لیپوزوم‌ها یا نانو لیپیدها: شناسائی، ویژگیها و روش‌های تهیه آنها

ژاله پورموذن
دانشکده علوم پایه، گروه شیمی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان،

چکیده

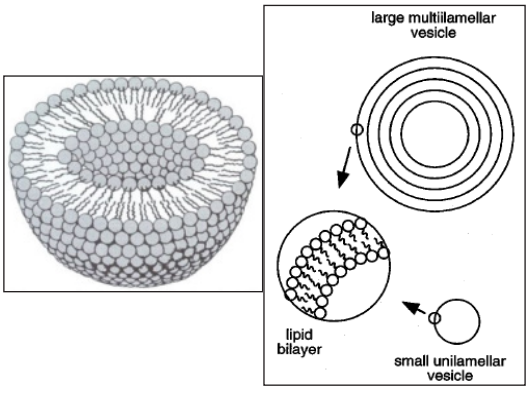
لیپوزوم‌ها نانو ذرات کروی شکلی هستند که یک یا چند لایه فسفولیپید در ساختار خود دارند و اولین بار در دهه ۶۰ تهیه شدند. امروزه لیپوزوم‌ها ابزار مفیدی در مطالعات ریاضی و فیزیک تئوری، بیو فیزیک، شـــیمی، علوم کلوئیدی، بیوشـــیمی و بیولوژی هستند که راه خود را به بازار باز کرده‌اند. به علت ساختار، ترکیب بندی شیمیائی و سایز کلوئیدی، که همه بخوبی توسط روش‌های مختلف تهیه قابل کنترل هستند، لیپوزوم‌ها خصوصیات متعددی از خود نشان می‌دهند که در زمینه‌های کاربردی مختلف مفیدند. مهمترین خصوصیت‌ها شـــامل ســـایز کلوئیدی در رنج nm۲۰ تا mμ۱۰، و ویژگیهای غشائی مثل تغییرات فازی دولایه‌ای‌ها، خواص مکانیکی و نفوذپذیری، دانسیته بار، وجود پلیمرهای سطحی یا گرافت شده، و یا لیگاندهای اتصال یافته هستند. بعلاوه، به دلیل دارا بودن ویژگیهای آمفی فیلی، لیپوزوم‌ها سیســـتم‌های انحلالی قدرتمندی برای گستره وسیعی از ترکیبات هستند. علاوه بر این خواص فیزیکوشیمیائی، لیپوزوم‌ها ویژگیهای بیولوژیکی بسیار ویژه‌ای را از خود نشان می‌دهند، مثل برهمکنش‌های ویژه با غشاهای بیولوژیکی و سلولهای مختلف.

واژه‌های کلیدی: *لیپوزوم ها، نانولیپیدها، غشاهای بیولوژیکی*

zhalehpourmoazzen@yahoo.com

۱- مقدمه

لیپوزوم‌ها که وزیکولهای لیپیدی نیز نامیده می‌شوند، از خود تجمعی مولکول‌های فسفولیپید در محیط آبی تشکیل می‌شوند. مولکول‌های فسفولیپید از یک سر غیرقطبی بلند (هیدروفوب) و یک سر قطبی (هیدروفیل) تشکیل شده‌اند. این مولکول‌ها با انحلال در یک محیط آبی بطور خودبخود تشکیل غشاهای دو لایه‌ای می‌دهند، که مرکب از دو لایه ورقه‌ای تک لایه از مولکول‌های لیپیدی هستند بگونه‌ای‌که سطوح غیرقطبی آنها به سمت همدیگر و سطوح قطبی آنها به سمت محیط آبی صف آرایی می‌کنند. به‌این ترتیب این غشاء، در درون خود حفره‌ای تشکیل می‌دهد که بخش کوچکی از فاز آبی را در بر دارد درست مثل غشای سلولی که یک سلول را احاطه کرده است. در واقع، غشای دو لایه‌ای اساسا غشای سلولی بدون پروتئینهاست [۱] (شکل ۱).



شکل ۱. شمائی از دو نوع لیپوزوم، چند لایه‌ای با اندازه بزرگ (بالا) و تک لایه‌ای کوچک (پایین).

اندازه لیپوزوم‌ها از ۱۰ میکرومتر (وزیکولهای چند لایه‌ای) تا ۲۰ نانومتر (وزیکولهای تک لایه‌ای) تغییر می‌کند. لیپوزوم‌ها به دلیل داشتن حفره آبی و غشای لیپیدی دولایه، در مصارف داروئی می‌توانند هم داروهای هیدروفوب و هم داروهای هیدروفیل را با خود حمل کنند. ترکیبات و داروهای محلول در آب در داخل حفره درونی محتوی آب در حالیکه ترکیبات و داروهای محلول در چربی در غشای فسفولیپیدی جای می‌گیرند. لیپوزوم‌های محتوی دارو از طریق تزریق وریدی، استنشاق دهانی، کاربرد موضعی یا قطره چشمی جهت اهداف درمانی مورد استفاده قرار گیرند.

خواص لیپوزوم‌ها بوسیله تکنیکهای متنوعی مورد مطالعه قرار می‌گیرد: آرایش مولکولی توسط تکنیکهای اشعه‌ایکس، رزونانس مغناطیسی هسته‌ای، رزونانس پارا مغناطیسی الکترون و طیف سنجی رامان. مراحل ذوب (که انتقالات کریستال به فاز کریستال مایع را نشان می‌دهد) توسط مطالعات کالریمتری، بار الکتریکی سطحی توسط میکروالکتروفورز[۲] و سایز ذره توسط پراکندگی نوری (scattering Light) و میکروسکوپ الکترونی انجام می‌گیرند.

لیپوزوم‌ها کاربردهای بیشماری به عنوان ابزار بایوشیمیائی و بایوفیزیکی دارند مثل:

۱. وزیکولهایی برای رساندن داروهای محلول در آب و چربی به سلول هدف
۲. مطالعه ویژگی غشاهای لیپیدی دولایه
۳. حدواسطهائی در ساخت غشاهای دو لایه‌ای به‌اندازه کافی بزرگ برای مطالعه خواص الکتریکی غشاء
۴. کمک به سیستم ایمنی
۵. افزایش کارائی و شاخص درمان
۶. افزایش پایداری و کاهش سمیت داروئی
۷. کاهش اثرات جانبی دارو
۸. بهبود اثرپذیری داروئی (کاهش حذف دارو از طریق افزایش طول عمر گردش در جریان خون)
۹. انعطاف پذیری در کوپلاژ با لیگاندهای محل- ویژه (Site-ligands specific) جهت نشانه گیری فعال [۲]

۲. اجزای ساختاری لیپوزوم‌ها

اجزای اصلی ساختاری لیپوزوم‌ها شامل فسفولیپیدها و کلسترول هستند.

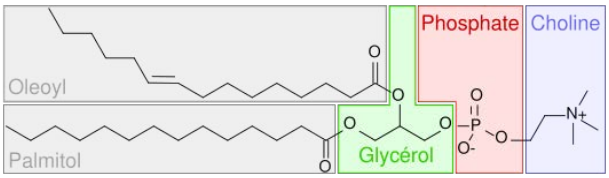
الف- فسفولیپیدها

غشای سلولی نقش مهمی در پدیده‌های بیولوژیکی دارد. این غشا اجزای زنده

موجود در سلول را سازماندهی می‌دهد، یک ماتریکس دوبعدی سیال بوجود می‌آورد و نقل و انتقالات کنترل شده به داخل و خارج سلول را برعهده دارد. همچنین غشای سلولی دارای کربوهیدراتهائی هستند که بطور کووالانسی به لیپیدها و پروتئینها موجود در غشاء اتصال دارند، اما با وجود این، مقدار کربوهیدراتهای غشاء در حدود ۱۰ درصد جرم کل غشاء است.

ماتریکس غشایی، در واقع دولایه لیپیدی تشکیل شده از فسفولیپیدها و گلیکولیپیدها به همراه پروتئینهاست. فسفولیپیدها بر دو نوعند: فسفوگلیسریدها و اسفینگو لیپیدها. مهمترین فسفولیپیدها فسفاتیدیل کولین، یک مولکول آمفی فیل دارای

- یک سر قطبی هیدروفیلی
- یک پل گلیسرول
- یک جفت از زنجیرهای آسیل هیدروکربن‌های هیدروفوب است. (شکل ۲)



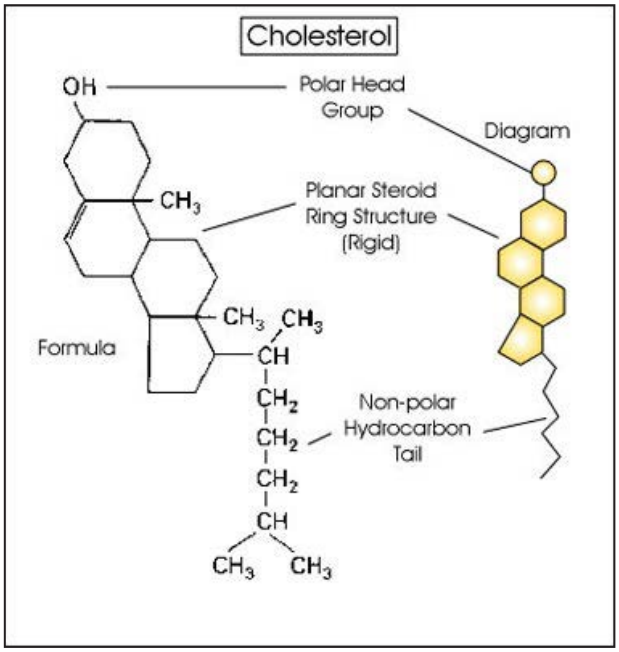
شکل ۲. ساختار فسفاتیدیل کولین

ساختار دولایه‌ای فسفولیپیدها برهمکنش‌های هیدروفیلی و هیدروفوبی را، که دو نوع از مهمترین برهمکنش‌های غیر کووالانسی هستند، توامان نشان می‌دهند. در این ساختار زنجیرهای اسید چرب غیر قطبی فسفولیپیدها طوری آرایش پیدا می‌کنند که کمترین تماس را با آب داشته باشند و بدین وسیله باعث افزایش برهمکنش‌های هیدروفوبی می‌شوند. در عوض گروه‌های یونی و در بعضی موارد گروه‌های دو یونی در تماس مستقیم با فاز آبی در سطح خارجی غشای دو لایه قرار دارند، بدین وسیله باعث افزایش برهمکنش‌های هیدروفیلی می‌شوند. هنگامیکه‌این غشای دو لایه‌ای بر روی هم تا خورده و به شکل وزیکولها در میایند این برهمکنش‌های نامطلوب بطور کامل از بین میروند. در مورد فسفولیپیدهای دو یونی مثل فسفاتیدیل کولین، برهمکنش‌های قطبی– قطبی بین جفت یون‌ها در سطح غشای دو لایه‌ای در پایداری ساختار غشاء موثر هستند. در بین سه نوع لیپید موجود در ساختار غشاء: فسفولیپیدها، لیپیدهای طبیعی به ویژه کلسترول و گلیکولیپیدها، فسفولیپیدها فراوانترین هستند.

بنابراین، لیپیدها به ویژه فسفولیپیدها در بسیاری از زمینه‌ها مانند شیمی، بایو شیمی و علوم پلیمری مورد توجه قرا گرفته‌اند. فسفولیپیدهائی که بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند فسفاتیدیل کولین، فسفاتیدیل اتانول آمین، فسفاتیدیل سرین و اسفینگو میلین (Sphingomyeline) هستند. گروه‌های انتهائی فسفولیپیدها بسته به pH محیط یا به صورت آنیونی و یا به صورت دو یونی وجود دارند. زنجیرهای هیدروکربنی طولهای متفاوت و درجات متفاوتی از غیراشباعی را دارا می‌باشند [۳].

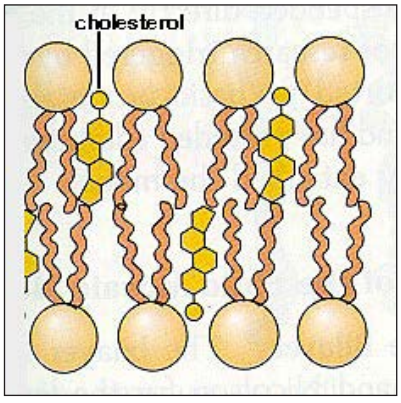
ب. کلسترول

مولکول لیپیدی دیگری که در غشای سلولی یافت می‌شود، کلسترول است که جزء دسته استروئیدهاست. مقدار کلسترول در سلولهای مختلف متفاوت است. این مولکول یک سیستم حلقوی صلب و یک زنجیر هیدروکربنی شاخه دار کوتاه دارد که بخش هیدروفوب مولکول را تشکیل می‌دهند، اما در عین حال حاوی یک بخش هیدروفیل، یعنی یک گروه هیدروکسیل، نیز است بنا براین کلسترول یک مولکول آمفی فیل است (شکل ۳).



شکل ۳. مولکول کلسترول

کلسترول در بین فسفولیپیدهای دولایه‌ای غشاء وارد شده، بطوریکه گروه هیدروکسیل آن به سمت فاز آبی و سیستم حلقوی هیدروفوب آن در کنار دنباله اسید چرب آن قرار می‌گیرد (شکل ۴). گروه‌های هیدروکسیلی کلسترول با فسفولیپیدها پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهند. برهمکنش با مولکول‌های صلب کلسترول، تحرک دنباله هیدروکربنی فسفولیپیدها را کاهش می‌دهد و به‌این ترتیب موجب می‌شود که غشاء تا حدی انحلالپذیری خود را نسبت به مولکول‌های قابل حل در آب از دست بدهد که‌این امر منجر به عبور کنترل شده آنها از غشاء می‌گردد. اما حضور کلسترول در غشای فسفولیپیدی در تراکم دنباله اسید چرب فسفولیپیدها برای تشکیل فرم کریستالی و صلب ایجاد مزاحمت می‌کند و به‌این ترتیب مانع انتقال به حالت کریستالی می‌شود. غشاهای فسفولیپیدی با غلظت بالائی از کلسترول دارای سیالیتی هستند که حدواسط بین حالت کریستال مایع و حالت کریستالی است. در غیاب کلسترول، غشاهای سلولی بسیار نرم و آبکی و نسبت به برخی مولکول‌ها بسیار نفوذپذیر می‌گردد. به عبارت دیگر، مانع از تبدیل شدن به یک فرم خمیری نرم می‌شود.



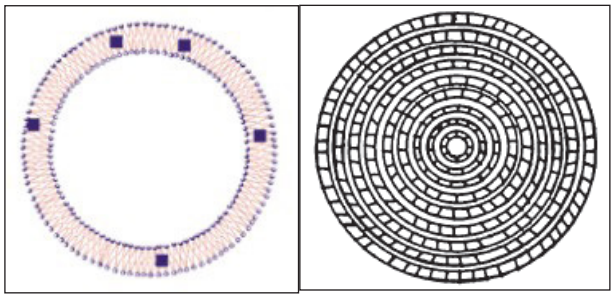
شکل ٤. طرز قرارگیری کلسترول در غشاء

با وجود اینکه کلسترول ثبات و انسجام غشاء را افزایش می‌دهد و از سیالیت بیش از حد آن جلوگیری می‌کند، ولی در عین حال سیالیت خاص غشاء را حفظ می‌کند. در واقع کلسترول به عنوان یک بافر سیالیت عمل می‌کند یعنی زیر دمای انتقال فاز موجب می‌شود که غشا نامنظم و بسیار نفوذپذیر شده و بالای دمای انتقال فاز موجب می‌شود که غشا بسیار منظم و منسجم باشد. بدین معنی که اتصال کلسترول جدائی بین سرهای قطبی فسفولیپیدها را افزایش داده و مانع از برهمکنش‌های الکتریکی و پیوندهای هیدروژنی معمول بین آنها شده، بنابراین موجب جدائی فسفولیپیدها از هم و کاهش نظم موجود در آنها در دماهای پائین می‌گردد. بالای دمای انتقال فاز، کاهش آزادی تحرک زنجیرهای آسیل باعث انقباض و صلبیت غشاء و تراکم بیشتر فسفولیپیدها و کاهش سیالیت آن می‌شود [۴].

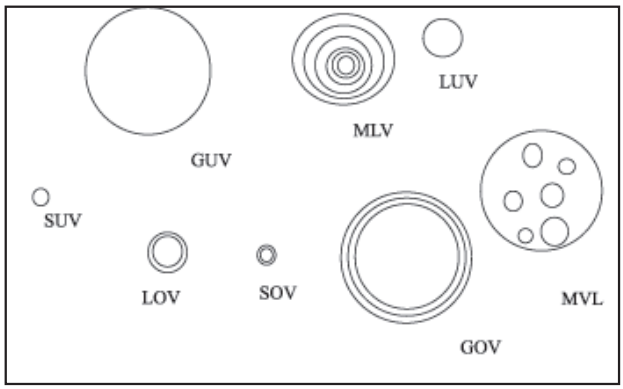
۳. انواع لیپوزوم‌ها

لیپوزوم‌ها بر اساس فاکتورهای زیر تقسیم بندی می‌شوند:

- پارامترهای ساختاری
- روش تهیه
- ترکیب شیمیائی و کاربرد



شکل ۵. لیپوزوم‌های تک لایه و چند لایه



شکل ٦. انواع لیپوزوم‌ها

الف- پارامترهای ساختاری

بر اساس پارمترهای ساختاری، لیپوزوم‌ها به ۴ دسته طبقه بندی می‌شوند:

۱. وزیکولهای چند لایه (MLV =vesicles Multilamellar) که قطری بین ۱۰۰۰۰nm-۵۰۰ دارند (شکل ۵).

۲. وزیکولهای الیگولاملار (OLV = vesicles Oligolamellar) که قطری بین ۱-۰/۱ µm دارند.

۳. وزیکولهای تک لایه‌ای UV (در اندازه‌های مختلف)

- وزیکولهای تک لایه‌ای کوچک SUV (۱۰۰ -۲۰ nm)
- وزیکولهای تک لایه‌ای متوسط MUV
- وزیکولهای تک لایه‌ای بزرگ LUV (>۱۰۰ nm)
- وزیکولهای تک لایه‌ای خیلی بزرگ GUV (۱۰۰۰۰۰۰ nm-۱۰۰۰۰)

۴. وزیکولهای دارای چند وزیکول MV/MVV (>۱ µm) (شکل ۶)

ب- بر اساس روش تهیه

- وزیکولهای DRV (Dehydrated-rehydration method)
- وزیکولهای REV (reverse phase evaporation method made LUVs/SUVs)
- وزیکولهای REV-MLV (reverse phase evaporation method made MLVs)
- وزیکولهای SPLV (stable plurilamellar vesicles)
- وزیکولهای FATMLV (Frozen and Thawed MLVs)
- وزیکولهای VET (reverse phase evaporation technique extrusion prepaired Vesicles)

ج- بر اساس ترکیب شیمیائی و کاربرد

- لیپوزوم‌های متداول (liposomes Conventional = CL) شامل فسفولیپیدهای خنثی، دارای بار منفی و کلسترول
- فیوزوژنیک لیپوزوم‌ها (liposomes Fusogenic)
- لیپوزوم‌های حساس به pH محیط، استفاده از فسفولیپیدهای PE و DOPE
- لیپوزوم‌های کاتیونی
- لیپوزوم‌های با طول عمر زیاد در طی گردش خون (Long circulatory liposomes (Stealth)(LCL)
- لیپوزوم‌های مصونیت‌زا (liposomes -Immuno) شامل اتصال آنتی بادی

٤. متدهای تهیه لیپوزوم‌ها

روش‌های تهیه لیپوزوم‌ها شامل بار گذاری غیر فعال که شامل بار گذاری مواد داخل حفره‌ای لیپوزوم قبل یا در حین عملیات تهیه لیپوزوم‌ها و بار گذاری فعال که در آن نوع خاصی از ترکیبات دارای گروه‌های قابل یونیزه و نیز ترکیبات انحلال پذیر در آب یا چربی می‌توانند بعد از مراحل تشکیل وزیکولهای با حفره‌های خالی، وارد لیپوزوم‌ها شوند.

۱- تکنیک بار گذاری غیر فعال، که بطورعمده شامل سه روش زیر است : الف- روش‌های پراکندگی مکانیکی ب- روش‌های پراکندگی حلال ج- روش‌های تفکیک پاک کننده

الف - روش‌های پخش مکانیکی

- هیدراتاسیون فیلم لیپیدی دستی و غیر دستی یا خشکاندن انجمادی

- میکرو امولسیون سازی
- دادن انرژی صوتی یا سونیکیت
- سل فشار فرانسوی
- اکستروژن غشائی
- تجدید ساخت وزیکولهای خشک
- منجمد کردن- انجماد زدائی

ب- روش‌های پخش حلال

- تزریق اتانول
- تزریق اتر
- وزیکولهای امولسیون مضاعف
- وزیکولهای تبخیر فازی برگشت پذیر
- وزیکولهای چند دیواره پایدار

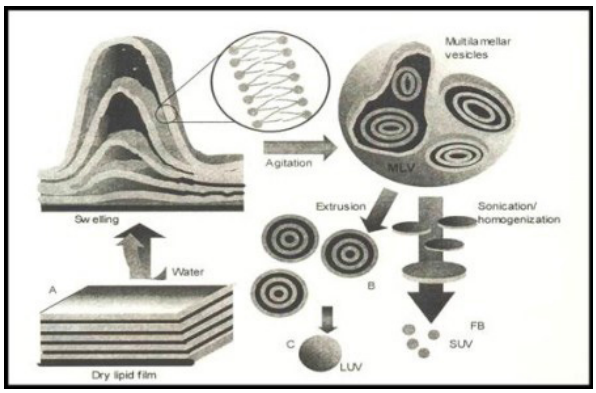
ج- روش‌های تفکیک پاک کننده

- پاک کننده (Cholate، آلکیل گلیکوزیدها، تریتو n x-۱۰۰) از مخلوط میسل توسط روش‌های زیر حذف می‌شود
- دیالیز
- کروماتوگرافی ستونی
- رقیق

در تهیه لیپوزوم‌ها لیپیدهای غیراشباع مورد استفاده قرار می‌گیرند و از اینرو مستعد اکسیداسیون هستند. حلالهای فرار نظیر کلروفرم، تمایل به تبخیر دارند لذا باید لیپوزوم‌ها درداخل ظروف شیشه‌ای تیره دربسته و در اتمسفر خنثی نیتروژن نگهداری شوند.

همه روش‌های تهیه لیپوزوم‌ها شامل مراحل اصلی زیر هستند:

- خشک کردن حلالهای آلی محتوی لیپیدها
- پراکندن لیپیدها در محیط آبی
- خالص سازی لیپوزوم‌های حاصله
- آنالیز محصول نهائی



شکل ۷. مراحل تهیه لیپوزوم

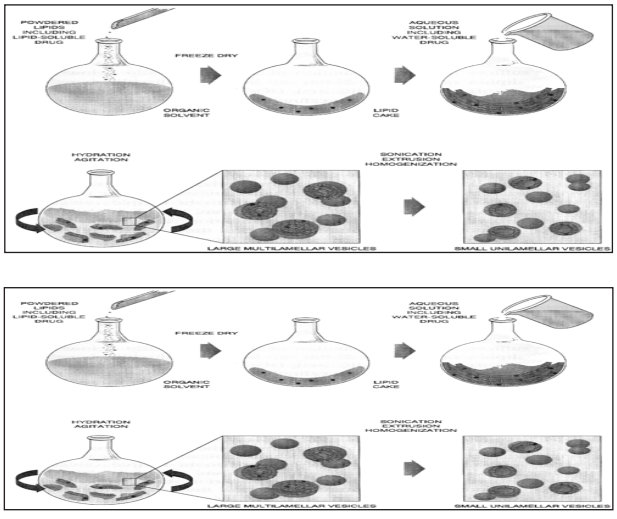
مکانیزم تشکیل لیپوزوم‌ها (وزیکولهای لیپیدی)

همانطور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود، اولین مرحله در تهیه لیپوزوم‌ها (وزیکولهای لیپیدی)، تهیه لایه‌های نازکی از لیپیدها و سپس خشک کردن و حذف کامل حلال است که در مرحله بعدی تحت هیدراتاسیون مجدد در محلول آبی محتوی ترکیبات مناسب جهت ذخیره در محفظه داخلی لیپوزوم قرار می‌گیرند. به دنبال هیدراتاسیون مجدد لایه‌های لیپیدی، مخلوطی از لیپوزوم‌های هتروژن، یعنی LUVs and ,MLVs ,MUVs ,SUVs، بدست می‌ایند و انواع تکنیکهای پراکندگی (جداسازی) مانند انرژی صوتی، سانتریفوژ، اکستروژن، انجماد- ذوب کردن، تبخیر اتر و تبخیر فاز برگشتی برای جدا کردن لیپوزوم‌های هموژن با سایز مطلوب مورد استفاده قرار می‌گیرند.

هنگامیکه لایه‌های نازک لیپیدها هیدراته می‌شوند و فسفولیپیدهای دو لایه‌ای کریستال مایع در نتیجه جذب آب نرم و متورم می‌شوند، در نهایت این ورقه‌های لیپیدی هیدراته شده در طی همزدن از هم جدا می‌شوند و دو انتهای ورقه‌های لیپیدی به هم نزدیک شده و تشکیل وزیکولهای چند لایه‌ای بزرگ (LMV) را می‌دهند. وقتی این ذرات تشکیل شدند، کاهش سایز ذرات به مصرف انرژی به شکل انرژی صوتی (Sonication) یا انرژی مکانیکی (Extrusion) نیاز دارند.

الف- تهیه ورقه‌های لیپیدی برای هیدراتاسیون (آبپوشی)

برای تهیه لیپوزوم‌ها از لیپیدهای با ساختارهای متفاوت، ابتدا لیپیدها باید در حلالهای آلی مخلوط شده و یک محلول هموژن از انحلال آنها حاصل شود. معمولا این فرایند بوسیله کلروفرم یا مخلوط کلروفرم : متانول انجام می‌گیرد. هدف، بدست آوردن یک محلول لیپیدی شفاف است. اساساً محلولهای لیپیدی به صورت ۲۰- ۱۰ میلی‌گرم لیپید / میلی لیتر حلال آلی تهیه می‌شوند، با این وجود محلولهای غلیظتری ممکن است ساخته شود اگر انحلال‌پذیری لیپیدها بیشتر باشد.



شکل ۸. مراحل تهیه لیپوزوم، تهیه ورقه‌های لیپیدی برای هیدراتاسیون (آبپوشی)

وقتی که لیپیدها بطور کامل در حلال آلی حل شدند، حلال تبخیر و بطور کامل حذف می‌شود و به‌این ترتیب فیلم نازکی از لیپید تشکیل می‌شود. در حجمهای کوچکی از حلال آلی (ml ۱>)، حلال به کمک نیتروژن خشک یا جریان گاز آرگون در زیر هود خشک می‌شود. در حجمهای بیشتر، حلال آلی از طریق تبخیر در روتاری حذف شده و بدین ترتیب لایه نازکی از لیپید در دیواره‌های فلاسک تشکیل می‌شود. فیلم لیپیدی حاصله یک شبانه روز تحت خلاء در دسیکاتور قرار داده می‌شود تا بطور کامل خشک شود. در مرحله بعدی با استفاده از کلروفرم یا سیکلوهگزان یا بوتانول نوع سوم برای بار دوم لیپیدها

حل می‌شوند. محلول لیپیدی با قرار دادن در توده‌های یخ خشک یا ظرف محتوی مخلوط یخ خشک – استون یا الکل (متانول یا اتانول) فریز می‌شود. بعد از انجماد کامل، لایه‌های لیپیدی منجمد شده در یک پمپ خلاء تا خشک شدن کامل (یک یا دو روز، بسته به مقدار ماده) قرارداده می‌شود. ضخامت لایه‌های لیپیدی نباید بیشتر از قطر ظرف بکار رفته برای خشک کردن آن باشد. لایه‌های لیپیدی خشک خارج شده از پمپ خلاء آماده برای هیدراته شدن هستند (شکل ۸).

ب- هیدراتاسیون لایه‌های لیپیدی

هیدراتاسیون لایه‌های لیپیدی از طریق افزایش محلول آبی به ظرف محتوی لایه‌های لیپیدی خشک بهمراه همزدن انجام می‌گیرد. دمای محیط هیدراتاسیون باید از دمای انتقال ژل- کریستال مایع (Tm یا TC) مولکول لیپیدی با بالاترین TC قبل از افزایش بر روی لایه‌های لیپیدی خشک بالاتر باشد. بعد از افزایش محیط هیدراسیون، دمای سوسپانسیون لیپیدی در مدت زمان هیدراسیون باید از دمای TC بالاتر باشد. برای لیپیدهای با TC بالا، این وضعیت به آسانی با انتقال سوسپانسیون لیپیدی به داخل فلاسک ته گرد و نصب آن در دستگاه روتاری بدون اعمال خلاء قابل دسترس است. چرخش فلاسک ته گرد در حمام آب گرم روتاری در دمای TC مربوطه منجر به هیدراته شدن لایه‌های لیپیدی در فاز مایع می‌گردد. مدت زمان هیدراسیون برای گونه‌های مختلف لیپیدی با ساختارهای گوناگون متفاوت است اما در حالت کلی، زمان هیدراسیونی در حدود ۱ ساعت همراه با بهمزدن توصیه می‌گردد. البته، نگهداشتن سوسپانسیون وزیکولها در طول شبانه روز در همان وضعیت قبل از مرحله کوچک سازی سایز۴ وزیکولها موجب ساده تر شدن مرحله سایزبندی شده و تهیه وزیکولهای هموژن را میسر می‌سازد.

افزایش مدت زمان این فرایند برای لیپیدهای با TC بالا به هیچ وجه توصیه نمی شود زیرا افزایش دما موجب هیدرولیز لیپیدها می‌گردد. محیط هیدراته کننده مناسب می‌تواند شامل آب مقطر، محلولهای بافری، محلول نمک و محلولهای غیر الکترولیت مثل محلول قندی است. محلولهای قابل استفاده در بافت زنده شامل محلول نمک ۰/۹٪، دکستروز ۵٪ و ساکارز۱۰٪ هستند. لیپیدهای باردار هنگام هیدراتاسیون در محلولهای با قدرت یونی کم تشکیل یک ژل ویسکوز می‌دهند. این مسئله می‌تواند با افزایش نمک یا با کاستن سایز لیپیدها کاهش یابد. لیپیدهای با توانائی کم در هیدراتاسیون، مثل فسفاتیدیل اتانول آمین تمایل به تراکم در حین هیدراسیون دارند. وزیکولهای لیپیدی دارای بیش از ۶۰٪ مولی فسفاتیدیل اتانول آمین تشکیل ذراتی می‌دهند که لایه هیدراسیون نازکی در اطراف خود دارند. وقتی ذرات بهم میرسند هیچ دافعه هیدراسیون برای جلوگیری از نزدیک شدن آنها وجود ندارد و دو غشاء بهم چسبیده و توده‌ای را تشکیل می‌دهند. این توده‌ها از محلول بصورت فولیکولهائی خارج می‌شوند، با همزدن مجدد پخش شده و با قطع همزن دوباره بهم میرسند. محصول هیدراتاسیون یک وزیکول بزرگ چند لایه (LMV) که از نظر ساختاری به یک پیاز شبیه است که هر دولایه لیپیدی آن توسط یک لایه آبی جدا شده است. فضای مابین لایه‌های لیپیدی به ترکیب این لایه‌ها بستگی دارد که لایه‌های لیپیدی خنثی از نظر الکتریکی نسبت به لایه‌های لیپیدی باردار که براساس میزان بار و دافعه بار الکتریکی از هم جدا می‌شوند، بهم نزدیکند. وقتی یک سوسپانسیون LMV هیدراته شده پایدار تشکیل شود، ذرات بزرگتر می‌توانند به ذرات کوچکتر توسط تکنیکهای متنوع شامل کاربرد انرژی صوتی یا مکانیکی قطعه قطعه شوند (شکل ۱۰).

ج- سایزبندی سوسپانسیون لیپیدی

- دادن انرژی صوتی (Sonication):

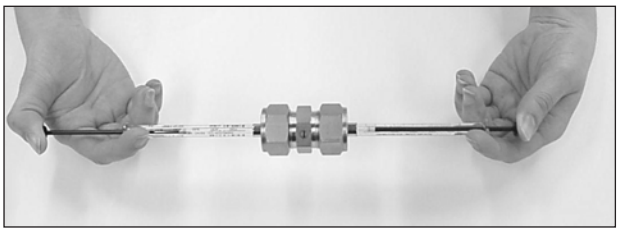
قطعه قطعه کردن سوسپانسیون LMV با استفاده از انرژی صوتی (صوتی کردن) اساسا وزیکولهای تک لایه کوچک (SUV) با قطری در رنج nm ۵۰-۱۵ تولید می‌کند. رایجترین ابزار برای تولید این ذرات and bath sonicators tip probe ,sonicators horn-Cup هستند. sonicators tip Probe انرژی بالائی به سوسپانسیون لیپیدی وارد می‌کنند که مکن است منجر به تخریب سوسپانسیون لیپیدی به علت گرمای بیش از حد وارده شود که از معایب این روش است. نوک قلم این دستگاه ذرات تیتانیم به سوسپانسیون لیپیدی وارد می‌کنند که باید قبل از استفاده به کمک سانتریفوژ حذف شوند. به همین دلیل sonicators bath رایجترین ابزار برای تهیه SUV هستند. دادن انرژی صوتی یک سوسپانسیون LMV با قرار دادن یک لوله آزمایش محتوی سوسپانسیون در یک sonicator bath (یا گذاشتن نوک قلم sonicator در لوله آزمایش) و دادن انرژی صوتی به مدت ۱۰-۵ دقیقه بالای TC لیپید انجام می‌گیرد.

سوسپانسیون لیپیدی شروع به روشنتر شدن می‌کند و در نهایت یک محلول تیره شفافی می‌دهد. تیرگی به علت پراکندگی نوری تحریک شده بوسیله ذرات بزرگ باقیمانده در سوسپانسیون است. این ذرات می‌توانند بوسیله سانتریفوژ حذف شوند و تولید سوسپانسیون شفافی از SUV دهند. سایز متوسط ذرات و میزان پراکندگی آنها از عواملی مثل ترکیب درصد اجزا و غلظت، دما، مدت زمان و توان صوتی کردن، حجم و میزان سازی sonicator تاثیر پذیر است. چون تولید دوباره شرایط انرژی صوتی تقریبا غیرممکن است، تنوع سایز در ذرات تولید شده در زمانهای مختلف غیرمعمول نیست. همچنین به دلیل گرد بودن این غشاها، SUV ذاتاً ناپایدار است و خودبخود به شکل وزیکولهای بزرگتر تبدیل می‌شود وقتی در زیر دمای انتقال فازشان نگهداری می‌شوند (شکل ۱۱).

شکل ۱۱. دستگاه صوتی کننده

- اکستروژن (روزن رانی): اکستروژن لیپیدها تکنیکی است که در آن یک سوسپانسیون لیپیدی با فشار از درون یک فیلتر پلی کربنات با سایز منافذ معین عبور داده می‌شود تا ذراتی به قطر منافذ فیلتر مورد استفاده تولید گردد. سوسپانسیون‌های LMV، قبل از مرحله اکستروژن از درون یک فیلتر معین، به دو روش به ذرات کوچکتر تبدیل می‌شوند: یا از طریق فرایندهای متوالی منجمد کردن- انجماد زدائی یا بوسیله پیش فیلتر کردن این سوسپانسیون از

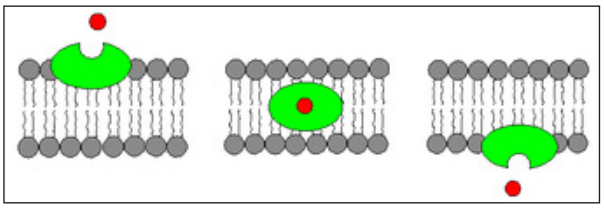
طریق یک فیلتر با منافذ درشت‌تر. این روش از رسوب غشاها جلوگیری کرده و موجب هموژن شدن سایز سوسپانسیون نهائی می‌شود. اکستروژن در دماهای بالای Tc لیپیدها انجام می‌گیرد. عمل اکستروژن زیر دمای Tc ناموفق بوده است زیرا غشاها همراه با غشاهای صلبی که قادر به عبور از منافذ نیستند، تمایل به ترسیب دارند. اکستروژن از طریق فیلترهائی با قطر منافذ ۱۰۰ نانومتر وزیکولهای تک دیواره بزرگ (LUV) با متوسط قطر ۱۴۰-۱۲۰ نانومتر را تولید می‌کنند (شکل ۱۰) [۵].



شکل ۱۰. اکسترودر لیپوزوم استاندارد

۵- تکنیک بار گذاری فعال یا از راه دور

غشای دولایه‌ای لیپیدها در حالت کلی نسبت به یون‌ها و مولکول‌های هیدروفیل بزرگتر نفوذناپذیر است. نقل وانتقال یون‌ها بوسیله یونوفورها (شکل ۱۱) تنظیم می‌گردد در حالیکه نفوذ مولکول‌های طبیعی و هیدروفوب می‌تواند توسط گرادیان غلظت کنترل شود.



شکل ۱۱. عمل یک یونوفور در غشاء

برخی از اسیدها و بازهای ضعیف می‌توانند از غشاء به علت برخی گرادیانهای نفوذپذیری مثل گرادیانهای الکتریکی، یونی (pH) یا پتانسیل شیمیائی عبور کنند. روش‌های زیادی برای بارگذاری بهتر داروها وجود دارد مثل روش‌های بارگذاری فعال که مولکول‌های دارو را با استفاده از گرادیان‌های pH و نیز اختلاف پتانسیل غشای لیپوزوم به داخل آنها وارد می‌کنند. تفاوت غلظت پروتون در طول غشای لیپوزوم‌ها عاملی برای بارگذاری داروهای آمفی فیل است. در حالت کلی روش‌های بار گذاری فعال نسبت به روش‌های بار گذاری غیرفعال دارای فواید زیرند:

- کارائی ذخیره سازی بالا
- نشت کاهش یافته ترکیبات ذخیره شده
- انعطاف پذیری در استفاده از لیپیدهای ساختاری، چون دارو بعد از تهیه حامل، بارگذاری می‌شود.
- اجتناب از بکار بردن ترکیبات بیولوژیکی فعال در طول مراحل تهیه و لذا کاهش خطرات ایمنی.

گرادیان نفوذپذیری pH با استفاده از روش‌های متعددی بسته به طبیعت داروی ذخیره شده می‌تواند بسط پیدا کند. برای بازهای ضعیف آمفی فیل با استفاده از گرادیان پروتون یا گرادیان آمونیوم سولفات و برای اسیدهای ضعیف آمفی فیل با استفاده از گرادیان کلسیم استات.

بازهای ضعیف آمفی فیل در فاز آبی وزیکولهای لیپیدی در پاسخ به اختلاف pH بین داخل و خارج لیپوزوم‌ها تجمع می‌یابند (pHin>pHout). معمولا یک فرایند دو مرحله‌ای این اختلاف pH را بین داخل و خارج لیپوزوم‌ها ایجاد می‌کند.

- ابتدا، وزیکولها در یک محلول با pH پایین تهیه می‌شوند، بنابراین در داخل وزیکولها pH پایینی را تولید می‌کنند.
- سپس یک محلول بازی به محیط بیرونی حفره وزیکولها افزوده می‌شود. ترکیبات بازی دارای گروه‌های آمین در pH بالا لیپوفیل و در pH پایین هیدروفیل هستند. دو محیط آبی موجود در لیپوزوم‌ها که توسط یک غشاء از هم جدا شده‌اند، در هر سمت که pH پایین باشد تراکم غشاء مشاهده می‌شود، بنابراین داروهای بازی پروتونه نشده می‌توانند از طریق غشای دولایه به محیط آبی احاطه شده توسط لیپوزوم‌ها نفوذ کنند. در سمت با pH پایین، اکثر مولکول‌ها پروتونه می‌شوند، از اینرو غلظت داروهای پروتونه نشده کم می‌شود و بدین ترتیب نفوذ مولکول‌های داروهائی بیشتری را به سمت با pH پایین افزایش می‌دهد.

با استفاده از این تکنیک ترکیبات داروئی زیر با موفقیت ذخیره سازی شده‌اند:

- بازهای ضعیفی مثل:
  - دوکسوروبیسین (Doxorubicin) (نوعی آنتی بادی جهت درمان ایدز)
  - آدریامیسین (Adryamycine)
  - وینکریستین (Vincristin)
- پپتیدهای کوتاه و انسولین

٦- سایز و نوع پخش آن

دقیق‌ترین روش برای تعیین سایز لیپوزوم‌ها میکروسکوپ الکترونی است زیرا، قادر به مشاهده لیپوزوم‌های منفرد بوده و اطلاعات جامعی در رابطه با تعداد لیپوزوم‌ها در اختیار می‌گذارد ولی در عین حال بسیار وقت گیر است. در مقام مقایسه روش پراکندگی نوری لیزری در عمل بسیار سریع و آسان است اما اشکال آن اندازه گیری خواص میانگینی از توده لیپوزوم‌ها است. ابزار مورد استفاده در همه‌این روش‌ها بسیار گرانقیمت است. در صورتیکه فقط سایز تقریبی مدنظر باشد، تکنیک کروماتوگرافی ژلی پیشنهاد می‌شود.

روش‌های میکروسکوپی

میکروسکوپ نوری برای بررسی سایز وزیکولهای درشت حاصل از اجتماع آمفی فیلهای زنجیره‌ای مورد استفاده قرار گرفته است. اگر لیپوزوم‌ها گروه‌های هیدروفیلی فلوئورسنت داشته باشند، می‌توان بوسیله میکروسکوپ فلوئورسنت آنها را مورد بررسی قرار داد. به دلیل محدودیت قدرت تشخیص میکروسکوپ نوری نمی توان سایز دقیق لیپوزوم‌ها را از طریق این تکنیک بدست آورد. اما با کاربرد میکروسکوپ الکترونی می‌توان ارزیابی کاملی از پائینترین حد توزیع سایز لیپوزوم‌ها بدست آورد. تکنیک میکروسکوپ الکترونی برای تعیین سایز وزیکولهای درشت (mμ۵) روش مناسبی نیست زیرا توزیع وزیکولها در طول تهیه آنها تخمین قطر ذره ابتدائی را مشکل می‌کند.

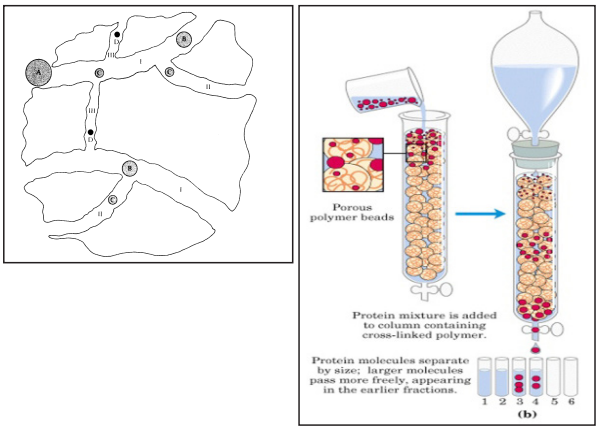
پراکندگی نوری لیزری

انکسار نور پدیده‌ای است که در آن یک پرتو نور تک رنگ بعد از برخورد به

یک ذره، تحت زاویه‌ای خاص انکسار می‌یابد. این انکسار موجب شکستگی نور و تغییر مسیر آن می‌گردد. با استفاده از این تکنیک می‌توان ذراتی بین nm۳ تا µm۳ را سایزبندی کرد.

نفوذ ژلی

کروماتوگرافی نفوذ ژلی روشی مکانیکی برای جداسازی مولکول‌ها بر اساس سایز آنها در محلول است. مولکول‌های کوچک قادر به نفوذ بیشتر در لابلای منافذ هستند و بنابراین به مدت طولانی تری نسبت به مولکول‌های بزرگتر در ستون نگهداشته می‌شوند (شکل ۱۲).



شکل ۱۲. مکانیسم نفوذ ژلی

این نوع کروماتوگرافی با ژلهای با سایز بزرگ برای جدا کردن SUVs از MUVs بکار می‌رود. اما با این وجود، وزیکولهای درشتتر با قطری حدود µm۳ معمولا در این تکنیک کارائی ندارند زیرا در ژل نفوذ کرده و در بالای ستون نگهداشته می‌شوند. کروماتوگرافی لایه نازک با استفاده از دانه‌های آگار به عنوان یک تکنیک راحت و سریع برای ارزیابی کلی سایز لیپوزوم‌ها بکار می‌رود. اما این روش بسیار حساس به انسداد فیزیکی منافذ ژل آگار است.

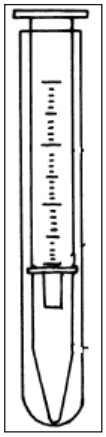
بار سطحی

تکنیک جریان آزاد الکتروفورز برای تعیین بار سطحی MUVs بکار می‌رود. این تکنیک وزیکولها را براساس بار سطحی آنها از طریق الکتروفورز بر روی یک صفحه سلولزی در بافر سدیم بورات با pH =۸/۸ از یکدیگر جدا می‌کند. لیپوزوم‌ها با قطری در حدود µm۲ و لیپیدهای باردار با غلظت کم در حدود ۲ درصد مولی در ساختار لیپوزوم‌های دولایه می‌توانند با این تکنیک مورد سنجش قرار گیرند.

درصد مواد محلول ذخیره شده

قبل از اینکه بخواهیم اثرات این مواد را در سیستمهای بیولوژیکی یا فیزیکی مورد مطالعه قرار دهیم، اندازه گیری مقدار موادی که در حفره درونی لیپوزوم‌ها به دام می‌افتند بسیار ضروری است زیرا اثراتی که بطور تجربی مشاهده می‌شوند به دز مصرفی مربوط است. به منظور انجام تستهای پایداری و نیز ابداع فرمولاسیون‌های جدید لیپوزوم‌ها و روش‌های نوین تهیه لیپوزوم‌ها، لزوم توسعه تکنیکهای جداسازی مواد به دام افتاده در حفره درونی لیپوزوم‌ها و مواد آزاد امری ضروری بنظر میرسد. در حالت کلی امروزه دو روش برای این منظور بکار می‌رود:

– **سانتریفوژ ریزستونی** (centrifugation column Mini): در این روش مقداری ژل هیدراته (۵۰-G sephandex) در تیوب یک سرنگ ml۱ بدون پیستون پر می‌شود که بوسیله تکه‌ای از کاغذ صافی (wattman) بسته می‌شود. این تیوب سرنگی در داخل یک تیوب سانتریفوژ قرار داده می‌شود (شکل ۱۳) و به مدت ۳ دقیقه در دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ می‌شوند تا اضافی محلول نمک از آن بیرون رود. بعد از سانتریفوژ ستون ژلی خشک شده و محلول نمک از تیوب سرنگی خارج می‌شود. سوسپانسیون لیپوزوم‌ها در بالای ستون قطره قطره قرار داده می‌شود و ستون به مدت ۳ دقیقه در دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ می‌شوند.



شکل ۱۳. تیوب سانتریفوژ

حجم درونی لیپوزوم‌ها

حجم درونی لیپوزوم‌ها از طریق اندازه گیری مقدار کل مواد حل شده به دام افتاده در حفره درونی لیپوزوم‌ها بدست میاید و این اندازه گیری به ما این اطمینان را می‌دهد که غلظت مواد حل شده در محیط آبی حفره درونی لیپوزوم‌ها مشابه محلول آغازی است و دیگر اینکه هیچ ماده حل شده‌ای از لیپوزوم‌ها به بیرون تراوش نکرده است. اما با وجود این در بعضی موارد چنین فرضیه‌ای بی اعتبار است. برای مثال، در روش‌های تهیه دوفازی، در مرحله خشک کردن، آب موجود در حفره درونی لیپوزوم‌ها از دست می‌رود و یا اینکه در نتیجه اختلاف فشارهای اسمزی آب می‌تواند به داخل یا خارج لیپوزوم‌ها نفوذ کند. بهترین روش برای اندازه گیری حجم، اندازه گیری مقدار آب بطور مستقیم است، و این عمل از طریق جایگزین کردن مایع درونی لیپوزوم‌ها با سیالی که از نظر طیف سنجی فعال نیست و سپس اندازه گیری سیگنال آب مثلا به کمک NMR امکان پذیر است. در این روش، لیپوزوم‌های تهیه شده در محلول آبی دارای آب معمولی در قدرت بالائی سانتریفوژ می‌شوند (۶ ساعت با دور ۲۰۰/۰۰۰) تا یک گوی سفتی بدهد. سپس این گوی سفت در D2O معلق می‌شود. نفوذپذیری غشا مشابه H2O است. ارتفاع پیک در بررسیهای NMR که مربوط به غلظت است با مقایسه استانداردهای حاوی مقادیر مشخصی از H2O یا D2O هستند تعیین می‌گردد.

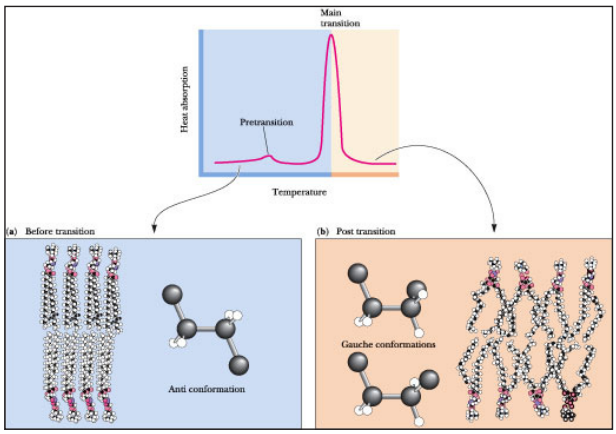
چند لایه‌ای بودن

تعداد متوسط دولایه‌های موجود در لیپوزوم‌ها به کمک میکروسکوپ الکترونی انکسار انجمادی و 31P-NMR تعیین می‌شود. امروزه‌این تکنیک برای مطالعه جزئیات ساختاری توزیع لیپیدها در محیط آبی بسیار پرطرفدار است.

در روش اخیر سیگنالها قبل و بعد از افزایش معرف پهن کننده مانند یون‌های منگنز که با لایه بیرونی خارجی ترین دولایه برهمکنش می‌دهد ثبت می‌گردد. بنابراین کاهش ۵۰٪ در سیگنالهای NMR نشان می‌دهد که لیپوزوم‌ها تک لایه‌ای هستند و کاهش ۲۵٪ در شدت سیگنال NMR اصلی به معنی وجود ۲ دولایه در لیپوزوم‌هاست.

نوع فاز لیپوزوم‌ها

یکی از ویژگیهای مهم غشاهای لیپیدی وجود یک انتقال فاز برگشت پذیر وابسته به دما است که در آن زنجیرهای هیدروکربنی فسفولیپیدها متحمل تغییرشکل از یک حالت منظم (ژل) به یک حالت سیال نامنظم (کریستال مایع) می‌شوند. این تغییرات توسط میکروسکوپ الکترونی انکسار انجمادی ثابت شده‌اند ولی به آسانی توسط تکنیک کالریمتری پویشی تفاضلی (DSC) مورد مطالعه قرار میگیرند. حالت فیزیکی غشاهای دولایه‌ای بطور عمیقی بر نفوذپذیری، سرعت تراوش و پایداری لیپوزوم‌ها تاثیر می‌گذارد. دمای انتقال فاز (TC) تابعی از حجم فسفولیپیدهاست. TC نشاندهنده میزان پایداری لیپوزوم‌ها، نفوذپذیری آنها و اینکه آیا دارو در غشاهای دولایه‌ای یا در محیط آبی بدام افتاده است (شکل ۱۴).

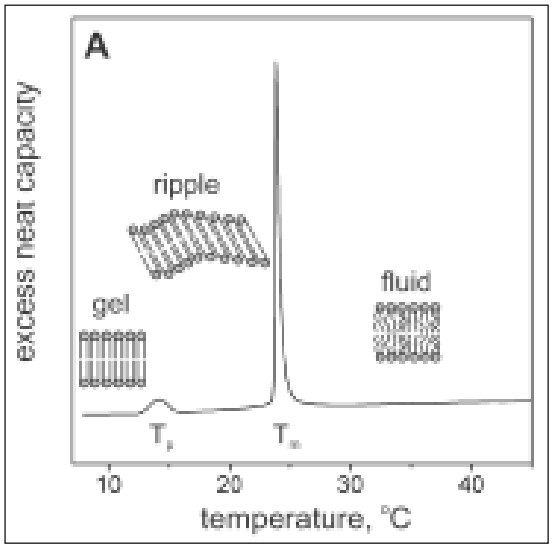


شکل ۱۴. حالت کریستالی و کریستال مایع غشای لیپیدی

۸- خواص فیزیکی لیپوزوم‌ها

انتقالات فازی در لیپیدهای دولایه‌ای

از نقطه نظر فیزیکی، اجزای اصلی غشای سلولی یعنی لیپیدهای دولایه‌ای به صورت ترکیبی از رفتار کریستال مایع بر اساس دما (انتقالات ترموتروپیک) و بر اساس غلظت لیپیدها (انتقالات لیوتروپیک) توصیف شوند. انتقالات فازی لیپیدها بطور گسترده‌ای بوسیله تکنیکهای متعددی مثل کالریمتری پویشی تفاضلی (DSC)، ray-X، میکروسکوپ الکترونی، رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (NMR)، زیرقرمز و طیف سنجی فلوئورسانس مورد مطالعه قرار گرفته است. یک فرایند انتقال فاز همراه است با یک تغییر در آنتالپی، چون نوآرائی مولکول‌ها به انرژی نیاز دارد به همین دلیل بصورت یک پیک در نمودار اسکن گرمائی DSC مشاهده می‌شود. برای مثال در نمودار DSC لیپوزوم‌های دارای دیمریستویل فسفاتیدیل کولین (DMPC) دو اندوترمیک پیک وجود دارد (۱۴TP°C= و Tm =۲۴°C) که بترتیب مربوط به انتقال از حالت فیزیکی ژل منظم به ژل موجدار و از حالت ژل موجدار به فاز کریستال مایع هستند (شکل ۱۵). دمای انتقال فاز دمایی است که منجر به تحریک تغییر در حالت فیزیکی لیپیدهای دولایه‌ای می‌گردد بطوریکه از یک فاز منظم ژله‌ای شکل، که در آن زنجیرهای هیدروکربنی در کنار هم با نظم خاصی آرایش پیدا کرده‌اند، به فاز کریستال مایع، که در آن زنجیرهای هیدروکربنی بصورت نامنظم قرار گرفته و از اینرو به فرم سیال تغییر حالت داده‌اند انتقال می‌یابند.

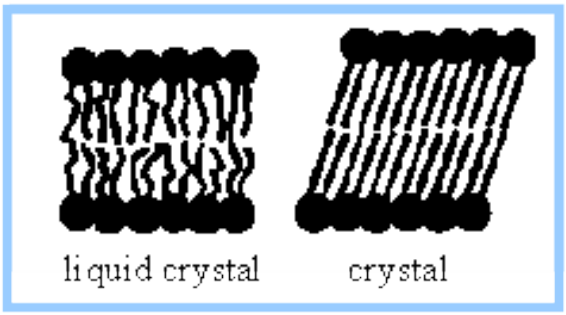


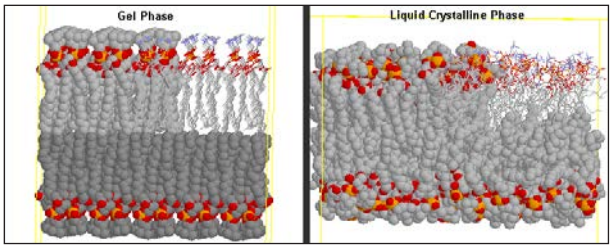
شکل ۱۵. نمودار DSC لیپوزوم‌های دارای DMPC

انتقال از ژل به حالت سیال، یعنی انتقال اصلی، بر روی خواص و ساختار لیپیدهای دولایه‌ای در سه سطح سیستم مولکولی تاثیر می‌گذارد (i) زنجیرهای آسیل لیپیدها (ii) مولکول‌های منفرد لیپیدها (iii) اجتماعات مولکول‌های لیپیدها. در Tm زنجیرهای آسیل لیپیدها ذوب می‌شوند، یعنی پیکربندی آنها از حالت صلب، راست و مستقیم ترانس مربوط به فاز ژل به حالت انعطاف پذیرتر با پیکربندی گوچ مربوط به فاز کریستال مایع تغییر می‌کند. آزادی تحرک زنجیرهای آسیل می‌توانند به صورت گسترش سطح مقطع عرضی و تا حدی، افزایش در حجم اشغال شده توسط زنجیرهای آسیل که همراه است با نازک شدن ضخامت غشاء مشاهده شوند. مساحت پیک انتقال در نمودارDSC با افزایش طول زنجیراسید چرب افزایش می‌یابد، در حالیکه وارد کردن پیوندهای دوگانه سیس زنجیرهای آسیل اثر برعکس دارد. بعلاوه، پراکندگی مولکول‌های منفرد لیپیدها، شامل حرکات جانبی در صفحه دولایه، چرخش حول محورمولکول بالای دمای Tm افزایش می‌یابند. نهایتا، لیپیدهای دولایه‌ای در حالت سیالی الاستیکی تر از حالت ژله‌ای هستند.

فاکتورهای متعددی وجود دارند که بطور مستقیم بر دمای انتقال فاز تاثیر می‌گذارند مثل طول زنجیرهای هیدروکربنی، غیراشباعی زنجیرهای هیدروکربنی، بار و نوع گروه‌های انتهائی فسفولیپیدی. وقتی طول زنجیرهای هیدروکربنی افزایش می‌یابند، برهمکنش‌های واندروالسی قویتر می‌شوند و بدین ترتیب به انرژی بیشتری برای از بین بردن آرایش منظم آنها مورد نیاز است، لذا دمای انتقال فاز افزایش می‌یابد. همچنین، وجود پیوند دوگانه سیس در گروه آسیل یک گره در زنجیر هیدروکربنی ایجاد می‌کند که به دمای خیلی پایینی برای بدست آوردن یک آرایش منظم نیاز دارد. نقطه میانی انتقالات فازی، نقطه ذوب یا Tm نامیده می‌شود. لیپوزوم‌ها در فاز کریستال مایع سیال تر و تحرک پذیرتر و از اینرو نفوذپذیرتر می‌شوند. لازم به ذکر است که لیپوزوم‌ها براحتی متحمل انتقالات فازی شده بدون اینکه تخریب

شوند، مثل تبدیل یخ به آب مایع. لیپوزوم‌های ساخته شده از فسفولیپیدهای مختلف Tmهای متفاوتی دارند. لیپوزوم‌های ساخته شده از فسفولیپیدهای با گروه‌های انتهائی فسفولیپیدی بزرگتر Tm پایینتری دارند زیرا پایداری کمتری دارند. وقتیکه غشاء در پایینتر از دمای Tm قرار دارد، حالت فیزیکی ژل دارد نه حالت کریستال مایع (شکل ۱۶).



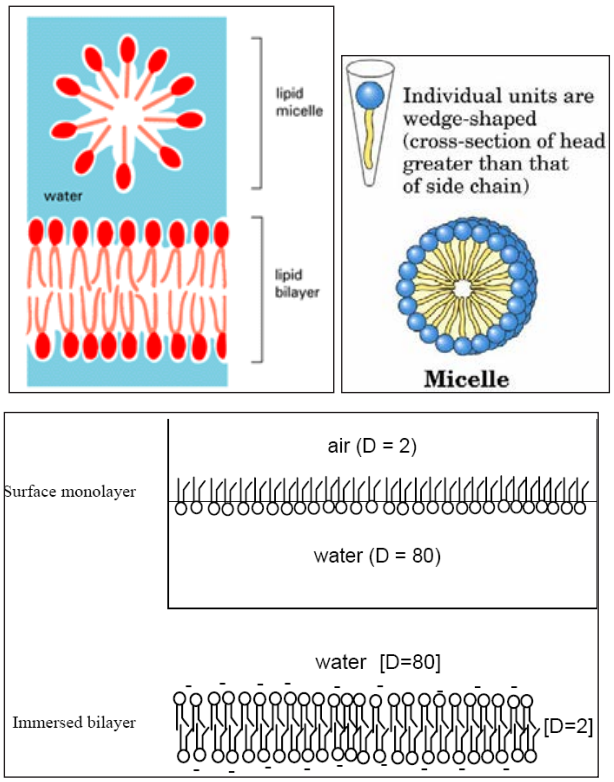


شکل ۱۶. انتقالات فازی در غشاء

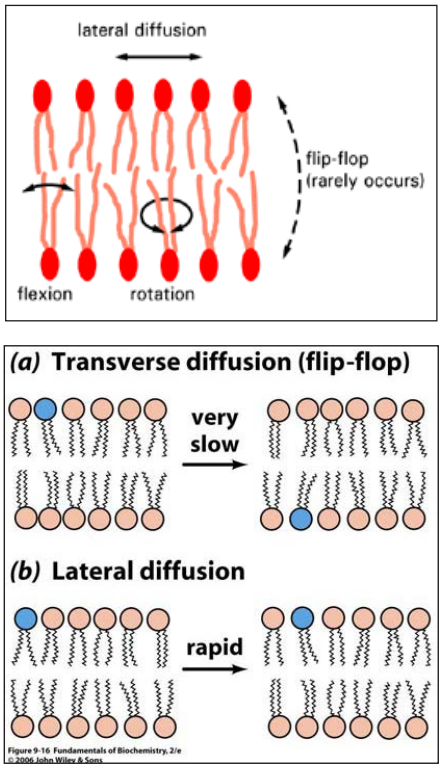
ساختار استروئیدی مولکول کلسترول تا حدی هم صلب و هم نرم است و تمایل به پیکربندی منظم شبیه ژل دارد اما شکل مولکول کلسترول از دیگر لیپیدهای موجود درغشاء متفاوت است بنابراین مانع از نظم زنجیرهای آسیل در کنار هم می‌گردد و از اینرو موجب افزایش آزادی تحرک آنها گشته و بدین ترتیب سیالیت و نفوذپذیری غشاء افزایش می‌یابد. از طرف دیگر برای جایگیری بهتر در بین لیپیدهای دولایه‌ای، مولکول کلسترول تشکیل فاز مابین فازهای ژل و کریستال مایع یعنی فاز ژل موجدار را تحریک می‌کند. از این گذشته، جایگیری کلسترول در لابلای غشای فسفولیپیدی ضخامت آن را افزایش و الاستیسیته و نفوذپذیری آنرا کاهش می‌دهد. در دماهای بالاتر از Tm، حلقه صلب کلسترول آزادی تحرک و آزادی چرخش زنجیرهای آسیل را کاهش داده و از اینرو تعداد زنجیرها در پیکربندی گوچ کمتر شده و این امر موجب کاهش سیالیت و نفوذپذیری غشاء می‌شود زیرا انتقالات فازی مشاهده شده در لیپوزومها به علت تغییرات پیکربندی در زنجیرهای آسیل وقتی پیکربندی زنجیرهای آسیل از ترانس به گوچ تغییر می‌کند و به مثابه آن تغییرات در طرز قرارگیری آنها در کنار هم است.

لیپیدهای دو لایه‌ای در فاز کریستال مایع می‌توانند بصورت فاز سمکتیک A (SmA) مشاهده شوند که در این حالت دارای تقارن C_{∞} است و لذا باید پیزوالکتریک باشد یا می‌توانند بصورت فاز سمکتیک C (SmC) مشاهده شوند که دارای تقارن C_2 است.

جدائی فازی در غشاهای تشکیل شده از مخلوط لیپیدها در لیپوزوم‌های تک لایه و چند لایه با میکروسکوپ فلوئورسانس و نیز با میکروسکوپ نیروی اتمی مشاهده شده است. نیروی محرکه برای این جدائی‌ها شامل دهیراسیون غشاء، برهمکنش‌های الکترواستاتیکی با ماکرومولکول‌ها، و عدم تطابق نیروهای هیدروفوبی بین لیپید- لیپید و بین لیپید- پروتئین است.



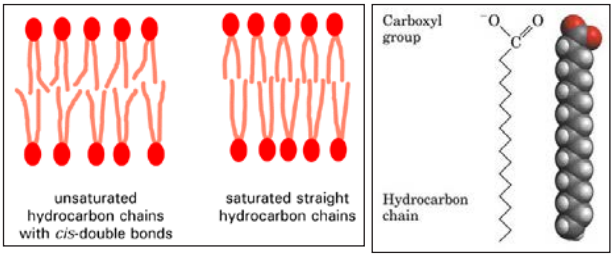
شکل ۱۷.یک لییید میسل شکل و یک لییید دولایه‌ای

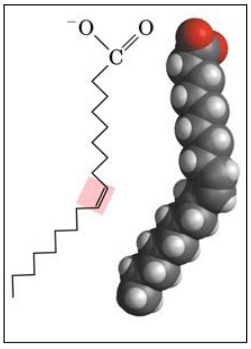


شکل ۱۸. انواع توزیع مولکول‌های فسفولیپید

پیوندهای دوگانه در ساختار مولکول‌های فسفولیپید مانع از فشردگی زنجیرها علاوه بر انتقالات فازی در ساختار لایه‌ای، لیپیدها انتقالات متعددی بین

مزوفازهای غیرلایه‌ای را نیز متحمل می‌شوند. این انتقالات به اشکال موثر مولکول‌های لیپیدی مربوط می‌شود که منجر به فشردگی لیپیدها را در ساختارهای مختلف می‌شود و می‌تواند با تغییر دما، هیدراتاسیون گروه فسفولیپیدی انتهائی یا قدرت یونی مایع اطراف آنها تحریک شود. فازهای سه بعدی متفاوتی در غشاهای بیولوژیکی وجود دارند. برای مثال مزوفاز مکعبی در برخی از غشاهای بیولوژیکی مثل غشای داخلی میتوکندری، در بافت پیوندی و نیز در غشای پلاسما تشکیل می‌شود [۶].

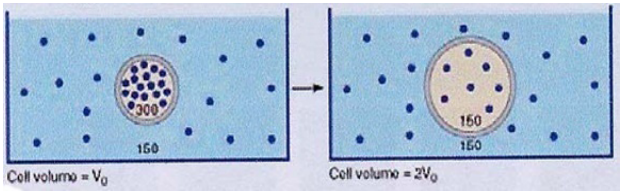




شکل ۱۹. مولکول‌های فسفولیپید اشباع و غیر اشباع

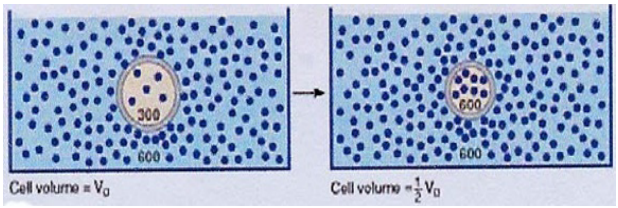
اثر فشار اسمزی

در یک محلول هیپوتونیک لیپوزوم‌ها متورم شده و نفوذپذیرتر می‌شوند و حتی ممکن است بترکند. (شکل ۲۰).



شکل ۲۰. لیپوزوم‌ها در محلول هیپوتونیک

در یک محلول هیپرتونیک لیپوزوم‌ها چین می‌خورند و نفوذپذیری آنها کاهش می‌یابد (شکل ۲۱).



شکل ۲۱. لیپوزوم‌ها در محلول هیپرتونیک

دینامیک لیپوزوم‌ها

مولکول‌های لیپیدی دو ساختار در آب تشکیل می‌دهند. شکل مولکول‌های لیپیدی نوع این ساختارها را معین می‌کنند. مولکول‌های لیپیدی گوه‌ای، میسلها و مولکول‌های لیپیدی استوانه‌ای ساختار دولایه‌ای را تشکیل می‌دهند. نیروی محرکه تجمع فسفولیپیدها نیروهای هیدروفوبی است [۹۰-۸۹]. (شکل ۱۷).

توزیع مولکول‌های فسفولیپید در یک ساختار دولایه‌ای شامل توزیع جانبی، متقاطع، چرخشی و خمشی است (شکل ۲۲). حرکات جانبی سریع (میکرون در هر ثانیه)، توزیع متقاطع کند است. همه حرکات دینامیکی (و نفوذپذیری) قویا به‌این بستگی دارد که آیا زنجیرها فریز می‌شوند یا ذوب می‌گردند. در کنار هم می‌شوند و بنابراین فریز شدن این مولکول‌ها را مشکل می‌کند. یک غیر اشباعی در مرکز اسیدهای چرب، دمای انتقال لیپیدهای دولایه‌ای را به علت افزایش حجم توده‌ای کاهش می‌دهد (شکل ۱۹).

منابع:

:

1. Lasic D. Stealed liposomes. In: Benita S, editor. J Microencapsulation methods and applications. 1996; 298-328.
2. McGraw-Hill Encyclopedia of Science and Technology, 5th edition, published by The McGraw-Hill Companies.
3. Principles of biochemistry: general aspects. In: Smith EL, Hill RL, Lehaman IR, Lefkowitz RJ, Handle P, White A, editors. 7th ed. McGraw-Hill International Editions. 1993; chapter 13.
4. Nakaya T, Jun LI Y. Pospholipid polymers. J prog polym sci. 1999; 24: 143-181.
5. Danilo D. Lasic. ‚Liposomes in Gene Delivery‘. Published by CRC Press LLC. 1997.
6. de Vries, A.H., Yefimov, S., Mark, A.E., and Marrink, S.J. Molecular structure of the lecithin ripple phase. Proc. Natl. Acad. Sci. 2005; 102: 5392-96.
7. Jamil H, Sheikh S and Ahmad I. Liposomes: the next generation. Modern Drug Discovery. 2004; 37.
8. Prof. Fletcher’s lectures on “Organised Surfactant Systems” as part of Module 06547 Advanced Topics in Nanotechnology. Timetable for 2005-6 session, semester 2.