

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra farmaceutické technologie

**STUDIUM TERMOTROPNÍHO CHOVÁNÍ  
PSEUDOCERAMIDU 14S24 A JEHO SMĚSÍ  
S CHOLESTEROLEM**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Dr. rer. nat. Jarmila Zbytovská

Hradec Králové 2007

Lenka Toningarová

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Dr.rer.nat. Jarmily Zbyrovské. K práci jsem použila literaturu a prameny uvedené v seznamu.

V Hradci Králové 14. května 2007

.....

podpis

## **Obsah**

1. Úvod.....	5
2. Teoretická část .....	7
2.1. Stavba a funkce lidské kůže .....	7
2.2. Struktura a funkce ceramidů .....	11
2.3. Nemoci kůže a role ceramidů.....	16
2.3.1. Atopická dermatitida (AD) .....	16
2.3.2. Psoriáza .....	17
2.3.3. Jiná kožní onemocnění .....	18
2.3.4. Suchá a stárnoucí kůže .....	18
2.3.5. Psychologický stres .....	19
2.3.6. UV záření a kůže .....	19
2.4. Využití ceramidů.....	19
2.5. Analogy ceramidů a jejich využití .....	20
2.6. Teoretické základy použitých metod měření .....	21
2.6.1. DSC - Diferenciální skenování kalorimetrie.....	21
2.6.2. Infračervená spektroskopie .....	24
3. Metodická část .....	26
3.1. Materiál .....	26
3.1.1. Příprava vzorku .....	26
3.1.2. DSC .....	26
3.1.3. IR.....	28
4. Experimentální část a výsledky.....	29
4.1. DSC – samotný analog 14S24 .....	29
4.2. IR – samotný analog 14S24 .....	30
4.3. DSC směsi cholesterolu a analogu 14S24.....	34
4.4. DSC hydratované směsi cholesterolu a 14S24 .....	38
5. Diskuze.....	42
5.1. Samotný analog 14S24.....	42
5.2. Směs cholesterolu a ceramidového analogu 14S24 .....	43
6. Závěr .....	45
7. Literatura.....	46

## Seznam zkratk

AD	atopická dermatitida
ATP	adenosin trifosfát
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
$\delta$	deformační vibrace
FasL	FAS ligand
GlcCer	glukosylceramid
GSH	glutathion
IFN- $\gamma$	interferon gamma
IR	infračervená spektroskopie
MK	mastná kyselina/mastné kyseliny
NADPH	nikotinamidadeninukleotid fosfát
ROS	reaktivní kyslíkaté metabolity
SC	stratum corneum
SM-ása	enzym sfingomyelinása
TLC	tenkovrstevná chromatografie
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor alpha
$\nu_s, \nu_{as}$	valenční vibrace symetrické a asymetrické

## 1. Úvod

Ceramidy jsou dnes již velmi rozšířené sloučeniny, které se nachází jednak v těle a zejména kůži každého člověka a jednak se jak komerčně tak léčebně využívají v různých kosmetických a farmaceutických přípravcích. Mezi tyto patří např.: balzám na vlasy s ceramidy a extraktem ze šalvěje od firmy Ryor, který má zabránit nadměrné tvorbě lupů. Dále nás kosmetický průmysl neustále informuje i o dalších přípravcích – rtěnky, make-upy, hydratační krémy na opalování, barvy na vlasy, pleťové masky atd. – obsahující ceramidy, díky nimž je pokožka lepší, zdravější, více hydratovaná a zbavená vrásek. A právě jako součást těchto přípravků a i léčivých krémů a mastí se podílejí na obnově kožní bariéry.

Mimoto se s ceramidy setkáme i v různých studiích popisujících a zkoumajících jejich protinádorové působení.

Ceramidy jsou molekuly, které dnes dokážeme laboratorně syntetizovat, což je velice finančně náročné. Vždyť i jednotlivé firmy si chrání patentem „své“ molekuly a předhání se ve výrobě toho nejlepšího přípravku. Vzhledem k náročnosti syntézy přirozeného ceramidu, se vědci snažili i o různé obměny přirozených molekul, které by měly jednak totožné vlastnosti s původní látkou a jednak by byly i finančně méně náročné. Zároveň dochází i ke změnám ve struktuře proto, že nový analog má lepší terapeutické vlastnosti než původní látka.

Na katedře organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové byl připraven analog přirozeného ceramidu 2 (NS), molekula tetradecyl esteru kyseliny (S)-2-tetracosanoylamino-3-hydroxypropionové, tj. analog 14S24. Jeho syntéza je levnější a snazší než syntéza přirozeného ceramidu 2. Proto by bylo jeho využití ve farmaceutických preparátech výhodné za předpokladu, že má podobné fyzikální a chemické vlastnosti a chování jako původní ceramid.

K tomu, jak vůbec ceramidy působí na pokožku je nutné znát strukturu kůže a především strata cornea (SC), která byla objasněna pomocí mnoha technik (elektronová mikroskopie, RTG, DSC, IR). Stejně metody pak byly využity při studii konkrétních lipidů SC. Bylo nutné znát k jakým změnám dochází v polárních oblastech molekuly, či v uhlíkatých řetězcích. Termotropní chování

molekuly ceramidu, či jeho analogu je důležitá fyzikální vlastnost. Na základě porovnání chování originálu a jeho analogu lze usoudit, zda je nová sloučenina totožná s původní látkou. Fyzikálně - chemické vlastnosti lipidů (tím i ceramidů) SC byly hodně studované a máme dostatek informací i literatury. Zároveň se objevují i nové studie, s novými možnostmi využití ceramidů při různých onemocněních u lidí.

Ovšem o analogiích se toho zatím ví jen velice málo.

### **Cíl práce**

Předkládaná diplomová práce je součástí širšího výzkumu možnosti ovlivnění bariérových vlastností kůže a navazuje na předchozí studie fyzikálně-chemických vlastností urychlovačů transdermální absorpce či přirozených složek strata cornea.

Jejím cílem je fyzikálně-chemická charakterizace pseudoceramidu 14S24 a jeho interakcí s cholesterolem pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a infračervené spektroskopie (IR spektroskopie). Konkrétně je zde popsáno termotropní fázové chování samotného ceramidu [NS] a jeho směsí s cholesterolem v suchém stavu i ve vodném prostředí.

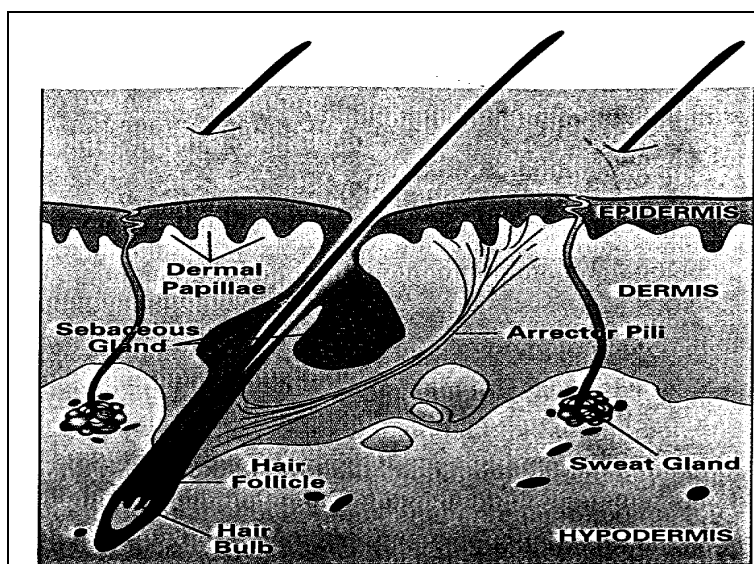
Hlavním úkolem pak bylo sestrojení fázového diagramu pro směs Cer [NS] /cholesterol.

Práce je členěna do dvou částí. Tou první je rešerše, kde jsou aktuálně shrnuty informace o užití zejména analogů ceramidů v terapii kožních a nádorových onemocnění. Druhou částí práce je pak vlastní laboratorní měření se závěrečnou diskuzí.

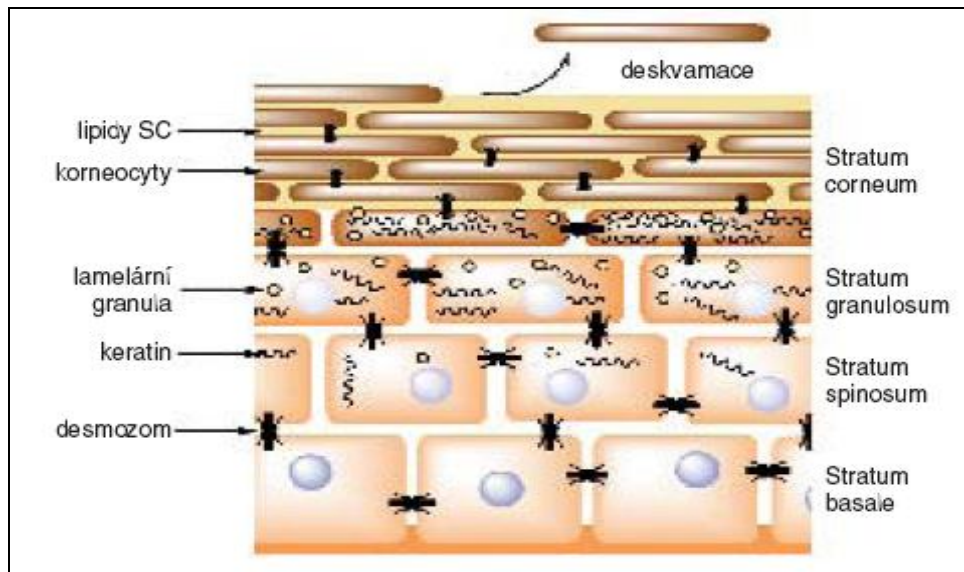
## 2. Teoretická část

### 2.1. Stavba a funkce lidské kůže

Povrch lidského těla je kryt kůží, která tak vytváří hranici s vnějším okolím. Kůže (obr.2.1.) chrání organismus před škodlivými fyzikálními i chemickými vlivy (např.: před mechanickým poškozením, UV zářením) a zabraňuje též vniknutí cizím mikroorganismům. Zároveň se podílí na regulaci vody a tepla. Brání jednak nadměrné ztrátě vody, tj. reguluje perspiraci a jednak se právě díky potu podílí též na výměně tepla s okolím. Dále obsahuje smyslové receptory tlaku, teploty a bolesti.



Obr. 2.1. Řez kůží – největším orgánem těla:  $1,5 - 2\text{m}^2$ , asi  $4,3 - 5\text{ kg}$ , tloušťka  $1,2\text{ mm}$ . Obsahuje dvě hlavní vrstvy: epidermis (funkce spíše bariérová) a dermis (funkce velice kompletní).



Obr. 2.2. **Epidermis:** aktivní vícevrstevná struktura; selektivně permeabilní strata odspodu: basale, spinosum, granulosum, lucidum, corneum. Směrem odspodu (tj. od str. basale ke str. corneum) dochází ke keratinizaci, stejně tak ubývá kyslík a živiny a dochází ke změnám buněčných struktur (zploštění buněk, akumulace keratinu a lipidů).<sup>13</sup>

### Anatomie

Složitost stavby kůže odpovídá jejím mnohačetným funkcím. Dělí se tak na epidermis, dermis a subcutis. Subcutis skládající se z vazivové a tukové tkáně slouží převážně jako ochrana před chladem a funguje jako zásobník energie. Dermis je dobře prokrvená inervovaná vazivová tkáň. Nachází se zde vlasové folikuly, potní a mazové žlázy. Je od epidermis oddělená bazální membránou - stratum basale. Epidermis obsahuje keratinocyty(95%), melanocyty, Langerhansovy a Merkelovy buňky. Tvoří hranici s vnějším okolím a dělí se do několika vrstev (obr.2.2.). Každá dílčí vrstva představuje jiné stadium životního cyklu keratinocytů, počínaje jejich tvorbou ve stratum basale. Ve stejném směru dochází též ke snižování koncentrace kyslíku a živin, buňky se tak stávají plošší, orgány jsou uvnitř degradovány a dochází k akumulaci keratinu a lipidů. Proces končí tvorbou kožní bariéry a nazývá se keratinizace. Celá epidermis se obnoví za 30 dní, z toho za 15 dní stratum corneum.<sup>8,13</sup>

Stratum basale tak vykazuje vysokou mitotickou aktivitu cylindrických (kubických) buněk a obnovuje přibližně za 4-6 týdnů kompletně celou epidermis. Ve stratum basale vznikají korneocyty, které prostupují a mění se ve vrstvách



epidermis až po mrtvé, zrohovatělé korneocyty ve stratum corneum. Nad stratum basale se nachází stratum spinosum, kde jsou již první morfologicky a biochemicky pozměněné buňky, které se nedělí. Produkují keratin - fibrózní protein (skléroprotein), součást zevního povrchu epidermis (ale i hlavní součást vlasů a nehtů). Další vrstvou je ještě biochemicky aktivní stratum granulosum, v jejíchž buňkách se hromadí keratohyalin (předstupeň keratinu). Buňky dále mimo jader obsahují keratin, fillagrin, lipidy, melanocyty (ochrana vůči UV záření), Langerhansovy buňky (imunitní procesy). Exocytózou lipidů do mezibuněčných prostor se vytváří jakýsi „cement“, který udržuje kompaktnost svrchnějších vrstev epidermis. Nejsvrchnější vrstva epidermis je stratum corneum má tloušťku 10-50 $\mu$ m a obsahuje přibližně 18-20 vrstev. Tato vrstva je velice důležitá pro bariérovou funkci kůže a proto je v následující kapitole podrobněji popsána.<sup>13,8</sup>

Hlavním zdrojem energie v epidermis je glukóza, ikdyž  $\beta$ -oxidace hraje také svou určitou roli (zejména je-li nedostatek glukózy jako substrátu pro získání energie). Bazální keratinocyty metabolizují glukózu pomocí glykolýzy za vzniku pyruvátu. Za přístupu kyslíku je pyruvát přeměněn na acetyl-CoA, který je pak v citrátovém cyklu oxidován na oxid uhličitý. Celý proces poskytne 38 molekul ATP. Z hexózového cyklu pak získáme NADPH nutné pro syntézu lipidů. Jak se keratinocyty diferencují a vzdalují od bazální membrány, ztrácejí vnitřní orgány, stávají se nefunkčními, jsou degradovány a prostředí se postupně mění na anaerobní. V něm dochází k přeměně pyruvátu na laktát. Ačkoliv je tento proces mnohem méně výhodný (získá pouze 2 molekuly ATP) než získání energie za aerobních podmínek, je tím nejhlavnějším pochodem získání energie v epidermis. Je výhodný v tom, že je nezávislý na dostatečném obsahu kyslíku v krvi a na tom, zda je povrch kůže přikryt nebo ne (tj. opět zda má povrch dostatek kyslíku). S tím vším je zároveň spojeno nízké pH, důležité pro keratinizaci a pro enzymy (kyselá hydrolázy) a tím i pro diferenciaci.<sup>3,13,17</sup>

### **Funkce a stavba stratum corneum**

Kožní bariéra, stratum corneum, je tvořena plochými, vzájemně do sebe zapadajícími buňkami s nepropustnou korneocytální (korneocyty jsou keratinocyty ve finálním stadiu diferenciaci) obálkou (ta je nepropustná v porovnání s membránami buněk v živé epidermis; složená z proteinů loricerinu

a involucrinu, jež jsou kovalentně vázané na hydroxyceramidy lipidové obálky), vyplněnými keratinem, obklopenými pevně vázanou, velmi lipofilní hmotou, nazývanou lipidová matrix. Takové uspořádání vytváří komplikovanou cestu pro průnik látek přes SC a je často nazýváno „cihly a malta“. Soudržnost buněk SC je navíc zajištěna desmozomy. <sup>3,13</sup>

V konečných fázích keratinizace jsou degradovány buněčné organely a keratinová vlákna se spojují do svazků, které zcela vyplní vnitřek korneocyty. Na vnitřní stranu buněčné membrány se ukládá silná proteinová vrstva, na níž se pak z vnější strany kovalentně váže monovrstva ceramidů, která slouží jako templát pro orientaci dalších vrstev lipidů. V procesu tvorby lipidových lamel mají zásadní význam lamelární granula vyplněná stohy lipidických disků, která se poprvé objevují ve stratum spinosum. V pozdní fázi diferenciaci keratinocyty (na rozhraní stratum granulosum a SC) tělíska migrují k vnější části buňky, kde se jejich membrána spojí s plazmatickou membránou a lipidy jsou uvolněny do mezibuněčného prostoru. Zde dojde k metabolizaci prekurzorů lipidů pomocí současně uvolněných enzymů, jednotlivé disky fúzí a vytvoří soubor lipidových lamel, zcela vyplňující mezibuněčné prostory - lipidovou matrix.

Pro bariérovou funkci SC má pravděpodobně největší význam složení, typ a obsah mezibuněčných lipidů a především jejich výjimečné strukturální uspořádání. Lipidová matrix představuje přibližně 20% objemu SC. Tato lipidická fáze je téměř rovnoměrně přítomna v celém SC, prostupující látky musí tedy touto fází projít, ať prostupují trans- nebo paracelulárně. Nemoci kůže, při nichž je pozměněn obsah lipidů, nebo po extrakci těchto lipidů, dochází potom ke zvyšování permeability kůže, tj. dochází ke ztrátám vody a k prostupu cizích látek. Hlavními složkami hmoty vyplňující intercelulární prostor SC jsou ceramidy (50%), cholesterol (25%) a mastné kyseliny – obvykle 14-28 uhlíkaté (10%). Cholesterol je lipid, který se velice často objevuje i v jiných biomembránách než jen v SC. Jeho včlenění do fosfolipidových vrstev plasmamembrán zapříčiňuje stabilitu těchto dvojvrstev. I v SC hraje důležitou roli v bariérové funkci. Dále jsou v SC v menší míře přítomny estery cholesterolu s organickými kyselinami, cholesterol-sulfát a další látky, nejsou zde však téměř žádné fosfolipidy. Složení lipidů může být i různé a tedy individuální v závislosti na věku, pohlaví, okolí (roční období, sezóna), typu a stavu kůže, na tom o jakou

část kůže těla se jedná, ale též i na metodách užitých při určování obsahu lipidů.<sup>3,8,13,17</sup>

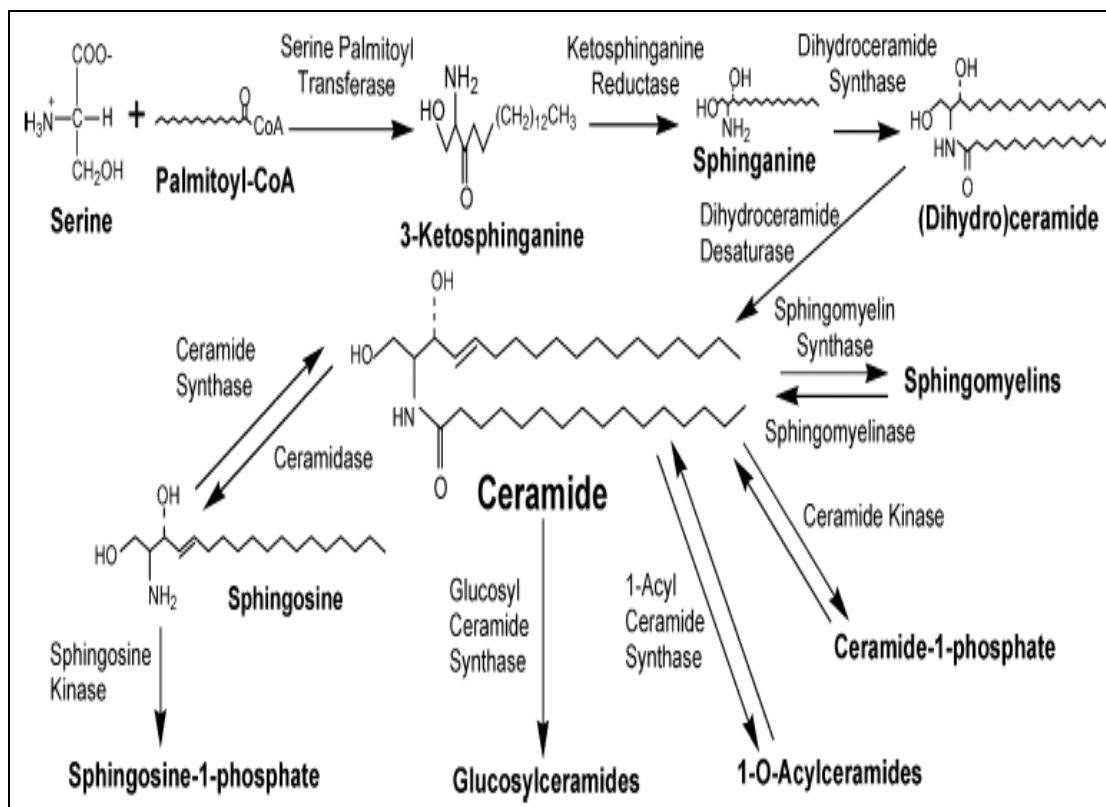
Příčinou výjimečně nízké permeability SC ve srovnání s jinými biologickými membránami jsou:

- neobvyklá délka volných mastných kyselin a řetězců ceramidů
- relativně malá polární hlava ceramidů (např. ve srovnání s fosfolipidy), která umožňuje těsnější zhuštění
- vysoká koheze díky vodíkovým vazbám.
- utváření komplexních vícevrstevných lamel.

## **2.2. Struktura a funkce ceramidů**

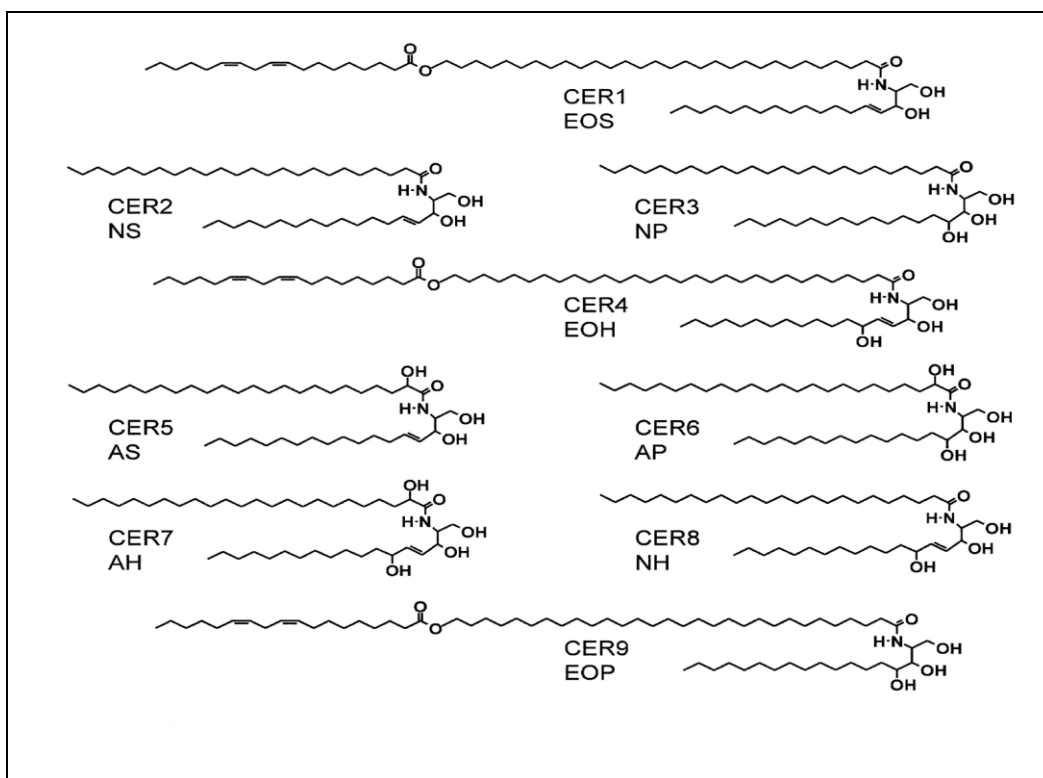
Ceramidy představují velice heterogenní skupinu. Jsou syntetizovány v endoplazmatickém retikulu a transportovány do Golgiho aparátu, kde jsou přeměňovány na cerebrosidy, gangliosidy a sfingomyeliny (obr.2.3.). Jsou hlavními polárními lipidy SC. Hrají hlavní roli v kožní bariéře, buněčné adhezi a epidermální diferenciaci. K tomu dále působí jako sekundární poslové signálu při stresem vyvolané apoptóze a indukují apoptózu nádorových buněk a redukuje rezistenci těchto buněk k chemoterapeutikům.<sup>3,13</sup>

Existují dvě cesty vzniku ceramidů. První je degradace glukosylceramidu a sfingomyelinu katalyzovaná  $\beta$ -glukocerebrosidázou a sfingomyelinázou (SM-asa) (pro jejíž aktivitu je nutné pH 5,1 – 5,6). Druhou je syntéza ceramidu ze serinu a kyseliny palmitové katalyzovaná serin-palmitoyltransferázou a ceramid-syntázou.



Obr. 2.3. Hlavní cesty vzniku ceramidu v lidské kůži

Základní molekulou je sřingosin (bazický aminodialkohol), fytosřingozin nebo 6-hydroxysřingozin na jejichř primární aminoskupinu v poloze 2 jsou navázány různé mastné kyseliny amidovou vazbou. Mastné kyseliny pak můřou v poloze  $\alpha$  nebo  $\omega$  obsahovat hydroxyskupinu. Na základě tenkovrstevné chromatografie (TLC) můřeme ceramidy rozdělit do devíti frakcí (obr.2.4.), které se navzájem liří jednak základním skeletem a jednak průměrnou délkou alkylových řetězců. Velikou variabilitu pak vykazují mastné kyseliny navázané amidickou vazbou. Ty můřou být nerozvětvené, nasycené nebo  $\alpha$ -hydroxy kyseliny s různou délkou řetězce, přičemř nejčastěji se vyskytují 16-ti, 18-ti a více jak 24 uhlíkaté.  $\omega$ -hydroxykyseliny pak můřou být až 34 uhlíkaté. Jiné prameny zase rozděluří ceramidy obsahující  $\alpha$ -hydroxykyselinu (HFA) a ceramidy s nehydroxylovanou mastnou kyselinou(NFA).<sup>3,7</sup>



Obr. 2.4. Chemické struktury devíti ceramidů lidské kůže<sup>7</sup>

Zvláště významné jsou tři typy ceramidů, které obsahují  $\omega$ -hydroxykyselinu o délce přibližně 30 uhlíků, na jejíž koncový hydroxyl se estericky váže esenciální mastná kyselina linoleová. Tyto ceramidy slouží jako molekulární spojky mezi jednotlivými lamelami.

Oproti fosfolipidům, což jsou lipidy běžně se vyskytující v buněčné membráně, je polární hlava ceramidů výrazně menší, a to umožňuje těsnější uspořádání těchto lipidů v lamelle. Dále i oba hydrofobní řetězce jsou podstatně delší, proto mohou vytvářet ne dvojvrstvy, ale několikavrstvé, vzájemně propojené lamelární struktury. Tyto strukturální znaky vysvětlují, proč je propustnost ceramidových lamel SC řádově tisíckrát nižší, než je tomu u fosfolipidových dvojvrstev. V lamelárních granulech jsou ceramidy přítomny ve formě glukosylceramidů a sfingomyelinů, které pravděpodobně představují méně lipofilní transportní formu kožních ceramidů. Pro uvolnění ceramidů z těchto prekurzorů je nutná glukocerebrosidáza, respektive sfingomyelináza. Důležitost těchto enzymů pro přežití suchozemských živočichů lze demonstrovat na příkladu pacientů s kompletní deficiencí glukocerebrosidázy u vzácných případů Gaucherovy nemoci - tzv. collodian babies, jejímž projevem je ichtyosiformní dermatitida a novorozenci takto postižení umírají krátce po narození.<sup>3</sup>

V nekeratinizujících epitelech (např. epitel ústní dutiny) k remodelaci lipidů nedochází a ve svrchních vrstvách epidermis jsou přítomny hlavně fosfolipidy a glykolipidy.

Pro správnou funkci SC je důležité i to, v jaké fázi se lipidy nacházejí. V humánním SC jsou lipidy organizované do dvou krystalických lipidových lamelárních fází s periodicitou 13 a 6 nm. Zejména první fáze (13nm) je důležitá pro bariérovou funkci, lipidy jsou v ní organizované do orthorombické laterální struktury, za kterou jsou zodpovědné asi mastné kyseliny (udělují dostatečnou ohebnost). Hlavní lipidová frakce equimolární směsi cholesterolu a ceramidu tvoří hexagonální (gelovou) strukturu s periodicitou 12,8 nm (což se vyskytuje např. u atopické dermatitidy). Připojení MK s dlouhým řetězcem zapříčiňuje přechod na orthorombickou laterální strukturu. Fázové přechody lipidů jsou závislé na tlaku, hydrataci, koncentraci solí, proteinech, teplotě, rozpouštědle, pH a kationtech.<sup>3</sup>

### **Role ceramidů při apoptóze**

Dříve byly pouze glycerofosfolipidy považovány za lipidy důležité k zprostředkované signální transdukci. Teprve okolo roku 1990 se objevily nové studie oznamující, že extracelulární signály (např. vitamín D<sub>3</sub>, tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), FAS ligand (FasL), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ),  $\gamma$ - záření) zapříčiňují aktivaci SM-ázy a ta spouští jako druhý posel různé reakce související se stresem (např. zastavení buněčného cyklu, apoptózu a stárnutí buněk).

Ceramid je prekurzor sfingomyelinu, který je součástí buněčné membrány zejména v neuronech. Existuje důkaz, že vznik ceramidu hydrolyzou sfingomyelinu souvisí s vyvoláním apoptozy a tím buněčné smrti. Ceramid může vznikat pomocí tří enzymů: neutrální a kyselou sfingomyelinázou (N-SMáza, A-SMáza) a ceramid-syntázou. Navázání TNF- $\alpha$  a FasL, nebo dalších stimulů interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), daunorubicin, aktivuje N- nebo A-SMázu, čímž dochází ke zvyšování obsahu ceramidů v buňce. Ceramid je tedy primárním uskutečňovatelem apoptozy. Jeho koncentrace se ale při apoptóze začíná zvyšovat poměrně dlouho od expozice (za 4-5 hodin, s vrcholem kolem 8 hodin) kaspázovou kaskádou (aktivace kaspázy 3, tím aktivace endonukleáz a fragmentace DNA). Zároveň také musí být blokována glukosylace a/nebo

hydrolýza ceramidů. Normální zdravé buňky nejsou citlivé na manipulace s hladinou sfingolipidů.

Vědci se tak snaží o navrhování analogů ceramidů, které budou schopné penetrovat buněčnou membránou do buňky a zde působit jako originální ceramidy.

Aby protinádorová léčiva působila stejně jako ceramidy apoptózu, musí penetrovat mitochondrii a interferovat s ubichinonovým metabolismem, který produkuje reaktivní kyslíkaté metabolity (ROS), kdy ROS ničí glutathion (GSH) a stimuluje syntézu ceramidu ze sfingomyelinu. Léčiva zároveň musí obsahovat allylický alkohol, keton nebo chinon, čímž dojde ke kondenzaci s GSH. Životně důležitým kontrolním faktorem se zdá být komplexní sada oxido-redukčních metabolitů, které kontrolují úroveň různých reaktivních kyslíkatých metabolitů (ROS). Ceramidy hrají v této rovnováze roli, dokud produkují ROS, které zase zpětně navíc produkují ceramidy. Extra dodávané ceramidy mohou být v nekontrolovatelně bujících nádorových buňkách též rychle přeměňovány na sfingolipidy, sfingosinofosfát a glukosfingolipidy. Glutathion (GSH)- redukční činidlo, redukuje ROS, blokuje tedy spirálu vzniku ceramidů a také inhibuje neutrální SM-ásu, čímž blokuje vznik ceramidu ze sfingomyelinu. Rakovinné buňky obsahují mnoho GSH, tím se chrání před vlastní apoptózou. Léky proti rakovině pak metabolicky inaktivují GSH, stimulují enzymy zahrnující GSH a chemicky kondenzují s GSH.

Jestliže dochází v buňkách k nadměrné syntéze glukosylceramidů (GlcCer), dochází k rezistenci nádorů vůči působení ceramidů, neboť GlcCer je stimulatorem buněčné proliferace, angiogeneze a buněčné adheze. Tak např. léčivo tamoxifen, antineoplastikum používané u žen s karcinomem prsu, zpomaluje glykosylaci ceramidů.

Nádorové buňky díky svému rychlému metabolismu odebírají z krve nebo lehce dostupných tkání (pokožka, plíce) sfingolipidy. Na základě tohoto poznatku by se pak v budoucnu mohla objevit skupina léčiv, která by s nádorovými buňkami kompetovala o substrát – sfingolipidy.<sup>1,4,9,10,12,18</sup>

Pokusy na sítnici krys nasvědčují tomu, že oxidativní stres stimuluje zvyšování obsahu ceramidů a tím dochází k indukci apoptózy fotoreceptorů. Se zvyšujícím se věkem u člověka dochází ke vzniku různých neurodegenerativních

onemocnění, kam patří i zvýšená apoptóza fotoreceptorů sítnice. Léčiva fumonisin B1 a cykloserin inhibují de novo syntézu ceramidů a tím chrání sítnici. Snižováním obsahu ceramidů by tedy mělo být nástrojem prevence smrti fotoreceptorů při neurodegenerativních onemocněních.<sup>19</sup>

Léčivá látka resveratrol zvyšuje obsah ceramidů v buňkách, čímž opět dochází ke zvýšené apoptóze. Používá se jako doplněk stravy pro prevenci rakoviny prostaty. Rovněž byly zkoumány analogy resveratrolu, které způsobovaly apoptózu v prsních nádorových buňkách.<sup>20</sup>

Exogenně dodaný syntetický analog ceramidu C(2) má efekt na endometriální nádorové buňky.<sup>21</sup>

### **2.3. Nemoci kůže a role ceramidů**

Jak již bylo řečeno, ceramidy jsou klíčové molekuly pro správnou funkci kožní bariéry. Proto se při mnohých onemocněních kůže setkáváme s jejich nižším obsahem (zde ovšem nevíme, zda jde o primární, či sekundární příčinu), nebo s pozměněnou strukturou molekuly v kůži.

Vědci se též snaží zjistit, co je příčinou změn ve struktuře ceramidů. Zkoumají tedy enzymy podílející se na metabolismu ceramidů a jejich výskytu při různých onemocněních. Rovněž je porovnávána úroveň exprese proteinu – sfingolipid aktivátoru – v epidermis normální a nemocné kůže.

#### **2.3.1. Atopická dermatitida (AD)**

AD je jedním z nejčastěji se vyskytujících chronických zánětlivých kožních onemocnění s prevalencí 10-20 % u dětí a 1-3 % u dospělých. AD sice patří mezi onemocnění s imunologickým základem, ovšem v poslední době se objevují studie, které popisují, že u takto nemocných dochází k poruchám kožní bariéry a k výraznému poklesu ceramidů a lze tyto změny zahrnout též do patogeneze AD. Poškozená kožní bariéra totiž umožňuje prostup alergenů, dráždivých látek a mikrobů do kůže, kde dochází k aktivaci cytokinů a vzniku zánětu. Zánět pak vede k dalšímu poškození kožní bariéry a tzv. „bludný kruh AD“ se uzavírá. Pokud by se tedy obnovila funkce kožní bariéry, došlo by k odstranění symptomů a ke snížení zhoršení této nemoci a tímto v konečném důsledku i ke



snížení spotřeby kortikoidů. Zda je primární příčinou onemocnění porucha kožní bariéry nebo imunitní odpovědi je v dnešní době předmětem četných diskuzí; s největší pravděpodobností se na vzniku onemocnění podílejí oba mechanismy. Vyšší propustnost a nižší hydratace kůže u AD byla popsána v 80. letech minulého století. Další práce pak našly snížené množství ceramidů ve SC a změny v jejich složení. Kolem roku 2000 byl u AD popsán výskyt abnormálních typů ceramidů, změny uspořádání ceramidových lamel a nedostatek kovalentně vázaných ceramidů. Byly také nalezeny možné příčiny těchto jevů. U pacientů s AD se objevuje enzym glukosylceramid-sfingomyelin deacyláza, degradující oba prekurzory ceramidů, dále byla popsána snížená aktivita sfingomyelinázy produkující ceramidy a také zvýšený výskyt bakterií produkujících ceramidázu. Další možný důvod absence ceramidů u AD je změna úrovně hydrolyzy sfingomyelinu. U AD je enzym sfingomyelin-deacyláza, která hydrolyzuje sfingomyelin na acylové straně na sfingosylfosforylcholin a volnou MK namísto ceramidu, který vzniká pomocí kyselé a základní sfingomyelinázy. AD-pacienti mají aktivitu SM-deacylázy 3-5x větší než u zdravých lidí.

Pacienti s kontaktní dermatitidou nebo chronickým ekzémem mají aktivitu SM-deacylázy stejnou jako zdraví lidé.

Při AD je sice nižší výskyt ceramidů v důsledku nižší proliferace keratinocytů, ovšem obsah cholesterolu je vyšší. Tento poměr je pak důležitý při hodnocení závažnosti AD.

Existují ceramidy, které mohou vznikat degradací glukosylceramidů (např. Cer1). U AD dochází ke zvýšené expresi a tím i aktivity glukosylceramid-deacylázy, která štěpí glukosylceramid na acylovém konci na glukosylsfingosin a volnou MK namísto ceramidů. Výsledkem je opět snížený obsah ceramidů.

Pro doplnění je zde obsah MK stejný jako u zdravé pokožky, ale jedná se o MK s počtem uhlíku 24 a více a těch je méně.<sup>1,2,3</sup>

### **2.3.2. Psoriáza**

Psoriáza (lupénka) je chronické zánětlivé onemocnění kůže s genetickou predispozicí, charakterizované hyperproliferační a poruchami diferenciací keratinocytů a vyšší propustností kůže. Větší ztrátou vody dochází k vyšší

proliferaci keratinocytů, jejich nekompletní diferenciaci, čímž vzniká vysoce porušená rohová vrstva.

Podobně jako u AD bylo u psoriázy nalezeno nižší množství ceramidů, včetně kovalentně vázaných, zejména obsahujících fytosfingosin. Možnými příčinami nedostatku ceramidů je nižší exprese glukocerebrosidázy, díky níž je v SC menší množství ceramidů vznikajících z glukosylceramidů a svou roli může hrát také snížená syntéza ceramidů ze serinu. Významný vliv může mít také snížené množství prosaposinu, prekursoru sfingolipidy - aktivujícího proteinu.<sup>2,3</sup>

### **2.3.3. Jiná kožní onemocnění**

Pod pojmem ichtyóza je zahrnuta rozsáhlá skupina dědičných i získaných hyperkeratóz, pro které je typickým projevem ztlustělé a šupinaté SC. Příčinou může být snížená deskvamace, zvýšená proliferace keratinocytů nebo poruchy metabolismu lipidů SC, zejména ceramidů. Patří sem také již dříve zmíněná Gaucherova nemoc, spojená s defektem glukocerebrosidázy. Tato nemoc má tři typy. První a třetí typ je bez abnormalit v kůži. Druhým je ichtyozní forma pokožky. Dochází ke zvyšování poměru glukosylceramid /ceramid, což souvisí až s 50x vyšší transepidermální ztrátou vody.

Dále mezi genetická onemocnění související s abnormalitami v ceramidech patří Niemann-Pickova nemoc (akumulace sfingomyelinázy, vyšší exprese SM-deacylázy) a Faberova nemoc (deficience sfingomyelinázy, akumulace ceramidů v různých tkáních – podkožní uzliny).

I u akné se vyskytují změny ve složení ceramidů, především nižší množství ceramidu EOS, obsahujícího esenciální mastnou kyselinu linoleovou. Nejvýraznější pokles je v komedonech.<sup>2,3</sup>

### **2.3.4. Suchá a stárnoucí kůže**

Nižší obsah ceramidů a snížená schopnost regenerace byla popsána také u suché a stárnoucí kůže. Srovnáme-li věkovou kategorii 41-50 let, množství ceramidů je až o polovinu nižší než u skupiny ve věku 21-30 let, nejvýraznější změny jsou na obličeji. U stárnoucí kůže byla popsána také nižší schopnost regenerace díky zhoršené schopnosti syntézy ceramidů de novo i ze sfingomyelinu. Množství

ceramidů kolísá také v závislosti na ročním období; v zimě je ceramidů výrazně méně.<sup>2,3</sup>

### **2.3.5. Psychologický stres**

Vliv psychického stavu na vzhled a funkci kůže je znám již dlouho dobu, teprve v posledních letech byl však potvrzen přímými experimenty. V roce 2001 byla provedena studie, v níž byl zkoumán vliv tří různých stresorů na kožní bariéru. První skupina absolvovala simulovaný pracovní pohovor, ve druhé skupině dobrovolníci 42 hodin nespali a ve třetí cvičili na běhacím pásu. V prvních dvou skupinách, tedy u psychického stresu, byl popsán výrazný nárůst propustnosti kůže a nižší schopnost regenerace, zatímco po fyzické zátěži k žádným změnám nedošlo. V experimentu na myších stresovaných stálým světlem, malým prostorem a poslechem nejmenované rozhlasové stanice byly popsány podobné změny a nalezena snížená syntéza ceramidů.<sup>2,3</sup>

### **2.3.6. UV záření a kůže**

Vliv UV záření velmi závisí na dávce, které je organismus exponován. Zatímco malé množství UV zvyšuje syntézu ceramidů, což se využívá např. při fototerapii u AD, vyšší dávky působí poškození bariéry, snižují množství kovalentně vázaných ceramidů a vyvolávají zánět.<sup>2,3</sup>

## **2.4. Využití ceramidů**

Logickým přístupem ke zmírnění popisovaných projevů je doplnění chybějících ceramidů topickou aplikací, problémem však zůstává jejich vysoká cena. Komerčně dostupnými léčivými přípravky s obsahem ceramidů jsou Lipobase Repair (Astellas), v USA a Triceram (Osмотics Corp.).

Na Farmaceutické fakultě UK byl vyvinut ceramidový analog 14S24 (obr.2.5.), který v testech na izolované lidské kůži vykázal vysokou schopnost regenerovat poškození kožní bariéry za daných podmínek dokonce lépe než fyziologické ceramidy. Jeho značnou výhodou je jeho nenáročná a relativně laciná syntéza. Různé ceramidové analogy využívá také celá řada kosmetických firem. Přestože aplikace ceramidů nemůže onemocnění typu AD zcela vyléčit, zlepšení bariérové

funkce kůže sníží množství penetrujících alergenů, dráždivých látek a mikrobu a omezí exacerbace onemocnění s typickými lézemi. Navíc je prokazatelně snížena spotřeba kortikoidů, případně antibiotik.

Pro léčbu je důležité, aby preparáty obsahovaly všechny tři lipidické složky SC zároveň, tj. cholesterol, ceramid a MK. Jejich určitý poměr je důležitý pro homeostázu kůže. Dochází pak ke zlepšování symptomů nemocí, jako je suchost, svědění, šupinatost, zčervenání, praskliny atd.

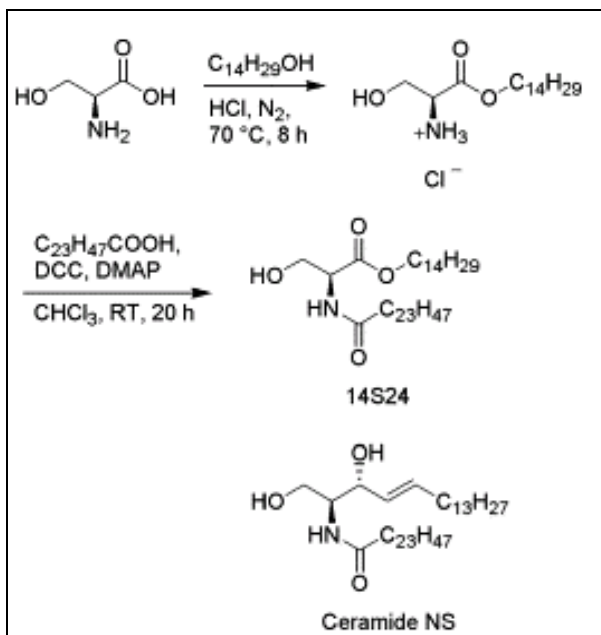
Využití nachází ceramidy i u jiných poškození kůže, než jsou jen zmiňované nemoci, např. chemické poškození.<sup>2,3</sup>

## **2.5. Analogy ceramidů a jejich využití**

Analog ceramidu NS, 14S24 vykazoval v in vitro zkouškách velice dobré vlastnosti. Jeho syntéza je jednodušší a taky levnější. Tento analog má stejné sterické a hydrofobní vlastnosti jako ceramidy kůže a lze ho užít při deficienci ceramidů ve stratum corneum, tímto pro obnovu funkce kožní bariéry. Mohl by být tedy velice prospěšný u pacientů s AD, jako prevence penetrace alergenů a dráždivých látek a následně zánětu. Dále z těchto testů vzniká domněnka, že allylický alkohol, který je esenciální pro apoptickou aktivitu, není důležitý pro formování kožní bariéry. Hydroxyskupina u ceramidu NS je nahrazena skupinou esterovou za vzniku analogu 14S24, který tímto neztrácí schopnost obnovovat funkci kožní bariéry.

Dále se analogy ceramidů mohou využívat v protinádorové terapii: karcinom kůže, močového měchýře, plic, ochrana střev (analogy C2 a C6-ceramidu v léčbě tlustého střeva metastazujícího do jater), karcinom prostaty (C2-ceramid působí apoptózu v nádorových buňkách buněčné linie LNCaP u karcinomu prostaty). Analog obsahující dvě dvojně vazby (4,6-dien-cer) se užívá při nádorech prsu, je aktivnější než originál. Zjistilo se, že fyto-sfingosinové ceramidy jsou aktivnější, než ceramidy se sfingosinovou bází. Jiný mechanismus účinku než apoptózu mají analogy ceramidů užívané jako inhibitory růstu Plasmodium falciparum-inhibují SM-ázu.<sup>4,9,10,12</sup>

Kationický pyridinium – ceramid (C6-Pyr-Cer), mající vysokou rozpustnost a biologickou dostupnost, společně s gemcytabinem nebo doxorubicinem urychluje účinek těchto léčiv na inhibici telomerázy a růstu rakovinných buněk v oblasti hlavy a krku.



Obr. 2.5. Schéma syntézy ceramidového analogu 14S24 a srovnání s originální molekulou ceramidu 2 (NS); DCC: dicyklohexyl karbodiimid, DMAP: 4-dimethylaminopyridin; RT: laboratorní teplota.<sup>14</sup>

## 2.6. Teoretické základy použitých metod měření

### 2.6.1. DSC - Diferenciální skenování kalorimetrie

Vyjádřit a popsat vliv teploty na to, v jakém stavu se nachází nějaký systém, který podléhá fázovým přechodům, chemickému rozložení nebo též sorpčním procesům, dnes vědci velmi dobře umí a dokážou. Snaha tyto teplotní vlivy zároveň i měřit a získat potřebné informace tvoří podstatu termické analýzy. International Confederation for Thermal Analysis (ICTA) vytvořila definici pro pojem termická analýza: „Termická analýza označuje skupinu metod, při nichž je nějaká fyzikální vlastnost vzorku měřena jako funkce teploty a zároveň je tento vzorek podroben určitému známému/kontrolovanému teplotnímu programu.“

DSC-metoda je založená na principu měření elektrické energie přídavného zdroje, potřebné k vyrovnání teplotních rozdílů vzniklých mezi zahříváním vzorkem a referenční látkou, tedy k udržení izotermních podmínek. Výsledkem je závislost rozdílů tepelného toku uvolňovaného z měřeného a referenčního

vzorku na teplotě v případě dynamického měření nebo na čase při konstantní teplotě v případě izotermického měření.

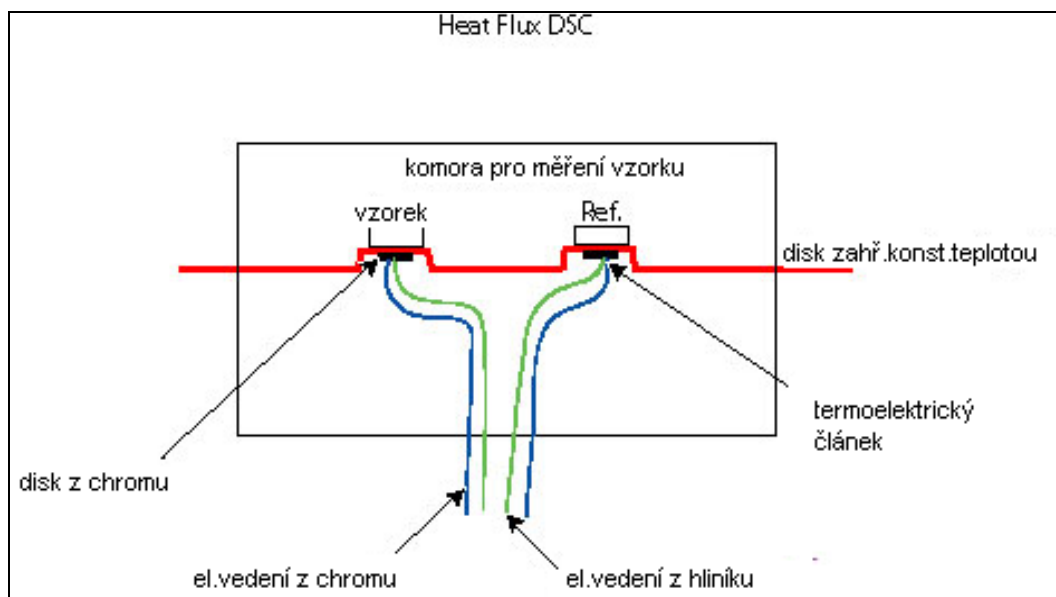
Typický DSC-kalorimetr se skládá ze dvou hermeticky uzavřených „pánviček“ o vysoké teplotní vodivosti: jednou je vzorek a druhou je reference (tím bývá obvykle pouze prázdná pánvička nebo indium). Tyto pánvičky jsou buď celé, nebo jen potažené hliníkem. Obě pánvičky jsou zahřívány nebo chlazeny úplně stejně, zatímco je monitorován rozdíl mezi proudem tepla v obou z nich.

DSC je tak velmi vhodnou metodou pro charakterizaci fázového chování lipidů. Poskytuje prvotní informace o fázových změnách v molekule lipidů. Obvykle největší pík z DSC křivky odpovídá právě tání uhlovodíkového řetězce lipidu. A pomocí DSC se dají zjistit i jiné změny, než jen tání, např. přechod z určité krystalické mřížky do jiné, změny v polární hlavě apod.<sup>15,16</sup>

DSC je velice užitečná metoda, pomocí níž se dají konstruovat fázové diagramy lipidových směsí, a tím získáme informace o mísitelnosti lipidů.

Nicméně DSC nám dává pouze iniciální informaci o teplotě a entalpii fázového přechodu. Abychom popsali přesně, co se děje v molekule lipidu, je třeba použít i další metody. Mnoho studií lipidů tak využívá kombinaci DSC v kombinaci se spektroskopickými metodami.

Metody měření jsou dvě. Tzv. power compensated DSC, při které vzorek i reference jsou každý ve vlastním „cylindru“ od sebe oddělené. A tzv. heat flux DSC (obr.2.6.), která je použita v této práci. Při ní je vzorek i reference položen na jakousi vyzdvihnutou plošinu, která je na disku. Teplo je pak přenášeno skrz disk do vzorku a reference. Rozdílný tok tepla je pak monitorován elektrickým vedením přes termoelektrický článek.



Obr. 2.6. Schéma měření vzorku pomocí DSC metodou heat flux

Abychom mohli měřit za daných podmínek, bývá komora se vzorkem a referencí umístěna v ocelovém válci. Možnost měnit jak tlak, tak teplotu poskytuje lepší podmínky při měření, což umožňuje měření s vyšší citlivostí a sledovat reakce citlivé na tlak. Měření zároveň ale vyžadují trvalé chlazení např. dusíkem nebo mechanicky chladičem.

Nezbytností při kvantitativní analýze pomocí DSC je kalibrace měřící cely. Kalibrace se provádí vždy, když jsou signifikantní rozdíly v podmínkách měření. Hodnoty kalibrace jsou ověřovány na fixních intervalech.

Dále je nutné provádět i korekci. A to vždy, když měníme teplotní programy. Provádí se s prázdnými pánvičkami, nebo s nějakým referenčním materiálem ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) a je při ní nastaven stejný teplotní režim, jako při měření vlastního vzorku. V podstatě se jí určí nulový signál a potom při měření vlastního vzorku, jsou hodnoty korekce od něj odečítány. Korekce tedy eliminuje vnější vlivy, které by mohli zkreslovat hodnoty při měření vlastního vzorku.

Celé měření je řízeno počítačem. Výskyt píků na měřených křivkách, termogramech, odpovídá exo- nebo endotermickým procesům probíhajícím v měřeném vzorku. Tím lze určit například fázové přechody, bod tání a tuhnutí, krystalizaci, čistotu, tepelnou kapacitu, oxidačně-redukční reakce atd.

Pík je část křivky, kdy se signál odchyluje od tzv. baseline (základní linie - nulový signál) a pak se zase vrací zpátky na její úroveň. Příčinou tohoto odchýlení může být fázový přechod, změny v chemické struktuře nebo i samotné chemické reakce. Pík bývá charakterizován:

- Teplotou maxima či minima
- Šířkou píku
- Výškou píku
- Plochou pod píkem (což je plocha mezi DSC křivkou a baseline), tato plocha je úměrná změnám v entalpii (J/g) – exotermní (teplo se uvolňuje), endotermní (teplo se spotřebovává) procesy.

### 2.6.2. Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie je analytická metoda, určená především pro identifikaci a strukturní charakterizaci organických sloučenin a také pro stanovení anorganických látek. Měří infračervené záření o různé vlnové délce, pohlcované analyzovaným materiálem. Jedná se o elektromagnetické záření, které má rozsah vlnových délek 0,78-1000 mm, což po převedení na vlnočety odpovídá 12800-10cm<sup>-1</sup>. Celá tato oblast pak bývá rozdělena na blízkou (13000-4000cm<sup>-1</sup>), střední (4000-200 cm<sup>-1</sup>) a vzdálenou infračervenou oblast (200-10 cm<sup>-1</sup>), přičemž nejpoužívanější je střední oblast.

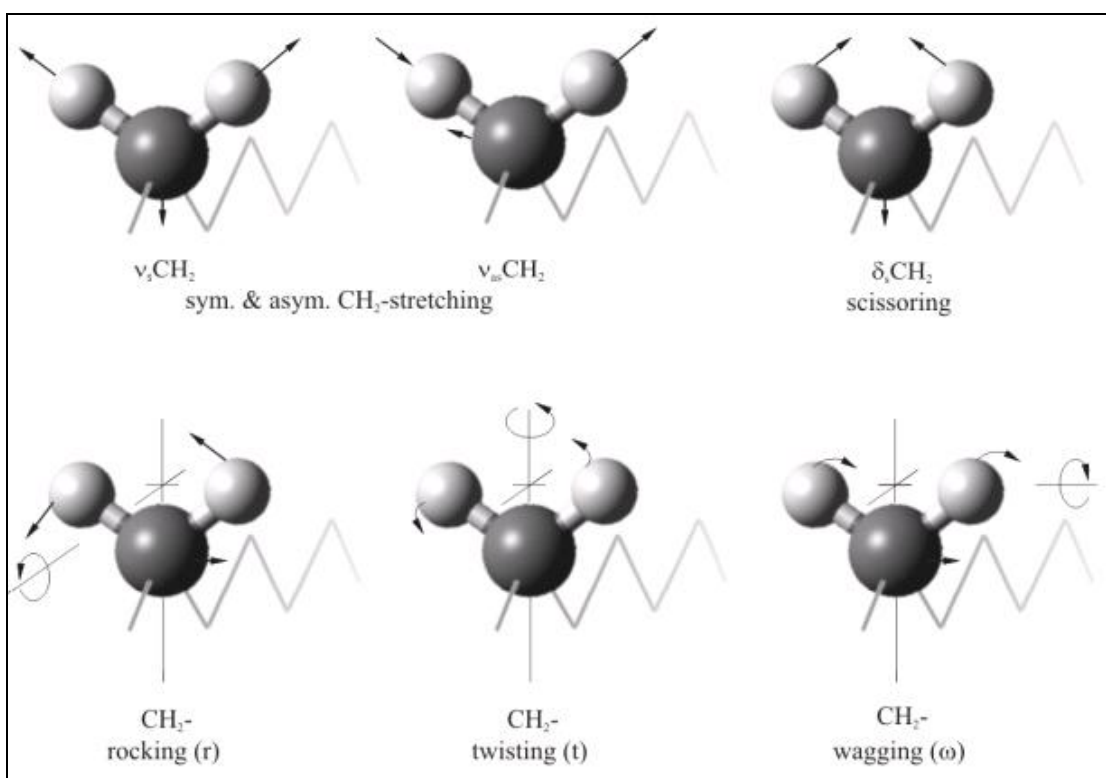
Principem metody je absorpce záření o určité vlnové délce při průchodu vzorkem, při čemž dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly – k absorpci tedy dochází jen u vazeb, které se „roztahují“ asymetricky (obr.2.7.). Analytickým výstupem je infračervené spektrum, které je grafickým zobrazením funkční závislosti energie, vyjádřené v procentech jako transmitance (T) nebo v jednotkách jako absorbance (A) na vlnové délce dopadajícího záření. Jelikož je závislost energie na vlnové délce logaritmická, používá se proto vlnočeta, který je definován jako převrácená hodnota vlnové délky, a tak závislost energie na vlnočtu, bude funkcí lineární.

Absorpční pásy mající vrcholy v intervalu 4000-1500 cm<sup>-1</sup> jsou vhodné pro identifikaci funkčních skupin (např. -OH, C=O, N-H, atd.). Pásy v oblasti 1500-400 cm<sup>-1</sup> jsou nazývané jako tzv. oblasti otisku palce „fingerprint region“. V této



oblasti dochází k valenčním vibracím jednoduchých vazeb mezi atomy hmotnostně blízkými k uhlíku (např. C-O, C-C, C-F atd.). Spektrum v tomto intervalu zpravidla obsahuje mnoho absorpčních maxim a zároveň do této oblasti spadá řada deformačních vibrací.

Infračervená spektroskopie je rovněž metoda, která podléhá různým obměnám zlepšujícím kvalitu či snadnost měření, lepší zacházení s analyzovaným materiálem, atd. Příkladem můžou být infračervené spektrometry s Fourierovou transformací (FTIR- spektrometry). Jedná se o přístroje pracující na principu interference spektra, které na rozdíl od disperzních přístrojů měří interferogram modulovaného svazku záření po průchodu vzorkem. Počítačové programy zpracovávající spektrální záznam vyžadují matematickou metodu Fourierovy transformace. Výhodou takového měření je, že na detektor dopadá vždy celý svazek záření, což umožňuje dělat i experimenty, při nichž dochází k velkým energetickým ztrátám, tj. měření silně absorbujících vzorků.<sup>5,6</sup>



Obr. 2.7. Vibrace methylenových skupin; nahoře valenční vibrace symetrické ( $\nu_s$ ) a asymetrické ( $\nu_{as}$ ), deformační vibrace ( $\delta$ ); dole tzv. rocking, twisting a wagging methylenových skupin

### **3. Metodická část**

#### **3.1. Materiál**

Analog 14S24 byl dodán katedrou organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Cholesterol, chloroform, methanol byly od firmy Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo. Aqua pro injectione byla od firmy Infusia Hořátev, Česká Republika.

##### **3.1.1. Příprava vzorku**

Měřeným vzorkem byla směs cholesterolu a ceramidového analogu 14S24 v poměrech 10:0; 8:2; 7:3; 7,5:2,5; 6,5:3,5; 6:4; 5:5; 4:6; 3:7; 2:8; 0:10.

Jednotlivé lipidy byly rozpuštěny ve směsi chloroformu a methanolu v objemovém poměru 2:1. Ekvivalentní množství jednotlivých roztoků bylo smícháno a posléze odpařeno na vakuové odparce.

Vzorky byly ponechány 24hodin v exsikátoru s vakuem při laboratorní teplotě.

##### **3.1.2. DSC**

Byl použit přístroj firmy NETZSCH Phoenix DSC 200.

Na analytických vahách bylo do hliníkových pánviček odváženo vždy přibližně 3mg vzorku. Pevný materiál bylo třeba pokaždé rovnoměrně rozprostřít po dnu pánvičky. Pak se přiložilo víčko a hermeticky tlakem uzavřelo.

Při přípravě hydratovaných vzorků se ještě před uzavřením pomocí Hamiltonovy mikrolitrové jehly káplo přibližně stejné množství vody (Aqua pro injectione) jako byla hmotnost vzorku a až poté hermeticky uzavřelo. Hydratované vzorky se ponechali 24 hodin v klidu při pokojové teplotě.

Při přípravě vzorku je vždy nutné dávat pozor, aby ani materiál, ani voda nezasahovali do okrajů pánvičky, neboť by pak nedošlo k úplnému uzavření a výsledky by byly zkreslené.

Jakákoliv manipulace s pánvičkami byla pomocí pinzet.

Referenčním vzorkem byla pouze prázdná, přesně zvážená pánvička.

Vzorek a reference se umístili na plošinky, přesně na střed topného disku a válec DSC přístroje se uzavřel.

Po vložení vzorku a reference do přístroje bylo nutné zadat postup měření. Vše se zadávalo přes počítač.

Měření nehydratované směsi cholesterolu a analogu

krok č.	
1	zahřátí na 170°C rychlostí 5K/min
2	izoterma 5min
3	chlazení na 20°C rychlostí 5K/min
4	izoterma 5min
5	zahřátí na 170°C rychlostí 5K/min
6	izoterma 5min
7	chlazení na 20°C rychlostí 25K/min

Pokaždé se začíná na 20°C. K chlazení se používá tekutý dusík.

Hydratované vzorky byly měřeny stejným způsobem, ovšem zahřívání bylo vždy jen do 90°C.

Teplotu vzorku měří hliníko-chromový termočlánek a tok tepla je měřen porovnáváním rozdílů v teplotách chromových membrán vzorku a reference.

Po změření jednoho vzorku, byl tento vyňat a místo něj dán další vzorek.

Manipulace a vyhodnocování grafů byla provedena pomocí originálního Netzsch software.

### 3.1.3. IR

IR-spektra byla naměřena Dr.rer.nat. Jarmilou Zbytovskou. Naměřená spektra jsem vyhodnocovala já.

Infračervená spektra analogu 14S24 při různých teplotách byla změřena použitím FTIR spektrometru NICOLET IMPACT 400, vybaveným ATR (attenuated total reflection) celou, ve které je horizontálně orientován ZnSe krystal (index lomu 2.4) s úhlem dopadu 45°. Průměr tohoto kulatého jednodrazového krystalu je 1.3 mm. Součástí přístrojového vybavení je termostat zajišťující měření při určité teplotě.

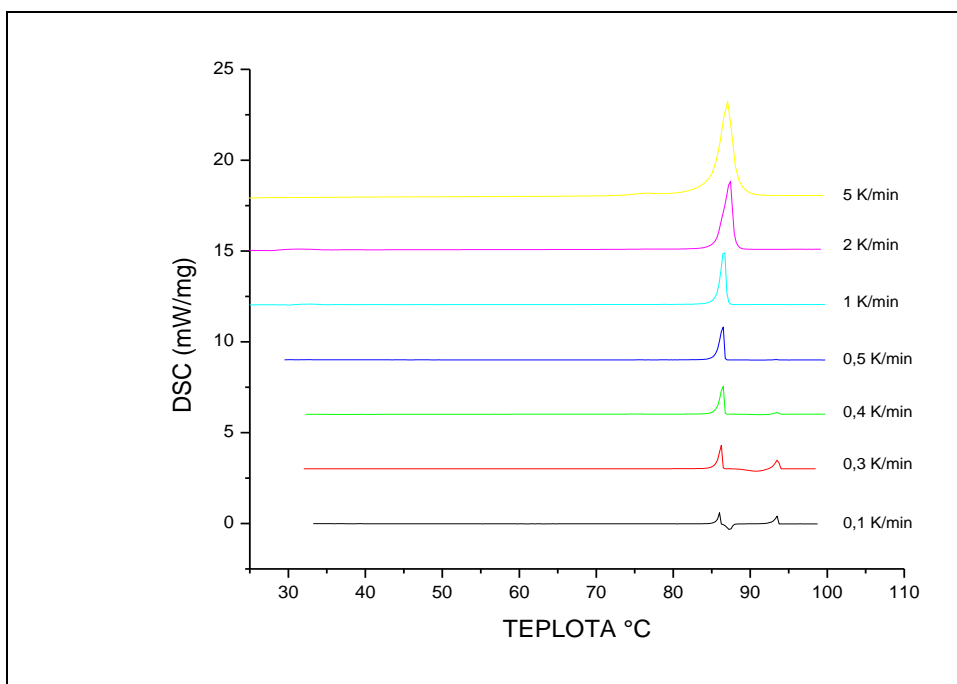
Před měřením bylo proměřeno pozadí (tzv.background) a při stejném nastavení přístroje pak probíhalo vlastní měření vzorků. Malé množství rozetřeného vzorku bylo nanášeno na povrch krystalu tak, aby bylo dosaženo maximálního kontaktu vzorku s krystalem pomocí přítlačného zařízení. Jedno měření čítalo 128 skenů. Měření probíhalo od 20 do 90°C ± 2 °C. Po každém teplotním kroku byla provedena 10 min ekvilibrace ke stabilizaci teploty.

Manipulace a vyhodnocování spekter byla provedena pomocí originálního Nicolett software.

## 4. Experimentální část a výsledky

### 4.1. DSC – samotný analog 14S24

Jedná se o DSC samotného analogu 14S24 různými rychlostmi zahřívání. Chtěli jsme zjistit, která rychlost je optimální pro naše další měření. Měřilo se rychlostmi: 0,1K/min, 0,3K/min, 0,4K/min, 0,5 K/min, 1 K/min, 2 K/min, 5 K/min.



Obr. 4.1. DSC křivky samotného analogu 14S24 při různých rychlostech zahřívání

Na počátku je molekula analogu 14S24 v určité fázi, konformaci, se zvyšující se teplotou dochází k překrystalování, tj. ke změnám ve struktuře molekuly a pak začíná analog tát. Z grafů je evidentní, že termotropní chování látky je závislé na rychlosti zahřívání. A to tak, že při největší rychlosti, tj. 5 K/min se objevuje pouze jeden pík (87,1°C), což je teplota tání našeho lipidu. Čím pomalejší je ale zahřívání, je zřetelné, že se začínají objevovat dva fázové přechody. První přechod (pík o nižší teplotě) je zřejmě změna v krystalové struktuře lipidu a až druhý přechod (hlavní pík) je tání lipidu. Teplota tání analogu s klesající

rychlostí zahřívání stoupá z 87,1°C na 93,5°C. S klesající rychlostí zahřívání se zároveň začíná objevovat exotermní pik. Poprvé při 0,4K/min.

V různých rychlostech chlazení se nenašla žádná významná závislost. Teplota tuhnutí lipidu byla v rozmezí 73,9 – 75,9°C.

#### 4.2. IR – samotný analog 14S24

Grafy, na kterých je závislost vlnočtů samotného analogu 14S24 na teplotě korelují s výsledky z DSC (obr. 4.1. 5K/min; obr. obr.4.2.). Je na nich evidentní zlom, který se objevuje téměř vždy okolo 87 °C, což je teplota tání lipidu.

Vibrace okolo 717cm<sup>-1</sup>, jedná se o deformační vibrace -CH<sub>2</sub>- skupiny, tzv. rocking. Ten nám pomůže i určit krystalickou mřížku lipidu. Na subcelu je jen jeden řetězec a tím, že se zde zároveň vyskytují i vlnočty v oblasti 2850 cm<sup>-1</sup>, předpokládáme hexagonální strukturu (příp. triklinickou).

Valenční vibrace C-O vyskytující se při 1069cm<sup>-1</sup> odpovídají primárním alkoholům. Vibrace okolo 1233 cm<sup>-1</sup> odpovídají též molekule C-O, ovšem tentokrát se jedná o nasycené estery.

Vibrace při 1281 a 1320 cm<sup>-1</sup> se vyskytly pouze jednou a to při 90°C. Jedná se o valenční vibrace C-N, tj. amidů a aminů.

Deformační vibrace O-H skupiny alkoholů a fenolů se vyskytuje při 1416 cm<sup>-1</sup>.

Kolem 1471 cm<sup>-1</sup> se vyskytují deformační vibrace (symetrické) CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> skupin; hlavně se jedná o scissoring CH<sub>2</sub> skupin.

Vibrace okolo 1540 cm<sup>-1</sup> odpovídají deformačním vibracím N-H atomů sekundárních amidů a zároveň jde o jejich valenční vibrace (C-N).

Valenční vibrace skupiny C=O, která se nachází u amidu má hodnotu 1640 cm<sup>-1</sup> a valenční vibrace skupiny C=O esterové (karbonyl) má hodnotu 1721 cm<sup>-1</sup>.

Důležité jsou vibrace okolo 2850 cm<sup>-1</sup>, jedná se o valenční vibrace CH<sub>2</sub>; čím je nižší poloha, tím více je trans konformací, ovšem v našem případě dochází k poklesu trans pozic a zvyšují se gauche konformace, čímž dokazujeme to tání; řetězce mají volnou pohyblivost.

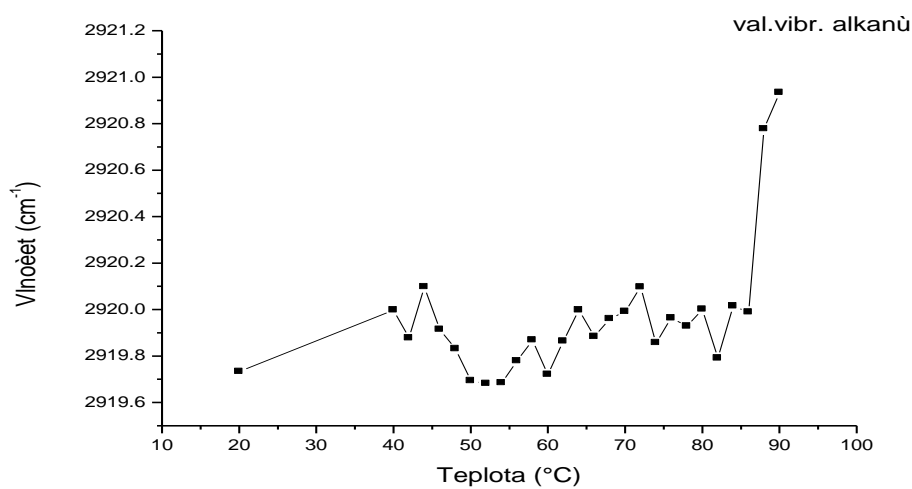
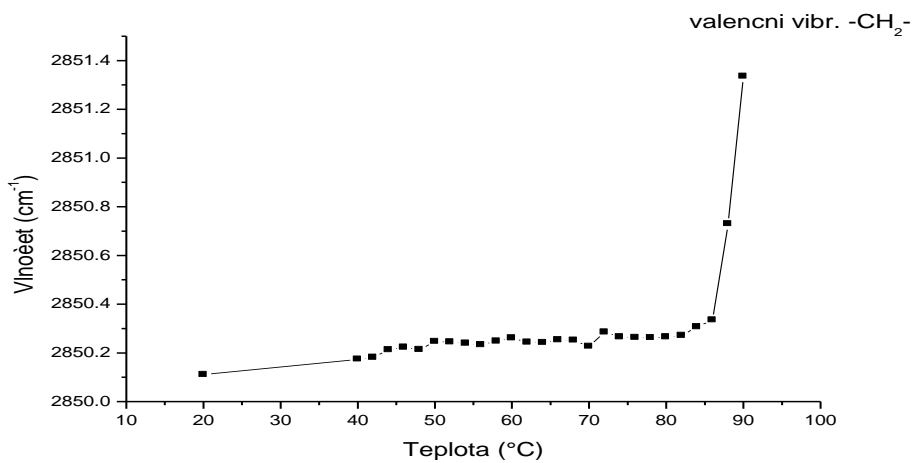
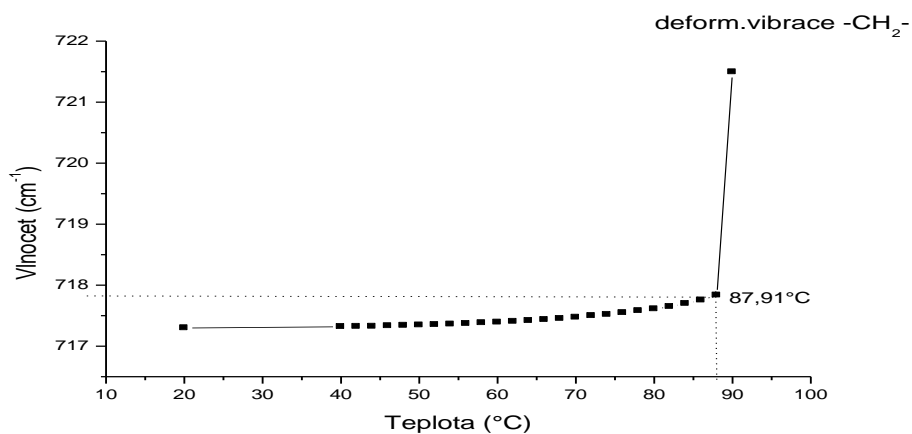
Hodnoty 2920 cm<sup>-1</sup> mají valenční vibrace C-H alkanů. Valenční vibrace N-H sekundárních aminů se vyskytují při 3313 cm<sup>-1</sup>.

3500  $\text{cm}^{-1}$  mají valenční vibrace O-H, vodíková vazba či asociované hydroxyly.

°C	-CH <sub>2</sub> -	-CO-	-CO-	-CN-	-CN-	-OH-	-CH <sub>2</sub> -	-NH-	-C=O	-C=O	-CH <sub>2</sub> -	C-H	N-H	O-H
20	717,2963	1069,564	1234,817	--	--	1416,484	1472,475	1540,64	1647,096	1721,932	2850,111	2919,733	3313,261	3496,196
40	717,3177	--	1234,491	--	--	--	1472,22	1540,287	1647,142	1721,902	2850,174	2919,998	3315,557	3497,88
42	717,322	--	1234,452	--	--	1416,449	1472,187	1540,226	1647,129	1721,893	2850,182	2919,878	3315,944	3497,866
44	717,3238	--	1234,418	--	--	--	1472,153	1540,215	1647,122	1721,883	2850,212	2920,098	3316,144	3498,333
46	717,3316	1069,348	1234,395	--	--	1416,449	1472,115	1540,169	1647,155	1721,885	2850,223	2919,914	3316,566	3498,66
48	717,3377	1069,314	1234,36	--	--	1416,437	1472,074	1540,125	1647,145	1721,895	2850,214	2919,831	3316,696	3498,929
50	717,3446	--	1234,322	--	--	--	1472,042	1540,084	1647,125	1721,864	2850,247	2919,694	3317,098	3499,389
52	717,3512	1069,294	1234,283	--	--	1416,453	1471,996	1540,021	1647,146	1721,883	2850,245	2919,681	3317,4	3499,582
54	717,3596	1069,271	1234,246	--	--	1416,451	1471,954	1539,961	1647,132	1721,894	2850,239	2919,685	3317,613	3499,733
56	717,3691	1069,257	1234,205	--	--	1416,468	1471,914	1539,903	1647,157	1721,88	2850,233	2919,779	3317,966	3500,085
58	717,3806	1069,251	1234,176	--	--	1416,455	1471,872	1539,832	1647,149	1721,91	2850,248	2919,869	3318,304	3500,142
60	717,3912	--	1234,127	--	--	--	1471,844	1539,771	1647,156	1721,903	2850,261	2919,721	3318,652	3503,254
62	717,4044	1069,221	1234,081	--	--	1416,471	1471,795	1539,675	1647,174	1721,92	2850,244	2919,864	3319,046	3503,461
64	717,418	--	1234,036	--	--	--	1471,76	1539,617	1647,175	1721,956	2850,242	2919,999	3319,365	3503,592
66	717,434	1069,204	1233,984	--	--	1416,505	1471,721	1539,498	1647,17	1721,96	2850,253	2919,884	3319,766	3503,741
68	717,4526	--	1233,941	--	--	--	1471,694	1539,471	1647,159	1721,994	2850,252	2919,96	3320,169	3503,823
70	717,4719	1069,198	1233,894	--	--	1416,532	1471,641	1539,368	1647,191	1722,012	2850,226	2919,992	3320,469	3503,93
72	717,4962	--	1233,842	--	--	--	1471,614	1539,33	1647,188	1722,048	2850,285	2920,096	3320,853	3504,076
74	717,5181	--	1233,794	--	--	--	1471,565	1539,227	1647,199	1722,06	2850,266	2919,857	3321,56	3504,161
76	717,5463	--	1233,741	--	--	--	1471,527	1539,097	1647,237	1722,119	2850,263	2919,964	3322,122	3504,273
78	717,5788	--	1233,686	--	--	--	1471,486	1535,897	1647,216	1722,192	2850,262	2919,928	3322,592	3504,401
80	717,6094	--	1233,626	--	--	--	1471,44	1535,729	1647,262	1722,232	2850,265	2920,001	3323,305	3504,449
82	717,6488	1069,252	1233,558	--	--	--	1471,386	1535,554	1647,299	1722,351	2850,271	2919,791	3323,855	3504,518
84	717,6975	--	1233,5	--	--	--	1471,345	1535,394	1647,315	1722,492	2850,306	2920,016	3324,91	3504,626
86	717,7531	1069,423	1233,448	--	--	--	1471,28	1535,278	1647,386	1722,679	2850,334	2919,989	3326,625	3504,727
88	717,8348	--	1233,642	--	--	--	1471,264	1535,264	1647,495	1722,779	2850,729	2920,777	3326,866	3504,706
90	721,4934	1083,372	1239,54	1281,845	1320,308	--	1466,609	1545,279	1653,784	1719,335	2851,335	2920,933	3318,904	3477,195

Tab. 4.1. hodnoty IR spekter čistého 14S24; vlnočet v  $\text{cm}^{-1}$ ; v záhlaví sloupců jsou naznačeny skupiny atomů, které se na daných vibracích podílejí





Obr. 4.2. Grafy závislosti teploty na vlnočtu; první křivka je deformační vibrace – CH<sub>2</sub>-; druhá je valenční vibrace –CH<sub>2</sub>- skupiny; třetí křivka odpovídá valenční vibraci alkanů

Z naměřených hodnot vyplývá, že při tání dochází ke změnám zejména v polární hlavě. Dochází ke zvyšování počtu gauche konformací na úkor trans, což vede k velké pohyblivosti řetězců. Dále je charakteristické pro obsah trans-konformerů poměr intenzity mezi  $\nu_{as}$  okolo  $2920\text{ cm}^{-1}$  a  $\nu_s$   $2850\text{ cm}^{-1}$ , kdy čím menší je tento poměr, tím více je gauche konformerů.

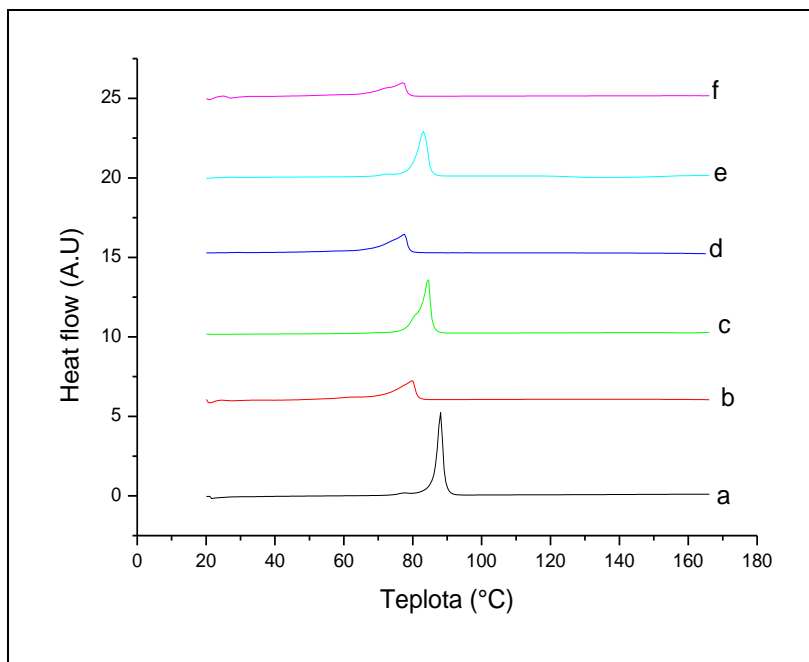
Jestliže je přítomné pásmo  $1350\text{-}1180\text{ cm}^{-1}$  a zároveň pásmo  $1070\text{-}710\text{ cm}^{-1}$ , obě tato pásma se objevila u analogu 14S24, dochází v methylenových skupinách řetězců mastných kyselin k wagging a twisting – rocking vibracím trans orientovaných  $-\text{CH}_2-$  skupin. Amidy v naší molekule mohou mít trans nebo cis konfiguraci. Jelikož je přítomen pás valenčních vibrací ( $\text{C}=\text{O}$ ) při  $1680\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$  a zároveň valenční vibrace ( $\text{N-H}$ ) okolo  $3300\text{ cm}^{-1}$ , je sekundární amid naší molekuly v konfiguraci trans.

### 4.3. DSC směsi cholesterolu a analogu 14S24

Samotný analog 14S24 taje při  $87,1^\circ\text{C}$ . Hodnota píku při druhém zahřívání je  $79,78^\circ\text{C}$ . Po ochlazení a opětovném zahřátí došlo k posunu teploty tání lipidu směrem k nižší hodnotě. Zároveň se objevila zřetelná pretransice při  $62,18^\circ\text{C}$ , která při prvním zahřátí nebyla.

Při koncentraci 2:8 (cholesterol:14S24) je při prvním zahřátí hodnota hlavního píku  $84,5^\circ\text{C}$ . Zároveň se objevuje malá pretransice, o hodnotě  $69,48^\circ\text{C}$ , která je endotermní a exotermní transice při  $160,1^\circ\text{C}$ . Při druhém zahřívání je teplota tání hlavního píku  $78,36^\circ\text{C}$  a i zde se objevuje malá pretransice při  $58,79^\circ\text{C}$ .

Směs o koncentraci 3:7 (cholesterol:14S24) vykazuje tři transice při prvním zahřátí. Hodnota hlavního píku je  $83,7^\circ\text{C}$ , endotermní pretransice se objevuje při  $73,34^\circ\text{C}$ , exotermní transice má hodnotu  $136,03^\circ\text{C}$ . Při druhém zahřátí je hodnota hlavního píku  $76,8^\circ\text{C}$  a od této koncentrace začíná mizet pretransice.



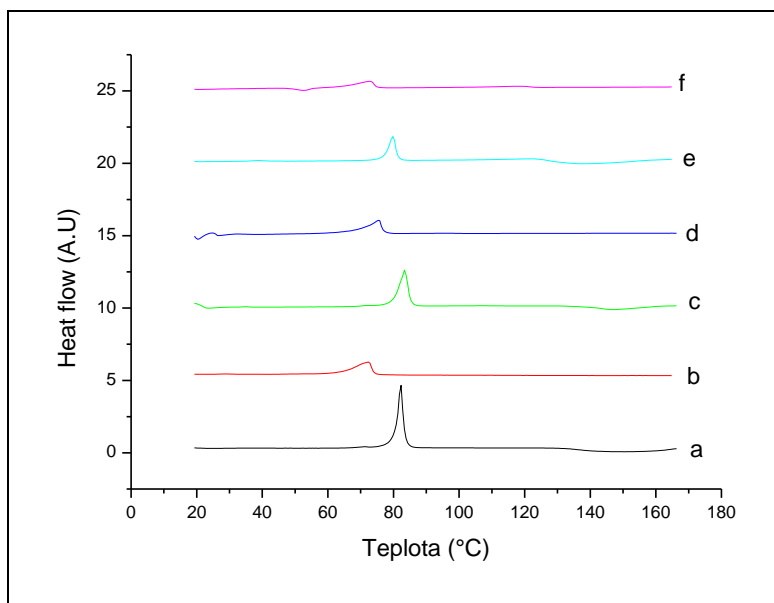
Obr. 4.3. První a druhé zahřátí směsi cholesterolu a analogu 14S24 měřeno pomocí DSC

a)první zahřátí samotný analog; b)druhé zahřátí samotný analog; c)první zahřátí směsi v poměru 2:8; d)druhé zahřátí směsi v poměru 2:8; e)první zahřátí směsi v poměru 3:7; f)druhé zahřátí směsi v poměru 3:7

Při koncentraci směsi 4:6 (cholesterol:14S24) se u prvního zahřátí opět vyskytují tři transice. Endotermní pretransice při 71,19°C, hlavní pík při 82,35°C a exotermní transice při 150,23°C. Po druhém zahřátí se objevila pouze jedna jediná transice, teplota tání směsi při 73,9°C.

První zahřátí směsi v poměru 5:5 vykazuje opět tři transice. Endotermní pretransice při 72,6°C, hlavní pík při 83,6°C a hodnota exotermní transice je 147,2°C. Při druhém zahřátí této směsi se vyskytla pouze jedna transice při 75,8°C.

Koncentrace směsi 6:4 (cholesterol :14S24) obsahuje stále tři transice. Hodnota endotermní pretransice je 40,5°C, hlavního píku je 81,5°C a exotermní transice 139,49°C. Při druhém zahřátí dané směsi se s poprvé začíná objevovat exotermní pretransice, která má hodnotu u této koncentrace 54,3°C. Teplota tání hlavního píku je 74,6°C. Zároveň se začíná objevovat endotermní pík při vyšší teplotě 119,92°C. Tyto tři transice druhého zahřátí se pak objevují i u dalších vzrůstajících koncentrací cholesterolu ve směsi.



Obr. 4.4. První a druhé zahřátí směsi cholesterolu a analogu pomocí DSC  
 a) první zahřátí směsi v poměru 4:6; b) druhé zahřátí směsi v poměru 4:6; c) první zahřátí směsi v poměru 5:5; d) druhé zahřátí směsi v poměru 5:5; e) první zahřátí směsi v poměru 6:4; f) druhé zahřátí směsi v poměru 6:4

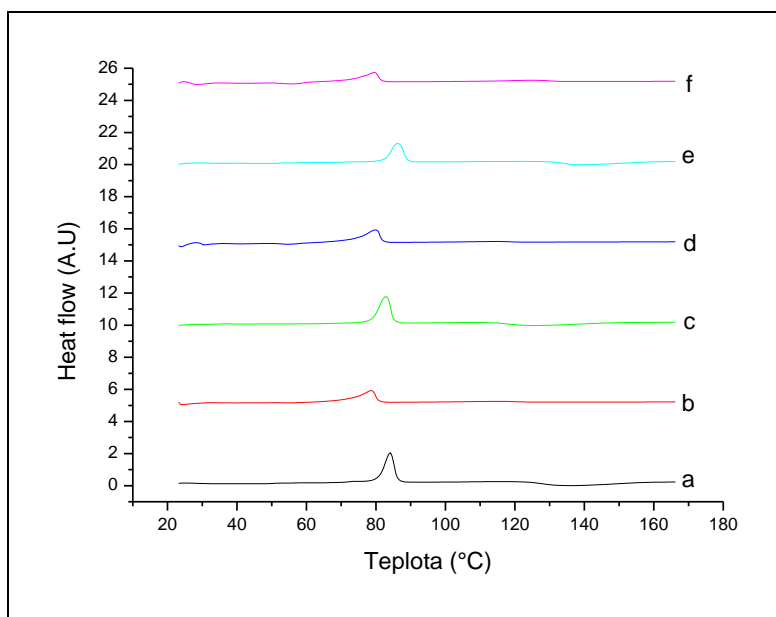
První zahřátí koncentrace 6,5:3,5 (cholesterol:14S24) obsahuje opět tři transice. Hodnota endotermní pretransice je 72,45°C, hlavního píku 82,9°C, a exotermní transice 134,34°C. Při druhém zahřátí této směsi se opět vyskytují tři transice. Malá exotermní pretransice při 51,94°C, teplota tání hlavního píku je 75,88°C a druhý endotermní pík má vrchol při 113,07°C.

Při koncentraci 7:3 (cholesterol:14S24) se u prvního zahřátí objevují tři transice. První malá pretransice je oproti dřívějším koncentracím už méně zřetelná a má hodnotu 70,35°C. Hodnota hlavního píku je 82,76°C a hodnota exotermního píku 125,69°C.

Druhé zahřátí obsahuje též tři transice. Exotermní pík při 50,96°C, hlavní pík při 76,41°C, druhý endotermní pík při 111,11°C.

Koncentrace 7,5:2,5 (cholesterol:14S24) obsahuje při prvním zahřátí endotermní pretransici 72,13°C, endotermní hlavní pík 83,05°C a exotermní transici 135,68°C.

Při druhém zahřátí této směsi se objevuje exotermní pík při 52,92°C, hlavní endotermní pík při 76,41°C a druhý endotermní pík při 121,35°C.

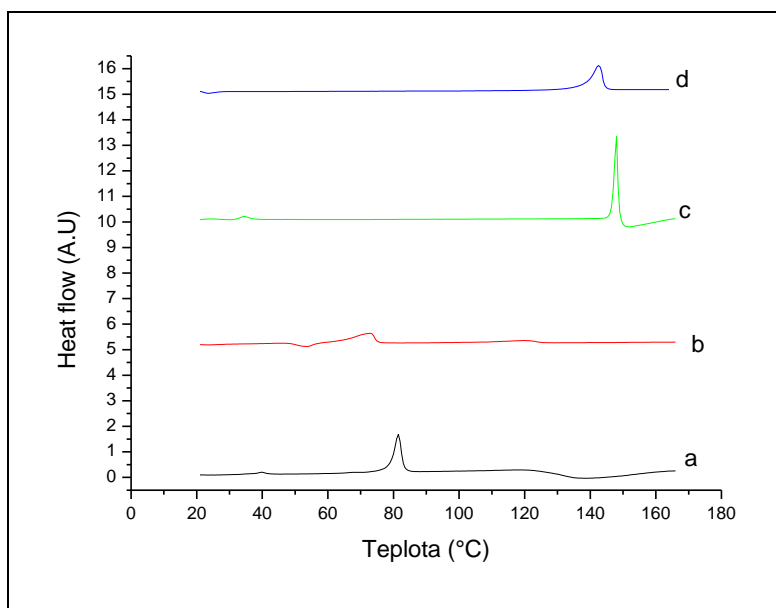


Obr. 4.5. První a druhé zahřátí směsi cholesterolu a analogu pomocí DSC  
 a)první zahřátí směsi v poměru 6,5:3,5; b)druhé zahřátí směsi v poměru 6,5:3,5;  
 c)první zahřátí směsi v poměru 7:3; d)druhé zahřátí směsi v poměru 7:3; e)první  
 zahřátí směsi v poměru 7,5:2,5; f)druhé zahřátí směsi v poměru 7,5:2,5

Při koncentraci 8:2 (cholesterol:14S24) se u prvního zahřátí objevuje úplně nový endotermní pík, při teplotě 39,83°C, pak opět endotermní pretransice 68,34°C, hlavní pík při 81,49°C a exotermní transice při teplotě 138,8°C. Druhé zahřátí již malou endotermní pretransici při nízkých teplotách neobsahuje. Vyskytují se tři transice. Exotermní pík při 53,4°C, první hlavní endotermní pík při 72,94°C, druhý endotermní pík při 119,92°C.

Samotný cholesterol taje při 148,59°C a zároveň se objevuje ještě tzv. pevný/pevný (endotermní) přechod při 34,91°C. Exotermní end, který se vyskytl při našem měření bude zřejmě jen nějaká chyba. Cholesterol při druhém zahřívání taje při 144,6°C.

Vzhledem k tomu, že cholesterol je součástí všech biomembrán, je velmi dobře prostudovaný různými fyzikálními a chemickými metodami. Cholesterol existuje ve dvou polymorfních formách, které se od sebe pouze nepatrně liší. Proto naše DSC-křivka vykazuje jeden přechod při 35,1°C a druhá transice má hodnotu 148,5°C. Vyšší hodnota je hodnota tání cholesterolu, tj. přechod z krystalické fáze do fáze tekuté.



Obr. 4.6. První a druhé zahřátí směsi cholesterolu a analogu pomocí DSC  
 a) první zahřátí směsi v poměru 8:2; b) druhé zahřátí směsi v poměru 8:2; c) první zahřátí samotného cholesterolu; d) druhé zahřátí samotného cholesterolu

Z DSC křivek lze vyčíst, že ať už je přítomna ve směsi jakákoliv koncentrace cholesterolu, pokaždé se objeví malá pretransice před hlavním píkem. Zároveň se objeví i exotermní přechod.

Teplota tuhnutí s klesající koncentrací analogu 14S24 klesá přibližně k 40% obsahu analogu a pak opět stoupá.

Z druhého zahřátí je zřetelné, že dochází k posunu teploty tání směsi směrem k nižším teplotám oproti prvnímu zahřátí. Na křivkách se zároveň před hlavním píkem objevuje malá endotermní pretransice. Ta ovšem se zvyšující se koncentrací cholesterolu mizí. Objevuje se ale úplně nová, jiná a to exotermní pretransice právě při vysokých koncentracích cholesterolu. Ta vzniká v důsledku nadbytku cholesterolu ve směsi. Od 60% cholesterolu se zároveň začíná objevovat endotermní pík okolo 120°C, což je dotávání cholesterolu.

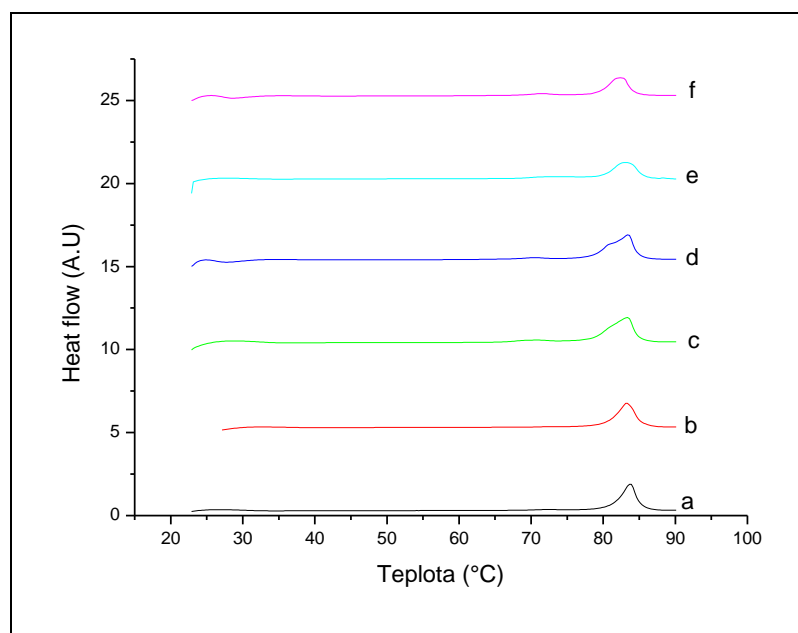
#### 4.4. DSC hydratované směsi cholesterolu a 14S24

Veškeré transice byly endotermní.

Teplota tání hydratovaného samotného 14S24 byla při prvním zahřátí 83,8°C a zároveň se objevuje malá pretransice při 72,55°C. Teplota tání při druhém zahřátí byla 83,2°C. Pretransice byla menší a objevila se při 73,06°C.

Při koncentraci směsi 2:8 (cholesterol:14S24) se objevily dvě transice. Teplota tání směsi je 80,5°C a pretransice se objevila při 67,74°C. Při druhém zahřátí byla teplota tání opět 80,5°C, pretransice se objevila při 67,6°C.

Teplota tání směsi o koncentraci 3:7 je při prvním zahřátí 79,8°C a pretransice při 69,2°C. Teplota tání po druhém zahřátí je 78,5°C, pretransice 68,5°C.



Obr. 4.7. První a druhé zahřátí hydratované směsi cholesterolu a analogu pomocí DSC

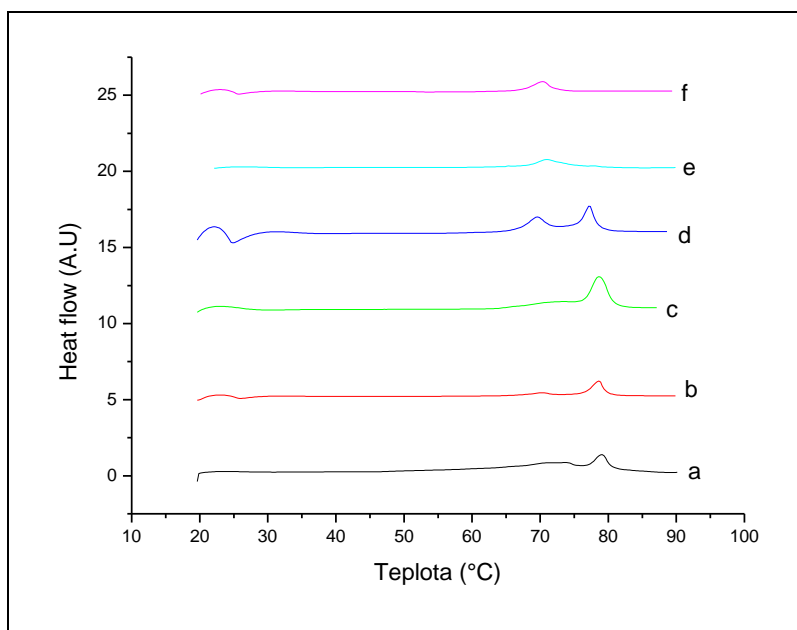
a)první zahřátí samotného analogu; b)druhé zahřátí samotného analogu; c)první zahřátí směsi v poměru 2:8; d)druhé zahřátí směsi v poměru 2:8; e)první zahřátí směsi v poměru 3:7; f)druhé zahřátí směsi v poměru 3:7

Při koncentraci 4:6 (cholesterol:14S24) se objevila u prvního zahřátí jedna velká transice, teplota tání směsi 79,0°C a pak se objevil pík o dvou vrcholech o hodnotě 71,4°C a 73,6°C.. Při druhém zahřátí je teplota tání směsi 78,7°C, pretransice 70,4°C.

Koncentrace směsi 5:5 už obsahuje pouze dvě transice. Při prvním zahřátí je hodnota hlavního píku 79,5°C a pretransice 74,1°C. Při druhém zahřátí je teplota tání 78,77°C a pretransice 70,9°C.

Vzhled DSC křivky směsi o poměru 6:4 (cholesterol:14S24) je jak při prvním, tak při druhém zahřátí podstatně jiný. Při prvním zahřátí byla teplota tání při 71,2°C a zároveň se objevila pretransice při 65,6°C a posttransice při 78,1°C. Při druhém zahřátí byla teplota tání 70,9°C a zároveň se objevil malý exotermní (všechny ostatní

jsou endotermní) pík při 54,4°C. Možná se jedná o nějaký zvláštní fázový přechod v molekule analogu, nebo může jít i o chybu měření.



Obr. 4.8. První a druhé zahřátí hydratované směsi cholesterolu a analogu pomocí DSC

a)první zahřátí směsi v poměru 4:6; b) druhé zahřátí směsi v poměru 4:6; c)první zahřátí směsi v poměru 5:5; d)druhé zahřátí směsi v poměru 5:5; e)první zahřátí směsi v poměru 6:4; f)druhé zahřátí směsi v poměru 6:4

Při poměru směsi 6,5:3,5 (cholesterol:14S24) se objevily opět pouze dvě transice. Teplota tání směsi při prvním zahřátí je 78,9°C a pretransice při 72,7°C.

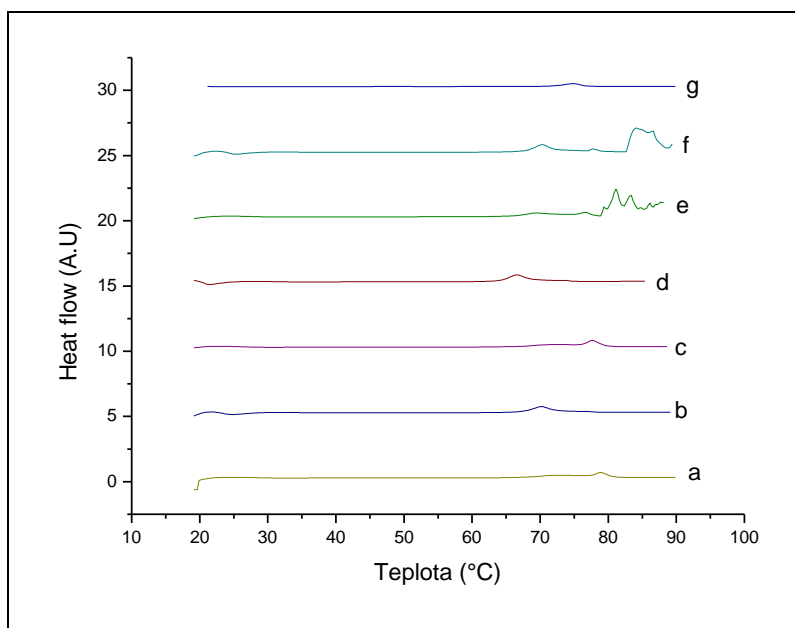
Teplota tání směsi při druhém zahřátí byla 71,0°C a objevila se posttransice při 78,01°C.

Koncentrace směsi 7:3 obsahovala opět dvě transice. Při prvním zahřátí byla teplota tání 79,02°C a pretransice při 74,15°C. Při druhém zahřátí byla hodnota hlavního píku 71,17°C a objevila se posttransice při 78,0°C.

Při poměru směsi 8:2 (cholesterol:14S24) se vyskytly v závěru DSC – křivky různé píky. Lze najít při prvním zahřátí opět dvě transice, první je při 71,2°C a druhá při 78,4°C. A při druhém zahřátí se též vyskytly dvě transice, první při 70,9°C a druhá při 78,3°C.

Hydratovaný cholesterol taje při 75,2°C. Objevil se pouze jeden zřetelný pík.





Obr.4.10. První a druhé zahřátí hydratované směsi cholesterolu a analogu pomocí DSC

a)první zahřátí směsi v poměru 6,5:3,5; b)druhé zahřátí směsi v poměru 6,5:3,5; c)první zahřátí směsi v poměru 7:3; d)druhé zahřátí směsi v poměru 7:3; e)první zahřátí směsi v poměru 8:2; f)druhé zahřátí směsi v poměru 8:2; g)první zahřátí samotného cholesterolu

Z měření vyplývá následující:

Hydratace snižuje teplotu tání u všech vzorků oproti nehydratovaným.

Hodnota hlavního píku při prvním a druhém zahřátí je téměř stejná, nedochází tudíž jako u nehydratovaného vzorku k nějakému posunu.

Se vzrůstající koncentrací cholesterolu opět klesá teplota tání směsi, přibližně k 40% hmotnostnímu obsahu analogu ceramidu 14S24.

Na všech křivkách je evidentní pretransice, která se se vzrůstající teplotou zvětšuje a hlavní pík se zmenšuje.

Se vzrůstající koncentrací tuhne vzorek později, tj. při nižších teplotách, ovšem od 60% koncentrace cholesterolu jsme již nedostali reprodukovatelné DSC křivky

U cholesterolu mizí s hydratací přechod při 35,1°C.

Hydratovaný cholesterol taje při 75,1°C. Jedná se o přechod cholesterol monohydrátu na krystalický cholesterol, který pak existuje v nadbytku vody. Tvoření cholesterol monohydrátu je časově závislé, což bylo dokázáno na pokusu, kdy pokud byl vzorek po prvním zahřátí bezprostředně opět zahříván, vznikl pík při 39°C, ovšem při 24 hodinovém uskladnění vznikl opět pouze pík při 75,2°C.

## 5. Diskuze

### 5.1. Samotný analog 14S24

#### DSC

Pro DSC měření směsi cholesterolu a ceramidového analogu 14S24 bylo důležité zjistit nejdříve termotropní chování samotného analogu při různých rychlostech. Výsledky z těchto DSC –křivek nám pomohly určit rychlost vhodnou pro naše další měření.

Z obr.4.1 je evidentní, že se molekula analogu 14S24 nachází na počátku měření v určité fázi, konformaci, která se ale mění se vzrůstající teplotou. Dochází ke změnám ve struktuře molekuly, tj. k překrystalování a při určité teplotě k tání.

Z grafů pak můžeme vysledovat, že termotropní chování analogu 14S24 je závislé na rychlosti zahřívání. Dochází ke změnám DSC – křivek a to tak, že při nejvyšší rychlosti 5K/min se objevuje pouze jeden pík ( $87,1^{\circ}\text{C}$ ), tj. teplota tání samotného ceramidového analogu 14S24. Se snižováním rychlosti zahřívání se začínají objevovat i dva další fázové přechody. První přechod o nižší teplotě bude nějaká změna v krystalové struktuře lipidu a druhý přechod, tj. hodnota hlavního píku je tání lipidu. Zároveň došlo s nižší rychlostí zahřívání ke vzestupu teploty tání lipidu z  $87,1^{\circ}\text{C}$  na  $93,5^{\circ}\text{C}$ .

S klesající rychlostí (poprvé při  $0,4\text{K/min}$ ) se začíná objevovat exotermní pík.

Snižováním rychlosti zahřívání mohl přístroj detekovat změny ve struktuře molekuly, které při vyšších rychlostech nejsou tak zřetelné a proto se nám při 5K/min objevil jeden jediný jasný pík. Tuto rychlost jsme použili pro měření termotropního chování směsi cholesterolu a analogu.

#### IR

IR – spektra nám umožňují určit krystalickou mřížku lipidu. Z naměřených hodnot vyplývá že se v případě analogu 14S24 zřejmě jedná o triklinickou (příp. hexagonální) strukturu. Usuzujeme tak proto, že se nám objevují deformační vibrace  $-\text{CH}_2-$  skupiny, tzv. rocking a zároveň se vyskytují i vlnočty v oblasti  $2850\text{ cm}^{-1}$ . Na jednu subcelu tak připadá jen jeden řetězec, což odpovídá hexagonálnímu uspořádání.

IR spektroskopie je výhodná hlavně pro polární skupiny a v našem případě nám umožňuje sledovat změny v polární hlavě lipidu. Z výsledků vyplývá, že dochází ke zvyšování gauche konformací na úkor trans, což vede k velké pohyblivosti řetězců.

Pro obsah trans-konformerů je důležitý poměr intenzity mezi  $\nu_{as}$  okolo  $2920\text{ cm}^{-1}$  a  $\nu_s$   $2850\text{ cm}^{-1}$ . Čím menší je tento poměr, tím více je gauche konformerů.

V methylenových skupinách řetězců mastných kyselin dochází k wagging a twisting – rocking vibracím trans orientovaných  $-\text{CH}_2-$  skupin. Tento závěr vyplývá ze současného výskytu pásma  $1350\text{-}1180\text{ cm}^{-1}$  a zároveň pásma  $1070\text{-}710\text{ cm}^{-1}$ .

Jelikož je přítomen pás valenčních vibrací ( $\text{C}=\text{O}$ ) při  $1680\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$  a zároveň valenční vibrace ( $\text{N-H}$ ) okolo  $3300\text{ cm}^{-1}$ , je sekundární amid naší molekuly v konfiguraci trans.

Obecně výsledky z IR- spekter korelují s výsledky z DSC (obr. 4.2).

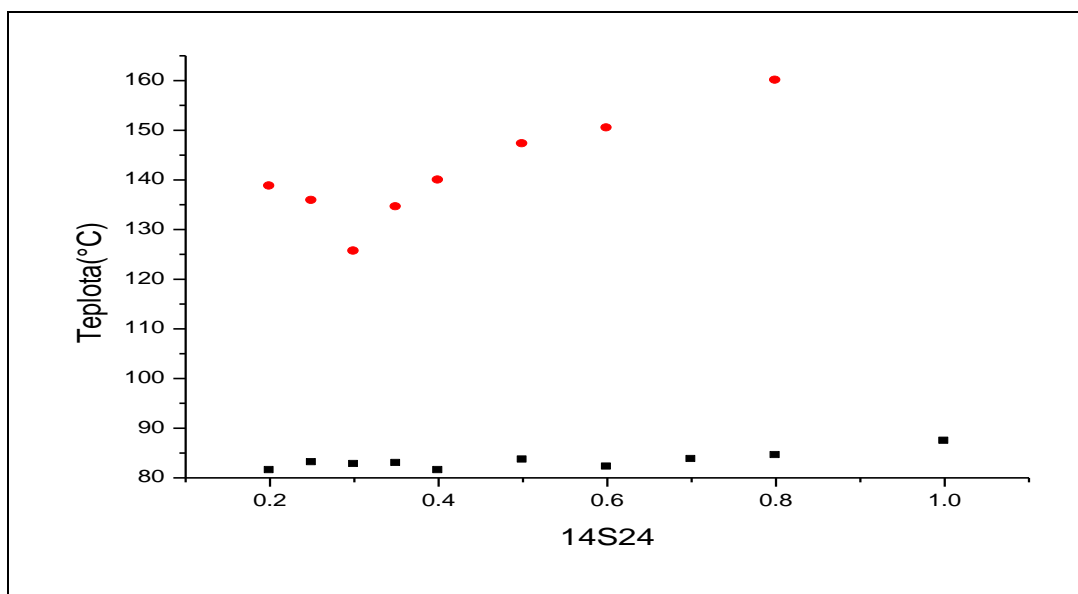
## 5.2. Směs cholesterolu a ceramidového analogu 14S24

### Nehydratované vzorky

Z DSC křivek lze vyčíst, že ať už je přítomna ve směsi jakákoliv koncentrace cholesterolu, pokaždé se objeví malá pretransice před hlavním píkem. Zároveň se objeví i exotermní třetí fázový přechod. Při druhém zahřátí vždy došlo k poklesu teploty tání směsi.

Teplota tuhnutí s klesající koncentrací analogu 14S24 klesá přibližně k 40% obsahu analogu a pak opět stoupá.

Z hodnot teploty tání lipidu a exotermní třetí fázové transice jsme vytvořili graf závislosti koncentrace směsi na hodnotách teplot těchto píků (obr.5.1). Z grafu jsme pak vyčetli, že při 30% obsahu 14S24 došlo ke vzniku eutektické směsi.



Obr. 5.1. Eutektikum

### Hydratované vzorky

Hydratace snižuje teplotu tání u všech vzorků ve srovnání s nehydratovanými. Při prvním a druhém zahřátí je hodnota hlavního píku téměř stejná. Nedochází k posunu teploty tání směsi jako u nehydratovaného vzorku.

Na všech křivkách je evidentní pretransice, která se se vzrůstající teplotou zvětšuje a hlavní pík se zmenšuje

Se vzrůstající koncentrací tuhne vzorek později, tj. při nižších teplotách, ovšem od 60% koncentrace cholesterolu jsme již nedostali reprodukovatelné DSC křivky.

U cholesterolu mizí s hydratací přechod při 35,1°C.

Cholesterol taje při 75,1°C, jedná se o přechod cholesterol monohydrátu na krystalický cholesterol, který pak tedy existuje v nadbytku vody. Tvoření cholesterol monohydrátu je časově závislé, což bylo dokázáno na pokusu, kdy se na DSC křivce po prvním zahřátí, ztuhnutí a opětovném zahřátí, objevil i pík při 39°C, ovšem při 24 hodinovém uskladnění vznikl opět pouze pík při 75,2°C.

## 6. Závěr

Termotropní chování směsi ceramidového analogu 14S24 s cholesterolem bylo studováno pomocí DSC metody a zároveň bylo vyhodnoceno IR- spektrum samotného analogu 14S24.

V závislosti na koncentraci jednotlivých složek směsi docházelo k posunům teplot tání a i k dalším fázovým přechodům. Z měření jsme zjistili hodnotu eutektické směsi, v níž je poměr obsahu analogu 14S24/cholesterolu 0,3/0,7.

Bylo zjištěno, že také hydratace má vliv na termotropní chování směsi. Došlo k posunu teplot tání směsi směrem k nižším hodnotám oproti nehydratovaným vzorkům.

Výsledky z IR-spekter korelovali s hodnotami z DSC. Teplota, při níž při IR měření docházelo ke změnám ve struktuře analogu 14S24 odpovídala teplotám tání naměřených pomocí DSC.

## 7. Literatura

1. Berardesca E., Barbareschi M., Veraldi S., Pimpinelli N.: *Evaluation of efficacy of a skin lipid mixture in patients with irritant contact dermatitis, allergic contact dermatitis or atopic dermatitis: a multicenter study.* Contact dermatitis 45; 280-285, 2001
2. Choi M.J., Maibach H.I.: *Role of Ceramides in Barrier Function of Healthy and Diseased Skin.* Am J Clin Dermatol 6; 215-223, 2005
3. Coderch L, Lopez O, de la Maza A, Parra JL.: *Ceramides and skin function.* Am J Clin Dermatol 4; 107–129, 2003
4. Engedal N., Saatcioglu F.: *Ceramide – Induced Cell Death in the Prostate Cancor cell Line LNCaP has Both Necrotic and Apoptotic Features.* The Prostate 46; 289-297, 2001
5. Günzler H., Heise H.M.: *IR- Spektroskopie, Dritte, neubearbeitete Auflage.* VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1996
6. Hamilton R.J., Cast J.: *Spectral Properties of Lipids.* Sheffield Academic Press, 1999
7. Jager M.W.de, Gooris G.S., Dolbnya I.P., Bras W., Ponec M., Bouwstra J.A.: *Novel lipid mixtures based on synthetic ceramides reproduce the unique stratum corneum lipid organization.* Journal of Lipid Research, Vol.45; 923-932, 2004
8. Neubert, R. H. H., Wohlrab, W. A., Marsch, W. Ch.: *Dermatopharmazie.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2001
9. Onyou H., Guncheol K., Yeon J. J., Seong W. K., Guiyong C., Hyun J. C., Seon Y.J., Don G. L., Jae D. L.: *Synthetic Phytoceramides Induce Apoptosis with Higher Potency than Ceramides.* Molecular Pharmacology Vol. 59; 1249-1255, 2001
10. Selzner M., Bielawska A., Morse M. A., Hannes A.R., Sindram D., Hannun Y.A., Clavien P.-A.: *Induction of Apoptotic Cell Death and Prevention of Tumor Growth by Ceramide Analogues in Metastatic Human Colon Cancer.* Cancer Research 61; 1233-1240, 2001
11. Shah J., Atienza J.M., Rawlings A.V., Shipley G.G.: *Physical properties of ceramides: effect of fatty acid hydroxylation.* Journal of Lipid Research, Vol.36; 1945-1955, 1995
12. Struckhoff A. P., Bittman R., Burow M. E., Clejan S., Elliott S., HAammond T., Yan T., Beckman B.S.: *Novel ceramide analogs as Potential*

- Chemotherapeutic Agents in Breast Cancer*. Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics 309; 523-532, 2004
13. Vávrová K., Hrabálek A.: *Role ceramidů v kůži*. Praktické lékárenství 2; 55-58, 2006
  14. Vavrova K, Zbytovska J, Palat K, Holas T, Klimentova J, Hrabalek A, Dolezal P.: *Ceramide analogue 14S24 ((S)-2-tetracosanoylamino-3-hydroxypropionic acid tetradecyl ester) is effective in skin barrier repair in vitro*. Eur J Pharm Sci. 21(5):581-587, 2004
  15. Wegener M., Neubert R., Rettig W., Wartewig S.: *Structure of stratum corneum lipids characterized by FT-Raman spectroscopy and DSC. III. Mixtures of ceramides and cholesterol*. Chemistry and Physics of Lipids 88; 73-82, 1997
  16. Wegener M., Neubert R., Rettig W., Wartewig S.: *Structure of stratum corneum lipids characterized by FT-Raman spectroscopy and DSC. I. ceramides*. International Journal of Pharmaceutics 128; 203-213, 1996
  17. Wertz W.P.: *The nature of the epidermal barrier: biochemical aspects*. Advanced Drug Delivery Reviews 18; 283-294, 1996
  18. Zbytovská J., Kiselev M.A., Funari S.S., Garamus V.M., Wartewig S., Neubert R.: *Influence of phytosphingosine – type ceramides on the structure of DMPC membrane*. Chemistry and Physics of Lipids 138; 69-80, 2005

#### ABSTRAKTY

19. German O.L., Miranda G.E., Abrahan C.E., Rotstein N.P.: *Ceramide is a mediator of apoptosis in retina photoreceptors*. Investigative Ophthalmology and Visual Science 47; 1658-1668, 2006
20. Minutolo F., Sala G., Bagnacani A., Bertini S., Carboni I., Placanica G., Prota G., Rapposelli S., Sacchi N., Macchia M., Ghidoni R.: *Synthesis of a resveratrol analogue with high ceramide-mediated proapoptotic activity on human breast cancer cells*. J Med Chem. 48(22); 6783-6, 2005
21. Takai N., Ueda T., Kawano Y., Nishida M., Nasu K., Narahara H.: *C2-ceramide exhibits antiproliferative activity and potently induces apoptosis in endometrial carcinoma*. Oncol Rep. 14(5); 1287-91, 2005