

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

Termální analýza interakcí epidermálních lipidů V

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel : RNDr. Marie Musilová, CSc.

Hradec Králové 2009

Petra Kaloušová

Děkuji RNDr. Marii Musilové CSc., za odborné vedení, trpělivost a čas, který mi věnovala při vypracování mé diplomové práce. Dále děkuji paní Lence Svobodové za pomoc s experimentální částí.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsme při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

.....

Kaloušová Petra

Termální analýza interakcí epidermálních lipidů V

Petra Kaloušová, diplomová práce, červen 2009

Abstrakt

Přirozenou funkcí kůže je chránit tělo před nepříznivými vlivy okolního prostředí. Během 50. a 70. let bylo zjištěno, že kožní bariéra je situována ve stratum corneum a určují ji lipidy v mezibuněčných prostorech této vrstvy. Transdermální aplikace léčiv má ve srovnání s perorálním podáním řadu výhod, na druhou stranu však právě stratum corneum představuje pro průnik léčiv určitou bariéru. Zaměřili jsme se proto na tuto lipidickou vrstvu a její interakce s vodou. Použili jsme in vitro vytvořené vzorky, které se skládaly z cholesterolu, pseudoceramidu a modulátorů transdermálního průniku. Snažili jsme se vzorky hydratovat a sledovali jejich charakteristiky a interakce pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie. Současně jsme se zabývali i hodnocením jednotlivých surovin a vhodnými experimentálními podmínkami pro tento druh měření.

Thermal analysis of interaction of epidermal lipids V

Petra Kaloušová, degree work , June 2009

Abstract

Natural function of human skin is to protect the body from adverse influences of the surrounding. In 1950's and 70's it was discovered, that the skin barrier is situated in stratum corneum and is determined by lipids in intercellular space of that layer. Transdermal application of medicaments has many advantages compared to peroral one. On the other hand stratum corneum is a certain barrier for penetration of the medicaments. Thus we have focused on this lipid layer and its interaction with water. We have used samples prepared in vitro consisting of cholesterol, pseudoceramid and modulators of transdermal penetration. We have tried to hydrate the samples and tracked their characteristics and interactions by differential scanning calorimetry. At the same time we have evaluated the individual groups of drugs and proper experimental conditions for that particular measurement.

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1. STAVBA A FUNKCE KŮŽE.....	9
2.1.1. TVORBA KOŽNÍ BARIÉRY.....	10
2.2. CHOLESTEROL.....	11
2.2.1. CHOLESTEROL A JEHO FUNKCE.....	11
2.2.2. STRUKTURA CHOLESTEROLU.....	11
2.2.3. USPOŘÁDÁNÍ CHOLESTEROLU V MEMBRÁNÁCH.....	13
2.2.4. FÁZOVÉ CHOVÁNÍ CHOLESTEROLU.....	14
2.3. CERAMIDY.....	16
3. PRACOVNÍ ÚKOL.....	18
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	20
4.1. POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	21
4.2. SEZNAM POUŽITÝCH SUROVIN.....	22
4.3. PRACOVNÍ POSTUP.....	23
4.4. VÝSLEDKY EXPERIMENTU.....	24
4.4.1. ÚKOL č. 1 (<i>charakteristika cholesterolu</i>).....	24
4.4.2. ÚKOL č. 2 (<i>charakteristika vody</i>).....	35
4.4.3. ÚKOL č. 3 (<i>binární směsi cholesterolu a vody</i>).....	43
4.4.4. ÚKOL č. 4 (<i>hodnocení pseudoceramidů a modulátorů transdermálního průniku</i>).....	52
5. DISKUZE.....	54
6. ZÁVĚR.....	60
7. LITERATURA.....	62

1. Úvod

Tato práce je součástí rozsáhlejšího souboru prací týkajících se transdermální aplikace léčiv. Transdermální aplikace léčiv má ve srovnání s perorální aplikací řadu výhod. Obchází gastrointestinální trakt, takže nedochází k first pass efektu. Toto může umožnit snížení potřebných dávek léčiva a tím i snížení některých nežádoucích účinků. Stablnější jsou i plazmatické hladiny. Na druhou stranu však kůže představuje pro průnik léčiv určitou bariéru, kterou tvoří především vnější vrstva kůže – stratum corneum. V této vrstvě se v mezibuněčných prostorech nacházejí lipidy, které brání průniku léčiv. Výzkum se proto zaměřuje na tuto lipidickou vrstvu.

Předložená práce se týká interakcí epidermálních lipidů. K hodnocení je použita metoda diferenční skenovací kalorimetrie. Práce řeší dílčí úkol zaměřený na interakci vybraných kožních lipidů s vodou. Uvedeny jsou výsledky týkající se cholesterolu, pseudoceramidu a dvou modulátorů transdermálního průniku syntetizovaných na katedře Anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. V práci jsou uvedeny i vhodné experimentální podmínky pro tento druh měření.

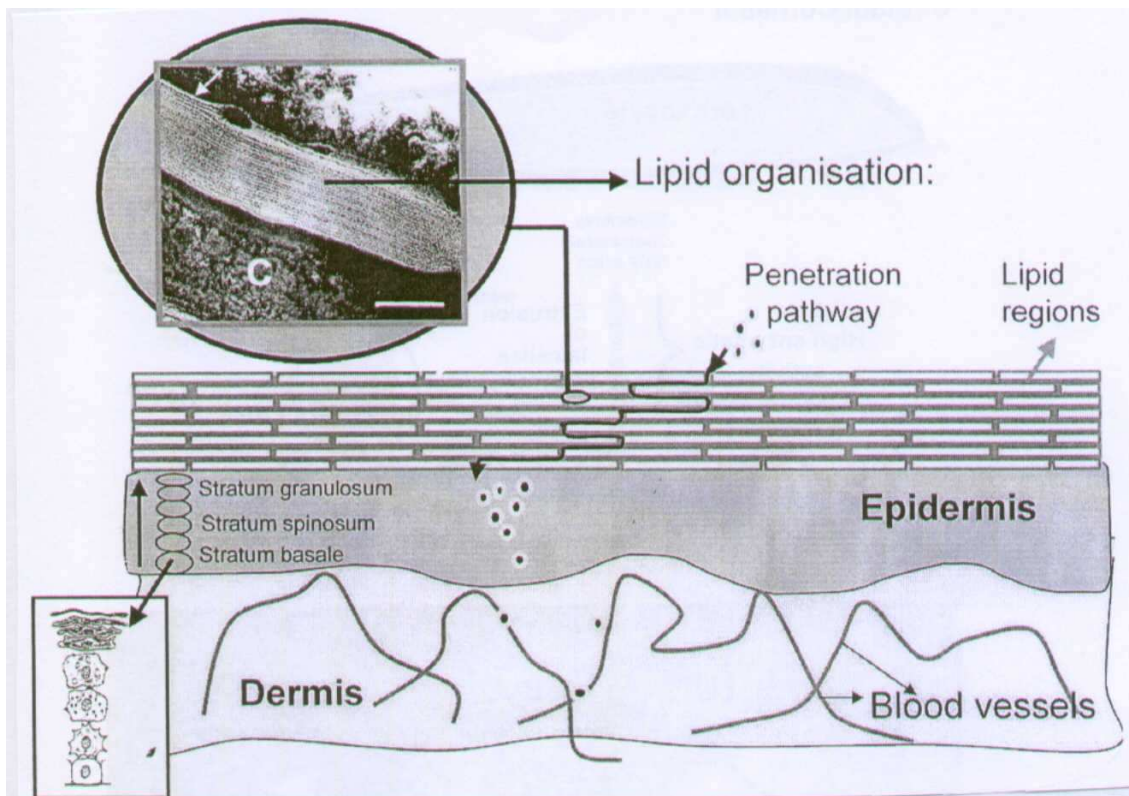
2. Teoretická část

2.1. Stavba a funkce kůže

Kůže je orgán tvořící ochrannou bariéru těla. Ohraničuje tělo od vnějšího prostředí a chrání organismus před mechanickým, fyzikálním a chemickým poškozením. Ochrannou funkci umožňuje struktura tvořená ze dvou hlavních vrstev – dermis a epidermis. Dermis je spodní část, tvořena fibroblasty a extracelulární matrix a je bohatě zásobena kapilárami a nervovými zakončeními. Epidermis je povrchová vrstva a skládá se ze čtyř vrstev – stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum a stratum corneum.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. V tomto směru ubývá kyslík a živiny, dochází ke změnám buněčných struktur, zplošťování buněk a akumulaci keratinu 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 stratum corneum.²

Obr. 1 – Stavba kůže³



Stratum corneum (rohová vrstva, SC) je nejsvrchnější vrstva kůže, zodpovědná za její ochrannou funkci. Je tvořena několika vrstvami zploštělých keratinocytů a intercelulární lipidovou matrix. Ta představuje přibližně 20% objemu SC. Tato lipidická fáze je téměř rovnoměrně přítomna v celém SC, prostupující látky musí tedy touto fází projít. Hlavními složkami lipidové matrix jsou ceramidy (50%), cholesterol (25%) a volné mastné kyseliny (10%).^{3,4}

Za normálních okolností je rohová vrstva kůže vždy částečně hydratována, obsahuje průměrně 20% vody.³ Ta vytváří prostředí pro vznik přirozeně zvlhčujících faktorů, což jsou ve vodě rozpustné látky, mezi které patří aminokyseliny a jejich deriváty, organické kyseliny nebo močovina. Většina vody je uložena v korneocytech. Klesne-li obsah vody v rohové vrstvě pod 20%, stává se tato vrstva křehkou, snadno lomivou a umožňuje přístup dráždivých látek jako jsou mýdlo, saponáty aj. Hydratace je tedy jeden z důležitých faktorů ovlivňující integritu kožní bariéry.^{5,6}

2.1.1. Tvorba kožní bariéry

V konečných fázích keratinizace jsou degradovány buněčné organely a keratinová vlákna se spojují do svazků, které zcela vyplní vnitřek korneocytu. Na vnitřní stranu buněčné membrány se ukládá silná proteinová vrstva, na niž se pak z vnější strany kovalentně váže monovrstva ceramidů, která slouží jako templát pro orientaci dalších vrstev lipidů.²

V procesu tvorby lipidových lamel mají zásadní význam lamelární granula, vyplněná stohy lipidických disků, která se poprvé objevují ve stratum spinosum. V pozdní fázi diferenciaci keratinocytu (na rozhraní stratum granulosum a SC) tělíčka migrují k vnější části buňky, kde se jejich membrána spojí s plazmatickou membránou a lipidy jsou uvolněny do mezibuněčného prostoru. Zde dochází k metabolizaci prekurzorů lipidů pomocí současně uvolněných enzymů, jednotlivé disky fúzí a vytvoří soubor lipidových lamel, zcela vyplňující mezibuněčné prostory – lipidovou matrix.^{2,5}

2.2. CHOLESTEROL

2.2.1. Cholesterol a jeho funkce

Cholesterol je třeba k výstavbě všech buněčných membrán, určuje jejich vlastnosti, viskozitu a udržuje viskozitu stabilní při změnách tělesné teploty. Nejdůležitějšími účinky cholesterolu na membrány, z pohledu mechaniky, jsou jeho schopnosti zvýšit mechanickou sílu, snížit propustnost pro vodu, malé molekuly a plyny i jeho schopnost regulovat fluiditu a fázové chování membrán.^{7, 8}

Zároveň je hlavním prekurzorem při syntéze žlučových kyselin, vitamínu D, steroidních a pohlavních hormonů. Sehrává také důležitou úlohu při správné funkci mozkových synapsí i pro imunitní systém.⁹

Většina cholesterolu je syntetizována de novo v buňkách lidského organismu, především v játrech, část se do organismu dostává exogenní cestou – potravou. Syntéza cholesterolu je přísně regulována. Jeho vysoký příjem v potravě vede k poklesu endogenní produkce cholesterolu, snížený příjem v potravě má opačný efekt.

2.2.2. Struktura cholesterolu

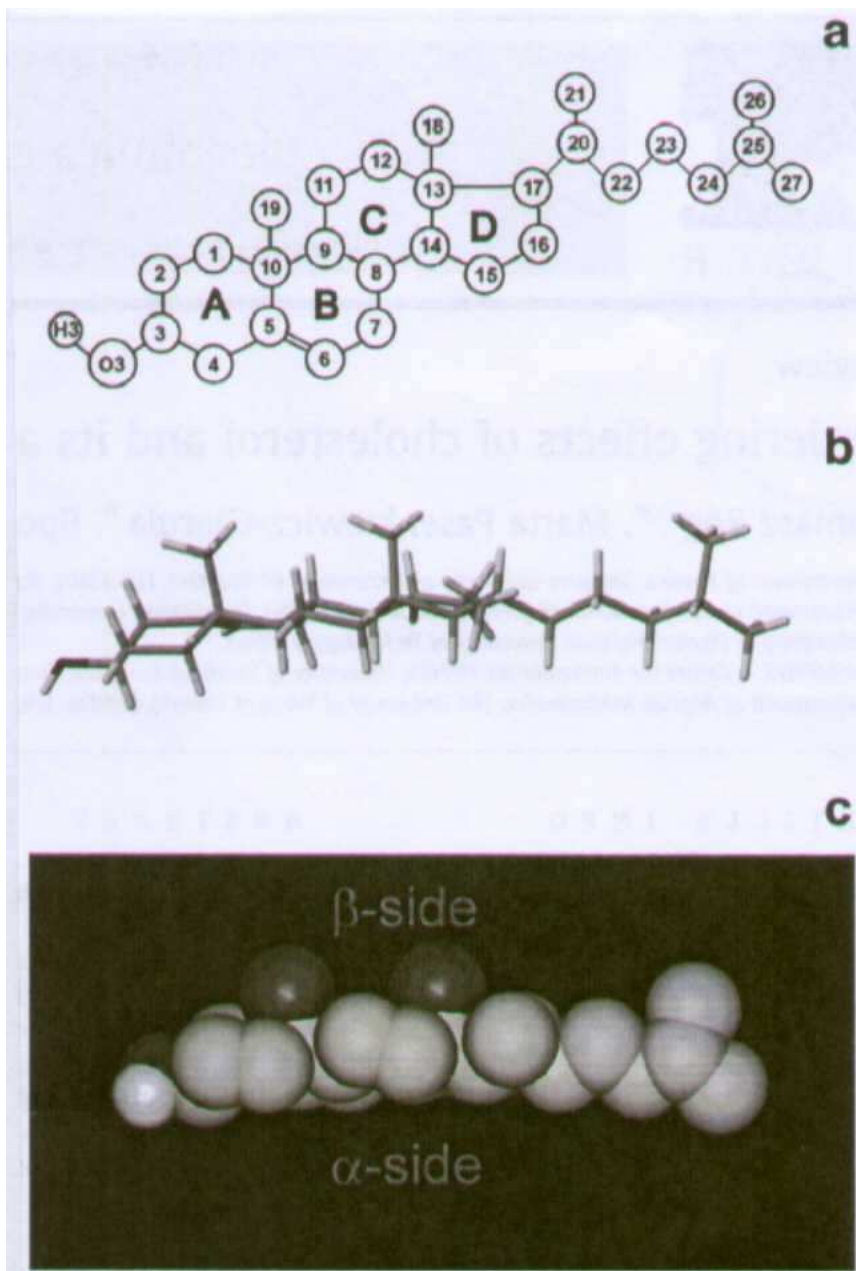
Cholesterol byl objeven už v 19. století, jeho struktura však byla popsána až v roce 1932 Heinrichem Wielandem.⁷

Ve vodě je prakticky nerozpustný. Strukturálně se řadí mezi steroidy, jejichž základní skelet tvoří tetracyklický uhlovodík steran. Obsahuje tři hlavní funkční prvky, důležité pro funkci membrán – pevný steroidní skelet, hydroxylovou skupinu v poloze 3, která umožňuje jeho interakci s vodou a alkylový řetězec vázaný na uhlík č. 17.⁷ Jak bylo stanoveno už v 70. letech, jakákoliv modifikace těchto strukturálních prvků snižuje účinky cholesterolu v lipidové dvojvrstvě.¹⁰ Tři ze čtyř kruhů jsou šestiuhlíkaté, další je pětiuhlíkatý. Kruhy mají spojení *trans* a tvoří plochou a pevnou strukturu charakterizující cholesterol a většinu jeho analogů. Dva methylové substituenty (C18, C19) jsou napojeny na uhlíky č. 10 a 13 v konfiguraci *cis*. Díky tomu je kruhový systém cholesterolu asymetrický – na jedné straně je plochý, bez substituentů (α strana), na druhé straně je charakterizován přítomností dvou methylů (β strana).

Zatímco v cholesterolu je pouze jedna dvojná vazba (mezi C5 a C6), v ostatních sterolech se počet a umístění dvojných vazeb do určité míry liší.⁷

Obr. 2 – Struktura cholesterolu ⁷

- a) struktura s očíslovanými uhlíky a kruhy
- b) trojrozměrná struktura
- c) zobrazení α a β strany



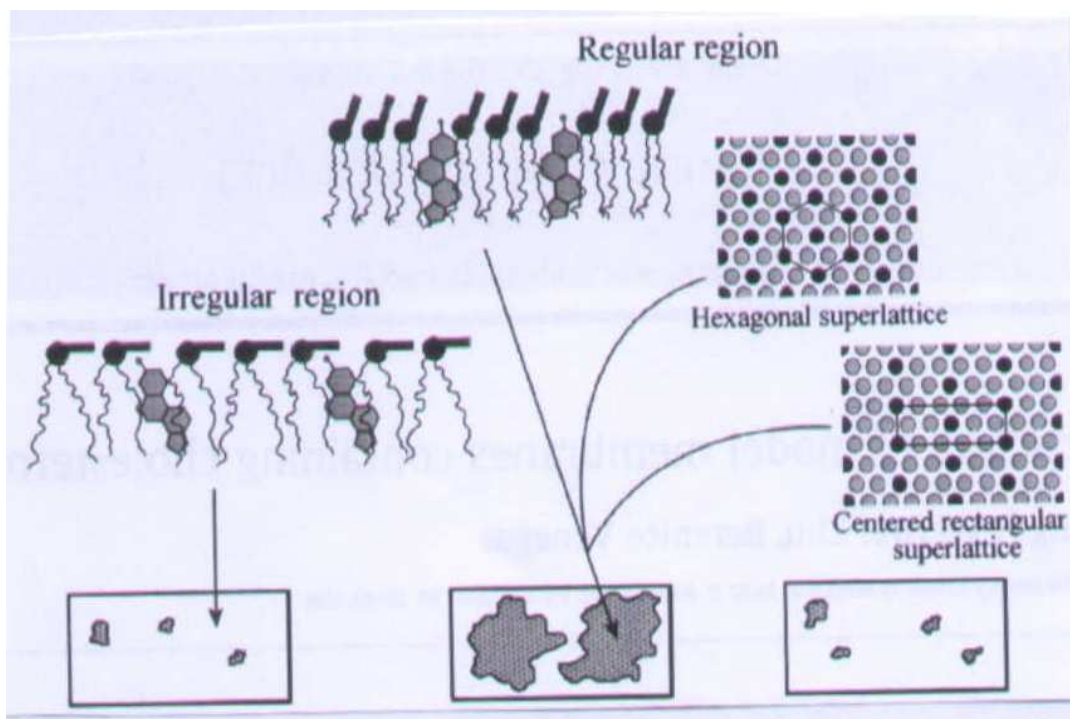
2.2.3. Uspořádání cholesterolu v membránách

Laterální organizace cholesterolu je v biologii membrán dlouhodobý problém. Teoreticky mohou být membránové komponenty rozděleny doménově, umístěné náhodně nebo pravidelně v prostoru membrány.¹¹

Současný pohled na pravidelné sterolové rozmístění je popsán na obrázku č. 3.¹² Tento model navrhuje, že steroly (cholesterol, ergosterol, dehydroergosterol) mohou být organizovány v pravidelném zesíťování tvořeném acylovými řetězci membránových lipidů a molekulami sterolu.

Obr. 3 – Schéma rozmístění sterolů.¹²

Pravidelně rozmístěné sterolové zesíťování (šedé oblasti) a nepravidelně rozmístěné lipidové oblasti (bílé oblasti) se objevují vždy společně v tekutých membránách obsahujících steroly (obdélníkové tvary). V pravidelných oblastech jsou sterolové molekuly (tmavá kolečka) rozmístěny buď v hexagonálních nebo obdélníkových strukturách.¹² Tvar a velikost pravidelného rozmístění se mění v čase a lipidy v nebo vně pravidelných oblastí prochází neustálou výměnou.¹³



2.2.4. Fázové chování cholesterolu

K bližšímu poznání vlastností a struktury tuhých látek lze využít metod termické analýzy. Například diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) je vhodnou metodou pro monitorování strukturních změn ve vodných disperzích lipidů.¹⁴

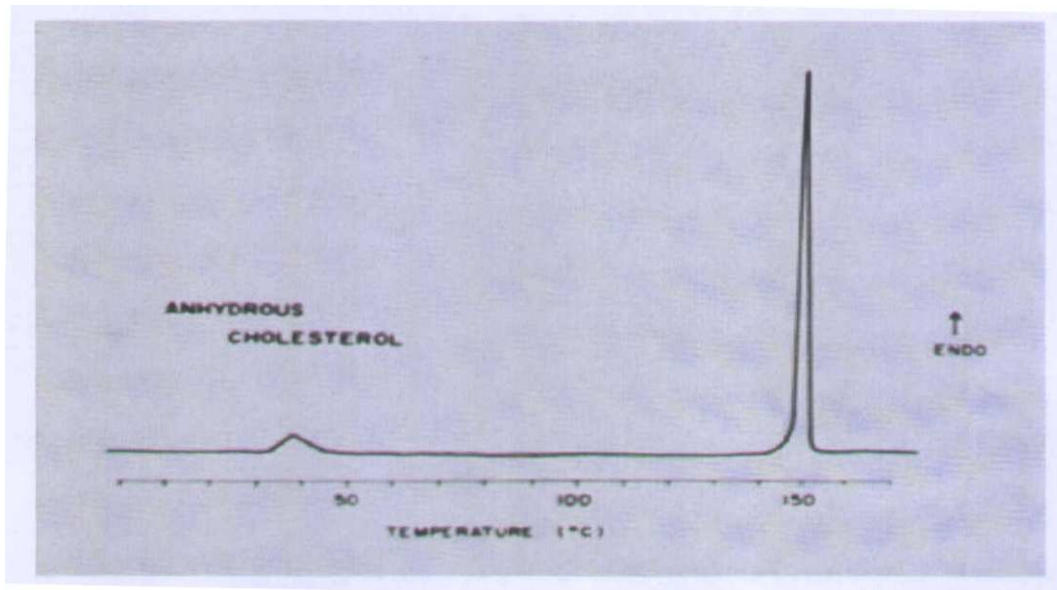
Je založena na principu měření elektrické energie přídatného zdroje, potřebné k vyrovnání teplotních rozdílů vzniklých mezi zahříváním vzorkem a referenční látkou, tedy k udržení izotermních podmínek. Výskyt extrémů na měřených křivkách odpovídá exotermním nebo endotermním procesům probíhajícím v měřeném vzorku. Tím lze určit například fázové přechody, bod tání a tuhnutí, krystalizaci, čistotu, tepelnou kapacitu atd. Velkou výhodou této metody je její rychlost a spotřeba velmi malého množství vzorku.^{14, 15}

Pomocí DSC bylo zjištěno, že termotropní fázové chování bezvodého cholesterolu se značně liší od cholesterolu monohydrátu. U bezvodého cholesterolu jsou viditelné dva enantiotropní přechody : polymorfní krystalická přeměna při 39°C a přeměna z krystalické na kapalnou fázi při 151°C. Zatímco v uzavřeném systému cholesterolu monohydrátu a vody se na DSC záznamech objevují tři reverzibilní endotermní přechody a to při teplotě 86, 123 a 157°C.¹⁶

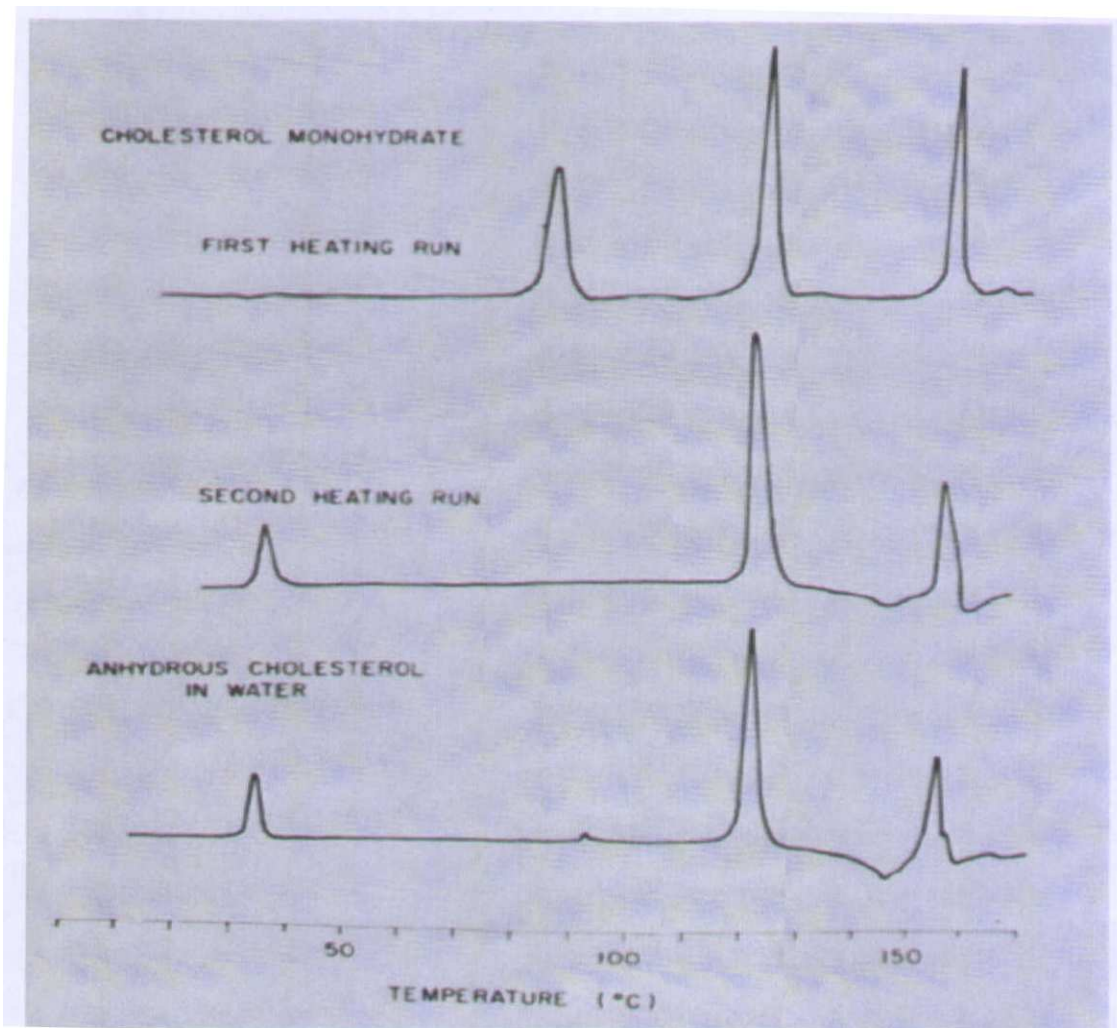
Při teplotě 86°C cholesterol monohydrát ztrácí vodu a přechází polymorfní přeměnou na bezvodý cholesterol. K opětovné rehydrataci cholesterolu dochází nejdříve za 24 hodin a poměr hydratace závisí především na polymorfní krystalické formě bezvodého cholesterolu a teplotních podmínkách.¹⁶

Při teplotě 123°C, v přítomnosti nadbytku vody, dochází k ostrému přechodu bezvodého krystalického cholesterolu na fázi kapalných krystalů ve smektickém stavu. Fáze kapalných krystalů je stabilní v teplotním rozmezí od 123 do 157°C, potom dochází k tání a vytváří se kapalina. Výskyt fáze kapalných krystalů hydratovaného cholesterolu by vysvětloval vysokou povrchovou aktivitu a možnost existence vysoké koncentrace cholesterolu v biologických membránách.^{16, 17}

Obr. 4 – Bezvodý cholesterol, záznam DSC ¹⁶



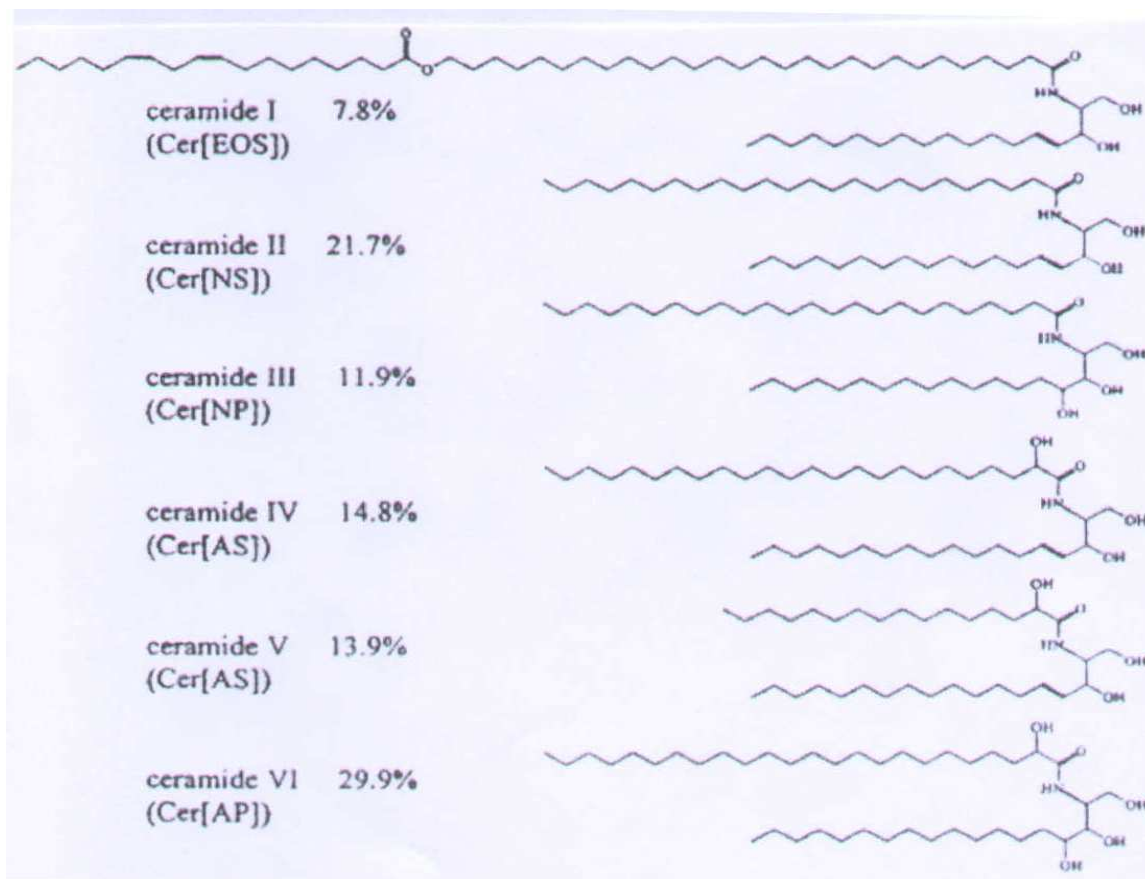
Obr. 5 – Srovnání záznamů DSC – první a druhý ohřev cholesterolu monohydrát a záznam krystalického bezvodého cholesterolu ve vodě ¹⁶



2.3. Ceramidy

Ceramidy jsou hlavní složkou epidermálních lipidů. Jejich relativní poměr ve SC je na obr. č. 6¹⁸

Obr. 6 – Struktura a relativní poměr zastoupení ceramidů ve SC¹⁸



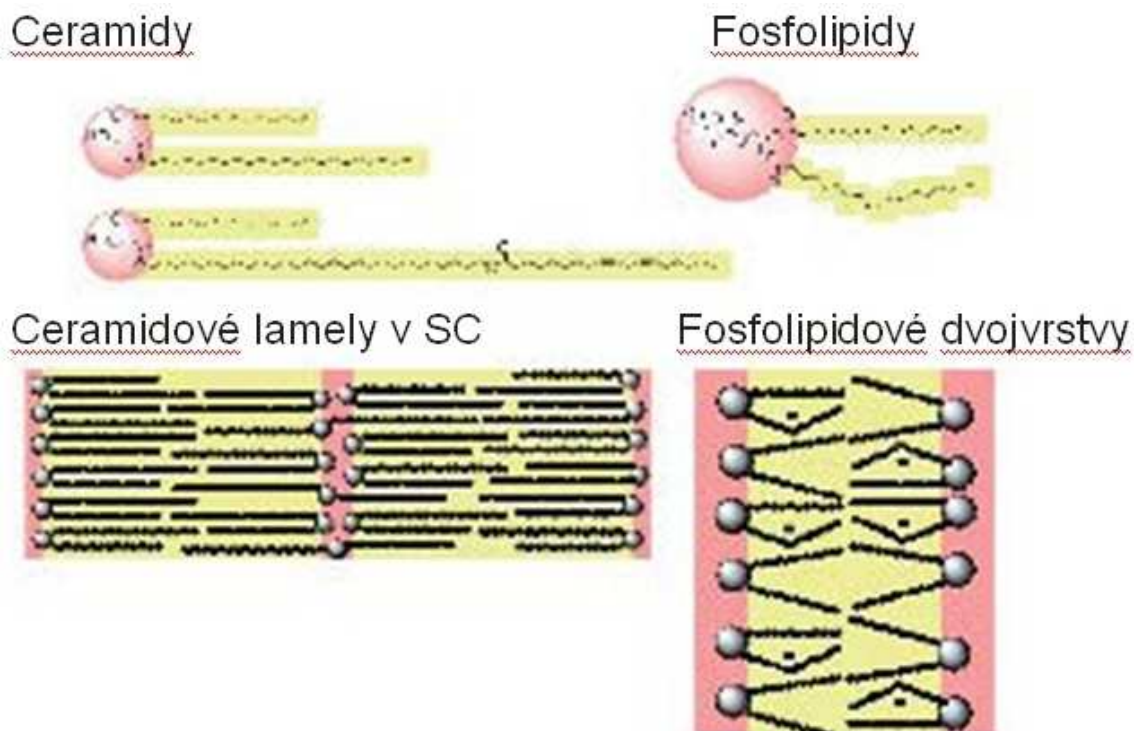
Tvoří nejdůležitější a nespecifičtější část lipidové matrix. Podle nových studií je 9 typů ceramidů, lišící se stavbou polární hlavy a průměrnou délkou řetězců.¹⁹

Základem molekuly ceramidu 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 nebo ω obsahovat hydroxyskupinu. Délka mastné kyseliny se pohybuje od 16 až po 34 uhlíků v ω -hydroxylovaných ceramidech, přičemž nejvíce se vyskytují kyseliny obsahující 24 uhlíků. Zvláště významné jsou tři typy ceramidů, které obsahují ω -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, hrají tedy klíčovou roli v organizaci intercelulární lipidové matrix ve SC a jejich nedostatek je příčinnou zhoršené bariérové funkce kůže.^{2, 5, 20}

Obecně molekula ceramidu obsahuje polární hlavu a dva hydrofobní řetězce, podobně jako fosfolipidy. Na rozdíl od fosfolipidů, tvořících běžné buněčné membrány, je však polární hlava ceramidů výrazně menší, což umožňuje těsnější uspořádání těchto lipidů v lamele. Ceramidy SC mají navíc podstatně delší hydrofobní řetězce a vytvářejí ne dvojrstvy, ale několikavrstvé, vzájemně propojené lamelární struktury (obr. č. 7). Právě tyto strukturální poznatky vysvětlují, proč je propustnost ceramidových lamel SC řádově tisíckrát nižší než je tomu u fosfolipidových dvojrstev.²

Obr. 7 – Srovnání struktur ceramidů a fosfolipidů a jejich uspořádání v lamelách²



3. Pracovní úkol

Pracovní úkol je zaměřený na prohloubení znalostí o interakci vybraných kožních lipidů s vodou. Pro hodnocení je použita metoda DSC. Práce řeší i vhodné podmínky měření.

Celý pracovní úkol lze rozdělit do několika dílčích bodů :

- 1) Charakteristika cholesterolu
- 2) Charakteristika vody a vliv podmínek měření na stanovení vody ve vzorcích
- 3) Hodnocení binárních směsí cholesterolu a vody
- 4) Hodnocení pseudoceramidů a modulátorů transdermálního průniku

4. Experimentální část

4.1. Použité přístroje

1. **DSC 200 PC Phox®** - diferenciální skenovací kalorimetr s tepelným tokem

výrobce : Netzsch- Gerätebau , Německo

teplotní rozsah : -150 °C - +600 °C

rychlost ohřevu : 0,1 K/min – 99,9 K/min

kalorimetrický rozsah : ± 750 mW

citlivost kalorimetru : 4 – 4,5 μ V/mW (indium)

chlazení : Dewarova nádoba 26l s tekutým dusíkem

zahřívání : cirkulační topné těleso kolem senzoru

kelímky odolávající tlaku 10 MPa, objem 25 μ l

2. **Ruční lis pro víčkování kelímků**

3. **Digitální analytické váhy CAHN 26**, Cahn Instruments, USA

4.2. Seznam použitých surovin

1. Cholesterol (Ch) – čistota 99 %, Sigma – Aldrich chemie
2. Pseudoceramid (tetradecyl N- tetrakosanoyl-(L)- serinu) 14S24 (C) – Katedra anorganické a organické chemie
3. Modulátor transdermálního průniku DOD H5 – 10 ($C_{28}H_{55}NO_4$)
4. Modulátor transdermálního průniku ETH5 – 10 ($C_{18}H_{35}NO_4$)
5. Ultra-čistá voda (V) – Katedra biochemických věd Faf HK

4.3. Pracovní postup

Příprava vzorků

Suroviny jsme navázili přímo do kelímku. Kelímek s víčkem jsme pomocí pinzety vložili do ručního lisu, kde došlo k uzavření. Poté jsme umístili kelímek do přístroje.

Vlastní měření

Ve speciálním programu pro měření na přístroji DSC firmy Netzsch jsme zadali potřebné parametry a nadefinovali teplotní program měření.

Teplotní program zahrnoval počáteční teplotu, cílovou teplotu ohřevu, rychlost ohřevu, možné izotermy s časově omezenou konstantní teplotou a teplotu konečného stavu. Měření probíhalo v dusíkové atmosféře.

Způsob vyhodnocování

Po skončení měření byla data vyhodnocena pomocí speciálního programu Netzsch Proteus Anylysis, který je dodáván současně s přístrojem.

U všech vzorků za daných podmínek byly pro potřeby naší práce stanovovány tyto parametry :

ΔH - teplo tání/tuhnutí	odpovídá ploše vymezené píkem DSC křivky
T_p – teplota píku	teplota odpovídající tání/tuhnutí převážného množství látky
T_o – onset	teplota odpovídající počátku tání nebo tuhnutí
T_{pk} -	teplota odpovídající konci tání nebo tuhnutí

4.4. Výsledky experimentu

4.4.1. Úkol č. 1

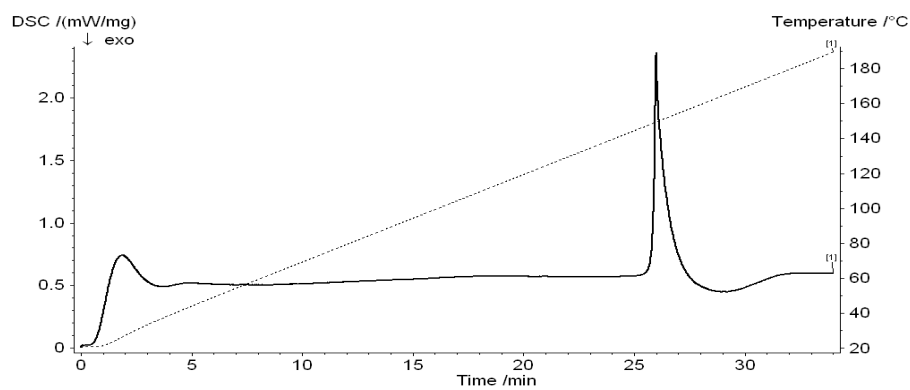
DSC záznamy ohřevů cholesterolu

GRAF č. 1

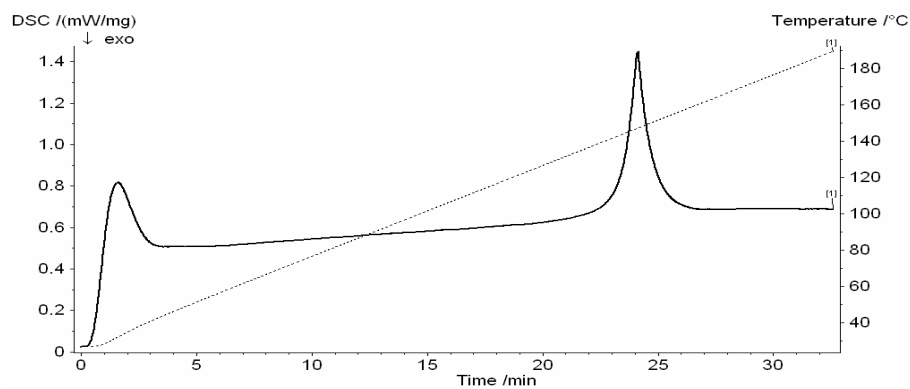
Vzorek : **cholesterol 1**

Navážka : 2,847mg

A) první ohřev



B) druhý ohřev

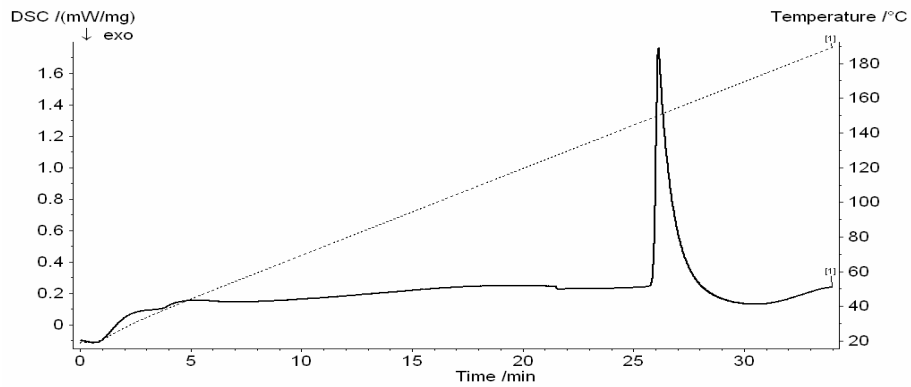


GRAF č. 2

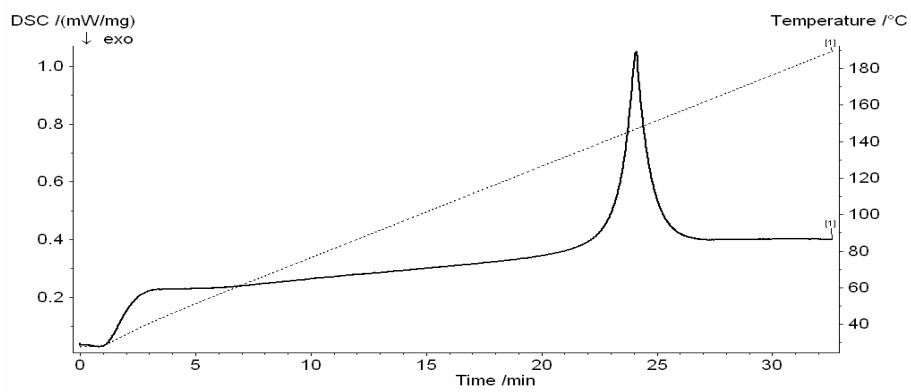
Vzorek : **cholesterol 2**

Navážka : 3,039 mg

A) první ohřev



B) druhý ohřev

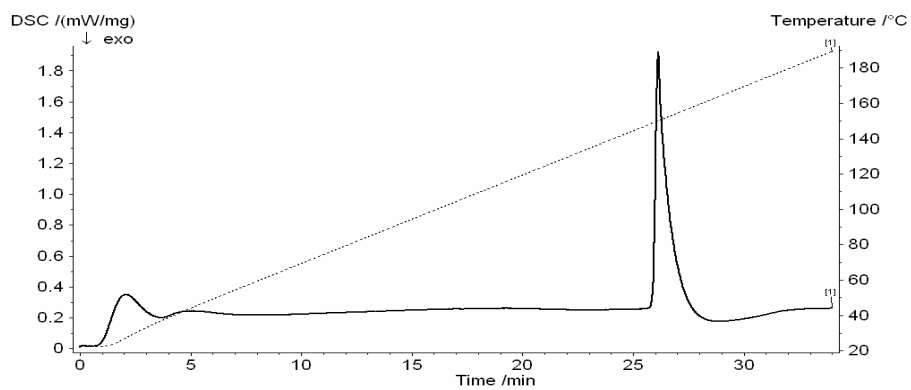


GRAF č. 3

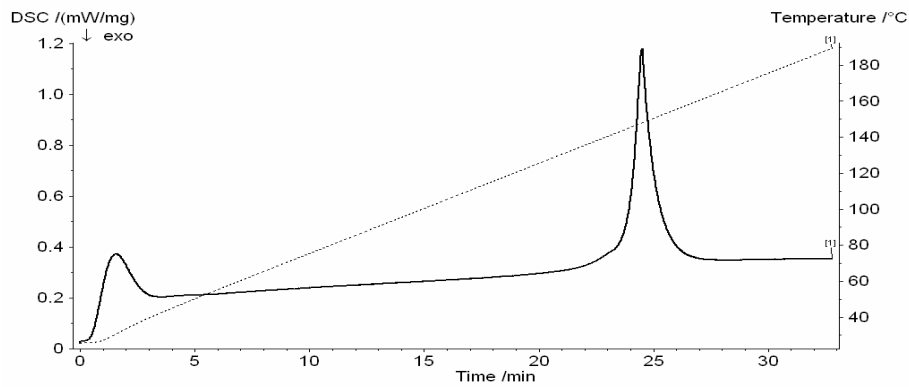
Vzorek : **cholesterol 3**

Navážka : 3, 240 mg

A) první ohřev



B) druhý ohřev

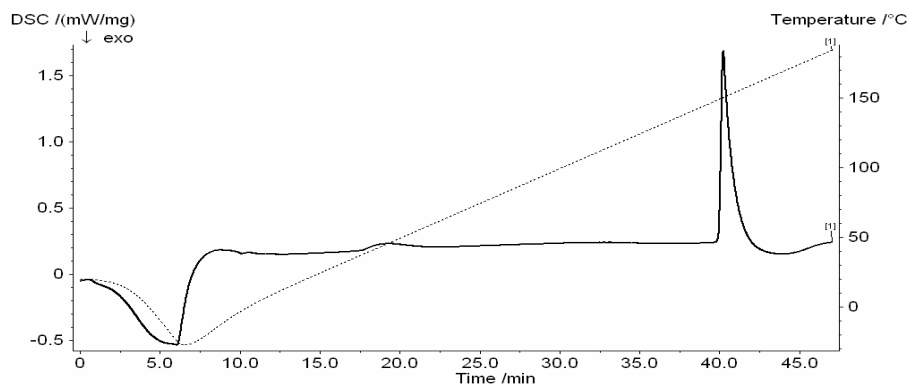


GRAF č. 4

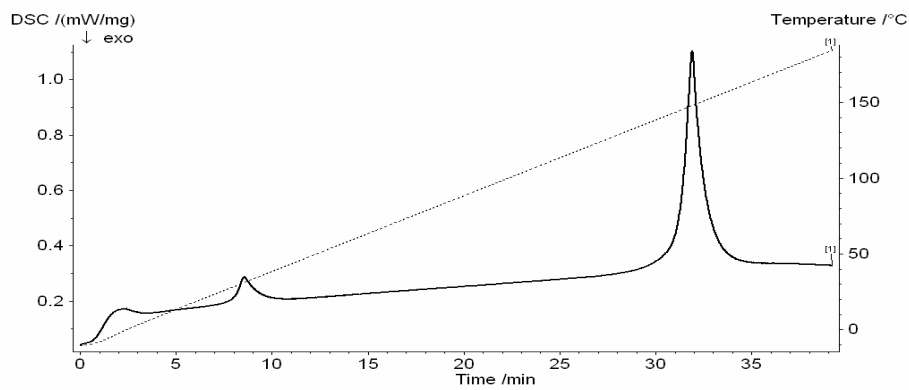
Vzorek : cholesterol 4

Navážka : 3,442 mg

A) první ohřev



B) druhý ohřev

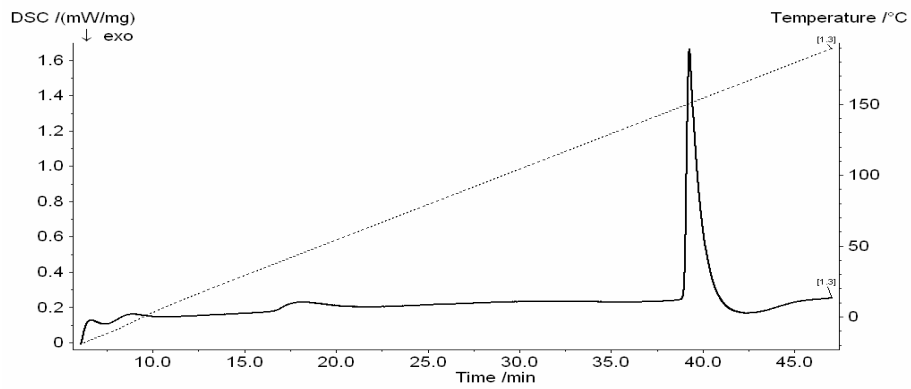


GRAF č. 5

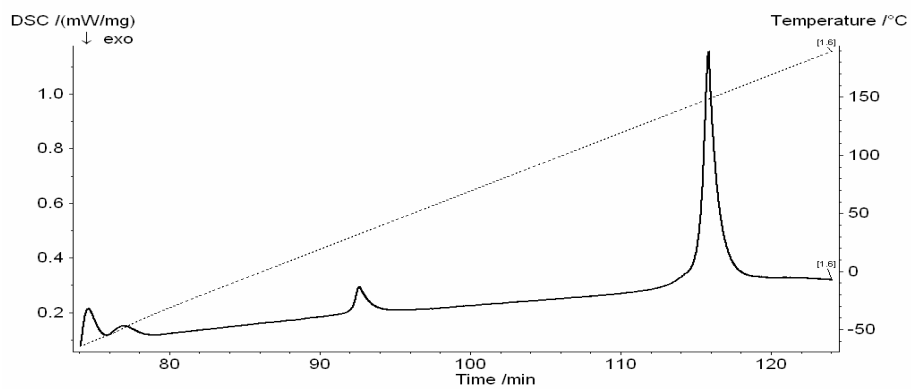
Vzorek : cholesterol 5

Navážka : 3,554 mg

A) první ohřev



B) druhý ohřev

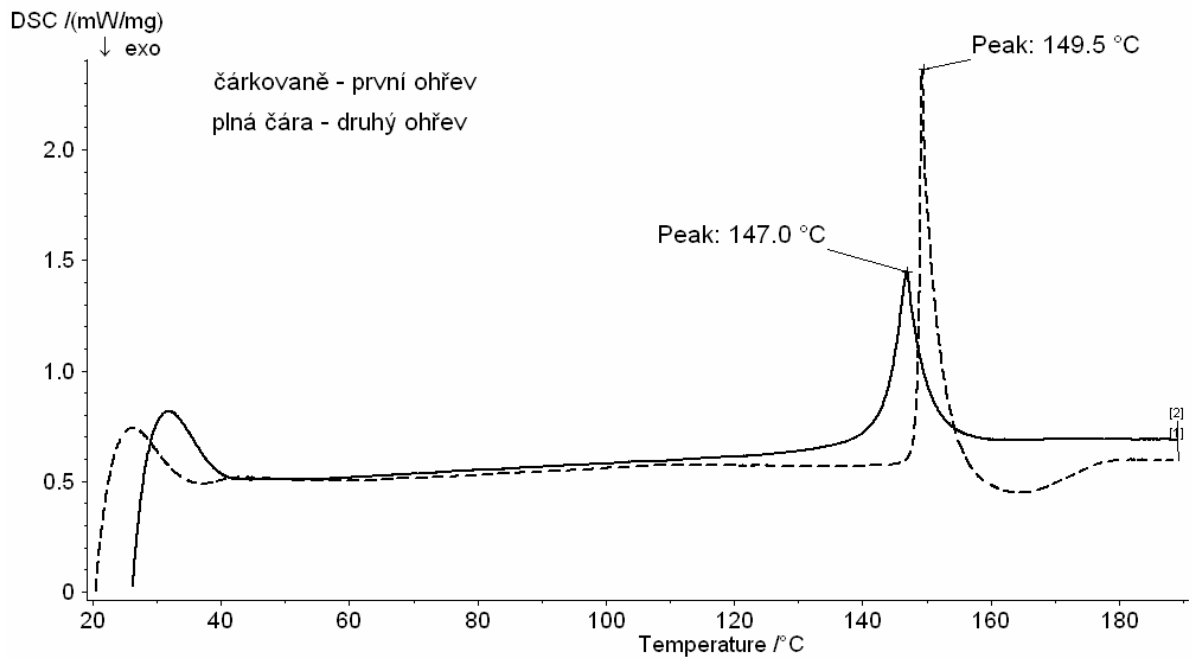


Porovnání měření prvních a druhých ohřevů cholesterolu

GRAF č. 6

Vzorek : **cholesterol 1**

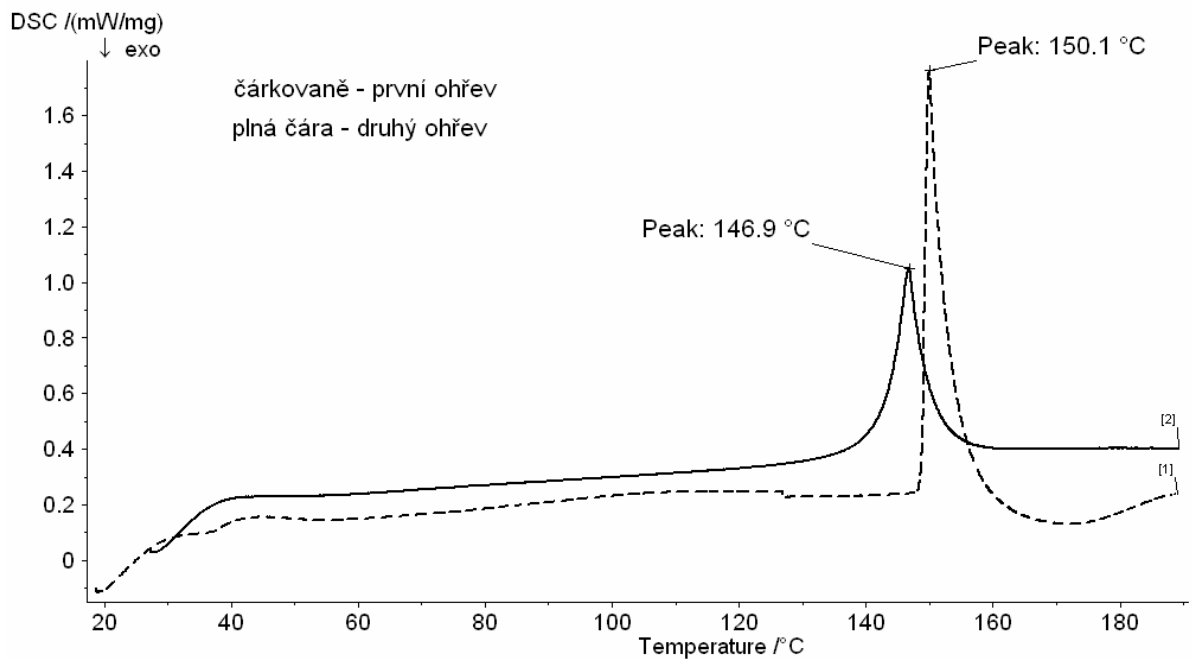
Navážka : 2,847 mg



GRAF č. 7

Vzorek : **cholesterol 2**

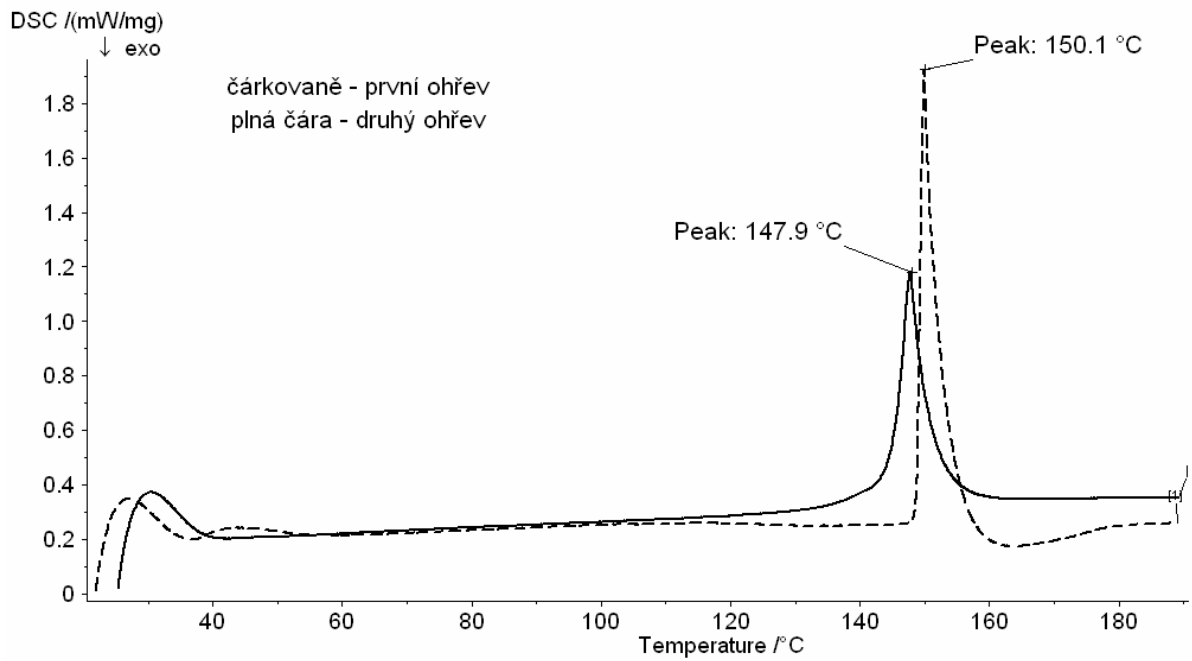
Navážka : 3,039 mg



GRAF č. 8

Vzorek : **cholesterol 3**

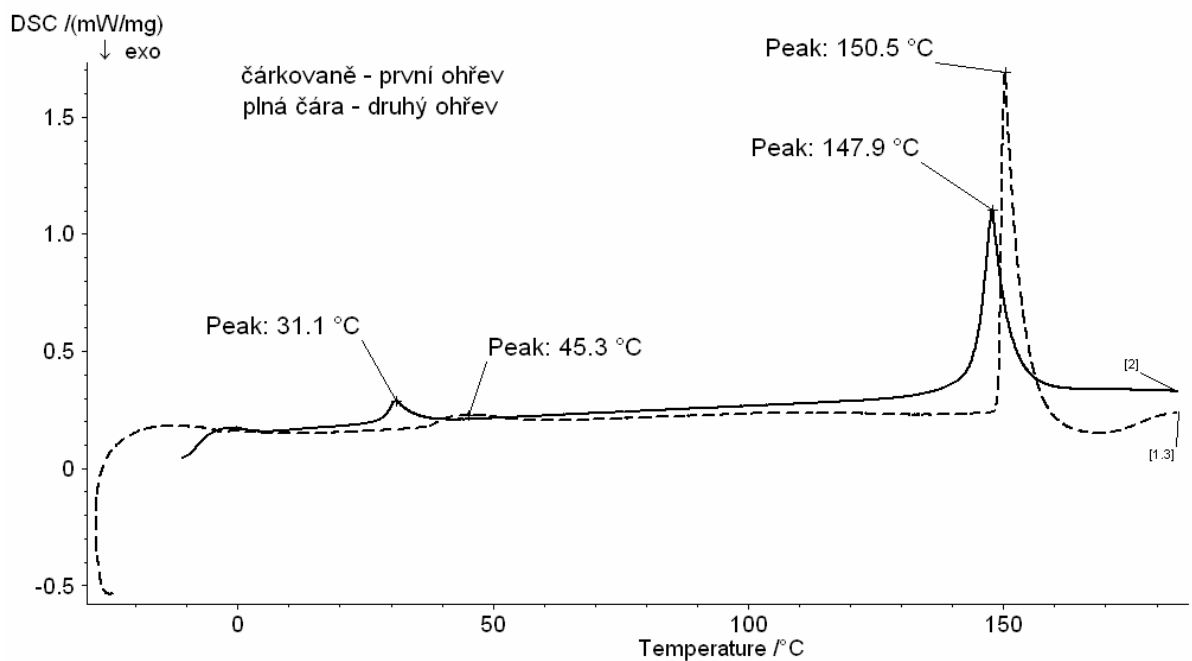
Navážka : 3,240 mg



GRAF č. 9

Vzorek : **cholesterol 4**

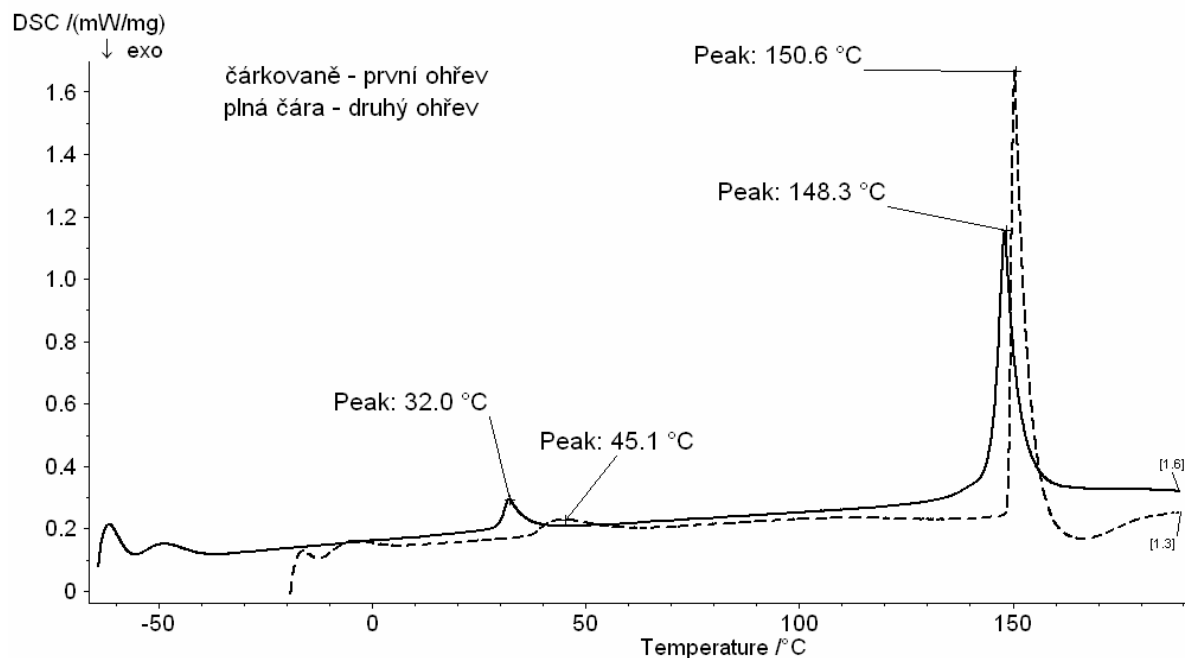
Navážka : 3,442 mg



GRAF č. 10

Vzorek : cholesterol 5

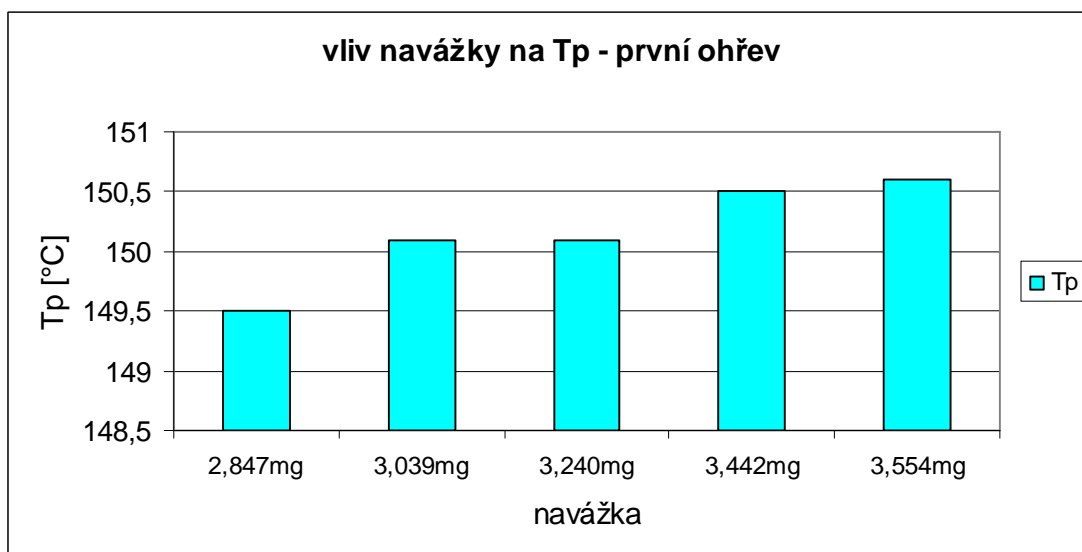
Navážka : 3,554 mg



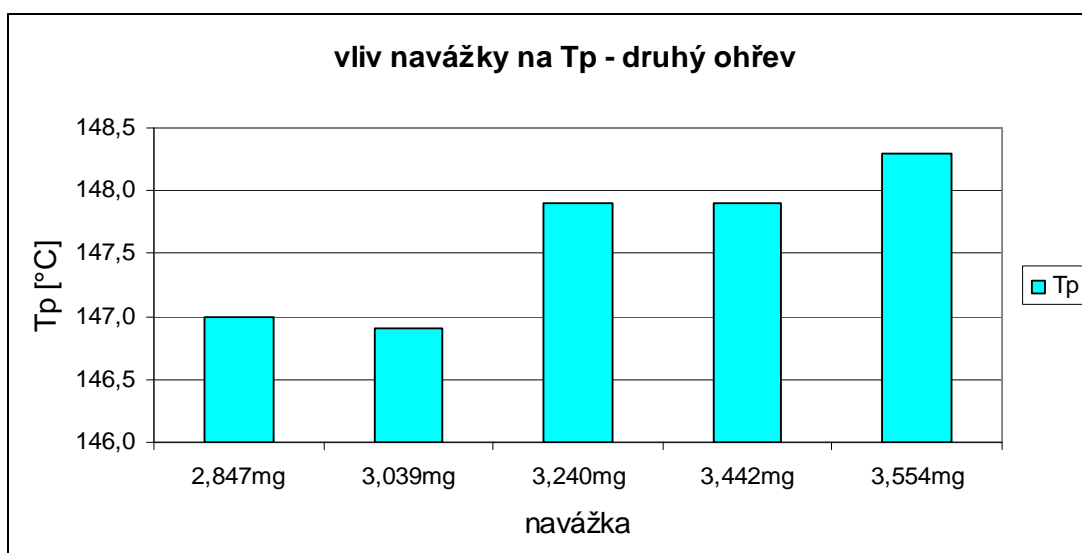
TABULKA č. 1 – Kalorimetrická charakteristika cholesterolu

Vzorek		To [°C]	Tp [°C]	Tpk [°C]	ΔH [J/g]
cholesterol 1 2,847 mg	1. ohřev	148,7	149,5	164,2	62,1
	2. ohřev	143,7	147,0	162,7	55,5
cholesterol 2 3,039 mg	1. ohřev	149,0	150,1	170,2	69,8
	2. ohřev	143,1	146,9	162,5	54,2
cholesterol 3 3,240 mg	1. ohřev	149,0	150,1	162,9	63,8
	2. ohřev	145,4	147,9	163,4	55,5
cholesterol 4 3,442 mg	1. ohřev	149,2	150,5	168,2	66,0
	2. ohřev	144,8	147,9	165,3	57,3
cholesterol 5 3,554 mg	1. ohřev	149,3	150,6	166,1	64,8
	2. ohřev	145,3	148,3	168,2	61,2

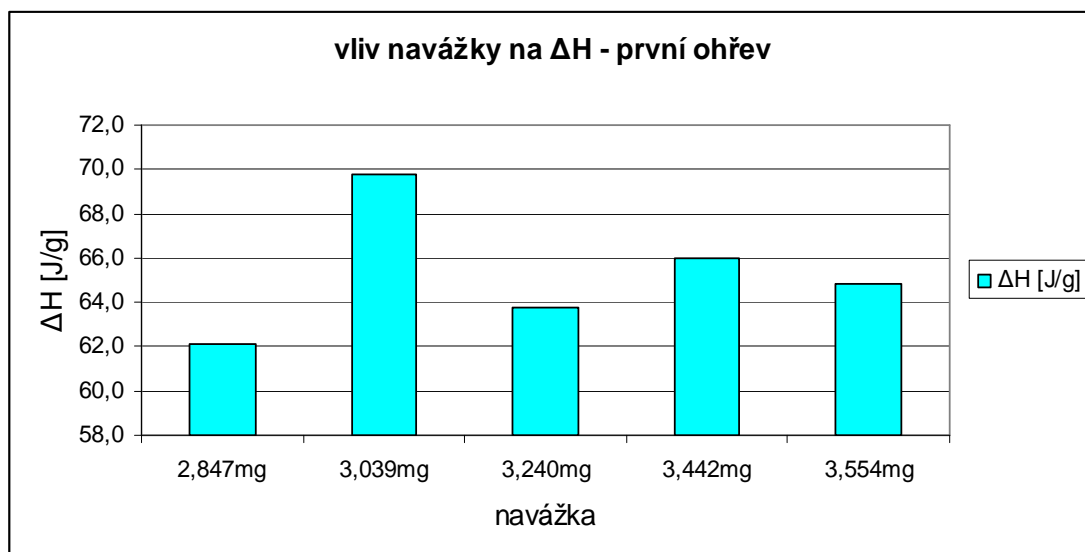
GRAF č. 11 a) - Vliv navážky cholesterolu na T_p u prvního ohřevu



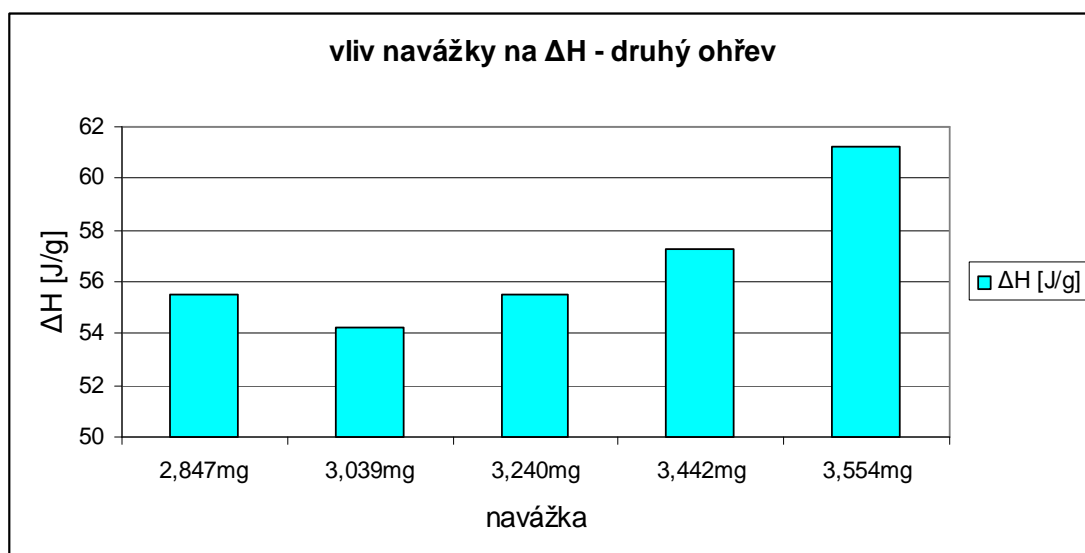
GRAF č. 11 b) - Vliv navážky cholesterolu na T_p u druhého ohřevu



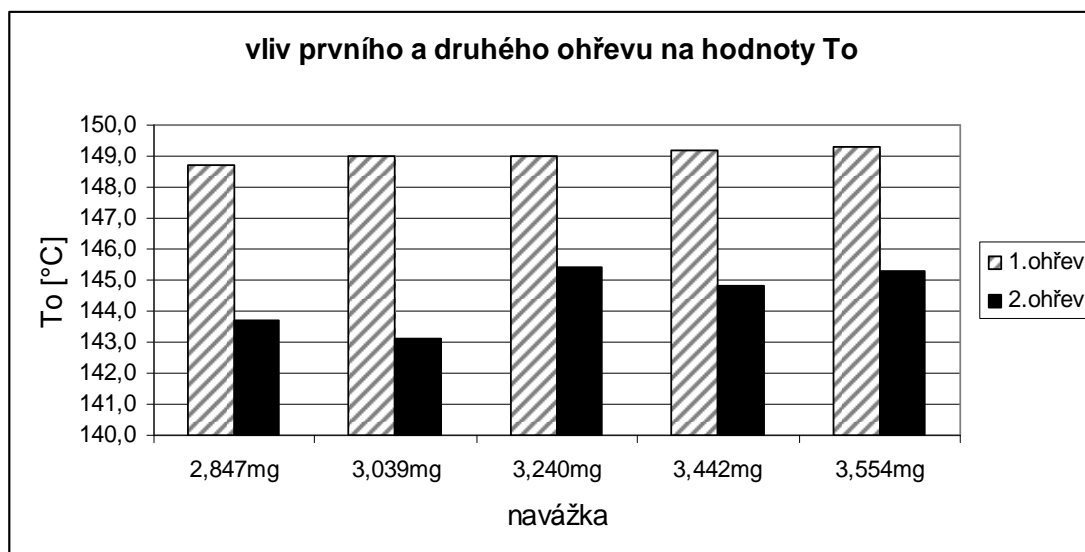
GRAF č. 12 a) - Vliv navážky cholesterolu na ΔH u prvního ohřevu



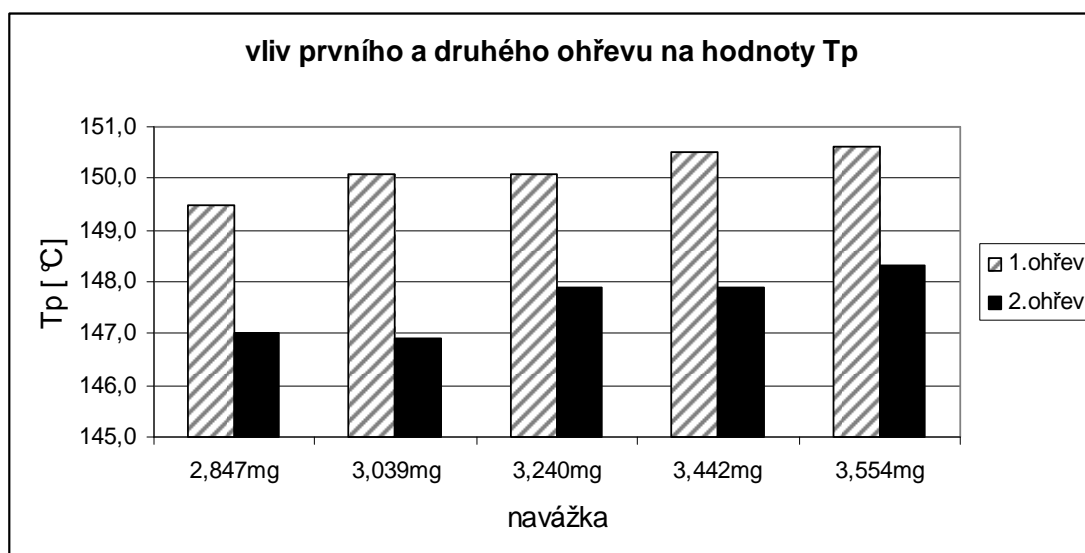
GRAF č. 12 b) - Vliv navážky cholesterolu na ΔH u druhého ohřevu



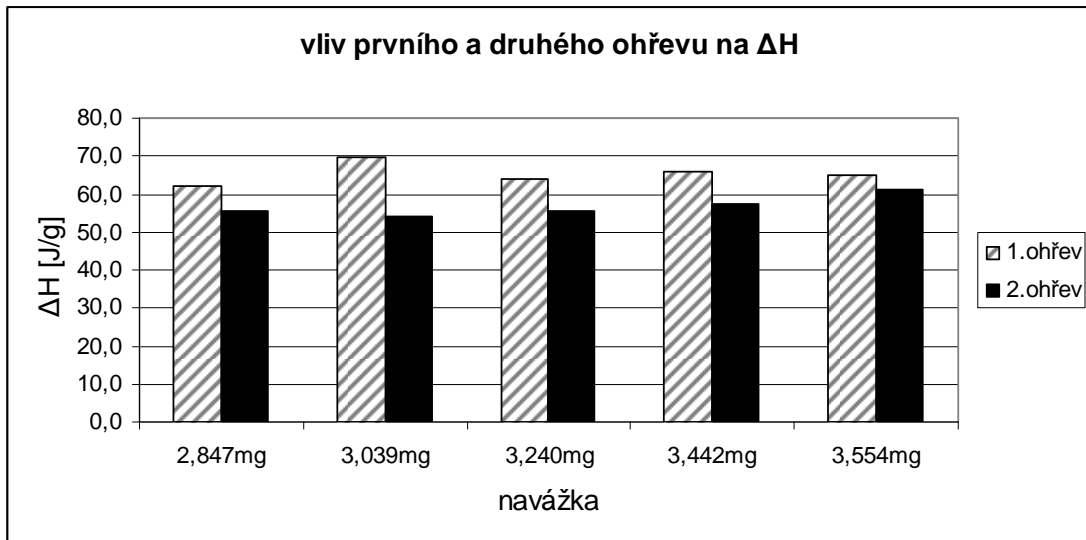
GRAF č. 13 a) – Vliv prvního a druhého ohřevu na hodnoty T_o



GRAF č. 13 b) – Vliv prvního a druhého ohřevu na hodnoty T_p



GRAF č. 13 c) - Vliv prvního a druhého ohřevu na hodnoty ΔH



4.4.2. Úkol č. 2

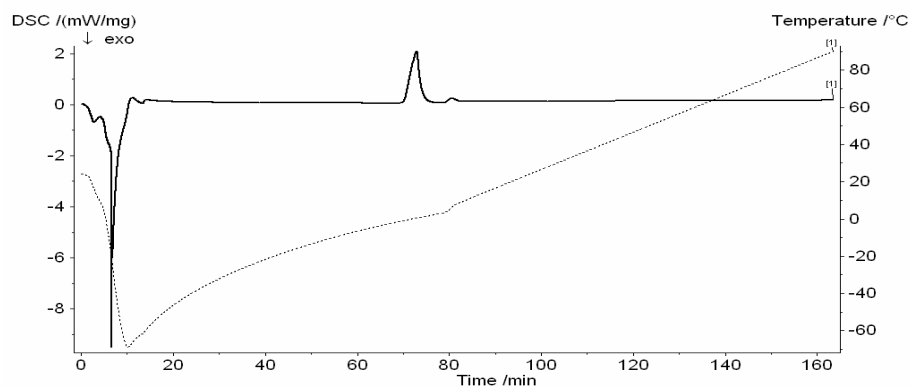
DSC záznamy ohřevů vzorků vody

GRAF č. 14

Vzorek : voda 1

Navážka : 4,98 mg

rychlost ohřevu 1 °C/min.

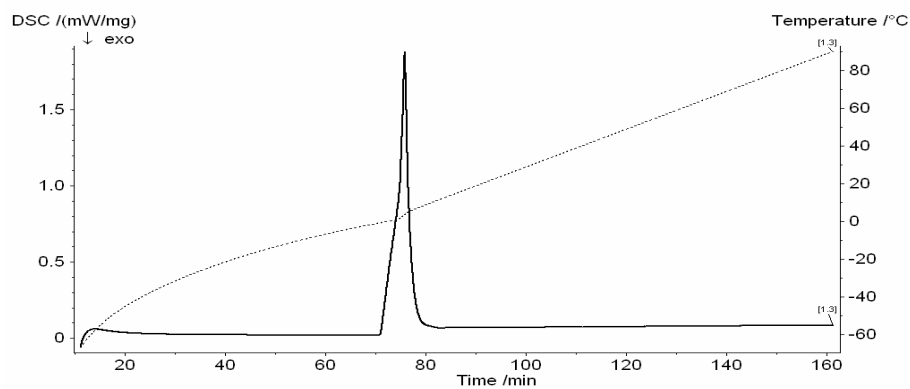


GRAF č. 15

Vzorek : voda 2

Navážka : 12,87 mg

rychlost ohřevu 1 °C/min.

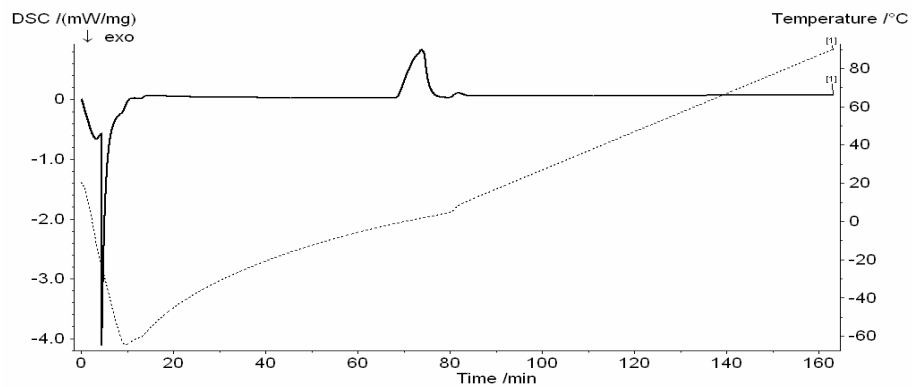


GRAF č. 16

Vzorek : voda 3

Navážka : 20,15 mg

rychlost ohřevu 1 °C/min.

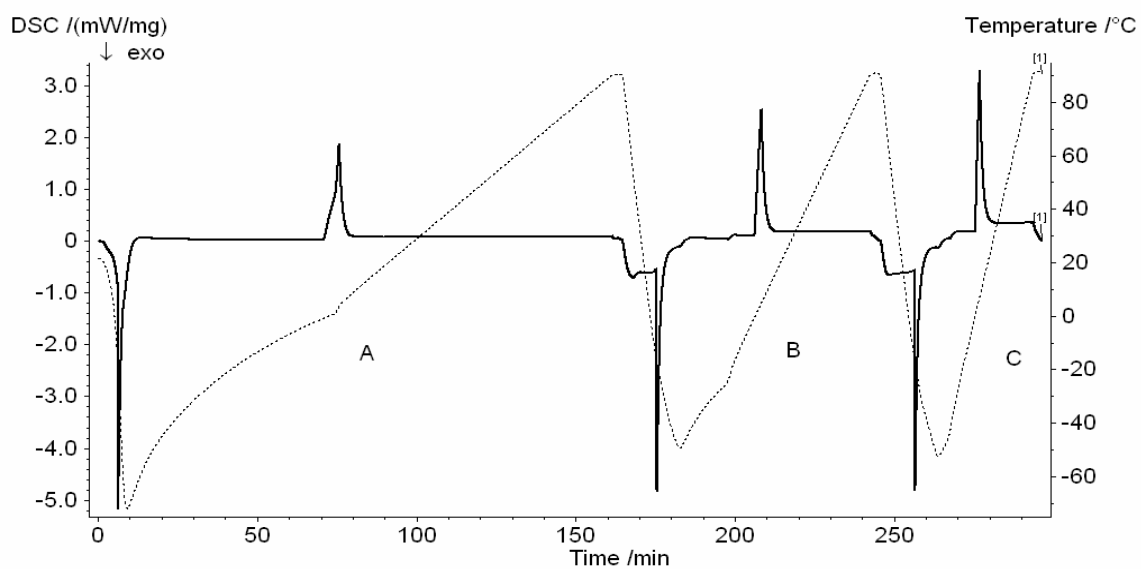


GRAF č. 17

Vzorek : voda 2

Navážka : 12,87 mg

- A) ohřev rychlostí 1 °C/min.
- B) ohřev rychlostí 2,5 °C/min.
- C) ohřev rychlostí 5 °C/min.

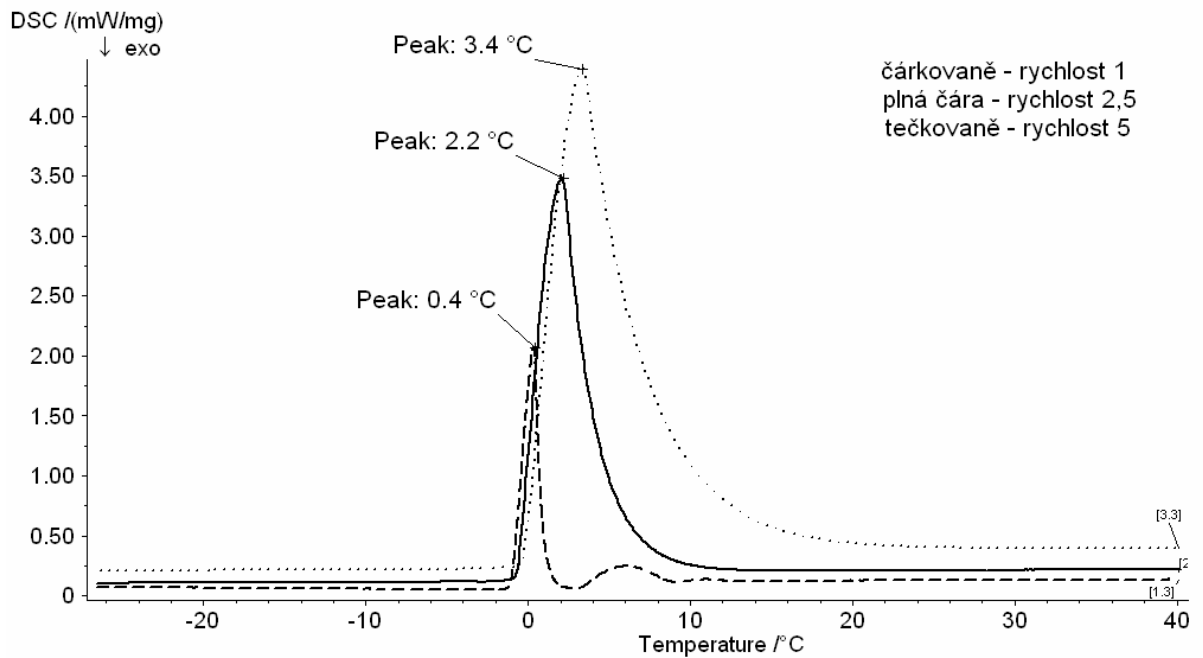


Porovnání ohřevu vzorků v závislosti na rychlosti ohřevu

GRAF č. 18

Vzorek : voda 1

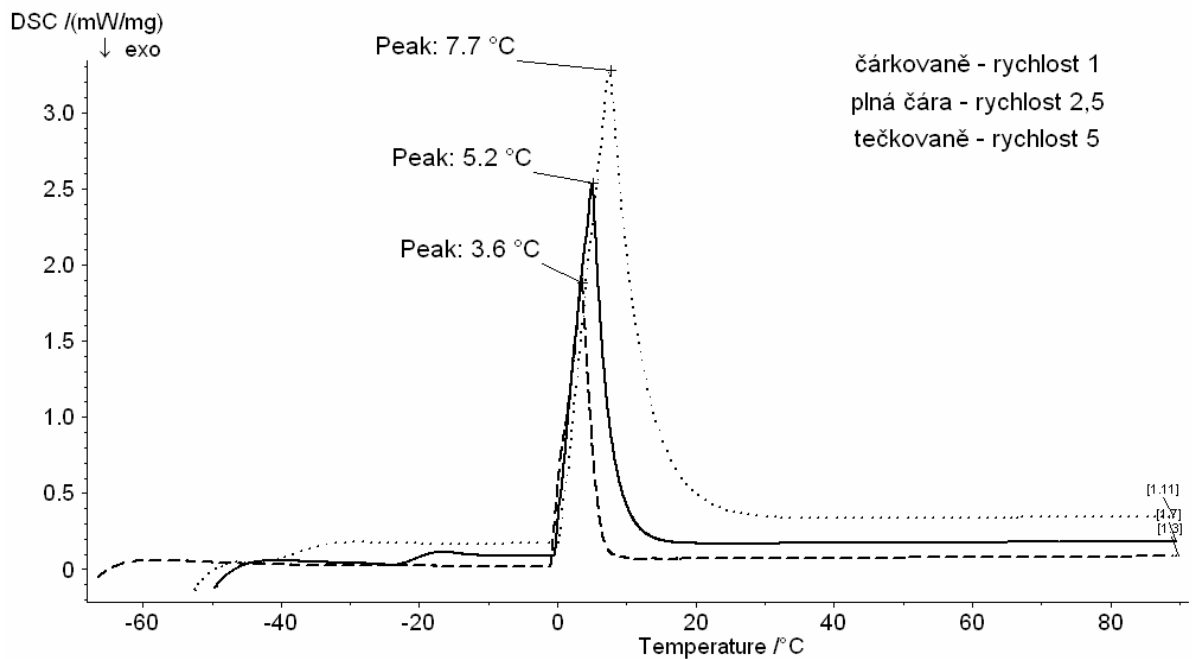
Navážka : 4,98 mg



GRAF č. 19

Vzorek : voda 2

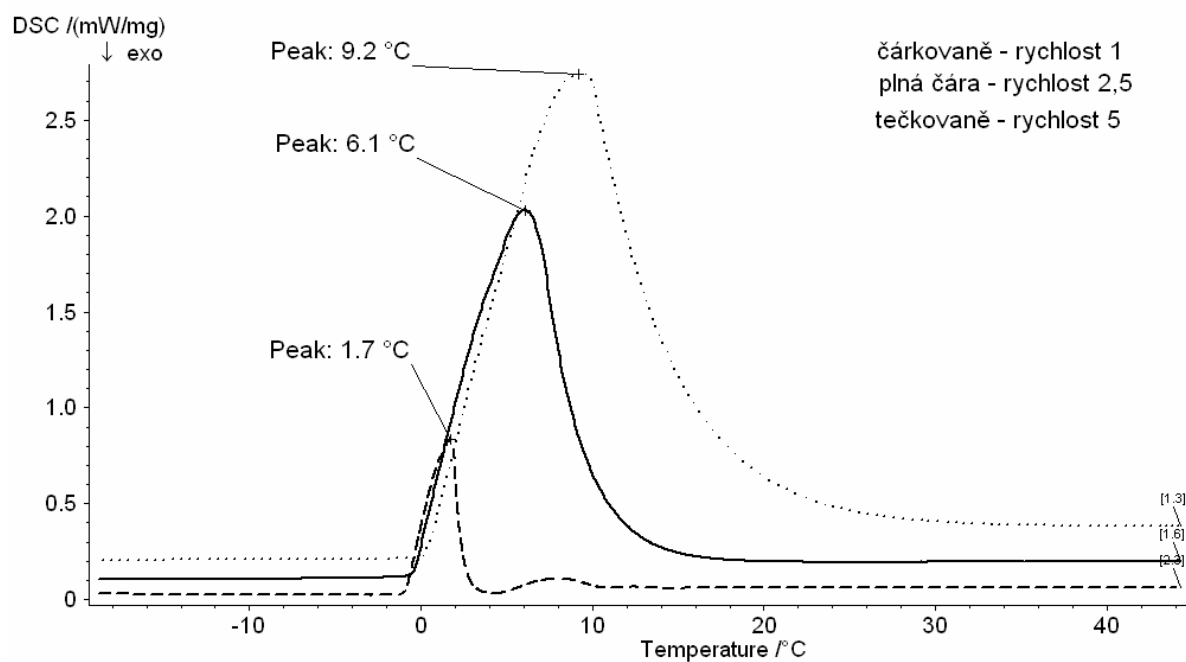
Navážka : 12,87 mg



GRAF č. 20

Vzorek : voda 3

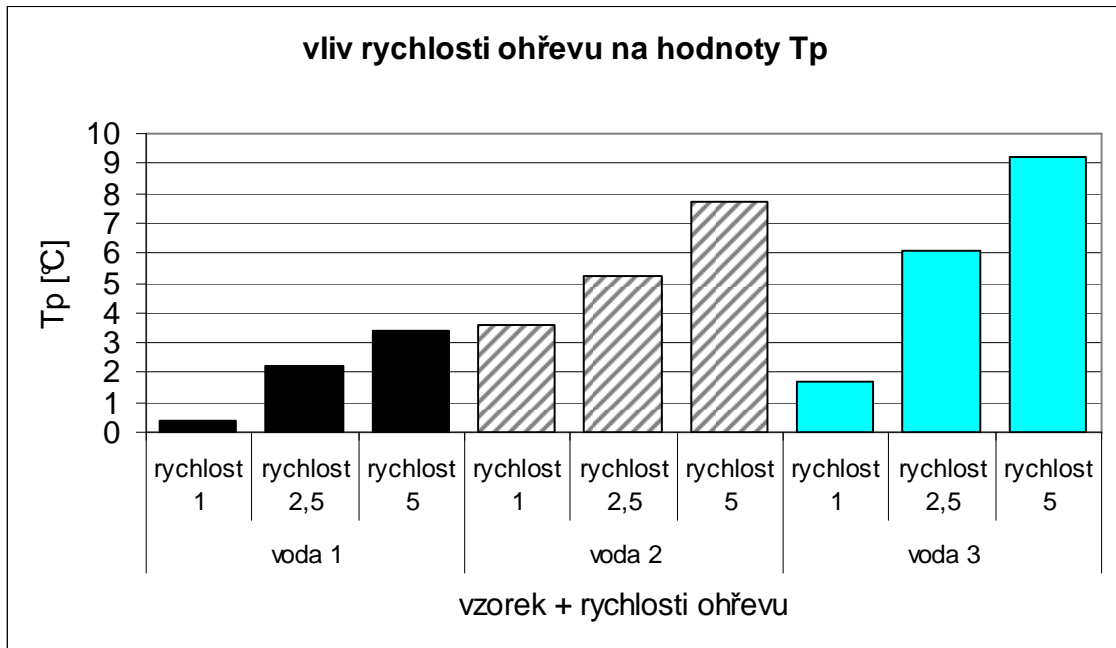
Navážka : 20,15 mg



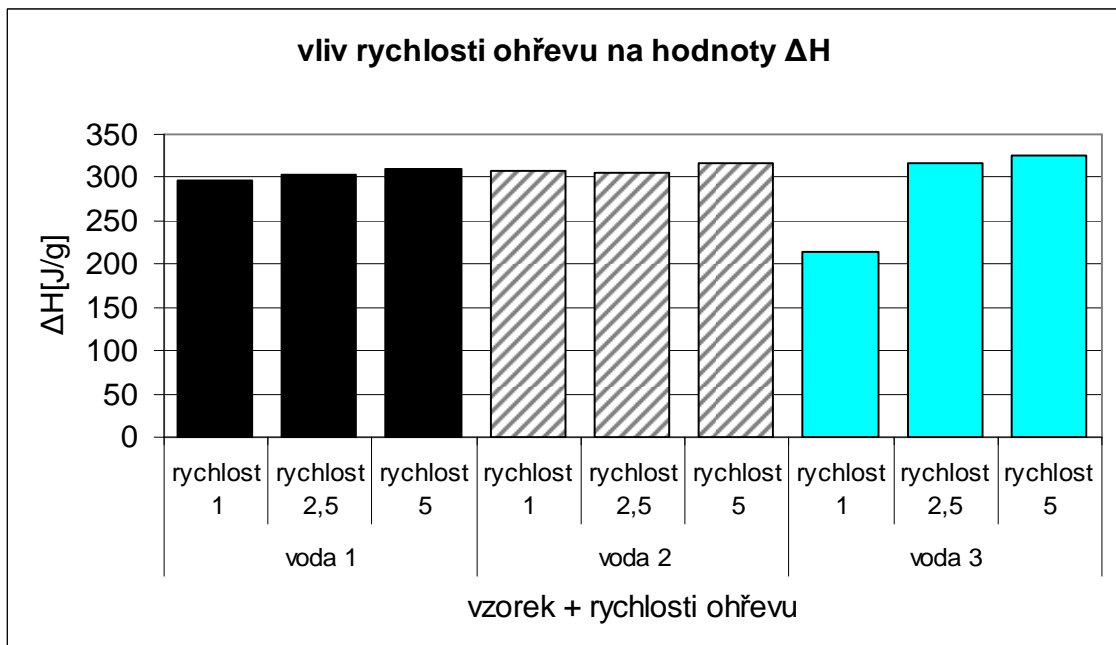
TABULKA č. 2 – Kalorimetrická charakteristika vody

Vzorek	rychlost ohřevu [°C/min]	To [°C]	Tp [°C]	Tpk [°C]	ΔH [J/g]
voda 1 4,98mg	rychlost 1	-0,9	0,4	2,8	296,9
	rychlost 2,5	-0,6	2,2	15,7	303,6
	rychlost 5	-0,1	3,4	27,1	309,7
voda 2 12,87mg	rychlost 1	-0,2	3,6	10,4	307,1
	rychlost 2,5	-0,3	5,2	16,6	304,7
	rychlost 5	0,5	7,7	29,3	316,2
voda 3 20,15mg	rychlost 1	-0,9	1,7	4,5	214,3
	rychlost 2,5	-0,4	6,1	19,8	315,6
	rychlost 5	0,4	9,2	31,9	325,7

GRAF č. 21 – Vliv rychlosti ohřevu na hodnoty T_p



GRAF č. 22 – Vliv rychlosti ohřevu na hodnoty ΔH

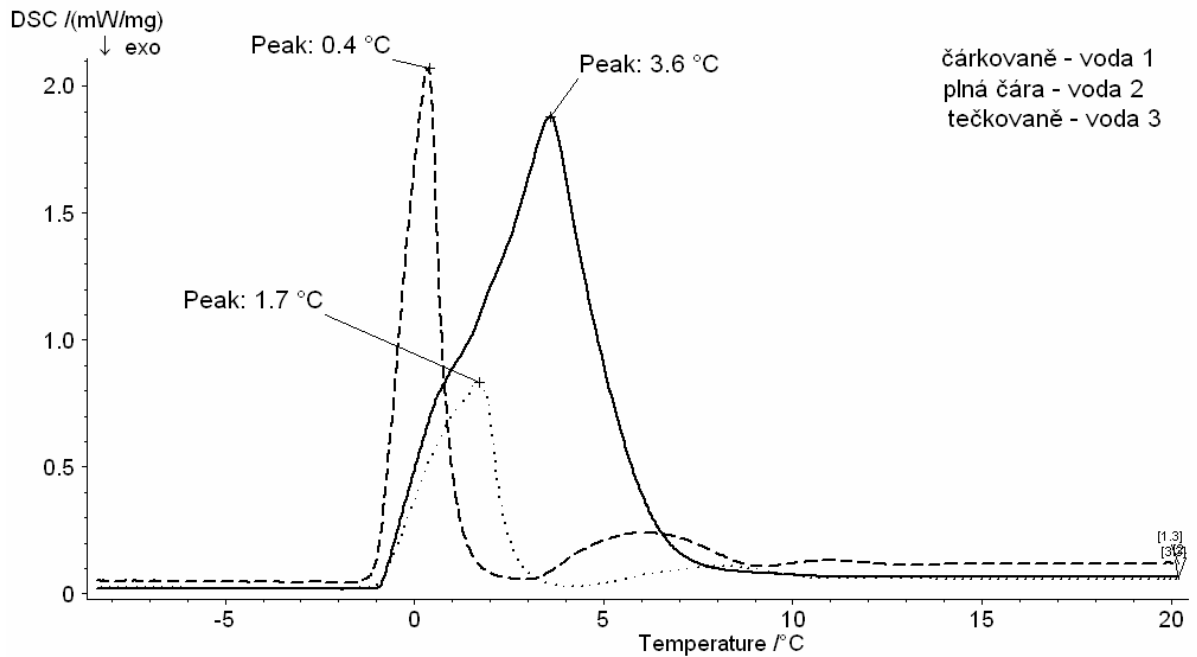


Porovnání ohřevu vzorků v závislosti na množství vody

GRAF č. 23

voda 1 – 4,98 mg
voda 2 – 12,87 mg
voda 3 – 20,15 mg

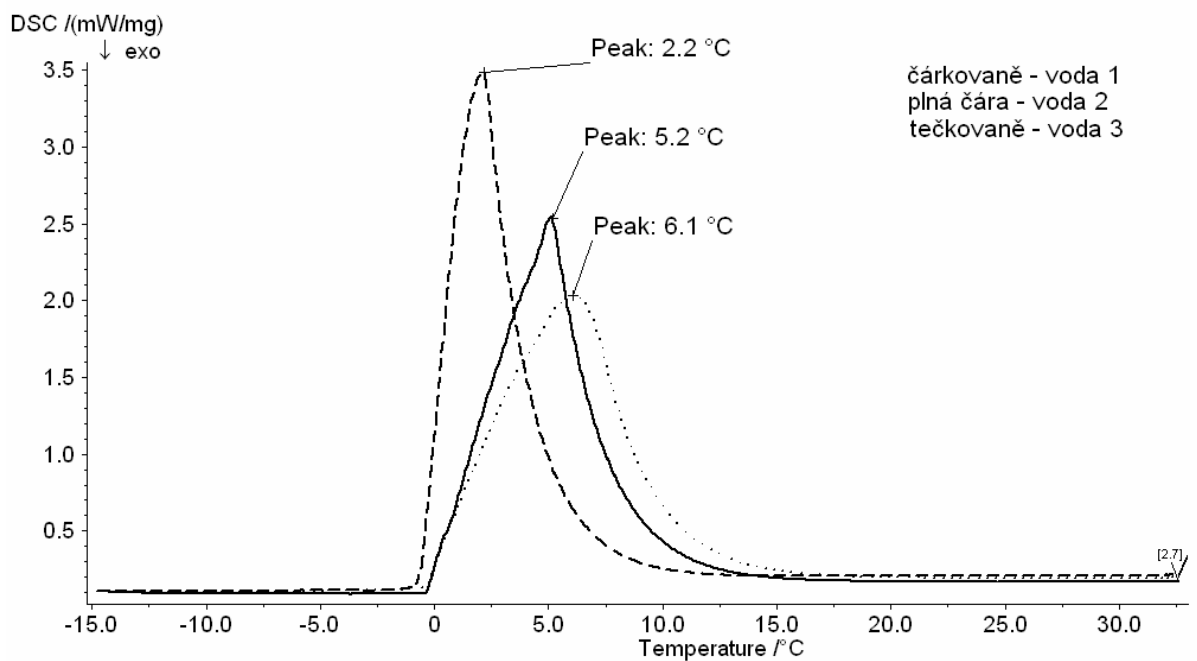
rychlost ohřevu 1 °C/min.



GRAF č. 24

voda 1 – 4,98 mg
voda 2 – 12,87 mg
voda 3 – 20,15 mg

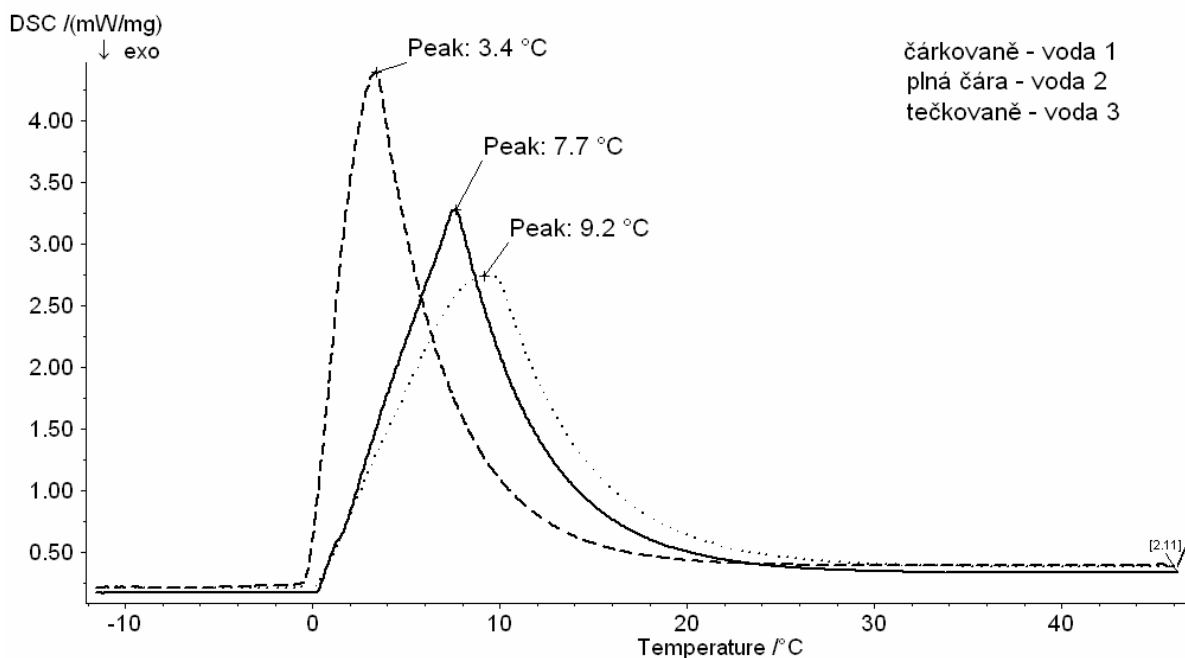
rychlost ohřevu 2,5 °C/min.



GRAF č. 25

voda 1 – 4,98 mg
voda 2 – 12,87 mg
voda 3 – 20,15 mg

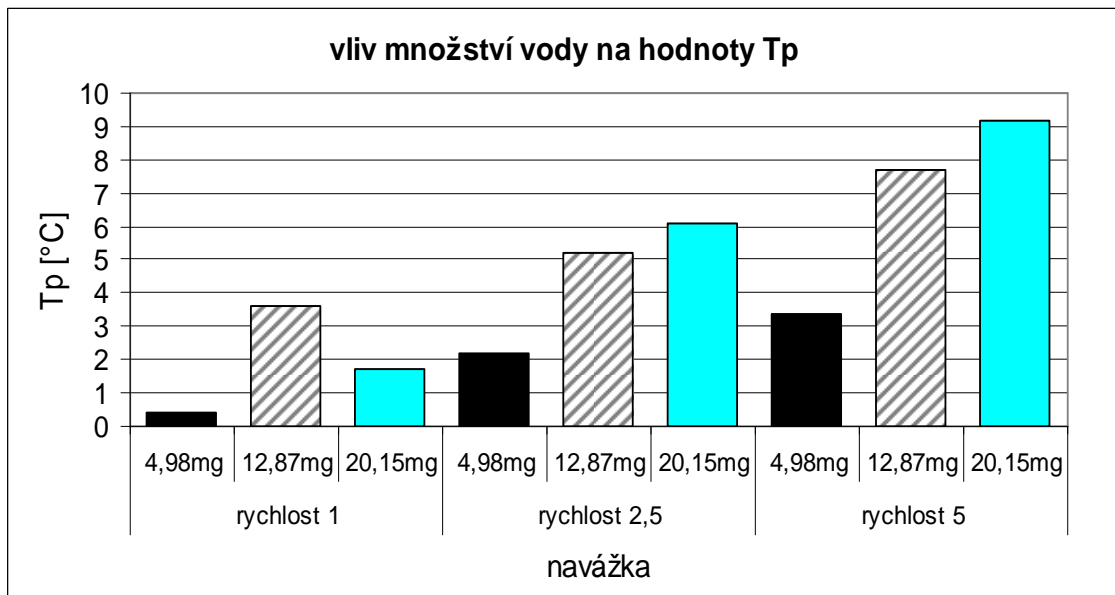
rychlost ohřevu 5°C/min.



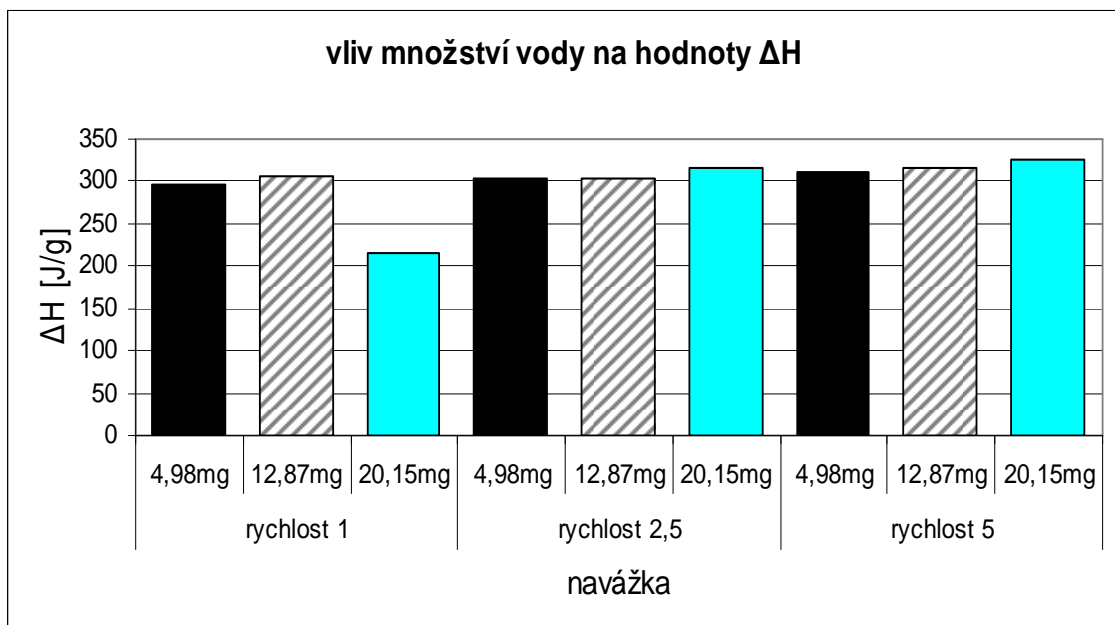
TABULKA č. 3 – Kalorimetrická charakteristika vody

rychlost ohřevu [°C/min]	Navážka vody	To [°C]	Tp [°C]	Tpk [°C]	ΔH [J/g]
Rychlost 1	4,98 mg	-0,9	0,4	2,8	296,9
	12,87 mg	-0,2	3,6	10,4	307,1
	20,15 mg	-0,9	1,7	4,5	214,3
Rychlost 2,5	4,98 mg	-0,6	2,2	15,7	303,6
	12,87 mg	-0,3	5,2	16,6	304,7
	20,15 mg	-0,4	6,1	19,8	315,6
Rychlost 5	4,98 mg	-0,1	3,4	27,1	309,7
	12,87 mg	0,5	7,7	29,3	316,2
	20,15 mg	0,4	9,2	31,9	325,7

GRAF č. 26 – Vliv množství vody na hodnoty T_p



GRAF č. 27 – Vliv množství vody na hodnoty ΔH



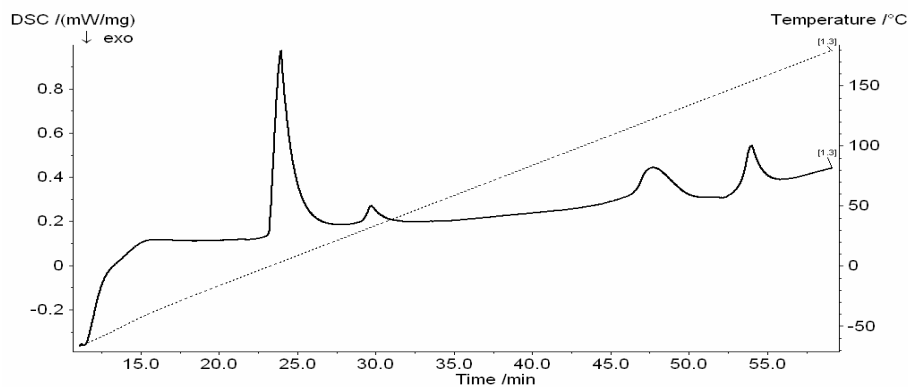
4.4.3. Úkol č. 3

DSC záznamy ohřevů binárních směsí cholesterolu a vody

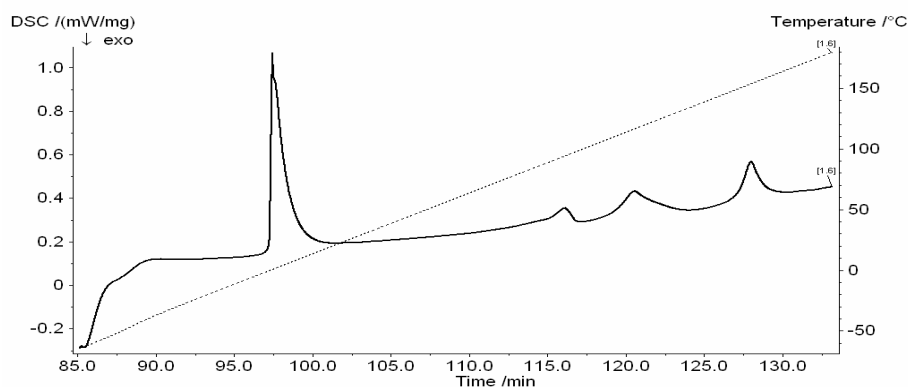
GRAF č. 28

Vzorek : A - 81,5% cholesterolu + 18,5% vody
(cholesterol 3,554mg + 0,886mg vody)

A) první ohřev



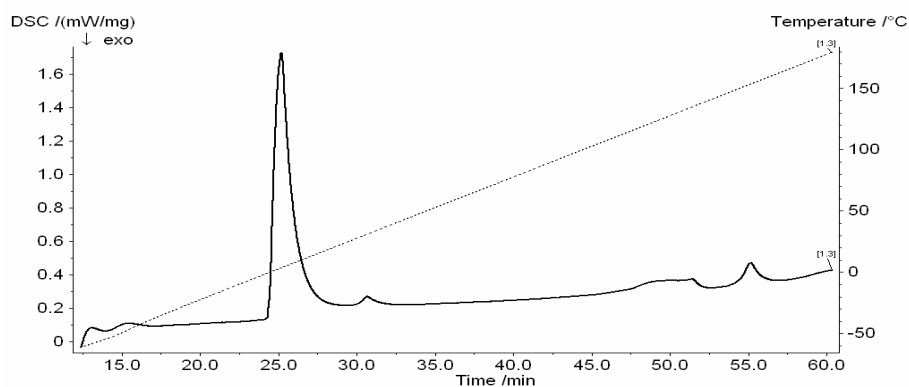
B) druhý ohřev



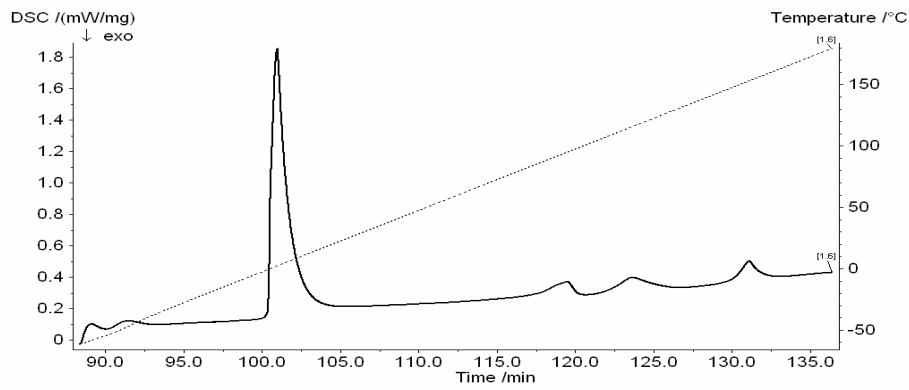
GRAF č. 29

Vzorek : B - 61,4% cholesterolu + 38,6% vody
(cholesterol 3,210mg + 2,018mg vody)

A) první ohřev



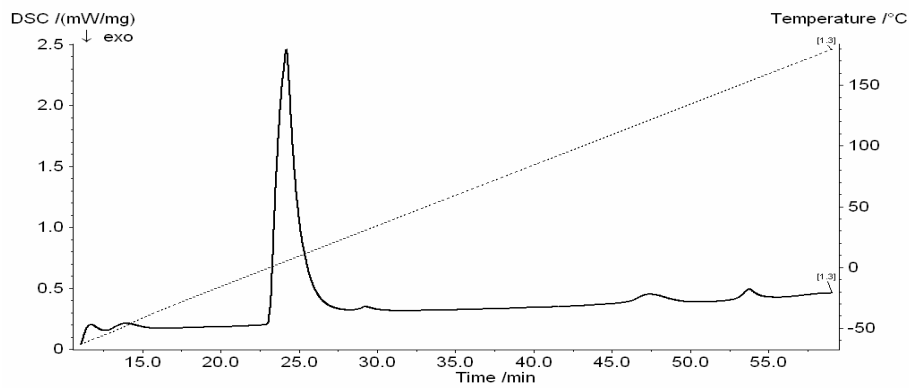
B) druhý ohřev



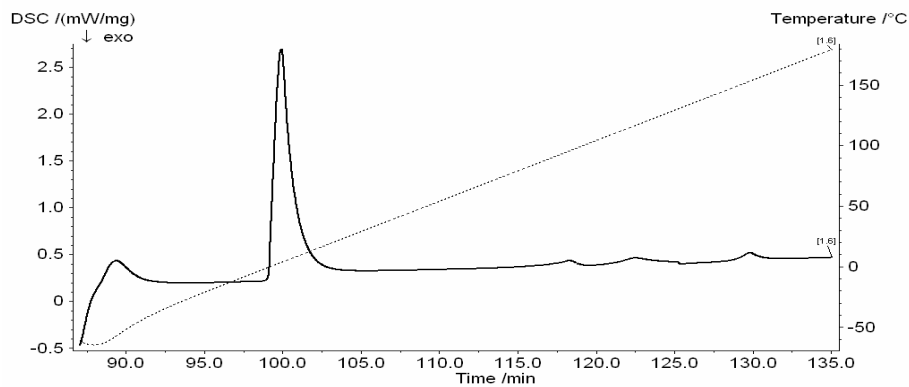
GRAF č. 30

Vzorek : C - 39,9% cholesterolu + 60,1% vody
(cholesterol 3,065mg + 4,598mg vody)

A) první ohřev



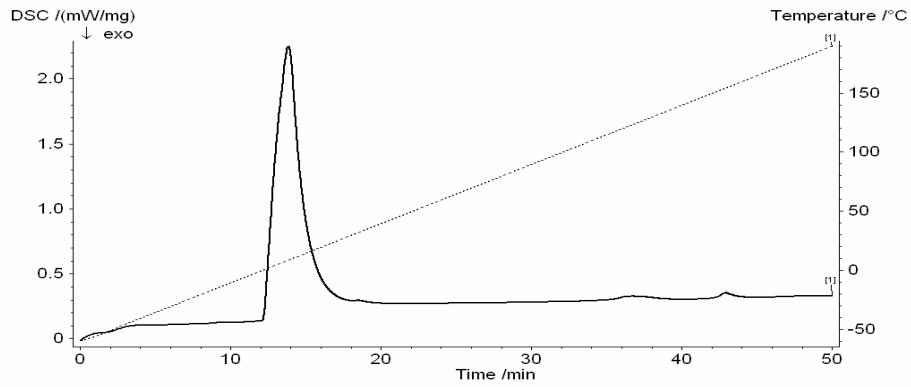
B) druhý ohřev



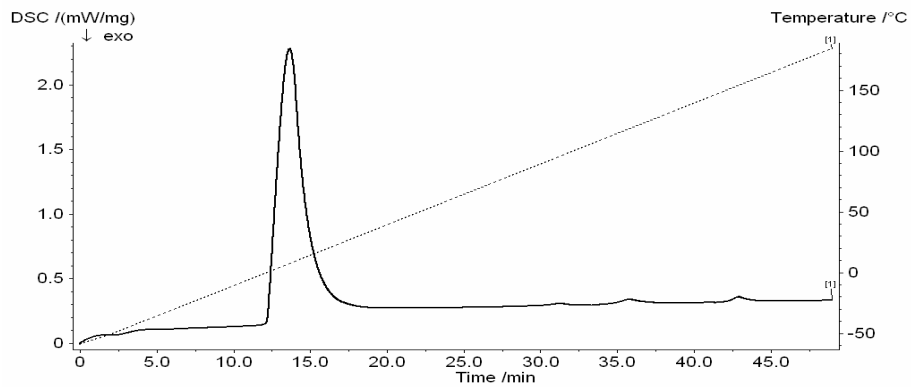
GRAF č. 31

Vzorek : D - 20,2% cholesterolu + 79,8% vody
(cholesterol 3,442mg + 13,768mg vody)

A) první ohřev



B) druhý ohřev

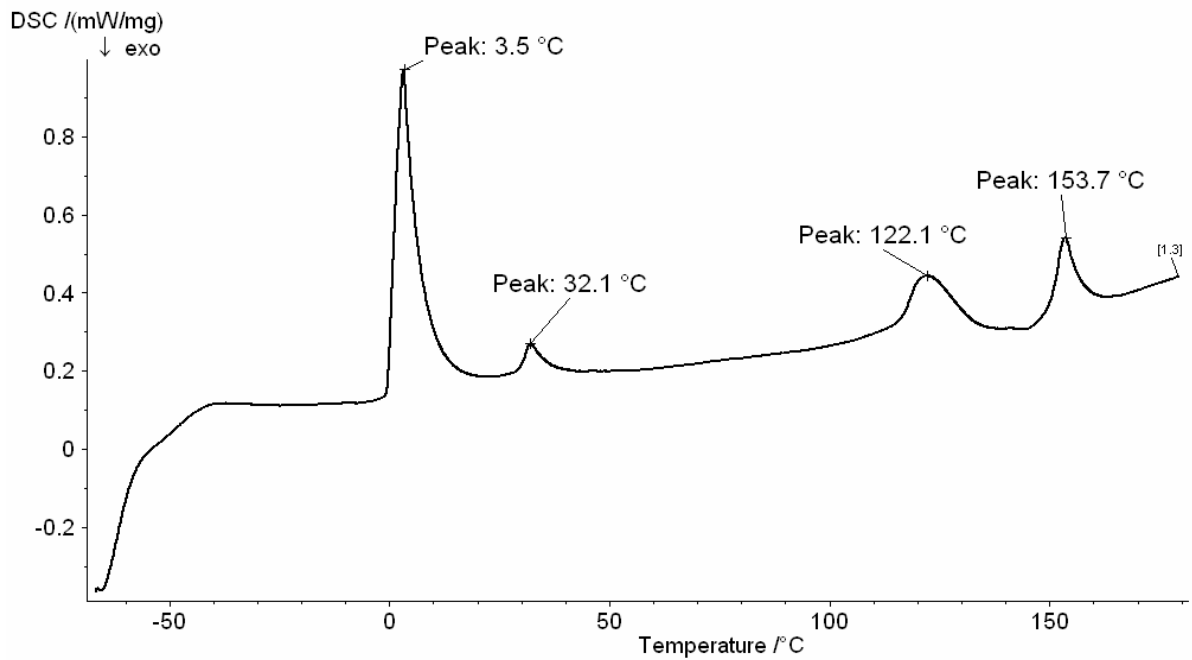


Záznamy měření ohřevu binárních směsí cholesterolu a vody

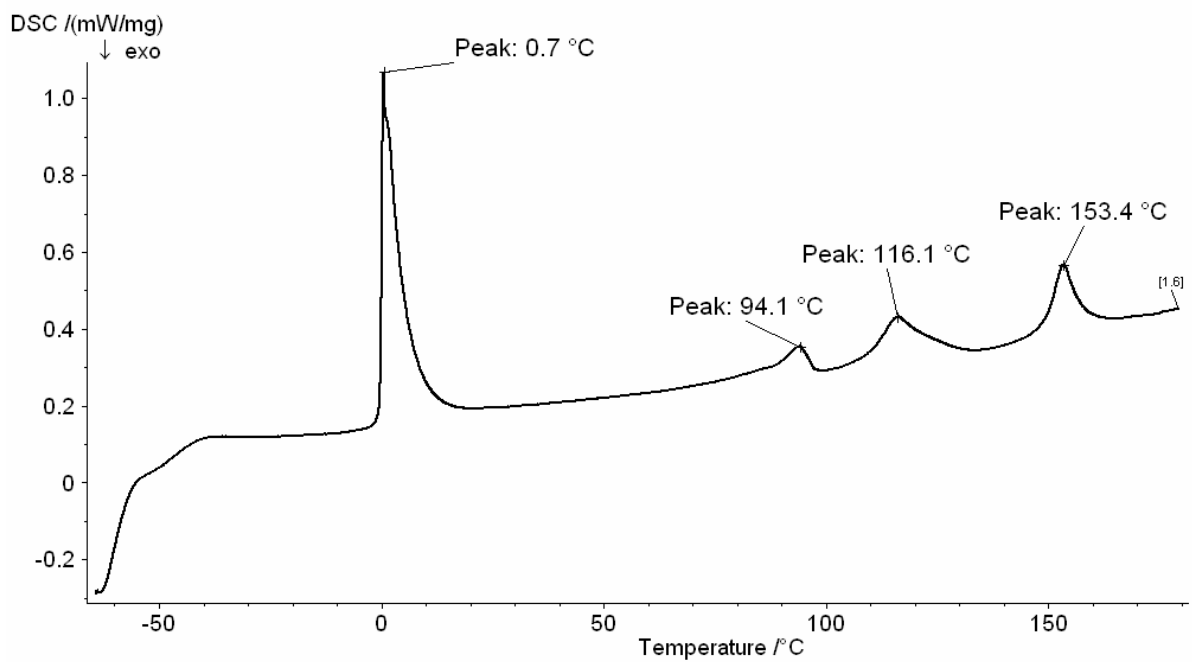
GRAF č. 32

Vzorek : A - 81,5% cholesterolu + 18,5% vody

A) první ohřev



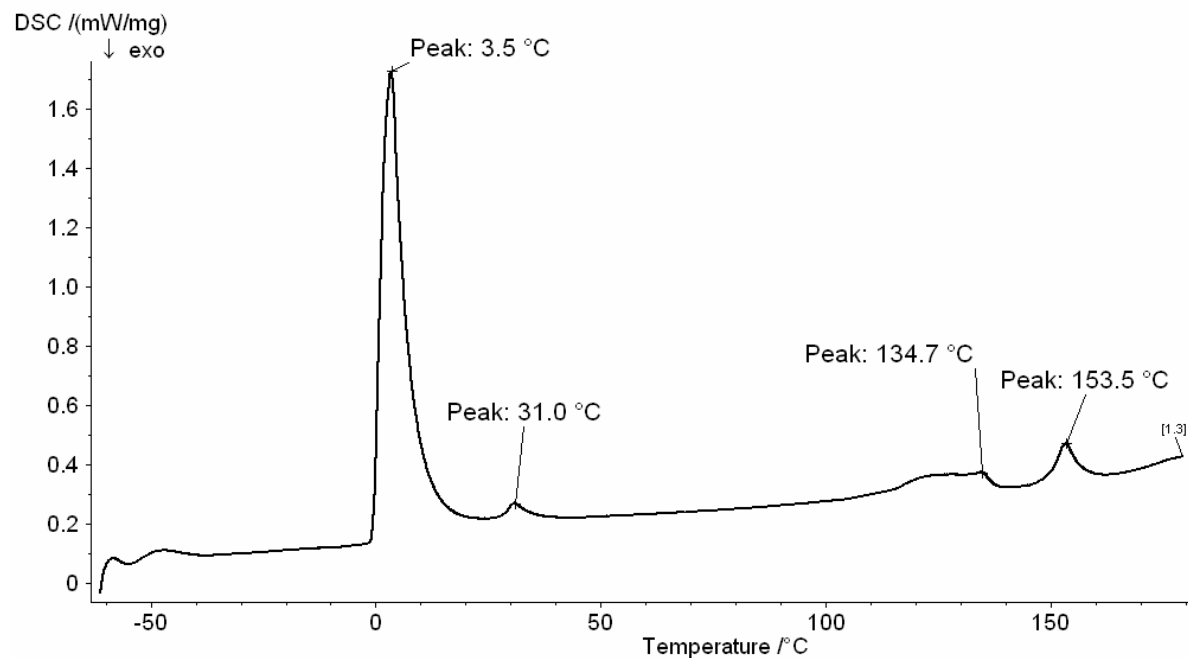
B) druhý ohřev



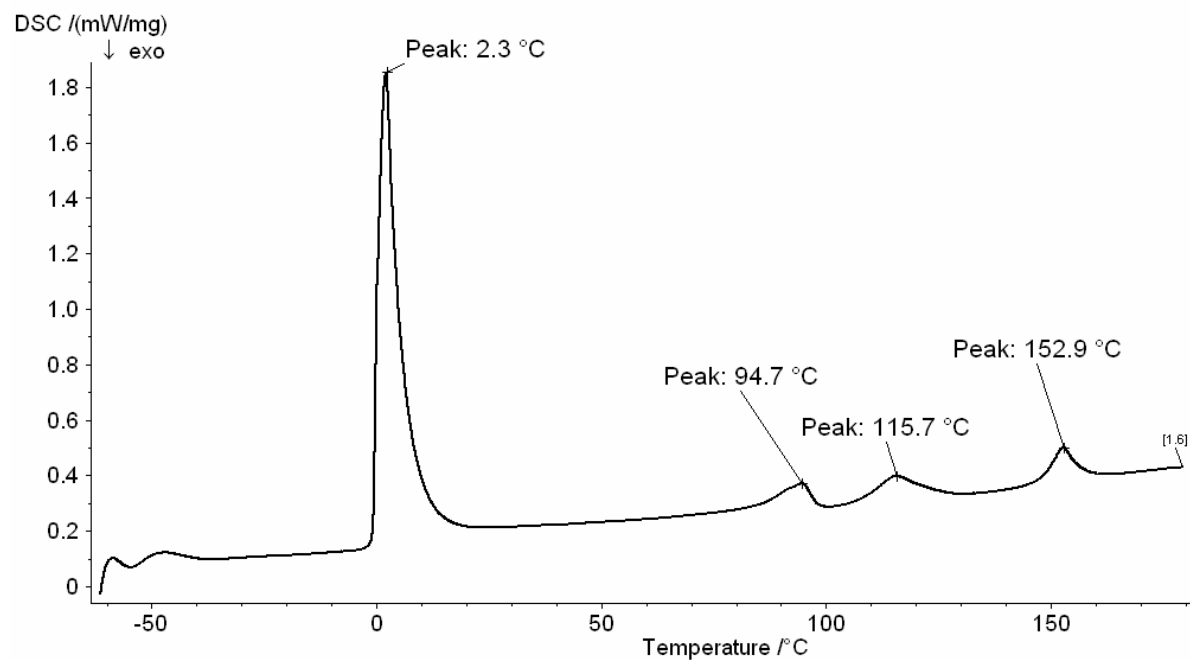
GRAF č. 33

Vzorek : B - 61,4% cholesterolu + 38,6% vody

A) první ohřev



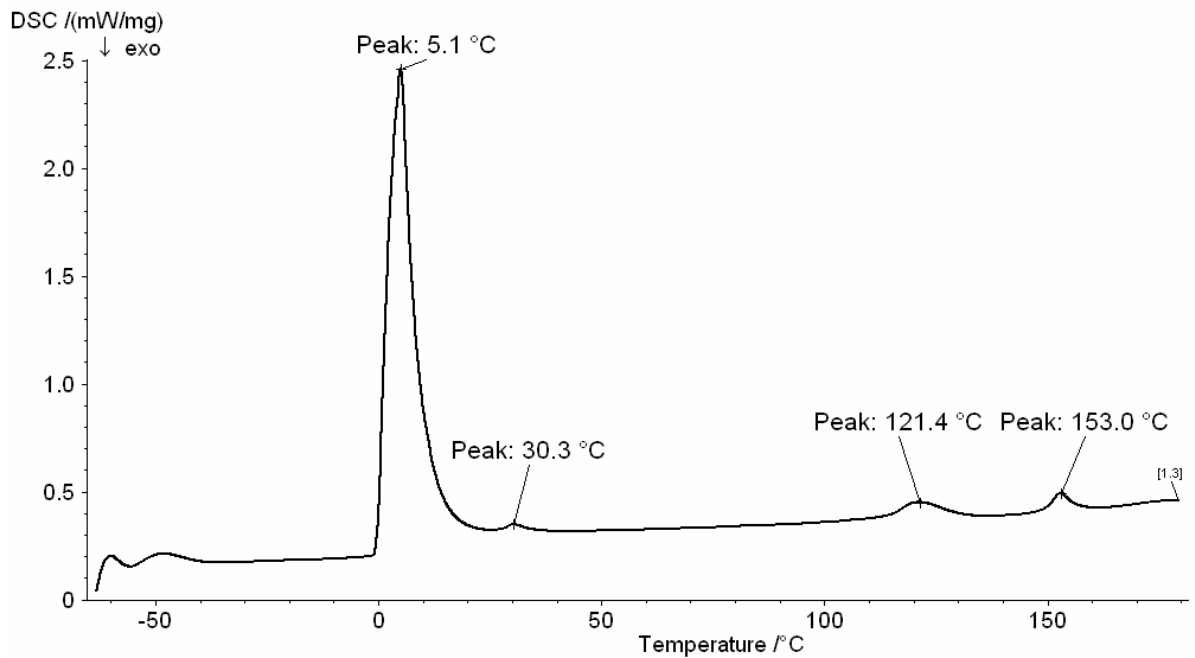
B) druhý ohřev



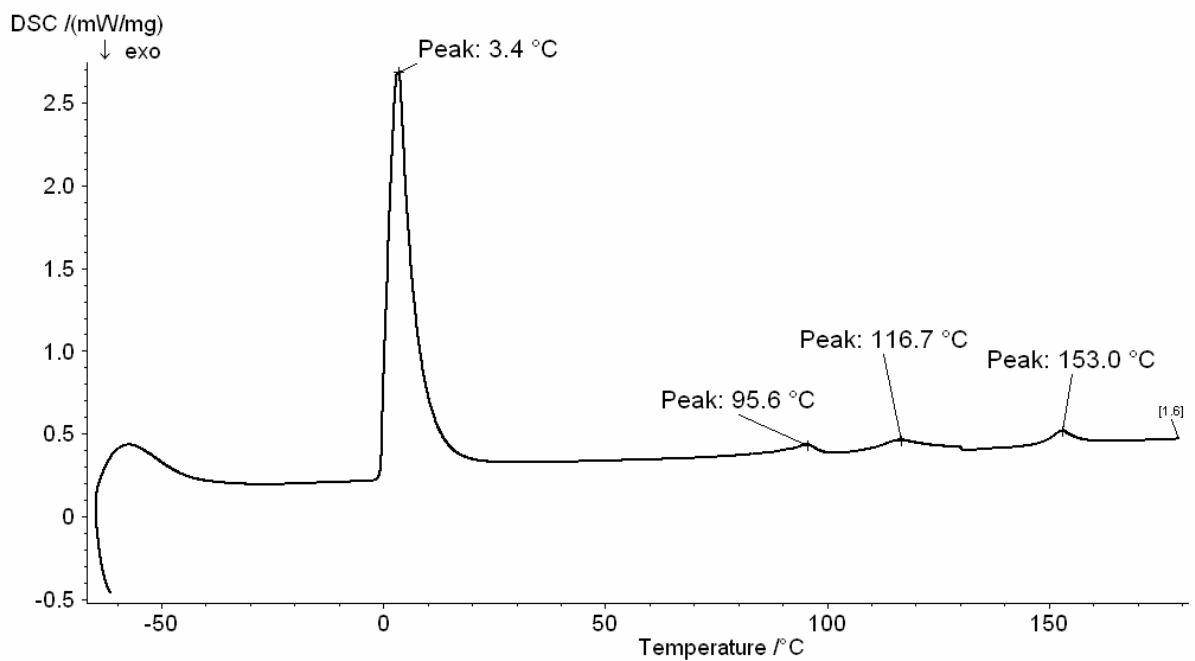
GRAF č. 34

Vzorek : C - 39,9% cholesterolu + 60,1% vody

A) první ohřev



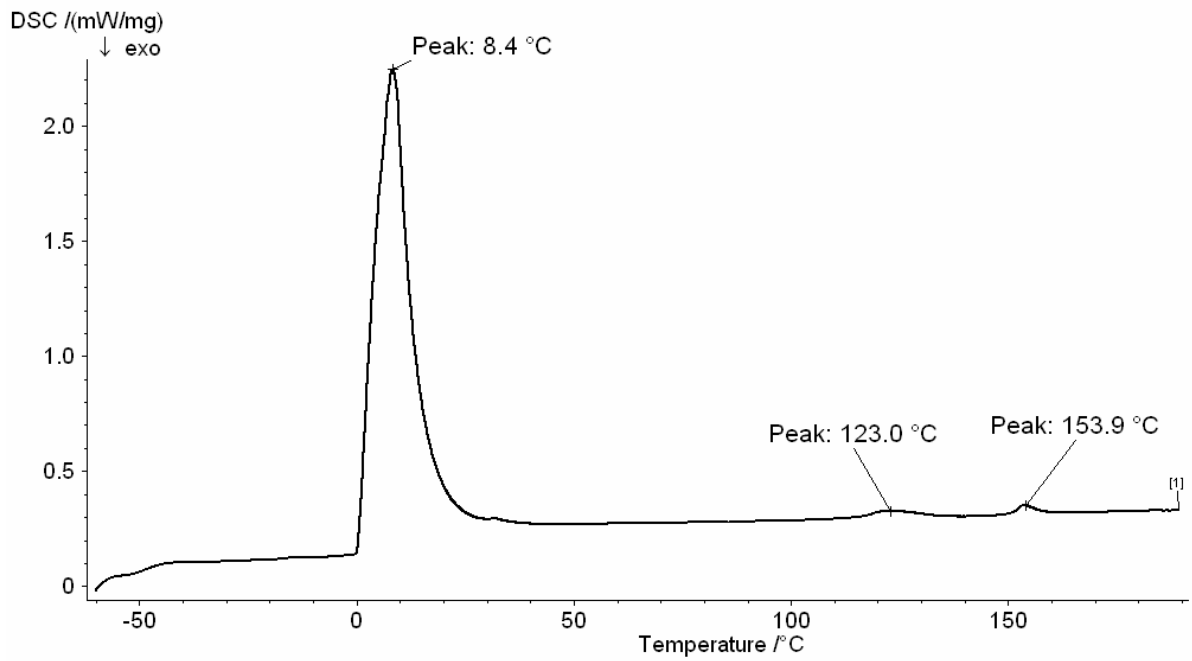
B) druhý ohřev



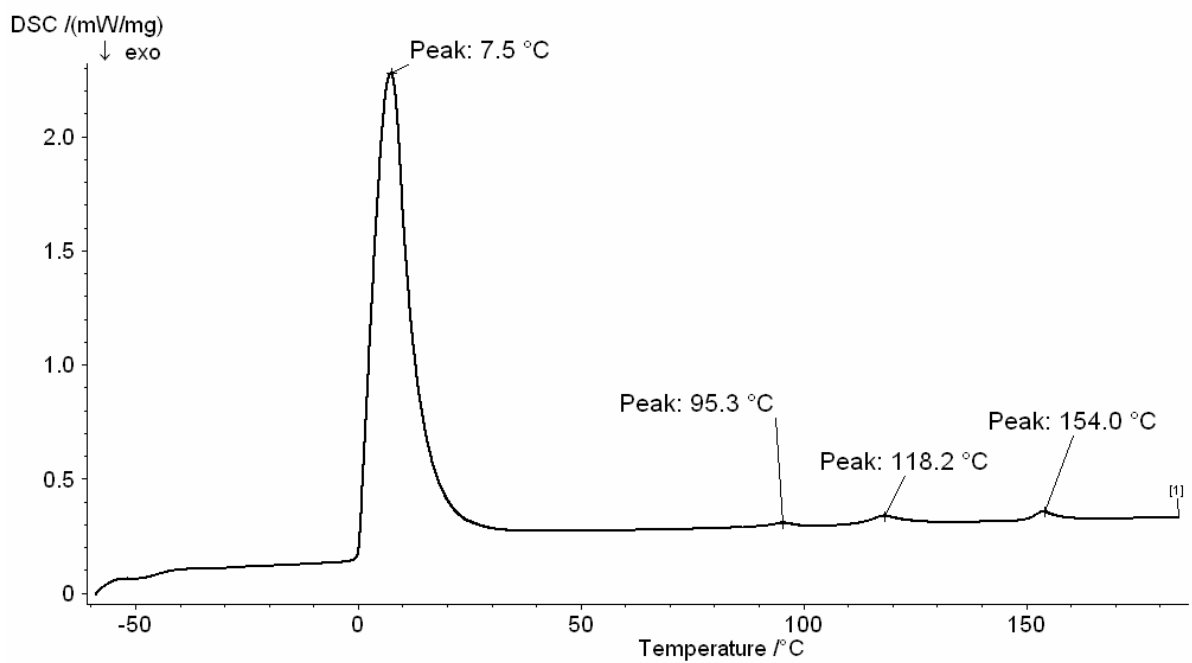
GRAF č. 35

Vzorek : D - 20,2% cholesterolu + 79,8% vody

A) první ohřev



B) druhý ohřev



TABULKA č. 4 – Kalorimetrická charakteristika – lipidická fáze

A) Porovnání hodnot T_p

Vzorek		T_{p1} [°C]	T_{p2} [°C]	T_{p3} [°C]
A 18,5% vody	1. ohřev	*	122,1	153,7
	2. ohřev	94,1	116,1	153,4
B 38,6% vody	1. ohřev	*	134,7	153,5
	2. ohřev	94,7	115,7	152,9
C 60,1% vody	1. ohřev	*	121,4	153,0
	2. ohřev	95,6	116,7	153,0
D 79,8% vody	1. ohřev	*	123,0	153,9
	2. ohřev	95,3	118,2	154,0

B) Porovnání hodnot ΔH u prvního ohřevu

Vzorek	ΔH_2 [J/g]	hodnota ~ navážce cholesterolu [J/g]	ΔH_3 [J/g]	hodnota ~ navážce cholesterolu [J/g]
A	24,4	30,5	14,5	18,1
B	15,3	25,6	8,5	14,1
C	10,3	25,8	5,6	14,0
D	5,3	26,5	3,0	15,0

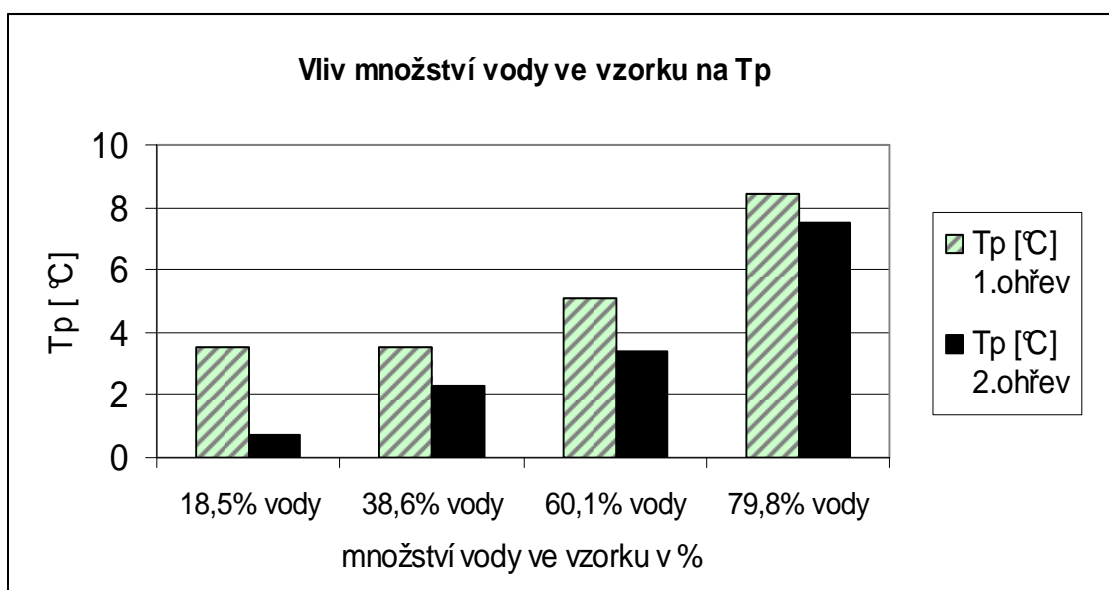
C) Porovnání hodnot ΔH u druhého ohřevu

Vzorek	ΔH_1 [J/g]	hodnota ~ navážce cholesterolu [J/g]	ΔH_2 [J/g]	hodnota ~ navážce cholesterolu [J/g]	ΔH_3 [J/g]	hodnota ~ navážce cholesterolu [J/g]
A	6,5	8,0	16,6	20,9	15,3	19,1
B	9,8	16,3	12,7	21,2	10,5	17,6
C	6,2	15,6	11,8	29,4	6,5	16,3
D	1,4	6,5	4,3	21,2	3,0	15,3

TABULKA č. 5 – Kalorimetrická charakteristika – vodná fáze

Vzorek		To [°C]	Tp [°C]	Tpk [°C]	ΔH [J/g]	hodnota ~ navážce vody [J/g]
A 18,5%vody	1. ohřev	-0,1	3,5	20,4	59,1	296,2
	2. ohřev	-0,1	0,7	20,2	51,3	257,2
B 38,6%vody	1. ohřev	-0,2	3,5	20,6	120,1	318,4
	2. ohřev	-0,5	2,3	21,4	114,6	303,8
C 60,1%vody	1. ohřev	-0,1	5,1	23,6	189,0	315,0
	2. ohřev	-0,4	3,4	23,8	187,0	311,7
D 79,8%vody	1. ohřev	0,6	8,4	30,5	246,3	307,9
	2. ohřev	0,4	7,5	32,1	242,2	302,8

GRAF č. 36 – Vliv množství vody ve vzorku na Tp

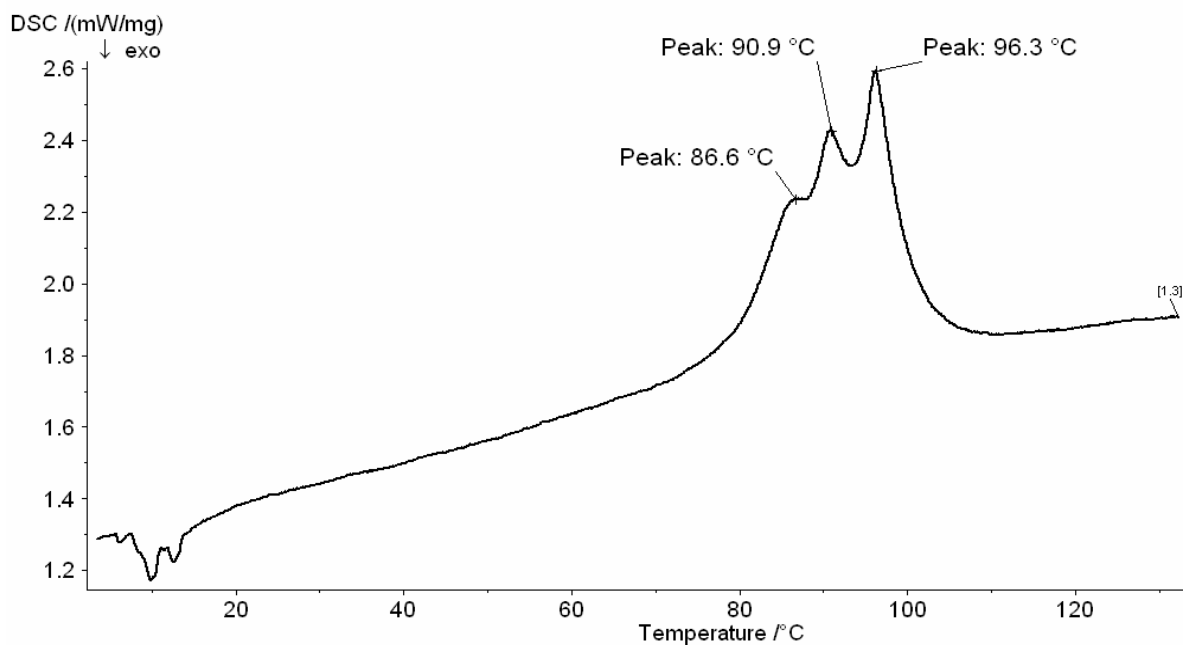


4.4.4. Úkol č. 4

GRAF č. 37 - záznam ohřevu pseudoceramidu

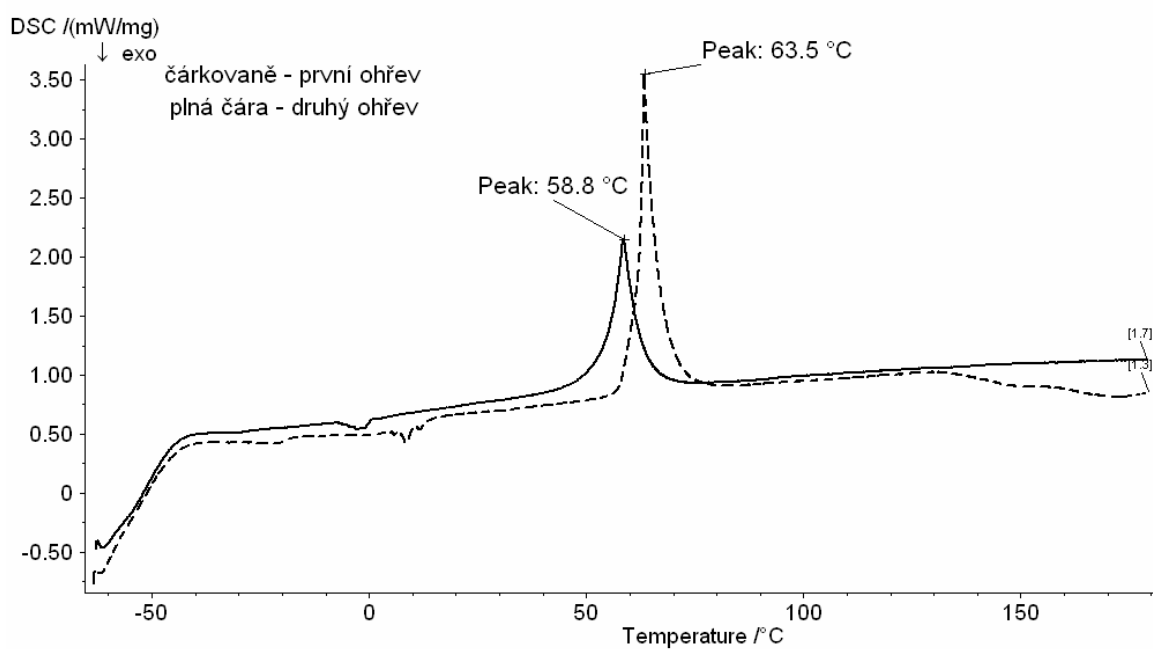
Vzorek : pseudoceramid 14S24

Navážka : 0,86 mg



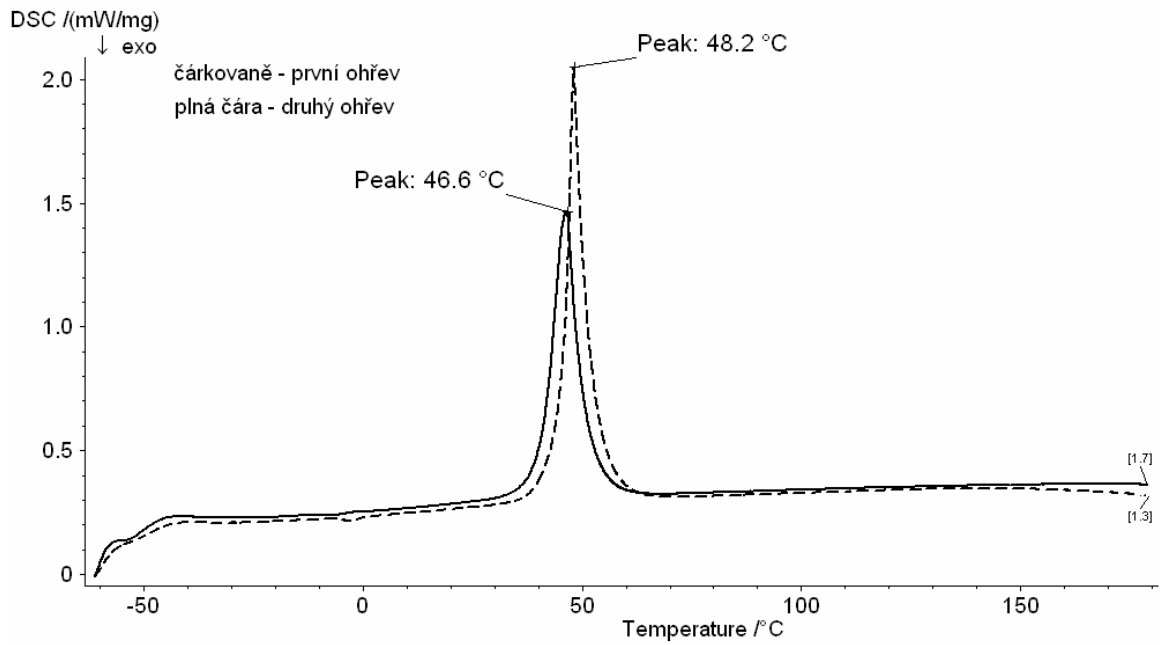
GRAF č. 38 – DODH5-10 – srovnání prvního a druhého ohřevu

Navážka : 0,94 mg



GRAF č. 39 – ETH5-10 – srovnání prvního a druhého ohřevu

Navážka : 5,59 mg



5. Diskuze

Diskuze k pracovnímu úkolu č.1

Použili jsme celkem 5 vzorků cholesterolu, hmotnosti navážek jednotlivých vzorků od 2,8 do 3,5 mg. U všech vzorků jsme provedli první ohřev a bezprostředně po chlazení druhý ohřev. Záznamy měření jsou uvedeny na grafech č. 1 – 5.

Porovnání prvních a druhých ohřevů je pro jednotlivé vzorky uvedeno na grafech č. 6 – 10.

Na všech záznamech je vidět, že hodnoty T_p druhých ohřevů jsou nepatrně nižší, rozdíl se pohybuje v rozmezí 2,5 – 3°C. Zároveň na všech grafech je vidět mírně rozdílný průběh ohřevu.

U všech prvních ohřevů pozorujeme po ukončení tání mírnou exotermickou reakci vzorku. Dále můžeme konstatovat, že pík tání cholesterolu při prvních ohřevech je užší zatímco u druhých ohřevů je pík širší a cholesterol taje v širším rozmezí teplot.

Celkově ovšem můžeme konstatovat, že není zásadní rozdíl mezi prvním a druhým ohřevem, tedy nejedná se o pomalu krystalizující tuk, kdy musíme pro hodnocení přesně dodržet podmínky včetně doby skladování.

Pro hodnocení se nám jeví vhodnější použít druhý ohřev, protože vzhledem k neexistenci exotermického záznamu po skončení tání, se dá přesněji určit hodnota ΔH .

Kalorimetrické charakteristiky jsou uvedeny v tabulce č.1. Vlivy navážky vzorku na hodnoty T_p a ΔH jsou uvedeny na grafech č. 11a), 11b) a 12a), 12b). Vlivy prvního a druhého ohřevu na hodnoty T_o , T_p a ΔH jsou potom dále prezentovány na grafech č. 13a), 13b), 13c).

Diskuze k pracovnímu úkolu č.2

Protože příprava lipidické membrány předpokládá přítomnost vyššího obsahu vody ve vzorcích, zaměřili jsme se proto na problematiku stanovení vody. Nejedná se pouze o vliv vody na lipidické součásti, ale musíme předpokládat, že část vody ve vzorku bude vždy v nadbytku a toto se nám projeví na záznamu DSC. Zároveň ovšem na tomto záznamu budeme mít i záznam mrznoucí interlamelární vody a může proto docházet k překrývání píku.

Při analýze může velkou roli hrát množství navážky vody a eventuálně i rychlost ohřevu vzorku. Z tohoto důvodu jsme zvolili tři základní značně rozdílné navážky vody a tři rychlosti ohřevu.

Vliv rychlosti ohřevu

Na grafech č. 14, 15, 16 je uveden záznam měření ohřevů vzorků různé hmotnosti s rychlostí ohřevu 1°C/min. U všech těchto vzorků je vidět, že v teplotní oblasti mírně nad 0°C není vzestup teploty lineární. Toto potom způsobuje na křivce DSC další dodatečný pík, který ovšem nepředstavuje tání. Pro ověření příčiny tohoto skoku na teplotní křivce jsme provedli měření pouze s prázdnými měřicími nádobkami bez jakéhokoliv vzorku. I v tomto případě na záznamu DSC byl viditelný skok na teplotní křivce v oblasti mírně nad 0°C. Příčinou tedy není vzorek samotný, ale podmínky měření.

Měřili jsme od teploty – 60°C a poněvadž u vzorku obsahující cholesterol musíme předpokládat měření minimálně do 160°C, z finančních důvodů předpokládáme ohřev vzorku bez současného chlazení. Jak vyplývá z námi uvedeného výše popsaného experimentu, nebude moci být použita rychlost ohřevu 1°C/min., protože v tomto případě nám takto pomalý ohřev, bez současného chlazení, nezajistí v kritické oblasti sledování tání píku vody rovnoměrný vzestup teploty tání.

Na grafu č. 17 jsme provedli opakovaně měření tání vody rozdílnými rychlostmi ohřevů. Z tohoto záznamu je vidět, že stejný skok na křivce označující teplotu, je i u ohřevu rychlostí 2°C/min. Teprve rychlost ohřevu 5°C/min. poskytuje plynulý teplotní vzestup. Z tohoto důvodu konstatujeme, že pouze rychlost ohřevu 5°C/min. lze použít pro měření bez současného chlazení vzorků hluboce zmrazených.

Na grafech č. 18, 19, 20 je uvedeno porovnání ohřevu vzorku v závislosti na rychlosti ohřevu. Z uvedených porovnání vyplývá, že počáteční teplota tání vzorku nezáleží na rychlosti ohřevu vzorku. Rychlost ohřevu má ale vliv na hodnoty T_p a zřetelně i na hodnoty konce teplotního efektu. U nízké rychlosti ohřevu 1°C/min. nám proces tání končí při teplotě do 10°C, při rychlosti 2,5 °C/min. se dostáváme již nad hodnotu 10°C a při rychlosti ohřevu 5°C/min. proces tání končí až v hodnotách nad 20°C. Toto je nutné vzít v úvahu v případě, že budeme hodnotit vzorky, které budou obsahovat další komponenty s teplotou tání zhruba do 20°C.

Kalorimetrické hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 2 , grafické znázornění vlivu rychlosti ohřevu na hodnoty T_p a ΔH v grafech č. 21, 22. Na hodnoty ΔH nemá rychlost ohřevu žádný vliv.

Vliv množství vody

Na grafech č. 23, 24, 25 je uvedeno porovnání ohřevu vzorku v závislosti na množství navážené vody ve vzorku. V grafu č. 23 byly jednotlivé vzorky měřeny rychlostí $1^\circ\text{C}/\text{min.}$, graf č. 24 znázorňuje rychlost $2,5^\circ\text{C}/\text{min.}$ a graf č. 25 rychlost $5^\circ\text{C}/\text{min.}$

Z uvedených porovnání vyplývá, že množství vody ve vzorku nemá výraznější vliv na počáteční hodnotu teploty tání. Množství vody má ale vliv na hodnoty T_p a na teplotu konce procesu tání. U nejnižší navážky vzorku (4,98mg) nám proces tání končí při teplotě okolo 10°C , při vyšší navážce (12,87mg) se dostáváme již nad 10°C a u navážky nejvyšší (20,15mg) proces tání končí v hodnotách nad 15°C .

Hodnoty ΔH se zásadněji nemění.

Kalorimetrické hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 3, grafické znázornění vlivu navážky na hodnoty T_p a ΔH v grafech č. 26, 27.

Diskuze k pracovnímu úkolu č.3

Záznamy DSC daných měření jsou uvedeny na grafech č. 28a), 28b), 29a), 29b), 30a), 30b), 31a) a 31b).

Proměřili jsme čtyři vzorky lišící se obsahem vody. Konkrétní množství vody ve vzorcích bylo 18,5%; 38,6%; 60,1%; 79,8% vody. Na záznamech jsou zřetelně oddělené píky vody a píky týkající se cholesterolu.

Pro přehlednější porovnání uvádíme na grafech zvlášť první a druhé ohřevy. Tyto ohřevy jsou prezentovány na grafech č. 32a), 32b), 33a), 33b), 34a), 34b) a 35a), 35b). Ve všech případech, tedy ve třech vzorcích lišících se koncentrací vody, vidíme při prvním ohřevu pík vody, dále následuje menší pík tání cholesterolu teplotách kolem $32,1^\circ\text{C}$ a další dva píky v teplotách kolem 120°C a 150°C . Pík při teplotě $32,1^\circ\text{C}$ je typický pro první ohřev a při dalších ohřevech se již neobjevuje. Pík při teplotě 122°C představuje přechod bezvodého cholesterolu v přítomnosti nadbytku vody na fázi

kapalných krystalů ve smektickém stavu. Pík s hodnotou T_p kolem 150°C představuje tání cholesterolu a přechod do kapalné fáze. Při tomto prvním ohřevu pracujeme s ještě nehydratovaným vzorkem, protože měření probíhá bezprostředně po navážení vody a vzorek neměl čas se nahydratovat. U druhého ohřevu vidíme tři píky. Pozice těchto píků odpovídá přítomnosti hydratovaného cholesterolu. První v oblasti s hodnotou T_p 94°C , který představuje ztrátu vody vzniklého cholesterolu monohydrátu a přechod na bezvodý polymorfní cholesterol. Druhý pík s hodnotou kolem 116°C prezentuje další fázový přechod. Rentgenovou difrakcí bylo zjištěno, že při této teplotě krystalická fáze přechází do kapalné krystalické fáze.¹⁶ Tato potom při teplotě kolem 155°C přechází do stavu kapaliny.

Souhrnné kalorimetrické hodnoty jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tabulce č. 4a), 4b), 4c).

Poněvadž hodnocení píku podle softwaru dodaného k měřicímu zařízení vyhodnocuje hodnoty ΔH v závislosti na vložené navážce vzorku, uvádíme v těchto tabulkách ještě hodnoty ΔH , které jsme přepočítali na navážku lipidové složky ve vzorku.

Při hodnocení těchto hodnot vidíme, že hodnoty ΔH posledního píku, tedy píku znázorňující přechod do kapalné fáze je zhruba ve všech vzorcích stejný a je prezentován hodnotou zhruba kolem 15 J/g lipidické fáze. Porovnáme-li tuto hodnotu s hodnotami ΔH čistého cholesterolu, který má hodnotu ΔH kolem 60 J/g , vidíme tady značný rozdíl, který je vysvětlitelný tím, že u hydratovaného vzorku nedochází k fázové přeměně krystalického cholesterolu na kapalinu, ale k fázovému přechodu ze smektické fáze na kapalnou. Fázový přechod prezentující vznik smektické fáze vyžaduje dodání tepla zhruba kolem 25 J/g lipidické fáze. V tabulce č. 4c) jsou uvedeny ΔH hodnoty příslušející prvnímu píku u druhých ohřevů - prezentuje přechod cholesterolu monohydrátu na bezvodou formu. Mezi jednotlivými vzorky lišícími se obsahem vody jsou až dvojnásobné rozdíly v hodnotách ΔH , bohužel nenacházíme žádnou závislost. Pro závěry by bylo potřeba více opakovaných měření.

Diskuze k pracovnímu úkolu č.4

Jako poslední pracovní úkol jsme provedli základní kalorimetrické měření tří látek syntetizovaných na katedře anorganické a organické chemie, které by mohly být

potenciálně použity v in-vitro připravených lipidických membránách. Na grafu č. 37 je uveden záznam měření pseudoceramidu 14S24. Tato látka taje v poměrně širokém teplotním rozmezí, zhruba od 73°C do 116°C. Při interakci s vodou nebude docházet k překrývání píku a lze očekávat snížení hodnot T_p této látky. Chemické složení dává předpoklad hydratace.

Další dvě látky jsou potenciálně použitelné jako modulátory transdermálního průniku. Záznam průběhu ohřevu látky s označením DODH5-10 je na grafu č. 38. Na tomto grafu je uvedeno srovnání prvního a druhého ohřevu, v obou případech v oblasti kolem 0°C je vidět sice malý ale zřetelný exotermní pík, který může svědčit o krystalizaci nějakého podílu. Hlavní mohutný pík tání této látky je v oblasti kolem 60°C, přičemž je mezi prvním a druhým ohřevem rozdíl v hodnotách T_p zhruba 5°C. Teplotní interval druhého ohřevu je vyšší než při prvním ohřevu. Pokud budou látky reagovat s vodou, nedojde k překrytí píku tání vody hydratované ani nehydratované látky.

Záznam průběhu ohřevu látky ETH5-10 je uveden na grafu č. 39. Hodnota T_p je kolem 48°C, rozdíl mezi prvním a druhým ohřevem je menší než 2°C. Teplotní interval prvního a druhého ohřevu je zhruba stejný. Při interakci s vodou by při vyšší rychlosti ohřevu vzorků mohlo dojít k obtížně rozlišitelnému rozmezí mezi koncem tání vody a začátkem hydratace vzorku.

6. Závěr

1. Druhý ohřev cholesterolu vykazuje mírně nižší kalorimetrické hodnoty. Přesněji se stanovuje ΔH cholesterolu u druhého ohřevu.
2. Při DSC měření hluboce zmrazených vzorků nelze provádět ohřev při rychlosti $1^\circ\text{C}/\text{min}$. a $2,5^\circ\text{C}/\text{min}$. bez současného chlazení (při měření hluboce zmrazených vzorků je nutné při těchto rychlostech ohřevu chladit vzorky i při ohřevu)
3. Rychlost ohřevu nemá vliv na počáteční hodnotu tání vody, výrazně ale ovlivňuje hodnoty T_p a teplotu konce procesu tání. Na hodnoty ΔH rychlost ohřevu vliv nemá. Množství vody nemá výraznější vliv na počáteční hodnotu teploty tání, má ale vliv na hodnoty T_p a na hodnoty konce teplotního efektu. Hodnoty ΔH se výrazněji nemění.
4. Cholesterol vstupuje do interakce s vodou již v průběhu prvního ohřevu. Při prvním ohřevu se již objevuje pík s hodnotou T_p kolem 120°C prezentující vznik fáze kapalných krystalů. Při druhém ohřevu je na křivce DSC patrný i pík s hodnotou T_p okolo 94°C prezentující existenci cholesterolu monohydrátu. Nebyla prokázána závislost interakce cholesterolu s vodou na množství inkorporované vody.

7. Seznam literatury

1. **Čihák, R.** : Anatomie 3, Grada publishing, Praha, 1997, s. 559–564
2. **Hrabálek, A., Vávrová, K.** : Role ceramidů v kůži. Praktické lékařství, vol. 2, 2006, s. 55–58
3. **Bouwstra, J. A., et al.** : Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. Progress in Lipid Research, vol. 42, 2003, s. 1-36
4. **Chalabala, M., et al.** : Technologie léků. Galén, 1. vydání, Praha, 1997, s. 316-317
5. **Hrabálek, A., Vávrová, K.** : Lze překonat kožní bariéru?. Praktické lékařství, vol.1, 2005, s. 8-11
6. **Kathi C Madison** : Barrier function of the skin : „La Raison d’Être“ of the Epidermis. Journal of Investigative Dermatology, vol. 121, 2003, s. 1-36
7. **Róg, T., et al.** : Ordering effects of cholesterol and its analogues. Biochim. Biophys. Acta, vol. 1788, 2009, s. 97-121
8. **Bloom, M., Evans, E., Mouritsen, O.G.,** : Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes. Q. Rev. Biophys., vol. 24, 1991, s. 293-337
9. **Rapaport, H., et al.** : Cholesterol Monohydrate Nucleation in Ultrathin Films on Water. Biophysical Journal, vol. 81, November 2001, s. 2729-2736
10. **De Kruyff, B., et al.** : The effect of different fatty acid and sterol composition on the erithritol flux through the cell membrane. Biochim. Biophys. Acta, vol. 298, 1973, s. 479-499
11. **Von Dreele, P. H.** : Estimation of lateral species separation from phase transitions in nonideal two-dimensional lipid mixtures. Biochemistry 17, 1978, s. 3939-3943
12. **Parkson Lee-Gau Chong, et al.** : On the lateral structure of model membranes containing cholesterol. Biochim. Biophys. Acta, vol. 1788, 2009, s. 2-11
13. **Parker, A., et al.** : Lateral distribution of cholesterol in dioleoylphosphatidylcholine lipid bilayers. Biophysical Journal, vol. 86, 2004, s. 1532-1544
14. **Brandenburg, K., et al.** : Can calorimetry tell us about changes of three-dimensional aggregate structures of phospholipids and glykolipids?. Thermochemica Acta, vol. 445, 2006, s. 133-143

15. **Gallagher, P. K., Brown, M. E.** : Handbook of Thermal Analysis and Kalorimetry. vol. 1 – Hot Topics in Thermal Analysis and Calorimetry. Kluwer academic Publisher, 2001, s. 255
16. **Loomis, C. R., Shipley, G. G., Small, D. M.** : The phase behavior of hydrated cholesterol. Journal of Lipid Research, vol. 20, 1979, s. 525-535
17. **Craven, B. M., et al.** : Crystal structure of cholesterol monohydrate. Nature, 1976, s. 727-729
18. **Globitza, B., Müller-Goemann, C. C.** : Influence of different ceramides on the structure of in vitro lipid systems of the stratum corneum lipid matrix . Chem. Phys. Lipids, vol. 117, 2002, s. 29-44
19. **Miranda, W. de Jager, et al.** : Novel lipid mixtures based on synthetic ceramides reproduce the unique stratum corneum lipid organisation. Journal of Lipid Research, vol. 45, 2004, s. 923-932
20. **Bouwstra, J. A., et al.** : The role of ceramide composition in the lipid organisation of the skin barrier. Biochim. Biophys. Acta, vol. 1419, 1999, s. 127-136