

LİPOZOMLAR

Özgür AKMAN, Fikret ALTUNAY, Gonca AŞUT, Tayfun BAYRAKTAR, Aykut UÇAR
Neslihan TOYRAN AL-OTAİBİ

ÖZET

Lipozomlar amfipatik yapıya sahip küçük veziküllerdir. İçerdikleri hidrofilik ve hidrofobik bölgeler nedeni ile suda ve yağda eriyen molekülleri taşıyabilme özelliğine sahiptir. Temel olarak fosfolipitlerden oluşan lipozomlar; yapı ve içerik açısından hücre zarına benzerlik göstermeleri, toksik olmamaları ve kimyasal içeriklerinin araştırmacı tarafından belirlenebilmesi nedeni ile bilim adamları tarafından uzun yıllar boyunca model membran olarak kullanılmıştır. Deneysel koşullarda sentetik fosfolipitlerin değişik yöntemlerle sulu bir ortama yayılması sonucu oluşan lipozomlar, hazırlama aşamasında dışardan eklenen diğer maddeleri de enkapsüle edebilme özelliğine sahip oldukları için ilaç taşıma araçları olarak da kullanılmaktadırlar. Ayrıca, belirli hedef hücrelere yönelebilen akıllı lipozomların geliştirilmesi ile birlikte bu veziküllerin tıpta kullanımı son yıllarda ivme kazanmıştır. Bu çalışmada, lipozomların genel özellikleri, hazırlama yöntemleri ve başta tıp olmak üzere farklı kullanım alanları derlenmiştir.

GİRİŞ

Lipozomlar, yapı ve içerik bakımından hücre zarı ile benzerlik gösteren, fosfolipit yapıda, amfipatik veziküllerdir (5,9). 1965 yılında tanımlanan kapalı lipit çift tabakası, 1967 yılında lipozom adını almıştır. İlk olarak 1968 yılında Sessa Wiessman tarafından biyolojik model membran çalışmalarında kullanılan lipozomların ilaç taşıyıcı olarak kullanımı son 15 yıla dayanmaktadır. İlaç taşıma aracı olarak lipozom kullanımının başlıca avantajları: Daha az yan etki, hedefe yönelik taşıma, yavaş ve uzun süreli ilaç salınımıdır. Sahip olduğu bu özellikler nedeni ile kanser tedavisinde kullanımı son yıllarda araştırmacıların dikkatini çeken bir konu haline gelmiştir (1). Bu derlemede, lipozomların tanımlanması, genel özelliklerinin kavranması, değişik kullanım alanlarının incelenmesi amaçlanmıştır.

LİPOZOM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ

Fosfolipitler suya eklendiklerinde, hidrofilik bölgeleri suya doğru yönelirken, hidrofobik bölgeleri sudan uzaklaşarak vezikül şeklini alırlar. Fosfolipit ve su molekülleri arasındaki hidrofobik etkileşimler ile fosfolipit molekülleri arasındaki van der Waals etkileşimleri, çift tabakalı lipozom yapısının oluşmasını sağlar.

Lipozomlar, katman sayılarına ve büyüklüklerine göre sınıflandırılırlar. Farklı hazırlama yöntemlerine bağlı olarak çok katmanlı (Multi Lamellar Vesicle=MLV) ve tek katmanlı (Small Unilamellar Vesicle=SUV, Large Unilamellar Vesicle=LUV) lipozomlar oluşturulabilmektedir (21).

Tablo . Vezikül çeşitleri ve çapları.

VEZİKÜL TİPİ	VEZİKÜL ÇAPI (nm)
SUV (Küçük Tek Tabakalı Lipozom)	25 - 50
MLV (Çok Tabakalı Lipozom)	50 - 100
LUV (Büyük Tek Tabakalı Lipozom)	>100

Hazırlama yöntemleri oluşturulacak lipozomların tabaka sayısı ve büyüklük dağılımını etkileyeceği için amaca yönelik yöntem seçilmelidir (11).

Lipozom hazırlamak için kullanılan yöntemler genel olarak 3 temel basamak içerir:

- Organik çözücüde çözdürülen lipitlerin kurutulması
- Sulu ortamda lipozomların oluşturulması
- Sonuçta elde edilen lipozomların analizi

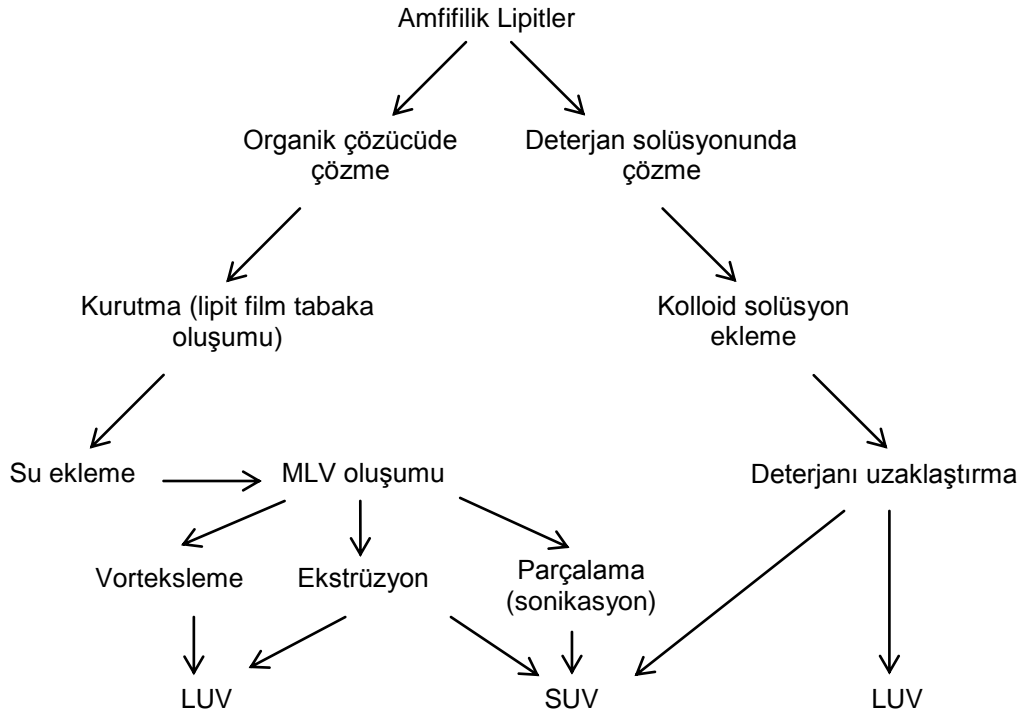
A) MLV Hazırlama Yöntemi

Lipit film, lipozomun yapısına katılacak lipitlerin kloroform gibi organik çözücülerde çözdürülmesi ve daha sonra bu çözücünün azot gazı kullanılarak uçurulması ile elde edilmektedir. Oluşturulan lipit film, oda sıcaklığında bir tampon çözelti ile hidrate edilir. Hidrate edilmiş lipit film, kendi anafaz geçiş sıcaklığının (T_m) üstündeki bir sıcaklıktaki ($T_m + 20$ °C) su içinde 1 dakika bekletilir sonrasında sudan çıkarılarak bir dakika boyunca vorteks yardımı ile çalkalanır. 15 dakika boyunca bu işlemler sırasıyla tekrarlanır. Bu işlemler sonucunda çok tabakalı lipozomlar elde edilmiş olur.

B) SUV ve LUV Hazırlama Yöntemi

Kuru lipit film hidrasyonu ile oluşturulmuş olan çok tabakalı lipozomların büyüklüğünü veya katmanlarının özelliklerini değiştirmek için çeşitli işlemler uygulanır. MLV'ler büyük ve heterojen bir yapıya sahiptir. Bu nedenle sonikasyon, ekstrüzyon, vorteksleme gibi yöntemler kullanılarak MLV'ler SUV veya LUV haline dönüştürülebilir. Bu işlemler sırasında kullanılan cihazlardan lipozom ekstrüzyon cihazı, sahip olduğu por çapına göre lipozomları ayırmada kullanılır. Por çapından daha küçük çapa sahip lipozomlar pordan geçerek ayrışır. Sonikasyon cihazı ile, MLV'lere yüksek düzeyde enerji uygulanarak SUV elde edilir.

LUV ve SUV, farklı bir yöntemle de oluşturulabilir. Bu yöntemde, çözücü olarak kullanılan deterjan, lipit-protein karışımından proteinlerin ayrıştırılmasını sağlar. Deterjan kullanımında tampon çözelti görevini kolloid çözeltiler görür. Deterjanın ortamdaki uzaklaştırılmasında santrifüj, jel filtrasyonu ya da hızlandırılmış kontrollü diyaliz yöntemleri kullanılır, böylece SUV veya LUV elde edilir (2,11,21).



Şekil . Lipozom Hazırlama Yöntemleri (12)

LİPOZOMLARIN KULLANIM ALANLARI

1. Lipozomların Tıpta Kullanımı

Lipozom yüzeylerinin farklı özellikteki molekülleri taşıyabilmesi, lipozomların farklı doku ve hücrelere etki etmelerini sağlar. Lipozomların tıp alanında kullanımında karşılaşılan en önemli problem, immunolipozomların fagositik sistem tarafından temizlenmesi olmuştur. Bu sorunu çözmek için bilim adamları, lipozom yüzeyini, bağışıklık sistemini aktive etmeyen moleküller ile kaplayarak çözmüşlerdir. Bu gelişmeye rağmen tedavi amaçlı olarak kan dolaşımına verilen lipozomlar ile istenilen sonuç alınamamıştır. Bu sorunun nedeni ise katı tümörlerdeki kan dolaşımının yetersiz oluşudur (16).

Damar yoluyla verilen lipozomların fagositik sistem tarafından sindirildiğinin anlaşılması ile makrofajlara lipozom aracılı ilaç taşınımı sağlanmıştır. Bu sayede lipozomlar, fagositik hücrelerin içinde bulunan parazitlere karşı tedavi geliştirilmesinde rol oynamıştır. Bu parazitlerin neden olduğu hastalıklardan en sık rastlanılanları leishmaniniasis ve mantar enfeksiyonlarıdır. Leishmaniniasis genellikle tropikal bölgelerde görülen 100 milyondan fazla insanda bulunan öldürücü bir makrofaj içi parazitik hastalıktır. Bu hastalıkta kullanılan lipozomlar enfekte bölgede birikmektedir. Biriken lipozomların toksik etkileri azdır (17). Başka bir çalışmada, Amfoterisin B taşıyan lipozomlarla mantar tedavisi yapılmıştır.

Bağışıklık sistemi tam olarak çalışmayan hastalarda kullanılan ilaçlar nörotoksik ve nefrotoksiktir. Bu toksik maddeler ya başka ilaçlarla bağ yaptırılarak temizlenir ya da bu ilaçlar lipozomlarla enkapsüle edilerek toksik etkileri büyük ölçüde azaltılır (15). Benzer yaklaşımlar, antibakteriyel ve antiviral tedavilerde de uygulanmıştır (19). Bu tedavilerde kullanılan antibiyotikler genellikle doğrudan alınmaktadır fakat bu antibiyotiklerin çok toksik olanları lipozomlarla enkapsüle edilmiş olarak verilir.

Aşılama amaçlı olarak da lipozomlar kullanılabilir. Lipozom aşısı hazırlanırken suda çözünen maddeler lipozomun içindeki sulu bölgeye, lipitte çözünen maddeler ise vezikül oluşumu sırasında lipit katmana karıştırılarak eklenir. Bu lipozomlar birçok hücre tarafından absorbe edilir ve hücre içine girdiğinde içerdikleri maddeleri salar. Bu aşılar genellikle makrofajları ve diğer fagositik hücreleri hedef almaktadırlar (7). Lipozomlar, amaca uygun antijen eklenerek vücuda verildikten sonra, hücreye girer girmez içlerindeki antijeni hücreye salarlar. Antijenle karşılaşan hücreler bir immun yanıt oluşturur.

Araştırmacılar, çeşitli maddelerin hücre membranıyla etkileşim mekanizmasını incelemek amacıyla lipozomları model membran olarak kullanmışlardır. Vitamin K₁'in hücre membranının fosfolipid tabakasına etkileri hakkında bilgi almak için yapılan bir çalışmada, Vitamin K₁ ile DMPC (dimyristoylphosphatidylcholine) ve DEPE (dielaidoylphosphatidylethanolamine)'den oluşmuş bir model membran kullanılmıştır. Vitamin K₁'in 25°C'de model membrana eklenmesi ile DMPC'nin interlaminar boşlukları arttırdığı görülmüştür. İlginç bir şekilde Vitamin K₁, DMPC sistemlerinde küresel yapıyı bozmuş ve altıgen bir yapı oluşmasına neden olmuştur (3). Lipozomların model membran olarak kullanıldığı diğer çalışmalarda kalsiyum, D vitamini ve E vitamini gibi maddelerin çeşitli fosfolipitlerden hazırlanmış membran sistemleri ile etkileşimleri incelenmiştir (4,8).

2. Lipozomların Biyomühendislik Alanında Kullanımı

Son yıllarda kalıtsal hastalıkların ve çeşitli kanserlerin tedavisinde, kullanılması gereken genlerin tanımlanması ve gen teknolojilerinin ilerlemesi sayesinde önemli gelişmeler olmuştur. Gen tedavisinde amaç, hastalığa neden olan kusurlu genin yerine sağlıklı kopyalarının hücre içine yerleştirilmesi ve genetik yapının bu şekilde düzeltilmesidir (18).

Gen tedavisinin basamakları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. Kalıtsal hastalığa neden olan genin tespit edilmesi
2. Hedef hücrelerin yerlerinin kesin olarak tespit edilmesi
3. Normal genin klonlanması
4. Sağlıklı genlerin hedef hücrelere ulaştırılması

Bu basamakların gerçekleştirilebilmesinde en önemli koşul, gen aktarımının etkin bir şekilde gerçekleştirilmesidir. Genleri istenilen hücrelere taşıyabilmek için fiziksel yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden bazıları, DNA'nın doğrudan enjeksiyonu, lipozom formülasyonları ve balistik gen enjeksiyonudur. Doğrudan DNA enjeksiyonu yönteminde, ilgili DNA'yı taşıyan plazmid doğrudan doğruya, örneğin kas içine, enjekte edilir. Bu gibi klasik yöntemlerde lipozomlar taşıyıcı olarak kullanılırlar. Klasik yaklaşımlarda, ağırlıklı olarak negatif yük içeren DNA molekülleri ile etkileşimi önlemek için negatif yüklü fosfatidilserinden yapılan LUV'lar kullanılır. Son zamanlarda ise pozitif yüklü kolesterol kullanılarak toksisitesi azaltılmış ve taşıma kapasitesi artırılmış lipozomlar kullanılmaktadır. Fiziksel yöntemler basit olmalarına karşın verimsizdirler ve bu yöntemlerin uygulama alanları kısıtlıdır (13).

3. Lipozomların Gıda Sanayide Kullanımı

Mikroenkapsülizasyon teknolojisinin geliştirilmesi ile lipozomlar çok çekici bir sistem haline gelmiştir. Bunun en büyük nedeni, lipozomların tamamen yenebilecek bir madde olarak kabul edilebilmesidir. Ürünlerin kalitesini arttırmak veya fermentasyon süresini kısaltmak için lipozom ile kapsüle edilmiş enzimler kullanılmaktadır. Bu enzimlerin kullanılması ile kimyasallara karşı korunma sağlanmaktadır. Bu durumun en klasik örneği peynir yapımıdır. Peynir yapımında lipozom kullanmanın sağladığı en önemli avantaj, hücre duvarı olmayan bakteri kalıntılarını kullanarak fermentasyon zamanını kısaltmaktır. Bu lipozomal sistemler peynir yapımını %30 hızlandırır. Peynir içindeki enzimlerin daha homojen dağılması ile tat vb. özelliklerin iyileştirilmesi sağlanır. Peynirin tadındaki acılık, bakterilerdeki proteolitik enzimlerinin fazla salgılanmasından kaynaklanmaktadır. Aynı zamanda, gelişen fermentasyon teknikleri sayesinde lipozomlar peynirin korunması amacıyla da kullanılmaktadır. Örneğin peynir yapılırken kullanılan sütün içindeki nitratlar sayesinde spor üreten bakterilerin çoğalması baskılanır (10).

Lipozomların gıda sanayide kullanımına verilebilecek diğer bir örnek de kabuklu deniz hayvanı üretim çiftliklerindeki kullanımınıdır. Kabuklu deniz hayvanları vücutlarında büyük oranda su depolayabilirler. Parazit kaynaklı enfeksiyonlara karşı oldukça duyarlı olan bu deniz hayvanlarının yetiştirilmesinde lipozomlardan faydalanılmaktadır (6,20).

4. Lipozomların Kozmetikte Kullanımı

Lipozomlar kozmetikte, çoğunlukla molekül taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Deri sağlığı için gerekli olan değişik tipte yağlar, vitaminler ve iyonlar, lipozomların içerisine enkapsüle edilerek deriye doğrudan uygulanabilmektedir. Kozmetikte lipozom kullanımının sağladığı en büyük avantaj, uzun süreli ve kontrollü madde salınımıdır.

Kremler ve jeller gibi kişisel kozmetik ürünlerinde, çeşitli özlere, yaşlanmaya karşı geliştirilmiş olan kremlerde, güneş koruyucularında, uzun süreli kalıcılık özelliği olan parfümlerde, saç kremleri ve tıraş losyonlarında, nemlendiricilerde, antibiyotik içeren ürünlerde küçük boyutlu, çok katmanlı lipozomlar; güneş yanığında, yara iyileşmesi için

kullanılan ve rekombinant protein içeren ürünlerde ise daha kompleks yapılu lipozomlar kullanılmaktadır.

Lipozomların taşıdıkları bu maddeler cilt hücreleri tarafından kabul edilebilir özelliktedir. Ancak koruyucu katkı maddeleri içeren ürünler ve parfümler, organizma tarafından yabancı madde olarak algılanabilmekte ve bu durum vücut savunma mekanizmasının alerji tetikleyici reaksiyon göstermesine neden olabilmektedir (14).

SONUÇ

İlk defa 1965 yılında tanımlanmış olan lipozomlar, yapılarının hücre zarına olan benzerliği, toksik olmayışı, içeriğinin ve yapısının amaca yönelik olarak düzenlenebilmesi ve hedefe yönelik kontrollü madde salınımı yapabilmesi gibi özellikleri sayesinde tıp, biyomühendislik, gıda sanayi ve kozmetik gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Son yıllarda bilim ve teknolojiye meydana gelen gelişmelere paralel olarak, lipozomların özellikle tıpta kullanımı önem kazanmıştır. Önümüzdeki yıllarda, başta kanser olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde lipozom kullanımının öneminin hızla artacağı düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- 1) Bangham A.D., Standish , M.M., Watkins, J.C.: Diffusion of Univalent Ions Across the lamellae of swollen Phospholipids, *J. Mol. Biol.*, 1965; 13: 238 -262.
- 2) Wang, B., Siahaan, T., Soltero, R.: *Drug Delivery: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, 2005.
- 3) Lukyanetz E.A., Shkryl V.M., Kravchuk O.V., et al.: *Biomembranes*, B.B.A., 1999; 1: 206-220.
- 4) Kiselev M.A., Wartewig S., Janich M., et al.: *Chemistry and Physics of Lipids*, 2003; 2: 165-176.
- 5) Duve, C., Trouet A., Campeneere, D.D., et al.: *Liposomes as Lysosomotropic Carriers*, N.Y. Acad.Sci, 1998; 53: 266-234.
- 6) Gatt, S., Bercovier J.H., Barenholz, Y.: Use of liposomes to combat oil spills and their potential application to bioreclamation, *Butterworth, Stoneham*; 1991; 293–312.
- 7) Gregoriadis, G.: Immunological adjuvants: A role for liposomes, *Immunol. Today*, 1990; 11: 89–97.
- 8) Hinch, D.K.: *FEBS Letters*, 2008; 25-26: 3687-3692.
- 9) Huang, C.: *Studies on Phosphatidylcholine Vesicles. Formation and Physical Characteristics* , *Biochem .*, 1978; 8: 344-351.
- 10) Kirby, C.: *Delivery systems for enzymes*, *Chem. Br.*, Sept. 1990; 847–851.
- 11) Kobayashi, N., Nishikawa, M., Takakura, Y.: *Gene Therapy and Gene Delivery*, In: *Drug Delivery: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., 2005; 305-318.
- 12) Lasch, J., Weissig, V., Brandl, M.: *Preparation of liposomes*, 2nd Ed., Oxford University Press, 2003; 3-29.
- 13) Lasic, D.D.: *Liposomes*, *Am. Sci.* 1992; 80: 512.
- 14) Lasic, D.D.: *Liposomes*, *Am. Sci.* 1992; 80: 513-514.
- 15) Lopez-Berestein, G., Fainstein V., Hopter R., et al.: Liposomal Amphotericin B for the treatment of systemic fungal infections in patients with cancer, *J. Infect. Diseases* , 1985; 151: 704–710.
- 16) Nassander, U.K., Steerenberg P.A., Storm G., et al.: In vivo targeting of OV-TL3 immunoliposomes to ascitic ovarian carcinoma cells (OVCAR-3) in athymic nude mice, *Cancer Res.*1995; 52: 646–653.

- 17) New, R.R.C., Chance S.M., Thomas S.C., et al.: Nature antileishmanial activity of antimonials entrapped in liposomes, 1978; 272: 55–58.
- 18) Nicolau, C., Cudd, A.: Liposomes as carriers of DNA, Crit. Rev. Therap. Drug Carr. Systems 1989;6: 239–271.
- 19) Svenson, C.E., Popescu M.C., Ginsberg, R.C.: Liposome treatments of viral, bacterial and protozoal infections, Crit. Rev. Microbiol. 1988; 15: 1–31.
- 20) Tahibi, A., Sakurai, J.D., Mathur R. Et al.: Novasome vesicles in extended pesticide formulation, Proc. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mat. 1992;18: 231–232.
- 21) Wang, G.: Liposomes as Drug Delivery Vehicles, John Wiley & Sons, Inc., 2005: 411-434.