* Pocock, 1890, including *Parabuthus granulatus* (Ehrenberg, 1831), which is regarded as the most venomous in the country, are widely distributed in southern Africa. Venom of these scorpions consists of several active components each with a different effect. The most extensively studied components are the neurotoxins, which cause the α -effect, an effect which induces Ca^{2+} overload in cardiac myocytes by reversing the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. Ca^{2+} overload leads to cell death and hypercontraction which can easily be observed microscopically. Another effect seen with venom of the genus *Parabuthus* is a membrane destabilizing effect or pore-forming. The latter created a lot of interest amongst researchers; seeing that there is increasing bacterial resistance against conventional antibiotics and a new generation of pore-forming peptides might have medical potential.

The cellular effects of scorpion venoms are studied mostly by specialized and expensive electrophysiological techniques and although active research on the subject has been going on for the last 3-4 years, all species found in South Africa have not yet been researched. The need for a sifting technique where effects like the α -effect, pore-forming and destabilization of the membrane can be discerned was noted. Venoms in which these effects could be identified by means of a sifting technique could then be further examined by specialized techniques such as whole-cell voltage clamping.

Manual counting of live myocytes is applied in the sifting technique and veratridine- and mastoparan (melittin)-models were used to distinguish between different effects. Variations which can influence the reliability of the sifting technique were examined and haemolysis of erythrocytes was used to distinguish between cell lysis by disruption of the cell membrane and colloid osmotic lysis due to pore forming. The results showed that the α -effect can be

distinguished effectively with the veratridine model, while discernment of pore-forming with the mastoparan model was hampered by phospholipase C activity.

This study led to the development of a useful, cost-effective sifting technique with several applications.

Keywords:

Sifting technique, α -effect, pore forming, *Parabuthus*, Ca^{2+} overload, cardiac myocytes, haemolysis.

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Skerpioenvenoom is saamgestel uit verskeie aktiewe komponente waaronder polipeptiede en ensieme. Hierdie komponente het elk sy spesifieke funksie of effek wat bydra tot die kliniese simptome wat na invenomering met skerpioenvenoom waargeneem word. Met die ontwikkeling van biochemiese en molekulêr-biologiese tegnieke het dit moontlik geword om hierdie komponente te isoleer en elke komponent se effek afsonderlik te bestudeer. Die neurotoksiese komponente wat ionkanale beïnvloed het tot dusver die meeste belangstelling by navorsers ontlok, maar meer onlangs het die vinnige ontwikkeling en verspreiding van bakteriële weerstand teen konvensionele antibiotika belangstelling in porievormende peptiede uit natuurlike toksiene, waaronder skerpioenvenoom, laat toeneem. Skerpioenvenoom van die genus *Parabuthus* veroorsaak die meeste patofisiologiese simptome wat by mense, veral kinders, in Suid-Afrika waargeneem word na invenomering. Hierdie genus kom wydverspreid in Suid-Afrika voor en hoewel daar die afgelope 3-4 jaar aktief navorsing op skerpioenvenoom van spesies wat in die land voorkom gedoen is, is daar nog 'n groot aantal spesies, veral van die genus *Parabuthus*, wat nog nie ondersoek is nie.

In hierdie studie is geïsoleerde kardiaale miosiete en eritosiete as preparate gebruik om die effekte van skerpioenvenoom te ondersoek. Miosiete het 'n kenmerkende dwarsgestreepte staafvormige voorkoms en sodra seldood by miosiete intree ondergaan die selle vormveranderinge deur hul staafvormige voorkoms te verloor en 'n geronde vorm aan te neem. Hierdie vormveranderinge is duidelik waarneembaar onder 'n mikroskoop en op grond van hierdie eienskap verleen miosiete hulle tot kardiaale toksiteitstudies. Verskeie metodes kan gebruik word om die oorlewing van miosiete te monitor. Die drie metodes wat die

meeste gebruik word is die manuele tel van staafvormige miosiete (selteltegniek), die gebruik van tripaanblou kleurstof waarmee daar tussen lewendige en dooie selle onderskei kan word of die bepaling van die hoeveelheid laktaatdehidrogenase wat vrygestel word. Hoewel hierdie drie metodes goed korreleer, word die selteltegniek as die mees sensitiewe metode beskou (Sarvazyan, 1998:297). Die manuele tel van selle is 'n tydrowende proses en om die rede is sommige laboratoriums besig om rekenaarondersteunde sagteware te ontwikkel waarmee die persentasie staafvormige miosiete bepaal kan word.

Miosiete is baie gevoelig vir 'n verhoging in intrasellulêre kalsiumkonsentrasie ($[Ca^{2+}]_i$) wat seldood, gekenmerk deur hiperkontraktuur of verkorting van die sel, veroorsaak. Skerpioen neurotoksiene, isgemie en glikosiedvergiftiging veroorsaak *in vivo* en *in vitro* 'n verhoging in intrasellulêre natriumkonsentrasie ($[Na^+]_i$) wat lei tot die omkeer van die Na^+Ca^{2+} -uitruiler en sodoende 'n verhoging in $[Ca^{2+}]_i$ of Ca^{2+} -oorbelading induseer. Seldood by miosiete kan ook veroorsaak word deur sellise waardeur die samestelling van die selmembraan versteur word en porieë gevorm word. Laasgenoemde twee effekte versteur die intrasellulêre homeostase, water beweeg in die sel in en dit lei tot selswelling en uiteindelik kolloïedosmotiese sellise.

Die effek van die aktiewe komponente van skerpioenvenoom word op sellulêre vlak met verskeie tegnieke, waaronder spanningsklemming, 'n hoogs gespesialiseerde en duur tegniek, ondersoek. Bogenoemde het gelei tot die behoefte aan 'n siftingstegniek waarmee die α -effek en ander effekte van skerpioenvenoom aangedui kan word voordat dit verder elektrofisiologies ondersoek word. Die beskikbaarheid van kardiaal miosiete in die elektrofisiologie laboratorium van die PU vir CHO en die sensitiwiteit van die selteltegniek, het bygedra tot die ontwikkeling van so 'n siftingstegniek. Die isolering van miosiete behels 'n ingrypende proses en hoewel die veranderlikes tydens die isoleringsproses sover moontlik beperk word en die ekstrasellulêre omgewing *in vitro* die *in vivo* omgewing naboots, is daar altyd verskille wat daartoe lei dat die

Ca²⁺-weerstandbiedendheid van die miosiete tussen verskillende bereidings varieer. 'n Miosiet word as Ca²⁺-weerstandbiedend beskou indien dit staafvormig, dwarsgestreep en nie spontaan aktief is nie. In die ontwikkeling van die siftingstegniek is bogenoemde variasies van miosiete en die betroubaarheid van die seltelstegniek ondersoek. Verder is die seltelstegniek deur manipulering van die ekstrasellulêre omgewing aangewend om die siftingstegniek te ontwikkel waarmee op 'n koste-effektiewe manier onderskei kan word tussen veral die neurotoksiese (α)-effekte en membraandestabiliserende of porievormende effekte van skerpioenvenoom van die genus *Parabuthus*.

1.1 DOELSTELLINGS EN MOTIVERING

Die hoofdoel van hierdie studie was om 'n siftingstegniek te ontwikkel waarmee α -effekte, porievorming en moontlik sellise met skerpioenvenoom van die genus *Parabuthus* op 'n koste-effektiewe manier aangetoon en onderskei kan word. Vir die ontwikkeling van die siftingstegniek is verdere doelstellings gestel naamlik:

1. Om te bewys dat die seltelstegniek betroubaar is en gebruik kan word in die siftingstegniek om die verskillende effekte van venome te onderskei.
2. Om vas te stel of bevriessing van die venoom die aktiwiteit beïnvloed. Vir hierdie doel is *P. schlechteri* Purcell, 1899 venoom gebruik.
3. Om veratridine as 'n model te gebruik om die α -effek in kardiaale miosiete met verskillende skerpioenvenome te onderskei.
4. Om mastoparan (melittin) as 'n model te gebruik om porievorming of membraandestabiliserende effekte aan te dui.
5. Om hemolise van eritrosiete te gebruik om kolloïedosmotiese lise van sellise as gevolg van disintegreerling van die selmembraan, te onderskei.

Die doel van hierdie studie was om 'n siftingstegniek te ontwikkel wat nog nie voorheen in die literatuur beskryf is nie. 'n Duidelike hipotese kon nie geformuleer word nie en aangesien daar verskeie faktore is wat die ontwikkeling

van so 'n siftingstegniek kan beïnvloed is die ondersoek van die invloed van hierdie faktore as doelstellings geformuleer.

HOOFSTUK 2

LITERATUURSTUDIE

2.1 MEDIESE BELANG VAN SKERPIOENVENOOM

Daar is ongeveer 1500 verskillende skerpioenspesies bekend en hulle behoort tot die klas Arachnida en die orde Scorpionidae. Die Buthidae Koch, 1837 skerpioenfamilie bestaan uit ongeveer 500 spesies. Die *Parabuthus* genus, wat aan hierdie familie behoort, kom wydverspreid in Suid-Afrika voor en die venoom van hierdie genus kan aanleiding gee tot patologiese simptome in die mens (Simard & Watt, 1990:436; Possani *et al.*, 1999:287).

Skerpioenvenoom is vanuit 'n biologiese oogpunt baie interessant en van mediese belang op grond van die teenwoordigheid van verskeie aktiewe komponente soos polipeptiede, ensieme, nukleotiede, lipiede, biogeniese amiene en ander onbekende komponente. Die venoomkomponente wat die meeste belangstelling by navorsers ontlok is die polipeptiede wat ionkanale, veral spanningsafhanklike natriumkanale (Na^+ -kanale) en kaliumkanale (K^+ -kanale), beïnvloed en sodoende aanleiding gee tot kliniese simptome. Die patofisiologie van skerpioeninvenoming verskil vir verskillende spesies wat verband hou met die verskil in samestelling van die venoom. Invenoming deur gevaarlike skerpioene tas veral die kardiovaskulêre stelsel, longe, spiere en verskeie kliere aan. Senuwee-eindpunte van die outonome senuweestelsel en die adrenale medulla word gedepolariseer wat lei tot die vrystelling van 'n groot aantal neurotransmitters, veral katesjolamienes, wat 'n groot effek op die hart het. Hierdie vrystelling van neurotransmitters lei tot 'n mengsel van simpatiese, parasimpatiese en paralitiese simptome. Die ernstigheidsgraad van simptome na invenoming is gewigs- en dosisafhanklik en daarom is die risiko vir kinders groter as vir volwassenes. Sistemiese simptome word gewoonlik nie met volwassenes geassosieer nie, hoewel hulle meer dikwels as kinders gestek

word. Lokale simptome behels dikwels 'n brandpyn en soms swelling en eritema. Hierdie simptome mag verskeie ure duur (Simard & Watt, 1990:434, 437-8; Omran & Abdel-Rahman, 1992:99).

Met die ontwikkeling van biochemiese en molekulêr-biologiese tegnieke is dit moontlik om toksienkomponente uit venoom te isoleer, te suiwer en te karakteriseer. Die venoomsamestelling word beïnvloed deur verskeie faktore wat dit moontlik maak dat toksiene van die venoom van dieselfde skerpioenspesie mag varieer as die skerpioene in verskillende geografiese gebiede voorkom (Simard & Watt, 1990:417-419; Omran & Abdel-Rahman, 1992:100).

Skerpioentoksiene is meestal polipeptiedkettings van 35-65 aminosure met 'n tipiese struktuur wat bestaan uit 'n driestring antiparallele β -plaat en 'n kort α -heliks. Die struktuur word deur drie of vier disulfiedbrûe gestabiliseer (Simard & Watt, 1990:419; Possani *et al.*, 1999:296).

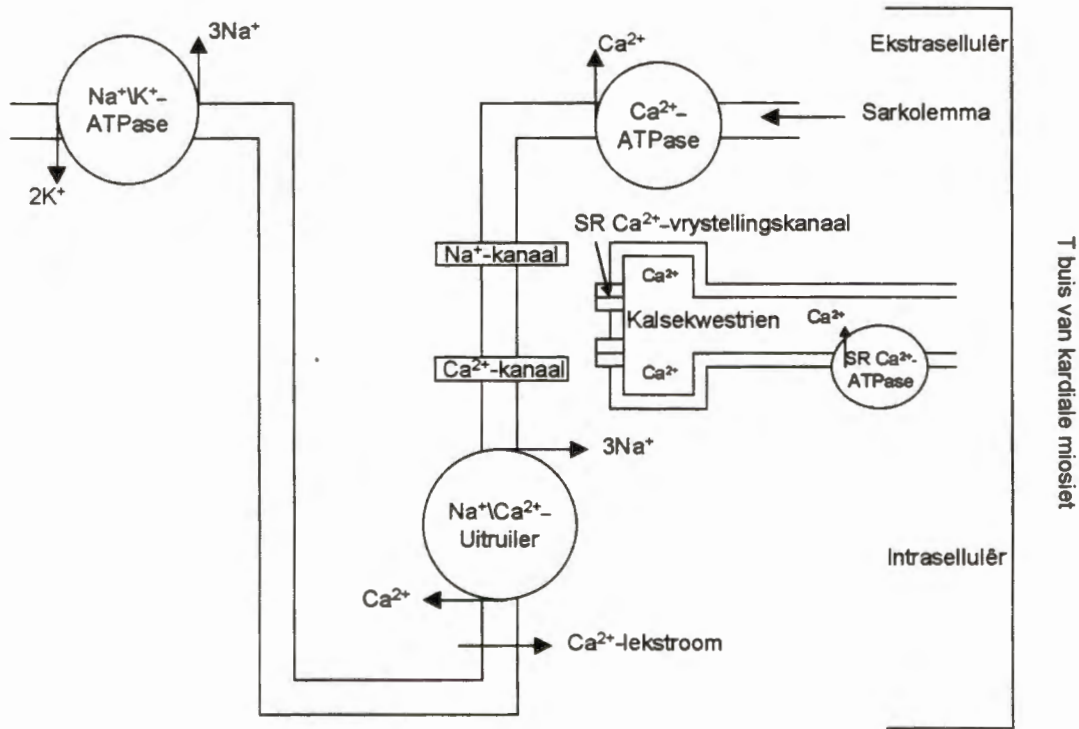
2.2 KARDIALE MIOSIETE

'n Tipiese kardiaale miosiet is 'n dwarsgestreepte, staafvormige sel, 10-30 μm breed en 80-150 μm lank. Indien kardiaale miosiete beskadig word, soos gebeur na blootstelling aan patologiese stimuli, vertoon die miosiet onomkeerbare hiperkontraktuur (verkort na 30-40 μm) en verloor sy staafvormige voorkoms (Borgers *et al.*, 1988:434; Ver Donck & Borgers, 1991:H1829; Macek *et al.*, 1994:213; Sarvazyn, 1998:297).

2.2.1 Kalsiumhomeostase

Die instandhouding van Ca^{2+} -homeostase is van groot belang in kardiaale miosiete, aangesien verhoogde $[\text{Ca}]_i$ lei tot Ca^{2+} -oorbelading, hiperkontraktuur en seldood. Kardiaale miosiete benodig 'n rustende $[\text{Ca}^{2+}]_i$ van minder as 200 nM vir die kontraktiele elemente om te ontspan na 'n kontraktsie. Wanneer die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ minder as 100 nM is behou 95% van die miosiete hul normale staafvormige

voorkoms, 50% miosiete vertoon hiperkontraktuur by 'n $[Ca^{2+}]_i$ van 400 nM en alle miosiete vertoon hiperkontraktuur by 'n $[Ca^{2+}]_i$ van 1 μ M (Chapman & Tunstall, 1987:81).



Figuur 2.1 Die intrasellulêre meganismes wat 'n rol speel in Ca^{2+} -homeostase tydens rustoestand.

Eksitasie-kontraksiekoppeling in die hart is die proses waartydens 'n aksiepotensiaal, deur middel van ionvloei deur ionkanale, die sel se kontraktiele apparaat aktiveer. Eksitasie (depolarisering van selmembrane) lei tot die opening van spanningsafhanklike Na^+ - en Ca^{2+} -kanale (Figuur 2.1). Die aanvanklike opwaartse beweging van die aksiepotensiaal word veroorsaak deur die Na^+ -influks via die Na^+ -kanaal en die plato word veroorsaak deur die Ca^{2+} -influks via die L-tipe Ca^{2+} -kanaal asook die omkeerfase van die Na^+Ca^{2+} -uitruiler (Barry & Bridge, 1993:1807; Terracciano *et al.*, 1998:652).

Die verhoogde $[Ca^{2+}]_i$ aktiveer die Ca^{2+} -vrystellingskanale van die sarkoplasmiese retikulum (SR) met gevolglike vrystelling van Ca^{2+} uit die intrasellulêre Ca^{2+} -store (Figuur 2.1). Die Ca^{2+} wat vrygestel word deur die SR inisieer 'n kontraksie deur aan die kontraktiele proteïene te bind. In die rustoestand word aktien en miosien geïnhibeer deur die troponien-tropomiosienkompleks, wat gebind is aan aktien. Sodra Ca^{2+} aan troponien-C bind vind konformasie-veranderinge van hierdie kompleks plaas en die inhibisie word opgehef, met gevolglike dwarsbruggie-interaksie en die verkorting van die kontraktiele elemente. Veranderinge in die affiniteit van die kontraktiele elemente vir Ca^{2+} , asook die $[Ca^{2+}]_i$, reguleer die ontwikkeling van kontrakieskrag in miosiete (Barry & Bridge, 1993:1810; Bers *et al.*, 1996:430). Verskeie chemiese middels kan die Ca^{2+} -homeostase aansienlik beïnvloed en sodoende die kontrakieskrag van individuele miosiete en gevolglik die kontrakieskrag van die hart as geheel beïnvloed.

Repolarisasie bevorder die $Na^+_{in}Ca^{2+}_{uit}$ fase van die uitruiler en gevolglik sal die $[Ca^{2+}]_i$ herstel. Vir die kontraktiele elemente om te ontspan moet die $[Ca^{2+}]_i$ herstel sodat Ca^{2+} van die troponien-C kan dissosieer. Daar is 'n aantal meganismes in kardiaal miosiete wat betrokke is by die herstel van $[Ca^{2+}]_i$:

1. Fosforilering van fosfolamban wat lei tot heropname van Ca^{2+} deur die SR se Ca^{2+} -ATPase pomp (Figuur 2.1) en gevolglike binding aan kalsekwestrien (in die SR),
2. die sarkolemma Na^+Ca^{2+} -uitruiler (Figuur 2.1) wat Ca^{2+} uit die sel uitvoer en verantwoordelik is vir 75% van die rustende Ca^{2+} -effluks,
3. die ATP afhanklike Ca^{2+} -pomp in die sarkolemma (Figuur 2.1) wat beskou word as 'n hoë affiniteit, lae kapasiteit Ca^{2+} -efflukssisteem en wat 'n kleiner rol speel as die Na^+Ca^{2+} -uitruiler, en
4. vulling van die Ca^{2+} -store in die mitochondria wat bepaal word deur die $[Ca^{2+}]_i$ en wat korttermyn (minute tot sekondes) verandering in $[Ca^{2+}]_i$ kan buffer.

Indien $[Ca^{2+}]_i$ nie herstel nie sal miosiete nie in staat wees om te ontspan nie en in hiperkontraktuur gaan (Callewaert, 1992:929; Barry & Bridge, 1993:1807; Bers

et al., 1996:430). Deur gebruik te maak van 'n model waar geïsoleerde kardiaale miosiete blootgestel word aan patologiese stimuli om Ca^{2+} -oorbelading te induseer, kan die gebeure tydens Ca^{2+} -oorbelading en gevolglike hiperkontraktuur op sellulêre vlak ondersoek word (Ver Donck & Borgers, 1991:H1831).

Lokale veranderinge in die ekstrasellulêre kalsiumkonsentrasie ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) is nie ongewoon *in vivo* nie aangesien Ca^{2+} -influks in selle die $[\text{Ca}^{2+}]_e$ in die beperkte interstisiële ruimtes verlaag wat dan die sel meer prikkelbaar maak. Algemene verlaging van $[\text{Ca}^{2+}]_e$ in bloedplasma mag lei tot 'n tetanussindroom en gevolglike konvulsies. Die potensiaalafhanklikheid van membraanstrome verskuif op 'n kenmerkende manier op grond van veranderinge in die $[\text{Ca}^{2+}]_e$. Verlaging van die $[\text{Ca}^{2+}]_e$ bevorder die ontstaan van spontane aksiepotensiale tydens depolarisering, aangesien die drempelwaarde vir aksiepotensiale verlaag en die prikkelbaarheid van die membraan verhoog (Dudel, 1989:27).

2.2.2 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -uitruiler

Die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -uitruiler speel 'n belangrike rol in Ca^{2+} -homeostase. Dit dra grootliks by tot die rustende Ca^{2+} -effluks en is verantwoordelik vir influks tydens depolarisasie (by ± -40 mV) deur om te keer. Die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -uitruilerstroom word deur verskeie navorsers ondersoek en is die eerste keer deur Kimura *et al.* (1986:596) en Mechmann & Pott (1986:598) in geïsoleerde kardiaale miosiete beskryf. Beukelmann & Wier (1989:499) het in dieselfde preparaat die uitruilerstroom geïsoleer deur die Na^+ - en Ca^{2+} -kanale te blokkeer asook die vrystelling van Ca^{2+} deur die SR te inhibeer. Diè navorsers het gevind dat 5 mM nikkelsensitiewe stroom (Beukelmann & Wier, 1989:499) verwys. Die resultaat met NiCl_2 is deur verskeie navorsers bevestig (Minezaki & Chapman, 1993:546; Kappl & Hartung 1996:2478). Wright *et al.* (1995:294) en Bers *et al.* (1996:430) het ekstrasellulêre Ca^{2+} verwyder en EGTA bygevoeg om te verseker dat die uitruiler volkome uitgeskakel word tydens eksperimentering.

Die Na⁺/Ca²⁺-uitruiler is 'n groot proteïen met 938-970 aminosure en 'n molekulêre massa van ongeveer 160 KDa. Dit bestaan uit elf transmembraansegmente met 'n groot hidrofiliese streek tussen die vyfde en sesde transmembraansegment. Die hidrofiliese streek is essensieel vir normale beheer en daar kom regulatoriese bindingsplekke voor waaraan sitoplasmiese Ca²⁺ moet bind vir aktivering van die transportaktiwiteit (Barry & Bridge, 1993:1806; Hryshko & Philipson, 1997:46-47; Fang *et al.*, 1998:C50).

Onder rustende toestande behels transportaktiwiteit die invloed van drie Na⁺-ione in ruil vir 'n Ca²⁺-ioon. Die netto elektrochemiese dryfkrag wat verantwoordelik is vir die uitruiling word deur die volgende vergelyking voorgestel:

$$A = 3\Delta_{\mu\text{Na}} - \Delta_{\mu\text{Ca}} \quad \text{waar}$$

A = die totale elektrochemiese dryfkrag (vrye energie)

$\Delta_{\mu\text{Na}}$ = energie beskikbaar in die elektrochemiese gradiënt vir Na⁺

$\Delta_{\mu\text{Ca}}$ = energie beskikbaar in die elektrochemiese gradiënt vir Ca²⁺

Indien die energie in die Na⁺-gradiënt drie keer groter is as dié in die Ca²⁺-gradiënt, beweeg Ca²⁺ uit die sel uit. Indien die Na⁺-gradiënt egter kleiner as die Ca²⁺-gradiënt is vind die teenoorgestelde plaas, die uitruiler keer om en Na⁺ beweeg uit die sel uit en Ca²⁺ beweeg die sel binne.

$$\therefore A = 3E_{\text{Na}} - 2E_{\text{Ca}} - E_{\text{m}} \quad \text{waar}$$

E_{m} = membraanpotensiaal

E_{Na} = Na⁺-ewewigspotensiaal

E_{Ca} = Ca²⁺-ewewigspotensiaal

Indien ewewig bereik is, is A = 0 en

$$E_{\text{eq}} = 3E_{\text{Na}} - 2E_{\text{Ca}}$$

E_{eq} = ewewigspotensiaal

Die omkeerpotensiaal waar die uitruiler omkeer is dieselfde as die ewewigspotensiaal (ongeveer -40 mV) in rustende ventrikulêre miosiete.

Die $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ -uitruiler is duidelik spanningsafhanklik en in rustende miosiete met 'n membraanpotensiaal van -90 mV wat meer negatief as die E_{eq} is, funksioneer die uitruiler om Na^+ in die sel en Ca^{2+} uit die sel te voer (Barry & Bridge, 1993:1806-1807).

2.2.3 Invloed van intrasellulêre natriumkonsentrasie

Tydens depolarisasie kan Na^+ -influks deur die Na^+ -kanaal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beïnvloed deur die $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ -uitruiler. 'n Verhoging in $[\text{Na}^+]_i$ lei tot 'n groter waarskynlikheid dat die uitruiler sal omkeer en Ca^{2+} in die sel sal voer (Chapman & Tunstall, 1987:81; Bers *et al.*, 1990:C951; Itogawa *et al.*, 1996:404).

Indien die aksiepotensiaal verleng, word die effluks van Ca^{2+} deur die uitruiler as gevolg van die membraanpotensiaal onderdruk. Die $[\text{Na}^+]_i$ verhoog, die energie beskikbaar om Ca^{2+} uit te voer word beïnvloed en dit lei tot 'n verhoogde $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Middels wat die kardiaale aksiepotensiaal verleng induseer sodoende Ca^{2+} -oorbelading. Hierdie Ca^{2+} -oorbelading mag spontane Ca^{2+} -vrystelling vanuit die SR veroorsaak en aanleiding tot aritmieë in die hart gee.

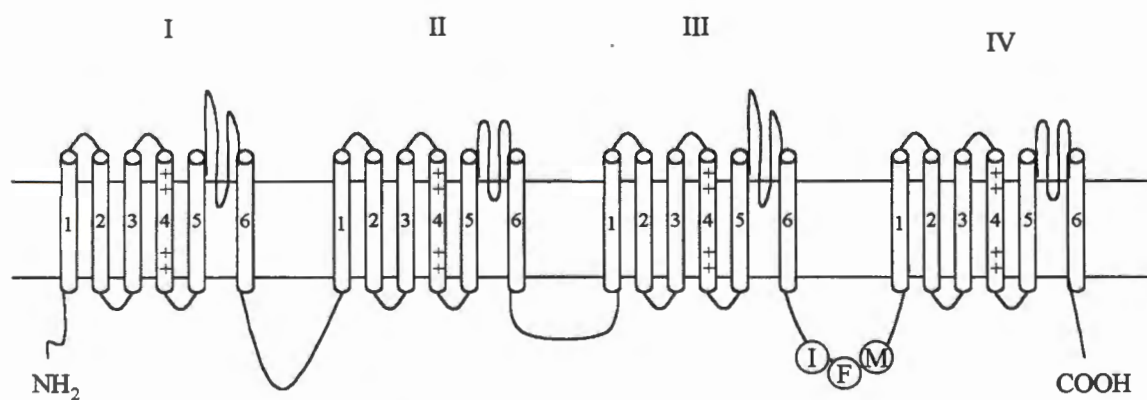
Digitalis glikosiede wat die Na^+K^+ -pomp inhibeer kan $[\text{Na}^+]_i$ verhoog en sekondêr tot 'n verhoging van $[\text{Ca}^{2+}]_i$ lei as gevolg van die $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ -uitruiler. Van hierdie Ca^{2+} word opgeneem in die SR en is dan beskikbaar vir vrystelling met die daaropvolgende kontraksie wat 'n kragtiger kontraksie tot gevolg sal hê (Ver Donck & Borgers, 1991:1833; Barry & Bridge, 1993:1813).

2.3 DIE NATRIUMKANAAL

Na^+ -kanale speel 'n belangrike rol in die fisiologie van die sel deurdat dit bydra tot die koördinering van verskeie fisiologiese prosesse soos vinnige depolarisasie

en geleiding van elektriese impulse deur sensuwe-, spier- en hartselle. Spanningsafhanklike Na^+ -kanale is integrale membraanproteïene wat verantwoordelik is vir die ontstaan van aksiepotensiale in prikkelbare weefsel. Tydens die aksiepotensiaal is daar influks van Na^+ -ione in die sel in wat 'n belangrike rol in eksitasie-kontraksie koppeling in die hart speel. Soogdiermiosiete bevat ongeveer 100 000 Na^+ -kanale ($1\text{-}50 \text{ Na}^+$ -kanale/ μm^2) teenoor veel minder Ca^{2+} - en K^+ -kanale (Marban *et al.*, 1998:647; Gordon *et al.*, 1996:8034).

Na^+ -kanale bestaan uit verkeie subeenhede waarvan die α -subeenheid (Figuur 2.2), wat uit ongeveer 2000 aminosure (240-280 kDa) bestaan, essensieel is vir kanaalfunksie. β -Subeenhede wat met die α -subeenheid geassosieer is kan die hekkinetika, spanningsafhanklikheid en sensitiwiteit van die kanaal beïnvloed. Die α -subeenheid bestaan uit vier homoloë streke wat elkeen ses transmembraansegmente bevat (Figuur 2.2). Die S5 en S6 segmente, van elk van die vier streke, vou saam en vorm so 'n sentrale transmembraanporie. Die samestelling van die porie bepaal die selektiwiteits- en geleidingseienskappe van die kanaal (Catterall 1992:S20, S29; Gordon *et al.*, 1996:8035; Marban *et al.*, 1998:647, 649).



Figuur 2.2 Skematiese voorstelling van 'n Na^+ -kanaal α -subeenheid.

Na⁺-kanale, net soos baie ensieme, kan maklik konformasie-veranderinge ondergaan. Hodgkin en Huxley was die eerste navorsers wat die kinetiese veranderinge van die Na⁺-kanaal beskryf het (Grant 1991:322). Die klassieke siening van Hodgkin en Huxley behels dat die beweging van ione deur Na⁺-kanale beheer word deur twee hekke, naamlik die aktiveringshekk (m-hekk) en inaktiveringshekk (h-hekk). Tydens die rustoestand is die aktiveringshekk toe en die inaktiveringshekk oop, waarna depolarisasie van die membraan veroorsaak dat die aktiveringshekk oopmaak. Beide die aktiverings- en inaktiveringshekke is nou oop en 'n vinnige influks van Na⁺-ione vind plaas wat tot verdere depolarisasie en influks van Na⁺ lei. Hierdie inwaartse Na⁺-stroom is verantwoordelik vir die vinnig stygende fase van die aksiepotensiaal. Sodra die inaktiveringshekk toemaak en inaktivering gevolglik plaasvind neem die inwaartse beweging van Na⁺ af en word die stroom getermineer. Inaktivering is saam met die uitwaartse K⁺-stroom verantwoordelik vir repolarisasie van die aksiepotensiaal. Die rustende membraanpotensiaal moet bereik word voor die membraan sy deurlaatbaarheid vir Na⁺ herwin en depolarisasie weer kan plaasvind (Simard & Watt, 1990:427; Grant 1991:322). Na⁺-kanale kan dus in drie verskillende fases wees nl. rustend, geaktiveerd of geïnaktiveerd.

Aktivering (oopmaak van die m-hekk) word veroorsaak deur spanningsafhanklike konformasie-veranderinge van die kanaalproteïen. Na⁺-kanale maak slegs vir 'n kort tydjie oop tydens depolarisasie en nie alle kanale is gelyktydig oop nie. Ioonkonduktansie deur Na⁺-kanale is een van die vinnigste proteïengemedieerde prosesse in die liggaam. 'n Membraanproteïen wat reageer op die verandering in membraanpotensiaal moet gelaai en/of dipolêre aminosuurresidue in die elektriese veld van die membraan hê. Veranderinge in die membraanpotensiaal oefen dan krag uit op die proteïengebonde dipole en ladings. Indien die energie van die ladings groot genoeg is, lei dit tot konformasie-veranderinge in die proteïen na 'n nuwe stabiele toestand waar die netto lading of die lokalisasie van die lading binne die elektriese veld van die membraan, verander het. Op grond hiervan het Hodgkin & Huxley voorspel dat aktivering van die Na⁺-kanaal die

beweging van ses positiewe ladings van die intrasellulêre na die ekstrasellulêre kant van die membraan vereis (Catterall 1992:S17). Die positief gelaai S4 segmente dien as aktiveringsensors. Tydens die aktiveringsproses beweeg gelaai aminosure in elke S4 segment fisies deur die membraan deur 'n nou deurgang wat gevorm word deur ander (nog ongeïdentifiseerde) streke van die kanaal (Marban *et al.*, 1998:650).

Die m-hek wat oopmaak tydens aktivering en die h-hek wat toemaak tydens inaktivering, funksioneer onafhanklik hoewel die twee prosesse gekoppel is (Cahalan, 1975:512; Grant, 1991:322). Koppeling van aktivering en inaktivering het tot gevolg dat inaktivering stadig by klein en vinnig by groot depolarisasies plaasvind (Tang *et al.*, 1998:639). Verskillende proteïenkomponente wat op die intrasellulêre oppervlak van die kanaal geleë is, veroorsaak vinnige en stadige inaktivering. Bepaalde aminosure, naamlik isoleusien (I), fenielalanien (F) en methionien (M), in die intrasellulêre lus tussen streek III en streek IV (Figuur 2.2), veroorsaak vinnige inaktivering deurdat dit met 'n skarniermeganisme die ruimte wat deur die S4-S5-verbindingselemente van streke III en IV gevorm word, van die intrasellulêre kant blokkeer (bal-en-ketting model). Die strukturele bepalers van stadige inaktivering is minder bekend, maar dit blyk dat aminosure in die poriestreek daarby betrokke is (Marban *et al.*, 1998:650). Inaktivering van die Na⁺-kanaal word vertraag deur verskeie neurotoksiene, insluitende die α -skerpioentoksiene (Catterall 1992:S28).

2.3.1 Invloed van toksiene op die Na⁺-kanaal

Neurotoksiene en ander chemiese komponente wat die Na⁺-kanaal se funksie wysig, beïnvloed een of meer van die drie essensiële funksionele eienskappe van die Na⁺-kanaal nl. spanningsafhanklike aktivering, inaktivering of selektiewe ioonkonduktansie. Hierdie toksiene bind met hoë affiniteit en spesifisiteit aan Na⁺-kanale en word vir navorsingsdoeleindes gebruik om die proteïenkomponente van die Na⁺-kanaal, asook die funksionele gebiede van die kanaal te identifiseer (Catterall 1992:S17).

2.3.1.1 Skerpioentoksiene

Alle bekende Na⁺-kanaal neurotoksiene toon ooreenkomste wat hul struktuur betref – hulle is swak basis proteïene, is saamgestel uit 60-76 aminosure en word gestabiliseer deur vier disulfiedbrûe. Die α -subeenheid van die Na⁺-kanaal bevat verskeie reseptorbindingsplekke vir neurotoksiene en ten minste ses van hierdie reseptorbindingsplekke is reeds geïdentifiseer. Skerpioentoksiene met Na⁺-kanale as spesifieke teiken beïnvloed meestal die hekmeganisme van die kanaal en is aanvanklik op grond van hul farmakologiese effekte in twee groepe verdeel nl. α - en β -toksiene. Skerpioen α -toksiene bind spanningsafhanklik aan reseptorbindingsplek 3 van die Na⁺-kanaal en vertraag of blokkeer die inaktiveringsproses. Neurotoksienbinding by ekstrasellulêre streke beïnvloed die inaktiveringsproses by die S3-S4-verbindingselemente van streek IV van die kanaal. Dit lei tot 'n verlenging van die aksiepotensiaal en tot akkumulering van intrasellulêre Na⁺ en gevolglik Ca²⁺. Dit word as 'n tipiese α -effek van skerpioentoksiene beskou (Simard & Watt, 1990:428; Possani *et al.*, 1999:292-293; Catterall, 1992:S18; Gordon *et al.*, 1996:8034; Marban *et al.*, 1998:652).

Skerpioen β -toksiene bind spanningsonafhanklik aan reseptorbindingsplek 4 van die Na⁺-kanaal. Hierdie toksiene beïnvloed aktivering van die Na⁺-kanaal deur die spanningsafhanklikheid na meer negatiewe membraanpotensiale te verskuif sonder om inaktivering te beïnvloed (Catterall, 1992:S18).

2.3.1.2 Veratridine

Veratridine is 'n alkaloid wat volgens die meeste navorsers van die lipiedfase van die membraan aan reseptorbindingsplek 2 bind. Veratridine is afkomstig van sabadilla-sade wat aanvanklik gebruik is as insekdoder deur Indiane. Sedert ongeveer 1970 word dit kommersieel vervaardig en wêreldwyd gebruik vir navorsingsdoeleindes. Veratridine verleng die tyd wat die Na⁺-kanaal oop is deur inhibering of vertraging van Na⁺-kanaal inaktivering (Yamashita *et al.*, 1999:1864; Tamura *et al.*, 1996:200; Itogawa *et al.*, 1996:401) met 'n gevolglike

verskuiwing van die spanningsafhanklikheid vir aktivering na meer negatiewe membraanpotensiale. As gevolg hiervan word veratridine as 'n Na^+ -agonis beskou en veroorsaak dit, soos die α -skerpioentoksiene, akkumulering van Na^+ in selle (Catterall, 1992:S18; Ulbricht, 1998:2,43; Yamashita *et al.*, 1999:1864-1865). Tamura *et al.* (1996:200) het met veratridine Ca^{2+} -oorbelading in miosiete geïnduseer en gevind dat hiperkontraktuur intree as gevolg van 'n verhoging in $[\text{Na}^+]$, en die daaropvolgende omkeer van die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -uitruiler.

2.4 PORIEVORMING

Selmembrane van soogdiere bestaan uit dubbelloepiedlae waarin integrale membraanproteïene, oppervlak-geassosieerde (perifere) membraanproteïene en koolhidrate voorkom. Hierdie selmembrane is slegs sowat 7-9 nm in deursnit, maar hou selle met 'n deursnit van 10-15000 nm intakt. Ongeveer die helfte van die membraan se gewig bestaan uit lipiede. Lipiede is amfipaties met hidrofiliese koppe en hidrofobiese sterte. Die proteïene, wat die membraan deurspan en ionkanale vorm, het polêre streke aan elke oppervlak en een of verskeie intrasellulêre hidrofobiese kante. Ionkanale en ionpompe hou die kenmerkende intrasellulêre ionsamestelling, wat noodsaaklik is vir normale selffunksionering, in stand. Enige verandering in die deurlaatbaarheid van die membraan hou gevolglik 'n bedreiging vir die voortbestaan van die sel in, aangesien lekkasies wat groot genoeg is en nie herstel kan word nie lei tot seldood (Ojcius *et al.*, 1998:44,48; Bhakdi & Tranum-Jensen, 1988:1).

Sitolitiese proteïene en peptiede het verskeie defensiewe en offensiewe funksies in lewende organismes. In die geval van antibakteriële en mikrobiese peptiede help dit met beskerming deur indringers te vernietig en in die geval van venome en toksiene help dit met verdediging. Beide die rolle word vervul deur sellise asook ensiematiese en nie-ensiematiese organismes. Peptiede wat as defensiewe en offensiewe verbindings optree staan bekend as sitolisiene, aangesien hulle lities is vir selle en bakterieë deur indringing, destabilisering of

vernietiging van selmembrane en verandering van membraanpotensiale en ioongradiënte (Verdonck *et al.*, 2000:247; Kini & Evans, 1989:277).

Die antibakteriële werking van sommige porievormende peptiede wek tans groot belangstelling by navorsers as gevolg van die vinnige ontwikkeling en verspreiding van bakteriële weerstand teen konvensionele antibiotika. Baie porievormende peptiede het breë antimikrobiese selektiwiteit en lae bakteriële weerstand met die voordeel dat dit maklik chemies gesintetiseer kan word. Sitolitiese peptiede, wat kankerselle as teiken het, kan moontlik lei tot die ontwikkeling van nuwe middels vir die behandeling van kanker. Tans lok peptiede wat unieke interaksies met selmembrane toon en geneeskundige potensiaal het, veral belangstelling (Verdonck *et al.*, 2000:248; Ojcius *et al.*, 1998:53). Vir die ontwikkeling en ontdekking van nuwe middels is dit egter nodig om die werking van antimikrobiese peptiede en proteïene te verstaan.

Sellise kan op twee maniere plaasvind naamlik kolloïedosmotiese en nie-kolloïedosmotiese lise. Tydens kolloïedosmotiese lise vind membraan-destabilisering plaas of 'n diskrete transmembraanporie word gevorm waardeur klein osmotiese komponente kan beweeg, maar nie groter molekule soos proteïene nie. As gevolg hiervan word die intrasellulêre omgewing hiperosmoties en 'n netto influks van water met gevolglike selswelling ontstaan. Sellise kan duidelik in eritrosiete waargeneem word met die vrystelling van hemoglobienmolekule. Die hemoglobienmolekule het 'n effektiewe deursnee van 4.8 nm en kan aanvanklik nie deur die klein porie beweeg nie, maar selswelling lei tot uiteindelijke sellise en vrystelling van die hemoglobien. Tydens nie-kolloïedosmotiese lise is die beskadiging van die selmembraan van so 'n aard dat sellise byna onmiddellik plaasvind. Laasgenoemde sellise word gewoonlik ensiematies geïnduseer deur onder andere fosfolipase A₂ (Chen *et al.*, 1997:685; Menestrina *et al.*, 1994:251; Park *et al.*, 1994:166; Yamanaka *et al.*, 1987:2859-69).

Die effek van sitolitiese peptiede op selmembrane het gelei tot konseptualisering van porieë. Porieë word beskou as geïsoleerde defekte van die membraanstruktuur waardeur polêre molekule met redelike gemak kan beweeg. Meeste porieë is uitgevoer met proteïene hoewel sommige porieë nie proteïenwande reg rondom het nie en gedeeltelik gevorm word deur die kante van die lipiedmembraan. Porieë word gekenmerk deur membraan-ingevoegde streke waar die een kant hidrofobies reageer met die membraanlipiede, terwyl die ander kant hidrofilies is en deurgang verleen aan ione en klein molekule. Die apolêre gedeeltes van die proteïene assosieer met die membraanlipiede sonder om die membraan verder te beïnvloed. Die proteïene is stewig geanker in die membraan en vorm die porie (Bhakdi & Tranum-Jensen, 1988:2).

Porievormende peptiede of proteïene bind òf aan die lipiede òf aan die proteïene in die selmembraan. 'n Groot aantal van die sitolitiese proteïene en peptiede bind aan die negatief gelaaide lipiede. Kationiese aminosuurresidue in die peptiedstruktuur blyk noodsaaklik te wees vir die interaksie met die negatief gelaaide lipiede van die membraan. Die struktuur van 'n peptied speel 'n belangrike rol by die invoeging van die peptied in die membraan en interaksie met die membraankomponente mag die litiese eienskappe van die peptied bepaal. Beide kationiese en hidrofobiese streke is nodig vir sitolitiese aktiwiteit (Arbuzova & Schwarz, 1999:2; Rudenko & Nipot, 1996:754; Kini & Evans, 1989:283).

Daar is verskillende modelle waardeur porieë geïnduseer kan word. Een so 'n model is die "barrel-stave" model, waar toksienmonomere aan die membraan bind. Die hidrofobiese oppervlak van die toksien dring gevolglik die membraan binne en lei tot die vorming van 'n porie. In hierdie model is 'n hidrofobiese oppervlak van die amfipatiese α -heliks of β -plaat van kritiese belang. In die "carpet-like" model is die peptiede waarskynlik te kort om oor die membraan te span. Peptiedmonomere bind aan die selmembraan deur elektrostatische kragte tussen die kationiese residue en die anioniese selmembraanoppervlak en lê op

'n sogenaamde “carpet-like” manier op die oppervlak van die membraan. Die membraan word beskadig sodra die drempelkonsentrasie van die peptied bereik word. Hoewel onwaarskynlik, is vorming van transmembraanporieë ook moontlik met hierdie model. Die “wormhole” model mag as 'n tussenstadium voorkom. Volgens die “wormhole” model vorm lipiede saam met die peptied die wande van die porie. 'n Verhoging in die peptiedkonsentrasie lei tot sigbare disintegrasië van die lipieddubbellaë van die membraan. Ten spyte van die verskille tussen die modelle is dit duidelik dat kationiese ladings en die hidrofobiese oppervlak van die toksien essensieel is vir porievorming (Chen *et al.*, 1997:688; Bechinger, 1999:173).

2.4.1 Die rol van Ca^{2+}

Hoewel sommige porievormende toksiene Ca^{2+} -ione benodig vir binding en hulle litiese aktiwiteit (Menestrina *et al.*, 1994:250; Ojcius *et al.*, 1998:47), dui navorsing ook op die beskermende rol van Ca^{2+} teen sitotoksiteit veroorsaak deur sekere virusse, bakterieë, diertoksiene, komplement en sintetiese komponente soos kationiese proteïene. Die beskermende rol van Ca^{2+} op die selmembrane van plantselle is al in 1914 beskryf en op membrane van neurone in 1957 (Mahadevan *et al.*, 1990:513). Die beskerming van die selmembraan teen skade word beskou as een van Ca^{2+} se fisiologiese rolle (Park *et al.*, 1994:166). Die meganisme waardeur die beskerming plaasvind is nog grootliks onbekend en verskil by verskillende toksiene. Dit is moontlik dat die laterale beweging van die toksiene wat nodig is om 'n transmembraanporie te vorm deur Ca^{2+} voorkom word soos in die geval van die staphylococcus α -toksien. Die inhiberende effek van Ca^{2+} op hemolise geïnduseer deur *Vibrio vulnificus* is egter nie die gevolg van inaktivering van die toksien, inmenging met binding of oligomerisasië van die toksien op die membraan nie. Porieë veroorsaak deur *Vibrio vulnificus* het 'n deursnee van ongeveer 1 nm, terwyl Ca^{2+} 'n effektiewe deursnee van 1.2 nm het en moontlik 'n inhiberende effek uitoefen deurdat dit as osmotiese beskermer optree (Park *et al.*, 1994:170). Lipiedladings speel 'n rol by die binding van peptiede aan bakteriële membrane. Ca^{2+} en ander divalente

katione bind baie effektief aan negatief gelaaide lipiede en indien 'n membraan 'n hoë persentasie lipiede bevat, skerm divalente katione moontlik die negatiewe ladings van die membraan af. Ca^{2+} en divalente katione kompeteer ook met die toksiene vir binding aan die membraan (Hetru *et al.*, 2000:663).

2.4.2 Porievorming deur natuurlike toksiene

2.4.2.1 Skerpioenvenoom

Skerpioenvenoom mag 'n nuwe bron van amfipatiese kationiese peptiede verteenwoordig waar verskeie funksies in die oorlewingstrategie gekombineer is, naamlik chemiese effektiwiteit om potensiële vyande af te skrik en verdediging teen bakteriële infeksies. Bo en behalwe die neurotoksiese peptiede, wat α -effekte op Na^+ -kanale het, is daar in die venoom van skerpioene wat tot die Scorpionidae en Buthidae families behoort, peptiede geïsoleer wat waarskynlik non-selektiewe porieë in selmembrane vorm. Met *P. schlechteri* venoom is degranulering van menslike granulose aangetoon en die porievormende komponent is geïsoleer. Geen degranulering is gevind met *P. granulatus* venoom nie. Aktiwiteit is wel opgemerk in die venoom van *P. transvaalicus*-Purcell, 1899, *P. villosus* (Peters, 1862) en *P. raudus* (Simon, 1888) (Verdonck *et al.*, 2000:256).

Verdonck *et al.* (2000:256) het in slegs 50% van die monsters van *P. schlechteri* venoom wat ondersoek is degranuleringsaktiwiteit gevind. Na bevriesing, stoor en ontvriesing van die venoom kom dit voor asof die porievormende komponent se aktiwiteit afneem, hoewel die effek op die Na^+ -kanaal stabiel bly. Hierdie variasie kon tot dusver nog nie verklaar word nie. Porievormende komponente toon nie die strukturele stabiliteit wat by kort- en langkettingpeptiede, wat 'n invloed op ionkanale uitoefen, gevind word nie. Laasgenoemde molekule toon baie voue en word gestabiliseer deur drie of vier disulfiedbrûe. Porievormende peptiede bevat geen sisteïen in die molekulêre struktuur vir die vorming van disulfiedbrûe nie en dit hou moontlik verband met die labiliteit van die molekule.

2.4.2.1.1 Parabutoporin

Die porievormende peptied in *P. schlechteri* venoom is geïsoleer en staan bekend as parabutoporin (Verdonck *et al.*, 2000:253). Hierdie peptied word as 'n nuwe klas porievormende peptiede beskou. Parabutoporin veroorsaak lekstrome by dorsale wortelgangliaselle (wat dui op die porievormende eienskap) en veroorsaak degranulering van menslike granulosiete, 'n effek wat ooreenstem met die effek van mastoparan. Parabutoporin het 'n molekulêre massa van 5033 Da, bestaan uit 45 aminosure en het 'n unieke primêre struktuur wat geen ooreenkomste toon met bekende porievormende peptiede nie. Die aminosuur volgorde is soos volg:

FKLGSFLKKAWKSKLAKKLRAKGKEMLKDAYAKGLLEGGSEEVPGQ

Uit die volgorde is dit duidelik dat sisteïen afwesig is en dat daar geen disulfiedbrûe in die struktuur is nie. Parabutoporin is 'n kationiese peptied wat ryk is aan lisien. Daar is sewentien gelaaië residue naamlik elf lisien- (K), een arginien- (R), een aspartaat-(D) en vier glutamaat (E)-residue. Die positiewe en negatiewe streke kom aan teenoorgestelde kante van die molekule voor. Die sekondêre struktuur vertoon, volgens voorlopige interpretasie, 'n amfipatiese α -heliks vir die grootste gedeelte van die peptied met polêre hidrofiliese en apolêre hidrofobiese aminosuursykettings aan teenoorgestelde kante van die heliks (Verdonck *et al.*, 2000:253).

Behalwe vir die indusering van lekstrome en degranulering kan parabutoporin verskeie ensiematiese reaksies, soos Ca^{2+} -verwante funksies en -reaksies, ook beïnvloed (Verdonck *et al.*, 2000:248). Parabutoporin verhoog $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in granulosiete en navorsing het bewys dat die verhoging plaasvind sonder Ca^{2+} influks. Hierdie verhoging is dus nie verwant aan porievorming nie. Parabutoporin verhoog $[\text{Ca}^{2+}]_i$ waarskynlik deur 'n reeks G-proteïen-afhanklike sellulêre prosesse. Die peptiedkonsentrasie wat verantwoordelik is vir Ca^{2+} -

vrystelling mag moontlik laer wees as die konsentrasie nodig vir porievorming (Verdonck *et al.*, 2000:258).

Dit wil voorkom asof parabutoparin 'n dubbele effek het, soos waargeneem met mastoparan en melittin. Die porievormende peptiede van mastoparan en melittin het 'n depolariserende effek op nokiseptore en dra potensieël by tot die neurale prikkelbaarheid en induksie van pyn. Verder lei hierdie toksiene ook tot die degranulering van mastselle en dra sodoende by tot die vinnige verspreiding van die toksiene deur die weefsel. Daar blyk heelwat ooreenkomste te wees tussen parabutoparin, mastoparan en melittin en laasgenoemde twee toksiene word vervolgens in meer besonderhede bespreek.

2.4.2.2 Mastoparan

Mastoparan van die *Vespula lewissi* wespe is 'n toksiese tetradekapeptied wat saamgestel word uit 14 aminosure. Mastoparan stem in baie opsigte ooreen met melittin en neem 'n α -heliks konformasie aan wanneer assosiasie met die selmembraan plaasvind. Die molekule is amfipaties met polêre en apolêre kante op die heliksstruktuur. In teenstelling met melittin (wat bestaan uit 26 aminosure) is mastoparan se α -heliksstruktuur nie lank genoeg om oor die membraan te span nie hoewel mastoparan wel porieë induseer. Die samestelling van mastoparan-geïnduseerde porieë is egter nog onbekend en ondersoek met lipiedvesikels toon dat die meeste mastoparanmolekule op die membraanoppervlak gaan lê met hul polêre kante gerig na die waterige medium. Die moontlikheid dat van die peptiede dieper in die membraan indring tydens porievorming is nie uitgesluit nie, aangesien slegs 'n klein hoeveelheid peptied vir porievorming nodig is (Arbuzova & Schwarz, 1999:140).

Mastoparan induseer porieë, maar aktiveer ook G-proteïene en het 'n stimulerende effek op menslike miokardiale fosfolipase C (PLC). PLC verhoog die $[Ca^{2+}]_i$ deur die stimulering van twee intrasellulêre boodskappers, naamlik diasielgliserol (DAG) en inositoltrifosfaat ($InsP_3$). DAG stimuleer proteïenkinase

C (PKC) en inisieer 'n komplekse fosforilasiekaskade, terwyl InsP_3 Ca^{2+} vanuit die intrasellulêre store vrystel. PKC vertraag die heropname van Ca^{2+} deur die SR en kan so die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beïnvloed. Die vrystelling van Ca^{2+} uit die intrasellulêre store, soos geïnduseer deur InsP_3 , is nie genoeg om Ca^{2+} -oorbelading te induseer nie, maar dit medieer 'n transmembraan Ca^{2+} -influks in verskeie selle en dra waarskynlik so by tot die verhoging van $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Baie hormone, neurotransmitters en groeifaktore induseer hul biologiese respons deur die aktivering van PLC ensieme. In soogdierharte neem PLC deel aan die regulering van kontraksiekrag deur die Ca^{2+} -homeostase te beïnvloed deur middel van InsP_3 . Die stimulerende effek van mastoparan op miokardiale PLC is aminosuurvolgorde spesifiek (Schnabel *et al.*, 1997:31; Bian *et al.*, 1998:2107; Felzen *et al.*, 1997:725).

2.4.2.3 Melittin

Melittin is 'n basiese amfipatiese peptied van 26 aminosure met 'n molekulêre massa van 2840 Da en 'n α -heliks konfigurasie. Melittin is die hoofbestanddeel van die venoom van die heuningby *Apis mellifera* en is wateroplosbaar. Die aminoterminaalvolgorde is tipies hidrofobies, terwyl die karboksielterminale 'n hidrofiliese volgorde het. Wanneer die struktuur van melittin verander word, soos wanneer die heksapeptied by die karboksielterminus verwyder word, of wanneer die lisienresidue gemodifiseer word, verloor die toksien sy litiese aktiwiteit. Die kationiese residue is dus van groot belang. Melittin vorm transmembraanporieë en vorm kanaaloligomere met hul hidrofobiese kant na die lipiedmembrane en hidrofiliese kant na die porie (Bernheimer & Rudy, 1986:130; Dempsey, 1990:144).

Melittin verhoog $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in verskeie selstipes deur die depolarisering van selmembrane en gevolglike indirekte verhoging van Ca^{2+} deur ekstrasellulêre kontraksiekoppeling. Melittin aktiveer PLC en ook weefselfosfolipase A_2 (Fletcher *et al.*, 1996:1302).

HOOFSTUK 3

EKSPERIMENTELE METODES

3.1 ENSIEMATIESE ISOLERING VAN MIOSIETE

Vir hierdie studie is ventrikulêre miosiete ensiematies geïsoleer uit Sprague Dawley rotharte deur gebruik te maak van die Langendorff perfusiesisteam. Die metode vir ensiematiese isolering is aanvanklik beskryf deur Mitra en Morad (1985:H1056-H1057) en later verfyn deur Tytgat (1994:280-281).

Opsommend is die prosedure soos volg:

- Die rot word op 'n eties goedgekeurde wyse eers verdoof, gedood deur dislokasie van die servikale werwels, waarna die hart verwyder en deur middel van 'n kanule in die aorta aan die Langendorff perfusiesisteam gekoppel word.
- Die temperatuur word deurgaans by 37 °C gehandhaaf en die oplossings word met O₂ deurborrel.
- Die hart word vir 5 minute met Tyrode (Tabel 3.1) geperfuseer.
- Daarna word oorgeskakel na 'n Ca²⁺-vrye oplossing (Tabel 3.1) vir 'n verdere 5 minute. Hierdie Ca²⁺-vrye oplossing was die residuele bloed uit die weefsel uit en verswak die intersellulêre sement van die interkallêre skywe (Bkaily *et al.*, 1984:H1018).
- Vervolgens word die miosiete geïsoleer deur vir 5-6 minute met 6 mg kollagenase tipe II (Sigma) en 3,5 mg protease tipe XIV (Sigma) opgelos in 40 ml Ca²⁺-vrye oplossing te perfuseer. Hierdeur word die glikokaliks (oppervlaklaag van die sarkolemma) verwyder en die selle by die interkallêre skywe losgemaak van mekaar.
- Om die kalsiumparadoksverskynsel te voorkom word die hart met 'n 0,2 mM CaCl₂-oplossing vir 'n verdere 5 minute geperfuseer.

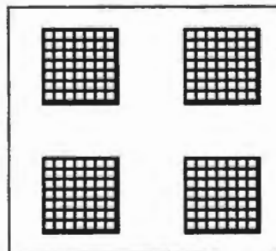
- Die hart word van die sisteem verwyder en die ventrikels word in klein stukkie gesny. Die stukkie word in 'n beker in die 0,2 mM CaCl₂-oplossing geskud om die miosiete vry te stel.
- Na 'n verdere 5-10 minute word die supernatant afgesuig en die miosiete met nuwe Ca²⁺-vrye oplossing met 0,2 mM CaCl₂ gespoel.
- Laastens word die miosiete met Tyrode-oplossing gespoel.

3.2 SELTELTEGNIK GEBASEER OP MORFOLOGIE VAN KARDIALE MIOSIETE

Vir hierdie tegniek is gebruik gemaak van die beginsel dat, wanneer kardiaale miosiete blootgestel word aan patologiese toestande, die meerderheid selle onomkeerbare hiperkontraktuur vertoon as gevolg van Ca²⁺-oorbelading (Sarvazyan, 1998:297; Ver Donck & Borgers, 1991:H1829; Borgers *et al.*, 1988:434). Miosiete in Tyrode (kontrole) vertoon byna geen morfologiese veranderinge tydens die duur van 'n eksperiment nie.

Opsommend is die metode soos volg:

- Vir hierdie eksperimente is gebruik gemaak van 'n "perspex" seltelkamer met vier telbadjies van 1cm x 1cm met 'n geruite bodem (Figuur 3.1).



Figuur 3.1 Seltelkamer met vier telbadjies.

- Vir opnames is in elkeen van die telbadjies 150-200 µl van 'n bepaalde ekstrasellulêre badoplossing en 25 µl miosiete (gesuspendeer in Tyrode) geplaas.
- Die lewende, staafvormige miosiete in 'n aantal blokkies (willekeurig geselekteer) van die telbadjie is onder 'n Olympus omkeermikroskoop getel.

tot 'n totaal van ongeveer 60 miosiete bereik is. Die tyd, aantal miosiete en posisie van die blokkies is genoteer.

- Hierdie tellings is met 10 minute tussenposes vir 'n totale tydsverloop van 50 minute herhaal.
- Die persentasie seldood is volgens hierdie tellings bereken deur gebruik te maak van die formule:

(Staaformige – geronde miosiete \ Totale aantal miosiete) x 100 (Tamura *et al.*, 1996:196)

Al die eksperimente is by kamertemperatuur (ongeveer 23 °C) uitgevoer.

- Die venoom is telkens by die ekstrasellulêre badoplossings gevoeg en die effek op die miosiete is waargeneem.

3.3 GEBRUIK VAN SKERPIOENVENOOM TYDENS EKSPERIMENTERING

- Heelvenoom is versamel deur elektriese stimulasie van die telson van skerpioene van die genus *Parabuthus*.
- Die venoom is gesuspendeer in 1 ml Ca^{2+} -vrye oplossing waarna dit verdeel is in kleiner hoeveelhede en by -20 °C gevries is tot verdere gebruik.
- Die hoeveelheid venoom wat per stimulasie verkry word wissel en daarom was dit nie moontlik om deurgaans van dieselfde konsentrasies gebruik te maak nie.
- Die volume venoom waarmee duidelike effekte waargeneem word is bepaal en konstant in eksperimente gebruik.
- Om die effek van bevriësing op die aktiwiteit van die venoom te bepaal is die volgende prosedure gevolg:
 - Venoom van 10 individuele *P. schlechteri* skerpioene is versamel en saamgevoeg in 3 ml 0 Ca^{2+} -Tyrode.
 - Die oplossing met die venoom is verdeel en die helfte daarvan is dadelik (vars venoom) vir 5 herhalings van die selteleksperimente en hemoliseksperimente gebruik. Die res van die venoom is gevries by -20 °C en 'n paar weke later is dieselfde eksperimente herhaal.

3.4 OPLOSSINGS

Die samestelling van die verskillende oplossings wat gebruik is word in Tabel 3.1 weergegee.

Tabel 3.1 Ionsamestelling van ekstrasellulêre badoplossings.

	Ca ²⁺ -vrye oplossing	Tyrode	Tyrode+NiCl ₂	0Ca ²⁺ -Tyrode	0Ca ²⁺ -Tyrode + EGTA
NaCl	130 mM	137,6 mM	137,6 mM	137,6 mM	137,6 mM
KCl	5,4 mM	5,4 mM	5,4 mM	5,4 mM	5,4 mM
MgCl ₂	-	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM
CaCl ₂	-	1,8 mM	1,8 mM	-	-
Hepes NaOH	-	11,6 mM	11,6 mM	11,6 mM	11,6 mM
Glukose	-	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
NiCl ₂	-	-	5 mM	-	-
EGTA	-	-	-	-	5 mM
Hepes	6 mM	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄	1,2 mM	-	-	-	-
MgSO ₄	1,2 mM	-	-	-	-
pH	7,2 (met NaOH)	7,4 (met NaOH)	7,4 (met NaOH)	7,4 (met NaOH)	7,4 (met NaOH)

3.5 BEPALING VAN HEMOLITIESE AKTIWITEIT

- 5 ml Bloed is getrek uit 'n Sprague Dawley rothart en 0,5 ml van 'n 3,8 % natriumsitraat oplossing is daarby gevoeg.
- Na sentrifugering (2000 omwentelinge per minuut vir 5 minute) is die bloed drie keer gespoel met 0 Ca²⁺-Tyrode.
- 100 µl van die eritosiete is gesuspendeer in 5 ml 0 Ca²⁺-Tyrode of Tyrode.
- Van bogenoemde oplossing is 80-90 µl in 'n 1,5 ml mikrosentrifugebuisie geplaas en 'n bepaalde volume venoom is bygevoeg. Die hoeveelheid venoom wat gebruik is vir die hemolise-eksperimente was hoër as vir die selteleksperimente.

- Die buisies is oornag by 37°C gelaat.
- Om hemolise te bepaal is die buisies gesentrifugeer en die absorbansie van die supernatant is met 'n Spectronic Genesys 5 spektrofotometer by 540 nm by kamertemperatuur bepaal.
- Persentasie hemolise is bereken deur die absorbansie van 0,1 mg saponin as 'n 100 % hemolisestandaard te neem (Chen *et al.*, 1997:687).

3.6 VERWERKING EN STATISTIESE ANALISE VAN RESULTATE

Die resultate is verwerk met behulp van Microsoft Excel (1997 weergawe) en Origin weergawe 5.0 (Microcal Software Inc., ©1991-1997).

Resultate is statisties geanaliseer met behulp van Statistica weergawe 5.5 (Statsoft Inc., ©1999). Die standaardfout van die gemiddelde is bepaal en die Tukeytoets (ANOVA) is gebruik om statisties betekenisvolle verskille ($p < 0.05$ en $p < 0.01$) aan te dui.

HOOFSTUK 4

RESULTATE EN BESPREKING

Die venoom van die skerpioengenus *Parabuthus* is saamgestel uit verskillende komponente wat gesamentlik bydra tot hipereksiteerbaarheid van selle en gevolglike kliniese simptome. Hierdie komponente toon α -effekte, porievorming of destabilisering van die selmembraan en moontlik lise van kardiaal miosiete. Die effek van die verskillende komponente mag verskil tussen verskillende spesies. Met elektrofisiologiese tegnieke kan daar tussen die verskillende effekte onderskei en die interaksie van die toksien met sy teikenreseptor bestudeer word. Laasgenoemde is 'n duur en arbeidsintensiewe proses en die behoefte aan 'n koste-effektiewe siftingstegniek om die effekte te onderskei, wat dan verder elektrofisiologies ondersoek kan word, het ontstaan. Met hierdie studie is 'n siftingstegniek ontwikkel om aan bogenoemde behoefte te voldoen. Die venoom of komponente van die venoom wat deur die siftingstegniek geïdentifiseer is, kan verder biochemies geanaliseer of elektrofisiologies bestudeer word.

Venoom van die skerpioengenus, *Parabuthus*, wat as medies belangrik in Suid-Afrika beskou word, is met die siftingstegniek ondersoek. Om die verskillende effekte te onderskei, is die invloed van die venoom of toksien op vars-bereide kardiaal miosiete in verskillende ekstrasellulêre oplossings, ondersoek. Die seltelstegniek, waar die lewende miosiete manueel getel word, is toegepas om die effekte waar te neem.

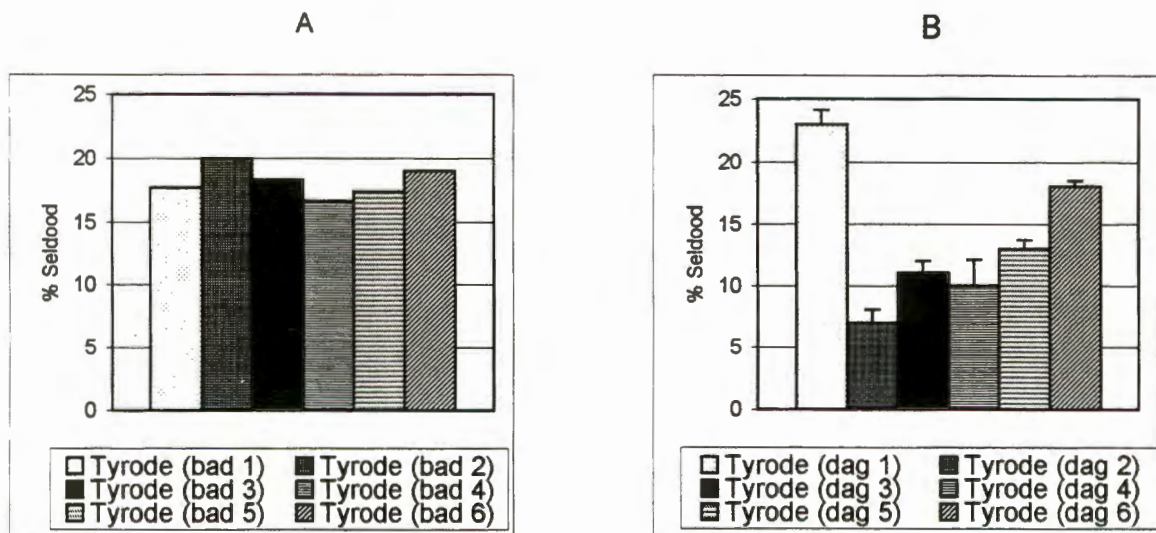
4.1 EKSPERIMENTELE VARIASIES

'n Mate van eksperimentele variasie, soos variasies in die Ca^{2+} -weerstandbiedendheid tussen miosietbereidings en variasies in venoomsamestelling, kan die resultaat met die siftingstegniek beïnvloed. Om die

invloed van hierdie faktore vas te stel is die betroubaarheid van die selteltegnyk bepaal en die invloed van bevriësing van venoom, wat venoomaktiwiteit kan beïnvloed, ondersoek.

4.1.1 Betroubaarheid van die selteltegnyk

Om die betroubaarheid van die tegnyk te ondersoek is daar met een miosietbereiding op dieselfde dag miosiete in ses verskillende badjies in Tyrode getel (Metode, Hoofstuk 3). Hierdie eksperiment is op ses verskillende dae herhaal. In Figuur 4.1A word die persentasie seldood in ses badjies op dag 6 aangetoon (sien Bylae vir resultate van dag 1-5) en in Figuur 4.1B die gemiddelde persentasie seldood op verskillende dae. Op elkeen van die ses dae in Figuur 4.1B is miosiete in ses afsonderlike badjies getel, die gemiddelde persentasie seldood is bereken en op die grafiek aangetoon. Dit is duidelik uit Figuur 4.1 dat die persentasie seldood van dieselfde bereiding 'n kleiner variasie toon as die persentasie seldood van verskillende bereidings.



Figuur 4.1 Die variasie in persentasie seldood tussen verskillende miosietbereidings. **A** Die gemiddelde persentasie seldood van miosiete vir dieselfde bereiding en **B** vir verskillende bereidings. Standaardfout van die gemiddelde word aangetoon.

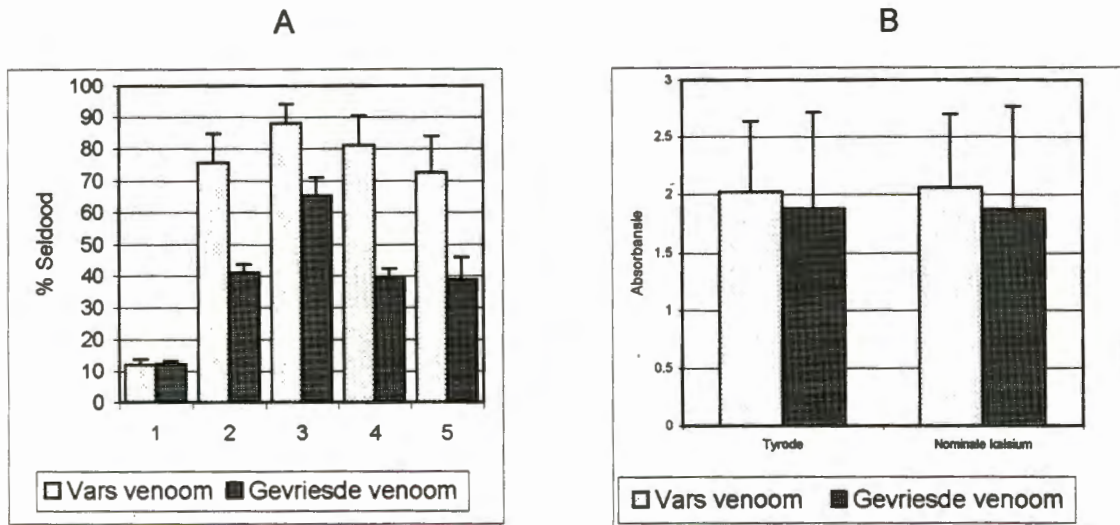
Die resultate van die bogenoemde eksperimente is statisties ontleed. 'n Variansie analise is op die resultate uitgevoer waar die variasie tussen die verskillende bereidings (verskillende dae) vergelyk is met die variasie in dieselfde bereiding (verskillende badjies). Vir die analise is die dag as die bron van variasie geneem. Die variansie was 23,73 (F-waarde) met 'n p-waarde van 0,0001. Die verskil is statisties betekenisvol met 'n betroubaarheid van 0,7912. Op grond van hierdie resultate kan afgelei word dat die selteltegniek betroubaar is en dat die variasies in die resultate grootliks toe te skryf is aan variasies tussen die kardiaale miosiete van verskillende bereidings.

4.1.2 Variasie in venoomkomponente

Variasie in die effek van die venoom, veral van *P. schlechteri*, is tydens eksperimentering waargeneem. Die variasie het meestal voorgekom by die porievormende effek en veral met die eliminerings van Ca^{2+} in die ekstrasellulêre oplossing. Van die 43 eksperimente wat met *P. schlechteri* venoom uitgevoer is, was daar tydens 21 eksperimente 'n hoër persentasie seldood in 0 Ca^{2+} -Tyrode, tydens 12 'n laer persentasie seldood en tydens 10 eksperimente was die persentasie seldood ongeveer dieselfde. Die venoom wat vir die verskillende eksperimente gebruik is, is eenvormig hanteer (Metode, Hoofstuk 3). Om venoom te bewaar sodat dit oor 'n lang periode gebruik kan word, word dit bevries. Verdonck *et al.* (2000:251) het 'n variasie in degranulering van granulosiete deur *P. schlechteri* venoom opgemerk, waar degranuleringsaktiwiteit in slegs 44 van die 91 monsters gevind is. Na aanleiding van hierdie waarnemings is selteleksperimente asook hemolise eksperimente uitgevoer met vars- en gevriesde (-20 °C) venoom (Metode, Hoofstuk 3) om die invloed van bevriesing van die venoom te ondersoek.

Die resultaat van bogenoemde selteleksperimente op miosiete en hemolise van eritrosiete word in Figuur 4.2 getoon. In Tyrode (1) wat as kontrole oplossing gebruik is, is 'n gemiddelde persentasie seldood van onderskeidelik 11,98% (vars) en 12,18% (gevries) gevind wat daarop dui dat daar minimale variasie in

die kwaliteit van die miosiete was en dat die eksperimente vergelykbaar is. In al die ander oplossings (2 tot 5) was die gevriesde venoom minder aktief. Die persentasie seldood van miosiete in vars en gevriesde *P. schlechteri* venoom toon statisties betekenisvolle verskille ($p < 0,05$) in al die badoplossings (Figuur 4.2A).



Figuur 4.2 Die invloed van bevriesing op *P. schlechteri* venoom.

A Persentasie seldood in vars- en gevriesde venoom (-20 °C) in: 1-Tyrode (kontrolle sonder venoom) en in badoplossings 2- Tyrode, 3- Tyrode+5 mM NiCl₂, 4- 0 Ca²⁺-Tyrode en 5- 0 Ca²⁺-Tyrode+5 mM EGTA is telkens 2 µl venoom gevoeg (n=5). **B** Hemolise in vars- en gevriesde venoom (n=3-4). Tyrode is gebruik as kontrolle (0 waarde). 32 µl Venoom is bygevoeg. Die standaardfout van gemiddelde word aangetoon.

Die venoom van *P. schlechteri* veroorsaak hemolise van eritrosiete. Dieselfde venoom wat in Figuur 4.2A gebruik is, is gebruik om die effek van gevriesde venoom op die hemolise van eritrosiete te ondersoek (Figuur 4.2B). Met laasgenoemde eksperiment is geen statisties betekenisvolle verskille gevind nie, hoewel dit voorkom of die gevriesde venoom minder aktief as vars venoom is.

Die porievormende komponent van *P. schlechteri* venoom is geïsoleer en die aminosuurvolgorde is bepaal (Verdonck *et al.*, 2000:256). Bogenoemde peptied

bevat geen sisteïen nie en gevolglik kom geen disulfiedbrûe voor nie, in teenstelling met die neuropeptiede wat deur disulfiedbrûe gestabiliseer word. Hierdie struktuursamestelling mag lei tot onstabiliteit en kan die afname in porievormende aktiwiteit na bevriësing en ontvriësing verklaar.

Skerpioenvenoom is deur middel van elektriese stimulering van die telson versamel en dit is moontlik dat die versamelingsmetode 'n invloed op die samestelling of aktiwiteit van die venoom uitoefen en gevolglik variasies kan veroorsaak. Die moontlikheid is deur Verdonck *et al.* (2000:251) ondersoek en laasgenoemde navorsers kon geen verskille tussen elektriese stimulering en ander versamelingsmetodes vind nie.

4.2 ONTWIKKELING VAN DIE SIFTINGSTEGNIEK

Deur gebruik te maak van die selteltegniek is 'n siftingstegniek ontwikkel waarmee die meganismes waardeur selbeskadiging geïnduseer kan word, soos die α -effek, porievorming en moontlik lise, onderskei kan word. Vir die evaluering van die resultate is twee modelle gebruik, naamlik veratridine om die α -effek aan te dui en mastoparan (asook melittin) vir ander effekte soos porievorming. In Tabel 4.1 word onderskeid getref tussen die α -effek en porievorming of ander effekte deur gebruik te maak van verskillende ekstrasellulêre oplossings (kolom 1 tot 5), waar Tyrode die normale ekstrasellulêre omgewing naboots. Die eerste kolom dui die effek van die venoom of toksien op miosiete *in vitro* aan. Die gevolg van blokkering van die $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ -uitruiler met nikkal word in die tweede kolom aangedui. Nikkal mag ook sekondêre effekte tot gevolg hê en daarom is oplossing 3 gebruik. Hierdie oplossing bevat nominale Ca^{2+} wat die uitruiler moontlik nog in stand kan hou en in die vierde kolom word die effek van EGTA wat Ca^{2+} reduseer tot sub millimolêre vlakke aangedui. Die eliminerings van Ca^{2+} deur EGTA skakel die uitruiler heeltemal uit sodat ander effekte, waaronder die Ca^{2+} -afhanklikheid van sommige prosesse, waargeneem kan word. Deur EGTA word die effek van spontane depolarisasie, soos gekenmerk word deur spontaan aktiewe selle,

uitgeskakel en Ca^{2+} -oorbelading deur middel van Ca^{2+} -influks word voorkom, hoewel seldood nog kan plaasvind deur ander meganismes soos kolloïedosmotiese beskadiging, lise of intrasellulêre Ca^{2+} vrystelling.

Die α -effek word onderskei deur beskerming in die oplossings met nikkel (Tabel 4.1 oplossing 2), moontlik met nominale Ca^{2+} (oplossing 3) en EGTA (oplossing 4) waar die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -uitruiler geïnhibeer of uitgeskakel word. Indien seldood steeds plaasvind na die uitskakeling van die uitruiler dui dit waarskynlik op een van die ander moontlikhede.

Tabel 4.1 Persentasie seldood van kardiaie miosiete in verskillende badoplossings.

Venoom \ toksien	1 Tyrode			2 Tyrode + 5 mM NiCl_2			3 0 Ca^{2+} -Tyrode			4 0 Ca^{2+} -Tyrode + 5 mM EGTA		
	χ	SF	n	χ	SF	n	χ	SF	n	χ	SF	n
Geen venoom	10,5%	1	22	12,8%	2	10	14%	2	22	6,7	1	5
Veratridine (30 μM)	45,7% [#]	7	5	16,1% [#]	3	5	20,2% [*]	4	5	6,6% [*]	1	5
<i>P. granulatus</i>	65,1% [#]	6	6	37% [#]	5	5	53,7% [*]	5	11	11,8% [*]	2	7
<i>P. neglectus</i>	45,6%	8	5	30,8%	4	5	60,8%	11	6	38,6%	12	6
<i>P. villosus</i>	78,9%	10	5	66,4%	7	5	55,5%	5	6	19,8%	6	6
Mastoparan (8 μM)	69,5%	7	5	78,2%	11	5	66,7% [*]	9	5	28,7% [*]	4	5
Melittin (11 μM)	23,5%	3	5	27%	8	5	37,2% [*]	6	5	9,8% [*]	0,5	5
<i>P. raudus</i>	58,3%	9	5	57,4%	15	5	52%	8	5	21,2%	5	5
<i>P. laevifrons</i>	58,7%	10	5	60,5%	10	5	54,5%	10	5	22,3%	6	5
<i>P. transvaalicus</i>	81,8%	5	5	89,1%	3	5	81%	10	6	80,7%	11	6
<i>P. schlechteri</i>	71,1%	5	18	49,2%	7	18	70,2%	4	45	78,5%	4	45
Parabutoparin (0,5 μM)	84,3%	4	6	66,5%	13	6	84%	6	6	72,3%	10	6
Parabutoparinfragment (0,6 mg/vml)	69% [#]	4	5	46,6% [#]	4	5	64,3% [*]	4	5	5,6% [*]	2	5

χ = gemiddelde (Sien Bylae Tabel 2.1 - 2.13 vir resultate waarvan gemiddelde bereken is)

SF = standaardfout van die gemiddelde

n = aantal eksperimente

[#] en ^{*} dui statisties betekenisvolle verskille ($p < 0.01$) aan

4.2.1 Veratridinemodel

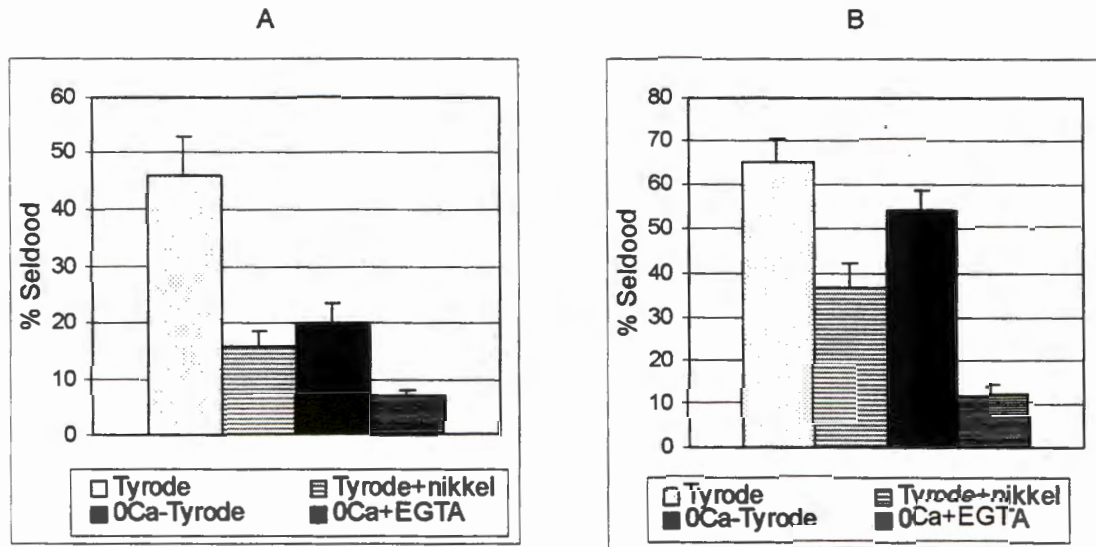
Die α -effek word gekenmerk deur die vertraging van inaktivering van die Na^+ -kanaal, wat lei tot 'n verlenging van die aksiepotensiaal en 'n gevolglike verlenging van die tyd wat die Na^+ -kanaal oop is. Dit lei weer tot 'n verhoging in intrasellulêre Na^+ -konsentrasie. Hierdie verhoging veroorsaak dat die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -uitruiler omkeer sodat Ca^{2+} -influks plaasvind en miosiete in hiperkontraktuur kan gaan as gevolg van Ca^{2+} -oorbelading (Literatuurstudie, Hoofstuk 2).

Veratridine is 'n bekende toksien wat 'n effek soortgelyk aan die α -effek op kardiaal miosiete toon (Tamura, 1996:200) en is gebruik as model om die α -effek met die siftingstegniek te karakteriseer (Tabel 4.1). In Figuur 4.3A is daar 'n waarneembare afname in die persentasie seldood van miosiete met veratridine na blokkering van die uitruiler met behulp van nikkel (moontlik onvolledig). Om te bevestig dat dit die uitruiler is wat by hierdie proses betrokke is, is oplossing 3 (Tabel 4.1) wat nominale Ca^{2+} bevat, gebruik en waar die been van die uitruiler wat direk by Ca^{2+} -oorbelading betrokke is, naamlik $\text{Ca}^{2+}_{\text{in}}/\text{Na}^+_{\text{uit}}$, geïnhibeer word. Hierdie been word heeltemal uitgeskakel met EGTA (oplossing 4) wat 'n verdere afname in seldood gee.

Die verwagte afname in seldood word inderdaad gevind. Dieselfde effek is waarneembaar met venoom van *P. granulatus* (Figuur 4.3B). Uit die resultaat kan afgelei word dat *P. granulatus* venoom volgens die veratridinemodel 'n suiwer α -effek toon (Tabel 4.1). Die verskille in die mate van die beskerming wat deur EGTA gebied word tussen veratridine en *P. granulatus* venoom in Figuur 4.3 is waarskynlik 'n konsentrasie effek.

Aangesien venoom 'n mengsel van verskeie aktiewe komponente is, kan daar verwag word dat venome gemengde effekte toon. Dit is waarskynlik die geval met *P. neglectus* Purcell, 1899 en *P. villosus* venoom (Tabel 4.1) waar EGTA en nikkel 'n mate van beskerming bied wat op 'n α -effek dui. Die beskerming was

egter nie so uitgesproke soos in die geval met *P. granulatus* nie en die afleiding kan gemaak word dat ander effekte hier ook 'n rol mag speel.



Figuur 4.3 Die persentasie seldood van miosiete met veratridine en *P. granulatus* venoom. **A** veratridine 30 μM en **B** *P. granulatus* venoom. Die persentasies verteenwoordig die gemiddelde van 5-11 eksperimente. Die standaardfout van gemiddelde word aangetoon.

4.2.2 Mastoparan (melittin)-model

In die literatuur word twee duidelike effekte vir mastoparan onderskei naamlik porievorming en 'n PLC effek. Hierdie twee effekte mag albei die resultate soos gevind met die studie beïnvloed en word vervolgens bespreek.

4.2.2.1 Porievorming

As porieë gevorm word waardeur klein osmotiese molekule kan beweeg, maar nie groter molekule soos sommige proteïene nie, veroorsaak dit dat die sel intrasellulêr hiperosmoties raak, water beweeg in die sel in en dit lei tot selswelling en gevolglik kolloïedosmotiese sellise (Literatuurstudie, Hoofstuk 2).

Mastoparan en melittin is bekende porievormende toksiene en is as modelle gekies in die siftingstegniek om porievorming en moontlike ander effekte te

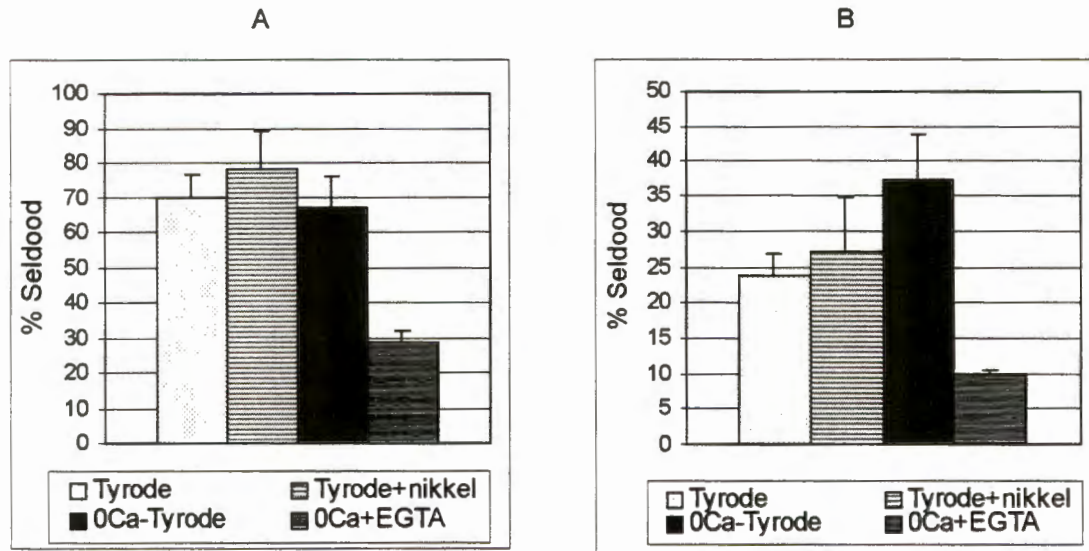
karakteriseer en om dit van die α -effek te onderskei. In Figuur 4.4 is dit duidelik dat blokkering van die uitruiler met nikkel, miosiete nie teen seldood beskerm na blootstelling aan mastoparan (Figuur 4.4 A) of melittin (Figuur 4.4 B) nie. Met hierdie resultaat word die α -effek uitgeskakel sodat aanvaar kan word dat seldood waarskynlik deur porievorming of membraandestabilisering geïnduseer word. Met EGTA is wel beskerming teen seldood met mastoparan en melittin gevind (Figuur 4.4). Ca^{2+} is nodig vir porievorming met mastoparan (persoonlike kommunikasie, dr. Bosteels), wat 'n moontlike verklaring vir die beskermende effek kan bied. 'n Verdere moontlikheid is dat Ca^{2+} deur die porieë die sel mag binnekom en sodoende mag bydra tot seldood. EGTA skakel hierdie moontlikheid uit.

4.2.2.2 Fosfolipase C-effek

Dit is bekend dat mastoparan ook interaksie met G-proteïene toon wat lei tot die fosfolipase C – InsP_3 kaskade waar ekstrasellulêre Ca^{2+} waarskynlik nodig is om fosfolipase C (PLC) te stimuleer (Danilenko *et al.*, 1993:1296). Stimulering van PLC lei tot 'n verhoging in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ deur die vrystelling van Ca^{2+} uit die intrasellulêre store (Schnabel *et al.*, 1997:31). PLC kan lei tot seldood in miosiete deurdat die verhoging in intrasellulêre Ca^{2+} saam met ander bronne Ca^{2+} -oorbelading kan induseer (Felzen *et al.*, 1997:725). Komatsu *et al.* (1993:23297) het in insuliensekretierende β -selle bevind dat die verhoging in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ uitgeskakel word met 0,1 mM EGTA in die ekstrasellulêre medium. In hierdie studie is 'n afname in persentasie seldood na mastoparan- en melittinblootstelling gevind indien EGTA teenwoordig was (Figuur 4.4).

Die beskermende effek van EGTA, waarskynlik teen Ca^{2+} -oorbelading (Figuur 4.4), is moontlik toe te skryf aan die PLC effek van mastoparan. In hierdie geval sal (1) PLC stimulering waarskynlik Ca^{2+} benodig en (2) die verhoging in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nie die drempelwaarde van ongeveer 10^{-7} M oorskrei wat nodig is vir Ca^{2+} -oorbelading nie. Met EGTA teenwoordig is daar geen ekstrasellulêre Ca^{2+} beskikbaar om by te dra tot die verhoging in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nie. PLC stimulering kan

PLA₂ stimuleer wat sal lei tot beskadiging van die selmembraan en sodoende kan seldood geïnduseer word. Indien Ca²⁺ nodig is vir PLC stimulering word hierdie effek deur EGTA uitgeskakel.

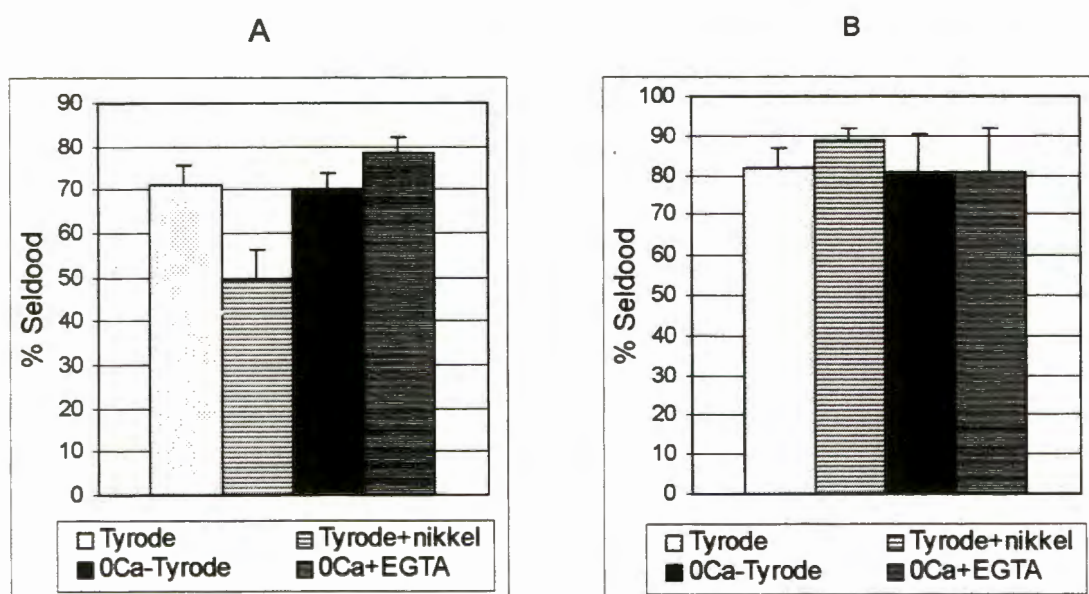


Figuur 4.4 Die persentasie seldood van miosiete met mastoparan en melittin. **A** 8 μM mastoparan en **B** 11 μM melittin. Persentasies verteenwoordig die gemiddelde van 5 eksperimente en die standaardfout van die gemiddelde word aangetoon.

Resultate met *P. neglectus* en *P. villosus* venoom kan nie ten volle met die veratridine- of mastoparanmodel verklaar word nie. Die feit dat blokkering van die uitruiler met nikkel en EGTA 'n mindere mate van beskerming bied as by *P. granulatus* (Tabel 4.1) het die vermoede laat ontstaan dat hier moontlik sprake van 'n ander effek, waarskynlik porievorming, is. Die beskerming met nikkel kan nie met die mastoparanmodel verklaar word nie en 'n groter mate van beskerming met EGTA sou hier verwag kan word vir 'n PLC-effek. Bogenoemde bevestig die vermoede dat hier gemengde effekte waargeneem word. Met *P. raudus* en *P. laevifrons* (Simon, 1888) is minimale of geen beskerming met nikkel, maar wel met EGTA, gevind. Die α-effek word dus nie hier waargeneem nie en beskerming met EGTA mag moontlik dui op 'n PLC effek,

membraandestabilisering of porievorming wat deur die uitskakeling van Ca^{2+} beïnvloed word.

Verdonck *et al.*, (2000:257) het venome van die genus *Parabuthus* vir porievorming met degranulering ondersoek en aktiwiteit gevind in *P. villosus*, *P. raudus*, *P. transvaalicus* en *P. schlechteri*. Geen degranuleringsaktiwiteit is in die venoom van *P. granulatus* gevind nie. Dit stem ooreen met die bevindinge in hierdie studie waar geen porievorming deur laasgenoemde venoom op miosiete aangedui word nie.



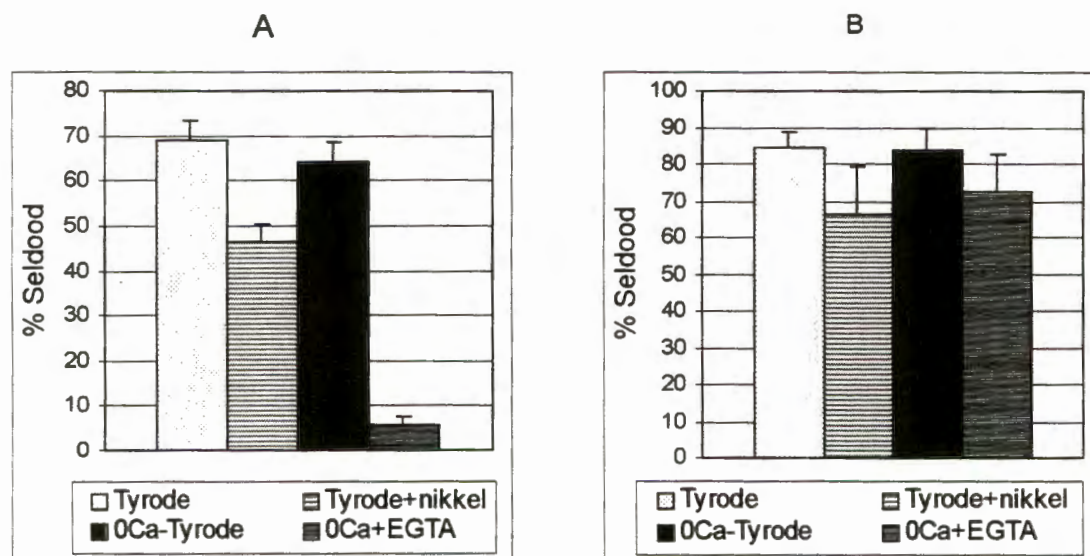
Figuur 4.5 Die persentasie seldood van miosiete met *P. schlechteri* en *P. transvaalicus* venoom. **A** *P. schlechteri* en **B** *P. transvaalicus* venoom. Persentasies verteenwoordig die gemiddelde van 5 eksperimente en die standaardfout van die gemiddelde word aangetoon.

EGTA het geen beskerming gebied met *P. transvaalicus* en *P. schlechteri* venoom nie en daarom is die porievormende of membraandestabiliserende effek die mees waarskynlike alternatief (Figuur 4.5). Blokkering van die uitruiler deur middel van nikkels beskerm met *P. schlechteri* venoom (Figuur 4.5A) wat op 'n moontlike α -effek dui. Daar is waarskynlik beide porievorming en α -effekte in die komponente van die venoom teenwoordig. Uit laasgenoemde resultate kan die

afleiding gemaak word dat Ca^{2+} nie nodig is vir seldood van miosiete met *P. schlechteri* en *P. transvaalicus* venoom nie.

Die porievormende komponent van *P. schlechteri* venoom is geïsoleer en nadat die aminosuur volgorde bepaal is, is dit sinteties vervaardig en word parabutoporin genoem (Verdonck *et al.*, 2000:247). As die resultate van die volledige parabutoporin met *P. schlechteri* venoom vergelyk word (Tabel 4.1), word die effek van parabutoporin effens opgehef met EGTA, terwyl geen beskerming deur EGTA in die geval van *P. schlechteri* gevind is nie. Die beskerming met nikkell teen parabutoporin is geringer as in die geval van *P. schlechteri*. Aangesien parabutoporin 'n gesuiwerde porievormende komponent is, kan hier nie sprake van 'n α -effek wees nie en die beskerming met nikkell kan moontlik toegeskryf word aan kompetisie vir binding tussen nikkell (divalente kation) en die toksien (parabutoporin). Die mate van beskerming met EGTA teen parabutoporin kan moontlik aan 'n PLC effek toegeskryf word. Moerman *et al.* (ongepubliseer) het bevind dat 0,5 μM parabutoporin die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ van granuloseite verhoog, maar dat hierdie verhoging by 'n hoër konsentrasie skaars waarneembaar is en dat die selle dan membraandestabiliserende effekte toon. In hierdie resultate is die PLC effek met die heelvenoom (*P. schlechteri*) moontlik versluier deur die effekte van ander komponente en kon daarom nie waargeneem word nie. Miosiete toon dalk 'n membraandestabiliserende effek by 'n laer konsentrasie van die venoom as granuloseite wat die vermoede laat ontstaan dat daar met parabutoporin en EGTA sprake van 'n membraandestabiliseringseffek asook 'n PLC effek kan wees. Resultate met parabutoporin kan nie volledig deur die mastoparanmodel verklaar word nie; dit mag moontlik verband hou met die konsentrasie van die venoom.

Tydens die sintese van parabutoporin is 'n fragment van 16 aminosure LKKAWKSKLAKKLRAK vervaardig. Die siftingstegniek is toegepas om die effek van die parabutoporinfragment met die volledige parabutoporin te vergelyk en die resultate word in Figuur 4.6 weergegee.



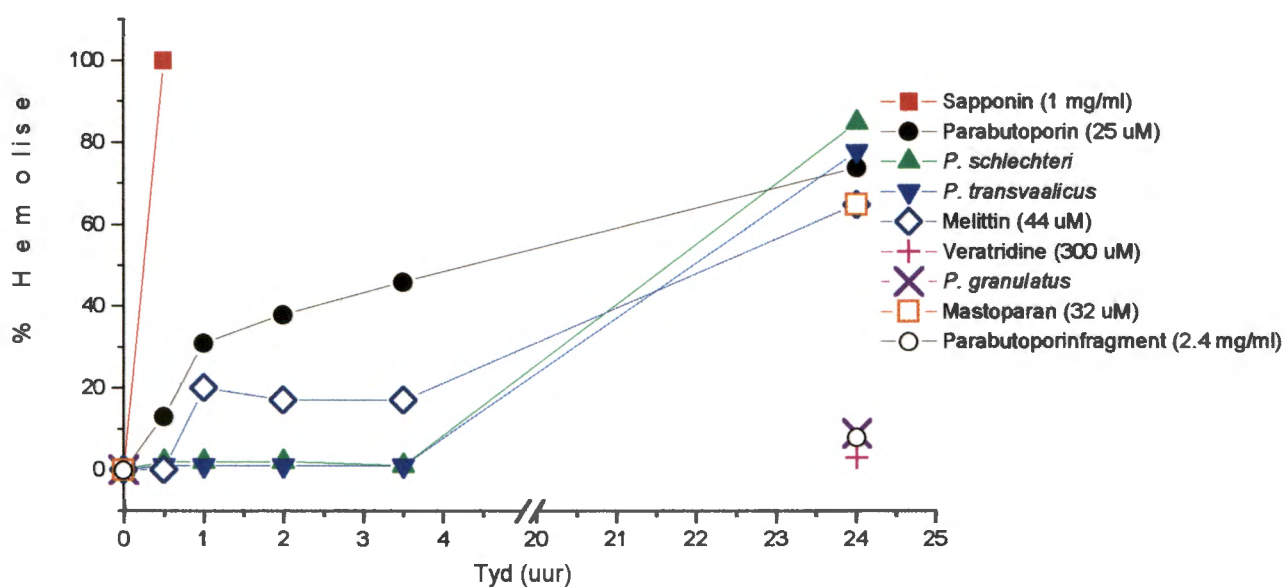
Figuur 4.6 Die persentasie seldood van miosiete met parabuto porinfragment en parabuto porin. **A** parabuto porinfragment en **B** parabuto porin. Persentasies verteenwoordig die gemiddelde van 5-6 eksperimente en die standaardfout van die gemiddelde word aangetoon.

Die teenwoordigheid van EGTA of Nikkel het die sel op 'n meer uitgesproke wyse teen die effek van die fragment beskerm as teen parabuto porin. Die fragment is 'n gedeelte van die volledige parabuto porinmolekuul en kan gevolglik nie 'n α -effek toon nie. Verdere navorsing is nodig om die beskerming van EGTA en nikkel teen die fragment se effek te verklaar.

4.2.3 Sellise

In die literatuur word daar onderskei tussen sellise, waar die teenwoordigheid van 'n toksien die membraan ensiematies laat disintegreer ("detergent-like"), en porievorming, wat kolloïedosmotiese lise tot gevolg het (Ladokhin *et al.*, 1997:1764). Die moontlikheid dat venome destabilisering van die membraan of porievorming, en nie sellise nie, veroorsaak is ondersoek. Eritrosiete wat meestal in die literatuur as preparaat gebruik word om sellise aan te dui, is ook in hierdie studie vir die doel aangewend. Beskadiging van die selmembraan lei tot die ontsnapping van die hemoglobienmolekule wat die supernatant rooi verkleur.

Deur meting van die absorpsie van die supernatant kan lise van eritrosiete (hemolise) bepaal word. Volledige (100%) hemolise word deur 0,1 mg/ml saponin, 'n plantaardige glikosied, geïnduseer (Chen *et al.*, 1997:687) en vind binne minute plaas. Met porievorming en kolloïedotiese lise vind hemolise eers plaas as die porieë groot genoeg is vir die hemoglobienmolekule om uit te beweeg of as selswelling die selmembraan destabiliseer of vernietig. Laasgenoemde proses mag etlike ure duur.



Figuur 4.7 Hemolise van eritrosiete. Absorbansie (540 nm) is met verskillende intervale oor 'n tydverloop van 24 uur bepaal.

Die resultate van die hemolise eksperimente word in Figuur 4.7 getoon. Saponin wat as kontrole gebruik is veroorsaak 100% hemolise binne 30 minute. Mastoparan en melittin, wat bekende porievormende toksiene is en as model vir porievorming in die studie gebruik is, veroorsaak kolloïedotiese lise. Hierdie toksiene het hemolise eers na 24 uur veroorsaak in teenstelling met saponin wat binne 30 minute hemolise tot gevolg gehad het. Hierdeur word die verskil tussen kolloïedotiese lise as gevolg van porievorming en lise as gevolg van disintegrasie van die selmembraan duidelik onderskei. *P. schlechteri* en *P.*

transvaalicus venoom veroorsaak kolloïedosmotiese lise soortgelyk aan mastoparan en melittin.

Parabutoporin induseer, soos *P. schlechteri* en *P. transvaalicus* venoom, eers na 24 uur hemolise, terwyl die fragment geen hemolise geïnduseer het nie. Hierdie waarneming bevestig waarskynlik die belang van die struktuur van die molekule vir die vorming van funksionele porieë.

Die membraandestabiliserende- of porievormende effek van parabutoporin is waarskynlik konsentrasie afhanklik. In studies deur Bosteels *et al.* (ongepubliseer) is 50% hemolise na 30 minute met 40 μ M parabutoporin gevind (persoonlike kommunikasie, dr. Bosteels). In die eksperiment in Figuur 4.7 is 25 μ M parabutoporin gebruik en is 'n soortgelyke effek eers na ongeveer 4 ure waargeneem. Geen hemolise is met 'n laer konsentrasie van parabutoporin gevind nie.

Veratridine wat as model vir die α -effek gebruik is, induseer na 24 uur geen hemolise nie. Dieselfde resultaat is met *P. granulatus* venoom gevind wat met die siftingstegniek 'n suiwer α -effek getoon het.

4.5 SAMEVATTING VAN RESULTATE

Die seltelstegniek, waar die morfologiese veranderinge van miosiete waargeneem word, is gebruik in die ontwikkeling van die siftingstegniek tydens hierdie studie. Aangesien variasies in die seltelstegniek 'n groot rol in die ontwikkeling van die siftingstegniek speel is die betroubaarheid daarvan ondersoek en die seltelstegniek is as betroubaar bewys.

Variasies in die effek van *P. schlechteri* venoom is opgemerk tydens hierdie studie, asook deur Verdonck *et al.* (2000:251). Hierdie variasies is moontlik toe te skryf aan die effek van bevriesing van die venoom. 'n Statisties betekenisvolle

afname in aktiwiteit is waargeneem met die selteleksperimente, terwyl hemolise van eritosiete 'n neiging tot afname in aktiwiteit getoon het.

Die siftingstegniek is ontwikkel om te onderskei tussen die verskillende effekte van die venome. *P. granulatus* was die enigste venoom wat volgens die veratridinemodel 'n suiwer α -effek getoon het. *P. schlechteri*, *P. neglectus* en *P. villosus* venoom toon waarskynlik α -effekte hoewel ander effekte nie uitgesluit kan word nie. *P. transvaalicus* venoom toon geen α -effek volgens die veratridinemodel nie en skakel ook nie ten volle in by die mastoparanmodel nie, aangesien geen beskerming met EGTA waargeneem word nie. Uit die resultaat met *P. transvaalicus* kan PLC aktiwiteit nie aangedui word nie en kan afgelei word dat seldood deur porievorming of destabilisering van die membraan geïnduseer word. Die teenwoordigheid van nikkel beskerm die sel nie teen die effek van *P. raudus* en *P. laevifrons* venoom nie, maar EGTA het wel 'n beskermende effek. Die effek van hierdie venome kan volgens die mastoparanmodel moontlik toegeskryf word aan PLC.

Parabutoporiin kan nie ten volle met die mastoparanmodel verklaar word nie, aangesien net 'n mate van beskerming met nikkel voorkom en EGTA ook slegs in 'n geringe mate beskerming bied. Die fragment kan nie volledig volgens een van die modelle verklaar word nie, hoewel die afname in aktiwiteit met EGTA mag dui op PLC aktiwiteit.

Hemolise van eritosiete is met hierdie studie gebruik om kolloïedosmotiese lise as gevolg van porievorming en sellise as gevolg van die disintegreer van die selmembraan te onderskei deur die tydseffek waar te neem. Met bogenoemde eksperimente is aangetoon dat skerpioenvenome kolloïedosmotiese sellise kan induseer.

HOOFSTUK 5

EVALUERING, GEVOLGTREKKINGS EN AANBEVELINGS

Beperkinge inherent aan die selteltegniek en variasies in Ca^{2+} -weerstandbiedendheid van geïsoleerde miosiete moet in ag geneem word by die gebruik van die siftingstegniek.

Hoewel die selteltegniek deur Sarvazyan (1998:297) as 'n sensitiewe tegniek beskryf is, word die moontlikheid van foute tydens die telproses en ook subjektiwiteit van die navorser as moontlike probleme geïdentifiseer. Die betroubaarheid van die selteltegniek is ondersoek en met hierdie studie is statisties aangetoon dat die tegniek betroubaar is en dat moontlike variasies in die resultate verband hou met variasies in die Ca^{2+} -weerstandbiedendheid van miosiete verkry met verskillende selbereidings. Verder is bewys gelewer dat bevriesing van venome die aktiwiteit beïnvloed en dat dit waarskynlik toegeskryf kan word aan die labiliteit van die molekule.

Voordat die siftingstegniek aangewend is om die effekte van die verskillende komponente van heelvenoom te onderskei, is die invloed van verskillende badoplossings op miosiete ondersoek sonder die byvoeging van venoom om die betroubaarheid van die tegniek te evalueer. Die miosiete word nie gestimuleer nie waardeur die Ca^{2+} -influks deur die Ca^{2+} -kanale tot die minimum beperk word. 'n Verlaging van $[\text{Ca}^{2+}]_e$ verhoog die prikkelbaarheid van kardiaale miosiete en spontane depolarisering word geïnduseer. Hierdie depolarisering mag aanleiding gee tot 'n hoër persentasie seldood as gevolg van Ca^{2+} -oorbelading. Spontane depolarisering het egter nie 'n beduidende invloed op die persentasie seldood van miosiete sonder venoom nie. Met EGTA is daar geen ekstrasellulêre Ca^{2+} beskikbaar om 'n rol in Ca^{2+} -oorbelading te speel nie, wat die beskerming deur EGTA verklaar. Hieruit is afgelei dat manipulering van die

badoplossings, soos gebruik in hierdie studie, aangewend kan word om die effekte van venoom van mekaar te onderskei.

Die resultate gevind met die manipulerings van die ekstraselulêre oplossings is statisties geanaliseer en die statisties betekenisvolle verskille is in Tabel 4.1 aangetoon. Hoewel daar met van die resultate statisties betekenisvolle verskille gevind is, is dit nie gebruik in die interpretasie van die resultate nie, omdat daar verskeie fisiologiese prosesse betrokke is en die effekte van die manipulerings van die badoplossings nie direk met mekaar vergelyk kan word nie.

Met behulp van die siftingstegniek wat in die studie ontwikkel is kan die veratridinmodel suksesvol gebruik word om die α -effek te karakteriseer. Om te onderskei tussen die membraandestabiliseringseffek en porievorming is 'n mastoparan (melittin)-model gebruik. Met die ontwikkeling van laasgenoemde model het die PLC effek na vore gekom en dit het duidelike onderskeiding van die porie-effek bemoeilik. Die mastoparanmodel is, as gevolg van die PLC effek, waarskynlik nie die ideale keuse om porievorming met die siftingstegniek aan te dui nie en 'n ionofoor sou moontlik as 'n beter model kon dien, veral om 'n "barrel-stave" tipe porie aan te dui. Met die hemolise eksperimente is kolloïedosmotiese lise met mastoparan gevind wat die porievormende effek van mastoparan bevestig. Hoewel die mastoparanmodel dus nie ideaal was om porie- of membraandestabiliserende effekte met die siftingstegniek te onderskei nie, kon dit goed toegepas word om kolloïedosmotiese lise aan te dui.

'n Gevolglike beperking van die mastoparanmodel in die siftingstegniek is dat deur een effek aan te dui ander effekte nie volkome uitgeskakel kan word nie, soos in die geval van *P. schlechteri*, *P. neglectus* en *P. villosus* venoom waar gemengde effekte waargeneem is. Met *P. transvaalicus* venoom kon met die siftingstegniek geen α -effekte onderskei word nie, hoewel α -effekte met elektrofisiologiese tegnieke vir *P. transvaalicus* aangedui is (Dyason, 1999:148). 'n Moontlike verklaring vir die verskynsel mag wees dat die porievormende effek

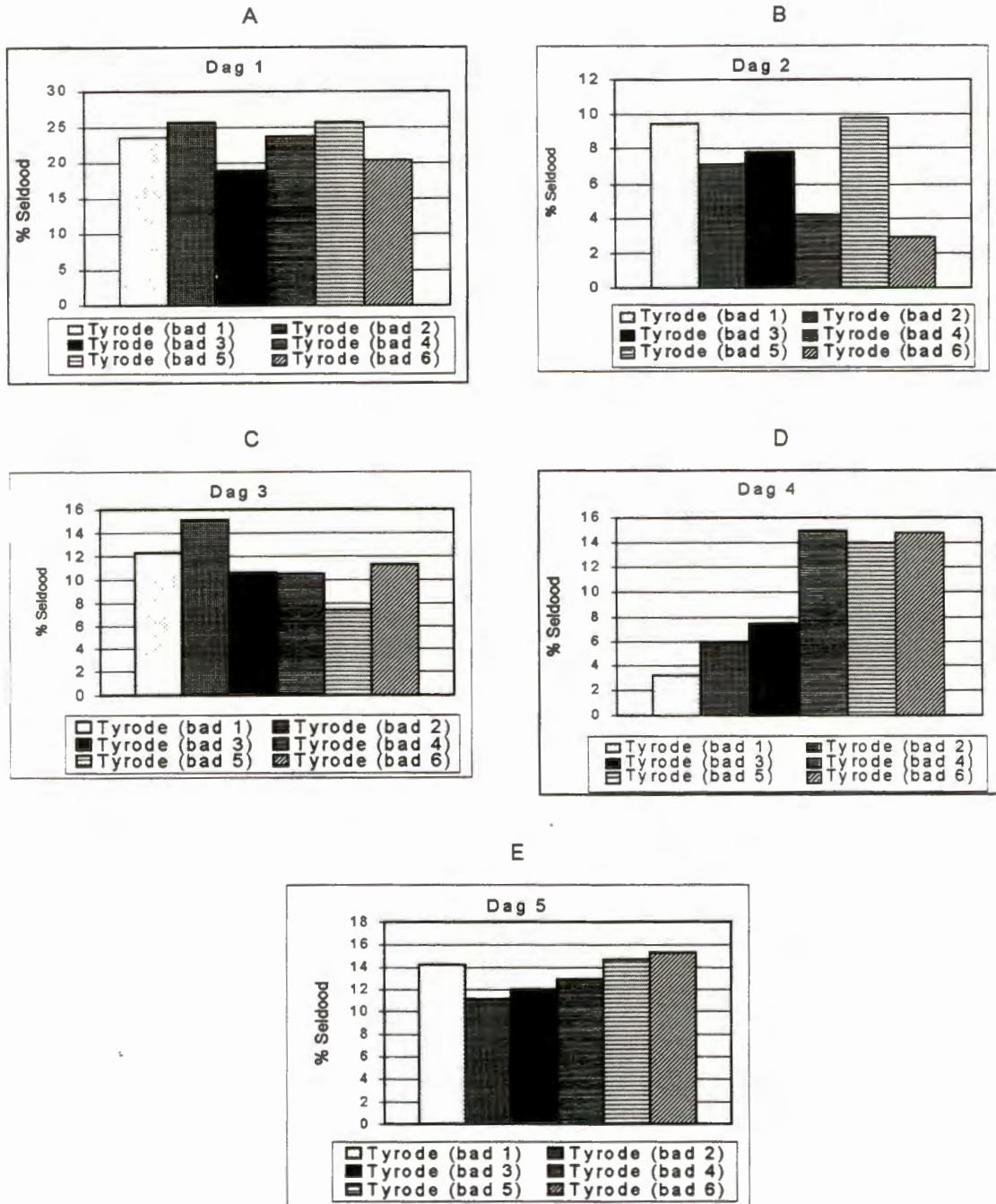
van *P. transvaalicus* venoom die α -effek in so 'n mate oorheers dat die siftingstegniek nie sensitief genoeg is om tussen die effekte te onderskei nie. Parabutoprin word in die literatuur met mastoparan vergelyk, maar met die siftingstegniek kan die effekte van parabutoprin nie volledig met die mastoparanmodel verklaar word nie.

Met die siftingstegniek kon al die verskillende effekte van skerpioenvenoom nie afsonderlik onderskei word nie. Die aantal eksperimente wat vir hierdie studie gedoen is het gewissel. Indien in bepaalde gevalle meer eksperimente gedoen sou word kon die effekte moontlik meer uitgesproke wees. Daar is egter genoeg aanduidings dat die tegniek nuttig as 'n koste- en tydseffektiewe tegniek gebruik kan word om aanduidings te gee van die verskillende effekte wat dan verder ondersoek kan word.

Ander moontlikhede waar die siftingstegniek aangewend kan word is om verskillende spesies in dieselfde genus te vergelyk, ander skerpioengenusse te ondersoek, dit met *Parabuthus* genus te vergelyk en selfs om moontlike verskille in dieselfde spesies van verskillende geografiese gebiede aan te dui.

BYLAE

1 BETROUBAARHEID VAN DIE SELTELTEGNIK



Figuur 1.1 Persentasie seldood van miosiete in verskillende badjies vir bereidings van dag 1-5
A dag 1, B dag 2, C dag 3, D dag 4, E dag 5.

2 ONTWIKKELING VAN DIE SIFTINGSTEGNIEK

Tabel 2.1 Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings sonder venoom.

Eksperimente	Tyrode	Tyrode + 5 mM NiCl ₂	0 Ca ²⁺ -Tyrode	0 Ca ²⁺ -Tyrode + 5 mM EGTA
1	8%	15%	26%	5%
2	2%	25%	11%	9%
3	13%	14%	22%	9%
4	11%	17%	12%	3,6%
5	10%	3,2%	15%	7%
6	23%	5%	32%	-
7	6%	4%	32%	-
8	21%	11,3%	16%	-
9	3%	22,2%	10,4%	-
10	7%	11,4%	19,5%	-
11	12%	-	10,7%	-
12	12,2%	-	4, %	-
13	11,4%	-	3,2%	-
14	12,2%	-	11,2%	-
15	9,2%	-	10,5%	-
16	14,8%	-	9,2%	-
17	13,3%	-	10,9%	-
18	8,3%	-	6,4%	-
19	6%	-	14,2%	-
20	11,9%	-	9,5%	-
21	10,6%	-	17,1%	-
22	5,6%	-	6,6%	-
	$\chi = 10,5\%$ SF = 1,06	$\chi = 12,8\%$ SF = 2,34	$\chi = 14,0\%$ SF = 1,7	$\chi = 6,7\%$ SF = 1,07

χ = gemiddelde
SF = Standaardfout van die gemiddelde

Tabel 2.2 Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met veratridine.

Eksperimente	Tyrode	Tyrode + 5 mM NiCl ₂	0 Ca ²⁺ -Tyrode	0 Ca ²⁺ -Tyrode + 5 mM EGTA
1	70,3%	8,4%	11,8%	8,1%
2	40,6%	18%	14,5%	8,6%
3	51,6%	13,8%	31,6%	2,9%
4	31,8%	15,3%	24,5%	7,6%
5	34,3%	25%	18,8%	6,1%
	$\chi = 45,7\%$ SF = 7,0	$\chi = 16,1\%$ SF = 2,7	$\chi = 20,24\%$ SF = 3,55	$\chi = 6,6\%$ SF = 1,02

χ = gemiddelde
SF = Standaardfout van die gemiddelde

Tabel 2.3 Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met *P. granulatus*.

Eksperimente	Tyrode	Tyrode + 5 mM NiCl ₂	0 Ca ²⁺ -Tyrode	0 Ca ²⁺ -Tyrode + 5 mM EGTA
1	50%	25%	51%	16%
2	83%	42%	59%	11%
3	66%	35%	37%	3%
4	75%	55%	39%	20%
5	69%	28%	42%	12%
6	4%8	-	36%	10%
7	-	-	87%	11%
8	-	-	65%	-
9	-	-	58%	-
10	-	-	64%	-
	-	-	53%	-
	$\chi = 65,1\%$	$\chi = 37\%$	$\chi = 53,7\%$	$\chi = 11,8\%$
	SF = 5,64	SF = 5,3	SF = 4,6	SF = 1,99

χ = gemiddelde
SF = Standaardfout van die gemiddelde

Tabel 2.4 Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met *P. neglectus*.

Eksperimente	Tyrode	Tyrode + 5 mM NiCl ₂	0 Ca ²⁺ -Tyrode	0 Ca ²⁺ -Tyrode + 5 mM EGTA
1	72%	36%	60%	94%
2	43%	43%	36%	18%
3	32%	20%	65%	28%
4	29,5%	27,9%	100%	33%
5	51,%5	27,1%	76%	425
6	-	-	28,3%	17,1%
	$\chi = 45,6\%$	$\chi = 30,8\%$	$\chi = 60,8\%$	$\chi = 38,6\%$
	SF = 7,68	SF = 3,96	SF = 10,7	SF = 11,7

χ = gemiddelde
SF = Standaardfout van die gemiddelde

Tabel 2.5 Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met *P. villosus*.

Eksperimente	Tyrode	Tyrode + 5 mM NiCl ₂	0 Ca ²⁺ -Tyrode	0 Ca ²⁺ -Tyrode + 5 mM EGTA
1	92%	63%	49,1%	16,6%
2	90%	75%	68%	19%
3	100%	78%	43%	15%
4	68,9%	74,1%	75%	48%
5	43,%8	42,1%	49%	17%
6	-	-	49,9%	3,5%
	$\chi = 78,9\%$	$\chi = 66,4\%$	$\chi = 55,5\%$	$\chi = 19,8\%$
	SF = 10,1	SF = 6,59	SF = 5,2	SF = 6,0

χ = gemiddelde
SF = Standaardfout van die gemiddelde

Tabel 2.6 Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met mastoparan.

Eksperimente	Tyrode	Tyrode + 5 mM NiCl ₂	0 Ca ²⁺ -Tyrode	0 Ca ²⁺ -Tyrode + 5 mM EGTA
1	61%	97%	37%	26%
2	67%	98%	85%	23%
3	68%	80%	75%	27%
4	96%	80%	78%	25%
5	55,8%	36%	58,7%	42,6%
	$\chi = 69,5\%$	$\chi = 78,2\%$	$\chi = 66,7\%$	$\chi = 28,7\%$
	SF = 6,9	SF = 11,2	SF = 8,59	SF = 3,5

χ = gemiddelde

SF = Standaardfout van die gemiddelde

Tabel 2.7 Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met melittin.

Eksperimente	Tyrode	Tyrode + 5 mM NiCl ₂	0 Ca ²⁺ -Tyrode	0 Ca ²⁺ -Tyrode + 5 mM EGTA
1	17,9%	18,9%	28,1%	9%
2	32,3%	52,5%	37,9%	10%
3	16,6%	8,9%	19,7%	8,6%
4	20%	35,9%	55%	11,1%
5	31%	19%	45,3%	10,6%
	$\chi = 23,5\%$	$\chi = 27,0\%$	$\chi = 37,2\%$	$\chi = 9,8\%$
	SF = 3,3	SF = 7,7	SF = 6,2	SF = 0,47

χ = gemiddelde

SF = Standaardfout van die gemiddelde

Tabel 2.8 Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met *P. raudus*.

Eksperimente	Tyrode	Tyrode + 5 mM NiCl ₂	0 Ca ²⁺ -Tyrode	0 Ca ²⁺ -Tyrode + 5 mM EGTA
1	61%	74%	38%	17%
2	92%	91%	34%	15%
3	52%	79%	52%	20%
4	46,6%	24,6%	59%	13%
5	40%	18,8%	77%	41%
	$\chi = 58,3\%$	$\chi = 57,4\%$	$\chi = 52\%$	$\chi = 21,2\%$
	SF = 9,0	SF = 14,8	SF = 7,7	SF = 5,0

χ = gemiddelde

SF = Standaardfout van die gemiddelde

Tabel 2.9 Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met *P. laevifrons*.

Eksperimente	Tyrode	Tyrode + 5 mM NiCl ₂	0 Ca ²⁺ -Tyrode	0 Ca ²⁺ -Tyrode + 5 mM EGTA
1	83%	93%	44%	14%
2	56%	72%	96%	46%
3	23%	58%	41%	16%
4	70,9%	32,7%	52,3%	16,6%
5	60,9%	47,2%	39,6%	19%
	$\chi = 58,7\%$	$\chi = 60,5\%$	$\chi = 54,5\%$	$\chi = 22,3\%$
	SF = 10,0	SF = 10,3	SF = 10	SF = 5,9

χ = gemiddelde

SF = Standaardfout van die gemiddelde

Tabel 2.10 Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met *P. transvaalicus*.

Eksperimente	Tyrode	Tyrode + 5 mM NiCl ₂	0 Ca ²⁺ -Tyrode	0 Ca ²⁺ -Tyrode + 5 mM EGTA
1	92%	88%	100%	100%
2	95%	93%	99%	98%
3	79%	94%	40%	27%
4	70,4%	92,9%	99%	90%
5	72,9%	77,6%	75,5%	74,5%
6	-	-	72,5%	94,7%
	$\chi = 81,8\%$	$\chi = 89,1\%$	$\chi = 81\%$	$\chi = 80,7\%$
	SF = 4,9	SF = 3,0	SF = 9,6	SF = 11,3

χ = gemiddelde

SF = Standaardfout van die gemiddelde

Tabel 2.11 Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met parabutooprin.

Eksperimente	Tyrode	Tyrode + 5 mM NiCl ₂	0 Ca ²⁺ -Tyrode	0 Ca ²⁺ -Tyrode + 5 mM EGTA
1	74,1%	89,2%	100%	100%
2	82,2%	98,4%	84,9%	73,4%
3	79,4%	92,6%	90,7%	33,3%
4	95,5%	34,8%	66,1%	54,5%
5	98,5%	59,2%	72,5%	94,4%
6	76,5%	24,5%	58,7%	78,5%
	$\chi = 84,3\%$	$\chi = 66,45\%$	$\chi = 84,0\%$	$\chi = 72,3\%$
	SF = 4,1	SF = 12,9	SF = 5,7	SF = 10,2

χ = gemiddelde

SF = Standaardfout van die gemiddelde

Tabel 2.12 Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met parabutooprinfragment.

Aantal eksperimente	Tyrode	Tyrode + 5 mM NiCl ₂	0 Ca ²⁺ -Tyrode	0 Ca ²⁺ -Tyrode + 5 mM EGTA
1	53,9%	38,5%	65,2%	12,2%
2	80%	36,6%	77,5%	5,3%
3	64,9%	55%	63,2%	6,3%
4	72,5%	50,7%	59%	1,6%
5	73,8%	52,1%	56,7%	2,9%
	$\chi = 69,0\%$	$\chi = 46,6\%$	$\chi = 64,3\%$	$\chi = 5,6$
	SF = 4,4	SF = 3,7	SF = 3,6	SF = 1,8

χ = gemiddelde

SF = Standaardfout van die gemiddelde

Tabel 2.13 Persentasie seldood van miosiete in verskillende badoplossings met *P. schlechteri*.

Aantal eksperimente	Tyrode	Tyrode + 5 mM NiCl ₂	0 Ca ²⁺ -Tyrode	0 Ca ²⁺ -Tyrode + 5 mM EGTA
1	92%	45%	25%	91%
2	82%	24%	70%	96%
3	88%	9%	34%	82%
4	57%	23%	54%	65%
5	67%	28%	44%	52%
6	92%	45%	94%	80%
7	82%	24%	100%	99%
8	88%	9%	68%	88%
9	57%	23%	100%	100%
10	67%	28%	100%	100%
11	87,3%	100%	61%	77%
12	49,1%	95,3%	98%	100%
13	65,5%	58,3%	45%	100%
14	94%	90%	83%	19%
15	89,4%	89%	92%	87%
16	44,6%	49%	91%	95%
17	45,1%	75%	95%	72%
18	33,3%	72,4%	96%	28%
19	-	-	100%	81%
20	-	-	44%	93%
21	-	-	45%	50%
22	-	-	58%	98%
23	-	-	42%	95%
24	-	-	74%	77%
25	-	-	38%	93%
26	-	-	60%	95%
27	-	-	82%	74%
28	-	-	77%	100%
29	-	-	96%	88%
30	-	-	71%	82%
31	-	-	100%	96%
32	-	-	51%	89%
33	-	-	41%	83%
34	-	-	96%	98%
35	-	-	49%	44%
36	-	-	62%	92%
37	-	-	100%	100%
38	-	-	100%	100%
39	-	-	49,2%	55,5%
40	-	-	80,6%	47,5%
41	-	-	75%	60%
42	-	-	100%	100%
43	-	-	49,1%	22,4%
44	-	-	34,3%	61,8%
45	-	-	35,9%	26,6%
	$\chi = 71,1\%$ SF = 4,6	$\chi = 49,2\%$ SF = 7,2	$\chi = 70,2\%$ SF = 3,6	$\chi = 78,5\%$ SF = 3,51

χ = gemiddelde

SF = Standaardfout van die gemiddelde

BRONNELYS

ARBUZOVA, A. & SCHWARZ, G. 1999. Pore-forming action of mastoparan peptides on liposomes: a quantitative analysis. *Biochimica et biophysica acta*, 1420:139-152.

BARRY, W.H. & BRIDGE, J.H.B. 1993. Intracellular calcium homeostasis in cardiac myocytes. *Circulation*, 87(6):1806-1815.

BECHINGER, B. 1999. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochimica et biophysica acta*, 1462:157-183.

BERNHEIMER, A.W. & RUDY, B. 1986. Interactions between membranes and cytolytic peptides. *Biochimica et biophysica acta*, 864:123-141.

BERS, D.M., BASSANI, J.W.M. & BASSANI, R.A. 1996. Na-Ca exchange and Ca fluxes during contraction and relaxation in mammalian muscle. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 779:430-442.

BERS, D.M., LEDERER, W.J. & BERLIN, J.R. 1990. Intracellular calcium transients in rat cardiac myocytes: role of Na-Ca exchange in excitation-contraction coupling. *American journal of physiology*, 258(27):C944-C954.

BEUKELMANN, D.J. & WIER, W.G. 1989. Sodium-calcium exchange in guinea-pig cardiac cells: exchange current and changes in intracellular Ca^{2+} . *Journal of physiology*, 414:499-520.

BHAKDI, S. & TRANUM-JENSEN, J. 1988. Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolytins. *Progress in allergy*, 40:1-43.

BIAN, J-S., ZHANG, W-M., XIA, Q. & WONG, T-M. 1998. Phospholipase C inhibitors attenuate arrhythmias induced by κ -receptor stimulation in the isolated rat heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 30:2103-2110.

BKAILY, G., SPERELAKIS, N. & DOANE, J. 1984. A new method for preparation of isolated single adult myocytes. *American journal of physiology*, 247:H1018-H1026.

BORGERS, M., VER DONCK, L. & VANDEPLASSCHE, G. 1988. Pathophysiology of cardiac myocytes. *Annals New York Academy of Sciences*, 522:433-453.

CAHALAN, M.D. 1975. Modification of sodium channel gating in frog myelinated nerve fibers by *Centruroides sculpturatus* scorpion venom. *Journal of physiology*, 244:511-534.

CALLEWAERT, G. 1992. Excitation-contraction coupling in mammalian cardiac cells. *Cardiovascular research*, 26:923-932.

CATTERALL, W.A. 1992. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiological reviews*, 72(4):S15-S48.

CHAPMAN, R.A. & TUNSTALL, J. 1987. The calcium paradox of the heart. *Progress in biophysics and molecular biology*, 50:67-96.

CHEN, D., KINI, R.M., YUEN, R. & KHOO, H.E. 1997. Haemolytic activity of stonustoxin from stonefish (*Synanceja horrida*) venom: pore formation and the role of cationic amino acid residues. *Biochemical journal*, 325:685-691.

DANILENKO, M., WORLAND, P., CARLSON, B., SAUSVILLE, E.A. & SHARONI, Y. 1993. Selective effects of mastoparan analogs: separation of G-protein-directed and membrane-perturbing activities. *Biomedical and biophysical research communications*, 196(3):1296-1302.

DEMPSEY, C.E. 1990. The actions of melittin on membranes. *Biochimica et biophysica acta*, 1031:143-161.

DUDEL, J. 1989. Information transfer by electrical excitation. (In Schmidt, R.F. & Thews, G., eds. Human physiology. Berlin: Springer-Verlag. 825p.)

DYASON, K. 1999. Elektrofisiologiese eienskappe van *Parabuthus transvaalicus* venoom op natrium- en kaliumkanale in hart en senuwee. Potchefstroom: PU vir CHO. (Proefskrif-Ph.D.) 207 p.

FANG, Y., CONDRESCU, M. & REEVES, J.P. 1998. Regulation of Na⁺Ca²⁺ exchange activity by cytosolic Ca²⁺ in transfected Chinese hamster ovary cells. *American journal of physiology*, 275(44):C50-C55.

FELZEN, B., BERKE, G., GARDNER, P. & BINAH, O. 1997. Involvement of the IP₃ cascade in the damage to guinea-pig ventricular myocytes induced by cytotoxic T lymphocytes. *European journal of physiology*, 433:721-726.

FLETCHER, J.E., HUBERT, M., WIELAND, S.J., GONG, Q-H. & JIANG, M-S. 1996. Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. *Toxicon*, 34(11):1301-1311.

GORDON, D., MARTIN-EAUCLAIRE, M-F., CESTÈLE, S., KOPENYAN, C., CARLIER, E., KHALIFA, R.B., PELHATE, M. & ROCHAT, H. 1996. Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor

sites on rat brain and insect sodium channels. *The journal of biological chemistry*, 271(14):8034-8045.

GRANT, A.O. 1991. The electrophysiology of the cardiac sodium channel. *Trends in cardiovascular medicine*, 1(8):321-330.

HETRU, C., LETELLIER, L., OREN, Z., HOFFMANN, J.A. & SHAI, Y. 2000. Androctonin, a hydrophilic disulfide-bridged non-haemolytic anti-microbial peptide: a plausible mode of action. *Biochemical journal*, 345:653-664.

HRYSHKO, L.V. & PHILIPSON, K.D. 1997. Sodium-calcium exchange: recent advances. *Basic research cardiology*, 92(1):45-51.

ITOGAWA, E., KUROSAWA, H., YABANA, H. & MURATA, S. 1996. Protective effect of *l*-cis-diltiazem on hypercontracture of rat myocytes induced by veratridine. *European journal of pharmacology*, 317:401-406.

KAPPL, M. & HARTUNG, K. 1996. Rapid charge translocation by the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger after a Ca²⁺ concentration jump. *Biophysical journal*, 71:2473-2485.

KIMURA, J., NOMA, A. & IRISAWA, H. 1986. Na-Ca exchange current in mammalian heart cells. *Nature*, 319:596-597.

KINI, R.M. & EVANS, H.J. 1989. A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. *International journal of peptide and protein research*, 34:277-286.

KOMATSU, M., McDERMOTT, A.M., GILLISON, S.L. & SHARP, W.G. 1993. Mastoparan stimulates exocytosis at a Ca²⁺-independent late site in stimulus-secretion coupling. *The journal of biological chemistry* 268(31):23297-23306.

LADOKHIN, A.S., SELSTED, M.E. & WHITE, S.H. 1997. Sizing membrane pores in lipid vesicles by leakage of co-encapsulated markers: pore formation by melittin. *Biophysical journal*, 72:1762-1766.

MACEK, P., BELMONTE, G., PEDERZOLLI, C. & MENESTRINA, G. 1994. Mechanism of equinatoxin II, a cytolyisin from sea anemone *Actinia equina* L. belonging to the family of actinoporins. *Toxicology*, 87:205-227.

MAHADEVAN, D., NDIRIKA, A., BASCHFORD, L., CHAMBERS, T. & PASTERNAK, C. 1990. Protection against membrane-mediated cytotoxicity by calcium and zinc. *American journal of pathology*, 136(3):513-520.

MARBAN, E., YAMAGISHI, T. & TOMASELLI, G.F. 1998. Structure and function of voltage-gated sodium channels. *Journal of physiology*, 508(3):647-657.

MECHMANN, S. & POTT, L. 1986. Identification of Na-Ca exchange current in single cardiac myocytes. *Nature*, 319:597-599.

MENESTRINA, G., MOSER, C., PELLET, S. & WELCH, R. 1994. Pore-forming by *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxin family. *Toxicology*, 87:249-267.

MINEZAKI, K.K. & CHAPMAN, R.A. 1993. The role of the sodium pump and sodium-calcium exchange in recovery from calcium overload in guinea-pig ventricular myocytes. *Experimental physiology*, 78:545-548.

MITRA, R. & MORAD, M. 1985. A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of vertebrates. *American journal of physiology*, 249:H1056-H1060.

OJCIUS, D.M., LIU, C. & YOUNG, J.D. 1998. Pore-forming proteins. *Science and medicine*, 5:44-53.

OMRAN, M.A.A. & ABDEL-RAHMAN, M.S. 1992. Effect of scorpion *Leiurus quinquestriatus* (H&E) venom on the clinical chemistry parameters of the rat. *Toxicology letters*, 61:99-109.

PARK, J-W., JAHNG, T-A., RHO, H-W., PARK, B-H., KIM, N-H. & KIM, H-R. 1994. Inhibitory mechanism of Ca^{2+} on the hemolysis caused by *Vibrio vulnificus* cytolysin. *Biochimica et biophysica acta*, 1194:166-170.

POSSANI, L.D., BECERRIL, B., DELEPIERRE, M. & TYTGAT, J. 1999. Scorpion toxins specific for Na^{+} -channels. *European journal of biochemistry*, 264:287-300.

RUDENKO, S.V. & NIPOT, E.E. 1996. Protection by chlorpromazine, albumin and bivalent cations against haemolysis induced by melittin, [Ala-14]melittin and whole bee venom. *Biochemical journal*, 317:747-754.

SARVAZYAN, N. 1998. A new approach to assess viability of adult cardiomyocytes: computer-assisted image analysis. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 30:297-301.

SCHNABEL, P., GÄS, H., NOHR, T. & BÖHM, M. 1997. G protein-independent stimulation of human myocardial phospholipase C by mastoparan. *British journal of pharmacology*, 122:31-36.

SIMARD, J.M. & WATT, D.D. 1990. Venoms and toxins. (*In* Polis, G., ed. *The biology of scorpions*. New York: Stanford University Press. p.504)

TAMURA, K., SUZUKI, Y., KOGA, T., AKIMA, A., KATO, T. & NABATA, H. 1996. Actions of CP-060S on veratridine-induced Ca^{2+} overload in cardiomyocytes and mechanical activities in vascular strips. *European journal of pharmacology*, 312:195-202.

TANG, L., CHEHAB, N., WIELAND, S.J. & KALLEN, R.G. 1998. Glutamine substitution at alanine¹⁶⁴⁹ in the S4-S5 cytoplasmic loop of domain 4 removes the voltage sensitivity of fast inactivation in the human heart sodium channel. *Journal of general physiology*, 111:639-652.

TERRACCIANO, C.M.N., DE SOUZA, A.I., PHILIPSON, K.D. & MacLOAD, T.K. 1998. Na^+ - Ca^{2+} exchange and sarcoplasmic reticular Ca^{2+} regulation in ventricular myocytes from transgenic mice overexpressing the Na^+ - Ca^{2+} exchanger. *Journal of physiology*, 512(3):651-667.

TYTGAT, J. 1994. How to isolate cardiac myocytes. *Cardiovascular research*, 28:280-283.

ULBRICHT, W. 1998. Effects of veratridine on sodium currents and fluxes. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, 133:1-54.

VERDONCK, F., BOSTEELS, S., DESMET, J., MOERMAN, L., NOPPE, W., WILLEMS, J., TYTGAT, J. & VAN DER WALT, J. 2000. A novel class of pore-forming peptides in the venom of *Parabuthus schlechteri* Purcell (Scorpions: Buthidae). *Cimbebasia*, 16:247-260.

VER DONCK, L. & BORGERS, M. 1991. Myocardial protection by R56865: a new principle based on prevention of ion channel pathology. *American journal of physiology*, 261:H1828-H1835.

WRIGHT, A.R., REES, S.A., VANDENBERG, J.I., TWIST, V.W. & POWELL, T. 1995. Extracellular osmotic pressure modulates sodium-calcium exchange in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Journal of physiology*, 488(2):293-301.

YAMANAKA, H., SATOH, T., KATSU, T. & SHINODA, S. 1987. Mechanism of haemolysis by *Vibrio vulnificus* haemolysin. *Journal of general microbiology*, 133:2859-2864.

YAMASHITA, T., YAMAUCHI, A., MIYAI, A., TANIGUCHI, M., YOSHIMINE, T. & TOHYAMA, M. 1999. Neuroprotective role of Na⁺/myo-inositol cotransporter against veratridine cytotoxicity. *Journal of neurochemistry*, 72:1864-1870.

BEDANKINGS

2 Korinthiërs 12:9

Sy antwoord was: "My genade is vir jou genoeg.

My krag kom juis tot volle werking wanneer jy swak is"

Sonder die Here se genade was hierdie studie nie moontlik.

Dankie aan die volgende persone:

- My gesin Corrin, Corika en Christelle.
- Dr. Karin Dyason en prof. Jurg van der Walt vir hulle bekwame hulp en leiding.
- Prof. Fons Verdonck wat sê: "Wees niet bang te moeten toevoegen dat je voor iets geen verklaring hebt; de wetenschap leeft van vraagtekens".
- Dr. Suzanne Bosteels vir haar bydrae.
- Prof. Nico Malan vir die besonderse wyse waarop hy die taalversorging hanteer het.
- Die personeel van vakgroep Fisiologie vir hulle belangstelling en ondersteuning.
- Al my vriende en familie vir hul belangstelling, aanmoediging en ondersteuning.
- Statistiese konsultasie dienste vir die bepaling van die variansie analise.