

Dipalmitoyl Phosphatidyl Choline의 Vesicle에서 Polyphenol Derivatives와 Hematoxylin-Eosin Stain에 의한 Metachromasy 반응에 관한 연구

김기준[†] · 성완모 · 김주한 · 윤성현

대진대학교 공과대학 화학공학과
(2019년 1월 25일 접수; 2019년 3월 12일 수정; 2019년 3월 19일 채택)

A Study on Reaction of Metachromasy by means of Polyphenol Derivatives and Hematoxylin-Eosin in Vesicle of Dipalmitoyl Phosphatidyl Choline

Kim Ki-Jun[†] · Sung Wanmo · Kim Joochan · Yoon Sunghyun

*Dept. of Chemical Engineering, Dae-jin University Pocheon 487-711, Korea
(Received January 25, 2019; Revised March 12, 2019; Accepted March 19, 2019)*

요약 : Dipalmitoyl phosphatidyl choline(DPPC), Polyphenol 유도체, 그리고 Hematoxylin-Eosin은 5분 동안 산성 상태에서 직접 초음파 처리하여 명확한 표준용액을 제공했다. 25 °C에서 DPPC 계의 레시틴소포에서 폴리페놀유도체의 흡수특성은 흡수분광학에 의해 분석하였다. 레시틴소포에서 단량체와 이량체 사이의 폴리페놀유도체의 평형은 폴리페놀유도체의 저농도에서 존재했지만 올리고머는 레시틴소포의 고농도에서 소포안에 형성되었다. 폴리페놀유도체의 일정한 농도에 Bacteriorhodopsin(BR)을 첨가함으로써 DPPC의 상전이동안 폴리페놀유도체의 흡수비율(α/β)이 감소되었다. 기둥이 있는 곳에 라멜라소포와 uni- and multilamella 응집체의 혼합물이 존재한다. 용출된 기둥과 혼합물사이의 속도 차이가 관찰되었으므로 기둥 용출된 라멜라반응 보다 촉매 효과를 나타냈다. DPPC 및 폴리페놀유도체에 대한 가수분해의 상전이 온도는 DPPC 및 폴리페놀유도체 보다 높게 측정되었다.

주제어 : 폴리페놀 유도체, 소포, 레시틴, DPPC, 상전이

Abstract : Dipalmitoyl phosphatidyl choline(DPPC), Polyphenol Derivatives, and Hematoxylin-Eosin were directly sonicated in acidic condition for 6 minutes to give clear stock solutions. Absorbtion properties of Polyphenol Derivatives in lecithin vesicle of Dipalmitoyl phosphatidyl choline system at 25°C have been studied by absorbtion spectroscopy. The equilibrium of Polyphenol Derivatives between monomer and dimer in lecithin vesicles have been existed at low

[†]Corresponding author
(E-mail: kjkim@daejin.ac.kr)

concentration of Polyphenol Derivatives, but oligomer has been formed in vesicle at high concentration of lecithin vesicles. By adding Bacteriorhodopsin(BR) to constant concentration of Polyphenol Derivatives decreased the absorbtion ratio(α/β) of Polyphenol Derivatives was increased during phase transition of dipalmitoyl phosphatidyl choline. In the presence of column eluted lamella vesicle and mixture of uni- and multilamella aggregates. The differences of rate between column eluted- and mixture were observed, therefore column eluted lamella reaction was represented more catalytic effect. The phase transition temperature of hydrolysis on Dipalmitoyl phosphatidyl choline and Polyphenol Derivatives were measured higher than it of Dipalmitoyl phosphatidyl choline and no Polyphenol Derivatives.

Keywords : Polyphenol Derivatives, vesicle, lecithin, DPPC, phase transition

1. 서론

인지질(phospholipid)은 생체막의 중요한 구성 성분으로서 그 생물학적인 특성이 많이 보고되어 있으며[1-4], 이들 여러 특성 중에 두개의 긴 알킬사슬의 길이와 불포화도에 따른 물리적인 현상을 연구해 왔다[5,6]. 또한 천연인지질과 유사한 합성인지질의 이중층막(bilayer membrane)에 대한 연구가 보고되었으며, 더욱이 3중 알킬사슬을 함유한 암모늄염들도 이중층막을 형성한다는 보고가 되었다[7-9]. 메타크로마지(Metachromasy)란 원래 질병 기타 영향으로 모발, 깃털, 피하 등이 그 본래의 색소가 변화하는 현상으로 생물학적 의미를 갖는 말이다. 예를 들면 연령에 따라 모발이 백발로 변하는 것, 발정기에서의 수컷 새들의 깃털에 대한 색깔의 변화, 당뇨병 등의 질병 검역시에 소변색의 변화 등을 들 수 있다. 이외에 조직 내지 세포 화학에서 사용되는 메타크로마지는 일반적으로 표본 절편의 특정 부분이 색소 본래의 용액 중의 색과 다른 색으로 염색되는 현상에 대해 붙여진 것이다. 예를 들면 염기성 색소 중에서 티아진(thiazine)은 뇌의 신진대사에 효과를 나타내는 아미노산으로 편안한 수면을 유도하고 스트레스 해소에 도움을 주는 물질로 도파민과 신경전달 물질 세로토닌에 영향을 주어 뇌에 활성화를 측정하는 효과뿐만 아니라 임상실 결과 심혈관과 종양예방에 도움이 크다고 밝혀졌다. 만성류마티스 관절염, 변형성 척추증의 검사에 사용되는 염료인 옥사진(oxazine)에 함유된 색소, 즉 티오닌(thionine)과 톨루이딘 블루(toluidine blue)는 리보핵산 염색에 사용되는 염기성 색소로 신경세포의 원형질 중에 존재하는 니슬소체(Nissl

body) 염색에 사용되며, 살균제, 항해파린제 뿐만 아니라 면역형광 분석으로 자궁악성종양과 양성 종양을 구별할 수 있는 시약이다. 크레실 바이올렛(cresyl violet)은 신경 세포원의 형태와 배열에 의해 신경핵과 피질의 각 부분을 분류하는 세포 구조학적 조직분자의 색조가 색소 농도에 따라 변화한다. 일반적으로 색소 농도가 낮을 때는 장파장(녹~청), 농도가 높으면 단파장(적자색) 쪽으로 벗어난다. 이와 같은 변화는 헤파린(heparine)은 D-글루코사민과 D-글루쿠론산이 α -1,4의 결합으로 교대로 사슬 모양을 이루며, 황산이 글루코사민의 N과 6위치 및 1개 걸러 글루쿠론산의 2위치에 결합하고 혈액응고방지-혈전방지에 사용된다.

콘드로이틴 황산(chondroitin sulfate)은 연골이나 동물의 결합조직에 분포하는 다당의 일종이다. 약알칼리, 프로테이스로 가용성이 된다. 조직에서는 단백질과 결합하고 유리의 형태로 존재하는 일은 없으며, 콜라겐과 함께 세포간 매트릭스의 주성분이 되고 있다. 또한 히알루론산(hyaluronic acid)은 아미노산과 우론산으로 이루어지는 복잡한 다당류의 하나로, N-아세틸글루코사민과 글루쿠론산으로 이루어진 고분자 화합물로서 눈의 초자체(vitreous body)나 탯줄 등에 존재하는데, 세균의 침입이나 독물의 침투를 막는 역할을 한다. N-아세틸글루코사민(N-Acetylglucosamine)과 글루쿠론산(Glucuronic acid)이 교대로 사슬 모양으로 결합한 분자량이 20만~40만 되는 고분자 화합물이며, 눈의 세포나 탯줄 등에 존재하며, 점성이 크고 세균의 침입이나 독성물의 침투를 막는 데 중요하다.

이와 같은 변화의 원인은 단일 색소의 변화에

대해 종래 알려져 있는 pH에 의한 변화와는 다르며, 색소 이온의 회합으로 또는 결합하는 고분자 전해질 이온의 영향으로 색소 이온의 전자 상태의 변화에 따른 것이라 생각하고 있다. 세포 화학에서는 조직 절편을 이들의 색소 용액에 붙여 메타크로마지로부터 산성 고분자, 특히 다당당의 정성에 쓰이고 있다. 핵산도 메타크로마지를 일으키지만 다당산에 비해 색조의 변화는 현저하지 않다.

Polyphenol Derivatives는 방향족 탄화수소의 수소가 수산기로 치환된 화합물의 유도체로서 폴리페놀은 탄닌(tannin)이라고도 불려 식물계에 폭넓게 분포되어 있다. 기능성 식품 첨가물로서 카테킨(catechin)이 산화방지제로서 활용되고 있으며, 녹차에 함유된 폴리페놀 외에 포도 씨, 사과, 카카오, 차조기의 열매 등에서 얻을 수 있는 폴리페놀 유도체라고 불리는 감탄닌(persimmon tannin)이 항산화제 또는 함유제로서 널리 알려져 있다. 식물에 포함된 폴리페놀 유도체는 차카테킨이라고도 하며 그 결정은 침상으로 백색에서 담황색을 나타내기도 한다. 그 맛은 쓴 맛을 지니며, 홍차나 우롱차와 같은 발효를 수반하는 차의 경우 발효과정에서 카테킨이 산화반응하여 폴리페놀 유도체가 형성된다. 이는 치석을 예방하고 충치 및 심장발작을 억제하는 효과가 있다고 발표되었다.

본 연구에서는 인지질로서 dipalmitoyl phosphatidyl choline(DPPC)를 사용하고 사슬길이 같은 Polyphenol Derivatives로 이루어진 이중층막(vesicle)을 초음파 처리법으로 제조하였고, sepharose-4B로 충전된 컬럼을 통과시켜 용리된 single unilamellar vesicle을 분리하였다. 이때 염기 촉매에 의한 Polyphenol Derivatives의 흡광분광 분석에 의해 DPPC 속에서 BR이 재구성(incorporation)된 시료의 흡광도가 농도에 따른 효과와 DPPC 속에서 BR이 재구성(incorporation)된 시료 + Polyphenol derivatives의 흡광도가 농도에 따른 효과에 따른 변화를 비교 실험하였다.

니슬염색(Nissl Stain) 염기성아닐린염료(basic aniline dye; 타이오닌 thionine, 메틸렌 블루 methylene blue, 톨루이딘 블루 toluidine blue, 크레실 바이올렛 cresyl violet 등)로 신경조직을 염색하는 방법으로 신경조직을 염색하는 가장 기본적인 방법이다. 니슬염색에서는 Hematoxylin-Eosin 염색에서 관찰되는 모든 구조 외에 신경세

포체의 니슬소체가 뚜렷하게 관찰된다. 신경원의 형태와 배열에 의해 신경핵과 피질의 각 부분을 분류하는 세포구조학적 연구(cytoarchitectonic study)는 니슬염색을 기본으로 한다. 본 연구에서 유기용매 초음파법으로 제조한 vesicles 용액하에서 Polyphenol Derivatives과 Hematoxylin-Eosin 혼합으로 인한 작용효과로서 metachromasy를 고찰함으로 조직세포의 염색과 변이된 세포의 상호작용 등을 생체막에서의 유기색소 분자의 기능과 물리화학적 영향분석 등을 분광학적 특성을 측정하여 확인하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

Polyphenol Derivatives와 DPPC는 Sigma사 제품을 사용했으며, HCl과 sodium borax, 그리고 신경조직 수초를 염색하는 Hematoxylin eosin stain은 Wako 사의 GR급을, sepharose-4B는 Sigma사 제품을 사용했다. 모든 수용액은 이차증류수를 사용하여 제조하였다. 흡광도의 측정은 Pye-Unicam사의 uv-visible spectrophotometer를 사용하였고, pH meter는 Orion사의 제품을 사용하였다. 초음파 처리는 태금초음파사의 40 KHz ultrasonicator를 사용하였고, 초원심분리기는 Shimatzu 사의 ultracentrifuger를 사용하였다.

2.2. Vesicle의 합성 및 반응속도 측정

pH=2.32의 Sodium borax-HCl 완충용액에 2×10^{-2} M DPPC와 2×10^{-3} M Polyphenol Derivatives용액 5 ml을 vial에 채취해 5 °C 이하의 항온상태에서 5분간 초음파 처리하여 vesicle을 제조하였다. 이 투명한 용액 2 ml을 직경 1.5 cm 길이 25cm인 sepharose-4B로 채운 컬럼에 분당 0.6 ml의 속도로 용출시켰다. Bacteriorhodopsin (BR)은 플라스크에 배지용액 1000 ml(NaCl 250g, MgSO₄ 20g, KCl 2g, CaCl₂ 0.2g, bacto-peptone 10g, MnSO₄ 3mg, FeCl₂ 23 mg, ZnSO₄ 4.4 mg, CuSO₄ 50mg)을 넣고 100~150rpm으로 배양하였다. 배양온도는 40°C로 항온시키면서 4일간 배양하였다. 그 후에 이 배양액을 100,000g에서 원심분리한 침전물을 기본 염용액에 용해시킨 후, D-nase 5 mg을 넣고 0.1 mole NaCl 용액에서 24시간 투석하였다. 이때 세포가 파괴된 적색 용균물을 40,000g에서 40

분간 원심분리하여 붉은 자주색의 BR을 얻었다. 분리한 보관용액을 완충액으로 희석시킨 다음, 희석된 시료 2ml을 quartz cell에 취해 항온으로 유지시킨 후 진한 NaOH용액을 micro-syringe로 주입하여 가수분해물인 phenolate ion을 400 nm에서 흡광도의 증가량으로 반응속도를 측정하였다. Pseudo-first order rate constant(k_0)는 시간(t)에 대한 $\ln(A_\infty - A_t)$ 를 도식해 기울기로서 구했다. Vesicles 속에서 Polyphenol Derivatives과 Hematoxylin-Eosin을 초음파 처리하여 meta-chromasy를 분광학적으로 측정하여 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

DPPC속에 BR(mole ratio 10:1)이 내재된 시료 속에서 polyphenol derivatives과 Hematoxylin-Eosin을 초음파 처리하여 재배열된 상태에서 시료에서 metachromasy 현상을 명확히 규명하고자 연구하여 실험하였다[12]. 아미노산이 polypeptide 결합을 형성한 BR의 분자는 30개 정도의 아미노산 사슬구조로 구성된 α -helix구조가 막대모양

으로 지질막에 수직으로 배열되었다[13].

Fig. 1은 vesicle의 농도 2.70×10^{-5} M의 표준용액에 농도를 첨가함에 따라 흡광도를 측정하였으며(682 nm), vesicles + BR을 첨가한 후에 초음파 처리하여 분광분석한 결과 vesicle의 농도가 커짐에 따라 흡광도가 증가하였으며, BR이 부차적으로 첨가됨에 따라 단파장 이동으로 피크(536 nm)가 크게 나타났다.

DPPC, DPPC + BR, DPPC + Polyphenol Derivatives + Hematoxylin-Eosin의 시료를 초음파처리하여 재배열된 상태에서 흡광도를 측정하여 나타난 스펙트럼 변화는 Fig. 2와 같다.

Polyphenol Derivatives and Hematoxylin-Eosin(H-E)가 재배열된 DPPC-BR, 시료의 최대 흡수 파장은 273 nm이었고, 생성물의 최대흡수 파장은 667 nm로 나타났으며, Hematoxylin-Eosin(H-E)가 흡광세기가 1.9로 가장 크게 나타났다.

Table 1에서 25°C에서 시간에 따른 Polyphenol Derivatives(PPD)-DPPC와 Hematoxylin-Eosin(H-E)-DPPC의 가수분해를 측정한 표현하였다.

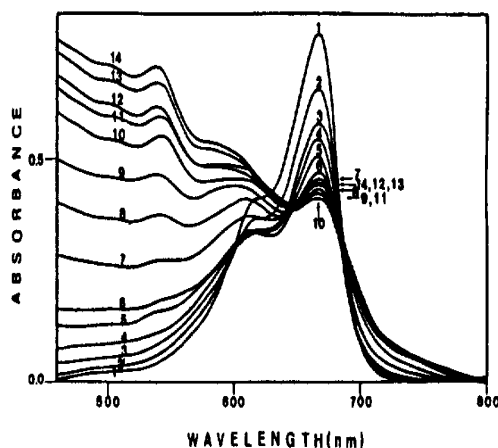


Fig. 1. Absorbance spectra of DPPC and BR at pH = 7.2.

- 1) 2.70×10^{-5} M DPPC, 2) 2.75×10^{-5} M DPPC, 3) 2.80×10^{-5} M vesicle, 4) 2.85×10^{-5} M vesicle, 5) 2.90×10^{-5} M vesicle, 6) 2.95×10^{-5} M vesicle, 7) 3.00×10^{-5} M vesicle, 8) 3.00×10^{-5} M vesicle + 1.20×10^{-5} M BR, 9) 3.00×10^{-5} M vesicle + 1.20×10^{-5} M BR, 10) 3.00×10^{-5} M vesicle + 1.20×10^{-5} M BR, 11) 3.00×10^{-5} M vesicle + 1.20×10^{-5} M BR, 12) 3.00×10^{-5} M vesicle + 1.20×10^{-5} M BR, 13) 3.00×10^{-5} M vesicle + 1.20×10^{-5} M BR, 14) 3.00×10^{-5} M DPPC + 1.20×10^{-6} M BR.

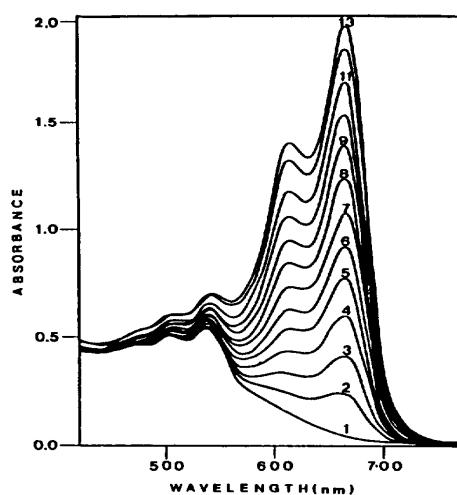


Fig. 2. Time dependence absorption spectra during the DPPC - BR incorporated with Polyphenol Derivatives(PPD) and Hematoxylin-Eosin(H-E)

- 1) $3.00 \times 10^{-5} \text{M}$ DPPC, 2) $3.00 \times 10^{-5} \text{M}$ DPPC + $1.20 \times 10^{-6} \text{M}$ BR, 3) $3.00 \times 10^{-5} \text{M}$ DPPC + $1.20 \times 10^{-6} \text{M}$ BR 4) $3.00 \times 10^{-5} \text{M}$ DPPC + $1.20 \times 10^{-6} \text{M}$ BR + $1.00 \times 10^{-7} \text{M}$ PPD + $1.00 \times 10^{-7} \text{M}$ H-E 5) $3.00 \times 10^{-5} \text{M}$ DPPC + $1.20 \times 10^{-6} \text{M}$ BR + $1.20 \times 10^{-7} \text{M}$ PPD + $1.20 \times 10^{-7} \text{M}$ H-E 6) $3.00 \times 10^{-5} \text{M}$ DPPC + $1.20 \times 10^{-6} \text{M}$ BR + $1.40 \times 10^{-7} \text{M}$ PPD + $1.40 \times 10^{-7} \text{M}$ H-E, 7) $3.00 \times 10^{-5} \text{M}$ DPPC + $1.20 \times 10^{-6} \text{M}$ BR + $1.60 \times 10^{-7} \text{M}$ PPD + $1.60 \times 10^{-7} \text{M}$ H-E, 8) $3.00 \times 10^{-5} \text{M}$ DPPC + $1.20 \times 10^{-6} \text{M}$ BR + $1.80 \times 10^{-7} \text{M}$ PPD + $1.80 \times 10^{-7} \text{M}$ H-E, 9) $3.00 \times 10^{-5} \text{M}$ DPPC + $1.20 \times 10^{-6} \text{M}$ BR + $2.00 \times 10^{-7} \text{M}$ PPD + $2.00 \times 10^{-7} \text{M}$ H-E 10) $3.00 \times 10^{-5} \text{M}$ DPPC + $1.20 \times 10^{-6} \text{M}$ BR + $2.20 \times 10^{-7} \text{M}$ PPD + $2.20 \times 10^{-7} \text{M}$ H-E, 11) $3.00 \times 10^{-5} \text{M}$ DPPC + $1.20 \times 10^{-6} \text{M}$ BR + $2.40 \times 10^{-7} \text{M}$ PPD + $2.40 \times 10^{-7} \text{M}$ H-E, 12) $3.00 \times 10^{-5} \text{M}$ DPPC + $1.20 \times 10^{-6} \text{M}$ BR + $2.60 \times 10^{-7} \text{M}$ PPD + $2.60 \times 10^{-7} \text{M}$ H-E, 13) $3.00 \times 10^{-5} \text{M}$ DPPC + $1.20 \times 10^{-6} \text{M}$ BR + $2.80 \times 10^{-7} \text{M}$ PPD + $2.80 \times 10^{-7} \text{M}$ H-E .

Table 1. The observed absorbance for the PPD-DPPC and H-E-DPPC catalyzed hydrolysis of Polyphenol Derivatives at 25 °C, pH 9.0

Time(min.)	A_{ppd}	$A_{\text{H-E}}$
2	0.5496	0.669
5	0.681	0.768
7	0.723	0.851
10	0.787	0.956
12	0.827	1.029
15	0.879	1.243
17	0.910	1.275
20	0.951	1.292
23	0.988	1.387
25	1.013	1.398
27	1.037	1.417
30	0.962	1.424
33	1.082	1.529
36	1.213	1.638

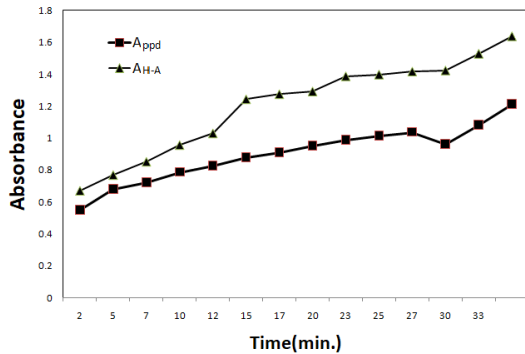


Fig. 3. Spectra Change of Absorbance by means of wavelength:
 ■; PPD-DPPC, ▲; H-E-DPPC catalyzed hydrolysis of Polyphenol Derivatives at 25 °C, pH 9.0.

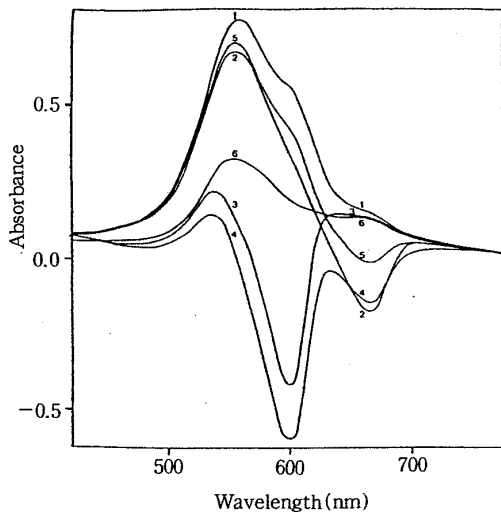


Fig. 4. Absorbance spectra of PPD, H-E, DPPC, BR in solution at 25°C, pH=7.02, 1) DPPC, 2) BR, 3) H-E, 4) PPD, 5)H-E-DPPC, 6)PPD-DPPC.

Fig. 4는 DPPC, BR, Polyphenol Derivatives, Polyphenol derivatives + Hematoxyline eosin stain, DPPC + Hematoxyline eosin stain, MB + Hematoxyline eosin stain의 파장에 의한 흡광도 세기를 측정된 값들이다. 560 nm에서 나타난 흡광도 세기는 DPPC가 가장 세게 나타났으며, Polyphenol derivatives + Hematoxyline eosin stain의 흡광도 세기가 가장 낮게 측정되었다. 이

는 친수성 부분과 소수성 부분이 충돌이 일어나고 Polyphenol derivatives의 이중결합 속에 Hematoxyline eosin이 침입됨에 따라 부피가 감소되는 것으로 사료된다.

4. 결론

DPPC속에 BR(mole ratio 10:1)이나 DPPC속에 BR(mole ratio 10:1)이 내재된 시료 속에서 polyphenol derivatives과 Hematoxylin-Eosin을 초음파 처리하여 재배열된 상태의 시료에서 metachromasy 현상을 명확히 규명하고자 연구하여 실험하였다.

1. Vesicle의 농도 2. 70×10⁻⁵ M의 표준용액에 농도를 첨가함에 따라 흡광도를 측정하였으며(682 nm), vesicles + BR을 첨가한 후에 초음파 처리하여 분광분석한 결과 vesicle의 농도가 커짐에 따라 흡광도가 증가하였으며, BR이 부차적으로 첨가됨에 따라 단파장 이동으로 피크(536 nm)가 크게 나타났다.
2. DPPC, DPPC + BR, DPPC + Polyphenol Derivatives + Hematoxylin-Eosin의 시료를 초음파처리하여 재배열된 상태에서 흡광도를 측정하여 나타난 스펙트럼 변화는 667 nm에서 DPPC + Polyphenol Derivatives + Hematoxylin-Eosin의 시료 흡광도가 가장 크게 나타났다.
3. DPPC, BR, Polyphenol Derivatives, Polyphenol derivatives + Hematoxyline eosin stain, DPPC + Hematoxyline eosin stain, MB + Hematoxyline eosin stain의 파장에 의한 흡광도 세기를 측정된 값들이다. 560 nm에서 나타난 흡광도 세기는 DPPC가 가장 세게 나타났으며, Polyphenol derivatives + Hematoxyline eosin stain의 흡광도 세기가 가장 낮게 측정되었다.
4. 25 °C, pH 7.02에서 흡광도 측정에서 DPPC의 흡광도가 가장 크게 측정되었다.

References

1. I. F. Uchegbu, "Synthetic Surfactant Vesicles", *CRC Press Inc.: N. Y* (2000).
2. P. T. T. Wong and H. H. Mantsch, *J. Chem. Phys.*, Vol. 83, No. 7, pp. 268~3273, (1985).
3. B. K. Burnett and R. J. Robson, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 815, pp. 57~67 (1985).
4. P. Vanderwerf and E. F. Ullman, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 596, pp. 302~314(1985).
5. Zana and Raoul, "Dynamics of Surfactant Self-Assemblies", *Marcel Dekker Inc.*, pp. 21~31 (2005).
6. T. Sano, J. Tanka and Y. Toyoshima, *J. Phy. Chem.*, Vol. 86, pp. 3013~3016, (1982).
7. K. Kanto and A. Romero, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 101, No. 15, pp. 4030~4037, (1979).
8. Y. Okahata, R. Ando and T.Kunitake, *Ber. Bunsenges, Phy. Chem.*, Vol. 85, pp. 789~798, (1981).
9. T. Kunitake, N. Kunitake and N. Nakashima, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 106, pp. 1977~ 1983, (1984).
10. Terrance G. Cooper, "The Tools of Biochemistry", *John Wiley & Sons Inc. N. Y.* (1975).
11. M. Iolanda and M. V. Regina, *Tetrahedron Letters*, Vol. 33, pp. 3065~3068, (1975).
12. Y. Okahata and T. Kunitake, *Bull. Chem. Soc. Jpn*", Vol. 52, pp. 3647~3653, (1979).
13. G. Gregoriadis, " Liposome Technology", *CRC Press Inc. : N.Y.* (1984).
14. M. D. Houslay and K. K. Stanley, "Dynamics of Biological Membrane", *John Wiley & Sons Inc. : N. Y.* (1982).
15. I. E. A. Dennis, J. Cao, Y. H. Hsu, V. Magrioti, G. Kokotos, 'Phospholipase A2 enzymes: physical structure', biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention, *Chemical Reviews*. Vol. 111, pp. 6131, (2011).