

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

**STUDIUM TERMOTROPNÍHO CHOVÁNÍ CERAMIDU 2
A JEHO SMĚSÍ S CHOLESTEROLEM**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Dr. rer. nat. Jarmila Zbytovská

Hradec Králové 2007

autor: Klára Voršílková

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

V Hradci Králové 14. května 2007

.....

podpis

Obsah

1. Úvod
 2. Cíl práce
 3. Teoretický úvod
 - 3.1. Stavba kůže
 - 3.2. Stratum corneum
 - 3.3. Organizace lipidové matrix ve stratum corneum
 - 3.4. Další funkce ceramidů
 - 3.5. Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)
 - 3.6. Infračervená spektrometrie (IR)
 4. Metody a materiály
 - 4.1. Použité chemikálie
 - 4.2. DSC
 - 4.3. IR
 5. Výsledky
 6. Diskuze
 7. Závěr
- Literatura
- Seznam použitých zkratk

1.Úvod

Primární funkcí kůže je ochrana před chemickými látkami, patogeny a ultrafialovým (UV) zářením. Kůže dále hraje důležitou roli v termoregulaci a vodní rovnováze organismu. Kůže je orgán mající funkci smyslovou, endokrinní a imunitní. Funkce ochranná je zabezpečena bariérovými vlastnostmi(1). Zjištění, že kožní bariéra je situována ve stratu corneum a že ji určují především lipidy v intracelulárních prostorech této vrstvy pochází teprve z roku 1944 od Winsdora a Burche (2).

Nejstarším důkazem významu mezibuněčných lipidů pro bariérovou funkci kůže jsou pokusy z roku 1970, kdy byl pozorován značný nárůst propustnosti kůže po extrakci lipidů strata cornea organickými rozpouštědly (1,2).

V roce 1975 pak bylo prokázáno, že hlavní složkou bariérových lipidů jsou ceramidy (1,2).

Studium fyzikálně-chemických vlastností složek strata cornea je velmi důležité pro pochopení jeho bariérové funkce a možnosti cíleně zasáhnout tyto struktury kůže s cílem ovlivnit je a bariérovou funkci dočasně pozměnit. Toho se pak využívá pro transdermální absorpci. Transdermální podání je aplikace léčiva přes kůži za účelem dosažení systémových hladin, čímž se odlišuje od dermální aplikace, kde je cílem průnik léčiva do hlubších vrstev kůže (3).

Průnik léčiva kůží může probíhat několika způsoby jako jsou:

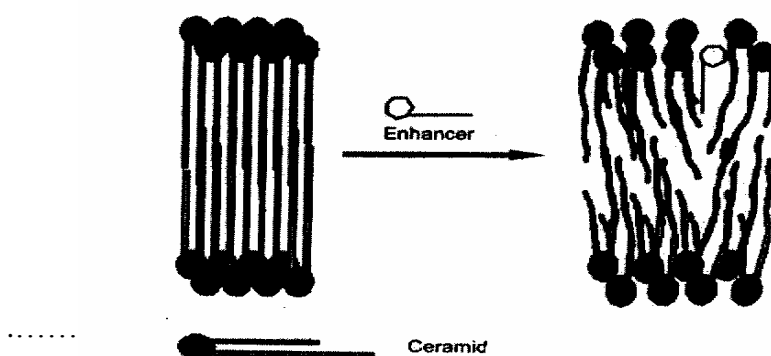
- transepidermální cesta - intercelulární (mezibuněčnými prostory) a transcelulární (přes buňky)
- transadnexární cesta - transglandulární (skrze žlázky) a transfolikulární

Základním mechanismem průniku je pasivní difúze (4).

Hlavní výhody transdermální aplikace jsou:

1. - snadná aplikace (při možnosti volného pohybu pacienta)
- snížená frekvence dávkování.
2. - absorpce léčiva není primárně ovlivněna denním režimem pacienta
tzn. (množství, skladba, kvantum a intervaly přijímání potravy a
řada dalších běžných aktivit).
3. - vyloučení „first pass efektu“ jater, což vede ke zvýšení jeho
biologické dostupnosti a následnému snížení potřebné dávky.
4. - snížené riziko předávkování, stabilnější plazmatické hladiny,
snadné a rychlé přerušení aplikace (3,4).

Urychlovače transdermální permeace dočasně snižují bariérovou funkci kůže. Interagují s lipidovými součástmi stratum corneum (Obr.1.1) nebo s korneocyty. Tyto látky jsou schopny dočasně ovlivnit „tmel“ vyplňující intercelulární prostor mezi korneocyty, případně pozměnit korneocyty jejich hydratací, denaturací přítomného keratinu. Tímto způsobem usnadňují transdermální podání léčiva (5)



Obr.1.1. Mechanismus působení transdermálních urychlovačů (5).

Patologicky poškozená kožní bariéra rovněž vede ke zvýšené permeabilitě kůže (např. psoriáza, ichtyóza, atopická dermatitida). Změna bariérových funkcí však nastává i s věkem, stresem a působením UV zářením (2,6).

V současnosti existuje řada metod, kterými může být stratum corneum a jeho jednotlivé složky zkoumány. Těmi hlavními jsou rentgenová difrakce, IR (infračervená spektroskopie) a Ramanova spektroskopie, nukleární magnetická rezonance, kalorimetrie, elektronové mikroskopické metody a podobně (1).

2. 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 (7).

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

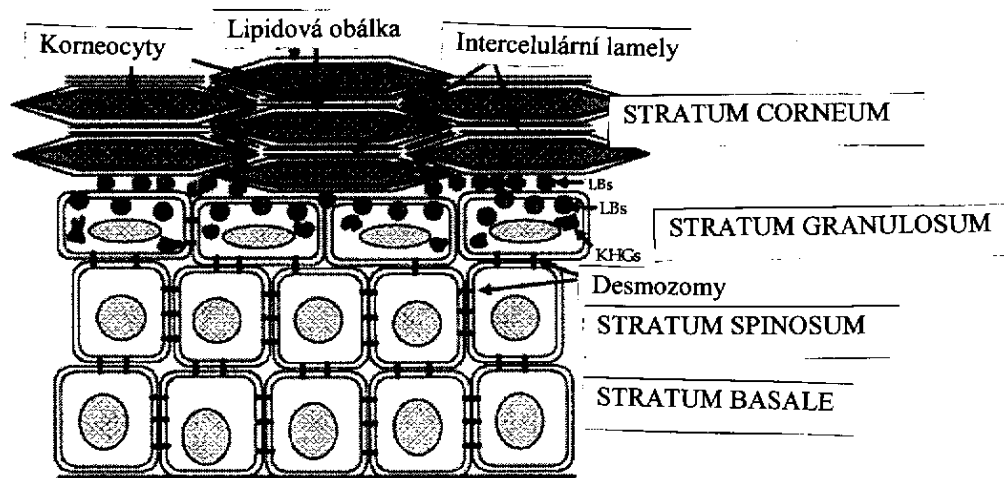
Hlavním úkolem pak bylo sestavení fázového diagramu pro směs Cer [NS] /cholesterol.

3. Teoretický úvod

3.1. Stavba kůže

Kůže je největší lidský orgán, jehož povrch je 1,5 až 1,8 m² a jeho hmotnost je 4,3 až 5 kg. Kůže se skládá ze dvou základních vrstev : dermis a epidermis (8). Dermis je tvořena fibroblasty z extracelulární matrix a je zásobená kapilárami a nervovým zakončením, představuje fyziologickou podporu pro vnější, avaskulární epidermis. Epidermis je složena především z keratinocytů, dále pak melanocytů, Langerhansenových buněk a Merkeliho buněk (5).

Epidermis můžeme rozdělit na čtyři základní vrstvy: stratum basale, spinosum, granulosum a stratum corneum (Obr. 3.1). Tyto vrstvy představují různá stadia diferenciací buněk, které jsou vytvářeny z kmenových buněk v bazální vrstvě na hranici epidermis a dermis a migrují směrem ke kožnímu povrchu, kde v tomto směru ubývá kyslík a živiny, dochází ke změnám buněčných struktur, zplošťování buněk a akumulaci keratinu a lipidů. Tento proces zrání epidermálních buněk, jehož výsledkem je kompletní kožní bariéra, se nazývá keratinizace. Celkově se celá epidermis obnoví za 30 dní, z toho 15 dní trvá obnova stratum corneum (2).



Obr.3.1 Základní vrstvy epidermis: stratum corneum, granulosum, spinosum a stratum basale. LBs: lamelární tělíska, KHGs: keratohyalinní granula (1)

Stratum basale je nejvnitřnější epidermální vrstvou, která je tvořena jednou vrstvou sloupcovitých basálních buněk, připevněných k podkladu membrány a navzájem spojených desmozomy.

Stratum spinosum je další epidermální vrstva, kde jsou buňky spojené desmosomy a první vrstva, kde mohou být detekována lamelární tělíska (také nazývána keratinosomy, nebo Odlandova tělíska) a keratinová vlákna.

Ve *stratum granulosum* kvantitativně vzrůstá výskyt keratinu. Keratinová granula obsahují proteiny a dávají název této vrstvě. V této i vyšší vrstvě se dále nachází lamelární tělíska.

Stratum corneum je nejsvrchnější vrstva kůže, která je složena z korneocytů a lipidové matrix a je zodpovědná za bariérovou funkci kůže (1).

3.2.Stratum corneum (SC)

Struktura SC se často popisuje jako „cihly a malta“ a představuje dobře postavenou zeď. Korneocyty (cihly) vytvářející nesouvislou složku a jsou zapuštěné v souvislou lipidovou matrix (malta). Lidské SC obsahuje obvykle 15 až 20 vrstev. Korneocyty mají hexagonální tvar ,velikosti 20 až 40 mikrometrů (bazální buňky jsou veliké 6 až 8 mikrometrů). Mezi další specifické rysy korneocytů je korneocytární obálka, která je tlustá a nepropustná v poměru s dalšími buňkami membrány vyskytujících se v epidermis. Soudržnost SC je zabezpečena desmozomy (5).

V SC můžeme rozlišit dvě vrstvy. První vrstva, stratum compactum, je mezi buňkami stabilizovaná korneodesmosomy a vytváří tak stabilitu SC. Ve druhé vrstvě nazývané stratum disjunctum dochází k degradaci korneodesmosomů a umožňuje tak deskvamaci (1).

3.2.1.Lipidové složení SC

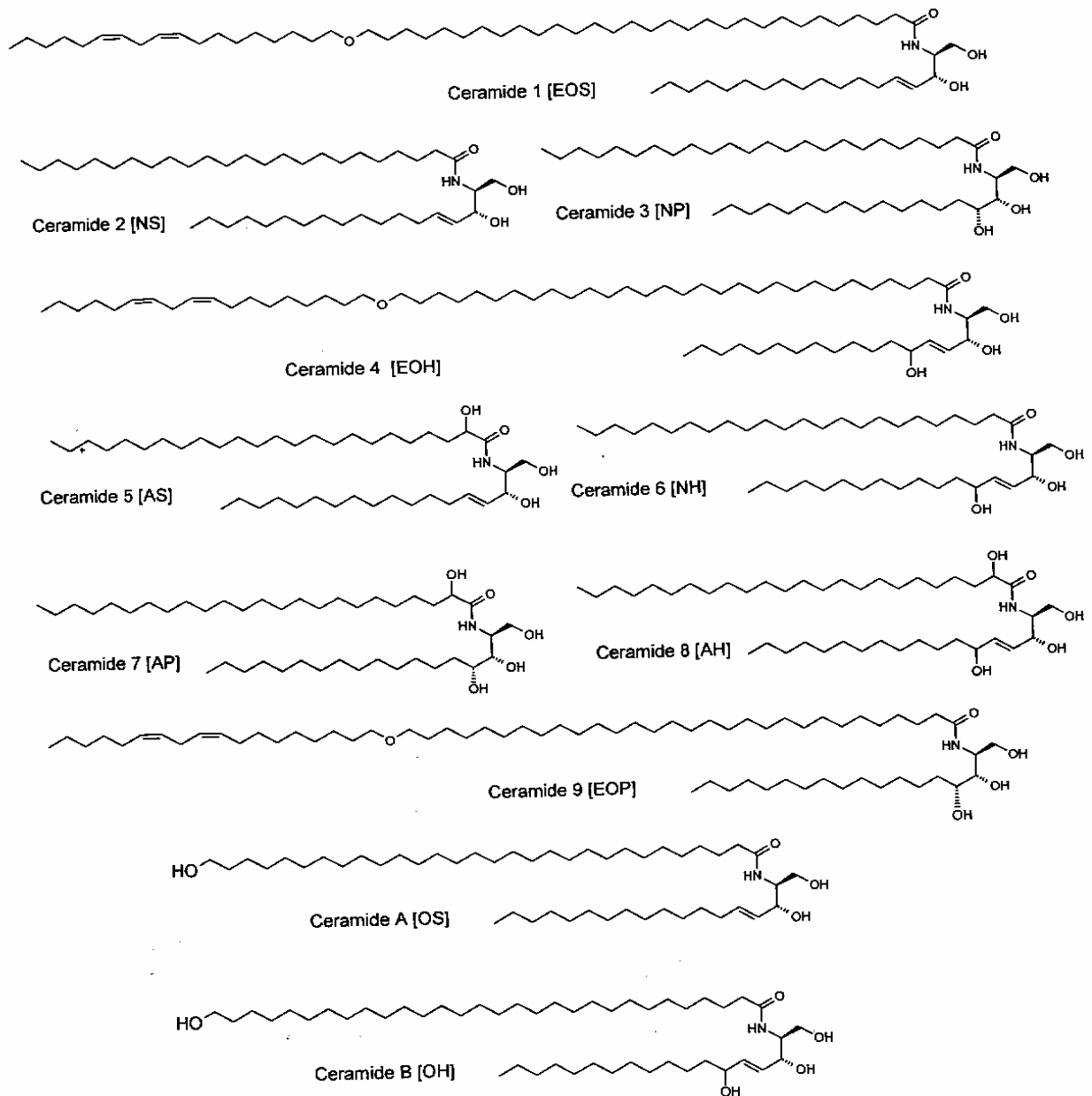
Vlastnosti kožní bariéry závisí na specifickém obsahu a složení lipidů SC, vhodném strukturálním uspořádání intracelulární lipidové matrix a lipidové obálce obklopující korneocyty. V sušině SC se nachází 10-15% lipidů (2). Z celkového množství lipidové hmoty je 50% ceramidů, 25% cholesterolu a 10% volných mastných kyselin. Dále se zde v malém množství nachází estery cholesterolu, sulfát cholesterolu a glukosylceramidy. Zajímavé je, že fosfolipidy, které vytváří hlavní složku biologických membrán, jsou v SC jen ve stopovém množství. Složení lipidové matrix závisí na věku, typu a stavu kůže, tělesné strance i na zvolené metodě využívané k získání vzorku lipidů (9).

3.2.1.1. Ceramidy

Hlavní lipidy SC představuje 9 různých strukturně odlišných ceramidů (Obr. 3.2), lišících se velikostí polární hlavy a průměrnou délkou řetězců. Obecně molekula ceramidu obsahuje polární hlavu a dva hydrofobní řetězce, podobně jako fosfolipidy. Na rozdíl od nich je však polární hlava ceramidu výrazně menší, což umožňuje těsnější uspořádání těchto lipidů v lamele. Ceramidy SC mají navíc podstatně delší hydrofobní řetězce, a nevytvářejí dvojvrstvy, ale několikvrstevné, vzájemně propletené lamelární struktury. Tyto strukturální znaky vysvětlují, proč je prostupnost ceramidových lamel SC tisíckrát nižší, než je tomu u fosfolipidových dvojvrstev (2,5).

Základem ceramidu je bazický alkohol, který může být sfingosin (S), fytosfingozin (P) nebo 6-hydroxysfingosin (H). Na jejich primární aminoskupinu v poloze 2 se amidicky váže mastná kyselina. Mastné kyseliny mohou být nehydroxylovány (N), alfa-hydroxylovány (A), nebo omega hydroxylovány (O), spojeny esterovou vazbou. Délka mastné kyseliny se obvykle pohybuje od 16 až po 34 uhlíků v omega-hydroxylovaných ceramidech, přičemž nejčastěji se vyskytují kyseliny obsahující 24 uhlíků.

Zvlášť významný je ceramid typu 1 (EOS), ceramid typu 4 (EOH) a ceramid 9 (EOP), které obsahují omega-hydroxykyselinu o délce přibližně 30 uhlíků, na jejíž koncový hydroxyl se estericky váže esenciální mastná kyselina, kyselina linoleová. Tyto ceramidy slouží jako molekulární spojky mezi jednotlivými lamelami (2,5).



Obr. 3.2. Vzorce ceramidů v lidském SC (5).

Biosyntéza ceramidů probíhá z jejich prekurzorů glukosylceramidu a sfingomyelinu, které jsou syntetizovány ze serinu a palmitoylkoenzymu A a jsou skladovány v lamelárních granulech. Na rozhraní stratum granulosum a stratum corneum jsou extrudovány z granul, prostřednictvím enzymů glukocerebrozidázy a sfingomyelinázy. Ceramidy spolu s mastnými kyselinami a cholesterolem vytvoří lamely, které zcela vyplní mezibuněčný prostor SC (2).

Patologické stavy SC způsobené abnormálním složením ceramidů

Atopická dermatitida je onemocnění při kterém dochází k výskytu abnormálních ceramidů, změny uspořádání v lamelách a nedostatku kovalentně vázaných ceramidů. Možnou příčinou tohoto jevu může být přítomnost enzymu glukosylceramid-sfingomyelindeacylázy, který degraduje prekuzory ceramidu, dále byla popsána snížená aktivita sfingomyelinázy a zvýšené množství bakterií produkující ceramidázu.

Atopická dermatitida patří bezesporu mezi onemocnění s imunologickým základem a velkou roli zde hraje i poškození kožní bariéry (6).

Psoriáza, nebo-li lupénka je chronické zánětlivé onemocnění kůže charakterizovaný hyperproliferací, poruchami diferenciací keratinocytů a vyšší propustností kůže. Vznik lupénky je možný v každém věku, obě pohlaví jsou postižena stejně. U psoriázy dochází k nižšímu množství ceramidů, včetně kovalentně vázaných, zejména obsahujících fytosfingosin. Snížené množství ceramidů může být způsobeno nižší expresí glukocerebrozidázy (6).

Ichtyóza je další z možných onemocnění způsobených zejména poruchou metabolismu ceramidů, ale také sníženou deskvamací a zvýšenou proliferací keratinocytů. Pod pojmem ichtyóza je zahrnuta rozsáhlá skupina dědičných i získaných hyperkeratóz, pro které je typické ztlustělé a šupinaté stratum corneum.

Akné je také kožní onemocnění při kterém se vyskytují změny ve složení ceramidů, zejména v nižším množství ceramidu EOS (2,6).

Stárnoucí kůže má také vliv na obsah ceramidů, kdy ve věku 41-50 let je množství ceramidů až o polovinu nižší, než u skupiny ve věku 21-30 let a to zejména v obličeji. U stárnoucí kůže byla také popsána nižší schopnost regenerace v závislosti na zhoršené schopnosti syntézy ceramidů de novo i ze sfingomyelinů.

Stres a vyšší dávky UV záření dále ovlivňují syntézu ceramidů, které poškodí kožní bariéru a sníží množství kovalentně vázaného ceramidu. Nižší dávky UV záření naopak zvyšují syntézu ceramidu, což se využívá např. při léčbě atopické dermatitidy (2,6).

Terapie poškozené kožní bariéry

Poškozená kožní bariéra může být obnovena topickou aplikací intercelulárních lipidů. Man a kol. demonstroval topickou aplikaci směsi lipidů stratum corneum tzn. ceramidů, cholesterolu a volných mastných kyselin na poškozenou lidskou kůži a zaznamenal rychlejší obnovu poškozené bariéry funkce stratum corneum. Důležitá je aplikace všech tří lipidů pro homeostázu kožní bariéry. Beradeca a kol. vyhodnotili efektivitu směsi kožních lipidů na pacientech s podrážděnou kontaktní dermatitidou, alergickou kontaktní dermatitidou, nebo atopickou dermatitidou. Kožní lipidy dosáhly u všech zkoušených skupin statisticky signifikantní zlepšení ve všech parametrech po 4 až 8 týdnech aplikace (10).

Tyto objevy podporují představu optimalizace lipidové směsi, která může pomoci v obstarání bariérových funkcí u pacientů s kožními potížemi (10). Komerčně dostupnými přípravky s obsahem ceramidů jsou Lipobase Repair[®] (Astellas), V USA pak Triceram[®] (Osmotic Corp.). Ceramidy také využívají různé kosmetické firmy (např. Vichy[®]). Nevýhodou u ceramidů je jejich vysoká cena, proto se zkoušejí využívat jejich analogy, např. analog 14S24 (vyvinutý na pracovišti naší fakulty) v testech na izolované lidské

kůži vykázal vysokou schopnost regenerovat poškození kožní bariéry.

Značnou výhodou analogu je jeho nízká cena (2).

Aplikace ceramidů nemůže onemocnění, jako je např. atopická dermatitida, zcela vyléčit, zlepšení bariérové funkce kůže však sníží množství penetrujících alergenů, dráždivých látek a mikrobů a omezí exacerbaci onemocnění s typickými lézemi. Nezanedbatelně je tak snížena spotřeba kortikoidů a antibiotik (2,10).

3.2.1.2. Volné mastné kyseliny

Mastné kyseliny obsažené v SC jsou téměř vždy nasycené, nerozvětvené a delší než 18 uhlíků. Nejvíce je zastoupena kyselina behemová (22 uhlíků) a kys. lignocerová (24 uhlíků) v menší míře pak palmitová, stearová aj.

Množství mastných kyselin vzrůstá nad čtvrtou vrstvou SC, což může být výsledkem odbourávání ceramidů, nebo kontaminací mazovými lipidy. (3)

3.2.1.3. Cholesterol

Významnou složkou lipidové matrix je cholesterol, který je rovněž často obsažen v biologických membránách. Ve stratum corneum funguje jako stabilizátor lipidických struktur a ovlivňuje stupeň propustnosti membrány. Cholesterol činí lamelární strukturu méně citlivou k odlišnostem ve složení lipidů a k přítomnosti exogenních škodlivin (5).

3.2.1.4. Cholesterol sulfát a estery cholesterolu

Ačkoli je množství cholesterol sulfátu v SC malé, hraje důležitou roli v kohezi buněk a v procesu deskvamace. Estery cholesterolu mohou poskytovat izolaci reziduí nenasycených mastných kyselin a prevenci jejich zkapalnění na intercelulární membráně (5).

3.3 Organizace lipidové matrix ve stratum corneum

Membránové struktury v epidermálních lamelárních granulech připomínají ploché lamelární disky, které v pozdějších stádiích diferenciačního procesu migrují k apikálnímu konci buňky. Ohraničující membrána granula splývá s plasmatickou membránou a jejich obsahy jsou vylity do intercelulárního prostoru. Poté disky splývají a jsou přeměněny do multilamelárních desek, které vyplňují nejvíce intercelulárních prostorů stratum corneum a určují permeabilitu kůže (11).

Když ohraničující membrána lamelárních granul splývá s plasmatickou membránou, acylglukosylceramid spojený s granulí je zaveden k okraji buňky. Ve stejné době je glukóza odštěpena z acylglukosylceramidu a využita pro energetický výnos. Linolenová kyselina je odstraněna a recyklována. Výsledný omega-hydroxyceramid se esterově spojí s kyselými skupinami na povrchu kornifikující obálky. Asi polovina omega-hydroxyceramidu se váže esterově přes omega-hydroxylovou skupinu a druhá polovina pravděpodobně přes primární hydroxylovou skupinu. Množství kovalentně vázaného lipidu je ekvivalentní k 2% sušiny tkáně. Takové množství by mělo být dostačující k vytvoření monovrstvy hydroxyceramidu obalujícího povrch všech kornifikujících buněk. V transmisní elektronové mikrofotografii (TEM) je kovalentně vázaná lipidová vrstva dobře viděna (11).

Fakt, že lamelární struktury se nacházejí v intercelulárních prostorech epidermálního stratum corneum byl dokázán kryoelektronovým mikroskopem v roce 1973 (Braethnach et. al.), toto však transmisním elektronovým mikroskopem potvrzeno nebylo.

Uvažovalo se o ztrátě lipidů během přípravy vzorku. Nicméně v roce 1987 byly odhaleny intercelulární lamely při použití tetraoxidu ruthenia jako fixačního činidla místo mnohem používanějšího tetraoxidu osmia. Neúspěch metody s tetraoxidem osmia je založen na nízké chemické reaktivitě s lipidy obsaženými v lamelách.(11). Elektronová mikroskopie odhalila přítomnost trilamelární opakující se jednotky s výskytem úzkého-širokého-úzkého pásu s velikostí intervalu 130 Å (pro široký pás) a 60 Å (pro úzký pás). Následně bylo objeveno, že lipidy SC jsou hlavně v krystalické fázi a lamela o velikosti 130 Å je typická a nezbytná pro uspořádání a funkci stratum corneum (1).

Při nedostatku ceramidu 1(EOS) se fázové vlastnosti SC velmi mění. Z toho vyplývá, že ceramid 1 (EOS) je velmi důležitý při tvorbě a uspořádání trilamelární struktury. Podobnou organizační roli SC lipidů může hrát ceramid 4 (EOH) a 9 (EOP) (1).

Rentgenová difrakce dále ukazuje na koexistenci orthorombické a hexagonální fáze lipidů SC. Z dalších metod (kalorimetrie, infračervená spektroskopie, elektronová paramagnetická rezonanční spektroskopie a fluorescenční spektroskopie) vychází tvrzení o přítomnosti gelových membránových domén při teplotě kůže v SC (1).

Na základě těchto informací je navrženo několik modelů pro uspořádání lipidů ve SC, tzn.doménový mozaikový model, sendvičový model a model jednotné gelové fáze:

Doménový mozaikový model

Tento model popisuje intercelulární lipidovou matrix SC jako ostrůvky membránových domén v krystalickém stavu separované fluidní fází. Mnohonásobné lipidové dvojvrstvy jsou separovány úzkými vrstvami vody (22). Fluidní charakter ohraničující oblasti mezi krystalovými doménami umožní difúzi hydrofilních i hydrofóbních molekul přes membránu (1).

Sendvičový model

Zatímco doménový mozaikový model připouští krystalové a tekuté domény v jedné vrstvě, sendvičový model předpokládá, že domény jsou odděleny v jednotlivých vrstvách a vytvářejí trilamelární uspořádání. Dle tohoto modelu část řetězce ceramidu (EOS), EOH a/nebo (EOP) jsou lokalizovány v úzké centrální vrstvě a spojují tři vrstvy dohromady. Tato centrální vrstva je v tekuté fázi a kolem ní jsou dvě krystalické fáze. Fluidní vrstva je tudíž nesouvislá a látky penetrující skrz SC musí projít i přes krystalickou fázi (1).

Model jednotné gelové fáze

Model jednotné gelové fáze popisuje kožní bariéru jako vytvořenou z jedné souvislé lamelární gelové struktury v intercelulárním prostoru SC. Nedochozí zde k oddělení mezi krystalickou a gelovou fází ani mezi odlišnou krystalickou fází s hexagonálním a orthorombickým uspořádáním. Tento návrh jednoduché lipidové struktury umožňuje nižší obsah vody, nižší stupeň pohyblivosti kožní bariéry a nižší propustnost pro vodu v důsledku uzavřeného uspořádání lipidů SC (12)

3.4. Další funkce ceramidů

Ceramidy mohou být zahrnovány v intercelulární transdukční systémy regulující odlišnosti buňky, její aktivaci, přežití a apoptózu (12).

Základem ceramidů je lipid sfingosin, který působí jako druhý posel při regulaci různých buněčných odpovědí na exogenní stimuly. Předpokládá se, že spojením ceramidu se specifickými signálními kaskádami jsou stimulem pro specifický typ buňky, který závisí na tomto subcelulárním produktu.

Vázající se ceramid není čistý ceramid, ale může být dvěma způsoby modifikován: 1) vysunutý alkylový řetězec ceramidu může interagovat s hydrofobní dutinou signalizujícího proteinu za předpokladu, že se lipidy přiváží k proteinům membrány. 2) generaci ceramidů obecně přibývá množství uhlovodíkových řetězců, čímž se zvyšuje tendence k hexagonální II fázi. Tato fáze může zvýšit fluiditu a permeabilitu membrány, což může mít vliv na procesy splnutí membrán, rozpustnost detergent-rezistentních signálních molekul a vnitřní membránové receptory (12).

Apoptóza je geneticky zakódovaná forma programové smrti buňky (PCD – Programmed cell death), při níž nedochází k uvolnění obsahu buňky do okolí (na rozdíl od nekrózy), ale buňky jsou fagocytované vcelku, po předcházejícím smrštění buňky a objevení se apoptických těles na povrchové membráně buněk (membrane-bound apoptic bodies) (13).

Výsledky různých studií dokazují účast ceramidů při apoptóze.

Agonisté a stresoví induktoři zvyšují koncentraci ceramidů, čemuž v mnoha systémech následují biochemické a morfologické manifestace apoptózy.

Zvýšení množství ceramidu např. pomocí aplikace sfingomyelázy může způsobit nebo urychlit apoptózu, nebo jinou formu buněčné smrti.

Schopnost ceramidů způsobit buněčnou smrt dokazuje také to, že jiné metabolity sfingolipidů nejsou cytotoxické.

Existence sfingosin-1-fosfátu (ceramid prostřednictvím enzymu ceramidázy se štěpí na sfingosin a z něj enzymem sfingosin-kinázou vzniká sfingosin-1-fosfát) naznačuje vysvětlení jak ceramid v různých buňkách může mít různorodé obměny a často protikladné funkce (14).

Spiegel a jeho spolupracovníci potvrdili, že zatímco ceramid je často proti proliferaci a pro smrt buňky, sfingosin-1-fosfát podporuje buněčnou proliferaci a přežití. Rovnováha mezi těmito dvěma sfingolipidovými posly je důležitý faktor determinující přežití, nebo smrt buňky (14).

Při stresu buňky dochází k zvýšení množství ceramidů v buňce. Zvýšení koncentrace ceramidů bylo zjištěno jako odpověď na množství chemoterapeutik využívaných k léčbě rakoviny jako např. etoposid, daunorubicin, doxorubicin, paclitaxel, fenretinid a irinotecan, nebo po radiační léčbě. Chemoterapeutika zvyšují množství ceramidů v nádorové buňce, jako výsledek stimulace syntézy ceramidů de novo, zvýšením sfingomyelázové aktivity, nebo pravděpodobně porušením katabolismu ceramidů. Manipulace s hladinou ceramidů může zefektivnit léčbu některých nádorových onemocnění. Například účinný inhibitor ceramidázy pojmenovaný B13 zvýší množství ceramidů v nádorové buňce a způsobí apoptózu nádorové buňky, bez ovlivnění množství ceramidů, nebo přežití normálních jaterních buněk (14).

Další pravděpodobné využití ceramidů ve spojení s apoptózou může být u léčby revmatoidní artritidy. U tohoto častého autoimunitního onemocnění, jsou trvale hledány léčebné způsoby s vyšší specifičností a menším množstvím vedlejších účinků. Využívají se na prvním místě chemické látky, dále připadá v úvahu léčba genetická a imunologická, kde by bylo možno využít zejména C2 ceramid, který podporuje apoptózu autoimunitních T lymfocytů a proliferujících synoviocytů (15).

Nedávné studie odhalily, že úroveň sfingomyelinu v plazmě, který je prekurzorem ceramidů, koreluje s rizikem koronárního onemocnění.

Proto ceramidy, známé jako lipidy způsobující apoptózu v různých buňkách, mohou přispívat k aterogenezi. Vysoká koncentrace ceramidů je pozitivně spojena s celkovým cholesterolem a triglyceridy (16).

Ceramidy mohou modulovat intracelulární peroxidy a zvýšit peroxidaci lipidů. Ceramidy se také mohou kumulovat v aterosklerotickém plaku (17).

Dále byl studován efekt ceramidů na růstový uvolňující hormon, stimulovaný akumulací cAMP a růstovým hormonem, u myších buněk.

Zajímavé je, že ceramidy [NS], [NH] a [AH] zvyšují stimulaci růstového uvolňujícího hormonu akumulací cAMP, ale zároveň stimulací růstového uvolňujícího hormonu inhibují uvolnění růstového hormonu (18).

Jak je patrné, ceramidy jsou a budou ještě po dlouhou dobu předmětem bádání a zkoušení, které jistě přinesou překvapivé výsledky.

3.5. Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)

DSC je nejčastěji používaná metoda termální analýzy, která měří „tok tepla“ (heat flow) a teplotu spojenou s exotermními a endotermními tranzicemi (19).

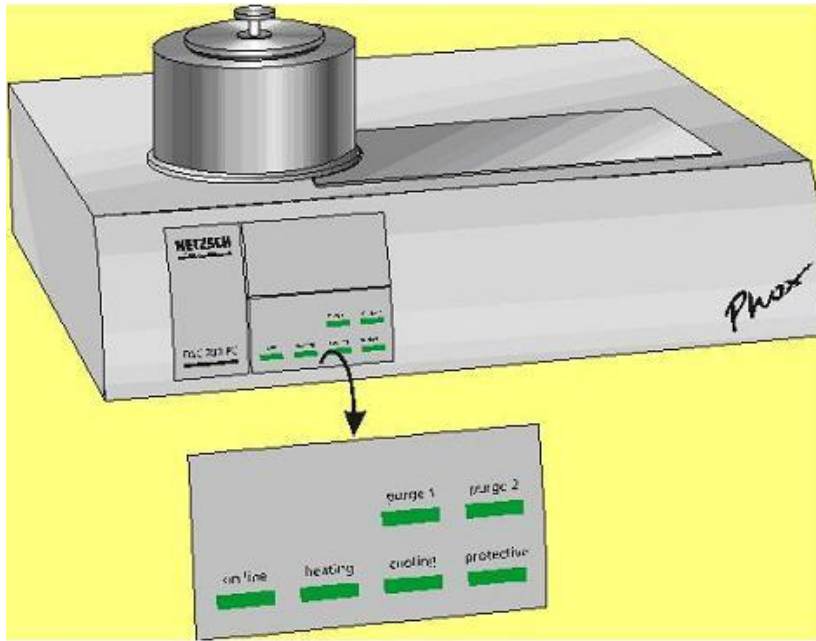
Měřený vzorek a referenční vzorek jsou při této metodě vystaveny stejnému teplotnímu režimu. Rozdíl v absorpci, nebo uvolnění energie je měřen jako funkce teploty. Teplota charakteristická pro fázovou tranzici je většinou determinována jako počátek DSC píku. Plocha píku odpovídá entalpii přeměny, která může být vyjádřena v kJ, nebo v kcal na mol či gram (1). Typické využití DSC např. zahrnuje determinaci chemického poločasu, určení struktury makromolárních domén, formulaci stabilitních studií, určení termální stability a reversibility. V našem případě je tato metoda využita k charakterizaci fázových vlastností lipidů. Zde DSC přináší prvotní informaci o fázových změnách v molekulách lipidů. U DSC křivky je typický větší pík, který u lipidů představuje tání uhlovodíkových řetězců. Samozřejmě se zde mohou vyskytovat i další fázové přechody; tranzice z jednoho krystalického uspořádání k jinému, nebo změny polárních hlav lipidů. Metoda DSC je velmi vhodná k vytváření fázových diagramů směsí lipidů k zjištění mnoha informací o mísitelnosti lipidů. Může být použita ve studiu lipidů strata cornea, nebo k zjištění interakce ceramidů či jiných lipidů s urychlovači absorpce (1,19).

Aparatura DSC. (Obr.3.5.1 a 3.5.2)

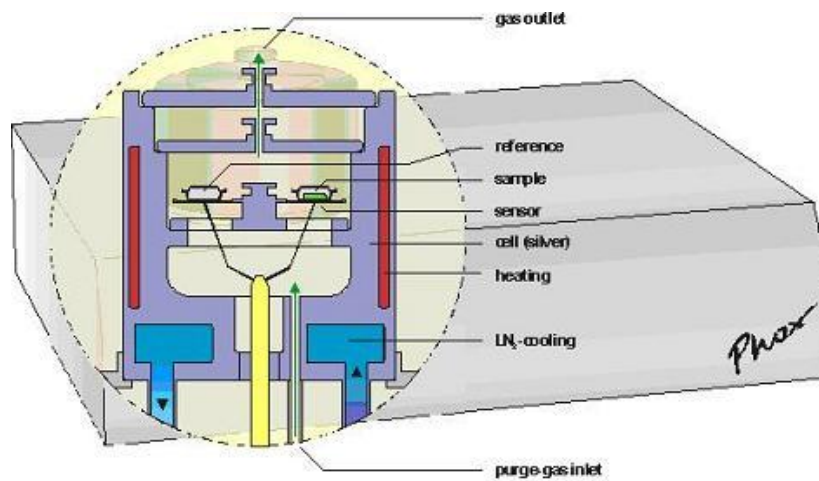
Nejdůležitější komponentou přístroje je modul, který obsahuje systém elektroniky, dále software k vykonání experimentů a skladování výsledků a komůrka obsahující termosensory pro monitorování rozdílného proudění tepla a teploty. Vzorek a referenční vzorek jsou v pánvičce uloženy na plošinu a skrz ně teplo prochází (Obr.3.5.2). Rozdíl proudu tepla je monitorován termosensory. Komůrka je uzavřena ocelovým válcem. Jako chladicí jednotka se využívá tekutý dusík.

Po vložení vzorku a nastavení vhodných parametrů do programu (tzn. počáteční a konečná teplota, počet zahřívání, chlazení, hmotnost vzorku, hmotnost prázdného kelímku, rychlost zahřívání a chlazení, start při dané teplotě) se program spustí (19).

Ze získaných dat se vytvoří termogram - graf závislosti teploty a rozdílného toku tepla mezi vzorkem a referenčním vzorkem. Na grafu se vyhodnocuje pík (část segmentu křivky signalizující výchylku, která se opět vrací na původní základní linii), který je způsoben fázovou přeměnou, změnou ve struktuře nebo chemickou reakcí. Pík může být charakterizován teplotou píku (při maximu nebo minimu píku), teplotou při počátku píku (onset), šířkou píku, vrcholem a plochou píku (19).



Obr.3.5.1 Kalorimetr firmy Netch (20)



Obr.3.5.2 Průřez kalorimetrem: vlevo vložená pánvička s referenčním vzorkem, vpravo pánvička se zkoušeným vzorkem (20)

3.6. Infračervená spektrometrie (IR)

Infračervená spektrometrie je analytická metoda založená na schopnostech látek absorbovat elektromagnetické vlnění o vlnových délkách 800nm až 1nm, které označujeme jako infračervené záření. Když molekuly měřené látky absorbují infračervené záření, dochází ke zvýšení jejich vibrační (v plynné fázi také rotační) energie. Infračervená absorpční spektra tak poskytují informaci o vibračních pohybech molekuly. Ty jsou pro ni charakteristické a proto lze spekter využít při identifikaci látek a určování struktury (21,22).

Mohutnost absorpce infračerveného záření závisí na změně dipólového momentu při prodloužení resp. zkrácení vazby. Amplitudy výchylek jednotlivých atomů molekuly jsou pro jednotlivé normální vibrace různé, často však můžeme vibrační pohyb molekuly při normální vibraci lokalizovat na určitou funkční skupinu, nebo vazbu. Poloha absorpčních pásů a jejich intenzita, kterými se projeví v IR spektru, se příliš neliší, je-li tato funkční skupina vázána v různých molekulách. Tato skutečnost umožnila sestavit tabulky vlnočtů charakteristických vibrací důležitých skupin a vazeb. Tyto tabulky se používají pro identifikační účely (21).
Rozeznáváme různé typy vibrací. Mění-li se při vibraci především délky vazby, jedná se o valenční vibraci, při změně úhlů hovoříme o deformační vibraci, kmitá-li atom mimo rovinu ostatních atomů, jedná se o mimorovinnou vibraci.

Infračervená spektroskopie se využívá zejména ke kvalitativní analýze. Pomocí IR spekter, které jsou charakteristické pro jednotlivé sloučeniny můžeme látky od sebe odlišit, nebo je identifikovat pomocí knihoven spekter.

Skutečnost, že se funkční skupiny projevují ve spektru podobně, umožňuje zjistit přítomnost jednotlivých funkčních skupin a též vyloučit výskyt jiných funkčních skupin (21,22).

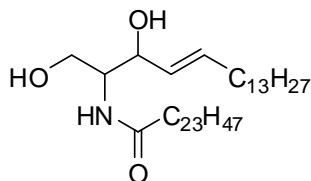
Aparatura IR

Infračervená spektra měříme na plně automatizovaných dvoupráskových infračervených spektrofotometrech, které umožňují měřit závislost absorpčních vlastností vzorku na vlnočtu v oblasti IR. Zdrojem záření je keramická tyčinka, která při zahřátí na 1000°C emituje spojitě záření v infračervené oblasti. Výsledkem je infračervené spektrum látky, tj. závislost transmitance nebo absorbance na vlnočtu, nebo vlnové délce. Oblasti spekter označujeme jako absorpční pásy a charakterizujeme polohou maxima a relativní intenzitou (21,22).

4. Metody a materiály

4.1. Použité chemikálie

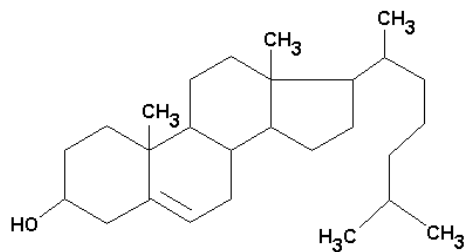
Vzorek ceramidu [NS] byl syntetizován v laboratoři katedry organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.



Molecular Weight: 650,11

Obr. 4.1.1 Strukturální vzorec ceramidu [NS]

Cholesterol, chloroform a metanol byly získány od firmy Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Německo. Všechna rozpouštědla byla HPLC čistoty.



Obr. 4.1.2. Strukturální vzorec cholesterolu

Voda pro injekce byla získána od firmy Hořátev, Česká Republika.

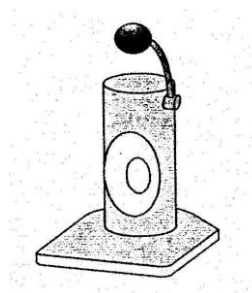
4.2.DSC

4.2.1.Příprava vzorků

Měřené vzorky byly směsí ceramid [NS] a cholesterolu v poměrech 10:0, 8:2, 7,5:2,5, 7:3, 6,5:3,5, 6:4, 5:5, 4:6 , 2:8 a 0:10 v suchém a hydratovaném stavu.

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

Vzorky byly poté uloženy do exsikátoru při laboratorní teplotě. Po úplném vysušení (min. 24 hodin) byly jednotlivé vzorky vpraveny do předem předvážené hliníkové pánvičky pro DSC měření s navázkou přibližně přesnou 3 mg a hermeticky uzavřeny. Hydratace vzorků byla provedena přidáním malého množství (zhruba 3 mikrolitry) vody pro injekce k suchému vzorku, který byl posléze hermeticky uzavřen v pánvičce (Obr.4.2.).



Obr.4.2. Zařízení pro hermetické uzavření pánvičky (2)

4.2.2. Vlastní měření

Připravené vzorky byly měřeny na přístroji NETZSCH Phoenix DSC 200 rychlostí 5 K/min v teplotním rozmezí od 20 až do 170°C za použití prázdné pánvičky jako standardu. Teplotní přechody byly stanoveny pomocí extrapolace píků (onset-values) za použití originálního Netsch software. Enthalpická změna byla stanovena pomocí integrace plochy píku ve srovnání se standardem.

Vždy před jednotlivým měření byla provedena korekce přístroje za pomoci dvou prázdných pánviček jako referenční, při stejném nastavení jako dané měření.

4.3. IR

Infračervená spektra Ceramidu[NS] 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 při 25, 80 a 100 °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.

5. Výsledky

5.1 Fyzikálně chemická charakterizace ceramidu [NS]

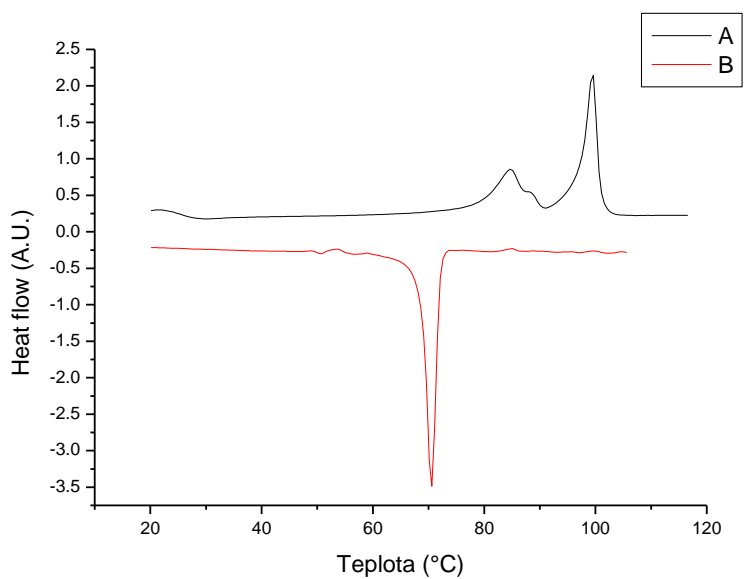
5.1.1. DSC

Vzorek čistého ceramidu [NS] byl podroben teplotnímu režimu: 1) zahřátí na 120°C; 2) zchlazení na 20°C; 3) zahřátí na 120°C; 4) zchlazení na 20°C; 5) zahřátí na 120°C; 6) zchlazení na 20°C; 7) zahřátí na 120°C; 8) zchlazení na 20°C.

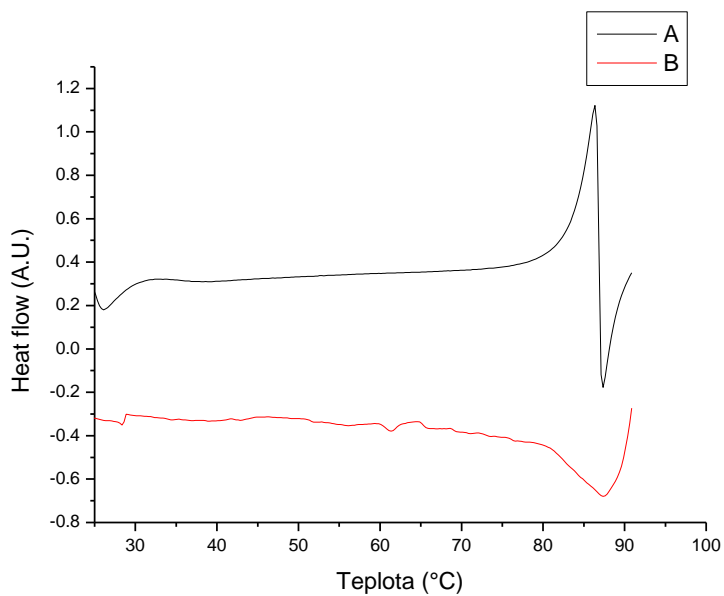
Počáteční zahřívání ceramidu [NS] na 120°C vykazuje dvě endotermní transzice při 84°C ($\Delta H = 40,5 \text{ J/g}$) a 99,5°C ($\Delta H = 80,7 \text{ J/g}$). Při chlazení na 20°C je zřetelná exotermní transice při 80,4°C ($\Delta H = 102,5 \text{ J/g}$) (Obr.5.1).

Při druhém zahřátí ceramidu [NS] na 120°C došlo k mírnému zvýšení teplot jednotlivých přechodů na 85,1°C ($\Delta H = 53,79 \text{ J/g}$) a na 99,6°C ($\Delta H = 158,3 \text{ J/g}$). Naopak hodnota píku při chlazení se mírně snížila na 80,2°C ($\Delta H = 99,3 \text{ J/g}$) (Obr.5.2.) Zajímavé je následné třetí zahřívání k 120°C, kde nalézáme pouze jednu endotermní tranzici při 100,0°C o vyšší entalpii ($\Delta H = 122,9 \text{ J/g}$). Při chlazení z tohoto stavu dále dochází ke snižování teploty fázového přechodu na 79,9°C ($\Delta H = 102,5 \text{ J/g}$). U dalšího čtvrtého zahřátí se opět vyskytují dvě endotermní transice a to při teplotě 86,2°C ($\Delta H = 41,8 \text{ J/g}$) a 99,5°C ($\Delta H = 130,8 \text{ J/g}$).

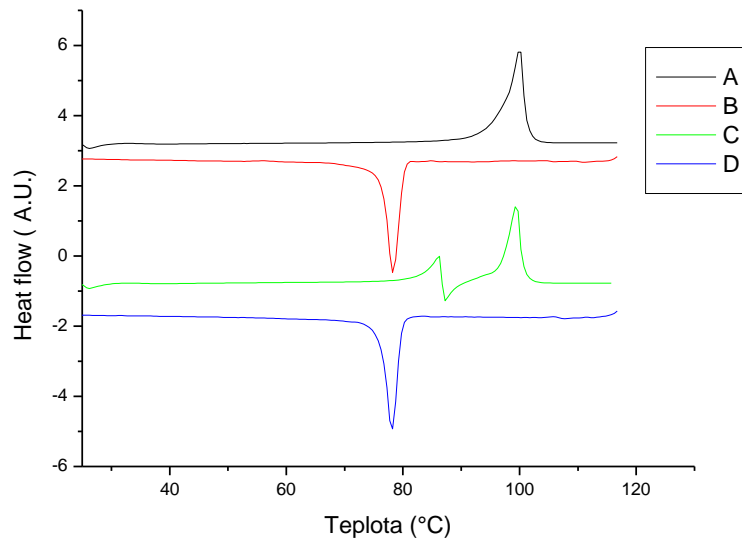
Při čtvrtém chlazení je pak vidět jedna exotermní transice při 79,8°C ($\Delta H = 101,4 \text{ J/g}$) (Obr 5.3.).



Obr.5.1. Termogram prvního zahřátí a chlazení keramidu [NS]. (A) křivka prvního zahřívání. (B) korespondující křivka chlazení.



Obr.5.2. Termogram druhého zahřátí a chlazení vzorku keramid [NS]. (A) křivka zahřívání na 120°C a (B) křivka chlazení na 20°C. Zahřívání / chlazení v poměru 5K/min

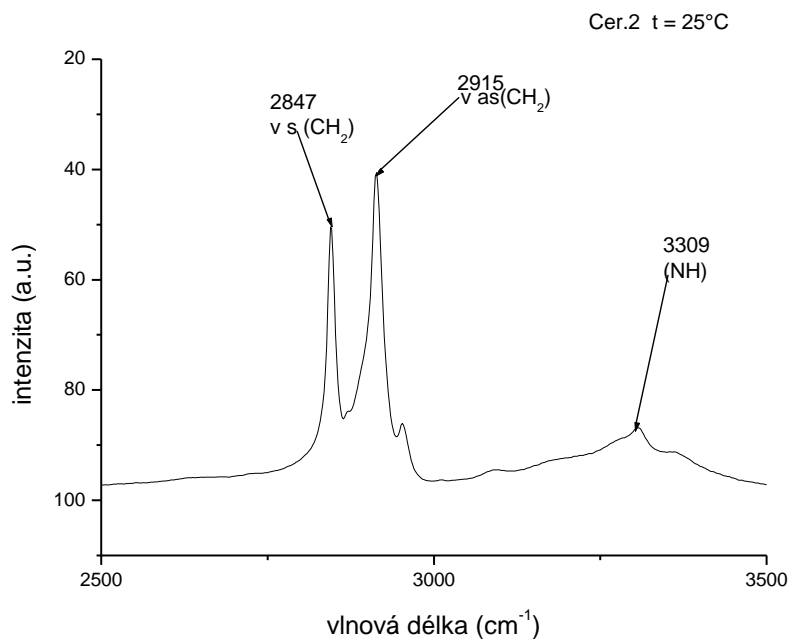


Obr.5.3. Zahřívání a chlazení ceramidu [NS] od 20°C do 120°C.
(A) křivka třetího zahřátí. (B) korespondující křivka chlazení.
(C) čtvrté zahřívání vzorku a (D) opětovné chlazení.
Zahřívání / chlazení v poměru 5K/min.

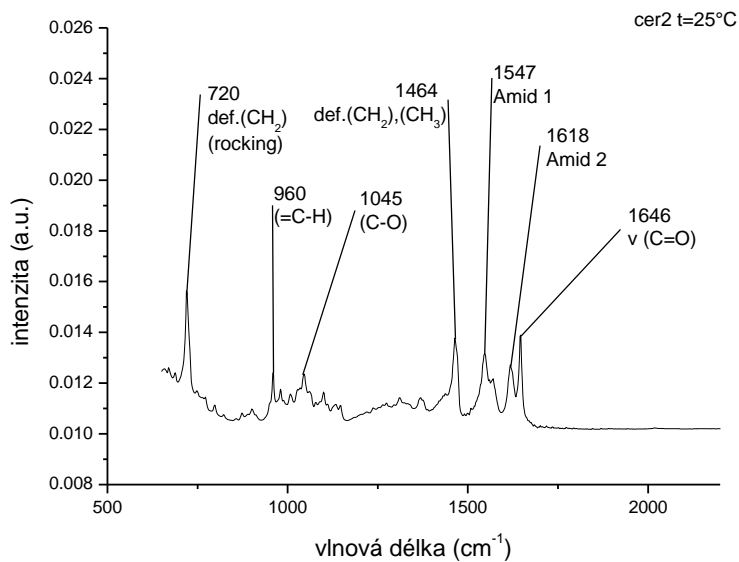
5.1.2. Infračervená spektroskopie

Tab.5.1. Výběr charakteristických vibrací funkčních skupin ceramidu [NS] (23).

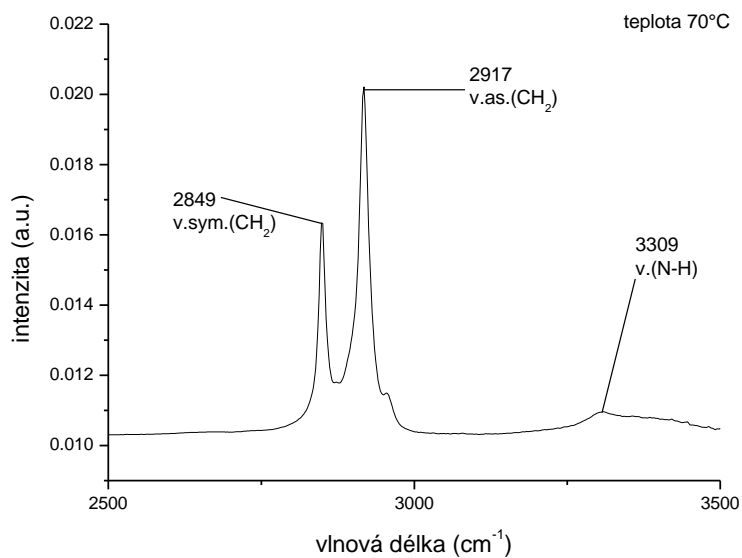
teplota 25°C	teplota 80°C	teplota 100°C	přiřazená vibrace
3309	3309	--	valenční N-H
2915	2917	2921	valenční asymet. CH ₂
2847	2849	2852	valenční symetr. CH ₂
1646	1646	1653	valenční C=O
1618	1623	--	Amid 2
1547	1541	1542	Amid 1
1464	1466	--	deformační – nůžkové (scissoring) CH ₂ , CH ₃
--	1458	1458	
1045	1041	1049	valenční C-O
960	962	968	deformační =C-H
720	720	719	deformační CH ₂ (rocking)



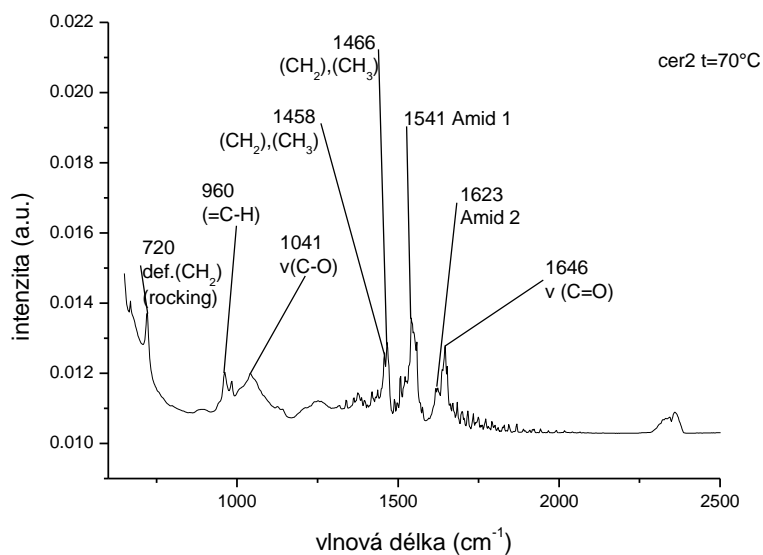
Obr. 5.4. IR ceramidu [NS] při teplotě 25°C v rozmezí 2500-3500 cm⁻¹.



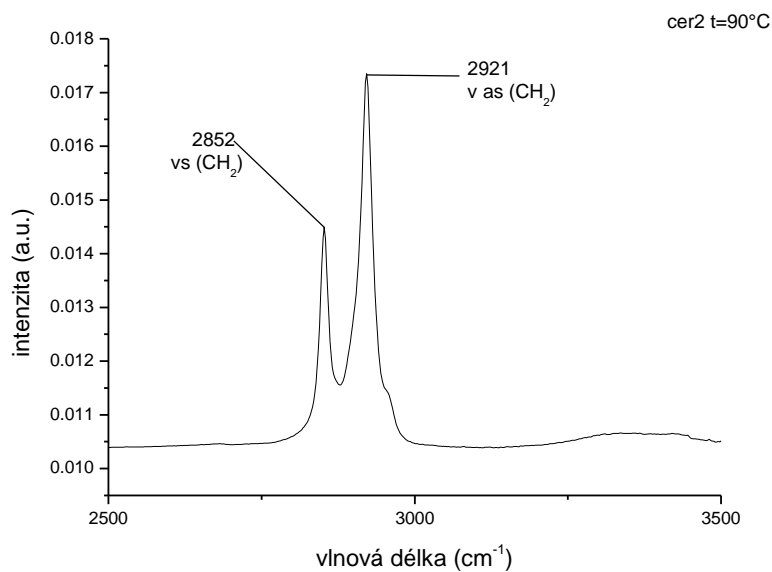
Obr.5.5 Ceramidu [NS] při teplotě 25°C , vlnočet 600-2250 cm⁻¹.



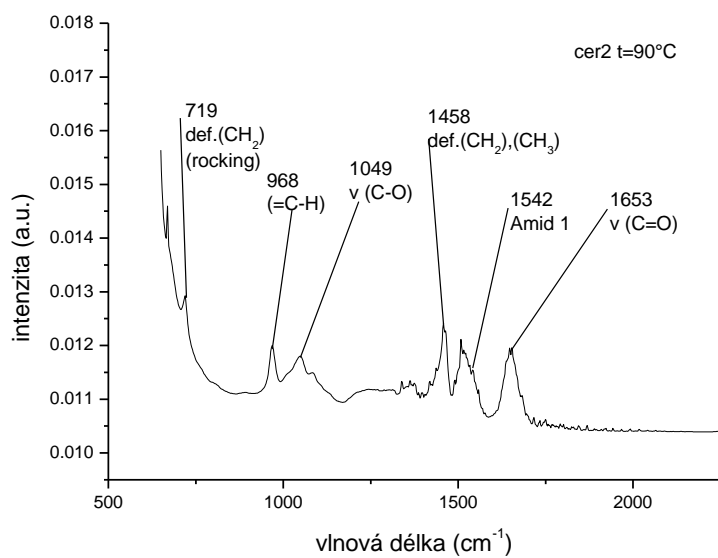
Obr.5.6.Ceramid [NS] při teplotě 70°C, vlnočet 2500-3500 cm⁻¹.



Obr.5.7. Ceramid [NS] při teplotě 70°C; vlnočet 600-2500 cm⁻¹.



Obr.5.8. Ceramid [NS] při teplotě 90°C a vlnočet 2500-3500 cm⁻¹.



Obr.5.9. Ceramid [NS] při teplotě 90°C, vlnočet 600-2250 cm⁻¹

5.2. Fyzikálně chemická charakterizace nehydratovaných směsí ceramidu [NS] a cholesterolu pomocí DSC

Všechny vzorky byly zahřívány z 20°C na 170°C, poté chlazeny zpět k 20°C a opět zahřívány na 170°C. Při prvním zahřívání směsi Cer[NS] a cholesterolu (Cer[NS]/chol.) v poměru 8:2 se vyskytují tři transice a to při 79,1°C, 84°C a 98,2°C. Při druhém zahřívání téhož vzorku dochází ke snížení všech tří hodnot teploty fázového přechodu na 60°C, 83,7°C a 92,5°C.

Další vzorek ceramid [NS]/cholesterol v poměru 7,5:2,5 při prvním zahřátí vykazuje tři endotermní transice při 76,6°C, 84,4°C a 95,8°C. Při druhém zahřívání se opět sníží všechny teploty na 65,9°C, 81,8°C a 87,3°C (Obr. 5.10.).

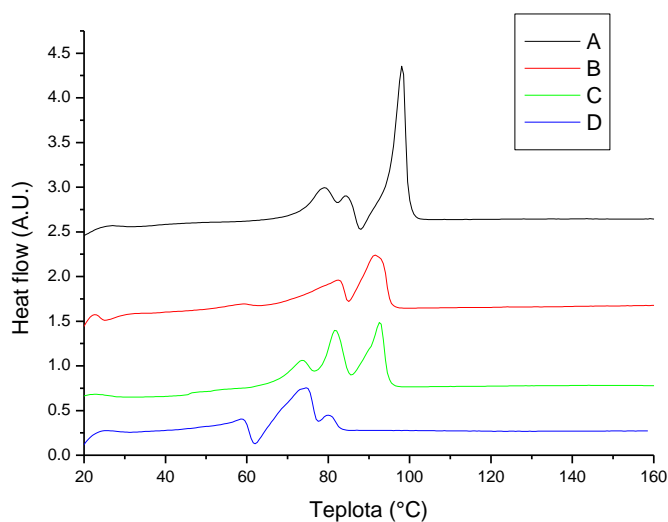
Ve směsi Ceramid[NS]/cholesterol v poměru 7:3 jsou při prvním zahřátí hodnoty píků obdobné předchozímu zahřívání (77,4°C, 84,7°C, 94,7°C), ale při druhém zahřívání jsou zřetelné pouze dva píky při 66,0°C a 81,6°C. Zajímavý je vzorek Ceramid[NS]/cholesterol 6,5:3,5 při prvním zahřívání vykazuje jen dvě transice při teplotě 77,6°C a 86,4°C a při zahřátí druhém 66,4°C a 81,1°C (Obr 5.11.).

U vzorku Ceramid[NS]/cholesterol 6:4 dochází ke zvýšení teploty přechodů na 84,6°C a 93,0°C při prvním zahřátí a při druhém naopak k mírnému snížení hodnot na 65,7°C a 80,6°C.

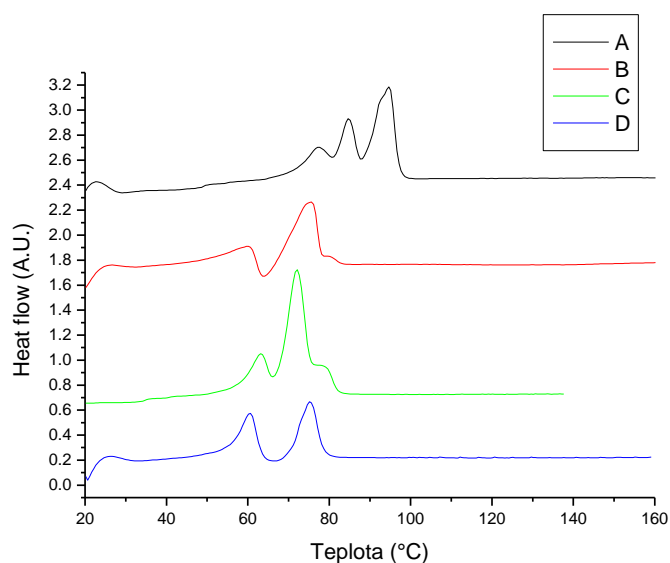
Ve stejném poměru ceramidu [NS] a cholesterolu tzn. v poměru 5:5 se při prvním zahřátí vyskytují tři transice, s hodnotami píků 76,0°C, 84,1°C, 88,9°C a při následujícím zahřátí jsou patrné transice při 62,2°C, 79,4°C, 105,2°C (Obr. 5.12)

Se snižujícím se množstvím ceramidu a zvyšujícím se množstvím cholesterolu (poměr 4:6) dochází při prvním zahřívání k výskytu čtyř píků při teplotě 74,0°C, 84,4°C, 90,0°C, 116°C. Při druhém zahřívání se vyskytují tři píky a to při 61,7°C, 76,4°C, 114,8°C.

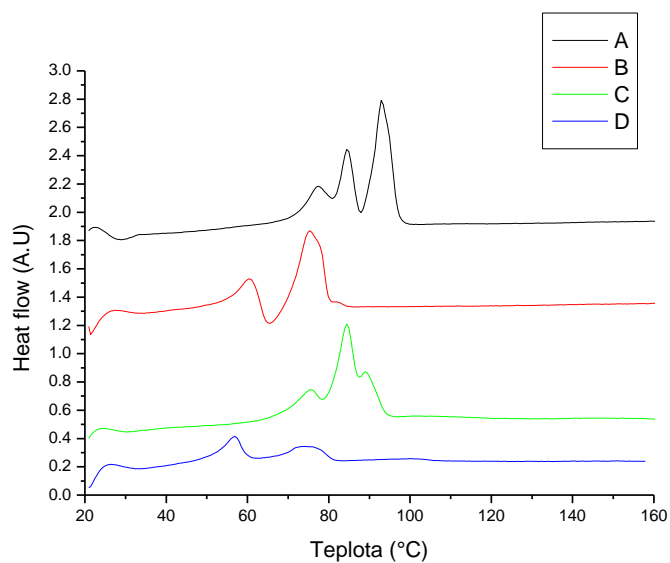
Vzorek Ceramid[NS]/cholesterol v poměru 2:8 vykazuje při prvním zahřívání tři píky s hodnotou 40,0°C, 80,6°C a 126,5°C a při druhém píků s hodnotami 33,0°C, 53,8°C, 70,1°C, 89,8°C a 124,9°C (Obr.5.13).



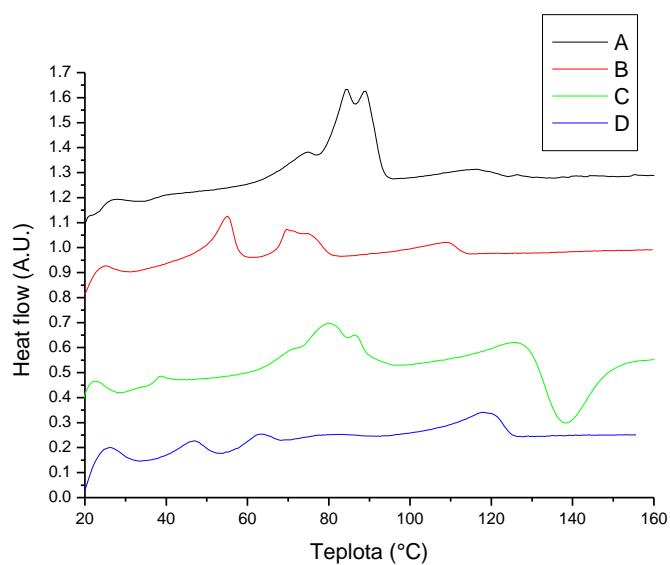
Obr.5.10. Zahřívání a chlazení směsi ceramid [NS] a cholesterolu pomocí DSC.(A) křivka prvního zahřívání Ceramidu[NS]/cholesterolu v poměru 8:2.(B) druhé zahřátí téhož vzorku. (C) první zahřátí vzorku Ceramidu[NS]/cholesterolu v poměru 7,5:2,5 a (D) jeho opětovné zahřátí..



Obr.5.11. Zahřívání a chlazení směsi ceramid [NS] a cholesterolu pomocí DSC.(A) křivka prvního zahřívání Ceramidu[NS]/cholesterolu. v poměru 7:3.(B) druhé zahřátí téhož vzorku.(C) křivka prvního zahřívání směsi Ceramidu [NS]/cholesterolu v poměru 6,5:3,5.(D) jeho opětovné zahřátí.



Obr.5.12. Zahřívání a chlazení směsi ceramid [NS] a cholesterolu pomocí DSC.(A) křivka prvního zahřátí Ceramidu[NS]/cholesterolu. v poměru 6:4.(B) druhé zahřátí téhož vzorku.(C) křivka prvního zahřátí směsi Ceramidu[NS]/cholesterolu v poměru 5:5.(D) jeho opětovné zahřátí.



Obr.5.13. Zahřívání a chlazení směsi ceramidu[NS]/cholesterolu pomocí DSC. (A) křivka prvního zahřátí Ceramidu[NS]/cholesterolu v poměru 4:6.(B) opětovné zahřátí téhož vzorku.(C) křivka prvního zahřátí směsi Cer[NS]/chol. v poměru 2:8. (D) jeho opětovné zahřátí.

5.3. Fyzikálně chemická charakterizace hydratovaného vzorku ceramidu [NS] a hydratované směsi ceramidu [NS] a cholesterolu pomocí DSC.

Čistý hydratovaný ceramid [NS] byl zahříván na 97°C, poté chlazen na 20°C a znovu zahříván na 97°C. Při prvním zahřátí se vyskytují dva píky a to při teplotě 76,8°C a 93,8°C. U druhého zahřívání se teplota prvního píku nepatrně zvýšila na 77°C a druhý pík má teplotu 93,7°C (Obr.5.14).

Hydratovaný vzorek ceramidu a cholesterolu v poměru 8:2 byl zahříván na teplotu 97°C. V termogramu jsou zřetelné dva píky s hodnotami 75,8°C a 90,9°C. Poté byl vzorek chlazen na 20°C a opět zahříván na 97°C přičemž teploty fázových přechodů klesly na 72,7°C a 90,6°C. Stejným způsobem byl zahříván hydratovaný vzorek ceramid [NS] a cholesterolu v poměru 7,5:2,5, který vykazoval při prvním zahřátí dva píky a to při teplotě 74,5°C a 90,0°C, při následném zahřátí se vyskytuje pík nový s hodnotou 50,1°C a další při teplotě 89,0°C (Obr.5.15).

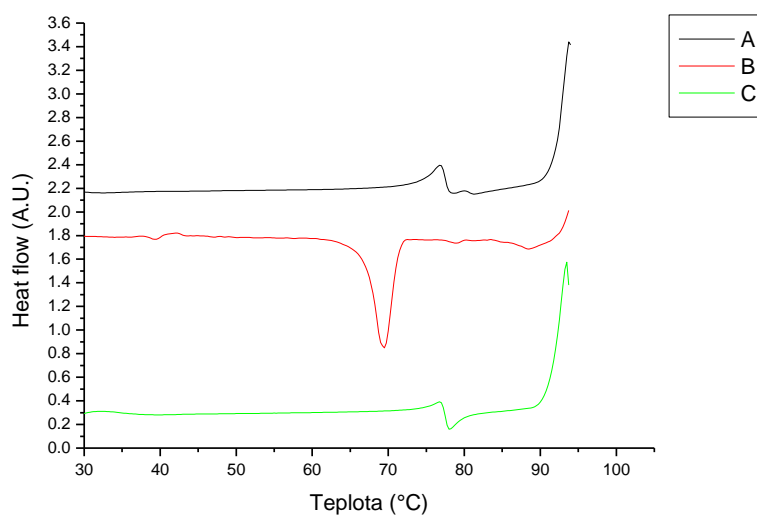
Další vzorky hydratované směsi ceramid [NS] a cholesterolu v různých poměrech, byly vždy zahřívány na teplotu 93°C, poté chlazeny na 20°C a opět zahřívány na 93°C. Hydratovaný vzorek v poměru ceramid [NS] a cholesterol 7:3 vykazuje při prvním zahřátí 3 píky s hodnotou 76,0°C, 86,9°C a 88,6°C.

Při druhém zahřátí se vyskytují také tři píky, ale s docela odlišnými hodnotami a to 51,8°C, 78,6°C a 87,3°C. Další poměr 6,5:3,5 vykazuje při prvním zahřátí 5 píků při teplotě 36,8°C, 63,5°C, 76,4°C, 79,8°C a 88,2°C. Při opětovném zahřátí jsou píky pouze tři při 52,1°C, 79,4°C a 85,7°C (Obr.5.16).

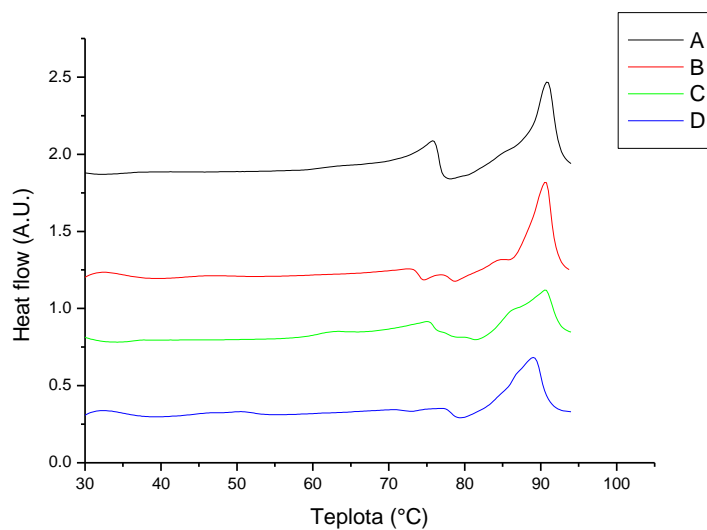
Vzorek hydratované směsi v poměru 6:4 vykazuje při počátečním zahřívání pouze dvě endotermní transice při 76,0°C a 88,3°C a při druhém zahřívání tři transice s hodnotami 52,3°C, 79,1°C a 87,3°C.

Další hydratovaný vzorek je v poměru 5:5 a vykazuje transice při prvním zahřátí 36,3°C, 63,4°C, 74,0°C, 86,0°C a druhém 43,7°C, 51,5°C a 61,5°C (Obr.5.17.).

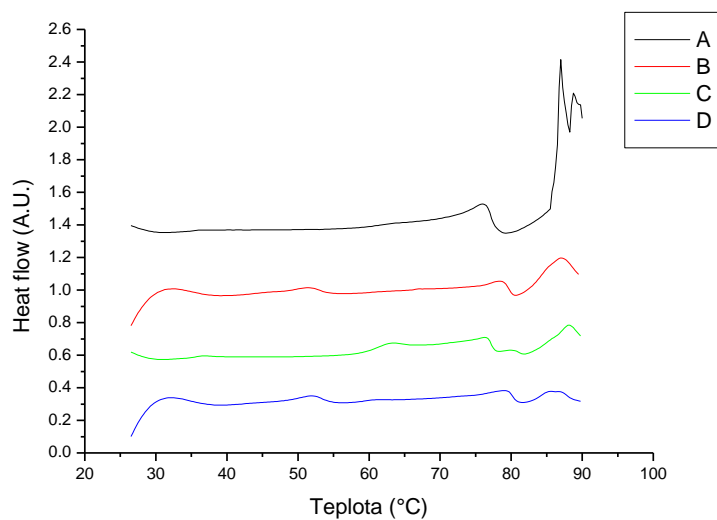
U hydratovaného vzorku ceramid [NS] a cholesterolu v poměru 4:6 se vyskytují transice 37,5°C, 63,3°C, 86,7°C při prvním zahřátí a při opětovném zahřátí jsou hodnoty 43,4°C, 51,1°C, 61,7°C. Poslední hydratovaný vzorek a to v poměru 8:2 vykazuje při prvním zahřátí pouze dvě transice s píkem 38,7°C, 63,7°C a čtyři transice při druhém zahřátí s hodnotami 35,8°C, 42,9°C, 51,8°C, a 62,3°C (Obr.5.18.).



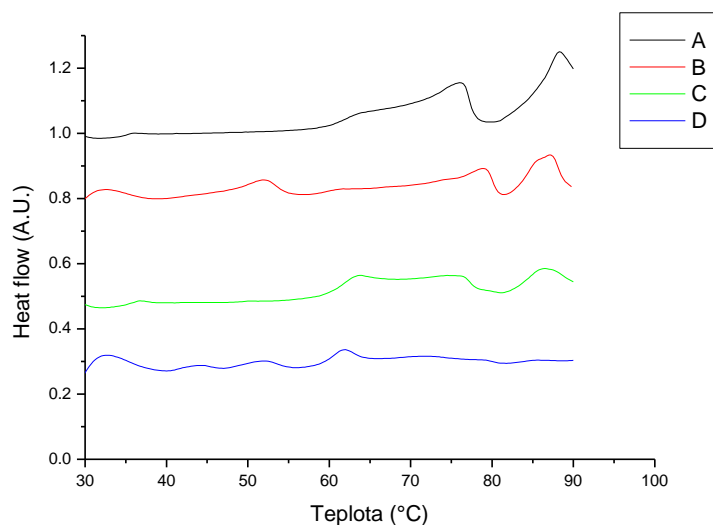
Obr.5.14. Termogram hydratovaného vzorku ceramidu [NS]. (A) křivka prvního zahřátí na 97°C , (B) následné chlazení na 20°C a křivka (C) ukazuje opětovné zahřátí vzorku na 97°C.



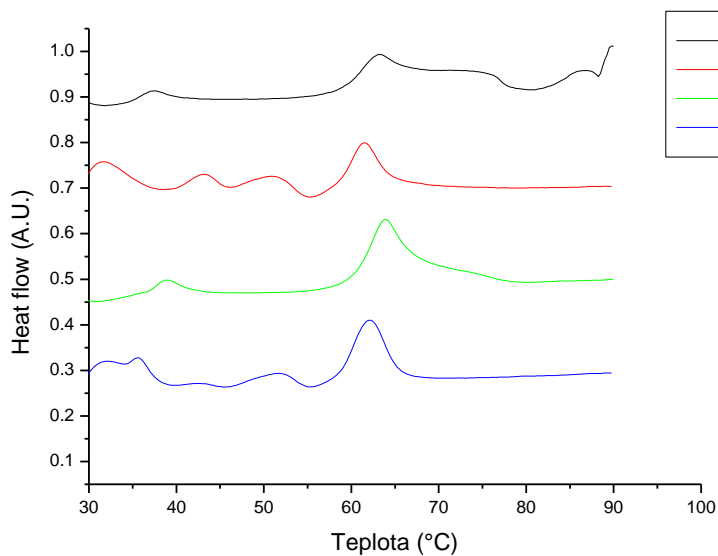
Obr.5.15. Zahřívání hydratovaného vzorku ceramidu [NS] s cholesterolem na teplotu 97°C. Křivka (A) znázorňuje první zahřívání hydratovaného vzorku v poměru 8:2. (B) opětovné zahřívání téhož vzorku. Křivky (C), (D) ukazují první a druhé zahřátí hydratovaného vzorku ceramidu [NS] a cholesterolu v poměru 7,5:2,5.



Obr.5.16. Zahřívání hydratovaného vzorku směsi ceramidu [NS] a cholesterolu na teplotu 93°C. Křivka (A) demonstruje první zahřátí vzorku v poměru 7:3. (B) opětovné zahřátí téhož vzorku. Křivky (C) a (D) vykazují první a druhé zahřátí hydratovaného vzorku v poměru 6,5:3,5.



Obr.5.17. Zahřívání hydratovaného vzorku směsi ceramidu [NS] a cholesterolu na teplotu 93°C. První vzorek je v poměru 6:4, křivka (A) vykazuje jeho první zahřátí a křivka (B) zahřátí druhé. Další vzorek je v poměru 5:5. Křivka (C) a (D) znázorňuje jeho první a druhé zahřátí.



Obr.5.18. Zahřívání hydratované směsi vzorku ceramidu [NS] a cholesterolu na teplotu 93°C. Křivky (A) a (B) znázorňují první a druhé zahřátí směsi hydratovaného vzorku v poměru 4:6. Následující křivky demonstrují zahřátí směsi vzorku v poměru 2:8, kde (A) je první zahřátí a (B) zahřátí následující.

6. Diskuse

6.1. Nehydratovaný Cer [NS]

DSC křivka nehydratovaného ceramidu [NS] ukazuje při zahřátí na 120°C dvě endotermní fázové tranzice při teplotě 84°C a 99,5°C, při chlazení exotermní tranzici při 80,4°C (Obr.5.1.). Z toho usuzuji, že nejdříve je molekula ceramidu [NS] je v určité fázi, konformaci, se zvyšující se teplotou dochází k překrytalizování tj. ke změnám ve struktuře molekuly a počíná ceramid tát. První přechod při 84°C je zřejmě změna v krystalové struktuře lipidu a až přechod při 99°C (hlavní pík) je teplota tání lipidu. Druhé zahřátí poskytuje obdobné tranzice, jako zahřátí první. Zajímavé je třetí zahřátí, kde se vyskytuje pouze jedna endotermní tranzice při 100°C (Obr.5.2. křivka A), tzn.,že zde nedochází ke změnám v molekulové struktuře, ale jen k tání. Čtvrté zahřátí bylo obdobné jako první.

IR spektrum nehydratovaného Cer [NS]

Z vyhodnoceného IR spektra je důležitá vibrace def (scissoring) CH_2, CH_3 vyskytující se při teplotě 25°C 1464 cm^{-1} , 80°C 1466 cm^{-1} při teplotě 100°C se nevyskytuje. Z těchto výsledků usuzuji na hexagonální strukturu při teplotě 25°C a 80°C.

Další hodnoty def. (scissoring) CH_2, CH_3 , nevyskytující se při teplotě 25°C, ale až při teplotách vyšších tzn. při 80°C a 100°C s hodnotami 1458 cm^{-1}

ukazují ortorombickou strukturu. Z toho vyplývá, že se během zahřátí mění struktura Cer[NS] z hexagonálního na ortorombické uspořádání

Vibrace valenční N-H skupiny, která poskytuje vibraci při teplotě 25°C a 80°C 3309cm⁻¹ (Obr.5.5. a 5.7.) a při teplotě 100°C (Obr.5.9) se nevyskytuje, pravděpodobně zde dochází zrušení vodíkových můstků. Také skupina Amid 2 se vyskytuje pouze při teplotě 25°C 1618 cm⁻¹ (Obr.5.5) a 80°C 1623cm⁻¹ (Obr.5.7.), při 100°C se nenachází, protože dochází k štěpení vodíkových vazeb (Obr.5.9).

Poměr mezi valenční asymetrickou vibrací CH₂ a valenční symetrickou vibrací se zvyšuje se vzrůstající teplotou, tzn., že se vzrůstající teplotou se snižuje množství cis konformerů.

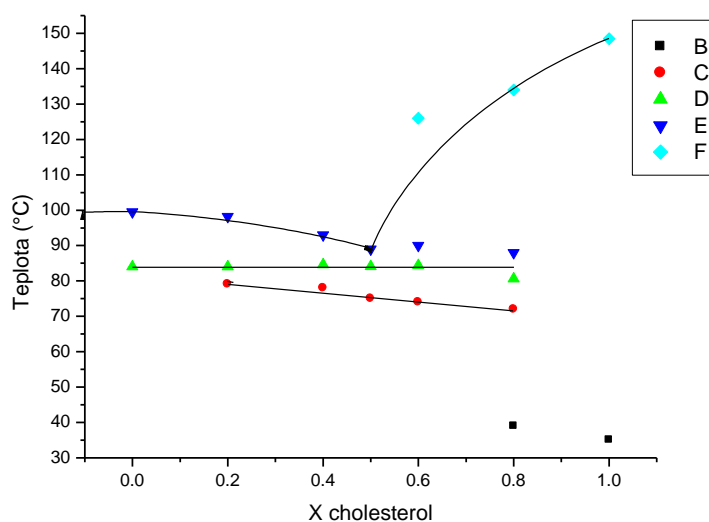
Obecně výsledky IR korelují s výsledky DSC tzn., že při první tranzici dochází ke koexistenci hexagonální a ortorombické struktury a při tranzici druhé je přítomno jen ortorombické uspořádání a dochází zde k štěpení vodíkových vazeb N-H skupiny a amidové skupiny.

6.2. Směs nehydratovaného Cer[NS] a cholesterolu

Representativní křivky směsi Cer[NS] a cholesterolu v různých poměrech jsou uvedeny na Obr. 5.10, 5.11. a 5.12. Je zřejmé, že přidání cholesterolu k Cer[NS] způsobí odlišné termální chování ceramidu. Křivky ukazují tři endotermní tranzice. Se vzrůstajícím množstvím cholesterolu se objevuje i čtvrtá endotermní tranzice. Při druhém zahřátí se hodnoty všech píků snižují.

Fázové digramy byly sestaveny z teploty tání lipidů a exotermní tranzice, jako grafy závislosti koncentrace směsi Cer[NS]/cholesterolu na hodnotách teplot těchto píků.

Fázový diagram prvního zahřátí směsi (Obr.5.19.) ukazuje eutektický bod v poměru 5:5 ceramidu [NS] a cholesterolu při teplotě 88,9°C. V tomto bodě dochází k mísitelnosti obou složek, které jsou při zmíněném poměru a teplotě ve fluidní fázi.

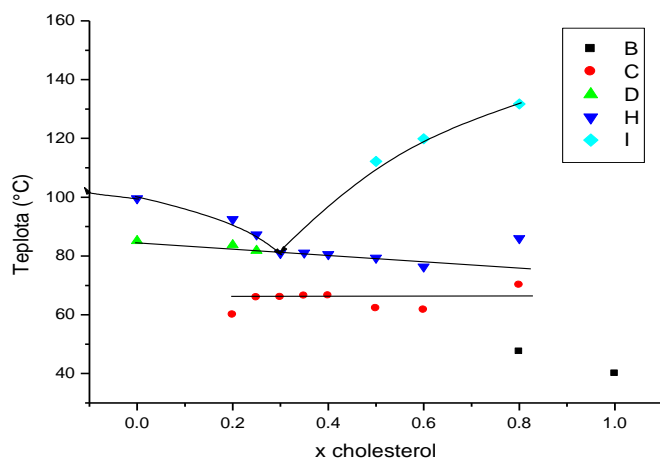


Obr.5.19. Fázový diagram prvního zahřátí směsi ceramidu [NS] a cholesterolu

Druhé zahřívání téže vzorků je patrné na Obr.5.10.,5.11.,5.12.

Dle fázového diagramu (Obr.5.20.) se eutektický bod pro druhé zahřátí směsi posouvá k poměru Cer[NS] a cholesterolu 3:7 při teplotě 82°C.

V eutektickém bodě přechází obě látky z krystalické fáze na fázi neuspořádanou fluidní. Při zvýšené koncentraci Cer[NS] se.....



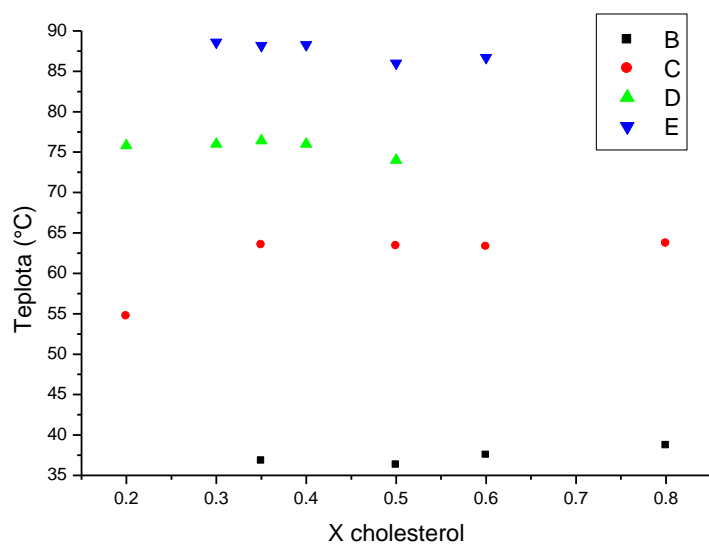
Obr.5.15. Fázový digram druhého zahřátí směsi ceramidu NS] a cholesterolu

6.3 Hydratovaný Cer[NS] a ve směsi s cholesterolem

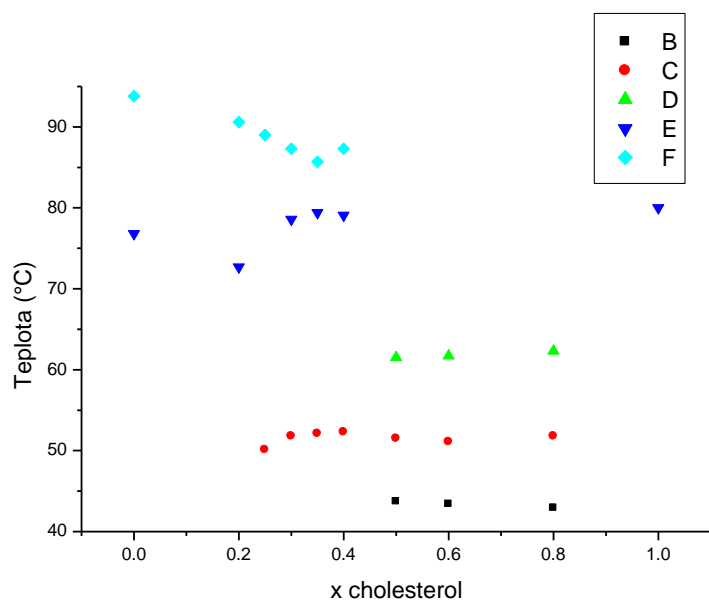
Kalorimetrická studie hydratovaného Cer[NS] demonstruje změny termotropního chování v závislosti na hydrataci. Vlivem hydratace dochází k snížení teplot tranzicí z 84 a 99,5°C (hodnoty prvního zahřátí nehydratovaného Cer[NS] Obr.5.1. křivka A) na 76,8 a 93,8°C (hodnoty prvního zahřátí hydratovaného Cer[NS] Obr.5.16.křivka A).

DSC křivky různých poměrů Cer[NS] a cholesterolu jsou na Obr.5.17.,5.18.,5.19. a 5.20. Hydratace snižuje teplotu tání u všech vzorků ve srovnání s nehydratovanými.

Vytvořené fázové diagramy prvního a druhého zahřátí jsou na obr. 5.21 a 5.22. Jak je patrné z těchto diagramů, tak měření nevyšla zcela optimálně. Může to být způsobeno pravděpodobně nedostatečnou hydratací, jejíž provedení bylo poměrně technicky obtížné, nebo nedostatečným zahříváním, které bylo díky teplotě varu vody sníženo na 97°C u CeramiduNS a v poměrech 8:2,7,5:3,5 na 97°C a u ostatních hydratovaných vzorků na 93°C.



Obr.5.21. Fázový diagram prvního zahřátí hydratované směsi ceramidu [NS] a cholesterolu.



Obr.5.22. Fázový diagram druhého zahřátí hydratované směsi ceramidu [NS] a cholesterolu.

7.Závěr

Termotropní chování směsi Ceramidu [NS] s cholesterolem bylo studováno pomocí DSC metody a zároveň bylo vyhodnoceno IR- spektrum samotného ceramidu [NS]

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 Ceramidu [NS]/cholesterolu 5:5 při prvním zahřátí a při druhém je poměr eutektické směsi 3:7.

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 Ceramidu [NS] odpovídala teplotám tání naměřených pomocí DSC.

Použitá literatura

1. Zbytovská J., Current knowledge status of the stratum corneum, 2006
2. Vávrová K., Hrabálek A. Role ceramidů v kůži. Praktické lékařství 2/2006
3. Hrabálek A., Vávrová K. Lze překonat kožní bariéru? Praktické lékařství, leden 2005, č.1, s. 8-11.
4. Technola
5. Vávrová K., Zbytovská J., Hrabálek A., Amphiphilic Transdermal Permeation Enhancers, p.2273-2277. Current Medicinal Chemistry, 2005, Vol. 12, No 19
6. Lékařské listy 17/2005, Moderní terapie v kožním lékařství, Arenberg P., s.2-5, www.zdn.cz
7. Waisser K., Pour M., Organická chemie 2, Praha, Karolinum 2000 s. 30,31.
8. Rokyta R. a kol. Fyziologie 1.vyd. Praha: ISV, 2000, s.176-179 ISBN 80-85866-45-5
9. Madison C. K. Barrier Function of the Skin, p.231-238. The society for Investigative Dermatology, Inc. 2003.

10. Choi M.J., Maibach H.I. Role of Ceramides in Barrier Function of Healthy and Diseased Skin, Review article, p.215-223. Am J Clin Dermatol 2005.
11. Wertz P., Bergh B., Review. The physical, chemical and functional Properties of lipids in the skin and other biological barriers. Chemistry and Physics of Lipids 91 (1998) 85-96
12. Kronke M. Biophysics of ceramide signaling: interaction with proteins and phase transition of membranes, p.110-121. Chemistry and Physics of Lipids, 1999.
13. Ništár F., Rácz O., Apoptóza a nekróza, s.1, 2006, [www.google/Apotóza a nekróza.htm](http://www.google/Apotóza+a+nekróza.htm)
14. Reynolds P., Maurer B.J., Kolesnick R.N. Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy, p.172-173. Cancer letters, 2003, www.elsevier.com/locate/canlet
15. Systémová enzymoterapie, 23.8.2000, s.20, Medicína 7/VII www.zdrava-rodina.cz/med/med0700-32.html.
16. Nakahara I et al. Association of ceramides in human plasma with risk factors of atherosclerosis, 2006, www.PubMed.com

17. Luan Y., Griffiths H.R. Ceramides redukuje CD36 cell surface expression and oxidised LDL uptake by monocytes and macrophages. Archives of biochemistry and Biophysics. Volume 450, Issue 1, 2006, p.89-99.
18. Negishi T.,Chik C.L.,Ho A.K. Ceramide Enhances Growth Hormone (GH)-Releasing Hormone-Stimulated Cyclic Adenosine 3,5 Monophosphate Accumulation but Inhibits GH Release in Rat Anterior Pituitary Cells. Endocrinology 1999 U.S.A.,Vol. 140, No 12
19.Thermal analysis, p.1-8
20. Faf UK HK
21. Řezanka P. Infračervená spektrofotometrie
<http://ksicht.glu.cz/serial.php.id-serie=Z>
22. Klimeš J. a kol. Kontrola léčiv 1, s.16-17, 1.vyd., Karolinum 2002
ISBN: 80-246-0419-1
23. Chen H.,Mendelsohn R.,Rerek M.,Moore D.Furier transform infrared Spectroscopy and differential scanning kalorimetry studie sof fatty acid Homogeneous ceramide 2. Biochimica et Biophysica Acta 1468 (2000) 293-303

24. 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 (1997) 73-82
24. Shah J.,Atienza J.,Duclos R.,Rawlings A.,Dong Z.,Shipley G. Structural and thermotropic properties of synthetic C16:0 (palmitoyl) ceramide: effect of hydratation. Journal of Lipid Reaserch, Volume 36,1995

Seznam použitých zkratk:

Cer[NS].....ceramid [NS]

SC.....stratum corneum

DSC.....diferenciální skenování kalorimetrie

IR.....infračervená spektrometrie

UV.....ultrafialové záření

chol.....cholesterol

TEM.....transmisní elektronová mikrofotografie

Obr.....obrázek