

# MEMBRÁN MŰKÖDÉST BEFOLYÁSOLÓ ANYAGOK VIZSGÁLATA MESTERSÉGES MEMBRÁNON\*


SZŐGYI MÁRIA, CSERHÁTI TIBOR\* és SZABON JÁNOS\*\*

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Biofizikai Intézet, \* Növényvédelmi Kutató Intézet,  
\*\* Központi Fizikai Kutató Intézet

A hatóanyag szervezetbe, sejtekbe való bejuttatásához gyakran használnak felületaktív anyagokat. Számos irodalmi adat (LEVY és mtsai 1966, SUZUKI és mtsai 1967, GIBALDI, FELDMAN 1970) utal arra, hogy gyógyszerek pl. barbiturátok, szulfonamidok, antibiotikumok felszívódása, vérszintje szignifikánsan megnő nem-ionos felületaktív anyagok jelenlétében. A peszticid szerformákban alkalmazott felületaktív anyagok ugyancsak sok esetben jelentős módon megváltoztatják a hatóanyag biológiai aktivitását (VALKENBURG 1973). Tekintve, hogy a bioszférába évről évre nagyobb mennyiségbe kerülő felületaktív anyagok maguk is rendelkeznek biológiai aktivitással, szükség van pontos hatásmechanizmusuk megismerésére, molekuláris paramétereik és hatásosságuk közötti összefüggés vizsgálatára.

Munkánk célja a nem-ionos felületaktív anyagok csoportjába tartozó nonil-fenil-etilénoxid polimerek membránalkotó lipid molekulákkal való kölcsönhatásának tanulmányozása, molekula szerkezetük és hatásosságuk közötti kapcsolat vizsgálata.

## Vizsgálati anyagok és módszerek

Kísérleteinkhez a nonil-fenil-etilénoxid polimer sor  $n = 4 - 30$  etilénoxid csoportot tartalmazó tagjait használtuk ( $C_9H_{19}$ -- $O(CH_2-CH_2O)_n H$ ).

A molekula lipofil része állandó, a hidrofil rész az etilénoxid csoportok számával változtatható. Tekintve, hogy a felületaktív anyagok jelentős membránműködést befolyásoló hatással rendelkeznek, így a homológ sor tagjai ideális vegyületek a molekula struktúra és membránkárosító hatás közötti kapcsolat vizsgálatára.

Meghatároztuk a molekulák biológiai hatásának értelmezése szempontjából fontos diffúziós sajátosságait, valamint lipofilitásukat. A diffúziós együtt-

\* X. Membrán Transzport Konferencián 1980. május 13-16. között Sümegen elhangzott előadás.

ható meghatározását az általunk korábban kidolgozott eljárással végeztük (TAMÁS, SZŐGYI 1973). Az agárgélbe vitt felületaktív anyag diffúzióját desztillált víz felé vizsgáltuk. A kidiffundált felületaktív anyag koncentrációját extinkció mérés alapján határoztuk meg. A diffúziós együttható kiszámításánál a hivatkozásban közölt módon jártunk el.

A molekulák lipofilitására jellemző  $R_M$  értéket reverz fázisú vékonyréteg kromatográfiás módszerrel határoztuk meg (CSERHÁTI, JÁNOS 1980).

A felületaktív molekulák és a membrán közötti kölcsönhatás pontos felderítése érdekében a membránalkotó lipid komponensek közül dipalmitoyl foszfatidilkolinból (DPPC) készítettünk liposzómát (a Koch—Light gyártmányú lipid tisztaságát vékonyréteg kromatográfiás módszerrel ellenőriztük). A lipidet 0,16 M-os  $^{42}\text{KCl}$ -ot tartalmazó oldatban duzzasztottuk, majd vízűtés és nitrogén-átáramoltatás mellett 20 percig ultrahanggal besugároztuk. (A besugárzást MSE 150 wattos, 20 kHz-es dezintegrátorral végeztük.) 16—18 órával az ultrahang besugárzás után a liposzómát Sephadex G-50-ből készült kromatográfiás oszlopra vittük, hogy a külső aktív oldattól elválasszuk. A mosófolyadék 0,16 M-os KCl oldat volt, átfolyási sebessége 0,5 cm<sup>3</sup>/perc. Az oszlopról lejövő frakciók közül aktivitás mérés [szcintillációs üreges NaI(Tl) kristály] alapján választottuk ki a továbbiakban felhasznált, legnagyobb aktivitást tartalmazó liposzóma frakciókat. A szétválasztást minden esetben a frakciók aktivitásának meghatározása révén ellenőriztük. A liposzómából 3—3 cm<sup>3</sup>-t dializáló zsákokba mértünk. Ezek közül egyet kontrollnak tekintettünk, a többihez felületaktív anyagot adtunk (100 µg/cm<sup>3</sup>). A dializáló zsákokban levő liposzómát 0,16 M-os inaktív KCl-t tartalmazó (10 cm<sup>3</sup>) pohárba tettük. A külső oldatot három órán keresztül negyedóránként cseréltük és mértük a kiáramló  $^{42}\text{KCl}$  percenkénti impulzusszámát. A kísérletet szobahőmérsékleten, ill. 42 °C-on a DPPC fázisátalakulási hőmérsékletén végeztük.

A dializáló zsákokban levő liposzóma lipid tartalmát foszforméréssel határoztuk meg.

Kísérleti eredményeink kvantitatív értékelését, a permeabilitási állapotok kiszámítását JOHNSON és BANGHAM (1969) által kidolgozott módon végeztük.

DSC-módszerrel mértük a DPPC felületaktív anyagok hatására bekövetkező fázisátalakulási hőmérséklet és fázisátalakulási entalpia változását. A méréseket Perkin—Elmer DSC-2 típusú készülékkel végeztük, fűtési sebesség 1,25 °C/perc. Az entalpia változás meghatározása indium standarddal való kalibrálással történt.

A biológiai aktivitás adatokat *Bac. subtilis* törzsön határoztuk meg. Bouillon táptalajban növesztett 10<sup>6</sup> bakt/cm<sup>3</sup> kiindulási csíraszámú baktériumkultúra szaporodását mértük, rázatott tenyészetben turbidimetriás módszerrel, 600 nm hullámhosszon. A felületaktív anyag koncentrációja 30, 50 és 100 µg/cm<sup>3</sup> volt.



### Eredmények és értékelésük

Az 1. ábrán a molekulák vizes közegben mért diffúziós egyensúlyi állandóját ( $D$ ) tüntettük fel a lipofilitást jellemző  $R_M$  érték függvényében.

Mint az ábrából látható, a nonil-fenil-etilénoxid polimerek vízben mért diffúziós egyensúlyi állandója a molekulák lipofilitásának logaritmusával csökken. Kísérleti eredményeinket a következő függvénykapcsolat írja le:

$$D = a + b \log R_M$$

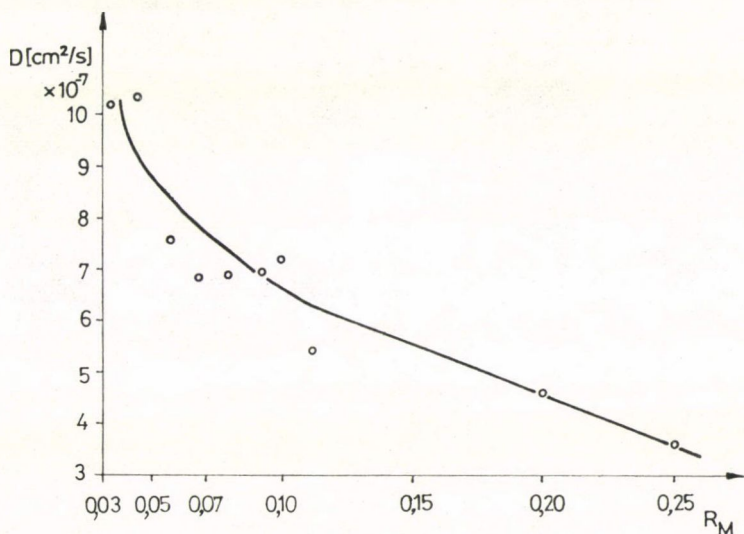
$$D = -0,429 - 6,9 \log R_M \quad n = 68$$

$$r = 0,6992; \quad r_{99,9} = 0,4078.$$

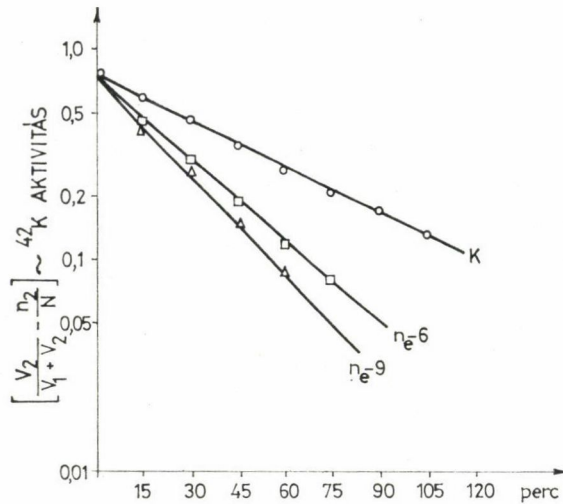
A fenti összefüggés arra az eddig nem kellő mértékben tanulmányozott jelenségre hívja fel a figyelmet, hogy a diffúziós egyensúlyi állandó a molekulaszűrés és a molekulaalak mellett a molekula hidratációs képességének, a molekulán belül a hidrophil és lipofil részek arányának függvénye is lehet.

A 2. ábrán azoknak a kísérleteknek az eredményét tüntettük fel, amelyeket a felületaktív molekulák liposzóma  $^{42}\text{K}$ -leadására gyakorolt hatásának vizsgálatakor kaptunk.

A liposzóma  $^{42}\text{K}$ -aktivitásával arányos mennyiséget ábrázoltuk az idő függvényében féllogaritmos koordináta rendszerben. A  $42^\circ\text{C}$ -on végzett mérések alapján megállapítható, hogy az  $n = 6$ , ill.  $n = 9$  etilénoxid csoportot



1. ábra. Nonil-fenil-etilénoxid polimerek vízben mért diffúziós egyensúlyi állandója ( $D$ ) a molekulák lipofilitásának ( $R_M$ ) függvényében



2. ábra.  $^{42}\text{K}$ -kiáramlás a kontroll (K), valamint az  $n = 6$ , ill.  $n = 9$  etoxi-csoportot tartalmazó felületaktív molekulákkal kezelt liposzómából

tartalmazó molekulák jelenlétében a  $^{42}\text{K}$ -kiáramlás jelentős mértékben nő a kontrollhoz képest. Méréseinket a homológ sor többi tagjával is elvégeztük, eredményeinket az 1. táblázatban összefoglalt permeabilitási állandók mutatják. (Az adatok  $42^\circ\text{C}$ -ra vonatkoznak.)

Az adatokból kitűnik, hogy az  $n = 4$  etilénoxidot tartalmazó molekula nem okoz változást, 6, ill. 9 etilénoxid csoport esetén a permeabilitást növelő hatás nagyobb, mint a 13, ill. 30 etilénoxid tartalmú molekuláknál.

Ha a szobahőmérsékleten mért kontrollértéket:  $0,5 \cdot 10^{-12}$  m/sec összehasonlítjuk a DPPC fázisátalakulási hőmérsékletén ( $42^\circ\text{C}$ ) mért értékkel, szem-

#### 1. táblázat

A kontroll és a felületaktív anyaggal ( $n = 4, 6, 9, 13, 30$  etoxi-csoportot tartalmazó molekulák) kezelt liposzóma permeabilitását jellemző adatok ( $42^\circ\text{C}$ -on)

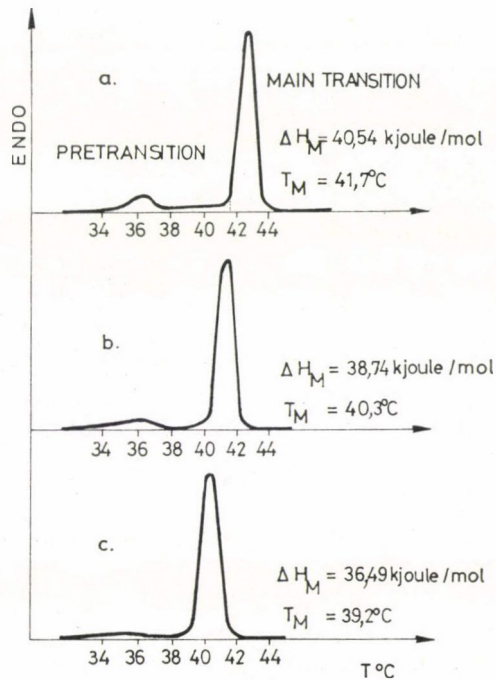
permeabilitási állandó $\times 10^{-12}$ m/s	
$P_K$	= 5,2
$P_{n-4}$	= 5,3
$P_{n-6}$	= 9,0
$P_{n-9}$	= 12,0
$P_{n-13}$	= 8,2
$P_{n-30}$	= 6,0

betűnő, hogy a permeabilitás mintegy tízszeresére nő. Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy a foszfolipid gélből folyadékkristályos fázisba való átalakulásakor nagymértékben csökken a membránban az intermolekuláris rend és ez elektrolitok, nem-elektrolitok megnövekedett átjutását eredményezi a membránon (SINGER 1979, PAPAHDJOPOULOS és mtsai 1973, BLOK és mtsai 1975).

A vizsgált felületaktív anyagok szobahőmérsékleten is megváltoztatják a liposzóma permeabilitását. A hatás azonos módon függ a molekulában levő etilénoxid csoportok számától, mint azt a 42 °C-on mért értékeknél tapasztaltuk.

A felületaktív molekulák és lipid közötti kölcsönhatás molekuláris szintű értelmezése a DSC mérések eredményei alapján vált lehetségessé. Példaként az  $n = 6$  etilénoxid csoportot tartalmazó molekulával kapott eredményeket mutatjuk be a 3. ábrán.

A tiszta DPPC görbében („a” görbe) a pretransition 35 °C-nál, a main-transition kezdete (gél—folyadékkristály átalakulás) 41,7 °C-on van, az utóbbi átalakulási entalpiája 40,54 kJ/mol. Felületaktív anyag jelenlétében („b” görbe, 97 : 3 lipid—felületaktív anyag molarány) a DPPC főátalakulási hő-



3. ábra. DSC görbék. Az „a” görbe a tiszta DPPC, a „b” görbe 97 : 3 DPPC-felületaktív anyag (molarány), a „c” görbe 90 : 10 DPPC-felületaktív anyag jelenlétében kapott fázisátalakulását jellemzi



mérséklete 40,3 °C-ra tolódott el, az endoterm fázisátalakulási entalpia 38,74 kJ/mol-ra csökkent.

A felületaktív anyag koncentrációjának növelésével („c” görbe, 90 : 10 lipid—felületaktív anyag molarány) az átalakulási hőmérséklet még alacsonyabb értékre tolódott el, és az entalpia további csökkenése volt tapasztalható. Jól látható a DSC görbéken, hogy a felületaktív anyag koncentrációjának növelésével a pretransition fokozatosan eltűnik.

A különböző számú etilénoxid csoportot tartalmazó molekulák 42 °C-on mért permeabilitásváltozást előidéző hatását, valamint a DSC méréseknél tapasztalt átalakulási hőmérsékleteltolódást előidéző hatását összehasonlítottuk biológiai aktivitásukkal (*Bac. subtilis* törzsön mért szaporodásgátlás). Mint az a 2. táblázatban látható, a biológiai aktivitás és a mért paraméterek között lineáris korrelációt találtunk.

Az élő sejtmembrán bonyolult összetételénél fogva, a felületaktív anyagok hatásának pontos értelmezéséhez minden bizonnyal még számos paramétert kell figyelembe venni. Tekintve, hogy a foszfolipid—víz rendszer sok tekintetben a biológiai membrán modelljeként használható (GABER, PETICOLAS 1977, YELLIN, LEVIN 1977), méréseink alapján levonhatjuk azt a következtetést, hogy a vizsgált felületaktív anyagok biológiai aktivitásában jelentős szerepet játszik membrán permeabilitást növelő hatásuk. Erre utal számos irodalmi adat is (BANGHAM, LEA 1978, SCHLIEPER, DE ROBERTIS 1977, INOUE, KITAGAWA 1974, 1976, VAN ZUTPHEN és mtsai 1972), amelyek szerint más, de az általunk vizsgált nem-ionos felületaktív molekulákhoz hasonló vegyületek megnövelik a bimolekuláris lipid membránok vezetőképességét, ionok és nem-elektrolitok kiáramlását liposzómákból.

A DSC-görbéken tapasztalt eltolódás alapján arra következtethetünk, hogy a felületaktív molekula és lipid közötti kölcsönhatás részben a poláros etilénoxid lánc és a lipid fejcsoportja, részben a molekula hidrofób része és a lipid szénhidrogén láncai között jön létre. Kísérleti adatainkkal jó egyezésben van az a felületaktív anyag—lipid molekulák közötti kölcsönhatásra vonatkozó sztérikus elképzelésünk, hogy a kisebb etilénoxid tagszámú molekulák, a lipid szénhidrogén láncai közé törtérő beépülésükkel méretük folytán nem zavarják

## 2. táblázat

*Nem-ionos felületaktív anyagok biológiai aktivitásának (Y) függése DPPC liposzóma permeabilitásának növelő ( $\Delta p\%$ ) és átalakulási hőmérsékletét ( $\Delta t$ ) csökkentő hatásától*

$$Y = a + bx$$

x	a	b	r	$r_{95}\%$
$\Delta p\%$	4,69	0,87	0,8180	0,8054
$\Delta t$	-24,66	32,00	0,7631	0,7545

meg számottevően a struktúrát. Az etilénoxid tagszám növekedésével ( $n = 6$ , ill. 9) a molekula membrán struktúrát módosító hatása nő. Nagy etilénoxid tagszámnál a nagyméretű hidrophil rész sztérikusan gátolhatja a hidrophób rész szénhidrogén láncok közé történő beépülését, így csökken az előzőekben említett dezorganizáló hatás.

A felületaktív molekulák és lipidek közötti kölcsönhatás tehát a lipid rétegek strukturális módosulását eredményezi, amelynek következtében megváltozik a permeabilitás.

### Összefoglalás

A nem-ionos felületaktív anyagok csoportjába tartozó nonil-fenil-etilén-oxid polimerek vizes közegben mért diffúziós egyensúlyi állandója a molekula lipofilitásának logaritmusával csökken. A vizsgált anyagok a dipalmitoyl foszfatidilkolinból (DPPC) készült liposzóma  $^{42}\text{K}$ -leadását az etilénoxid csoportok számától függően növelik. Felületaktív molekulák jelenlétében a DPPC fázisátalakulási hőmérséklete és entalpiája csökken. A különböző számú etilénoxid csoportot tartalmazó molekulák biológiai aktivitása és a liposzómán mért permeabilitás változást előidéző hatása, valamint a DSC méréseknél tapasztalt fázisátalakulási hőmérséklet eltolódást előidéző hatása között lineáris korrelációt találtunk. Eredményeink alapján arra következtettünk, hogy a vizsgált felületaktív molekulák az etilénoxid csoportok számától függően hidrophób részükkel a lipid szénhidrogén láncai közé penetrálnak, strukturális módosulást okoznak és ennek következtében megnő a membrán permeabilitása.

### IRODALOM

- BANGHAM, I. A., E. I. A. LEA: *Biochim. Biophys. Acta* **511**, 388 (1978).  
 BLOK, M. C., E. C. M. VAN DER NEUT-KOK, L. L., M. VAN DEENEN, I. DE GIER: *Biochim. Biophys. Acta* **406**, 187 (1974).  
 CSERHÁTI, T., É. JÁNOS: in: *Chemical Structure-Biological Activity Relationships*. J. Knoll, F. Darvas Akadémiai Kiadó Bp. 221 p. (1980).  
 GABER, B. P., W. L. PETICOLAS: *Biochim. Biophys. Acta* **465**, 260 (1977).  
 GIBALDI, M., S. FELDMAN: *J. Pharm. Sci.* **59**, 579 (1970).  
 INOUE, K., T. KITAGAWA: *Biochim. Biophys. Acta* **426**, 1 (1976).  
 INOUE, K., T. KITAGAWA: *Biochim. Biophys. Acta* **363**, 361 (1974).  
 JOHNSON, S. M., A. D. BANGHAM: *Biochim. Biophys. Acta* **82**, 193 (1969).  
 KAKEMY, K., T. ARITA, S. MURANISHI: *Chem. Pharm. Bull.* **13**, 976 (1965).  
 LEVY, G., K. E. MILLER, R. H. REUNING: *J. Pharm. Sci.* **5**, 394 (1966).  
 MATSUZAWA, T., H. FUJISAWA, K. AOKI, H. MINA: *Chem. Pharm. Bull.* **17**, 999 (1969).  
 PAPAHAJDOPOULOS, D., K. JACOBSON, S. NIR, T. ISAC: *Biochim. Biophys. Acta* **311**, 330 (1973).  
 SCHLIEPER, P., E. DE ROBERTIS: *Arch. Biochem. Biophys.* **184**, 204 (1977).  
 SINGER, M.: *Chem. Phys. Lipids* **25**, 15 (1979).  
 SUZUKI, M., MOTOYOSHI, H. ARAI, H. HORIKAWA: *Jap. J. Pharmacol.* **17**, 525 (1967).  
 TAMÁS, Gy., M. SZÓGYI: *Acta Pharm.* **43**, 283 (1973).  
 VALKENBUG, V. W.: *Pesticide Formulations* Marcel Dekker Inc. New York (1973).  
 VAN ZUTPHEN, H., A. I. MEROLA, G. P. BRIERLEY, D. G. CORNWELL: *Arch. Biochem. Biophys.* **152**, 755 (1972).  
 YELLIN, N., I. W. LEVIN: *Biochemistry* **16**, 642 (1977).