

2. Okres międzyciążowy u krów chorych utrzymywanych w fermach z uwiązem jest dłuższy o średnio 26 dni a w obiektach wolnostanowiskowych o 16 dni.

3. Wskaźnik inseminacyjny u krów chorych wynosi średnio 2,6 natomiast u krów zdrowych 2,1.

Piśmiennictwo

1. Benda J.: Závěrečná zpráva UVSH, Praga, 1970, s. 173.
2. Benda J.: Veterinářství 22, 210, 1972.
3. Berger G.: Mh. Vet.-Med. 32, 683, 1977.
4. Gietz G.: Probleme der Gliedmassen- und Kaluengesundheit. Tierhygiene Informationen, Eberswalde-Finow 69, 8, 1976.
5. Domansky L.: Závěrečná zpráva VUZT, Repy 1968.
6. Fuchs G.: Tierzucht 31, 264, 1977.
7. Heidrich H. D., Arcularis K., Günther M., Marceau W., Woll W.: Mh. Vet.-Med. 23, 856, 1968.
8. King J. O. L.: Vet. Rec. 108, 557, 1981.
9. Orság A., Ledecký V.: Vyskumná zpráva P-11-529-262-02-VI/99, VSV Košice, 1980, s. 166.
10. Orság A., Ledecký V., Veghová J., Balun J., Huba F., Svidron V., Janda J., Lovas B.: Závěrečná zpráva CU VI-5-11/05, VSV Košice, 1985, s. 298.
11. Russel A. M., Rowlands G. J., Shaw S. R., Weaver A. D.: Vet. Rec. 111, 155, 1982.
12. Ryska B.: Závěrečná zpráva VUZE, Brno 1966.
13. Zöldag L., Végh M.: Magy. Allatorv. Lap. 36, 196, 1981.

Adres autora: doc. dr Andrej Orság, ul. Komenského 73, 841-81 Košice (CSRS)

Ország A. — Влияние ортопедических болезней на некоторые репродукционные показатели молочных коров в условиях крупнопромышленного разведения

Наблюдения за влиянием ортопедических болезней на длину межбеременного периода и инсеминационный показатель велись на 4 фермах, т.е. 2 с привязью и решетчатым полом по 500 молочных

коров и 2 свободностойловых с частью для лежания на 320 и 1050 коров. Животных разделили на группы согласно упитанности, длине беременности, молокопродуктивности и возрасту. Отмечено что межбеременный период в группах исследуемых коров с ортопедическими болезнями в коровниках с привязью был на 67 дней дольше, а в свободностойловых коровниках — на 41 день. Средние величины в стадах исследуемых коров составлял соответственно 26 и 16 дней. Инсеминационный показатель составлял 2,6 по сравнению с 2,1 у здоровых коров.

Наблюдения подтвердили неблагоприятное влияние ортопедических болезней на длину межбеременного периода и на инсеминационный показатель.

Ország A. — The influence of arthopaedic diseases on some reproductive indices in milking cows maintained in large scale breeding

The influence of some orthopaedic diseases on the length of the period between pregnancies and insemination index was assessed at four farms, i.e. at two each containing 500 milking cows being tied and at two cowsheds designated for 320 or 1050 cows kept free. The animals were divided into groups according to the state of nourishment, time of pregnancy, milk yield and age. It was found that the period between pregnancies in cows with orthopaedic diseases was longer at 67 days or 41 days depending on the system of breeding, i.e. longer at cowsheds with animals tied. Mean values in the herds were 26 and 16 respectively. The insemination index was 2.6 compared with 2.1 in healthy cows. These data confirmed unfavourable influence of orthopaedic diseases on the length of period between pregnancies and on the insemination index.

ANDRZEJ LEDWOŻYŃ, ADAM KĄDZIOLKA

Liposomy jako nośniki leków

Zakład Patofizjologii Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Od pewnego czasu pęcherzyki lipidowe wykorzystuje się jako błony modelowe w badaniach nad fizykochemicznymi właściwościami warstw lipidowych oraz w badaniach nad wzajemnym oddziaływaniem między lipidami a innymi składnikami błon (5). Stwierdzono też, że komórki ssaków *in vitro* i *in vivo* mogą wbudowywać duże ilości pęcherzyków lipidowych bez efektu cytotoksycznego. Ponieważ do wnętrza pęcherzyków można wprowadzać rozmaite materiały, zaś do ich błony włączać glikoproteidy i glikolipidy, fakt pochłaniania pęcherzyków przez komórki stwarza potencjalną możliwość modyfikacji składu komórek organizmu i zezwala na wprowadzanie do nich materiałów biologicznie czynnych.

Pęcherzyki wielowarstwowe (liposomy) są prostymi strukturami ciekłokrystalicznymi otrzymywanymi przez rozproszenie w wodzie lub w roztworach soli lipidów amfipatycznych, np. fosfolipidów. Badania przy użyciu mikroskopu elektronowego i dyfrakcji promieni rentgenowskich wykazały, że w strukturach tych lipidy zorganizowane są w postaci koncentrycznych, dwuwarstwowych blaszek, rozdzielonych warstewkami fazy wodnej o różnej grubości. Każ-

da z blaszek w obrębie pęcherzyka tworzy kompletny, zamknięty woreczek. Liposomy są heterogenne, o średnicy 0,5—10 μm, mają jednak stałą liczbę blaszek przypadającą na jeden pęcherzyk. Szczegółowo procedurę otrzymywania liposomów opisuje Kinsky (34).

Działanie ultradźwięków na liposomy powoduje ich rozbicie, z wytworzeniem małych jednowarstwowych pęcherzyków (MJP). Są to struktury dużo mniejsze (25—100 nm średnicy), zawierające w swym wnętrzu fazę wodną, otoczoną przez pojedynczy woreczek lipidowy. Populacje MJP są bardziej jednorodne niż liposomów. O konwersji liposomów w MJP świadczy stopniowe nabieranie przejrzystości przez próbkę w czasie działania ultradźwięków. Efektywne oddzielenie MJP od mogących pozostać liposomów osiąga się metodą filtracji żelowej na Sefarozie 4B lub przez ultrawirowanie przy 100 000 g przez 1 godzinę (MJP pozostają w supernatancie). Opisano też metody otrzymywania MJP bez użycia ultradźwięków przez wstrzyknięcie etanolowego roztworu fosfolipidów do dużej objętości buforu, lub przez rozpuszczenie lipidów w detergentie i następnym powolnym usunięciu detergentu drogą dializy.

Opisano też trzecią klasę pęcherzyków lipidowych, powstających na drodze fuzji MJP, tzw. duże jednowarstwowe pęcherzyki (DJP) (45). Fuzja ta jest wynikiem dodania jonów Ca^{2+} , co powoduje rozbitcie pęcherzyków z utworzeniem dużych płaszczyzn lipidowych, zwijających się w cylindry. Poddanie tych cylindrów działaniu kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) powoduje gwałtowną transformację strukturalną z utworzeniem dużych jednowarstwowych pęcherzyków, o średnicy do 1 μm .

Jakkolwiek nie ma jednolitego przepisu na otrzymywanie pęcherzyków lipidowych, większość laboratoriów używa mieszaniny fosfolipidów, cholesterolu i naładowanego elektrycznie czynnika amfifilowego w rozmaitych stosunkach molowych; dokładny skład zależy od przeznaczenia pęcherzyków. Większość fosfolipidów spontanicznie tworzy liposomy po dyspersji w roztworach wodnych, mogą być one więc używane także do otrzymywania MJP. Stosuje się tu naturalne i syntetyczne fosfatydylocholino (13, 14), fosfatydyloserynę (42) i szereg innych kwaśnych fosfolipidów. Do otrzymywania liposomów można też używać ekstraktów lipidowych z tkanek lub komórek (4).

Zdolność fosfolipidów do tworzenia liposomów zależy od temperatury przejścia fazowego (T_c), tj. temperatury, w której „topią się” łańcuchy węglowodorowe cząsteczki lipidu przechodząc ze stanu stałego w stan ciekłokrystaliczny. Naturalne fosfolipidy istnieją przeważnie powyżej tego punktu w temperaturze otoczenia, łatwo więc tworzą liposomy. Wiele syntetycznych fosfolipidów z długimi nasyconymi łańcuchami tworzy także podobne struktury, jeżeli temperaturę podniesie się do temperatury bliskiej T_c (7).

Sterole, a przede wszystkim cholesterol, są szeroko używane jako składniki liposomów i MJP. Cholesterol, który sam nie tworzy ciekłych kryształów, dla utworzenia pęcherzyków może być mieszany z fosfolipidami do ilości 1:1 (stosunek molowy). Jest on niezbędny do utworzenia pęcherzyków przy zastosowaniu sfingomieliny jako fosfolipidu. Jego użycie jednak znacznie ogranicza ilość materiału włączanego do wnętrza pęcherzyków. Naładowane elektrycznie amfifile, jak stearylamina (ładunek dodatni), fosforan dicetylu (ładunek ujemny) i inne kwaśne fosfolipidy (ładunek ujemny), są często stosowane jako składniki błon pęcherzyków. Obecność naładowanych grup na powierzchni warstwy lipidowej zwiększa objętość fazy wodnej we wnętrzu pęcherzyka, stwarzając tym samym warunki do umieszczenia tam większej ilości rozpuszczalnego w wodzie materiału. Należy jednak podkreślić, że wybór naładowanego amfifilu zależy w dużym stopniu od rodzaju materiału wprowadzanego do pęcherzyków. Jeżeli materiał jest elektrycznie obojętny, można użyć dodatnio lub ujemnie naładowanego amfifilu. Jeżeli materiał posiada ładunek elektryczny, należy użyć amfifilu o podobnym ładunku

w fizjologicznym zakresie pH. Zmniejsza to możliwość zatrzymywania znaczących ilości wprowadzonego materiału przez elektrostatyczne oddziaływanie z błoną pęcherzyka. Problem ten jest ważny w proponowanym użyciu pęcherzyków jako nośników leków, gdyż wiązanie leku przez ścianę pęcherzyka może znacznie ograniczyć jego aktywność farmakologiczną. Z drugiej jednak strony asocjacja roztworu wprowadzonego do pęcherzyków z ich ścianą przez oddziaływanie elektrostatyczne znacznie zwiększa ilość roztworu wodnego zawartego w pęcherzyku. W ten sposób wprowadzono kombinację cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP) i aktynoweiny D, bez utraty aktywności farmakologicznej. W końcu obecność naładowanych amfifili w błonie pęcherzyka jest ważna w określeniu mechanizmu wbudowywania pęcherzyków do wnętrza komórki.

Niezależnie od składu samych pęcherzyków, można wbudować w ich ścianę, lub wprowadzić do ich wnętrza szereg materiałów. Jest to właściwość czyniąca liposomy i MJP atrakcyjnym narzędziem pozwalającym na wprowadzenie materiałów biologicznie czynnych do wnętrza komórki. W ten sposób wprowadzono: oksydazę cytochromową (24), Ca^{2+} — ATPazę i ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) — ATPazę (15), rodopsynę (25), białko S 100 receptora acetylocholinowego (39), glikoforynę (53), jej fragment hydrofobowy (57), białko trzeciego szczytu elektroforetycznego błony krwinek czerwonych (55), apoproteid proteolipidu mieliny (46), antygen Forssmana (28), globozyd (32), galaktocerebrozyd (3), monogalaktozydylgliceryd (3), mieszaninę gangliozydów (22), lipopolisacharydy bakteryjne (26), kationy Na^+ , K^+ , Rb^+ , Ca^{2+} i aniony Cl^- , CrO_4^{2-} , TeO_4^{2-} , SO_4^{2-} (59), glukozę, sacharozę, erytrytol i mannitol (54), cAMP i polinukleotydy (60), lizozym (58), amyloglukozydazę (20), heksokinazę, dehydrogenazę glukozo-6-fosforanu i beta-galaktozydazę (32), dekstranazę (8), peroksydazę (23), aktynoweinę D (50), bleomycynę (19), 5-fluorouracyl (65), metotreksat (9), albuminę (20), alfa-glukozydazę (11), toksoid błoniczy (2), EDTA (51), pepstatynę (10) oraz katalazę i dysmutazę nadlenkowaną (63). Biorąc pod uwagę dużą różnorodność komponentów wbudowywanych do liposomów sądzić należy, że ich rodzaj zależy raczej od inwencji eksperymentatora, niż od ograniczeń natury technicznej. Szczególnie ważny jest fakt, że glikolipidy i glikoproteidy związane hydrofobowo z błonami liposomów, zachowują swe właściwości antygenowe (32), co sugeruje, że ich orientacja w błonie pęcherzyka jest podobna do orientacji w błonach naturalnych. Oprócz hydrofobowego wbudowania składników w błonę liposomu, rozmaite materiały można wprowadzić do fazy wodnej wewnątrz pęcherzyka. Jeżeli materiały te obecne są w fazie wodnej w początkowych stadiach otrzymywania pęcherzyków, teoretycznie każdy rozpuszczalny w wodzie materiał, nawet wielkocząsteczkowy, może zostać wbudowany do wnętrza liposomu.

Jest jednak oczywiste, że MJP są w istocie zbyt małe do umieszczenia w nich znacznych ilości dużych makrocząsteczek. Także użycie ultradźwięków na pewnym etapie wytwarzania MJP może inaktywować niektóre związki, np. kwasy nukleinowe. Pod tym względem DJP pozostają alternatywą dla wbudowywania makrocząsteczek.

Wartość T_c pozwala na konstruowanie pęcherzyków „stałych” lub „ciekłych” w wymaganej w doświadczeniu temperaturze. Odgrywa to zasadniczą rolę w sposobach kierowania pęcherzyków do poszczególnych struktur wewnątrzkomórkowych (47).

Pęcherzyki utworzone z niezmodyfikowanych fosfolipidów wykazują krańcowy brak przepuszczalności dla kationów, przy stosunkowo wysokiej przepuszczalności dla anionów. Są one przepuszczalne także w dużym stopniu dla wody. Wykazano, że przepuszczalność pęcherzyków generalnie wzrasta wraz ze wzrostem stopnia nienasylenia i skróceniem łańcucha acylogowego w cząsteczce fosfolipidu. Wbudowanie białek do ściany pęcherzyka może także istotnie zwiększyć szybkość wypływu materiału zawartego w jego wnętrzu. Zdolność ta jest skorelowana ze stopniem penetracji białka do warstwy lipidowej.

Pewną ochronę przed szybkim wypływem materiału z pęcherzyków stanowi wbudowanie cholesterolu do ich błony (43). Wykazano, że inkorporacja cholesterolu do ściany pęcherzyków znacznie obniża ich przepuszczalność dla wbudowanego materiału, nawet w obecności białek (29). Ten wpływ cholesterolu na obniżenie przepuszczalności błony zwany jest „efektem kondensującym”, wywieranym na upakowanie cząsteczek fosfolipidów w obrębie warstwy lipidowej. Ogranicza on możliwość ruchu cząsteczek fosfolipidów, czemu towarzyszy zmniejszenie powierzchni zajmowanej przez cząsteczkę fosfolipidu, co prowadzi do bardziej pionowego ich ułożenia i wzrostu grubości błony. Kondensujący wpływ cholesterolu na błony pęcherzyków prowadzi do znacznej redukcji ich przepuszczalności dla anionów, kationów, wody i szeregu nieelektrolitów (29).

Szereg doświadczeń wykazało, że rozmaite komórki hodowane *in vitro* mogą wbudowywać pęcherzyki o różnym składzie lipidowym, bez widocznego efektu cytotoksycznego. Komórki ssaków wykazują znaczny apetyt w stosunku do pęcherzyków lipidowych. Wbudowanie do 1×10^6 pęcherzyków na jedną komórkę jest łatwo osiągalne i nie zmniejsza jej żywotności oraz zdolności do namnażania (48). Kinetyka inkorporacji liposomów do komórki w 37°C jest podobna w różnych typach komórek, z szybkim pochłanianiem pęcherzyków w ciągu pierwszych dwóch godzin i następną stabilizacją trwającą 3–8 godzin. Pochłanianie MJP ma charakter liniowy w szerokim zakresie ich stężeń, jednak przy wysokich stężeniach (ponad 5×10^6 pęcherzyków na komórkę) obserwuje się zmiany w

wyglądzie komórek i tempie ich wzrostu. Obecność lub brak dodatniego albo ujemnego ładunku pęcherzyków, względnie ich otrzymanie z lipidów „stałych” lub „płynnych” w 37°C posiada niewielki wpływ na liczbę inkorporowanych pęcherzyków. Jednak ładunek powierzchni, jak i stan fizyczny ich lipidów są znaczące dla mechanizmu wbudowywania do wnętrza komórki.

Obserwacje nad inkorporacją MJP zawierających jeden znacznik izotopowy w błonie, inny zaś we wnętrzu wykazały, że obydwa składniki wbudowują się do komórki w identycznych ilościach. Dowodzi to, że MJP pochłaniane są przez komórki jako nienaruszone struktury. Dalszym dowodem, że pęcherzyki rzeczywiście inkorporują się do wnętrza komórki (w przeciwieństwie do prostego wiązania do jej powierzchni), jest odzyskanie ich składników z frakcji subkomórkowych (26). Widziano też składniki pęcherzyków we wnętrzu komórki, stosując metody histochemii elektronowomikroskopowej i autoradiografii (26). W końcu wykazano, że materiały biologicznie aktywne, wprowadzone za pośrednictwem pęcherzyków wywołują specyficzne zmiany w metabolizmie komórek.

Cytochalazyna B hamuje endocytozę składników w wielu typach komórek. Hamuje też pochłanianie MJP i liposomów przez komórki *in vitro*, jakkolwiek nasilenie tego procesu zależy od składu lipidowego pęcherzyków (48). Podobnie — uprzednie podanie inhibitorów glikolizy i oddychania wewnątrzkomórkowego powoduje całkowite zahamowanie pochłaniania „płynnych” obojętnych i „stałych” naładowanych liposomów, lecz pochłanianie „płynnych” naładowanych liposomów jest hamowane tylko w 40%. Rezultaty te wskazują, że pęcherzyki obojętne i „stałe” ujemnie naładowane są wbudowywane do komórek przede wszystkim na drodze endocytozy, podczas gdy przynajmniej 60% „płynnych” ujemnie naładowanych pęcherzyków osiąga wnętrze komórki na drodze nieendocytarnej (48). Sądzi się, że ten ostatni mekanoz, że materiały biologicznie aktywne, wprochich fuzję z błoną komórkową. Istotnie, fuzję między błoną komórkową a „płynnym” naładowanym MJP i błoną komórkową a liposomem obserwowano też w mikroskopie elektronowym (38).

Brak zdolności „stałych” ujemnie naładowanych i „płynnych” obojętnych pęcherzyków do fuzji z powierzchnią komórki zgadza się z obserwacjami, że te klasy pęcherzyków nie wywołują fuzji komórek, który to proces wymaga uprzedniej fuzji pęcherzyków z powierzchnią komórki (38). Pęcherzyki tego typu wykazują też bardzo małą zdolność do fuzji z innymi pęcherzykami (44). Przeciwnie, „płynne” naładowane pęcherzyki silnie indukują fuzję komórkową (38), ulegają też łatwo fuzji z innymi pęcherzykami (44).

Nie wykazano żadnych różnic w drogach wbudowywania liposomów i MJP o identycznym

składzie, co wskazuje, że fizyczny stan lipidów w błonie pęcherzyka i obecność lub brak ładunku elektrycznego na jego powierzchni mają większe znaczenie, niż ich rozmiary w określaniu czy endocytoza, czy też fuzja z błoną komórkową jest dominującą drogą ich wybudowywania do komórki (48). Uważa się, że liposomy są wybudowywane wyłącznie na drodze endocytozy i nie ulegają fuzji z błoną komórkową, jednak wydaje się, że takie uogólnienie nie jest słuszne.

Istnieje niewiele wiadomości o mechanizmach inkorporacji pęcherzyków *in vivo*. Brak jednak podstaw aby przypuszczać, że mechanizmy działające *in vivo* istotnie różnią się od mechanizmów opisanych dla sytuacji *in vitro*. Rahman i Wright (52) obserwowali wbudowywanie obojętnych liposomów lecytynowo-cholesterolowych przez komórki wątroby *in vivo*. Liczne badania wykazały, że liposomy i MJP są dobrze tolerowane przez zwierzęta po wprowadzeniu ich różnymi drogami: dożylną (9), dostrzewnową (19), podskórną (2) i po wstrzyknięciu do jądrowym (56).

To, że pęcherzyki mogą być użyte w charakterze nośników, celem wprowadzenia materiałów biologicznie aktywnych do wnętrza komórki, wykazali jako pierwsi Magee i Miller (37). Stwierdzili oni, że poddanie komórek działaniu liposomów zawierających IgG neutralizujące wirus Coxackie A-21, chroni je przed infekcją wirusową. Liposomy zawierające IgG były 10 000 razy bardziej skuteczne w ochronie komórek, niż wolne przeciwciała w takim samym stężeniu. Ponieważ bezpośrednia inkubacja liposomów zawierających IgG z izolowanymi wirionami także powodowała znaczną neutralizację wirusa, można przypuszczać, że IgG związane były z powierzchnią pęcherzyków, a nie zawarte w ich wnętrzu. Ponieważ IgG nie mogły być usunięte z powierzchni komórek intensywnym przemywaniem (w przeciwieństwie do wolnych IgG) należy przypuszczać, że liposomy uległy rzeczywiście fuzji z błoną komórkową, wbudowując w nią bezpośrednio cząsteczki IgG. Wykazano też, że liposomy mogą być nośnikami dla wprowadzenia inwertazy do komórek — mutantów makrofagów mysich i fibroblastów ludzkich, nie posiadających tego enzymu hodowanych *in vitro*. Komórki znakowano uprzednio ^{14}C -sacharozą, która nie mogła być rozkładana z powodu braku inwertazy, a następnie inkubowano z liposomami. Uwieńczone sukcesem transport enzymu do komórek wykazano ich zdolnością do hydrolizy ^{14}C -sacharozy do ^{14}C -glukozy i ^{14}C -fruktozy. Wiele badań prowadzonych na hodowlach fibroblastów pochodzących od chorych z niedoborami enzymów lizosomalnych wykazało, że dodanie brakującego enzymu do hodowli powoduje jego wbudowywanie się do lizosomów i prowadzi do cofnięcia się stanu niedoborowego (6, 35). Stwierdzono też, że wbudowanie peroksydazy inkorporowanej do liposomów do fagocytów psa morskiego, jest 100

razy intensywniejsze niż do komórek wystawionych na działanie wolnego enzymu (65). Stwierdzono także, że wbudowanie „płynnych” naładowanych elektrycznie MJP zawierających cAMP do komórek 3T3 myszy i komórek 3T3, które uległy transformacji wirusowej (SV3T3) powoduje znaczne zahamowanie ich wzrostu przy stężeniach cAMP nie wywierających wpływu na proliferację komórek. Znaczne zahamowanie wzrostu komórek powodował cAMP zawarty w „płynnych” naładowanych elektrycznie pęcherzykach, natomiast cAMP zawarty w „stałych” naładowanych pęcherzykach nie miał takiego wpływu, mimo, że komórki wbudowywały podobne ilości obu rodzajów pęcherzyków. Sugeruje się, że różnica ta spowodowana jest różnymi mechanizmami, za pomocą których wbudowuje „płynne” i „stałe” pęcherzyki, w zależności od miejsc w jej wnętrzu, w których cAMP ma być ewentualnie uwolniony. Proponuje się, że „płynne” naładowane pęcherzyki ulegają fuzji z błonami komórkowymi i uwalniają zawarty w nich cAMP bezpośrednio do cytoplazmy. Przeciwnie, „stałe” pęcherzyki nie ulegają fuzji z błonami plazmatycznymi i są wchłaniane na drodze endocytozy z uwalnianiem zawartego w nich cAMP do lizosomów. Brak wpływu cAMP na wzrost komórek po wprowadzeniu go do lizosomów wynika z braku jego uwalniania z tych organelli w formie aktywnej w wystarczających stężeniach. Ograniczona przepuszczalność błony lizosomalnej (16) i prawdopodobna inaktywacja cAMP przez lizosomalne fosfodiesterazy (61) przemawiają za tym przypuszczeniem.

Używano też z powodzeniem MJP do wprowadzenia leków przeciwnowotworowych do komórek nowotworowych *in vitro*. Odporność komórek nowotworowych na takie leki jak aktynomycyna D, metotreksat, iperyt azotowy, daunomycyna i alkaloidy barwnika, spowodowana jest zmianami w przepuszczalności błony komórkowej, co powoduje zmniejszone wychwytywanie leków przez te komórki (33). Potwierdzeniem tej hipotezy jest wykazanie różnicy w przenikaniu leków do komórek wrażliwej i odpornej oraz stwierdzenie, że wzmożone przyjmowanie leku będące rezultatem modyfikacji przepuszczalności błony przy pomocy detergentu wzmacnia zamieralność komórek (66). Ostatni dowód jest jednak wątpliwy, gdyż detergenty same przez się powodują znaczną cytotoksyczność, a to komplikuje ocenę wartości leku. Użycie pęcherzyków zawierających lek, celem wzmożenia przyjmowania go przez komórkę odporną o niskiej przepuszczalności błony, stwarza pewne możliwości rozwiązania tego problemu.

Używano też MJP jako nośników celem wzmożenia przyswajalności aktynomycyny D do aktynomycynoodpornej linii komórek chomika (DC3F-ADX). Oporność ta była wynikiem zmniejszonej zdolności do transportowania leku przez błonę komórkową. Linia ta zdolna jest

do wzrostu w środowisku o wysokim stężeniu aktynomycyny D, będącej silnie toksyczną dla wrażliwej na lek linii macierzystej DC3F. Inkubacja komórek DC3F-ADX z „płynnymi” naładowanymi elektrycznie MJP zawierającymi aktynomycynę D powodowała 5-krotny wzrost stężenia leku w ich wnętrzu w porównaniu z ekspozycją komórek na takie same stężenie wolnego leku, powodując tym samym znaczne zahamowanie syntezy RNA przez komórki i zahamowanie ich wzrostu przy stężeniach leku, które nie wywierają wpływu, gdy stosowane są w postaci wolnej jako dodatek do płynu hodowlanego.

W 1932 r. Johnson opatentował sposób, w który „preparaty” farmaceutyczne przeznaczone do iniekcji dożylnych lub podskórnych mogą być otrzymywane przez połączenie leku z cieciami takimi jak tłuszcze i oleje, a jeżeli zachodzi konieczność — z woskami lub substancjami woskopodobnymi, względnie z innymi płynami. Czynnik roznoszący lek po organizmie pozwala na utrzymanie każdej wymaganej dawki leku i uwalnia go w pożądanym momencie, pozostawiając tylko niewielkie niewykorzystane resztki w organizmie ...” (30). Pęcherzyki lipidowe odpowiadają w pełni tej charakterystyce. Np. czynnik zapewniający stopniowe uwalnianie strofantyny w ustroju jest określany jako „emulsja otrzymana z 25 części lecytyny, 20 części wody, 1,5 części cholesterolu, 0,03 części strofantyny i 0,5 części Nipasolu” (ester propylowy kwasu p-hydroksybenzoesowego). Według Banghama i wsp. (5) jest prawdopodobne, że sukcesy tego preparatu należy przynajmniej w części przypisać faktowi, że jakaś część leku zatrzymana została w smektycznej fazie lipidowej, tj. w liposomach. Możliwość użycia pęcherzyków lipidowych jako nośników substancji czynnych cieszy się coraz większym zainteresowaniem (17).

Umieszczenie czynników terapeutycznych lub innych biologicznie aktywnych substancji we wnętrzu pęcherzyków dla ich wprowadzenia do komórek *in vivo* posiada szereg zalet w porównaniu z podawaniem wolnego leku. Wiele substancji powoduje odpowiedź immunologiczną ze strony organizmu, a ich powtarzane wstrzyknięcia niosą ryzyko wystąpienia reakcji alergicznych. Zamknięcie materiału we wnętrzu immunologicznie nieaktywnych pęcherzyków lipidowych zmniejsza, a być może całkowicie usuwa to ryzyko (2). Chroni też lek przed szybkim rozłożeniem go pod działaniem enzymów obecnych we krwi i w płynach ustrojowych.

Wielkie zainteresowanie wzbudza możliwość wykorzystania pęcherzyków lipidowych jako nośników leków w chemioterapii nowotworów. Rahman i wsp. (50) wykazali, że wstrzyknięcie MJP zawierających aktynomycynę D myszom z guzem Ehrlicha znacząco wydłuża czas przeżycia w porównaniu ze zwierzętami nie leczonymi tym lekiem w postaci wolnej. Podobne rezultaty uzyskano też w innych badaniach (19)

używając MJP zawierających aktynomycynę D celem wydłużenia przeżywalności myszy inokulowanych komórkami białaczki.

Używano też MJP jako czynników wprowadzających środki chelatujące do komórek *in vivo* (51). W leczeniu zatruc metalami ciężkimi używany jest EDTA, lecz jego efektywność jest ograniczona brakiem zdolności przedostawiania się do wnętrza komórek. Po wprowadzeniu EDTA do wnętrza MJP wykazano, że iniekcja tego środka myszom prowadzi do wyraźnego usuwania złogów plutonu, ołowiu i rtęci.

Straub i wsp. donieśli, że iniekcje liposomów i MJP zawierających syntetyczne polinukleotydy powodują u myszy znaczny wzrost produkcji interferonu, w porównaniu z iniekcją samych polinukleotydów (60).

Inbar i Shinitzky użyli pęcherzyków lipidowych dla wywołania zmian w składzie błon plazmatycznych komórek nowotworowych. W rezultacie uzyskali zmniejszenie kanцерогенności wielu środków *in vivo* (27).

Tak więc sterowanie składem lipidowym pęcherzyków pozwala na wprowadzanie ich do określonych rejonów komórki. Pęcherzyki pochłaniane przez komórki na drodze endocytozy wraz z ich zawartością kierują się głównie do lizosomów. Pęcherzyki zaś, których skład powoduje ich zdolność do fuzji z błonami komórkowymi, mogą być używane do wprowadzania nowych składników do błon komórkowych i do uwalniania zawartości bezpośrednio do cytoplazmy.

Pęcherzyki mogą być więc używane do wprowadzania rozmaitych substratów bezpośrednio do lizosomów celem badania aktywności enzymów lizosomalnych i kinetyki rozkładu substratów w różnych typach komórek (10). Interesująca jest też możliwość wprowadzania odpowiednich enzymów celem leczenia wrodzonych niedoborów enzymów lizosomalnych. De Duve i wsp. sugerują, że pęcherzyki zbudowane z materiału ulegającego biodegradacji, a inkorporowane do komórki na drodze endocytozy, mogą stanowić sposób na wprowadzanie nie przenikających materiałów do wnętrza komórki (12). Zjawisko to, zwane lizosomotropizmem pozwala na kierowanie materiałów biologicznie aktywnych związanych z nośnikami do lizosomów, gdzie materiał aktywny może być uwalniany pod działaniem enzymów lizosomalnych na część nośnikową. Po uwolnieniu mógłby on działać w obrębie lizosomów, lub dyfundować do innych części komórki. Jednakże możliwość degradacji enzymatycznej materiału leczniczego w obrębie lizosomu oraz inaktywacja w niskim pH środowiska wewnątrzlizosomalnego oraz ograniczona przepuszczalność błony lizosomalnej sugerują, że dogodniejszą drogą wprowadzania takich substancji jest pominięcie endocytozy. Fuzja pęcherzyków z błoną komórkową może stwarzać taką możliwość.

Oprócz kierowania pęcherzyków lipidowych do specyficznych rejonów komórki, ich wartość

jako narzędzia badawczego w biologii komórkowej wzrosnąć, gdy nastąpi rozwój odpowiednich metod, pozwalających na docelowe i zamierzone wysyłanie ich do specyficznych komórek. Wstępne badania nad tym zagadnieniem wykonali Gregoriadis i Neerunjun (18). Wbudowywali oni immunoglobuliny specyficzne przeciwko pewnym komórkom do błony liposomów i wykazali, że spowodowało to istotne ukierunkowanie liposomów do tych komórek, przeciwko którym skierowane były przeciwciała. Użyto też liposomów pokrytych przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko krwinkom czerwonym owcy celem skierowania ich *in vivo* do tych komórek (21).

Piśmiennictwo

1. Alderson J. C. E., Green C.: FEBS Lett. 52, 208, 1975.
2. Allison A. C., Gregoriadis G.: Nature 252, 252, 1974.
3. Alving C. R., Fowble J. W., Joseph K. C.: Immunochimistry 11, 475, 1974.
4. Alving C. R., Kinsky S. C., Haxby J. A., Kinsky C. B.: Biochemistry 8, 1582, 1969.
5. Bangham A. D., Hill M. W., Miller N. G. A.: Meth. Membr. Biol. 1, 1, 1974.
6. Brady R. O.: Ann. Intern. Med. 82, 257, 1975.
7. Chapman D., Fluck D. J.: J. Cell. Biol. 30, 1, 1966.
8. Colley C. M., Ryman B. E.: Biochem. Soc. Trans. 2, 871, 1974.
9. Colley C. M., Ryman B. E.: Biochem. Soc. Trans. 3, 157, 1975.
10. Dean R. T.: Nature 257, 414, 1975.
11. De Barys T., Devos P., Van Hoff F.: Biochem. Soc. Trans. 3, 139, 1975.
12. De Dure C., De Barys T., Poole P., Trouet A., Tulken P., Van Hoff F.: Biochem. Pharmacol. 23, 2495, 1974.
13. De Gier J., Manderslot J. G., Van Deenen L. L. M.: Biochim. Biophys. Acta 150, 606, 1968.
14. Demel R. A., Kinsky S. C., Kinsky C. B., Van Deenen L. L. M.: Biochim. Biophys. Acta 150, 655, 1968.
15. Goldin S. M., Tong S. W.: J. Biol. Chem. 249, 5907, 1974.
16. Gordon S., Cohn Z. A.: Intern. Rev. Cytol. 36, 171, 1973.
17. Gregoriadis G.: FEBS Lett. 36, 292, 1973.
18. Gregoriadis G., Neerunjun E. D.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 537, 1975.
19. Gregoriadis G., Neerunjun E. D.: Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 10, 351, 1975.
20. Gregoriadis G., Ryman B. E.: Eur. J. Biochem. 24, 485, 1972.
21. Harsch M., Walther P., Weder H. G.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 1069, 1981.
22. Haywood A. M.: J. Gen. Virol. 29, 63, 1975.
23. Heath T. D., Robertson D., Birbeck M. S. C., Davies A. J. S.: Biochim. Biophys. Acta 599, 42, 1980.
24. Hinkle P. C., Kim J. J., Racker E.: J. Biol. Chem. 247, 1338, 1972.
25. Hong K., Hubbel W. L.: Biochemistry 12, 4517, 1973.
26. Huang L., Pagano R. E.: J. Biol. Chem. 38, 38, 1975.
27. Inbar M., Shinitzky M.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2123, 1974.
28. Inoue K., Kinsky S. C.: Biochemistry 9, 4767, 1970.
29. Jain M. K.: Curr. Top. Membr. Transp. 6, 1, 1975.
30. Johnson J. Y.: Brit. Patent 417, 715, (1934).
31. Johnson S. M.: Biochem. Soc. Trans. 3, 160, 1975.
32. Kataoka T., Williamson J. R., Kinsky S. C.: Biochim. Biophys. Acta 298, 158, 1973.
33. Kessel D.: Biochem. Pharmacol. (Suppl.) 2, 47, 1974.
34. Kinsky S. C.: Meth. Enzymol. 32B, 501, 1975.
35. Lagunoff D., Nicol D. M., Pritzl P.: Lab. Invest. 29, 449, 1973.
36. Landbrooke B. D., Chapman D.: Chem. Phys. Lipids 3, 304, 1969.
37. Magee W. E., Miller O. V.: Nature 235, 349, 1972.
38. Martin E., Mac Donald R.: Nature 252, 161, 1974.
39. Michaelson D. M., Rattery M. A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4768, 1974.
40. Oldfield E., Chapman D.: FEBS Lett. 21, 303, 1972.
41. Ozato K., Huang L.: Carnegie Inst. Washington Annu. Rep. Direct., Carnegie Inst., Baltimore 1974, s. 83.
42. Papahadjopoulos D., Bangham A. D.: Biochim. Biophys. Acta 126, 183, 1966.
43. Papahadjopoulos D., Cowden M., Kimmelberg H. K.: Biochim. Biophys. Acta 330, 8, 1973.
44. Papahadjopoulos D., Poste G., Schaeffer B. E., Vail W. J.: Biochim. Biophys. Acta 352, 10, 1974.
45. Papahadjopoulos D., Vail W. J., Jacobson K., Poste G.: Biochim. Biophys. Acta 394, 483, 1975.
46. Papahadjopoulos D., Vail W. J., Moscarello M.: J. Membr. Biol. 22, 143, 1975.
47. Phillips M. C.: Progr. Surf. Membr. Sci. 5, 139, 1972.
48. Poste G., Papahadjopoulos D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1603, 1976.
49. Racker E., Eytan E.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 174, 1973.
50. Rahman Y. E., Cerny E. A., Tollaksen S. L., Wright B. J., Nance S. L., Thomson J. F.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146, 1173, 1974.
51. Rahman Y. E., Rosenthal M. W., Cerny E. A.: Science 180, 300, 1973.
52. Rahman Y. E., Wright B. J.: J. Cell. Biol. 65, 112, 1975.
53. Redwood W. R., Jansons V. K., Patel B. C.: Biochim. Biophys. Acta 406, 347, 1975.
54. Reeves J. P., Douben R. M.: J. Membr. Biol. 3, 123, 1970.
55. Rothstein A., Cabantchik Z. I., Balshin M., Juliano R.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 144, 1975.
56. Segal A. W., Gregoriadis G., Black C. D. U.: Clin. Sci. Mol. Med. 49, 99, 1975.
57. Segrest J. P., Gulik-Krzywicki T., Sardet C.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3294, 1974.
58. Sessa G., Weissmann G.: J. Biol. Chem. 245, 3295, 1970.
59. Spielvogel A. M., Norman A. W.: Arch. Biochem. Biophys. 167, 335, 1975.
60. Straub S. X., Garry R. F., Magee W. E.: Infect. Immun. 10, 783, 1974.
61. Tappel A. L.: Lysosomes Biol. Pathol. 2, 207, 1969.
62. Trauble H., Eibl H.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 214, 1974.
63. Turrens J. F., Crapo J. D., Freeman B. A.: J. Clin. Invest. 73, 87, 1984.
64. Verkleij A. J., De Kruff B., Ververgaert P. H. J., Toccanne J. F., Van Deenen L. L. M.: Biochim. Biophys. Acta 339, 432, 1974.
65. Weissmann G., Bloomgarden D., Kaplan R., Cohen C., Hoffstein C., Collins T., Gottlieb A., Nagle D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 88, 1975.
66. Yamada T., Iwanami Y.: Gann 52, 225, 1962.

Adres autora: dr Andrzej Ledwożyw, ul. Grażyny 29/13, 20-602 Lublin

ITO K., OKU Y., OKAMOTO M., AHBAYASHI M., KITAMURA Y., SHIBAHARA T.: Pasożyty u małpy japońskiej *Macaca fuscata fuscata* w prefekturze Ehime w Japonii. (Helminth parasites of the Japanese monkey, *Macaca fuscata fuscata* in Ehime prefecture Japan). Jpn. J. Vet. Res. 36, 235-247, 1988 (3-4)

Pośmiertnym badaniom parazytologicznym poddano 363 małp, *Macaca fuscata fuscata*, złapanych w prefekturze Ehime w 1986-87. U 69,9% małp stwierdzono zarażenie *Streptopharagus pigmentatus*, 52,9% *Strongyloides fulleborni*, 52,9% *Irichuris* sp. i 5,6% *Oesophagostomum dentatum*. *S. pigmentatus* zasiedlał żołądek i jelita cienkie, głównie ich przedni odcinek, zaś średnie nasilenie inwazji wynosiło 14,8. Tylko w jednym przypadku w żołądku występowało ponad 50 pasożytów. *Trichuris* sp. zasiedlający jelito ślepe i okrężnicę tylko w dwóch przypadkach występował w dużych ilościach. Znacznie silniejsza inwazja występowała u małp młodych (do 1 roku życia) aniżeli u osobników dojrzałych (1-5 lat i starszych (powyżej 5 lat)).

G.

OCHIAI K., TAKASHIMA I., HASHIMOTO N.: Analiza antygenowa wirusa japońskiego zapalenia mózgu wyosobnionego w Hokkaido przy użyciu przeciwciał monoklonalnych. (Antigenic analysis of Japanese encephalitis virus isolated in Hokkaido with monoclonal antibodies). Jpn. J. Vet. Res. 37, 21-26, 1989 (1)

Wirus japońskiego zapalenia mózgu przenoszony przez komary wywołuje u ludzi i u koni ciężkie zapalenie mózgu, a u świń ciężarnych ronień. Dotychczas nie wiadomo w jaki sposób wirus przeżywa w zimie. Mechanizm przenoszenia wirusa przebadano w Hokkaido, gdzie występują bardzo zróżnicowane warunki klimatyczne. Stosując szczepy wirusa japońskiego zapalenia mózgu izolowane z płodów poronionych oraz przeciwciała monoklonalne dla tych szczepów oraz dla wzorcowych szczepów wirusa zapalenie mózgu wykazano, że szczepy wyosobnione od poronionych płodów świń w Hokkaido różnią się strukturą antygenową od standardowego szczepu Nakayma, JaGAR-01. Różnią się też one od szczepów izolowanych w Honsiu.

G.