UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra anorganické a organické chemie

Rigorózní práce

Vliv délky acylu ceramidů na permeabilitu kůže

Hradec Králové, 2009 **Mgr. Petr Lorenc**

Prohlášení o samostatném vypracování práce

Prohlašuji, že jsem na této rigorózní práci pracoval samostatně. Veškerá literatura, z níž jsem při zpracování čerpal, je uvedena v seznamu použité literatury a je v práci řádně citována.

V Hradci Králové, 2009 Mgr. Lorenc Petr

Poděkování

Děkuji PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za odborné vedení při vypracování mé rigorózní práce, za cenné rady při psaní teoretické části a pomoc při získávání a zpracování experimentálních výsledků.

Obsah

Abstract 6
Abstrakt 7
1. ÚVOD A CÍL PRÁCE 8
2. TEORETICKÁ ČÁST 9
2.1. Stavba kůže 9
2.2. Stratum corneum jako kožní bariéra 10
2.2.1. Lipidy tvořící SC 11
2.3. Ceramidy 12
2.3.1. Biosyntéza ceramidů 12
2.4. Permeace látek přes kůži 15
2.4.1. Matematicko-fyzikální vyjádření permeačních parametrů 17
2.5. Vztah mezi nedostatkem ceramidů a kožními onemocněními 19
2.5.1. Problémy kožní bariéry 19
2.5.2. Topická aplikace ceramidů 21
2.5.3. Problémy kožní bariéry - shrnutí 22
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 23
3.1. Použité chemikálie 23
3.1.1 Studované ceramidy 23
3.2. Přístrojové vybavení 24
3.3. Modelová léčiva 25
3.4. Permeační pokusy 25
3.4.1. Příprava kůže 25
3.4.2. Příprava donorových vzorků 26
3.4.3. Příprava akceptorové fáze 26
3.4.4. Vlastní provedení permeačních pokusů 27
3.4.5. Stanovení theofylinu a indometacinu v kůži 28
3.4.6. Měření elektrického odporu kůže 28
3.4.7. Stanovení vlivu ceramidů na rozpustnost theofylinu a indometacinu v donorovém vzorku 28
3.5. HPLC stanovení vzorků 29

3.5.1. Analytická metodika 29
3.5.2. Kalibrační standardy pro stanovení theofylinu a indometacinu 31
3.5.3. Parametry kalibrační křivky 31
3.6. Analýza dat 31
4. VÝSLEDKY A DISKUZE 32
5. ZÁVĚR 38
6. LITERATURA 39
7. PŘÍLOHA 43

Abstract

Ceramides that are present in stratum corneum (SC), the uppermost layer of the skin, are responsible for skin barrier function and thus for its permeability for drugs. Their role in the formation of skin barrier has been widely described; however, up to now, their structure-activity relationships have not been fully revealed. Previous studies suggested, that the ceramide acyl chain length is a key factor for the permeability of the skin barrier.

The aim of this work was to study the influence of the length of ceramide acyl chain on the permeability of the skin barrier using short ceramides, sphingosine, phytoshingosine and ceramide 2 (NS). Short ceramide analogues contained sphingosine with 18 carbon atoms and the acyl chain ranging from 2 to 18 carbon atoms. Their influence on skin permeability was tested *in vitro* in Franz diffusion cells on dermatomed porcine skin using two model drugs – theophylline (TH) and indomethacin (IND). Donor samples were prepared as 5% (w/v) suspension of TH and 2.5% (w/v) suspension of IND with addition of 1% (w/v) ceramide in 60% (v/v) propylene glycol. Negative samples for the comparison of the fluxes and the drug concentrations contained 5% (w/v) suspension of TH and 2.5% (w/v) suspension of IND propylene glycol without the addition of ceramide. Phosphate buffer saline (PBS) was used as an acceptor phase.

The results of this study showed that short ceramides with 2-8C acyl chain lost their barrier function, hence increased the skin permeability. The highest permeability was observed in ceramide analogue C4, which increased the flux of TH 3.8-times and that of IND 2.7-times. Similar pattern was obtained for the skin concentration, with the highest value in ceramide analogue C6. This ceramide increased the concentration of TH and IND in the skin 2.6 and 2.1-times respectively. Pretreatment application of the ceramide analogues confirmed the previous results and proved that the obtained results do not come from an interaction of the tested substances with the model drugs in the sample but from a direct interaction with the skin barrier. These results were also verified by electrical resistance of the skin. The presence of the ceramides did not significantly influence the solubility of TH and IND in donor sample.

The results of this thesis confirmed the previous suggestion that the ceramide chain length plays a key role in skin permeability and that the ceramides with short acyl chain do not have the barrier properties of physiological ceramides.

Abstrakt

Ceramidy obsažené v nejsvrchnější vrstvě epidermis, stratum corneum (SC), jsou zodpovědné za bariérovou funkci kůže a tím i její propustnost pro léčiva. Jejich úloha při tvorbě kožní bariéry je detailně známa, do dnešní doby však není řádně prostudován vztah mezi jejich strukturou a aktivitou. Výsledky dřívějších prací naznačují, že délka řetězce ceramidu je klíčová pro jeho bariérové vlastnosti v kůži. Tato práce se tedy věnovala vlivu délky acylového řetězce ceramidů na propustnost kožní bariéry.

Pro permeační pokusy byly použity krátké analogy ceramidů, sfingosin, fytosfingosin a ceramid 2 (NS). Použité krátké analogy ceramidů měly délku sfingosinu 18 uhlíků a acylový zbytek 2 až 18 uhlíků. Jejich vliv na permeabilitu kůže byl testován *in vitro* ve Franzových difúzních celách na dermatomované prasečí kůži pomocí dvou modelových léčiv theofylinu (TH) a indometacinu (IND). Donorové vzorky byly připraveny jako 5% roztok theofylinu a 2,5% roztok indometacinu s přídavkem 1% ceramidu v 60% propylenglykolu. Pro porovnání hodnot fluxů a koncentrací léčiva v kůži byly připraveny negativní kontrolní vzorky složené jen z 5% roztoku TH a 2,5% roztoku IND v propylenglykolu, bez přídavku ceramidu. Jako akceptorová fáze pro stanovované léčivo byl použit fosfátový pufr (PBS).

Bylo zjištěno, že krátké ceramidy s 2-8 uhlíkatým acylem ztrácí svou bariérovou funkci a naopak prostupnost kůže zvyšují. Největší zvýšení permeability kůže bylo pozorováno u ceramidového analogu C4, který zvýšil flux TH 3,8krát a flux IND 2,7krát. Pro koncentraci modelových léčiv v kůži byly zjištěny podobné vztahy jako u hodnot fluxů, nejvyšší koncentrace v kůži nebyla však zjištěna u ceramidového analogu C4, ale u C6. Tento ceramid zvýšil koncentraci TH v kůži 2,6krát a koncentraci IND 2,1krát. Pretreatment aplikace ceramidových analogů potvrdila předchozí výsledky a dokázala, že nejde o interakci zkoumaných látek s modelovými léčivy ve vzorku, ale skutečně o vliv krátkých ceramidů na kožní bariéru. Tyto výsledky byly také potvrzeny měřením elektrické rezistence kůže. Přítomnost ceramidů neovlivnila rozpustnost TH a IND v donorovém vzorku.

Výsledky této rigorózní práce potvrdily názor dřívějších studií, že délka řetězce ceramidu je klíčová pro permeabilitu kůže a ceramidy s krátkým acylem nemají bariérové vlastnosti fyziologických ceramidů.

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové je část jejího vědeckého potenciálu věnována problematice transdermální permeace, v rámci výzkumného záměru MSM0021620822 Výzkum nových lékových struktur. Základním předpokladem transdermálního podání, tedy aplikace léčiva přes kůži za účelem dosažení systémových hladin, je úspěšné překonání kožní bariéry.

Za bariérovou funkci kůže jsou zodpovědné především ceramidy, tvořící hlavní součást mezibuněčných lipidových lamel v nejsvrchnější vrstvě kůže, stratum corneum[1]. Proto je na katedře též široce studována role ceramidů v kůži. Ačkoliv jejich fyziologická a patologická role již byla do značné míry objasněna, doposud nebyl řádně prostudován vztah mezi jejich strukturou a aktivitou. Výsledky dřívějších prací ukazují, že délka řetězce ceramidu je klíčová pro jeho bariérové vlastnosti v kůži.

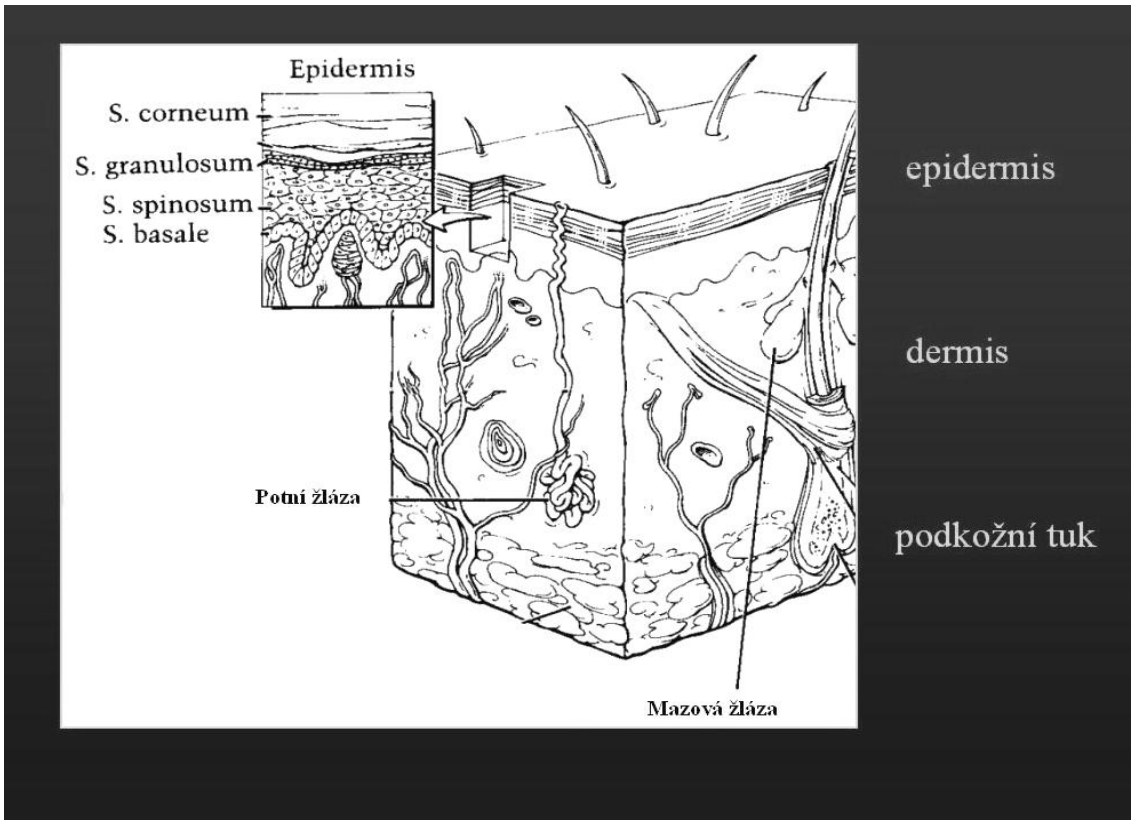
Předmětem této rigorózní práce proto bylo studium vlivu délky acylového řetězce ceramidů na propustnost kožní bariéry. Experimentální část práce zahrnovala permeační pokusy na prasečí kůži in vitro ve Franzových difúzních celách s využitím dvou modelových léčiv, theofylinu a indometacinu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

Primární funkcí lidské kůže je chránit organizmus vůči chemickému i mechanickému poškození a ultrafialovému záření. Kůže zamezuje ztrátám vody a jiných fyziologicky důležitých látek a zabraňuje nebo omezuje permeaci potencionálně toxických látek, alergenů a mikrobů do organismu. Vytváří tak bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím. Vznik pro vodu nepropustné kožní bariéry byl jedním z nejdůležitějších aspektů vývoje života na suché zemi.

2.1. Stavba kůže

Kůže člověka má povrch průměrně 1,8 m^2 a hmotnost 4,3-5 kg (obr. 1.). Je složena ze dvou základních vrstev, dermis a epidermis, průměrná tloušťka je 1,2 mm. Dermis je bohatě prokrvena a inervována a představuje fyziologickou podporu pro vnější avaskulární epidermis. Epidermis, která je široká přibližně 100 až 150 μm, můžeme rozdělit na čtyři základní vrstvy: stratum basale, spinosum, granulosum a stratum corneum (SC). Tyto vrstvy představují různá stádia diferenciace buněk, které jsou vytvářeny z kmenových buněk v bazální vrstvě na hranici epidermis a dermis a migrují směrem ke kožnímu povrchu. Tak se dostávají až na povrch kůže, kde vytvoří novou vrstvu SC a zastanou tak bariérovou funkci buněk, které před nimi podlehly deskvamaci (odlupování opotřebené vrstvy). 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 kompetentní kožní bariéra, se nazývá keratinizace. Celkově se celá epidermis obnoví za 30 dní, z toho 15 dní trvá obnova SC[1].



Obr. 1. Stavba kůže[2].

2.2. Stratum corneum jako kožní bariéra

Kožní bariéra, SC, je tvořena plochými, vzájemně do sebe zapadajícími buňkami s nepropustnou korneocytální obálkou, 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“, kde korneocyty reprezentují „cihly“ a lipidová matrix „maltu“. Tloušťka SC v lidské kůži je asi 20 μm a má obvykle 18-21 vrstev buněk. Soudržnost buněk SC je navíc zajištěna desmozomy[3]. SC je složeno ze 75-80 % proteinů, 5-15 % lipidů a zbytek tvoří další organické sloučeniny a voda, včetně zvlhčujících faktorů (aminokyseliny, močovina, laktamy aj.). Proteiny jsou obsaženy především v korneocytech (asi 70 % α-keratinu a přibližně 10 % β-keratinu), a asi 15 % proteinů představuje jiné peptidické struktury, včetně kožních enzymů. Korneocyty jsou vysoce nerozpustné a velmi rezistentní k působení chemikálií.

2.2.1. Lipidy tvořící SC

Intercelulární prostor SC je vyplněn směsí specifických lipidů s malým množstvím vody. Lipidy tvoří lamely, složené z několika dvojvrstev, ve kterých jsou uspořádány tak, že směřují svou hydrofobní částí dovnitř a hydrofilní, tvořenou hydroxylovými a karbonylovými skupinami vně, do vodného prostředí[4]. Lipidová matrix představuje přibližně 20 % objemu SC. Hlavními složkami hmoty vyplňující intercelulární prostor SC jsou ceramidy (50 %), cholesterol (25 %) a volné mastné kyseliny (10 %). V menší míře jsou přítomny estery cholesterolu s organickými kyselinami, cholesterol-sulfát a další látky, nejsou zde však téměř žádné fosfolipidy[5, 6].

Důvody mimořádně nízké propustnosti SC oproti jiným biologickým membránám jsou:

- Neobvyklá délka volných mastných kyselin a acylových řetězců v ceramidech.
- Relativně malé polární hlavy ceramidů (v porovnání s fosfolipidy), které umožňují těsnější spojení[7].
- Přítomnost cholesterolu jako stabilizátoru lipidických struktur[4].
- Vysoká soudržnost ceramidů díky vodíkovým vazbám mezi polárními částmi.
- Uspořádání lipidů do multilamelární struktury (6-12 vrstev), vzájemně propojené a orientované paralelně ke kožnímu povrchu, která slouží jako primární bariérová funkce SC[7].

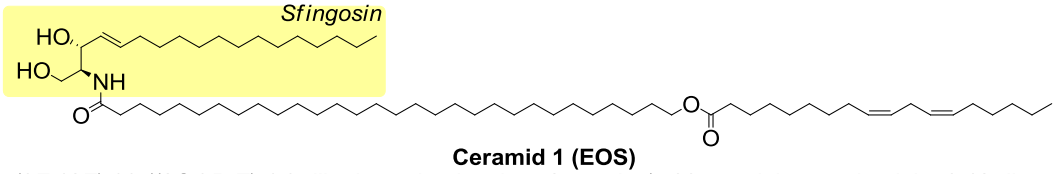
2.3. Ceramidy

Pro bariérovou funkci SC má pravděpodobně největší význam složení mezi-buněčných lipidů a především jejich výjimečné strukturální uspořádání. V roce 1975 pak bylo prokázáno, že hlavní složkou bariérových lipidů jsou ceramidy[5]. Ceramidy jsou strukturálně heterogenní skupinou tvořící devět různých subtypů (obr. 2)[8]. Zatím poslední byl popsán v roce 2003. Základem molekuly je bazický alkohol, kterým může být sfingosin, fytosfingosin nebo 6-hydroxysfingosin. Na jejich primární aminoskupinu v poloze 2 se amidicky váže mastná kyselina, která může v poloze α a nebo ω obsahovat hydroxyskupinu. Délka mastné kyseliny se pohybuje od 16 až po 34 uhlíků, přičemž nejčastěji se vyskytují kyseliny obsahující 24 uhlíků[5,6].

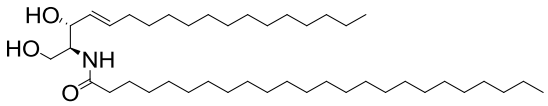
Z hlediska stavby lamel a jejich organizace hrají významnou roli ceramidy, ve kterých je sfingosin (nebo jeho derivát) navázán na ω-hydroxykyselinu s 30-34 uhlíky, jejíž hydroxyl je esterifikován kyselinou linolovou (ceramid 1, 4 a 9). Ceramid 1 (EOS) tvoří základ lipidových lamel. Tento typ ceramidu tvoří jakousi matrici, okolo které se organizují ostatní ceramidy, ve kterých je kyselinová část tvořena kyselinami s 20-24 uhlíky. Z mastných kyselin jsou ve SC přítomny především kyselina behenová (C_{22}) a lignocerová (C_{24}), v menší míře pak palmitová, stearová a další[4].

2.3.1. Biosyntéza ceramidů

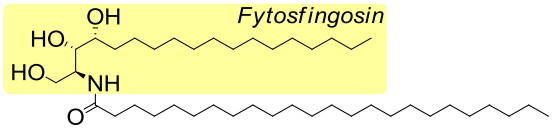
V lamelárních granulech jsou ceramidy přítomny ve formě glukosylceramidů a sfingomyelinů, které pravděpodobně představují méně lipofilní transportní formu kožních ceramidů. Tyto prekurzory jsou syntetizovány ze serinu a palmitoylkoenzymu A. Na rozhraní stratum granulosum a SC jsou extrudovány z lamelárních granul, metabolizovány na ceramidy a spolu s mastnými kyselinami a cholesterolem vytváří lamely, které zcela vyplní mezibuněčný prostor SC. Pro uvolnění ceramidů z těchto prekurzorů je nutná glukocerebrozidáza a sfingomyelináza[1].



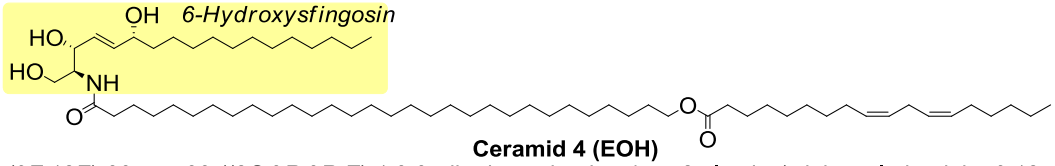
Ceramid 1 (EOS)
(9*Z*,12*Z*)-30-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-ylamino)–30-oxotriakontyl-oktadeka-9,12-dienoát



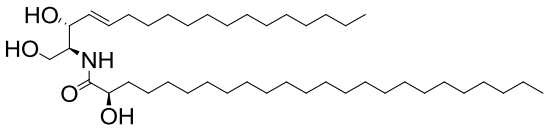
Ceramid 2 (NS)
N-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)tetrakosanamid



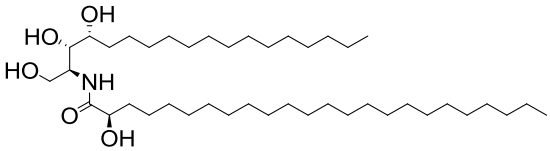
Ceramid 3 (NP)
N-((2*S*,3*S*,4*R*)-1,3,4-trihydroxyoktadekan-2-yl)tetrakosanamid



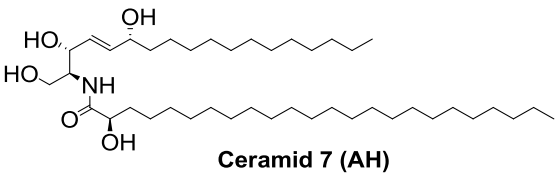
Ceramid 4 (EOH)
(9*Z*,12*Z*)-30-oxo-30-((2*S*,3*R*,6*R*,*E*)-1,3,6-trihydroxyoktadec-4-en-2-ylamino)triakontyl-oktadeka-9,12-dienoát



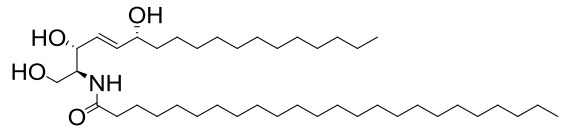
Ceramid 5 (AS)
(*R*)-*N*-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)-
-2-hydroxytetrakosanamid



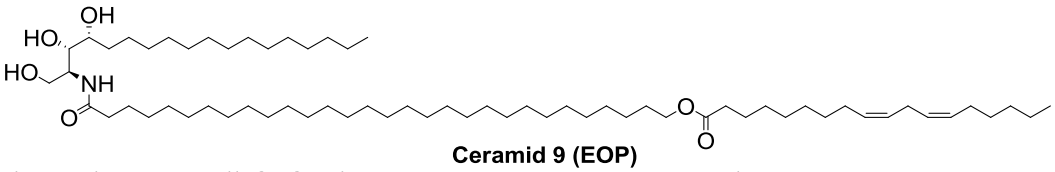
Ceramid 6 (AP)
(*R*)-2-hydroxy-*N*-((2*S*,3*S*,4*R*)-1,3,4-trihydroxyoktadekan-
-2-yl)tetrakosanamid



Ceramid 7 (AH)
(*R*)-2-hydroxy-*N*-((2*S*,3*R*,6*R*,*E*)-1,3,6-trihydroxyoktadec-4-en-2-
yl)tetrakosanamide



Ceramid 8 (NH)
N-((2*S*,3*R*,6*R*,*E*)-1,3,6-trihydroxyoktadec-4-en-2-yl)-tetrakosanamide



Ceramid 9 (EOP)
(9*Z*,12*Z*)-30-oxo-30-((2*S*,3*S*,4*R*)-1,3,4-trihydroxyoktadekan-2-ylamino)triakontyl-oktadeka-9,12-dienoát

A = α-hydroxykyselina; **EO** = esterifikovaná ω-hydroxykyselina; **H** = 6-hydroxysfingosin; **N** = nehydroxylovaná kyselina; **P** = fytosfingosin; **S** = sfingosin

Obr. 2. Chemické struktury ceramidů[8].

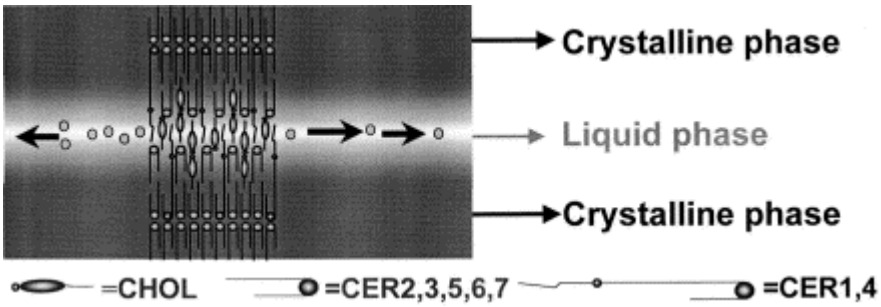
Postup při objasňování struktury kožních ceramidů umožnil vytvoření nomenklatury založené na jejich molekulární struktuře, oproti dřívějšímu systému založeném na chromatograficky oddělitelných ceramidových frakcích. Tento systém vytváří jednotlivé charakteristiky, které naznačují typ mastné kyseliny a typ baze. Molekula ceramidu obsahuje polární hlavu a dva hydrofobní řetězce, jednotlivé ceramidy se od sebe odlišují stavbou polární hlavy a délkou řetězce mastné kyseliny [9,10,11,12]

2.3.2. Uspořádání lipidů v lamelách

Lipidy mohou být ve fázi pevného krystalu, gelové fázi a kapalně krystalické fázi. Za fyziologické teploty jsou lipidové řetězce většinou v pevné krystalické nebo gelové fázi. V těchto fázích vykazuje membrána malé difúzní vlastnosti a je méně propustná než membrána v kapalně krystalickém stavu, který se nachází za vysokých teplot[13].

Metodou širokoúhlé rentgenové difrakce bylo zjištěno, že oblasti krystalicky uskupených lipidů se střídají s fázemi povahy gelu v pravidelném sledu[3]. Elektronověmikroskopickou analýzou byly pozorovány 13nanometrové opakující se jednotky sestávající ze světlých proužků ve sledu široký – úzký – široký (obr. 3).

V širokých 6nanometrových pásech na koncích mezibuněčného prostoru se nacházejí lipidy vázané na buněčný povrch (ceramidy s dlouhými řetězci), lipidy jsou ve fázi krystalické a zodpovídají pravděpodobně za bariérové vlastnosti kůže. Úzké 3nanometrové pruhy sestávají z cholesterolu a jeho derivátů a dále sem zasahují linoleátové řetězce ceramidu 1, 4 a 9, takzvané molekulové zipy. Tyto úzké pruhy (tekutá fáze) pravděpodobně zodpovídají za elasticitu kůže[14,15].



Obr. 3. Model bariérové struktury[8].

2.4. Permeace látek přes kůži

Transdermální absorpce do systémové cirkulace zahrnuje permeaci přes SC, živou epidermis a vrchní kožní vrstvy. Hlavní bariéru pro permeaci valné většiny látek tvoří SC. Živá epidermis působí jako důležitá bariéra pouze pro permeaci extrémně lipofilních sloučenin[16,17].

Existují tři potenciální cesty přestupu přes kožní bariéru:

1. přestup přes SC
2. cesta přes vlasové folikuly
3. permeace pomocí potních žláz.

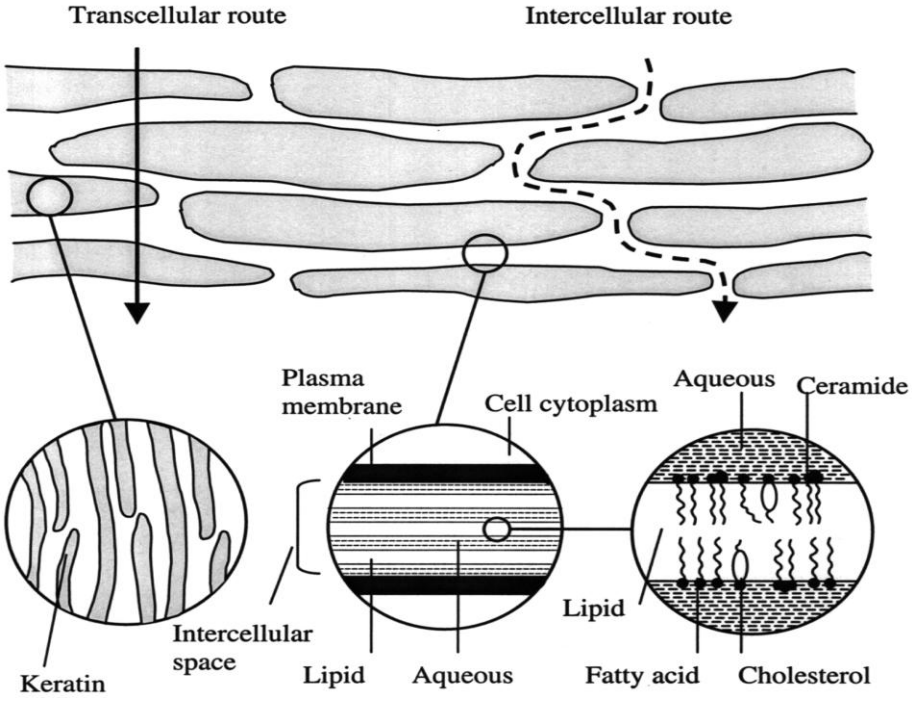
Protože vlasové folikuly a potní žlázy tvoří asi jen 0,1 % kožního povrchu, zdá se cesta přes póry zajímavou pouze pro omezený počet sloučenin, např. látky s vysokou molekulární hmotností[18,19]. Jako příklad lze uvést DNA, velikou molekulu, která může imunizovat po topické aplikaci, což naznačuje možnost folikulárního transportu[20].

Přes SC byly popsány dvě cesty permeace (obr. 4):

1. intracelulární (transcelulární) cesta přes korneocyty
2. intercelulární (paracelulární) cesta přes mezibuněčné lipidy.

Bylo prokázáno, že pro množství substancí s širokým spektrem polarity je intercelulární cesta nejčastější cestou penetrace[21,22,23]. Byly také popsány vztahy mezi cestou kožní permeace u různých sloučenin a jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Zjistilo se, že možnost vytvoření vodíkové vazby, velikost a lipofilita molekuly jsou nejdůležitějšími faktory, které rozhodují o permeabilitě sloučenin[24,25,26].

Experimentálně bylo prokázáno, že délka difúzní cesty je mnohem větší než je tloušťka SC (přibližně 20 μm) a byla přibližně vypočtena na 500 μm. Důležité je, že intercelulární prostor obsahuje lipidové struktury a difundující molekuly musí překonat různé lipofilní a hydrofilní prostory předtím, než dosáhnou spojení mezi SC a živou epidermis. Prostředí kožní bariéry je velmi heterogenní a je proto možná překvapující, že difúze přes ní může být popsána podobně jako u homogenních membrán Fickovým difúzním zákonem[27].



Obr. 4. Permeace přes SC[18].

2.4.1. Matematicko-fyzikální vyjádření permeačních parametrů

Nejzákladnější rovnicí vyjadřující difúzi je Fickův první zákon, který popisuje tok v ustáleném stavu (flux) **J** pomocí následujícího vzorce (1):

$$J = \frac{D \times c_{s,m}}{L} \times \frac{c_v}{c_{s,v}} \qquad (1)$$

J flux je kumulativní množství léčiva prošlé přes jednotku plochy kůže za čas ($\mu g/cm^2/h$)

D difúzní koeficient v kůži (m^2/s)

L šířka membrány (μm)

$c_{s,m}$ rozpustnost v membráně

c_v koncentrace ve vehikulu

$c_{s,v}$ rozpustnost léčiva ve vehikulu

Dle Fickova prvního zákona je **J** přímo úměrný difúznímu koeficientu **D** léčiva v membráně, rozpustnosti léčiva v membráně $\mathbf{c_{s,m}}$ a koncentraci léčiva rozpuštěné ve vehikulu $\mathbf{c_v}$. Naopak **J** klesá s rostoucí šířkou membrány **L** a rozpustností léčiva ve vehikulu $\mathbf{c_{s,v}}$[28].

Kumulativní množství léčiva proniknuvšího jednotkovou plochou za určitou dobu (nejčastěji za 24 hodin), se označuje jako $\mathbf{Q_{24}}$ ($\mu g/cm^2$) .

Ideální fyzikálně-chemické vlastnosti molekuly penetrující přes kůži se dají vyčíst z následujícího vzorce (2):

$$J = \frac{dm}{dt} = \frac{D \times Co \times K}{L} \qquad (2)$$

$\mathbf{C_o}$ je konstantní koncentrace léčiva v donorovém vzorku

K je rozdělovací koeficient permeantu mezi kůží a roztokem[18]

Jednoduchý rozbor rovnic ukazuje, že proměnné, které mohou být ovlivněny tak, abychom dosáhli maximálního **J** látky, jsou *rozdělovací koeficient*, *difúzní koeficient* a *koncentrace aplikovaného permeantu*[29].

Zlepšení permeace léčiv může být tedy dosaženo:

- Zvýšením difúzního koeficientu (**D**) rozrušením lipidů ve stratum corneum.
- Zvýšením rozpustnosti permeantu v kůži ($\mathbf{c_{s,m}}$).
- Zvýšením nasycenosti vehikula léčivem (poměru $\mathbf{c_v/c_{s,v}}$)[28].

V nejjednodušším případě tak lze zvýšit koncentraci aplikovaného permeantu (léčiva ve vehikulu) až na hodnotu jeho vlastní rozpustnosti. Následné zvýšení koncentrace by již nemělo žádný efekt na permeační křivku. Bylo zjištěno, že 1% suspenze by byla stejně účinná jako 5% suspenze[30]. Velké molekuly mají tendenci difundovat pomalu, molekuly s dobrou rozpustností v obou prostředích, hydrofilním i hydrofobním, permeují dobře[31]. Mnohé permeanty jsou slabými kyselinami nebo slabými bazemi. Permeace je závislá na stupni ionizace, na tom, jak ionizace ovlivňuje rozpustnost v aplikované fázi a na rozdělování ionizované látky do kůže. Je tedy prospěšné aplikovat léčivo v jeho ionizované formě, ve které sice bude mít menší permeabilitní koeficient, ale zato bude mít mnohem větší rozpustnost[32].

Vlastnosti vhodného permeantu tedy jsou:

- Nízká molekulová hmotnost, nejlépe pod 500 Da (látka má vysoký **D**).
- Dobrá rozpustnost ve vodě i v oleji, kdy membránový koncentrační gradient je vysoký, ($\mathbf{C_o}$ je vysoký). Ideální jsou saturované roztoky nebo suspenze s maximální termodynamickou aktivitou, které vykazují nejvyšší flux. Molekula s přiměřeně vysokým rozdělovacím koeficientem (**K)** má dobrou rozpustnost v mezibuněčných lipidech stratum corneum a zároveň je dostatečně hydrofilní, aby se dostala do živé části epidermis.
- Nízká teplota tání korelující s dobrou rozpustností a stabilitou léčiva[18].

2.5. Vztah mezi nedostatkem ceramidů a kožními onemocněními

Vztah mezi onemocněním kůže a změnami ve složení lipidové bariéry, zvláště ceramidů, je velmi těžké dokázat, protože v tomto vztahu existuje mnoho proměných. Přesto většina kožních onemocnění, které mají oslabenou bariérovou funkci SC, vykazuje pokles v celkovém množství ceramidů a jejich abnormální složení.

Preparáty, které obsahují lipidy, identické s těmi v kůži, a částečně nějaké doplňky ceramidů, mohou zmírnit poškození kožních funkcí. Sníží množství penetrujících alergenů, dráždivých látek a mikrobů a omezí exacerbace onemocnění s typickými lézemi. Použití fyziologických lipidů, vzhledem k těmto parametrům, má potenciál jako nové formy topické terapie dermatóz. Alternativní strategie k zvýšení ochranné funkce kůže je topická aplikace lipidových prekurzorů, která vede k podpoření schopnosti syntézy přírodních lipidů v kůži[33]. Současné práce ukazují velmi pozitivní výsledky s bariérovým krémem obsahujícím ceramidy u dětí s atopickou dermatitidou[34].

2.5.1. Problémy kožní bariéry

Problémy kožní bariéry lze rozdělit podle následující klasifikace:

- Akutní poškození kožní bariéry, není spojeno se zánětem, vede k patologickým projevům kůže, příkladem jsou extrakce organickými rozpouštědly nebo krátký kontakt s agresivním detergentem.
- Chronické poškození kožní bariéry se projevuje změnami v rohové vrstvě, jako abnormální suchost, šupinatost a drsnost. Je často závislá na ročním období a více se projevuje u pacientů s atopickou kůží a kontaktní dermatitidou. Vede k zánětlivým reakcím a někdy má svůj počátek v kožním onemocnění.
- Strukturální změny v kožní bariéře, jak je to pozorováno u ichtyózy, generální dyskeratózy a atopické kůže.
- Zánětlivá onemocnění kůže, která jsou provázena změnami kožní bariéry hlavně u atopické dermatitidy a psoriázy[35].

Na množství lipidů a složení kožní bariéry má však významný vliv i věk, pohlaví, tělesná konstituce, fenotyp, stres, životní prostředí, roční období a UV záření. Nižší obsah ceramidů a snížená schopnost regenerace byla popsána u stárnoucí kůže. Zástupci ve věkové kategorii 41-50 let, měli množství ceramidů až o polovinu nižší než skupina ve věku 21-30 let, nejvýraznější změny jsou na obličeji[1]. Hodnoty lipidů ve SC (měřeno na obličeji, ruce a noze) byly výrazně sníženy v zimním období v porovnání s jarem a létem[36]. Na složení ceramidů SC mají u žen též velký vliv změny hormonálních hladin[37]. Vliv UV záření velmi závisí na dávce. V nízkých (suberythermálních) dávkách dochází ke zvyšování množství ceramidů v SC a k vylepšení funkce kožní bariéry, což se využívá při fototerapii atopické kůže. Vyšší dávky však způsobují poškození bariéry, snížení množství ceramidů a vyvolávají zánět[38].

Nedostatek ceramidů a jejich abnormální složení je typické pro tato kožní onemocnění:

- *Atopická dermatitida* je zánětlivé kožní onemocnění s imunologickým základem provázené významnou poruchou kožní bariéry. Dochází k masivnímu snížení množství ceramidů 1 (EOS) a 3 (NP), zvýšení transepidermální ztráty vody a snížení hydratace kůže. Dochází k degradaci obou prekurzorů ceramidů díky enzymu glucosylceramid-sfingomyelin deacyláza. Je snížená aktivita sfingo-myelinázy produkující ceramidy[33,39].
- *Psoriáza* (lupénka) je chronické kožní onemocnění s poruchou keratinizace a zvýšenou propustností povrchové vrstvy kůže. Její příčina je neznámá, značný význam má dědičnost. Projevuje se výsevem drobných červených pupínků, které později splývají ve větší ložiska pokrytá stříbřitými šupinkami. Často se objevuje v okolí loktů, kolen, ale může být např. i ve vlasaté části hlavy. Psoriázu nelze zcela vyléčit, ale řada postupů ji může alespoň načas zklidnit[40]. Ultrastrukturální analýza SC u psoriatických lézí ukázala extrémně úzké mezibuněčné prostory, které obsahovaly několik patologických lipidových lamel mezi vysokým počtem parakerotických korneocytů[41]. Podobně jako u atopické dermatitidy bylo u psoriázy nalezeno nižší množství ceramidů. Možnými příčinami nedostatku ceramidů je snížená exprese glukocerebrozidázy, díky níž je v SC menší množství ceramidů vznikajících z glukosylceramidů a snížená syntéza ceramidů ze serinu[33,39].

- *Ichtyóza* zahrnuje širokou skupinu dědičných i získaných hyperkeratóz, pro které je charakteristické ztluštělé a šupinaté SC. Zevně vypadá toto onemocnění jako suchá kůže, ale nemusí to být vždy sníženým obsahem vody v kůži. Příčinou může být snížená deskvamace, zvýšená proliferace keratinocytů nebo poruchy metabolismu lipidů, zejména ceramidů[33].
- *Xeroza,* neboli suchá kůže, je příkladem chronického poškození kožní bariéry, které je velmi často spojeno s ročním obdobím a více se vyskytuje u pacientů s atopickou kůží. Změny v rohové vrstvě, jako jsou drsnost a abnormální suchost, jsou zodpovědné za zvýšenou náchylnost k iritujícím látkám a následně ke kožnímu poškození[42].
- *Akné* je kožní onemocnění charakterizované zánětem mazových žláz. Nejčastěji vzniká u dospívajících vlivem hormonálních změn a určitých vrozených dispozic. Příznaky jsou od jednoduchých komedonů, až po rozsáhlejší hnisavé a jizvící projevy[40]. I u akné se vyskytují změny ve složení ceramidů, především nižší obsah ceramidu 1 (EOS), obsahujícího esenciální mastnou kyselinu linolovou. Nejvýraznější pokles je v komedonech[33].

2.5.2. Topická aplikace ceramidů

Přestože aplikace ceramidů nemůže výše zmíněná onemocnění vyléčit, zlepšení bariérové funkce kůže prokazatelně snižuje spotřebu kortikoidů, případně antibiotik[33,39].

HVLP obsahující ceramidy na našem trhu jsou *Lipobase Repair*® (Astellas) a *Bevita* (Orion Pharma)[43], problémem však zůstává jejich vysoká cena. Různé ceramidové analogy využívá také celá řada kosmetických firem.

Součástí vědeckého výzkumu, věnovaného problematice ceramidů, na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové byl na tomto pracovišti vyvinut ceramidový analog 14S24, který v testech na izolované lidské kůži vykázal vysokou schopnost regenerace poškození kožní bariéry, za daných podmínek dokonce lépe než fyziologické ceramidy. Jeho značnou výhodou je jeho nízká cena[1].

2.5.3. Problémy kožní bariéry - shrnutí

Výzkum struktury a funkce ceramidů výrazně narostl v období posledních 20-ti let. Ceramidy zahrnují heterogenní, komplexní skupinu sloučenin, které jsou založené na sfingoidní struktuře s rozdílnou délkou acylového řetězce. Řadou studií je potvrzeno, že ceramidy hrají klíčovou roli ve struktuře a zachování vodní permeability kožní bariéry.

Široké rozpětí ceramidů, nacházející se v SC není nadbytečné, protože každý ceramidový druh má své jedinečné vlastnosti, které přinášejí organizaci a soudržnost, a umožňují poskytovat SC funkci kožní bariéry[33].

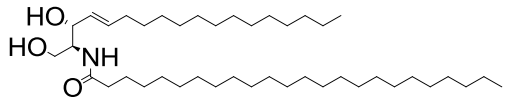
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité chemikálie

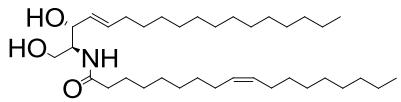
acetonitril pro HPLC od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, SRN)
azid sodný od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, SRN)
dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, SRN)
hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, SRN)
chlorid sodný od firmy Lachema, a.s. (Brno, ČR)
indometacin od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, SRN)
methanol pro HPLC od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, SRN)
propylenglykol od firmy RNDr. Jan Kulich s.r.o. (Hradec Králové, ČR)
theofylin od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, SRN)
ultračistá voda pro HPLC byla vyrobena systémem Milli-Q-Water Filtration (Millipore, Bedford, MA)

3.1.1 Studované ceramidy

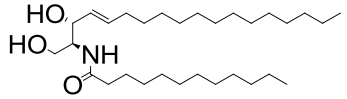
studované ceramidy byly zakoupeny od firmy Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)



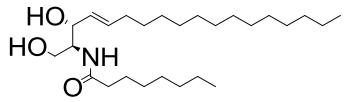
Ceramid NS (ceramid C24)
N-tetrakosanoylsfingosin
N-((2S,3R,E)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)tetrakosanamid



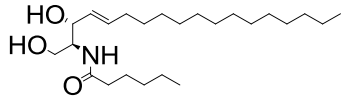
Ceramid C18:1
N-oleoylsfingosin
N-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)oleamid



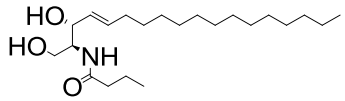
Ceramid C12
N-dodekanoylsfingosin
N-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)dodekanamid



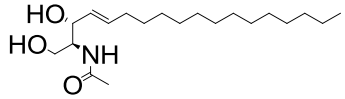
Ceramid C8
N-oktanoylsfingosin
N-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)oktanamid



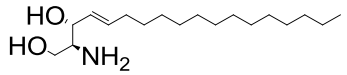
Ceramid C6
N-hexanoylsfingosin
N-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)hexanamid



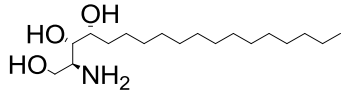
Ceramid C4
N-butyroylsfingosin
N-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)butyramid



Ceramid C2
N-acetylsfingosin
N-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)acetamid



Sfingosin
(2*S*,3*R*,*E*)-2-aminooktadec-4-en-1,3-diol



Fytosfingosin
(2*S*,3*S*,4*R*)-2-aminooktadekan-1,3,4-triol

3.2. Přístrojové vybavení

automatické mikropipety od firmy Biohit (Rosbach, SRN)

centrifuga minispin od firmy Eppendorf (Hamburg, SRN)

dermatom Aesculap od firmy B.Braun Medical s.r.o. (Praha, ČR)

digitální váhy od firmy Sartorius (Goetingen, SRN)

digitální pH metr s mikroelektrodou HC 153 od firmy Hanna instrument (Leighton Buzzard, UK)

kolona LiChroCART 250-4 od firmy Merck (Darmstadt, SRN)
laboratorní termostat od firmy Memmert (Schwabach, SRN)
laboratorní třepačka MS2 od firmy IKA (Staufen, SRN)
LCR-metr 4080 od firmy Conrad electronic (Hirschau, SRN)
magnetická míchačka od firmy Fisher Scientific (Waltham, USA)
sestava pro HPLC od firmy Schimadzu (Kyoto, Japonsko)
termostatová vodní lázeň od firmy Memmert (Schwabach, SRN)
vícemístná ponorná magnetická míchačka od firmy Variomag (Florida, USA)
vakuová vývěva od firmy KNF LAB (New Jersey, USA)

3.3. Modelová léčiva

Pro zjišťování schopnosti ovlivnit průnik léčiv kožní bariérou je velmi výhodné zvolit látku, která sama, za normálních okolností, proniká zdravou kůží velmi neochotně. Zároveň je nutné, aby použitá látka nebyla dráždivá a svými vlastnostmi sama neovlivňovala bariérové vlastnosti kůže. Musí se též jednat o látku, kterou lze v akceptorové fázi snadno stanovit běžnými analytickými metodami[44].

Pro své vhodné vlastnosti byly zvoleny tyto látky:

Theofylin (TH) má molekulovou hmotnost M_r = 180,17 g/mol, lipofilitu logP = -0,1, ionizační konstantu pKa = 1,7 a 8,8 a flux skrz prasečí kůži J = 2,06 μg/cm^2/h.

Indometacin (IND) má molekulovou hmotnost M_r = 357,79 g/mol, lipofilitu logP = 3,7, ionizační konstantu pKa = 4,5 a flux skrz prasečí kůži J = 0,32 μg/cm^2/h[45].

3.4. Permeační pokusy

3.4.1. Příprava kůže

Jelikož je z etických důvodů poměrně problematické provádět permeační pokusy na lidské kůži, jsou mnohé studie prováděny za použití náhrad. Jako modelová membrána byla proto, pro svou podobnost s lidskou, vybrána prasečí kůže. Prasečí uši byly získány z podniku Skaličan a.s., Česká Skalice. K zachování celistvosti SC je však bezpodmínečně nutné odpreparovat kůži z ucha mrtvého zvířete před jeho spařením vroucí vodou.

Z dorzální strany ucha byla pomocí skalpelu stažena kůže plné tloušťky a zbavena chlupů zastřihovačem tak, aby nedošlo k jejímu poškození. Poté byla kůže upravena dermatomem na tloušťku 1000 μm. Dermatomované fragmenty byly z důvodu konzervace na 5 minut ponořeny do 0,05% roztoku azidu sodného. Jednotlivé osušené kůže byly uchovány v polyethylenových sáčcích při –20 °C, maximálně po dobu dvou měsíců.

3.4.2. Příprava donorových vzorků

Donorové vzorky byly připraveny jako 5% roztok theofylinu a 2,5% roztok indometacinu s přídavkem 1% ceramidu v 60% propylenglykolu. Ceramidy v donorových vzorcích obsahovaly buď sfingosin, fytosfingosin, krátké analogy ceramidů nebo ceramid 2 NS (24 uhlíků) – pozitivní kontrolní vzorek. Pro porovnání hodnot fluxů jednotlivých vzorků obsahujících ceramidy byly připraveny negativní kontrolní vzorky složené jen z 5% roztoku theofylinu a 2,5% roztoku indometacinu v propylenglykolu, bez přídavku ceramidu. Roztoky byly homogenizovány po dobu 5 minut na magnetické míchačce při teplotě 50 °C. Poté byly vzorky uloženy v termostatu po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C. Těsně před aplikací na kůži byly suspenzní vzorky zhomogenizovány pomocí laboratorní třepačky.

3.4.3. Příprava akceptorové fáze

Jako akceptorová fáze pro stanovované léčivo (permeant) byl použit ve Franzových celách fosfátový pufr pH 7,4 (PBS), který zaručuje vysokou rozpustnost permeantu ve fázi, minimální inkompatibility s léčivem a dobrou rozlišitelnost retenčního času permeantu a fáze při HPLC analýze.

Zásobní roztok pufru byl připraven rozpuštěním 2,1 g $NaH_2PO_4.2\ H_2O$ v 500 ml vody pro HPLC a 19,1 g $Na_2HPO_4.12\ H_2O$ ve 400 ml vody pro HPLC. Asi 300 ml roztoku $Na_2HPO_4.12\ H_2O$ bylo přidáno k 500 ml $NaH_2PO_4.2\ H_2O$ a pH bylo upraveno na hodnotu 7,4 přidáním potřebného množství roztoku Na_2HPO_4 za stálého míchání na magnetické míchačce. Pufr byl izotonizován přidáním 4,4 g NaCl na litr připraveného roztoku a konzervován azidem sodným o koncentraci 0,3 g/l.

3.4.4. Vlastní provedení permeačních pokusů

Před započetím vlastního permeačního pokusu bylo nutno sestavit Franzovy difúzní cely. Tyto permeační buňky se skládají z donorové a akceptorové části, které jsou oddělené vzorky kůže[33]. Difúzní plocha byla 1 cm^2 a objem akceptorové části přibližně 17 ml.

Kožní vzorky byly bezprostředně před použitím pomalu rozmraženy a opatrně prohlédnuty, zda nedošlo k jejich poškození. Části kůží byly nařezány skalpelem na rozměry 2 x 2 cm, zafixovány silikonovým olejem mezi dvě destičky z plexiskla, v nichž je vyříznut kruhový otvor o velikosti 1 cm^2 ohraničující permeační plochu, a vloženy do cel tak, aby dermální strana směřovala směrem dolů do akceptorové fáze. Pro objektivnější hodnocení byla pro každý pokus použita kůže z dvou až jedenácti zvířat.

Akceptorové fáze byly naplněny fosfátovým pufrem simulujícím prostředí krevního oběhu. Její přesný objem byl změřen pro každou celu a byl zahrnut do výpočtů. Sestavené Franzovy cely s upevněnými kůžemi byly postaveny do vodní lázně vytemperované na 32 °C 30 minut před vlastním nanesením vzorků. Tato lázeň byly vybavena magnetickým míchadlem pro každou celu. Po dosažení ustáleného stavu (vyrovnání teplot a rovnoměrná hydratace kůže) bylo aplikováno na horní stranu kůže 140 µl donorového vzorku a překryto krycím sklíčkem, aby se zabránilo odpařování rozpouštědla.

Vzorky o objemu 600 µl byly odebírány z akceptorové fáze v předem určených časových intervalech (3, 6, 18, 21, 24, 27 a 30 hodin), po každém odběru byl objem akceptorové fáze doplněn čistým pufrem. Odebrané vzorky byly uzavřeny do skleněné vialky a jejich obsah vyhodnocen pomocí HPLC. Pro každý sledovaný vzorek byl pokus 4-16krát zopakován.

Při experimentech s pretreatment aplikací analogů ceramidů byl postup stejný jako bylo popsáno výše. Pouze 2 hodiny před samotným nanesením vzorku léčiva bylo na kůži aplikováno 100 µl 1% ceramidu v 60% propylenglykolu bez TH a IND. V případě negativního kontrolního vzorku byl aplikován jen 60% propylenglykol. Před vlastní aplikací donorových vzorků byla kůže očištěna, opláchnuta (60% ethanol a následně destilovaná voda), opatrně osušena vatovou tyčinkou a byla změřena elektrická rezistence. Poté byly na kůži aplikovány vzorky léčiva bez ceramidů.

3.4.5. Stanovení theofylinu a indometacinu v kůži

Po ukončení permeačního experimentu, za 30 hodin, byly difúzní cely rozebrány. Z důvodu odstranění zbytků donorových vzorků byl povrch kůže opláchnut 0,5 ml 60% ethanolu a následně 0,5 ml destilované vody. Plocha 1 cm^2 kůže, která byla vystavena působení vzorku, byla vyseknuta, osušena, zvážena a umístěna s magnetickým míchadlem do vialky. Do každé vialky se vzorkem kůže bylo přidáno 5,0 ml mobilní fáze pro TH nebo IND a kůže byly extrahovány při 32 °C na vodní lázni, za stálého míchání, po dobu 48 hodin. Koncentrace léčiva v kůži byla stanovena metodou HPLC. Účinnost extrakce byla 98 ± 2 % pro TH a 101 ± 7 % pro IND, což je v souladu s FDA předpisem pro validaci bioanalytických metod, 2001[45].

3.4.6. Měření elektrického odporu kůže

Dalším měřítkem vlivu studovaných ceramidů na bariérovou funkci kůže bylo měření její elektrické rezistence pomocí LCR-metru 4080 (měřící rozsah 20 Ω – 10 MΩ, chyba u hodnot v řádu kΩ < 0.5%, měřící frekvence 120 kHz). Na vzorky kůže ve Franzových difúzních celách byly aplikovány vzorky ceramidů či kontrola, viz výše. Po dvou hodinách byly vzorky odstraněny a povrch kůže byl opláchnut (60% ethanol a následně destilovaná voda). Na každou kůži bylo aplikováno 0,5 ml PBS a změřena elektrická rezistence pomocí dvou elektrod – jedné v donorové a jedné v akceptorové části cely.

3.4.7. Stanovení vlivu ceramidů na rozpustnost theofylinu a indometacinu v donorovém vzorku

Pro stanovení rozpustnosti TH a IND v donorovém vzorku, který byl ponechán 48 hodin v termostatu při 37 °C, byly zbytky rozpuštěných vzorků 10 minut centrifugovány rychlostí 13 400 otáček/min. Dále bylo odebráno 20 µl supernatantu pro vzorky s obsahem TH a 2 500krát naředěno, pro vzorky s obsahem IND bylo odebráno 10 µl supernatantu a 100krát naředěno. Koncentrace léčiv byly stanoveny metodou HPLC.

3.5. HPLC stanovení vzorků

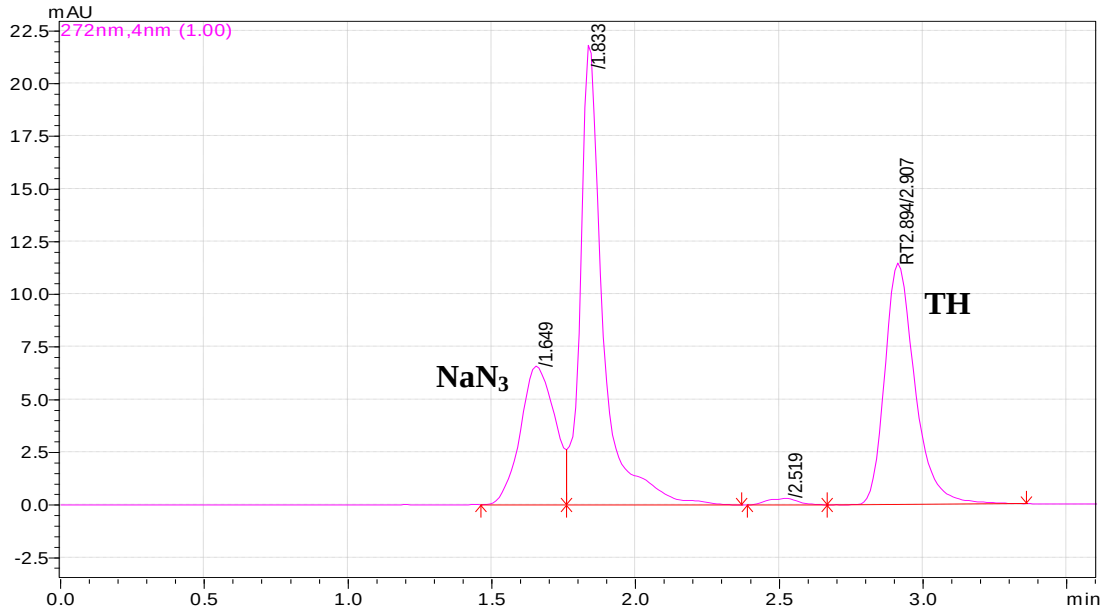
3.5.1. Analytická metodika

Metodika HPLC stanovení theofylinu a indometacinu byla vypracována již dříve a pro účely této práce byla pouze přejata.

Vzorky byly analyzovány systémem sestávajícím z vysokotlaké pumpy Schimadzu, vysokotlakého čerpadla Shimadzu LC-20AD, autosampleru Shimadzu SIL-20-AC, UV/VIS detektoru Shimadzu SPD-20A a integračního software LCsolution verze 1.22.

Pro separaci theofylinu byly použity tyto podmínky:

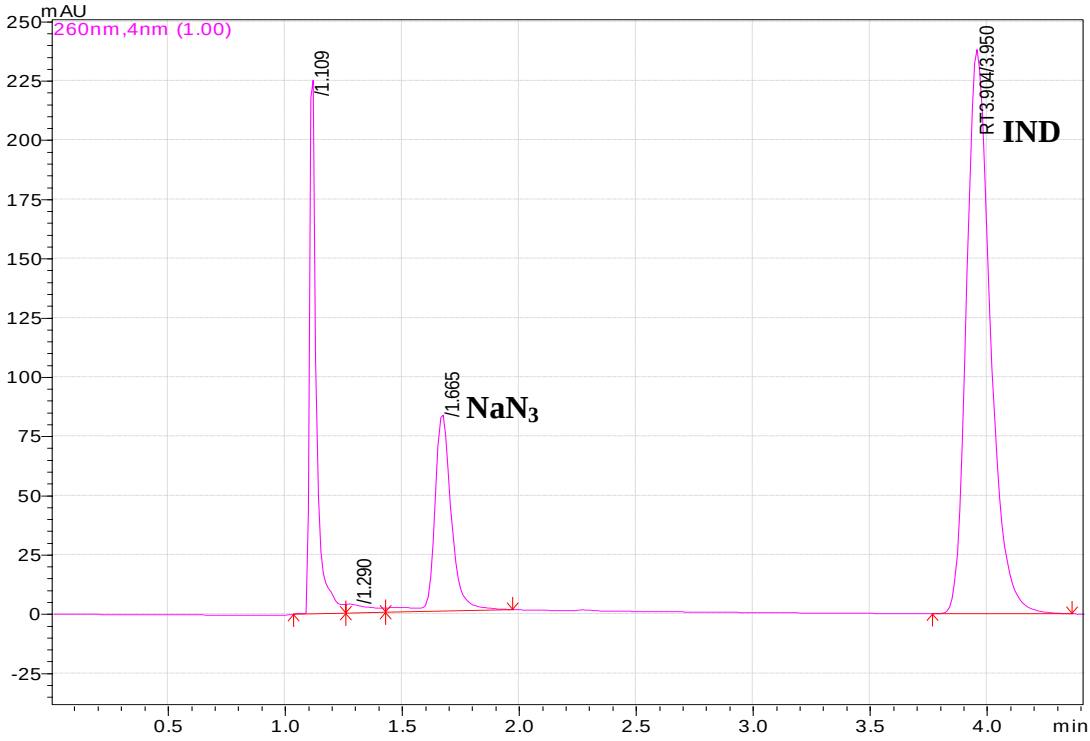
- kolona LiChroCART 250-4 s náplní LiChrospher 100 RP-18, 5 µm
- teplota kolony 35 °C
- mobilní fáze 100 mM NaH_2PO_4 + 40% methanolu
- průtok mobilní fáze 1,2 ml/min (tlak kolem 20 MPa)
- detekce UV, vlnová délka 272 nm
- retenční čas ±3 min podle kolony (délka analýzy cca 4 min)
- nástřik na kolonu 20 µl.



Obr.5. Analýza akceptorové fáze s obsahem theofylinu.

Pro separaci indometacinu byly použity tyto podmínky:

- kolona LiChroCART 250-4 s náplní LiChrospher 100 RP-18, 5 µm
- teplota kolony 40 °C
- mobilní fáze acetonitril/voda/kyselina octová 90:60:5 (v/v/v)
- průtok mobilní fáze 1,5 ml/min
- detekce UV, vlnová délka 260 nm
- retenční čas ±3,3 min podle kolony (délka analýzy cca 5 min)
- nástřik na kolonu 50 µl.



Obr.6. Analýza akceptorové fáze s obsahem indometacinu.

3.5.2. Kalibrační standardy pro stanovení theofylinu a indometacinu

Kalibrační standardy byly připraveny naředěním příslušného léčiva ve fosfátovém pufru s azidem sodným na roztok o koncentraci 20 mg/100 ml. Z tohoto zásobního roztoku byly pufrem naředěny vzorky o koncentracích 10; 6; 4; 2; 1; 0,5; 0,1; 0,05 mg/100 ml. Vzorky byly mezi měřeními uchovány v lednici.

3.5.3. Parametry kalibrační křivky

Kalibrační vzorky byly nastříknuty na kolonu a odezva byla odečtena jako plocha pod píkem. Ze získaných dat byly sestrojeny kalibrační křivky, jejichž parametry byly stanoveny metodou lineární regrese.

Kalibrace TH: y = 282240 x r = 0,99999 r^2 = 0,99998

Kalibrace IND: y = 787155,5 x r = 0,99990 r^2 = 0,99980

Hodnota **y** představuje plochu pod píkem, která odpovídá odezvě detektoru, **x** odpovídá koncentraci analyzované látky, **r** je korelační koeficient, $\mathbf{r^2}$ koeficient determinace.

3.6. Analýza dat

Kumulativní množství TH a IND, které prošlo kůží do akceptorové fáze, bylo přepočítáno vzhledem k odběrům a doplňování akceptorové fáze a přesnému objemu cel. Hodnoty byly vyneseny do grafů v závislosti na čase. Oblast ustáleného toku permeantu (lineární oblast křivky) byla použita pro výpočet příslušných hodnot fluxů J (μg/cm^2/h).

Ke statistickému hodnocení byl použit test ANOVA s Dunnettovým post testem. Výsledné hodnoty jsou prezentovány jako průměry ± SEM (standardní chyba).

V rámci experimentální části této práce bylo provedeno celkem **227 permeací,** jejichž výsledky jsou uvedeny v kapitole **4. Výsledky a diskuze**.

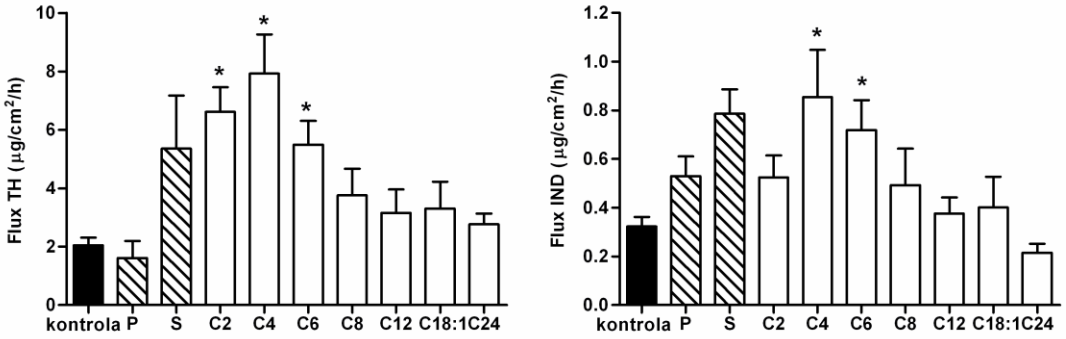
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této rigorózní práce bylo studium vlivu délky acylu ceramidů na propustnost kožní bariéry. Pro stanovení schopnosti krátkých ceramidů ovlivnit flux léčiva a jejich koncentraci v kůži jsme zvolili in vitro pokusy ve Franzově difúzní cele. Jako modelovou membránu jsme použili prasečí kůži, která je, co se týče permeability, lidské kůži velmi podobná, je snadno získatelná a na rozdíl od lidské kůže nepodléhá etickým požadavkům. Jako akceptorovou fázi jsme zvolili izotonický fosfátový pufr o pH 7,4, který svými vlastnostmi vhodně napodobuje plazmu a všechny studované látky se v něm dobře rozpouští, což je důležité pro správný průběh pokusu v in vitro podmínkách. Permeační pokusy byly prováděny s modelovými léčivy s rozdílnými fyzikálně chemickými vlastnostmi, theofylinem a indometacinem. Permeabilita theofylinu je lepším ukazatelem kožní bariérové funkce, s vyšší citlivostí, než měření transepidermální ztráty vody.

Donorové vzorky obsahovaly buď sfingosin, fytosfingosin, ceramid 2 NS (24 uhlíků) nebo krátké ceramidy. Použité krátké analogy ceramidů měly délku sfingosinu 18 uhlíků a acylový zbytek měl délku 2 až 18 uhlíků. V této práci jsou označeny jako ceramid C2, C4, C6, C8, C12, C18:1. Ceramid C18:1 obsahoval *cis*-dvojnou vazbu v poloze 9. Ze SC použitých kůží nebylo možno experimentálně odstranit fyziologické (dlouhé) ceramidy, pouze k nim byly přidány námi testované krátké analogy ceramidů.

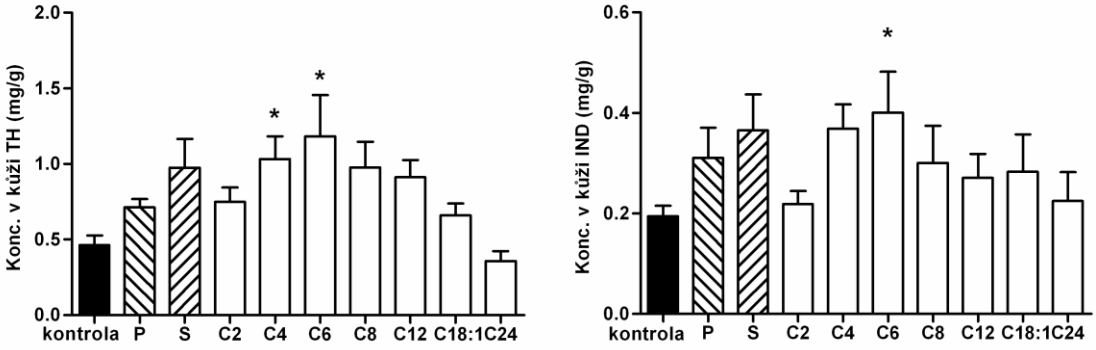
Naměřené hodnoty byly porovnány s negativním kontrolním vzorkem (léčivo bez ceramidu) a s pozitivní kontrolou (léčivo s fyziologickým ceramidem 2 (NS)). Podrobná data permeačních parametrů jsou uvedena v kapitole **7. PŘÍLOHA –** tabulka 1. a 2.

Z námi získaných hodnot je zřejmé, že krátké ceramidy s 2-8 uhlíkatým acylem ztrácí svou bariérovou funkci a zvyšují prostupnost kůže pro modelová léčiva TH a IND, nejvyšší efekt je u analogu C4. U ceramidů C12, C18:1, C24 a fytosfingosinu nedošlo ke zvýšení pemeability. Zajímavé je, že i samotný sfingosin zvyšoval permeabilitu kůže, ne však statisticky významně. Největší zvýšení permeability kůže bylo pozorováno u ceramidového analogu C4 (flux TH = 7,92 ± 1,34 a flux IND = 0,86 ± 0,19 $\mu g/cm^2/h$). Ceramid C4 zvýšil tedy flux TH 3,8krát a flux IND 2,7krát (viz graf 1.).



Graf 1. Flux TH (vlevo) a flux IND (vpravo) z 60% propylenglykolu (kontrola) a po přidání 1% sfingosinu (S), fytosfingosinu (P), ceramidu 2 NS (C24) a ceramidových analogů (C2-C18:1, číslo udává počet uhlíků v acylu). Data jsou prezentována jako průměry a SEM (standardní chyba). Počet opakování *n* = 4-16, počet donorů (zvířat) *N* = 2-8. * udává statisticky významně odlišnou hodnotu od kontroly ($p < 0,05$).

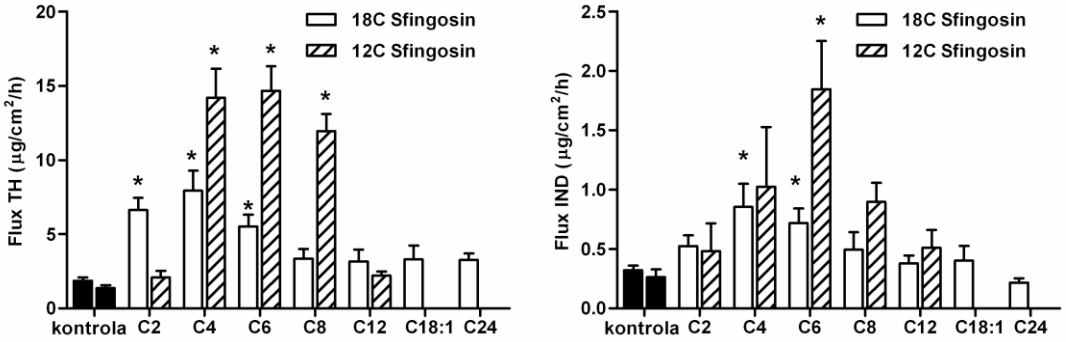
Pro koncentraci modelových léčiv v kůži byly zjištěny podobné vztahy jako u hodnot fluxů, nejvyšší koncentrace v kůži nebyla však zjištěna u ceramidového analogu C4, ale u C6. Koncentrace léčiva v kůži pro ceramid C6 (TH = 1,18 ± 0,27 mg/g a IND = 0,4 ± 0,08 mg/g). Ceramid C6 zvýšil tedy koncentraci TH v kůži 2,6krát a koncentraci IND 2,1krát (viz graf 2.).



Graf 2. Koncentrace TH (vlevo) a IND (vpravo) v kůži z 60% propylenglykolu (kontrola) a po přidání 1% sfingosinu (S), fytosfingosinu (P), ceramidu 2 NS (C24) a ceramidových analogů (C2-C18:1, číslo udává počet uhlíků v acylu). Data jsou prezentována jako průměry a SEM. Počet opakování *n* = 8-22, počet donorů (zvířat) *N* = 4-11. * udává statisticky významně odlišnou hodnotu od kontroly ($p < 0,05$).

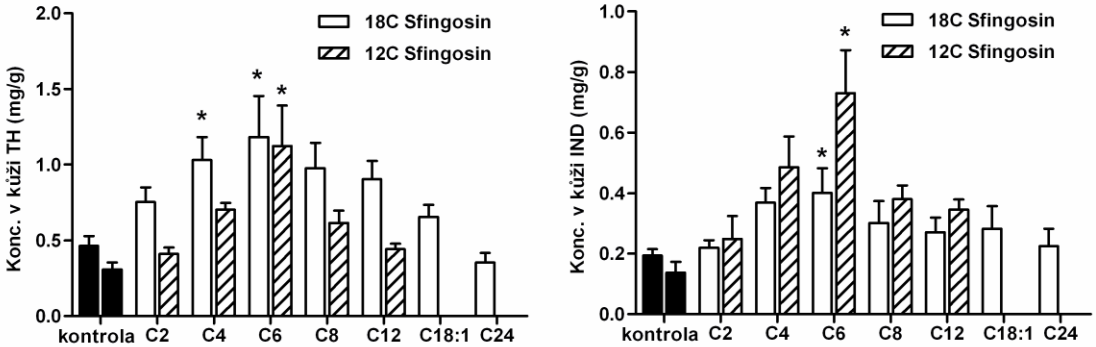
Z porovnání účinku ceramidových analogů obsahujících 18C sfingosin s ceramidy, které obsahují 12C sfingosin, na flux TH a IND je zřejmé, že zkrácení sfingosinu významně zvýšilo schopnost ceramidů zvyšovat permeabilitu kůže (větší mezery mezi ceramidy v lamelách). Maximální zvýšení permeability bylo zjištěno u C6 ceramidového

analogu (12C sfingosin) místo C4 (18C sfingosin). Ceramid C6 s 12C sfingosinem zvýšil flux TH 10,8krát a flux IND 7,0krát. Je zde však patrná podobná závislost mezi účinkem a délkou acylu (viz graf 3.).



Graf 3. Srovnání účinku ceramidových analogů obsahujících 18C sfingosin (přirozený sfingosin, tato práce) a 12C sfingosin (data z předchozí práce[45]) na flux TH (vlevo) a IND (vpravo). Data jsou prezentována jako průměry a SEM. Počet opakování *n* = 4-26, počet donorů (zvířat) *N* = 2-11.
* udává statisticky významně odlišnou hodnotu od kontroly ($p < 0,05$).

Při porovnání účinku ceramidových analogů obsahujících 18C a 12C sfingosin na koncentraci TH a IND v kůži byly pozorovány velmi podobné výsledky a stejná závislost mezi účinkem a délkou acylu. Nejvyšší koncentrace TH v kůži bylo dosaženo při aplikaci ceramidu C6 s 18C sfingosinem, ale u IND byla nejvyšší koncentrace v kůži změřena u ceramidu C6 s 12C sfingosinem (viz graf 4.).

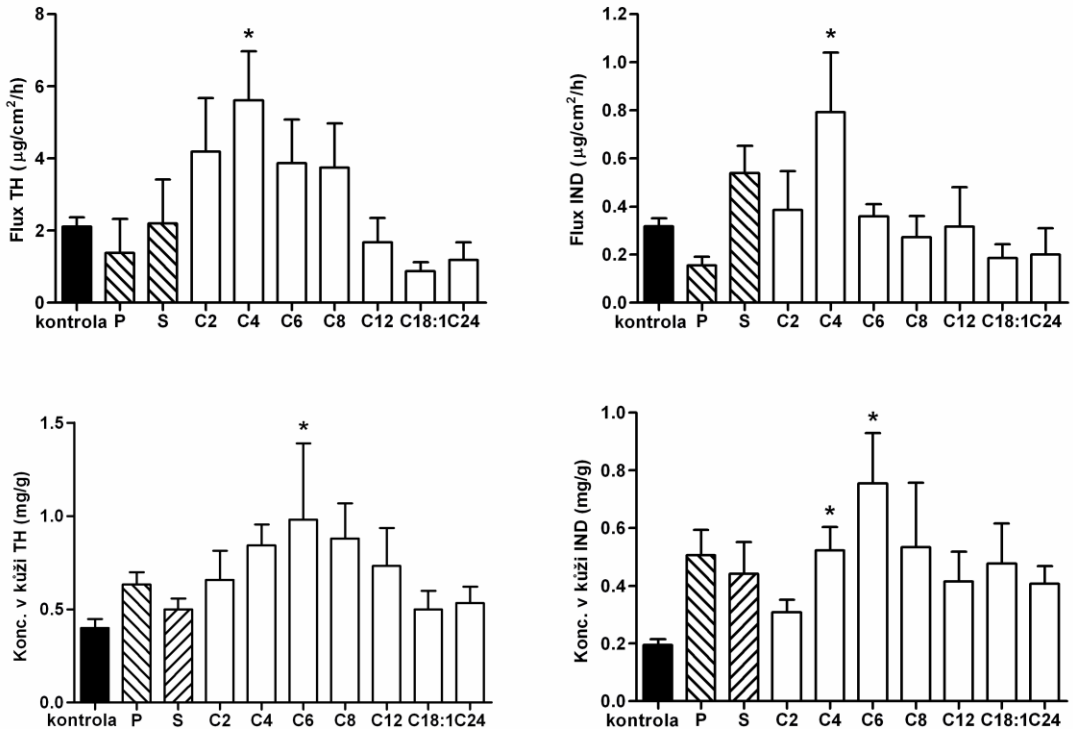


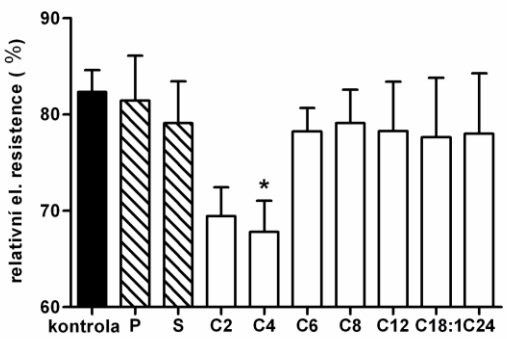
Graf 4. Srovnání účinku ceramidových analogů obsahujících 18C sfingosin (přirozený sfingosin, tato práce) a 12C sfingosin (data z předchozí práce[45]) na koncentraci TH (vlevo) a IND (vpravo) v kůži. Data jsou prezentována jako průměry a SEM. Počet opakování *n* = 4-26, počet donorů (zvířat) *N* = 2-11. * udává statisticky významně odlišnou hodnotu od kontroly ($p < 0,05$).

Při současné aplikaci studovaných ceramidů s modelovými léčivy na kůži ve Franzových difúzních celách by mohlo dojít k zvýšení fluxu i díky interakci ceramidu s modelovým léčivem. Podobné výsledky při pretreatment aplikaci však toto vyvrátily. Pretreatment aplikace ceramidových analogů potvrdila předchozí výsledky a bylo dokázáno, že nejde o interakci zkoumaných látek s modelovými léčivy ve vzorku, ale skutečně o vliv krátkých ceramidů na kožní bariéru. Toto bylo dokázáno třemi metodami (hodnoty fluxu TH a IND, stanovení koncentrace léčiva v kůži a změření relativní rezistence).

Největší zvýšení permeability kůže u pretreatment aplikace bylo pozorováno u ceramidového analogu C4 (flux TH = 5,61 ± 1,36 a flux IND = 0,79 ± 0,25 μg/cm^2/h). Ceramid C4 zvýšil tedy flux TH 2,7krát a flux IND 2,5krát. Nejvyšší koncentrace léčiva v kůži byla zaznamenaná u ceramidu C6 (TH = 0,98 ± 0,41 mg/g a IND = 0,75 ± 0,18 mg/g). Ceramid C6 zvýšil tedy koncentraci TH v kůži 2,45krát a koncentraci IND 3,9krát. Relativní elektrickou rezistenci významně snížil, a tím i rezistenci kůže, ceramid C4 (kontrolní vzorek el. rez. 82,3 ± 2,3 %, ceramid C4 67,8 ± 3,2 %).

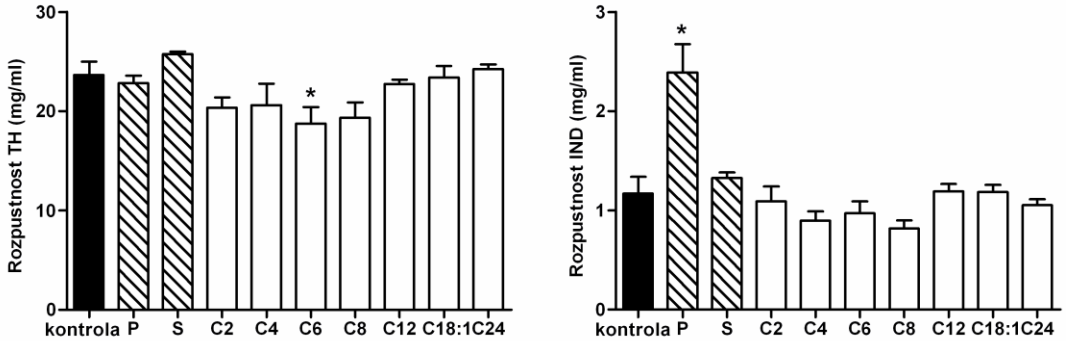
Ceramidy byly na kůži aplikovány jen na dvě hodiny a před aplikací léčiva byly z kůže odstraněny, proto jsou i dosažené hodnoty o trochu nižší (viz graf 5.).





Graf 5. Permeační charakteristiky v „pretreatment“ aplikaci analogů ceramidů: flux TH a IND, koncentrace TH a IND v kůži a relativní elektrická resistence po 2 hod. aplikaci 60% propylenglykolu (kontrola) nebo 1% sfingosinu (S), fytosfingosinu (P), ceramidu 2 NS (C24) a ceramidových analogů (C2-C18:1, číslo udává počet uhlíků v acylu) v 60% propylenglykolu. Data jsou prezentována jako průměry a SEM. Počet opakování *n* = 4-10, počet donorů (zvířat) *N* = 2-5. * udává statisticky významně odlišnou hodnotu od kontroly ($p < 0,05$).

Přítomnost ceramidů neovlivňuje rozpustnost TH a IND v donorovém vzorku, kromě C6 ceramidu, kde je malý, sice statisticky významný pokles rozpustnosti, ale je tak malý, že nemůže být zodpovědný za pozorovaný účinek tohoto ceramidového analogu (navíc prokázáno, že funguje i v pretreatment aplikaci). Rozpustnost TH v donorovém vzorku byla 23,7 ± 1,3 mg/ml a rozpustnost IND 1,17 ± 0,17 mg/ml. K významné interakci došlo mezi fytosfingosinem a IND (může zodpovídat za část pozorovaného vlivu na permeaci). Pravděpodobně jde o tvorbu iontového páru mezi kyselým IND a bazickým fytosfingosinem, je ale zajímavé, že k tomu nedošlo u sfingosinu, jehož bazicita je podobná jako u fytosfingosinu (viz graf 6.).



Graf 6. Rozpustnost TH (vlevo) a IND (vpravo) v donorovém vzorku (60% propylenglykol = kontrola) a po přidání 1% sfingosinu (S), fytosfingosinu (P), ceramidu 2 NS (C24) a ceramidových analogů (C2-C18:1, číslo udává počet uhlíků v acylu). Data jsou prezentována jako průměry a SEM. Počet opakování *n* = 8-12. * udává stat. významně odlišnou hodnotu od kontroly ($p < 0,05$).

Řada studií naznačuje, že vodíkové vazby hrají důležitou roli v soudržnosti lipidových membrán[46,47]. Krátké ceramidy, studované v této práci, však porušily kožní bariéru i přesto, že měly stejnou schopnost vytvářet vodíkové vazby jako ceramid 2 (NS). To je v souladu s nedávnými studiemi, které ukázaly, že ceramidy založené na sfingosinu, bez ohledu na délku řetězce, vytvářejí síť vodíkových vazeb se dvěma molekulami vody a ne se sousedními molekulami ceramidů a hnací silou pro soudržnost sfingosinových ceramidů jsou hydrofobní interakce jejich řetězců[48]. Vzhledem k tomu, že hydrofobní interakce jsou způsobeny přitažlivostí indukovaných dipólů v hydrofobním řetězci, jsou silně závislé na délce tohoto řetězce. A tak, čím kratší je řetězec, tím slabší se předpokládá být interakce, což vede k zvýšené permeabilitě lipidové membrány. Délka řetězce je tedy pro bariérovou funkci ceramidu asi důležitější než tvorba vodíkových vazeb.

Další možné vysvětlení je, že vložení kratšího řetězce do lamely s dlouhým řetězcem by jednoduše vedlo k zvětšení prostoru uvnitř membrány, což by s největší pravděpodobností bylo kompenzováno zvýšenou mobilitou okolních řetězců (vzrůst fluidity lamel). Podobný mechanizmus účinku byl navržen pro amfifilní akceleranty kožní permeace.

Třetí možností je, že tyto krátké ceramidy by mohly vytvářet oddělené fáze v rámci lipidových lamel s dlouhými řetězci, což by vedlo k permeabilnější „zkratce“ skrz membránu[7].

Výše zmíněné hypotézy mohou být pouze částečným vysvětlením zaznamenaných vztahů mezi délkou řetězce a permeabilitou kůže. Permeabilita kůže se zvyšovala s klesající délkou acylového řetězce s maximem u ceramidu C6 (12C sfingosin) a ceramidu C4 (18C sfingosin). Další zkracování acylu ceramidu nevedlo k většímu zvýšení permeability, naopak ceramid C2 (12C sfingosin) ovlivnil permeabilitu jen minimálně a ceramid C2 (18C sfingosin) ji sice zvýšil, ale méně, než ceramid C4. Důvody pro zjištěné rozdíly mezi ceramidy C4 a C2 nejsou doposud zcela prozkoumány a prezentovány.

Je proto zapotřebí dalších studií zabývajících se molekulárními aspekty, které by více objasnily roli délky acylového a sfingosinového řetězce ceramidů.

5. ZÁVĚR

V této práci jsme se snažili objasnit, jaký vliv má délka acylu ceramidu na permeabilitu kůže. Experimentální část zahrnovala permeační pokusy na prasečí kůži ve Franzových difúzních celách. Pomocí dvou modelových léčiv a elektrické rezistence jsme zjišťovali, jak testované ceramidy sníží bariérovou funkci kůže a tím zvýší flux pro daná léčiva. Použili jsme krátké analogy, sfingosin, fytosfingosin a ceramid 2 (NS). Výsledky této rigorózní práce potvrdily názor dřívějších studií, že délka řetězce ceramidu je velice důležitá pro permeabilitu kůže. Tyto vztahy mezi délkou acylového řetězce ceramidů a jejich schopností ovlivnit kožní bariéru ukázaly překvapivou podobnost s chováním krátkých ceramidů v buněčných membránách a potvrdily, že tyto ceramidy nepůsobí jako fyziologické ceramidy a při jejich aplikaci se proto musí postupovat velice opatrně.

6. LITERATURA

[1] Vávrová, K., Hrabálek, A. Role ceramidů v kůži. Prakt. lékárenství. 2006; 2: 55-58.

[2] http:/ /liposukce.cz/editor/image/stranky3-galerie/obrazek-58.jpg, 16. 9. 2008.

[3] Menon, G.K. New insights into skin strukture:scratching the surface. Adv Drug Deliv Rev. 2002; 54 (Suppl 1): S3-17.

[4] Hrabálek, A., Vávrová, K. Lze překonat kožní bariéru? Prakt. Lékárenství. 2005; 1: 8-11.

[5] Wertz, P.W., van den Bergh, B. The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. Chem Phys Lipids. 1998; 91: 85-96.

[6] Madison, K.C. Barrier function of the skin: „Ia raison d'etre“ of the epidermis. J Invest Dermatol. 2003; 121: 231-241.

[7] Vávrová, K., Zbytovská, J., Hrabálek, A. Amphiphilic transdermal permeation enhancers: structure-activity relationships. Curr Med Chem. 2005; 12: 2273-2291.

[8] Bouwstra, J.A., Honeywell-Nguyen, P.L., Gooris, G.S., Ponec, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. Prog Lipid Res. 2005; 42: 1-36.

[9] Robson, K.J., Steward, M.E., Michelsen, S. 6-hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. J Lipid Res. 1994; 35: 2060-8.

[10] Wertz, P.W., Downing, D.T. Ceramides of pig epidermis: structure determination. J Lipid Res. 1983; 24: 759-65.

[11] Stewart, M.E., Downing, D.T. A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin. J Lipid Res. 1999; 40: 1434-9.

[12] Motta, S., Monti, M., Sesana, S. Ceramide composition of the psoriatic scale. Biochim Biophys Acta. 1993; 1182: 147-51.

[13] Schaefer, H., Redelmeier, T.E. Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Basel: Karger, 1996

[14] Suhonen, T.M., Bouwstra, J.A., Urti, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation stratum corneum structural alterations. J Control Release.1999; 59: 149-161.

[15] Wertz, P.W. The nature of the epidermal barrier: biochemical aspects. Adv Drug Deliv Rev. 1996; 8: 283-294.

[16] Flynn, G.L. In Percutaneous Absorption: Mechanisms - Methodology - Drug Delivery; Bronaugh, R.L., Maibach, H.I., Eds., Marcel Dekker: New York, 1989; 27-51.

[17] Kou, J.H., Roy, S.D., Du, J., Fujiki, J. Effect of receiver fluid pH on in vitro skin flux of weekly ionizable drugs. Pharm Res. 1993; 10: 986.

[18] Barry, B.W. Novel mechanisms and devices to enable succesful transdermal drug delivery. Eur J Pharm Sci. 2001; 14: 101-114.

[19] Hueber, F., Schaefer, H., Wepierre, J. Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of steroids: in vitro studies on human skin. Skin Pharmacol. 1994; 7 (5): 237.

[20] Barry, B.W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. Adv Drug Deliv Rev. 54, 2002; Suppl. 1, S31.

[21] Albery, W.J., Hadgraft, J. Percutaneous absorption: in vivo experiments. J Pharm Pharmacol. 1979; 31 (3): 140.

[22] Potts, R.O., Guy, R.H. Barrier function of human keratinocyte cultures grown at the air-liquid interface. J Invest Dermatol. 1991; 96 (3): 323.

[23] Potts, R.O., Guy, R.H. Predicting skin permeability. Pharm Res. 1992; 9 (5): 663.

[24] Guy, R.H., Hadgraft, J. Physiochemical aspects of percutaneous penetration and its enhancement. Pharm Res. 1988; 5 (12): 753.

[25] Potts, R.O., Guy, R.H. Apredictive algorithm for skin permeability: the effects of molecular size and hydrogen bond activity. Pharm Res. 1995; 12 (11): 1628.

[26] Degim, I.T., Pugh, W.J., Hadgraft, J. Skin permeability data: anomalous results. Int J Pharm. 1998; 170: 129-133.

[27] Barry, B.W. Reflections on transdermal drug delivery. Pharm Sci Technolo Today. 1999; 2 (2): 41-43.

[28] Moser, K., Kriwet, K., Naik, A., Kalia, Y.N., Guy, R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. Eur J Pharm Biopharm. 2001; 52: 103-112.

[29] Vávrová, K., Lorencová, K., Klimentová, J., Novotný, J., Holý, A., Hrabálek, A. Transdermal and dermal delivery of adefovir: effects of pH and permeation enhancers. Eur J Pharm Biopharm. 2008; 69 (2): 597-604.

[30] Hadgraft, J. Modulation of the barrier function of the skin. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 2001; 14 Suppl 1: 72-81.

[31] Hadgraft, J., Somers, G.F. Percutaneous absorption. J Pharm Pharmacol. 1956; 8: 625-634.

[32] Hadgraft, J., Valenta, C. pH, pK(a) and dermal delivery. Int J Pharm. 2000; 2: 243-247.

[33] Coderch, L., López, O., de la Maza, A., Parra, J.L. Ceramides and Skin Function. Am J Clin Dermatol. 2003; 4: 107-129.

[34] Chamlin, S.L., Frieden, I.J., Fowler, A. Ceramide-dominant, barrier-repair lipids improve childhood atopic dermatitis. Arch Dermatol. 2001; 137: 1110-2.

[35] Thestrup-Pedersen, K. How common are skin barrier problems? Yamanouchi Satellite Symposium 4th EADV Congress. Clinical Management of Skin Barrier Problems 1995 Oct 10-15; Brussels, 5-8.

[36] Rogers, J., Harding, C., Mayo, A. Stratum corneum lipids: the effectof ageing and the seasons. Arch Dermatol Res. 1996; 228: 765-70.

[37] Denda, M., Koyama, J., Hori, J. Age- and sex-dependent change in stratum corneum sphingolipids. Arch Dermatol Res. 1993; 285: 415-7.

[38] Wefers, H., Melnik, B.C., Flühr, M. Influence of UV irradiation on the composition of human SC lipids. J Invest Deramtol. 1991; 96: 959-62.

[39] Choi, M.J., Maibach, H.I. Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin. Am J Clin Dermatol. 2005; 6: 215-223.

[40] Vokurka, M., Hugo, J. Praktický slovník medicíny. 4. vyd. Praha: Maxdorf, 1995; 357 s. ISBN 80-85800-28-4.

[41] Fartash, M. Epidermal barrier in disorders of the skin. Microsc Res Tech. 1997; 38: 361-72.

[42] Tupker, R.A., Pinogoda, J., Coenraads, P.J. Susceptibility to irritants: role of barrier function, skin dryness and history of atopic dermatitis. Br J Dermatol. 1990; 123: 199-205.

[43] AISLP, Micro-verze,2007.1 pro Windows.

[44] Hrabálková, E. Hodnocení účinnosti akcelerantů transdermální permeace. SOČ, Biskupské gymnázium Bohuslava Balbína, Hradec Králové, 2008.

[45] Novotný, J., Janůšová, B., Novotný, M., Hrabálek, A., Vávrová, K. Short-Chain Ceramides Decrease Skin Barrier Properties. Skin Pharmacol. Physiol. 2009; 22: 22-30.

[46] Karlsson, K-A. On the character and functions of sphingolipids. Acta Biochim Polonica. 1998; 45: 429-438.

[47] Pascher, I. Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide end their implication on membrane stability and permeability. Biochim Biophys Acta. 1976; 455: 433-451.

[48] Li, L., Tang, X., Taylor, K.G., DuPre, D.B., Yappert, M.C. Conformational characterization of ceramides by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biophys J. 2002; 82: 2067-2080.

7. PŘÍLOHA

Tab. 1. Permeační parametry získané při současné aplikaci zkoumaných sfingolipidů s modelovými léčivy.

	flux TH $\mu g/cm^2/h$	flux IND $\mu g/cm^2/h$	konc. v kůži TH (mg/g)	konc. v kůži IND (mg/g)	rozp TH (mg/ml)	rozp IND (mg/ml)
kontrola	2,06 ± 0,25	0,32 ± 0,04	0,46 ± 0,06	0,19 ± 0,02	23,7 ± 1,3	1,17 ± 0,17
C2	6,61 ± 0,84*	0,52 ± 0,09	0,75 ± 0,10	0,22 ± 0,03	20,3 ± 1,0	1,09 ± 0,15
C4	7,92 ± 1,34*	0,86 ± 0,19*	1,03 ± 0,15*	0,37 ± 0,05	20,6 ± 2,1	0,89 ± 0,10
C6	5,49 ± 0,81*	0,72 ± 0,12*	1,18 ± 0,27*	0,40 ± 0,08*	18,8 ± 1,7*	0,97 ± 0,12
C8	3,76 ± 0,91	0,49 ± 0,15	0,98 ± 0,17	0,30 ± 0,07	19,4 ± 1,5	0,82 ± 0,08
C12	3,16 ± 0,81	0,38 ± 0,07	0,91 ± 0,12	0,27 ± 0,05	22,8 ± 0,4	1,19 ± 0,07
C18:1	3,30 ± 0,92	0,40 ± 0,13	0,66 ± 0,08	0,28 ± 0,07	23,4 ± 1,2	1,18 ± 0,07
C24	2,76 ± 0,37	0,22 ± 0,04	0,36 ± 0,06	0,23 ± 0,06	24,3 ± 0,5	1,05 ± 0,06
P	1,62 ± 0,57	0,53 ± 0,08	0,71 ± 0,05	0,31 ± 0,06	22,8 ± 0,8	2,39 ± 0,28*
S	5,35 ± 1,82	0,79 ± 0,10	0,98 ± 0,19	0,37 ± 0,07	25,8 ± 0,3	1,33 ± 0,06

data jsou prezentována jako průměry a SEM (standardní chyba)
počet opakování viz obrázky
* udává statisticky významně odlišnou hodnotu od kontroly ($p < 0,05$)

Tab. 2. Permeační parametry získané při 2h „pretreatment“ aplikaci zkoumaných sfingolipidů.

	flux TH $\mu g/cm^2/h$	flux IND $\mu g/cm^2/h$	konc. v kůži TH (mg/g)	konc. v kůži IND (mg/g)	el. resistence (%)
kontrola	2,10 ± 0,26	0,32 ± 0,03	0,40 ± 0,05	0,19 ± 0,02	82,3 ± 2,3
C2	4,18 ± 1,49	0,39 ± 0,16	0,66 ± 0,16	0,31 ± 0,04	69,4 ± 3,0
C4	5,61 ± 1,36*	0,79 ± 0,25*	0,84 ± 0,11	0,52 ± 0,08*	67,8 ± 3,2*
C6	3,87 ± 1,21	0,36 ± 0,05	0,98 ± 0,41*	0,75 ± 0,18*	78,2 ± 2,4
C8	3,75 ± 1,23	0,27 ± 0,09	0,88 ± 0,19	0,53 ± 0,22	79,1 ± 3,4
C12	1,68 ± 0,68	0,32 ± 0,17	0,73 ± 0,20	0,42 ± 0,10	78,3 ± 5,1
C18:1	0,88 ± 0,25	0,19 ± 0,06	0,50 ± 0,10	0,48 ± 0,14	77,6 ± 6,2
C24	1,18 ± 0,50	0,20 ± 0,11	0,53 ± 0,09	0,41 ± 0,06	78,0 ± 6,2
P	1,38 ± 0,95	0,16 ± 0,04	0,63 ± 0,07	0,51 ± 0,09	81,4 ± 4,7
S	2,20 ± 1,21	0,54 ± 0,11	0,50 ± 0,06	0,44 ± 0,11	79,1 ± 4,3

data jsou prezentována jako průměry a SEM (standardní chyba)
počet opakování viz obrázky
* udává statisticky významně odlišnou hodnotu od kontroly ($p < 0,05$)