

LIPOSZÓMA: ELŐÁLLÍTÁSA, VIZSGÁLATA, FELHASZNÁLÁSA A MEMBRÁNKUTATÁSBAN ÉS A GYAKORLATBAN

BÁTHORI GYÖRGY

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézet, Budapest

Bevezetés

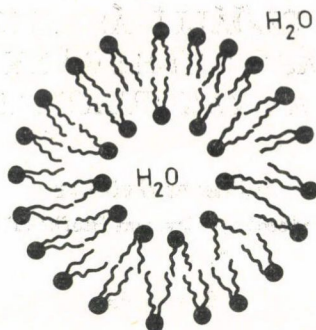
A lipid vezikulák, vagy ahogy kevésbé pontos terminológiával nevezni szokták, liposzómák az utóbbi években az orvosbiológiai tudományok egyre több területén nyertek polgárjogot, újabban pedig komoly gyakorlati jelentőségre tettek szert. A lipid vezikulák tulajdonképpen lipidréteggel határolt gömböcskék (1. ábra), amelyek a sejtmembrán lipidkettősrétegét vannak hivatva modellezni a különféle vizsgálatokban. Eredetileg a kolloidika és a biofizika tudományok körébe tartozó vizsgálatok kedvelt objektumai voltak, hamarosan azonban a biokémikusok is felfedezték, a közelmúltban pedig klinikai alkalmazásukra történtek biztató kísérletek. Jelen munkának egyrészt az a célkitűzése, hogy a hazai szakemberek számára figyelemfelkeltő céllal áttekintést nyújtson a lipid vezikulák felhasználhatóságáról, másrészt be szándékozik mutatni, hogyan épülnek egymásra az anyag szerveződésének egyre magasabb bonyolultsági fokán vizsgálódó diszciplínák (fizika, biofizika, biokémia, élettan, immunológia, klinikai orvostudomány) által nyert eredmények.

A lipid vezikulák előállításánál használatos anyagok és módszerek

Erről a témakörrel több összefoglaló tanulmány áll rendelkezésre (PAGANO és WEINSTEIN 1978, SZOKA és PAPAHDJOPOULOS 1980, SZEBENI és BÁTHORI 1981), ezért csak kivonatossan ismertetem.

A lipidek alapváza egyszerű esetben egy glicerin molekula, amelyhez észter kötéssel két zsírsavlánc kapcsolódik, és az ún. fejcsoport. A fejcsoport a molekula hidrofil része, amely töltésére nézve lehet negatív (például foszfatidil-szerin, foszfatidsav, kardiolipin, foszfatidil-etanolamin), semleges (foszfatidilkolin) vagy pozitív (szfingomielin). Ettől az általános szerkezettől eltérnek a koleszterin és származékai. További megkülönböztetést is tehetünk aszerint, hogy az adott lipid tartalmaz-e kettőskötéseket vagy sem. Ez utóbbi körülmény erősen befolyásolja fizikai tulajdonságukat. A természetes anyagokból kivonható lipidek általában kettőskötéseket tartalmaznak. Léteznek ezenkívül kettőskötés mentes ún. szintetikus készítmények is.

A lipid vezikulák előállításánál a cél általában az, hogy egy vizes fázisban diszpergáljuk a lipideket, vagyis egy szerves fázist. Ha ezt a műveletet



1. ábra. Liposzóma sematikus ábrája

kézzel rázással vagy rázógéppel végezzük, akkor hagymahéjszerűen egymásra boruló koncentrikus lipid kettősréteget nyerünk. Ma már csak az utóbbiakat nevezzük liposzómának, az összes olyan készítményt, amelyet egyetlen lipid kettősréteg alkot, lipid vezikulának hívjuk.

A diszpergálást végezhetjük ultrahang segítségével is. Ilyenkor vezikulákat kapunk. Az eljárás során azonban részben oxidálódhatnak, részben pedig a méreteloszlásuk inhomogén lesz.

Mindkét fenti problémát megoldják az ún. injektálási módszerek. Ekkor a szerves oldószerben oldott lipidet egy fecskendő segítségével juttatjuk a vizes fázisba és az oldószert például dialízissel távolítjuk el. Az előállítás során befolyásolni tudjuk, hogy nagy vagy kisméretű vezikulák készüljenek. A vezikulák fizikai tulajdonságai — a molekulák rendezettsége — a mérettől függően erősen különböznek egymástól. A sejtmembránt csak a nagyméretűek modellezik jól.

További eljárások is ismeretesek, ezekre azonban itt nem kívánok kitérni.

A vezikulák biofizikája

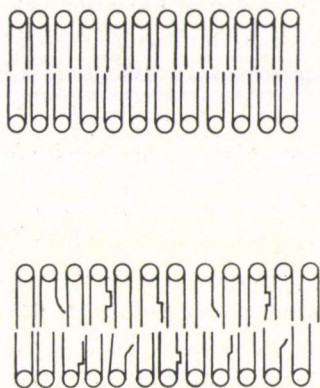
A vezikulák molekuláris kettősrétegében lezajló szerkezetváltozásokat túlnyomórészt fizikai módszerekkel tudjuk vizsgálni és fizikai fogalmakkal értelmezni. A biofizikai vizsgálódások tárgyául azok a szerkezetváltozások szolgálnak, amelyek biológiai funkciókkal bírnak.

A lipid vezikulák (tágabb értelemben: a molekuláris lipid kettősrétegek) fizikai szempontból ún. *folyadékkristály*oknak tekinthetők. A folyadékkristályok esetén a szilárd halmazállapotból a folyadék halmazállapotba nem egy lépcsőben történik az átmenet, hanem több különböző közbeeső ún. mezomorf állapoton keresztül. Egy adott anyag esetén nem szükségképpen lép fel az összes mezomorf állapot. A mi szempontunkból érdekes átalakulást a 2. ábra mutatja. A sematikus rajzból jól látható, hogy a molekula réteg alapvetően rendezett marad, de azért a rendezettség bizonyos mértékben csökken (elsősorban a molekulán belüli rendezettség).

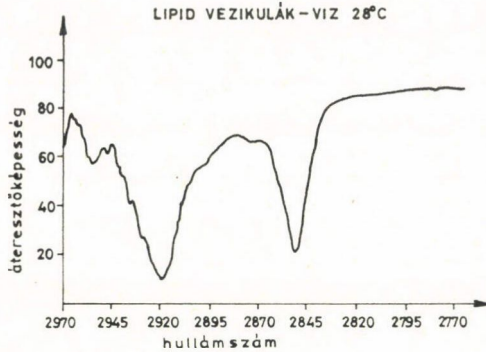
Ezen fázisátalakulás jelentőségének alátámasztásául szeretném előljáróban megemlíteni azokat a biológiai funkciókat, amelyekben a fázisátalakulás szerepet játszik s amelyek egyébként vezikulákon modellezhetőek. Négy ilyen funkció van: *anyagtranszport* (permeabilitás), *immunolízis*, *membrán fúzió*, *enzim aktivitás szabályozása*. Emellett azt is érdemes megemlíteni, hogy számos gyógyszer (anesztetikumok, trankvillánsok) szintén a fázisátalakulás menetébe szólnak bele. Miután láthatjuk, hogy ugyanaz a fizikai jelenség ennyi különböző folyamatban jut szerephez, önként adódik a kérdés, hogyan lehetséges ez? A válasz a következőben foglalható össze: a molekuláris mechanizmus viszonylag bonyolult, ennek következtében, mikor a lipidrteg egyéb anyagokkal kapcsolatba kerül (fehérjék, ionok), végkifejlete a kölcsönható anyagtól függően más és más lehet. Ezek után szeretnék rátérni a fázisátalakulás tárgyalására.

A fázisátalakulást elsősorban a hőmérséklet változtatásával lehet kiváltani, de ezenkívül pH, ionkoncentráció változás, fehérjékkel való kölcsönhatás is okozhatja. A fázisátalakulási állapotban a membrán különleges tulajdonságokkal rendelkezik, például különböző anyagokra nézve ilyenkor a legnagyobb az áteresztőképessége.

A különféle lipidfajtáknak más és más hőmérsékleten van a fázisátalakulása. Szokás szerint ennek pontos értékét mikrokalorimetriás módszerrel állapítják meg (a leggyakrabban DSC-vel) (SZŐGYI és mtsai 1981). Az átalakulás során végbemenő molekuláris változásokat pedig különféle szerkezetvizsgáló módszerekkel derítik fel (röntgenszórás, neutronszerzés, elektronszerzés, NMR, ESR, lézer-Raman, infravörös és fluoreszcens spektroszkópia). Ezek a módszerek kiegészítik egymást, de még távolról sem adnak teljes képet a vizsgált folyamatról. Éppen emiatt bírnak különleges jelentőséggel az elméleti modellek, amelyek kapcsolatot teremtenek a különböző típusú mérési eredmények között (SUGÁR 1979). Néhány példát mutatok be ízelítőképpen arról, hogy milyen típusú információt tudnak nyújtani. A második ábrán látható szénhidrogén-



2. ábra. Molekuláris konformáció változások a fázisátalakulás alatt



3. ábra. Spektrumrészlet a metilénsoport vegyértékrezgéseinek régiójából

láncokon törések vannak. Ezeknek a töréseknek a létrejöttét lézer-Raman spektrumokon látható változások alapján lehetett megállapítani (WALLACH és mtsai 1979). A harmadik ábrán saját eredményünk látható. Az infravörös spektrum sávjai különféle molekuláris részek (CH_2 , CH_3 stb.) rezgéseire rendelhetők. Ezek változásainak elemzése alapján állíthatjuk, hogy nemcsak ezek a láncrészek jönnek létre, hanem a molekuláris szerkezet felborul, a lecitin molekulák közti szabad tér nagyobbá válik. Nem sorolhatok itt fel minden módszert, inkább megint csak példaképpen a fenti molekuláris változás konzekvenciáit említem meg. A láncrészek következtében hibahelyek, ún. lyukak jelennek meg a membránban, amelyek a lánc mentén végig vándorolhatnak (SUGÁR 1979), s közben anyagot transzportálhatnak. Ezt az is alátámasztja, hogy a láncrészek számának emelkedésével a lipid kettősréteg permeabilitása növekszik. A molekuláris szerkezet lazulása pedig az oldalirányú mozgást teszi lehetővé. Ez a típusú mozgás a fehérjék funkciójához, alegységeik egymásmellé kerüléséhez elengedhetetlen.

Külön részletezés nélkül itt említem meg a biofizikai vizsgálatok egyik melléktermékét. A vezikulák bizonyos körülmények között képesek egymással összeolvadni, fuzionálni. A fúzió pontos molekuláris mechanizmusa jelenleg még nem ismert, további kutatások tárgyát képezi.

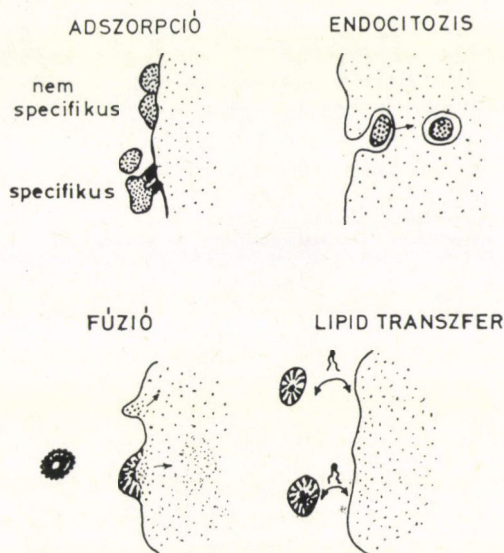
A lipid vezikulák felhasználási lehetőségei biokémiai vizsgálatoknál

Ebben az alfejezetben felsorolt eljárások és vizsgálatok jelentős része határterületet képez a biofizika és biokémia között. Hogy ez mit jelent, azt az enzim beépítési kísérletek példáján szeretném bemutatni. Ha mondjuk egy transzport enzimet építünk be a vezikulába, és ESR-rel vizsgáljuk a lipid-fehérje kölcsönhatás jellegét, vagy más alkalmas módszerrel a lipidréteg szerkezetét a fehérjék körül, akkor ez biofizika. Ha viszont a transzport funkciót tanulmányozzuk kinetikai módszerekkel, különböző gátló anyagok hatása

alatt, akkor ez biokémia. Végezetül, ha az enzimaktivitást vizsgáljuk, hőmérsékletfüggésben, és azt tapasztaljuk, hogy a lipid fázisátalakulási hőmérsékletén az aktivitás ugrásszerűen változik, akkor el sem tudjuk különíteni, hogy melyik diszciplínáról van szó tulajdonképpen. Hasonló átfedés azonban az élettan vonatkozásában is tapasztalható.

Ezek után vegyük sorba a további fontosabb alkalmazásokat. Legnagyobb jelentősége a fúziós kísérleteknek van. Ehhez az alapötletet az a — már említett — megfigyelés adta, hogy a vezikulák képesek egymással összeolvadni nagyobb vezikulákká. Kézenfekvő volt az a feltevés, hogy ha egymással fuzionálhatnak, akkor az élő sejtekkel is képesek a fúzióra. Ilyen módon viszont olyan anyagokat lehet a sejtbe juttatni, amelyek számára a membrán egyébként átjárhatatlan. Kísérleteinkben a c-AMP-t juttattunk be sejten belülré (BÁTHORI és mtsai 1981). Így válik tanulmányozhatóvá *in vivo* a c-AMP hatása különféle biokémiai mechanizmusokra. A fúziós kísérletek már előremutatnak a gyakorlati alkalmazások felé. Ha vezikulák segítségével olyan citosztikumokat juttathatunk célzottan a rákos sejtekbe, amelyek számára a membrán nem átjárható, akkor csökkentjük a káros mellékhatásokat.

A lipid vezikulák azonban nemcsak fúzió segítségével juttathatnak sejten belülré anyagot, hanem a fagocitózisra képes sejtek fagocitálhatják is őket. A vezikulát alkotó lipid fázisátalakulási hőmérséklete felett a fúzió, alatta a fagocitózis a domináló folyamat. A vezikula — sejt kölcsönhatás főbb lehetőségei a 4. ábrán láthatók. A specifikus adszorpció esetén a vezikula falába ellenanyag van építve. Ennek segítségével keresi fel a célsejtet, például a rákos sejtet.



4. ábra. A lipid vezikulák és sejtek kölcsönhatásának különféle módozatai

A fúziós kísérletek segítségével megváltoztathatjuk a sejtmembrán összetételét is. Az ilyen típusú kísérletek közül legérdekesebb az az eset, amikor valamilyen receptort, például acetilkolin receptort építenek be a vezikula falába, majd fuzionáltatják a sejtekkel. Az eljárás eredményeképpen a sejt egy új anyaggal szemben válik ingerelhetővé.

Lipid vezikulák segítségével vált felderíthetővé az immunolízis pontos mechanizmusa is. Ha valamilyen antigént építünk be a vezikula falába, majd specifikus ellenanyaggal és komplementtel hozzuk össze, létrejön a lízis. Ezt úgy észlelhetjük, hogy a vezikula kiengedi a bezárt jelzőanyagot, például spinjelölőt vagy glukózt (HSIA és TAN 1978, LEWIS és MCCONELL 1978). Ez a jelenség érdekes módon csak a fázisátalakulási hőmérsékleten megy végbe.

Az immunolízisnek ez a modellrendszere magában rejti a gyakorlati alkalmazás lehetőségét. Alkalmas a specifikus immunreakciók diagnosztikus célzatú kimutatására. Elképzelhető, hogy ez az eljárás a jövőben *membrán immunoassay* néven a radio immunoassay vetélytársává fejlődik.

Élettani vonatkozások — klinikai alkalmazások

Ezt a két alfejezetet célszerű összevonva tárgyalni. Ezt az indokolja, hogy az orvosi alkalmazásoknál szükséges kötelező óvatosság miatt a potenciális lehetőségeket élettani kísérletekben próbálják ki először (GREGORIADIS 1980).

Újból csak rövid felsorolásra vállalkozhatom. Az egyik érdekes lehetőség *fehérjetermészetű anyagok orális bejuttatása*. Ilyen kísérleteket végeztek például inzulinnal. A vezikulákba zárt inzulint diabéteszes patkányoknak adták be, s a patkányoknál ennek hatására hipoglikémia lépett fel (RYMAN és mtsai 1978).

Egy a közelmúltban a *Lancet*-ben megjelent közlemény arról tudósít, hogy vérzékenységben szenvedő beteget liposzómába „csomagolt” antihe-mofilia faktoralal gyógyították. A készítményt szintén orálisan alkalmazták. Antihemofilia faktor intravénás adagolás eddig is szokásos terápiás eljárás volt, azonban ilyenkor a hatás csak egy vagy két napig tartott. Az új eljárással viszont csak négy nap múlva kellett újabb adagot adni. A hatóanyag a liposzómából nem azonnal szabadult fel, hanem csak bizonyos idő elteltével, időben elnyújtva. Ez az ún. adjuváns hatás egy kissé bővebb magyarázatra szorul. A lecitinből készült vezikulák membránját a vérszérum fehérjéi lerombolják. A dezintegrálódás sebességét szabályozni lehet. Ha koleszterint építünk be a membránba, lassíthatjuk a folyamatot. Minnél magasabb a koleszterin tartalom a vezikulákban, azok annál ellenállóbbak (KIRBY és mtsai 1980, SCHERPHOF és mtsai 1979).

A vezikulákat a daganatok kemoterápiájában is fel lehet használni citosztatikumok célzott bejuttatására (SHINOZAWA és mtsai 1980). A citosztatiki-

kumokról jól ismert, hogy igen toxikusak. Nemcsak a daganatot, hanem az összes osztódó sejtet pusztítják. Ha lipid vezikulákba zárjuk őket, akkor csak azokkal a sejtekkel jutnak kapcsolatba, amelyekkel a vezikulák fuzionálnak. Egyes esetekben daganat ellenes ellenanyagot építenek be a vezikulák membránjába. Ezek ilyen módon specifikusan a daganatsejtekhez kötődnek, majd bekövetkezik a fúzió és a tartalmuk az intracelluláris térbe ürül. A kielégítő hatásfokú célzási módszerek kidolgozását jelenleg világszerte kutadják.

Ismeretes az is, hogy a daganatszövet a gyulladással szövetekhez hasonlóan valamelyest magasabb hőmérsékletű, mint a környezete. Lehetséges olyan lipid alkotókat találni, amely fázisátalakulása néhány fokkal a testhőmérséklet fölött van. Az ilyen lipiddből készült vezikula csak a daganatos szövetbe jutva kerül a fázisátalakulás állapotába. A biofizikai alfejezetben már említettük, hogy a membrán ilyenkor különleges tulajdonságokkal rendelkezik és áteresztőképessége maximális. Ennek következtében a citosztatikum lokálisan szabadul fel. Gyulladásos szövetek esetén a gyulladásgátló gyógyszerek hasonló lokális felszabadulását érhetjük el (GREGORIADIS 1980).

Radioaktív izotópok és gammakamera segítségével nyomon követhető volt, hogy a vezikulák elsősorban a májban, lépben és a nyirokcsomókban halmozódnak. Ennek alapján két további dologra használhatók fel: segítségükkel kirajzolható a nyirokcsomók pontos helye, továbbá egy bizonyos trópusi betegség, a leishmániázis esetén (ALVING és STECK 1979) a szükséges gyógyszert közvetlenül a májba juttatják, így a felhasznált gyógyszer mennyisége jelentősen csökkenthető.

Ezen a ponton abba kell hagynom az amúgy sem teljes felsorolást, részben, mert saját tudásom sem biztos, hogy kiterjed minden lehetőségre, részben pedig szinte naponta jelennek meg az új cikkek az irodalomban. Bizonyosnak mondható, hogy mire ez a munka kikerül a nyomdából, már kiegészítésre fog szorulni.

Összefoglalás

Végezetül a kutatási területnek a gyakorlattal való szoros kapcsolatát szeretném még egyszer aláhúzni, egy további a *gyógyszeriparunk szemszögéből* fontos körülmény kiemelésével. Anélkül, hogy új típusú gyógyszereket kellene előállítani, az előzőekben ismertetett módszer segítségével, a már meglévő régi szereket lehet új, hatékonyabb formában alkalmazni. Ez a megoldás jelentős költségmegtakarítást eredményezhet.

Szeretném azonban hangsúlyozni, hogy a sokféle gyakorlati alkalmazás csak lehetőségeket jelent és alapos, sokoldalú kutatómunkával kell majd tisztázni, hogy mennyi valósítható meg belőlük. Tekintettel az el nem hanyagolható gazdasági szempontokra, gondosan megválasztott kutatási stratégiát kell alkalmazni. Ennek a stratégiának két pillére van. A gyakorlati felhasználás

interdiszciplináris kutatást kíván. Szükség lehet biofizikusok, biokémikusok, élettanászok, immunológusok, gyógyszertechnológusok és klinikusok együttműködésére. Vegyük még ehhez tekintetbe, hogy a liposzómák nagyon sok alap kutatási probléma megoldásához bizonyulhatnak hasznos eszköznek. Ezeket a kutatásokat elő kell mozdítani, mert a gyakorlati célú kutatás tartalmát képezhetik.

A másik alapeleme a stratégiának, hogy néhány jól megválasztott területre kell koncentrálnunk, amelyek nagyobb valószínűséggel és gyorsabban hozhatnak eredményt (vakcina, RES betegségei, nyújtott hatású készítmények).

IRODALOM

- ALVING, G. R., STECK, E. A.: Trends Biochem. Sci. **4**, 175—177 (1979).
 BÁTHORI, GY., HOLLY, S., GRANDICS, P., NÁRAY, A.: MTA Biol. Oszt. Közl. **24**, 187—194 (1981).
 GREGORIADIS, G.: In: CELIS, J. E., GRAESSMANN, A., LOYTER, A. (ed): Transfer of cell constituents into eucaryotic cells. Plenum Publ. Corp., New York, N. Y. 173—199 (1980).
 GREGORIADIS, G.: Nature **283**, 814—815 (1980).
 HSIA, C. H., TAN, C. T.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **308**, 139—148 (1978).
 KIRBY, C., CLARKE, J., GREGORIADIS, G.: Febs Letters **111**, 324—328 (1980).
 LEWIS, T., McCONNELL, H. M.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **308**, 124—138 (1978).
 PAGANO, R. E., WEINSTEIN, J. N.: Ann. Rev. Biophys. Bioeng. **7**, 435—468 (1978).
 RYMAN, B. E., JEWKES, R. F., JEYASINGH, K., OSBORNE, M. P., PATEL, H. M., RICHARDSON, V. J., TATTERSAL, M. H. N., TYRELL, D. A.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **308**, 281—307 (1978).
 SCHERPHOF, G., MORSELT, H., RECTS, J., WILSCHUT, J. C.: Biochim. Biophys. Acta **556**, 196—207 (1979).
 SHINOZAWA, S., ARAKI Y., ODA, T.: Gann, **71**, 107—111 (1980).
 SUGÁR, I. P.: Biochim. Biophys. Acta **556**, 72—85 (1979).
 SZEBENI, J., BÁTHORI, GY.: Biológia **29**, 3—28 (1981).
 SZOKA, F. JR., PAPAHAJDOPOULOS, D.: Ann. Rev. Biophys. Bioeng. **9**, 467—508 (1980).
 SZŐGYI, M., CSERHÁTI, T., SZABON, J.: MTA Biol. Oszt. Közl. **24**, 202—207 (1981).
 WALLACH, D. F. H., VERMA, S. P., FOOKSON, J.: Biochim. Biophys. Acta **559**, 153—208 (1979).