

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
Katedra farmaceutické technologie

**STUDIUM TERMOTROPNÍHO CHOVÁNÍ**  
**KRÁTKOŘETĚZCOVÝCH ANALOGŮ CERAMIDŮ**

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: Dr. rer. nat. Jarmila Zbytovská  
Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové 2010

Mgr. Helena Vavrysová

Ráda bych poděkovala Dr. rer. nat. Jarmile Zbytovské za odborné vedení, cenné poznatky a připomínky při vypracovávání této rigorózní práce.

# OBSAH

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE.....	6
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	7
2.1. Fyzikálně chemické vlastnosti lipidů- hlavních komponent SC a biologických membrán .....	7
2.1.1. Termotropní chování lipidů a metody je popisující.....	9
2.2. Stratum corneum (SC).....	12
2.3. Ceramidy .....	13
2.3.1. Ceramidy jako permeační urychlovače.....	15
2.3.2. Funkce ceramidů jako druhých posílů při transdukci buněčných signálů .	17
2.3.3. Působení krátko-řetězcových ceramidů na uspořádání lipidových domén	20
2.3.4. Krátko-řetězcové ceramidy a jejich vliv na buněčnou apoptózu.....	21
2.3.5. Využití ceramidů ke studiu biologické aktivity a nádorové terapii .....	22
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	24
3.1. Materiály a měřicí metody .....	24
3.1.1. DSC.....	25
3.1.2. Infračervená spektroskopie .....	25
4. VÝSLEDKY MĚŘENÍ.....	26
4.1. Ceramid C2 .....	26
4.1.1. DSC.....	26
4.1.2. ATR-FTIR spektroskopie .....	26
4.2. Ceramid C4 .....	32
4.2.1. DSC.....	32
4.2.2. ATR-FTIR spektroskopie .....	32
4.3. Ceramid C6 .....	39
4.3.1. DSC.....	39
4.3.2. ATR-FTIR spektroskopie .....	39
4.4. Ceramid C8 .....	45
4.4.1. DSC.....	45
4.4.2. ATR-FTIR spektroskopie .....	45
4.5. Ceramid C12 .....	51
4.5.1. DSC.....	51
4.5.2. ATR-FTIR spektroskopie .....	51
4.6. Ceramid C24 [NS].....	57
4.6.1. DSC.....	57
4.6.2. ATR-FTIR spektroskopie .....	57
5. DISKUZE .....	63
6. ZÁVĚR .....	73
7. POUŽITÁ LITERATURA .....	74

## **Abstract**

Ceramides of stratum corneum (SC) play a crucial role in maintaining the barrier function of the skin. This work deals with series short-chain analogues of ceramides with structure identical to naturally occurring ceramide NS, acyl chain length from 2 to 12. Acyl chain length is very important for barrier properties. Ceramides with chain length 4-8C lose barrier function, conversely were able to increase skin permeability. Ceramides with 2 and 12C showed no increase in permeability. Calorimetric and infrared spectroscopic measuring data were used for studying thermotropic phase behaviour analogues of ceramides and compared to the physiological ceramide NS. At physiological temperatures, all crystalline phases of ceramides exhibit lamellar structures with highly ordered hydrocarbon chains. Structure-activity relationships and potential permeable activity of these ceramides were observed. Short-chain ceramides do not act as natural ceramides and their biological activity has been widely investigated.

## **Abstrakt**

Ceramidy stratum corneum (SC) hrají klíčovou roli v zachování bariérové funkce kůže. Tato práce se zabývá studií série krátko-řetězcových analogů ceramidů se strukturou identickou přirozeně se vyskytujícímu ceramidu NS s různou délkou acylového řetězce od 2 až 12C. Délka ceramidového řetězce je velmi důležitá pro bariérové vlastnosti. Ceramidy s délkou řetězce 4 až 8C ztrácí bariérové vlastnosti, naopak kožní permeabilitu zvyšují. Ceramidy s 2 a 12C žádné zvýšení permeability nevykazují. Ke studiu termotropního fázového chování analogů ceramidů bylo použito dat z měření diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a infračervené spektroskopie (IR) srovnáním s fyziologickým ceramidem NS. Při fyziologických teplotách vykazují všechny krystalické fáze ceramidů lamelární struktury s vysoce uspořádanými uhlovodíkovými řetězci. Byly sledovány vztahy mezi strukturou a možnou permeační aktivitou těchto ceramidů. Krátko-řetězcové ceramidy nepůsobí jako přirozené ceramidy a jejich biologická aktivita je široce zkoumána.

# 1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Kožní bariéra hraje klíčovou roli ve fyziologii člověka, chrání organismus před vnějšími fyzikálními a chemickými vlivy. Bariérová funkce kůže závisí především na vnější vrstvě epidermis, zvané stratum corneum (SC), která se skládá ze dvou hlavních strukturálních složek, korneocytů a mezibuněčné lipidové matrix. Tato matrix je tvořena lipidy SC, které jsou organizovány v lamelárních dvojvrstvách, v nichž jsou lipidové řetězce vysoce uspořádány. Složení lipidové matrix je jedinečné, tvořené ceramidy, volnými mastnými kyselinami a cholesterolem. Ceramidy jsou kovalentně spojeny k proteinovému obalu korneocytů v SC, které interagují s volnými lipidy matrix. Molekulární organizace SC je docela odlišná od jiných biologických membrán (1).

V lidské SC bylo identifikováno jedenáct typů ceramidů, patřících do třídy sfingolipidů a složené ze sfingoidní baze-sfingosinu, fytosfingosinu nebo 6-hydroxysfingosinu, které jsou N-acylovány dlouhým řetězcem nasycené mastné kyseliny,  $\alpha$ -hydroxykyseliny nebo  $\omega$ -hydroxykyseliny (2).

Hlavními strukturálními předpoklady lipidů pro zajištění kompetentní kožní bariéry je relativně malá polární hlava ceramidů, se schopností tvorby systému vodíkových vazeb, mimořádně dlouhými uhlovodíkovými řetězci, umožňující hydrofobní přitažlivé síly. Strukturálními změnami buď polární hlavy nebo zkrácením acylového řetězce lze připravit ceramidové analogy, působící jako permeační urychlovače. Hlavním strukturálním znakem sloučenin, zvyšující kožní permeabilitu je délka acylového řetězce 10-12C (3).

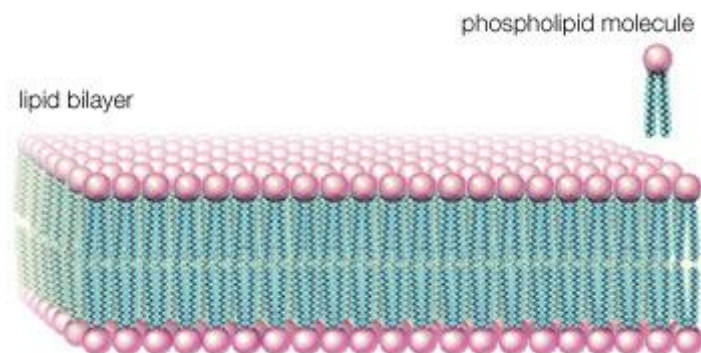
Tato práce je zaměřena na roli délky acylového řetězce u kožních ceramidů. Tato strukturální modifikace je diskutována v řadě studií, zabývajících se rolí ceramidů v buněčné signalizaci a apoptóze nebo jejich působením na uspořádání lipidů buněčné membrány. Zatímco dlouho-řetězcové ceramidy jsou důležitou složkou mezibuněčných lipidů SC, kratší analogy působí jako permeační urychlovače. Cílem této práce je studium termotropního fázového chování série pěti krátko-řetězcových analogů ceramidů a nalezení vztahu mezi jejich strukturou a urychlovací aktivitou použitím metod DSC a IR a tématicky navazuje na předloženou diplomovou práci, zabývajících se studiem permeačních urychlovačů.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

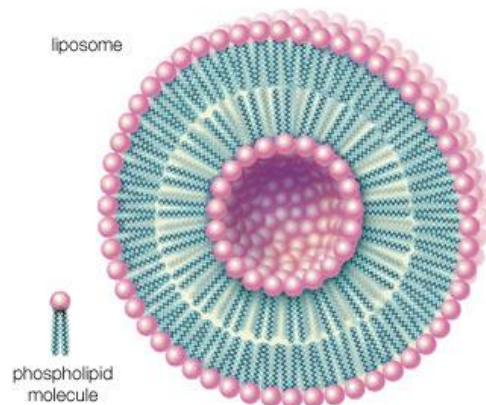
### 2.1. Fyzikálně chemické vlastnosti lipidů - hlavních komponent SC a biologických membrán

Lipidy jsou definovány jednou z jejich fyzikálních vlastností, a sice vlastností amfifilní, která jim umožňuje vytvoření velmi účinné bariéry, zabráňující průniku vody a jiných molekul dovnitř a ven z buněk a celého organismu. Jsou jedinečné mezi ostatními biologickými molekulami tím, že jsou definovány spíše jejich fyzikálními vlastnostmi než chemickou strukturou. Strukturálně mohou být lipidy tvořeny chemicky odlišnými složkami. Právě tato rozdílnost přispívá k širokému rozmezí biologických funkcí, kterých se lipidy účastní, od strukturálních elementů až po složky podílející se na přenosu mezibuněčných signálů. Fyzikální vlastnosti lipidů jsou nepochybně důležité pro zachování těchto funkcí a to především funkce buněčných membrán, tvořené lipidovým systémem, a také bariérové funkce SC, pro kterou má zřejmě největší význam složení mezibuněčných lipidů a jejich výjimečné organizované uspořádání (4).

Lipidy jsou amfifilní molekuly složené z polární a nepolární části tvořené dlouhými, hydrofobními řetězci mastné kyseliny, tzv. polární lipidy. Jedním z aspektů chování lipidů je lipidový polymorfismus, mohou se tedy vyskytovat ve formě sférických lipidových molekul, tzv. micel nebo tvoří lamelární fázi, která je podstatou lipidové dvojvrstvy, ve které jsou dvě vrstvy lipidů orientované svými hydrofobními řetězci (Obr.1). Hnací silou pro její vytvoření jsou hydrofobní interakce mezi řetězci a také odpor ve vodném prostředí. Vlastnosti dvojvrstvy jsou ovlivněny mnoha faktory, jako je lipidové složení, teplota, membránový tlak a také okolní prostředí. Právě ve vodném prostředí dochází spontánně ke tvorbě lipozomů, malých sférických útvarů lipidové dvojvrstvy (Obr. 2) (5).



Obr. 1 Schéma lipidové dvojvrstvy tvořené fosfolipidy (6).



Obr. 2 Schéma lipozomu (6).

Lipidová dvojvrstva byla popsána Singerem a Nicolsonem jako fluidní mozaikový model membránové struktury skládající se z fluidní, homogenní fáze, obsahující domény jako hlavní hnací síly pro vytvoření membránové organizace (8). Později byl navržen Forslindem doménový mozaikový model SC, ve kterém jsou lipidy SC organizované v uspořádaných doménách spojených lipidy ve fázi kapalně-krytalické (9). V literatuře se používá několik termínů pro popis distribuce lipidových molekul, např. tvorba domén, mikroagregace, fázová separace, mikrofázová separace nebo laterální fázová separace. Domény mohou být funkčně významné jako regulátor membránové proteinové aktivity (8).

Další důležitou vlastností lipidů je jejich schopnost intermolekulární interakce s ostatními lipidy prostřednictvím vodíkových vazeb. Této interakce se účastní bazické a kyselé skupiny na polární hlavě fosfolipidů nebo amidová a hydroxylová skupina acylového řetězce sfingosinové baze. Účast vodíkových vazeb zvyšuje teplotu fázové tranzice lipidů. Vodíkové vazby mezi lipidy ve dvojvrstvě mohou být významně stabilizovány v přítomnosti vody, i přes skutečnost, že jsou již lipidy sdružené působením hydrofobních Van der Waalsových sil mezi lipidovými řetězci (7).



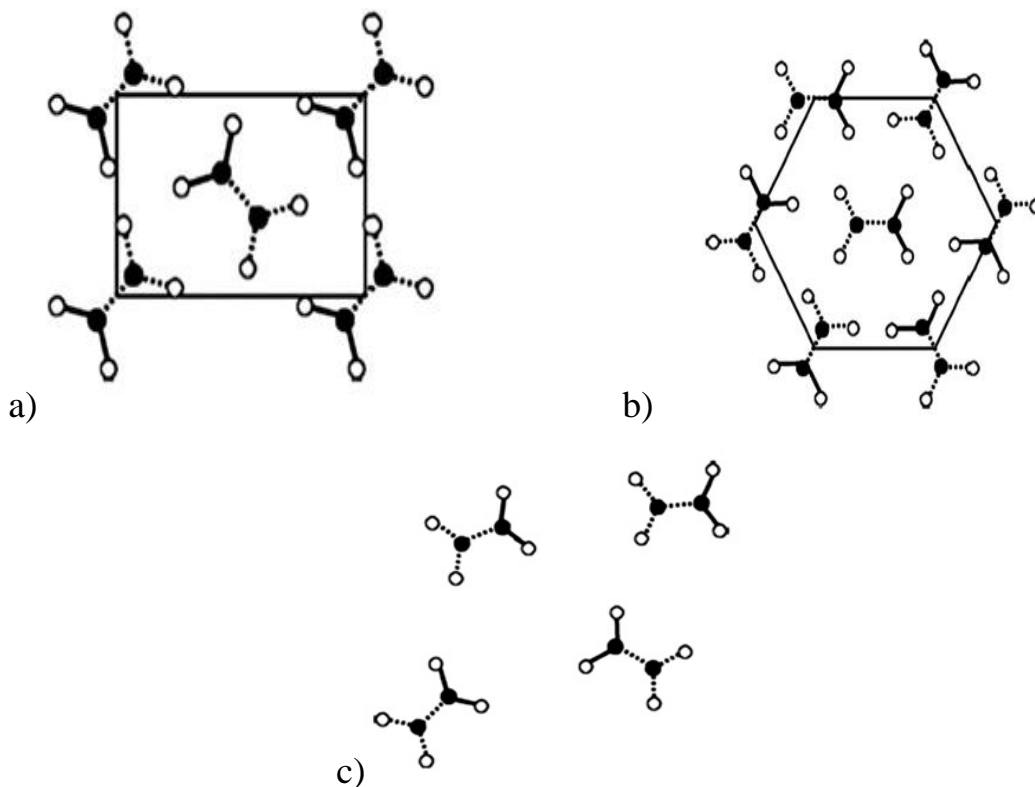
### 2.1.1. Termotropní chování lipidů a metody je popisující

Tyto specifické fyzikální vlastnosti lipidů vychází především z uspořádání dlouhých alkylových řetězců, tvořících uhlovodíkovou část molekuly. Tři základní typy uspořádání alifatických řetězců převážně se vyskytujících v molekule lipidů:

1) pevně uspořádané alifatické řetězce se specifickými meziřetězovými interakcemi tvořící krystalovou mřížku (orthorhombickou – Obr. 3a nebo triklinickou, či monoklinickou).

2) přechodná forma mezi krystalickou a kapalnou fází s oslabením meziřetězových interakcí, avšak řetězce jsou uspořádány do mřížky (hexagonální) a vyznačují se vyšší pohyblivostí (Obr. 3b).

3) fluidní, neuspořádaná fáze (Obr. 3c) (10).



Obr. 3 Schéma tří základních stavů uspořádání alkylových řetězců vyskytujících se při fázových přechodech lipidů – a) orthorhombické, b) hexagonální, c) fluidní (9).

Přechody (tranzice) mezi těmito stavy jsou charakterizovány prudkými změnami entalpie. V molekule lipidu může docházet ke dvěma i více fázovým přechodům, nejprve z krystalického uspořádání na hexagonální a z hexagonálního na fluidní fázi. Entalpie fázového přechodu z krystalické mřížky orthorhombické nebo triklinické na kapalnou fázi je 1 kcal /-CH<sub>2</sub>- a 0,5 kcal /-CH<sub>2</sub>- z hexagonální na fluidní. V případě lipidů je hlavním fázovým přechodem proces tání, což je právě přechod z uspořádaného stavu do fáze fluidní. Tání charakterizuje teplota tání, která je daná délkou uhlovodíkového řetězce, přítomností dvojných vazeb, cyklické struktury a větvením řetězce. Hydrofilní část molekuly lipidů hraje také roli při teplotních přechodech alkylových řetězců a také při interakci s vodným systémem (10).

Široce využívanou termoanalytickou metodou pro zjištění průběhu fázové tranzice je diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). Teplota charakteristická pro fázový přechod je určena onsetem píku na DSC křivce, který vyjadřuje v případě studia fázového chování lipidů, tání uhlovodíkových řetězců. Teplotní onset nám podává prvotní informaci o teplotě, entalpii fázového přechodu v molekule lipidů. Ostatní metody lze využít k popisu toho, co se přesně děje během fázového přechodu v molekule lipidu, změny v krystalové soustavě lipidu a na polární hlavě. Proto se většinou užívá kombinace metody DSC se spektroskopickými metodami (11).

Další metodou je infračervená spektroskopie (IR), využívaná ke strukturální analýze lipidových řetězců, studiu jejich konformačního uspořádání a polární hlavy molekuly lipidů. Uspořádání lipidových řetězců lze velmi dobře monitorovat z IR spektra, z konformačně sensitivních vibrací methylenových skupin uhlovodíkových řetězců lipidů a je vhodná jak pro popis polárních tak nepolárních částí molekuly (11). Ramanova spektroskopie je na rozdíl od infračervené vhodnější pro charakterizaci uhlovodíkových řetězců.

Rentgenová difrakce je jednou ze základních metod využívanou při lipidovém výzkumu. Metoda je založena na rozptýlení rentgenového záření a měřená intenzita může být vyhodnocena jako funkce difrakčního úhlu. Zpravidla je měření odděleno na malý (small angle X-rays scattering-SAXS) a široký (wide angle X-rays scattering-WAXS) úhel rentgenové difrakce. Podstatou je anizotropní chování amfifilních lipidických molekul, které vede k charakteristickému uspořádání. V SAXS oblasti lze detekovat molekulovou délku a podle pozic reflexe lze v lipidickém systému přiřadit fázi dlouhých, organizovaných řetězců (-lamelární, hexagonální, kubická). Z WAXS

difrakce lze popsat laterální organizaci uhlovodíkových řetězců (orthorhombická, hexagonální, triklinická) (12).

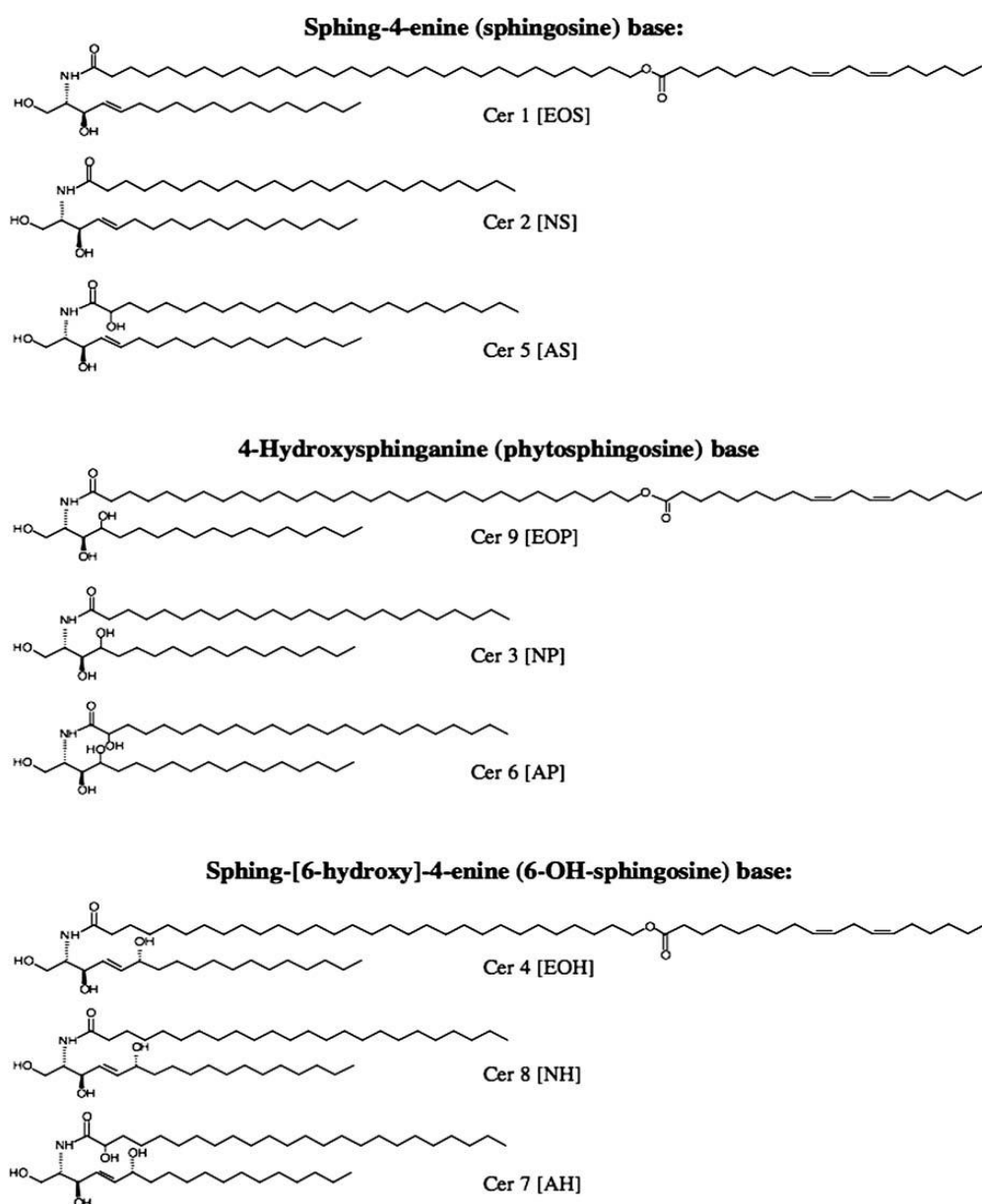
## 2.2. *Stratum corneum (SC)*

Funkce kožní bariéry je připisována SC, nejzvnější vrstvě epidermis. SC je složena z keratinocytů a mezibuněčné lipidové matrix. Keratinocyty jsou ploché, vzájemně do sebe zapadající buňky s nepropustnou obálkou, vyplněnou keratinem. Zpravidla jsou hexagonálního tvaru, s velikostí 20 až 40  $\mu\text{m}$  v průměru. Soudržnost SC je zajištěna desmozomy. Lidská SC je obvykle tvořena 18 až 21 vrstvami. Bariérové vlastnosti jsou dány specifickým obsahem a složením lipidů SC a také vyjímečným strukturálním uspořádáním mezibuněčné lipidové hmoty. Lipidová fáze je spojitá v celé vrstvě SC, pronikající látka tedy musí interagovat s touto fází (12).

Lipidová matrix představuje asi 20% objemu SC (5) a z největší části a sice 50% je tvořena ceramidy, cholesterol tvoří 25% a volné mastné kyseliny představují okolo 10% lipidů. Také jsou přítomny v menší míře estery cholesterolu a cholesterol-sulfát, fosfolipidy se téměř nevyskytují. Cholesterol je všude se vyskytující složka biologických membrán, umožňuje smísení strukturálně odlišných lipidů a přispívá k zajištění stability lamelárních struktur SC. Volné mastné kyseliny jsou téměř vždy nasycené, nevětvené a delší než 18-ti uhlíkaté. Cholesterol-sulfát je přítomen v malém množství, ale hraje důležitou roli v procesu deskvamace SC (odlupování odumřelých vrstev pokožky). Lipidy SC pochází z lamelárních granul, které obsahují lipidické disky a v konečných fázích diferenciaci keratinocytu na rozhraní stratum granulosum a SC tělíska migrují k vnější části buňky, kde dojde ke splnutí s plazmatickou membránou a uvolnění lipidů do mezibuněčného prostoru. Prekurzory ceramidů ve formě acylglukosylceramidů a sfingomyelinů, které jsou skladovány v lamelárních granulech jsou při splnutí membrán metabolizovány na ceramidy (11). Tyto prekurzory jsou syntetizovány ze serinu a palmitoylkoenzymu A a pravděpodobně představují méně lipofilní transportní formu kožních ceramidů. Pro uvolnění ceramidů z těchto prekurzorů je nutný enzym glukocerebrozidáza nebo sfingomyelináza (13) nebo mohou být tvořeny *in vivo* ceramidsyntázou (16). Disky postupně fúzí a vytváří multilamelární soubory, které vyplňují intercelulární prostory SC a tvoří lipidovou matrix (8). Kožní onemocnění jako atopická dermatitida (AD) a psoriáza odráží změny v metabolismu ceramidů, vedoucí k jejich nedostatku. U AD byla popsána snížená aktivita sfingomyelinázy a přítomnost enzymu glukosylceramid-sfingomyelindeacylázy, degradující oba prekurzory ceramidů. U psoriázy může být příčinou nižší exprese glukocerebrozidázy a také snížená syntéza ceramidů ze serinu (13, 14).

### 2.3. Ceramidy

Hlavní lipidy tvořící bariéru jsou ceramidy jedenácti strukturálně heterogenních skupin viz. Obr. 4. Tyto ceramidové směsi jsou hlavní složkou pro vytvoření a stabilizaci kožní bariéry (12).



Obr. 4 Struktury ceramidů vyskytujících se v lidské SC, struktury sfingoidní baze zahrnují sfingosin, fytosfingosin a 6-hydroxysfingosin (14).

Ceramidy patří mezi sfingolipidy, obvykle je jedna mastná kyselina amidově spojena ke 18-uhlíkaté sfingoidní bazi. Jejich strukturální rozmanitost pochází z možných kombinací mezi třemi typy sfingoidní baze – sfingosin, fytosfingosin, 6-hydroxysfingosin a tři typy mastných kyselin –  $\alpha$ - nebo  $\omega$ -hydroxykyselina a kyselina neobsahující hydroxy-skupinu, každá s různě dlouhým řetězcem. Charakteristickým znakem ceramidů je polymorfismus a ten má význam pro lamelární strukturu lipidové matrix SC. Za fyziologické teploty vykazují krystalické fáze ceramidů lamelární struktury s vysoce uspořádanými uhlovodíkovými řetězci (15).

Přirozené ceramidy mají dlouhý nasycený N-acylový řetězec a malou polární hlavu, tato struktura jim udílí specifické vlastnosti, a sice schopnost tvorby systému rozsáhlých vodíkových vazeb. Výjimečně dlouhé, nasycené řetězce umožňující silnou, hydrofobní přitažlivost a jejich strukturální rozmanitost jsou základní předpoklady fungující kožní bariéry (16).

Délka N-acylového řetězce má také vliv na stabilizaci uspořádaných domén-tzv. raft-stabilizaci. Ceramidové analogy mají schopnost přednostně vytlačit cholesterol z těchto domén a tyto vlastnosti jsou podobné přirozeným ceramidům. Ceramid a sterol soutěží o umístění v těchto doménách. Minimální délka 12-ti uhlíkatého řetězce je podmínkou pro ještě stabilizační působení. Ceramidy s kratším řetězcem tuto schopnost stabilizace ztrácejí. Toto poznání není překvapující, neboť tyto krátké ceramidy lze přirovnat k lipidům s jedním dlouhým řetězcem, např. fosfolipidům, které nemají schopnost tvorby termálně stabilních uspořádaných domén. Chování těchto ceramidů neovlivní malé změny v blízkosti polární hlavy tak významně jako změny v délce acylového řetězce. Efekt délky alkylového řetězce ceramidových analogů na termální stabilitu domén byl testován v přítomnosti a absenci sterolu na základě předchozích studií. V nepřítomnosti sterolu byla termální stabilita zvyšována s prodlužováním řetězce analogů, tzn. C16 > C12 > bez ceramidu > srovnatelně C2, C6, C8. V přítomnosti cholesterolu měl C2 ceramid méně destabilizující efekt než C6 a C8 a závislost stability na délce řetězce byl následující: C16 > C12 > C2 > srovnatelně C6, C8. Chování bylo kvalitativně podobné v přítomnosti a absenci cholesterolu. Je tedy ukazatelem toho, že délka acylového řetězce je zásadní pro termální stabilizaci domén a tuto schopnost neumožňuje specifická interakce mezi ceramidem a sterolem (16).

Předchozí studie ukazují, že změnou struktury ceramidů lze získat syntetické analogy ceramidů s jejich možným využitím jako permeačních urychlovačů – viz kapitola 2.3.1. (3).

### 2.3.1. Ceramidy jako permeační urychlovače

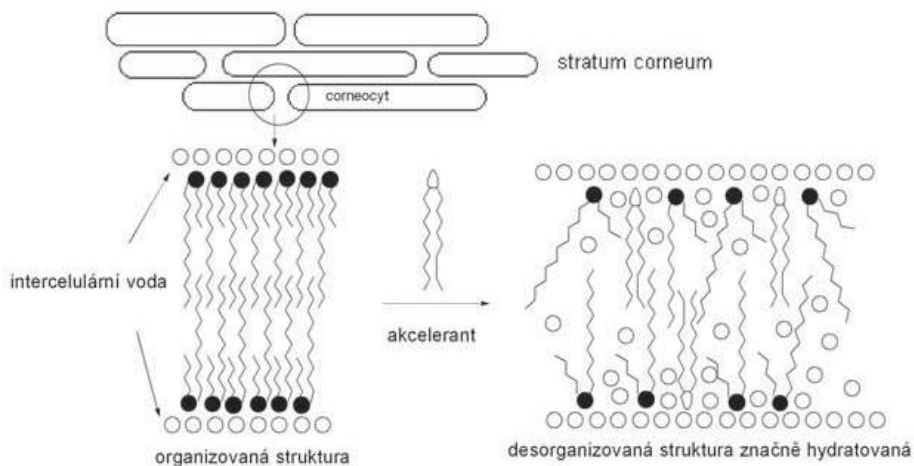
Využití permeačních urychlovačů je jedna z možností jak usnadnit průchod léčiva kůží interakcí se složkami SC a tím reverzibilně snížit bariérové vlastnosti kůže. Pro efektivní působení těchto látek je významná interakce s mezibuněčnými lipidy SC. Mnoho urychlovačů je schopno vkládání mezi hydrofobní řetězce ceramidové dvojvrstvy a tím ruší jejich uspořádání, zvyšují jejich fluiditu a následně vedoucí ke snadnějšímu průniku penetrující látky (17).

Existuje hypotéza, že by měla být jistá podobnost mezi molekulou urychlovače a ceramidy. Vlastnosti molekuly ceramidů jsou nezbytné pro zachování bariérové funkce, a právě změny v molekule ceramidu by mohly vést ke struktuře s vlastnostmi urychlovačů (17). Může se jednat o změnu struktury polární hlavy lipidů se zachováním délky řetězců nebo zkrácením dlouhých ceramidových řetězců se stejnou polární hlavou. Mnoho účinných sloučenin zvyšujících permeabilitu kůže spojuje jeden hlavní, strukturální rys, kterým je délka řetězce 10 až 12 uhlíků. Tato délka by měla být vhodnou pro vytvoření neuspořádanosti mezi mnohem delšími ceramidovými řetězci a pro zajištění optimální lipofility molekuly k penetraci do SC (18). Podobný příklad byl nalezen u MK. Zatímco dlouhořetězcové MK jsou důležitou složkou lipidové matrix SC, krátkořetězcové působí jako permeační urychlovače. Předchozí studie ukázaly, že krátkořetězcové ceramidy nemají stejné bariérové vlastnosti jako jejich přirozeně se vyskytující dlouhořetězcové protějšky (3).

Permeační urychlovače mohou působit několika mechanismy na SC. Působení může být zaměřeno na **mezibuněčné lipidy**, tím že strukturálně modifikují lipidové domény a naruší lipidovou organizaci SC nebo působením na **desmozomy a proteinové struktury** a jejich rozrušení. Další cílovou strukturou může být působení uvnitř **keratinocytu** a následná denaturace keratinu (18).

Interakce permeačních urychlovačů s mezibuněčnými lipidy můžeme rozdělit do dvou fází – průnik urychlovače do lipidových lamel a jejich následné, specifické působení s těmito lipidy (Obr. 5). Obě fáze působení mohou být určeny sterickými, hydrofobními a elektronovými parametry urychlovače. Se zvyšující se molekulovou velikostí urychlovače se zvýší hydrofobní povrch, a tím se urychlí rozložení urychlovače a permeabilita přes lipidovou membránu. Velké molekuly získávají více prostoru a tím pomalejší difúzi.

Také schopnost tvorby vodíkových vazeb negativně ovlivňuje urychlující aktivitu. Analoga ceramidů s největší urychlovací permeační aktivitou mají nejspřádanější řetězce, a právě uspořádanost řetězců by mohla být důležitým faktorem pro jejich působení (19).

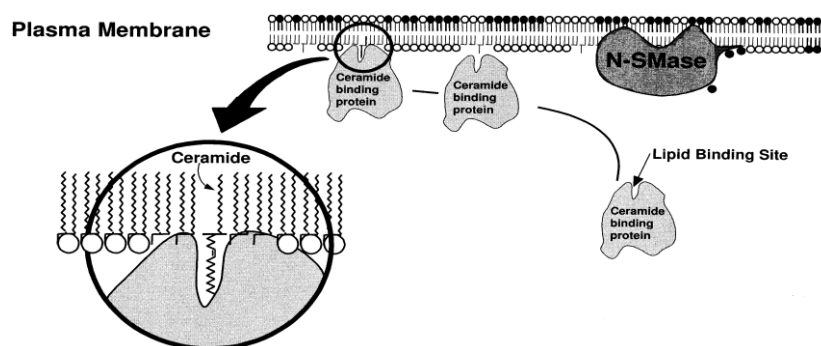


Obr. 5 Mechanismus účinku urychlovačů – interakce s lipidy lipidové matrix (20).



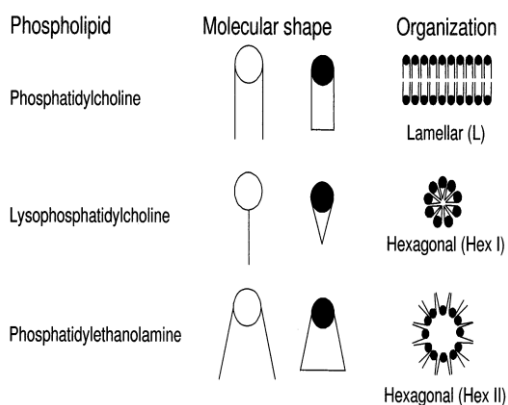
### 2.3.2. Funkce ceramidů jako druhých posílů při transdukci buněčných signálů

Ceramidy jsou také obsaženy v systémech transdukce intercelulárního signálu, regulující buněčnou diferenciaci, aktivaci, přežití a apoptózu. Patří do skupiny sfingosinových, lipidových druhých posílů a ti jsou zapojeni do regulace různých buněčných odpovědí působením vnějších podnětů. Aktualně studovaným problémem je stimulovaná produkce ceramidu při diferenciaci vyvolané vitamínem D3 a při apoptóze vyvolané TNF (tumor nekrotizující faktor) u dlouhodobě kultivovaných buněčných linií. Ceramidy jsou následně po aktivaci buněk rychle produkovány působením sfingomyelinázy. Aktivaci může způsobit stres nebo cytokiny jako TNF, interleukin IL-1 nebo CD95L. Spuštění receptorů pro TNF, IL-1 nebo CD95L vyvolá katabolickou tvorbu ceramidu hydrolýzou sfingomyelinu. Tyto rychlé a dočasné změny hladin ceramidu naznačují možné role ceramidu ve zprostředkování velmi časného přenosu signálu. Je předpokládán dvojitý mechanismus působení ceramidu: 1) Tzv. model vyčnívajícího alkylového řetězce ceramidu, kterým může ceramid vázat proteiny k membránám (Obr. 6). Tento mechanismus je založen na „prodloužené“ (tzv. splayed-chain) lipidové konformaci. V tomto modelu jsou dva acylové řetězce ceramidu roztaženy opačným směrem k polární hlavě. Po hydrolýze hydrofilní, polární hlavy sfingomyelinu sfingomyelinázou, několik ceramidových molekul podstoupí konformační změny s následným roztažením řetězců. Vyčnívající alkylový řetězec může připojit signální proteiny k membránám, interakcí s hydrofobní dutinou a druhý řetězec zůstává v membráně, který pravděpodobně zaručuje správnou aktivaci specifického signálního komplexu (21).

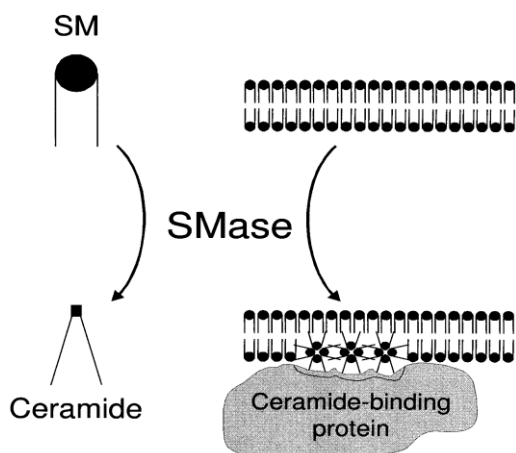


Obr. 6 Model vyčnívajícího alkylového řetězce (21).

2) Vedle interakce alkylových řetězců s proteiny dochází ke změně fluidity a permeability membrány tím, že se obecně tvorbou ceramidů zvyšuje objem hydrofobních řetězců uvnitř lipidové dvojvrstvy, tímto vylepšují jejich tendenci k vytváření hexagonální fáze. Tyto změny membrány mohou zasahovat do procesů membránových fúzí a internalizací membránových receptorů. Fosfolipidy nejsou náhodně uspořádány uvnitř biologických membrán, fosfo- a sfingolipidy vykazují asymetrické rozložení a odlišné chování v membránách, závislé na velikosti polární hlavy a řetězců. Mohou být uspořádány v lamelární struktuře nebo nelamelárních, hexagonálních fázích (Hex I a II) (Obr. 7) (21). Zvýšením koncentrace ceramidu v membránách vzrůstá objem uhlovodíkových řetězců nad hydrofilními skupinami a tím tendence ke tvorbě hexagonální Hex II fáze. Místní hexagonální fáze může poskytnout větší plochu pro hydrofobní interakce se signálními proteiny (21).



Obr. 7 Struktura fosfolipidů (21).



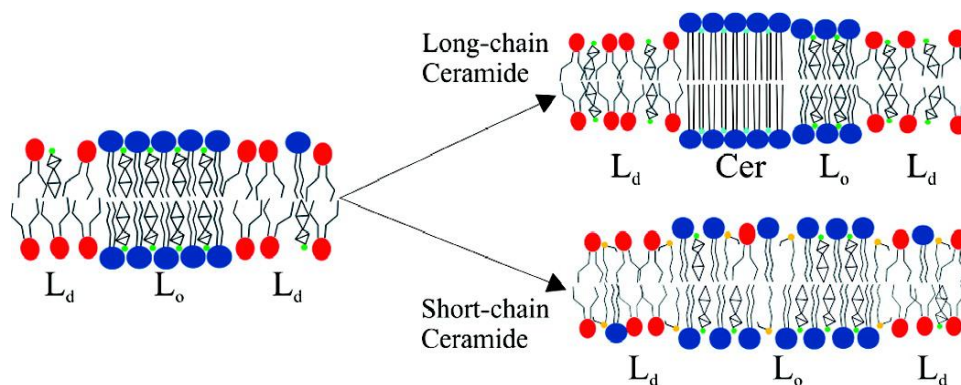
Obr. 8 Ceramid vázající proteiny prostřednictvím Hex II tranzice (21).

Produkce ceramidu sfingomyelinázou může tedy hrát klíčovou signální roli prostřednictvím přímé interakce se signálními proteiny nebo usnadnění utváření signálních transdukčních komplexů (21). Jako druhý posel v přenosu signálu, působením TNF a CD95L, může vyvolat apoptózu aktivací určitých kináz (22).

### 2.3.3. Působení krátko-řetězcových ceramidů na uspořádání lipidových domén

Přirozeně se vyskytující dlouho-řetězcové ceramidy, označované také jako „nerozpustné amfifily“, jsou známy svou schopností utváření domén, separovaných v kapalně-uspořádané fázi, které se účastní několika buněčných procesů, od apoptózy až po imunitní odpověď. Jejich krátko-řetězcové analogy klasifikované jako „amfifily rozpustné“, vykazují velmi odlišné biofyzikální vlastnosti, netvoří separovanou fázi. Mění fyzikální vlastnosti těchto domén, snižují jejich stabilitu a viskozitu a jejich schopnost zvyšovat permeabilitu je velmi nízká (23).

Obr. 9 popisuje vliv různě dlouhých ceramidů na fázovou separaci modelu lipidové membrány v přítomnosti ceramidů dlouho-řetězcových (16 a 18 uhlíků v acylovém řetězci) a krátko-řetězcových (2, 6, 12 uhlíků). Pouze ceramidy s 16 a 18 uhlíky tvoří domény, skládající se z vysoce uspořádané gelové fáze, charakterizované velmi pomalou pohyblivostí. Naopak krátké ceramidy nejsou odděleny do separovaných domén, ale jsou v kapalně-uspořádané fázi solubilizovány, čímž jsou stabilita a lipidové uspořádání domén silně redukovány. Tyto změny by mohly pozměnit přenos signálu a jiných buněčných procesů (23).



Obr. 9 Schématický model pro fázovou separaci v přítomnosti dlouho- a krátko-řetězcových ceramidů. Lipidová membrána je tvořena: DOPC (dioleoylphosphatidylcholine)-červeně, sfingomyelin-modře, cholesterol-zeleně, dlouho-řet. ceramidy-sv.modře, krátko-řet. ceramidy-hnědě (23).

Studie zabývající se vlivem různých krátko-řetězcových ceramidů na lipidové uspořádání domén naznačují, že tyto ceramidy snížením membránové stability inhibují

buněčnou signalizaci v krevních destičkách. Narušení lipidového uspořádání v RBL (rat basophilic leukemia) buňkách, působením ceramidů C2, C6 je vysoce spojena s inhibicí antigen-stimulované  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizaci a aktivace fosfolipázy D1 (PLD1). Mechanismus pro tento inhibiční účinek není kompletně prozkoumán, je však jisté, že inhibice velmi úzce souvisí s rozrušením lipidových domén (24).

#### 2.3.4. Krátko-řetězcové ceramidy a jejich vliv na buněčnou apoptózu

Krátko-řetězcové ceramidy jsou na rozdíl od přirozených ceramidů schopny rychle vstoupit do buněk po exogenním podání. Mechanismus, kterým působí na buňky není úplně jasný. Působí jako sekundární poslové, změnou fosforylačního stavu a tím ovlivňují aktivitu jistých klíčových enzymů. Tyto ceramidy v podobných koncentracích k těm, které mají fyziologický účinek, mohou přímo pozměnit lipidový metabolismus, substitucí endogenních ceramidů v biosyntéze. Tyto ceramidy inhibují včlenění radioaktivně značeného serinu do sfingolipidů a mohou být samy metabolizovány do odpovídajících sfingomyelinů a glukosylceramidů (25). Toto působení nasvědčuje kompetici krátko-řetězcových ceramidů a ceramidů endogenních o konverzi do více hydrofilních sfingolipidů. Ve studii používající fibroblasty z ledvin křečků, byly sledovány tři apoptoticky působící ceramidy, které působily různým mechanismem, zahrnující inhibici biosyntézy sfingolipidu, fosfatidylcholinu a cholesterolu. Po inkubaci došlo v těchto buňkách k apoptóze. Kvantitativně největší účinek ceramidu na tyto buňky byl ve snížení syntézy fosfatidylcholinu, tím, že snižuje hladinu klíčových metabolitů. Inhibici této syntézy odpovídalo nahromadění diacyl- a triacylglycerolu, pravděpodobně jako důsledek blokády cytidylyltransferázy. C2-SM (SM odpovídající C2 ceramidu) má silný inhibiční efekt na cytidylyltransferázu, enzymu, který katalyzuje syntézu CDP-cholinu (rychlostně-limitovaný krok syntézy fosfatidylcholinu). Jelikož je C2 ceramid konvertován do C2-SM, je pravděpodobné, že inhibice je zapříčiněna C2 ceramidem. Apoptotické působení těchto ceramidů je někdy spojována s inhibicí cytidylyltransferázy, ale mnohem těsněji koreluje s kompetitivní inhibicí biosyntézy sfingomyelinu (25).

### 2.3.5. Využití ceramidů ke studiu biologické aktivity a nádorové terapii

Od doby identifikace ceramidů jako lipidových sekundárních poslů, jsou analogy ceramidů široce využívány ke studiu biologických rolí ceramidů. Dlouho-řetězcové (C12 až C18) ceramidové analogy lze využít pro studie působení ceramidů, jelikož si zachovávají hlavní membrány-stabilizující vlastnosti přirozených ceramidů a jejich inkorporace do buněk může být snazší než přirozených delších ceramidů. Krátko-řetězcové jsou využívány častěji z důvodu mnohem snazšího průniku do buněk a jsou účinnější než dlouho-řetězcové v indukci apoptózy v několika rakovinných buněčných liniích. Zatímco přirozené ceramidy tvoří rozsáhlé domény, které jsou nezbytné ve Fas ligand-zprostředkované apoptóze, krátko-řetězcové tuto schopnost nemají (16).

Exogenní aplikace ceramidů je cytotoxická a vystavení buněk chemoterapii nebo záření je spojena se zvýšením hladiny ceramidů, přesněji ke zvýšení de novo syntézy, katabolismu sfingomyelinu nebo obojí. Ceramid může být metabolizován na méně toxické formy glykosylací, acylací nebo rozkladem na sfingosin, který je poté fosforylován na anti-apoptický sfingosin-1-fosfát. Glukosyl-ceramid syntáza měla vést ke zvýšení rezistence na chemoterapie, a tak inhibicí metabolismu nebo katabolismu ceramidů může zvýšit účinnost chemoterapie. Kombinace chemoterapie a modulátorů ceramidového působení ukazují zvýšení protinádorové aktivity v preklinických modelech, s minimální toxicitou pro zdravé buňky (27).

Jako přirozené ceramidy jsou krátko-řetězcové analogy hydrolyzovány na sfingosin a mastné kyseliny, a také převedeny na krátké glukosylceramidy a sfingomyelin. Uvolněný sfingosin podstupuje acylaci na přirozené ceramidy. Krátké ceramidy kompetují s dlouho-řetězcovými v syntéze komplexu sfingolipidů a ovlivňují tak buněčné složení. Ceramid C8 a Glukosylceramid C8 vedly v kulturách rakovinných buněk ke zvýšení přirozených ceramidů a Glukosylceramidů a snížení SM, DNA syntézy a syntézy proteinů (28).

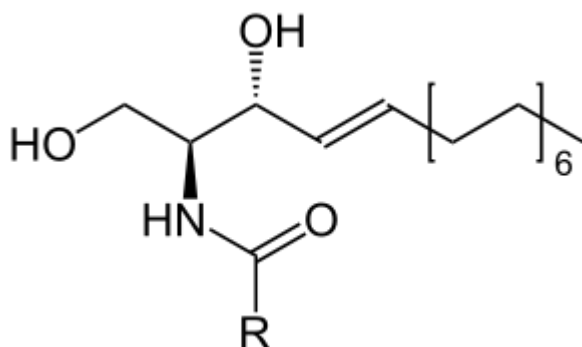
Exogenní ceramid C<sub>6</sub> užitý v experimentální studii vlivu krátko-řetězcových ceramidů na A549 buněčné linie lidského plicního adenokarcinomu, měl za následek jednoznačné zvýšení hladiny endogenních dlouho-řetězcových ceramidů, které byly inhibovány fumonisinem B1. Utváření endogenních ceramidů jako odpovědi na C<sub>6</sub> ceramid má opětovně použít sfingosin ceramidu C<sub>6</sub> deacylací. Selektivně značený C<sub>6</sub> byl inkorporován do nově syntetizovaných ceramidů. Tvorba endogenních ceramidů

souvisí s biologickou rolí ceramidu C6 v buněčném cyklu, zastavující fázi  $G_0/G_1$ , růst a inhibici telomerázy. Toto působení je vázáno na stereospecifitu C6, účinný je pouze D-erythro-C6 (26). A tak krátko-řetězcové ceramidy mohou působit jako proléčiva a mohou prokázat efektivní apoptotické působení in vivo (28).

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Materiály a měřící metody

K měření byla použita série pěti krátko-řetězcových ceramidových analogů a ceramid NS (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA). Jedná se o analogy ceramidu NS s délkou acylového řetězce 2, 4, 6, 8 a 12 uhlíků, které jsou předmětem výzkumu ve vztahu k jejich urychlující aktivitě.



Obr. 10 Obecný vzorec sfingosinových ceramidů (29).

R=24C Ceramid NS - N-lignoceroyl-D-erythro-sphingosin

R=12C Cer C12 N-lauroyl-D-erythro-sphingosin

R=8C Cer C8 N-octanoyl-D-erythro-sphingosin

R=6C Cer C6 N-hexanoyl-D-erythro-sphingosin

R=4C Cer C4 N-butyroyl-D- -sphingosin

R=2C Cer C2 N-acetoyl-D-erythro-sphingosin



### 3.1.1. DSC

Vzorky byly nejprve vystaveny měření DSC, při kterém byly zjištěny počáteční informace o jednotlivých fázových tranzicích. Měření bylo prováděno pomocí přístroje NETZSCH Phoenix DSC 200 PC od 20 do 120 °C rychlostí 5 K/min. Jako reference byla použita prázdná pánvička.

Výstupem měření jsou termogramy. Teplota fázového přechodu byla stanovena podle onsetu tranzičního píku determinovaného pomocí Netzsch software. Změny v entalpii byly stanoveny integrací plochy pod tranzičním píkem.

### 3.1.2. Infračervená spektroskopie

Měření infračervených spekter probíhalo pomocí spektrometru NICOLET IMPACT 400. Pro metodu ATR byl použit jednodrazový ATR krystal s úhlem odrazu 45°C ze ZnSe směsi, materiálu o vysokém indexu lomu doplněný teplotní sondou a elektrickým termostatem. ATR krystal je lichoběžníkového tvaru v horizontálním uspořádání o průměru 1,3 mm. Rezoluce měření byla 4 cm<sup>-1</sup>. Měření probíhalo v 1 až 2 °C ( $\pm 0,2$  °C) teplotním intervalu od pokojové teploty po teplotu nad hlavní fázovou tranzici. Po každém jednotlivém navýšení teploty byl vzorek ekvilibrován po dobu 5 min před dalším IR měřením. Získaná IR spektra vyjadřují závislosti reflektance na vlnové délce. Zpracování, vyhodnocování a úprava dat byla uskutečněna za pomoci speciálního softwaru.

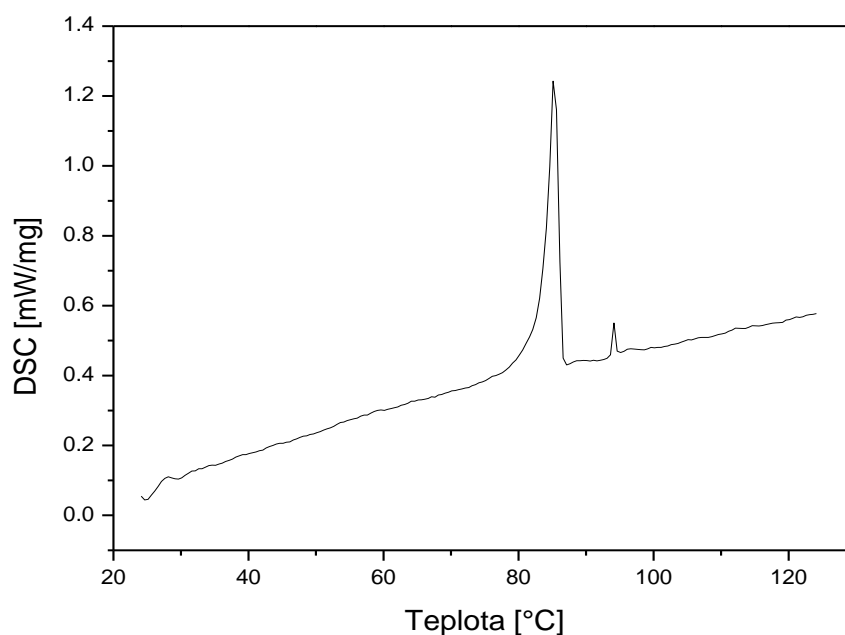
Princip metod a přesný postup měření je popsán v diplomové práci (11).

## 4. VÝSLEDKY MĚŘENÍ

### 4.1. Ceramid C2

#### 4.1.1.DSC

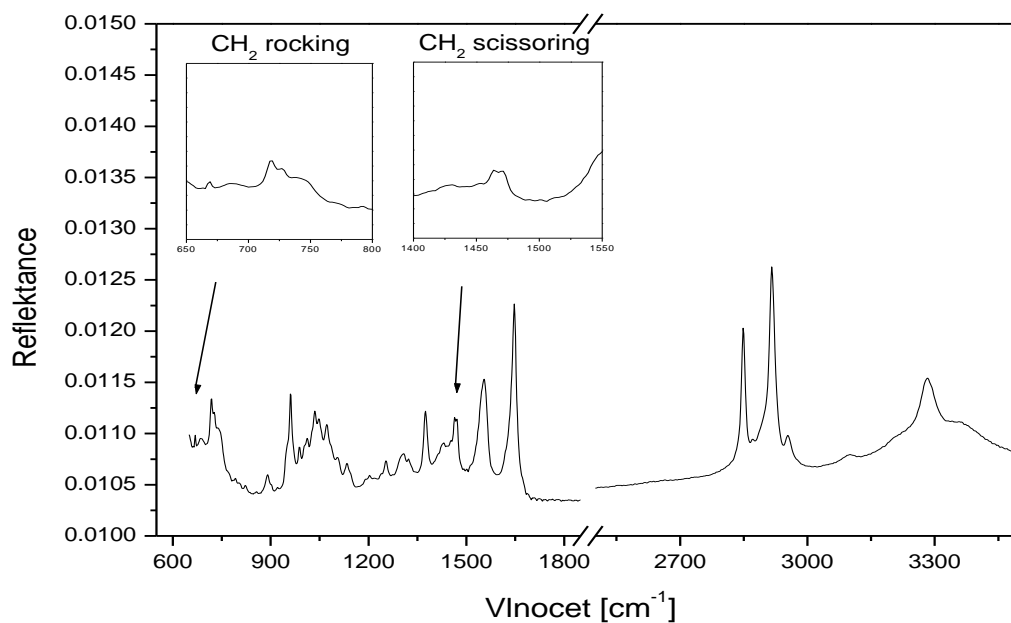
DSC termogram vzorku C2 znázorňuje endotermní fázovou tranzici při zahřívání, kterou představuje endotermní pík, odpovídající onsetu teploty 83,6 °C a změně entalpie 45,9 kJ/mol (Obr. 11).



Obr. 11 DSC křivka ceramidu C2.

#### 4.1.2. ATR-FTIR spektroskopie

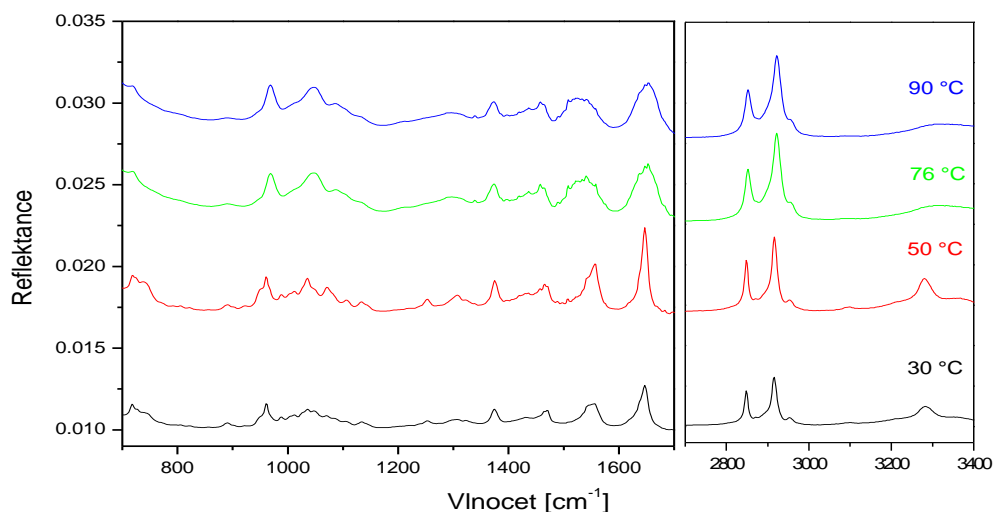
Měření probíhalo v teplotním rozsahu od 28 do 103 °C po 2 °C, v oblasti fázové tranzice po 1 °C. Fázový přechod nastal při teplotě 74 °C. IR spektrum získané při 28 °C je zobrazeno na Obr. 12, šipky označují absorpční pásy charakteristické pro analyzované funkční skupiny. Přiřazení vybraných absorpčních pásů je uvedeno v Tab. 1. Na Obr. 13 jsou zobrazena jednotlivá spektra C2 před a po fázovém přechodu.



Obr. 12 IR spektrum ceramidu C2 při pokojové teplotě. Šipky naznačují vybrané absorpční pásy CH<sub>2</sub> rocking a CH<sub>2</sub> scissoring vibrace.

Tab. 1 Přiřazení vybraných IR pásů C2 při pokojové teplotě a při teplotě po fázovém přechodu.

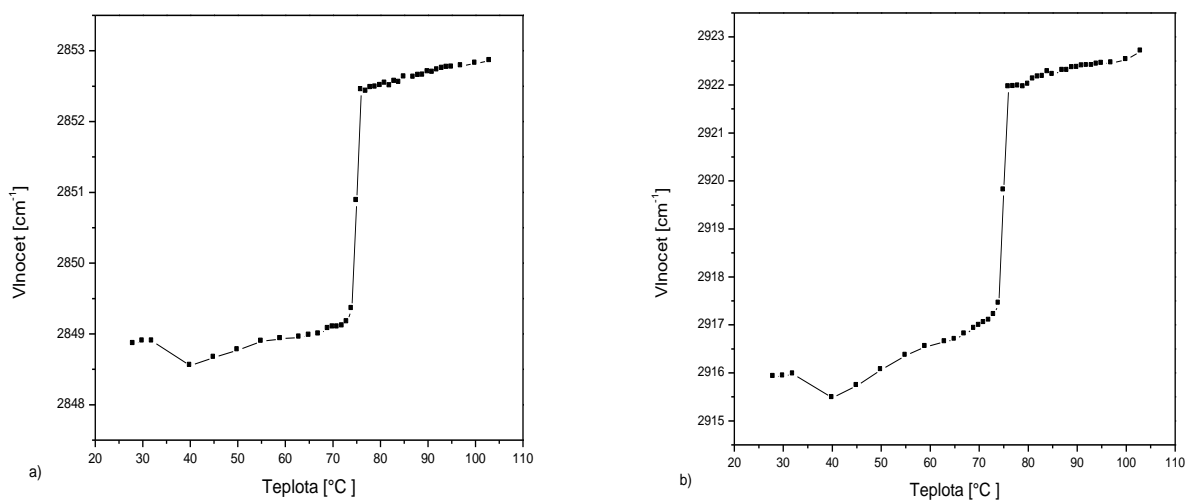
IR (cm <sup>-1</sup> )		Přiřazení pásu
<b>28 °C</b>	<b>80 °C</b>	
718,2	718,4	δ(CH <sub>2</sub> ) deformační (rocking)
726,3	-	
890,6	888,9	δ(CH <sub>3</sub> ) deformační
961,2	968,6	out-of-plane C-H bending C=C
1072,2	1067	ν(C-O) CH <sub>2</sub> -OH prim.alkoh.
1273,8	1296,6	ν(C-O) CH-OH
1464,2	1464,1	δ(CH <sub>2</sub> ) nůžková vibrace
1470,4		
1554,5	1557,9	δ(NH) amid II
1646,9	1653,2	ν(C=O) amid I
2848,9	2852,5	ν <sub>s</sub> (CH <sub>2</sub> ) sym. valenční
2871,8	-	ν <sub>s</sub> (CH <sub>3</sub> )
2915,9	2922	ν <sub>as</sub> (CH <sub>2</sub> ) asym.valenční
2953,3	-	ν <sub>as</sub> (CH <sub>3</sub> )
3293,1	3313,7	ν(NH)
3346,2	-	ν(OH)



Obr. 13 IR spektra ceramidu C2 měřená při teplotě 30, 50, 76 a 90 °C v rozmezí vlnočtu - 700-1700  $\text{cm}^{-1}$  a 2700-3400  $\text{cm}^{-1}$ .

#### a) Oblast $\text{CH}_2$ valenčních vibrací

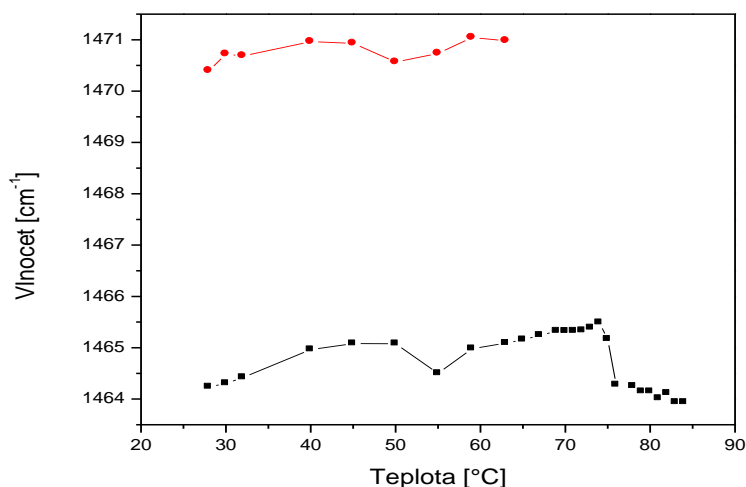
Při teplotě 28 °C byly pozorovány pozice valenční (stretching) vibrace symetrické ( $\nu_s(\text{CH}_2)$ ) 2848,9  $\text{cm}^{-1}$  a asymetrické ( $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ ) při 2915,9  $\text{cm}^{-1}$ . Při teplotě 76 °C došlo k posunu absorpčních pásů k hodnotám  $\nu_s$  2852,5 a  $\nu_{as}$  2922,0  $\text{cm}^{-1}$ . Teplotní vývoj pozice pásu symetrické a asymetrické stretching vibrace je zobrazen na Obr. 14.



Obr. 14 a) Teplotní závislost pozice pásu symetrické valenční vibrace  $\nu_s(\text{CH}_2)$ , b) asymetrické valenční vibrace  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  pro ceramid C2.

### b) CH<sub>2</sub> nůžková vibrace

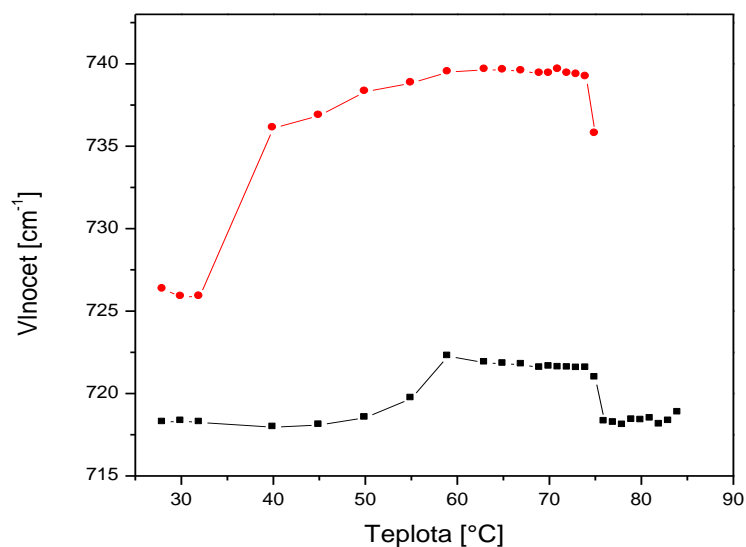
Pozice vibračního pásu přiřazená nůžkové (scissoring) vibraci při 30 °C byla zaznamenána jako dublet při vlnočtu 1464,2 a 1470,4 cm<sup>-1</sup>. Zvýšením teploty k 65 °C hodnota vlnočtu klesla na 1465,2 cm<sup>-1</sup> a pás je patrný pouze jako jednotlivý. Při teplotě 76 °C došlo k posunu k 1464,2 cm<sup>-1</sup>. Teplotní vývoj nůžkové vibrace je zobrazen na Obr. 15. Z tvaru absorpčního pásu lze usoudit spolu s rocking vibrací o jaké uspořádání subcely lipidových řetězců se jedná.



Obr. 15 Teplotní vývoj CH<sub>2</sub> nůžkové vibrace ceramidu C2.

### c) Oblast 700 až 900 cm<sup>-1</sup>

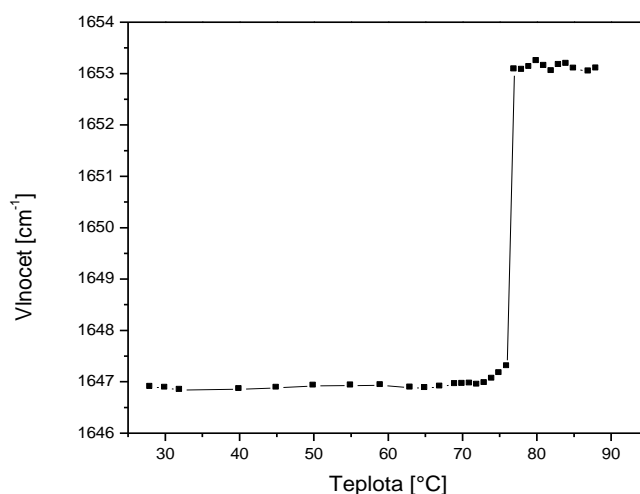
V tomto spektrálním rozmezí jsou pro analýzu fázového chování lipidů významné deformační rocking vibrace  $\delta(\text{CH}_2)$ . Vibrační pás je patrný jako dublet při vlnočtu 718,2 cm<sup>-1</sup> a 726,3 cm<sup>-1</sup> za laboratorní teploty (Obr. 12). Dosažením teploty 75 °C je pozorovatelný pouze jednotlivý pás při vlnočtu 720,9 cm<sup>-1</sup>. Teplotní vývoj této vibrace je zobrazen na Obr. 16. Vlnocet 897,4 cm<sup>-1</sup> je přiřazen  $\delta(\text{CH}_3)$  rocking vibraci při teplotě 28 °C a zvýšením teploty k tranzici se snižuje k hodnotě 888,9 cm<sup>-1</sup>.



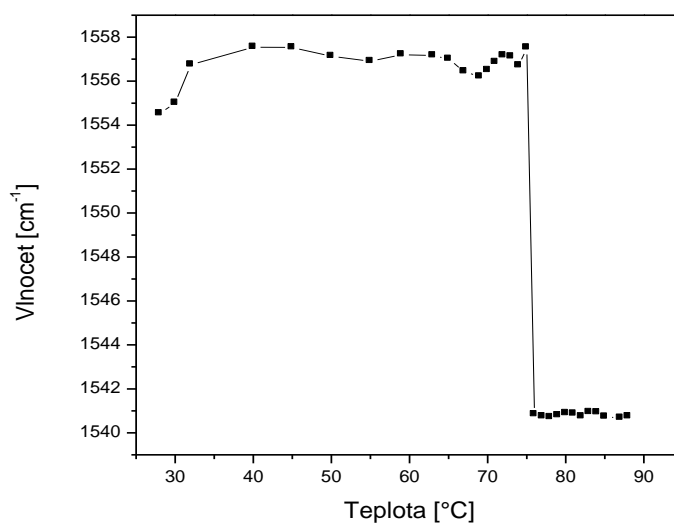
Obr. 16 Teplotní vývoj CH<sub>2</sub> deformační vibrace ceramidu C2.

#### d) Deformační vibrace amidové struktury

Pozice vibračního pásu při 28 °C 1646,9 cm<sup>-1</sup> je přiřazena deformační vibraci karbonylu amidové struktury (Amid I). Při teplotě 77 °C dochází k posunu k 1653,2 cm<sup>-1</sup> (Obr. 17). Při nižších hodnotách vlnočtu 1545,0 cm<sup>-1</sup> je pozorovatelný pás δ(NH) skupiny (Amid II). Dosažením teploty tranzice je zaznamenán při nižších hodnotách 1540,9 cm<sup>-1</sup>. Teplotní vývoj deformační NH vibrace je uveden na Obr. 18.



Obr. 17 Teplotní vývoj vibrace amidu I pro ceramid C2.



Obr. 18 Teplotní vývoj vibrace amidu II ceramidu C2.

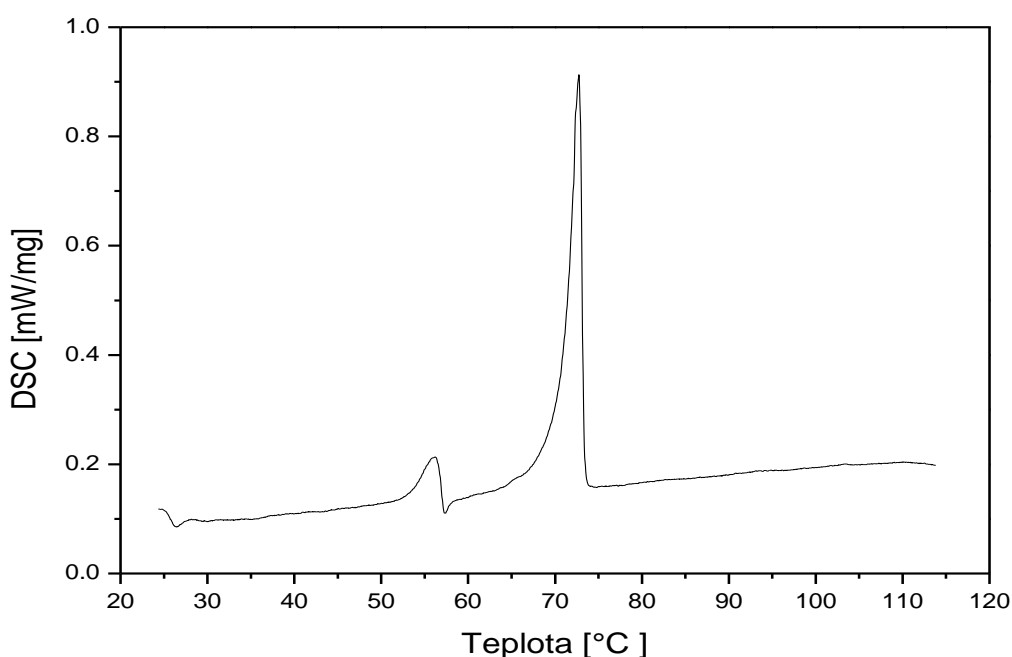
#### e) NH a OH valenční vibrace

Při nejvyšších vlnočtech jsou zaznamenány vibrační pásy náležící NH a OH skupinám. Při teplotě 28 °C je při 3293,1 cm<sup>-1</sup> pozorována valenční vibrace NH skupiny a při vyšším vlnočtu 3346,2 cm<sup>-1</sup> valenční vibrace OH skupiny. Teplotou fázového přechodu je již detekovatelný pouze jeden široký vibrační pás při 3313,7 cm<sup>-1</sup>, kde jednotlivé vibrace splývají.

## 4.2. Ceramid C4

### 4.2.1. DSC

Na DSC termogramu lze pozorovat dva endotermní fázové přechody. K prvnímu dochází při onsetu teploty 53,2 °C a je doprovázen změnou entalpie 3,9 kJ/mol. Druhý nastal při nepatrném zvýšení teploty s teplotním onsetem při 70,9 °C a změnou entalpie 36,8 kJ/mol (Obr. 19).

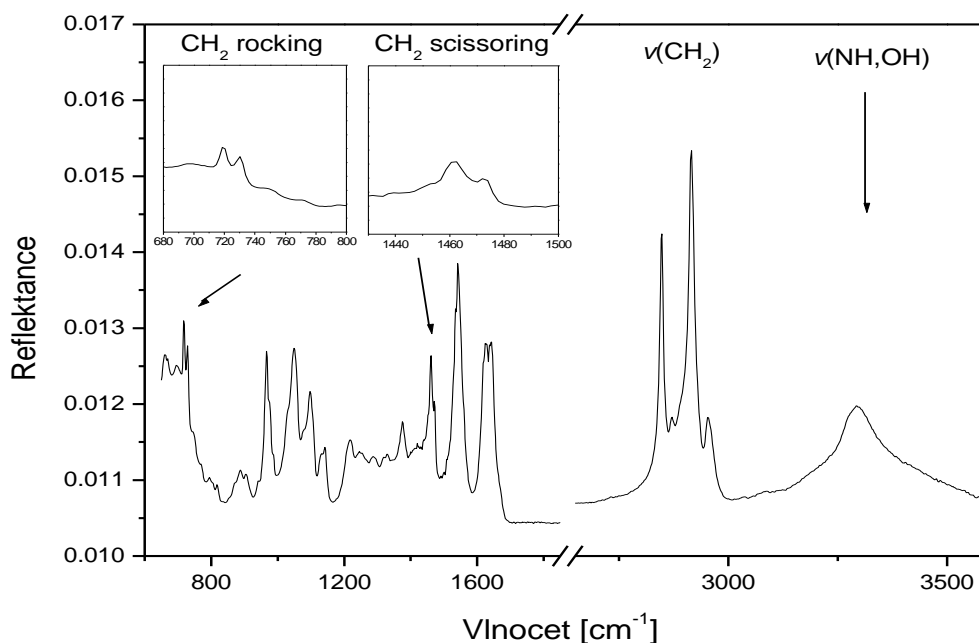


Obr. 19 DSC křivka ceramidu C4.

### 4.2.2. ATR-FTIR spektroskopie

Měření probíhalo v teplotním intervalu od 25 do 85 °C po 2 °C, při teplotě v oblasti fázového přechodu po 1 °C. Byly zaznamenány dva fázové přechody. Počátek prvního fázového přechodu nastává při teplotě 42 °C a přetrvává až k teplotě 47 °C a druhý lze pozorovat od teploty 65 až 67 °C. IR spektrum C4 je zobrazeno na Obr. 20 spolu s přiřazenými absorpčními pásy v Tab. 2. Teplotní závislost vybraných částí spektra je uvedena na Obr. 21 při pokojové teplotě a teplotách po fázových přechodech.

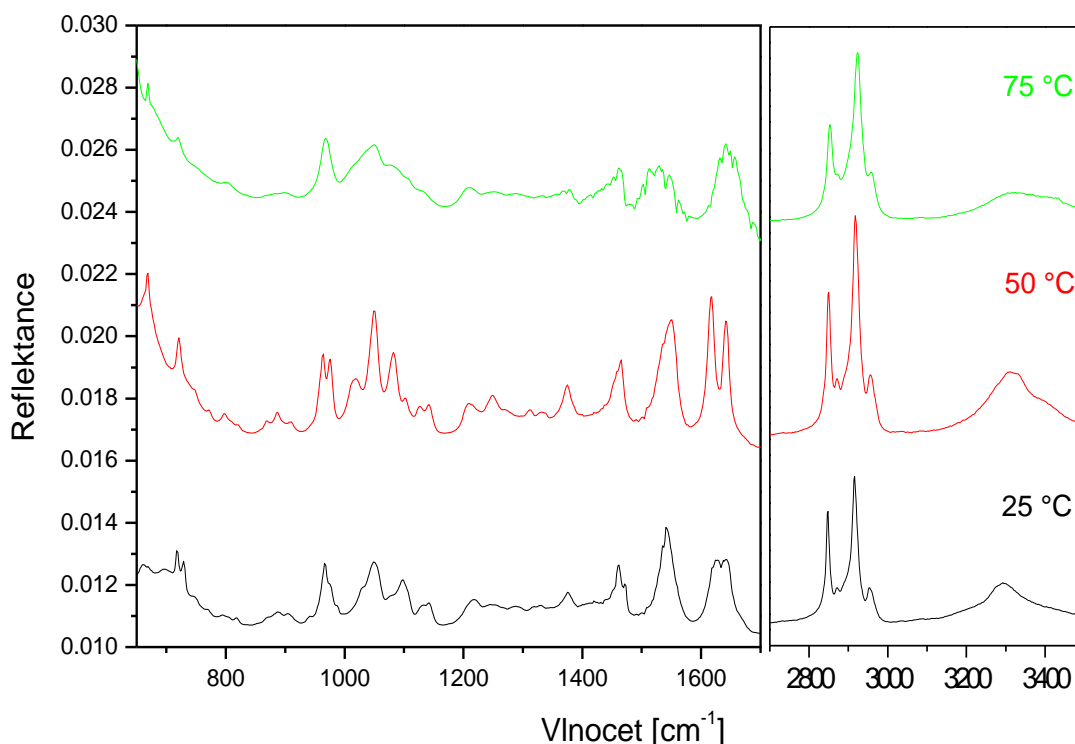




Obr. 20 IR spektrum C4 při pokojové teplotě. Šipky naznačují hlavní absorpční pásy se zvětšenými vibracemi rocking a scissoring vyznačující jejich rozštěpení.

Tab. 2 Přiřazení vybraných absorpčních pásů C4 při pokojové teplotě a při teplotách po obou fázových přechodech

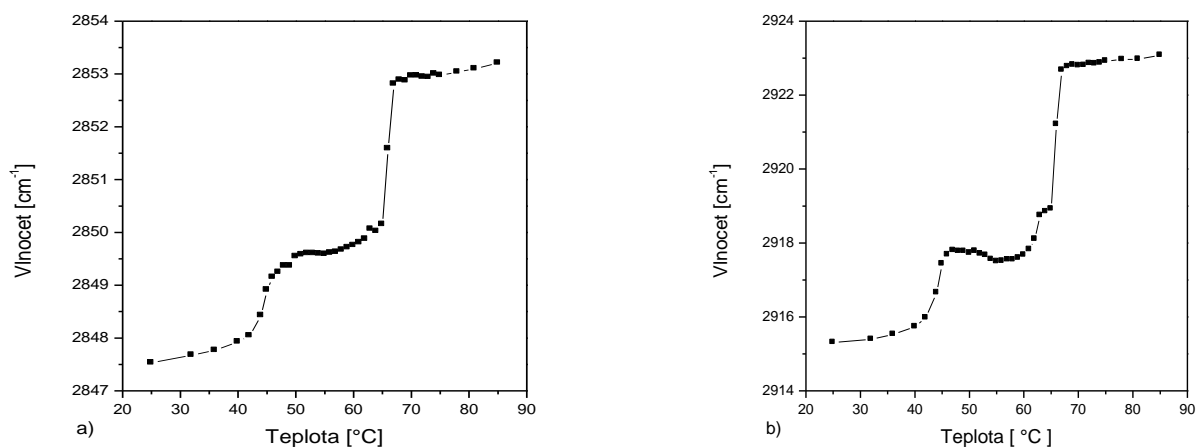
IR (cm <sup>-1</sup> )			Přiřazení pásu
25 °C	50 °C	75 °C	
718,2	720,8		δ(CH <sub>2</sub> ) deformační, splitting
728,7			
966,7	963,6	968,1	out- of- plane C-H bending C=C
1049,3	1050	1049,39	ν(C-O) CH <sub>2</sub> -OH
1245,5	1249	1252	ν(C-O) CH-OH
1460,9	1465,1	1461,3	ν(CH <sub>2</sub> ) nůžková, splitting
1471			
1541,6	1550	1546,4	δ(NH) amid II
1624,5	1617,1		
1642,1	1642	1656,6	(C=O) amid I
2847,5	2849,5	2853	ν <sub>s</sub> (CH <sub>2</sub> ) sym. valenční
2870,9	2870,7		ν <sub>s</sub> (CH <sub>3</sub> )
2915,3	2917,7	2922,92	ν <sub>as</sub> (CH <sub>2</sub> ) asym. valenční
2953,2	2955,8		ν <sub>as</sub> (CH <sub>3</sub> )
3292,8	3311,1	3324,7	ν(NH,OH)



Obr. 21 Teplotní závislost IR spektra C4 v rozmezí vlnočtu- 650-1700  $\text{cm}^{-1}$  a 2700-3500  $\text{cm}^{-1}$  při teplotě 25, 50 a 75  $^{\circ}\text{C}$ .

**a) Oblast  $\text{CH}_2$  valenčních (stretching) vibrací – oblast 2848-2950  $\text{cm}^{-1}$**

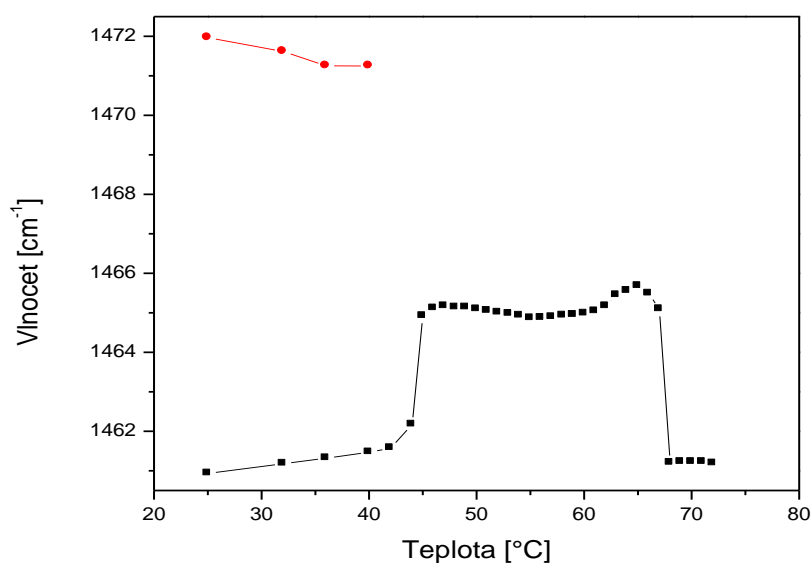
Při pokojové teplotě byl zaznamenán absorpční pás  $\nu_s(\text{CH}_2)$  při 2847,5  $\text{cm}^{-1}$ . Zvyšováním teploty k teplotě první tranzice 47  $^{\circ}\text{C}$  došlo k posunu k 2849,5  $\text{cm}^{-1}$ , což naznačuje zvyšující se počet gauche konformerů v řetězci. Dalším zahříváním k teplotě 67  $^{\circ}\text{C}$  byl pozorován vlnčet 2853,0  $\text{cm}^{-1}$ . Asymetrická stretching vibrace tvoří vibrační pás při hodnotě 2915,3  $\text{cm}^{-1}$ , při prvním fázovém přechodu se hodnota zvyšuje k 2917,7  $\text{cm}^{-1}$  a při druhém k 2922,9  $\text{cm}^{-1}$ . Obr. 22 znázorňuje teplotní závislosti obou valenčních vibrací, na kterých jsou patrné dva fázové přechody.



Obr. 22 a) Teplotní závislost absorpčních pásů symetrické stretching vibrace  $\nu_s(\text{CH}_2)$ , b) asymetrické stretching vibrace  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  ceramidu C4.

### b) $\text{CH}_2$ nůžková vibrace

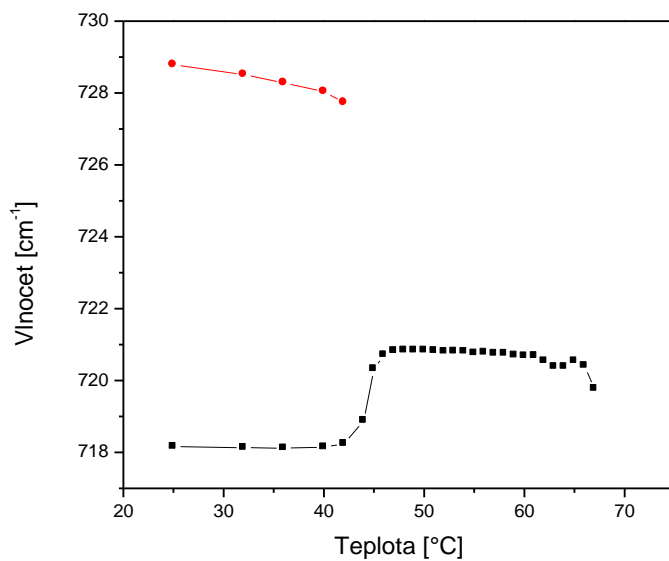
Absorpční pás náležící této deformační vibraci lze pozvat na Obr. 20 jako dvojitý (splitting) při vlnočtu 1460,9 a 1471,0  $\text{cm}^{-1}$  za pokojové teploty. Při teplotě 47  $^\circ\text{C}$  je viditelný už jen jednotlivý pás při 1465,1  $\text{cm}^{-1}$  a teplotou druhého přechodu dochází ke snížení hodnoty k 1461,3  $\text{cm}^{-1}$  (Obr. 21). Na Obr. 23 je zobrazen teplotní vývoj této vibrace.



Obr. 23 Teplotní vývoj  $\text{CH}_2$  nůžkové vibrace pro ceramid C4.

### c) Oblast vlnočtu od 700 do 900 $\text{cm}^{-1}$

U deformačního rocking vibračního pásu je také pozorováno jeho rozštěpení. Hodnoty vlnočtu jsou 718,2 a 728,7  $\text{cm}^{-1}$  při 25 °C. Zvýšením teploty je pozorován pouze jeden pás při vlnočtu 720,8  $\text{cm}^{-1}$  a při teplotě druhého fázového přechodu již není pozorovatelný. Na Obr. 24 je zobrazen teplotní vývoj rocking vibrace.

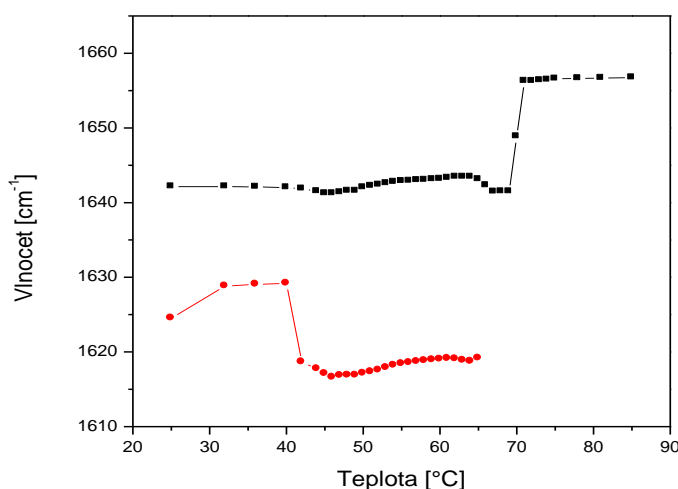


Obr. 24 Teplotní vývoj  $\text{CH}_2$  deformační vibrace pro ceramid C4.

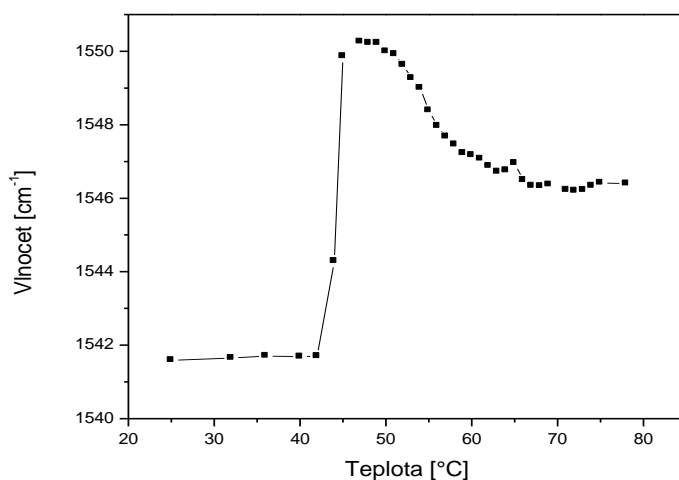
#### d) Oblast valenčních C=O vibrací a amidové struktury

Vibrační pás přiřazený karbonylu (Amid I) je pozorovatelný jako dvojitý při pokojové teplotě a vlnočtu 1627,0 a 1642,0  $\text{cm}^{-1}$ . Dosažením teploty první tranzice došlo k posunu k hodnotám 1617,0 a 1642,0  $\text{cm}^{-1}$ . Dalším zvýšením teploty k 75 °C je pozorovatelný pouze jeden pás se snížením vlnočtu k 1641,5  $\text{cm}^{-1}$  (Obr.25). Snížení frekvence této vibrace a splitting může vypovídat o přítomnosti vodíkových vazeb.

Deformační vibrace NH skupiny (Amid II) je zaznamenána při 25 °C při 1541,6  $\text{cm}^{-1}$  s nepatrným náznakem rozštěpení, což může opět vypovídat o přítomnosti vodíkových vazeb. Při první tranzici dochází k posunu k 1465,0  $\text{cm}^{-1}$  a při druhé dojde ke snížení k 1461,3  $\text{cm}^{-1}$  (Obr. 26).



Obr. 25 Teplotní vývoj valenční vibrace amidu I pro ceramid C4.



Obr. 26 Teplotní vývoj deformační vibrace amidu II pro ceramid C4.

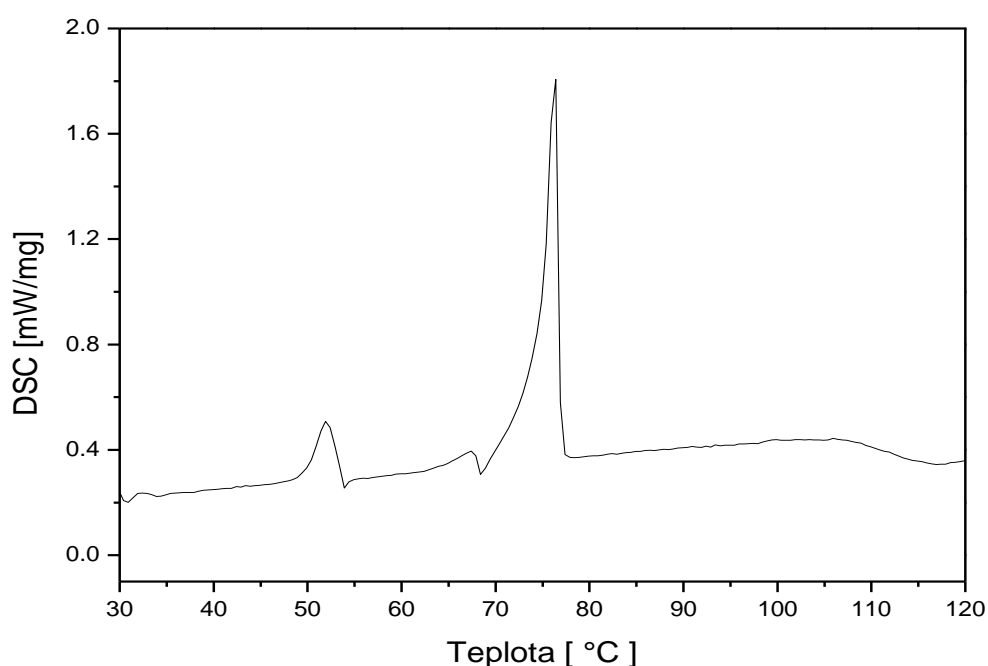
**e) NH a OH vibrace**

Valenční vibrace NH a OH skupiny jsou pozorovatelné v jednom vibračním pásu při  $3292,8 \text{ cm}^{-1}$  za laboratorní teploty. Při teplotě  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  došlo k posunu k hodnotě  $3311,1 \text{ cm}^{-1}$  a při teplotě  $75 \text{ }^\circ\text{C}$  po fázovém přechodu k  $3324,7 \text{ cm}^{-1}$ .

### 4.3. Ceramid C6

#### 4.3.1. DSC

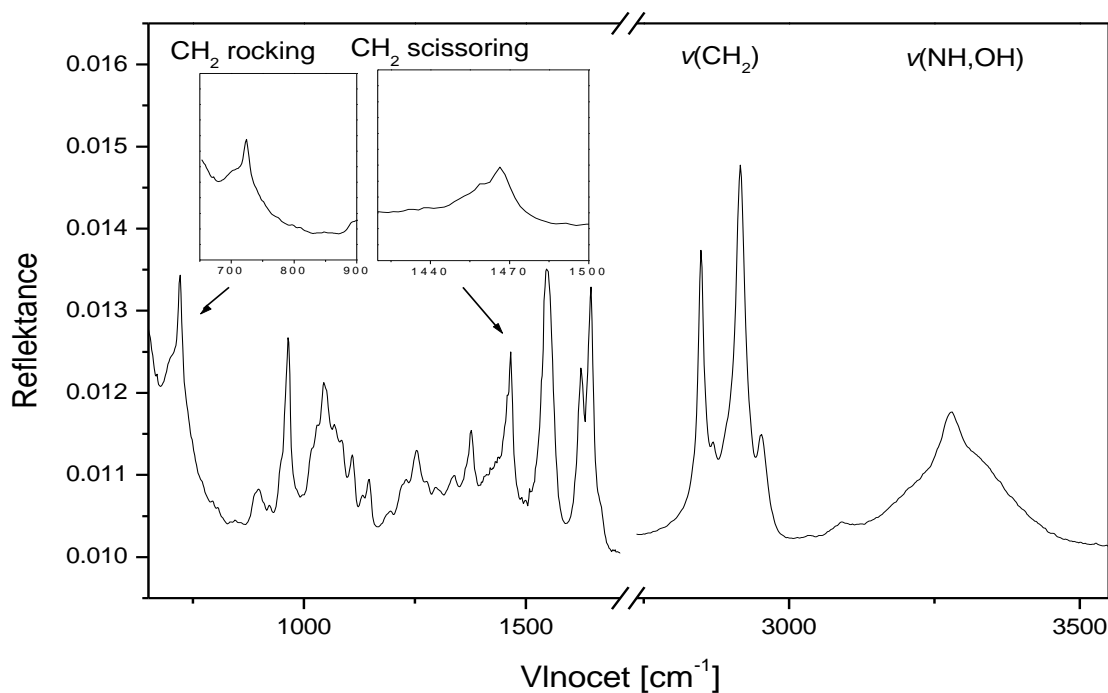
Stejně jako u ceramidu C4 lze pozorovat dva endotermní fázové přechody. K prvnímu dochází při teplotním onsetu 49,8 °C a je doprovázen změnou entalpie 12,9 kJ/mol. Při dalším zahřívání na teplotu 74,7 °C došlo k druhému přechodu se změnou entalpie 82,7 kJ/mol (Obr. 27).



Obr. 27 DSC termogram ceramidu C6.

#### 4.3.2. ATR-FTIR spektroskopie

Měření probíhalo v teplotním intervalu od 25 do 93 °C po 2 °C, v oblasti teplotní tranzice po 1 °C. IR spektrum za pokojové teploty je ukázáno na Obr.28. Se zvýšením teploty ke 42 °C došlo k prvnímu fázovému přechodu a ke druhému při teplotě 69 °C. Teplotní závislost spekter při různých teplotách je zobrazena na Obr. 29.

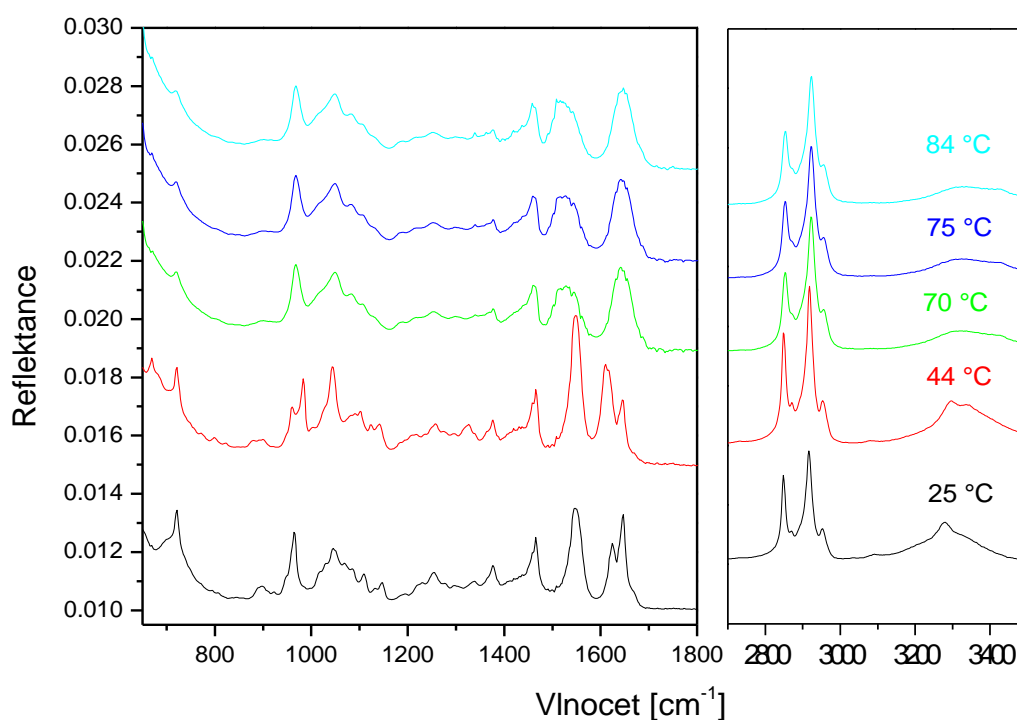


Obr. 28 IR spektrum C6 při pokojové teplotě s vyznačenými absorpčními pásy charakteristickými pro lipidy.

Tab. 3 Přiřazení vybraných absorpčních pásů C6 při pokojové teplotě a při teplotách po fázových přechodech.

IR (cm <sup>-1</sup> )			Přiřazení pásu
25 °C	50 °C	75 °C	
720,9	720,4		δ(CH <sub>2</sub> ) rocking
964,9	959	968,1	out-of-plane C-H bending C=C
1045,1	1040,6	1049,1	ν(C-O) CH <sub>2</sub> -OH struktury
1254,2	1255,4	1253	ν(C-O) CH-OH
1465,6	1465,9	1459,7	δ(CH <sub>2</sub> ) scissoring
1546,2	1546,5	1527,3	δ(NH) amid II
1624,3	1618,5		ν(C=O) amid I
1646,4	1645,5	1641,7	
2848,6	2849,2	2852,9	ν <sub>s</sub> (CH <sub>2</sub> ) symetrická stretching
2915,9	2917,7	2922,5	ν <sub>as</sub> (CH <sub>2</sub> ) asymetrická
3279,5	3296,4	3324,5	ν(NH,OH)

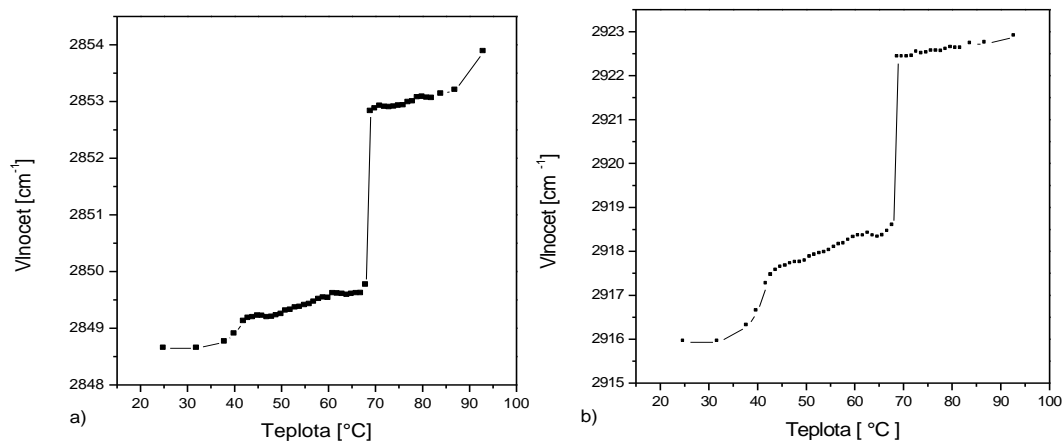




Obr. 29 Teplotní závislost IR spektra C6 v rozmezí vlnočtu od 650-1800  $\text{cm}^{-1}$  a 2700-3500  $\text{cm}^{-1}$  při daných teplotách.

#### a) Oblast $\text{CH}_2$ valenčních vibrací

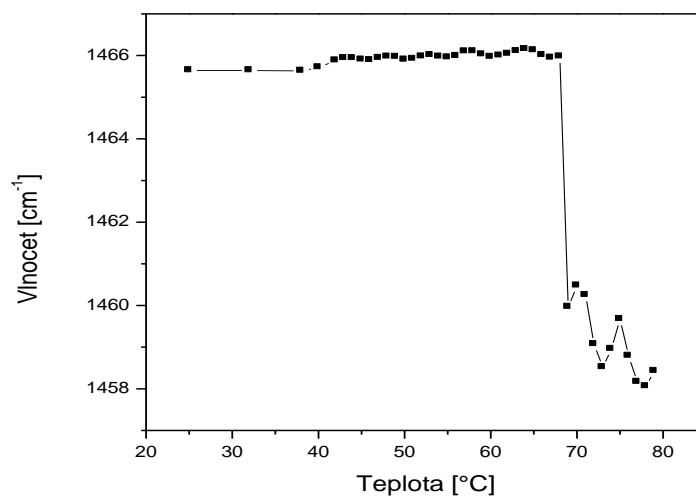
Za laboratorní teploty jsou symetrické a asymetrické stretching vibrace pozorovány při 2848,6 a 2915,9  $\text{cm}^{-1}$ . Na Obr. 30a je nepatrně vidět první tranzice při teplotě 42 °C a posun na 2849,2  $\text{cm}^{-1}$ . Další zvýšení pozice  $\nu_s(\text{CH}_2)$  pásu je zřetelné při druhé tranzici při teplotě 70 °C. Při tání dochází k posunu k 2852,9  $\text{cm}^{-1}$ . U asymetrické vibrace je zaznamenán posun na 2917,8  $\text{cm}^{-1}$  při teplotě 42 °C, při teplotě 75 °C na 2922,5  $\text{cm}^{-1}$  (Obr. 30b).



Obr. 30 Teplotní závislost valenční stretching vibrace ceramidu C6- a) symetrické, b) asymetrické.

### b) CH<sub>2</sub> nůžková vibrace

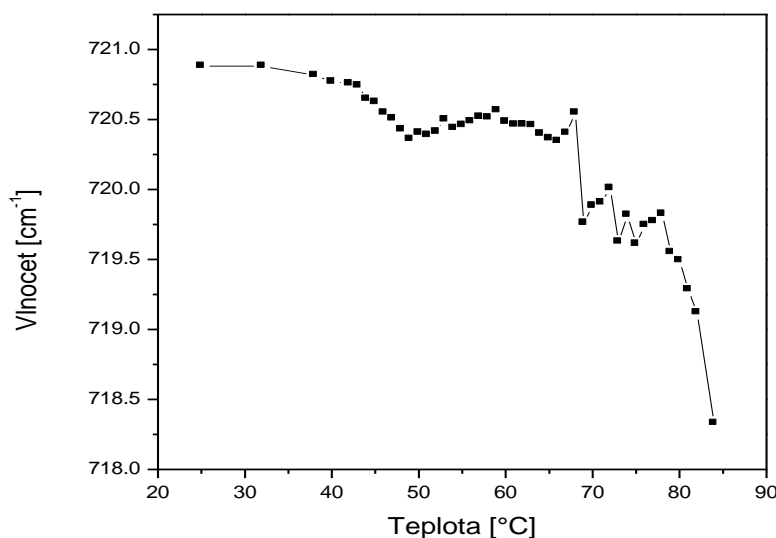
Vibrační pás přiřazený této vibraci je ukazatelem pro určení typu uspořádání lipidových řetězců. Při pokojové teplotě byl zaznamenán při vlnočtu 1465,6 cm<sup>-1</sup>, při teplotě 75 °C po proběhlém fázovém přechodu s posunem ke 1459,7 cm<sup>-1</sup> (Obr. 29). Teplotní vývoj této vibrace je zobrazen na Obr. 31.



Obr. 31 Teplotní vývoj CH<sub>2</sub> nůžkové vibrace pro ceramid C6.

### c) Oblast rocking vibrací

Vibrační pás  $\text{CH}_2$  rocking vibrace byl pozorován za pokojové teploty při  $720,9 \text{ cm}^{-1}$ . Při teplotě  $42 \text{ }^\circ\text{C}$ , při které došlo k prvnímu fázovému přechodu je tato vibrace pozorována při vlnočtu  $720,4 \text{ cm}^{-1}$ . Dosažením teploty  $69 \text{ }^\circ\text{C}$ , teploty druhého fázového přechodu není vibrační pás pozorovatelný. Teplotní průběh této vibrace je zobrazen na Obr. 32.

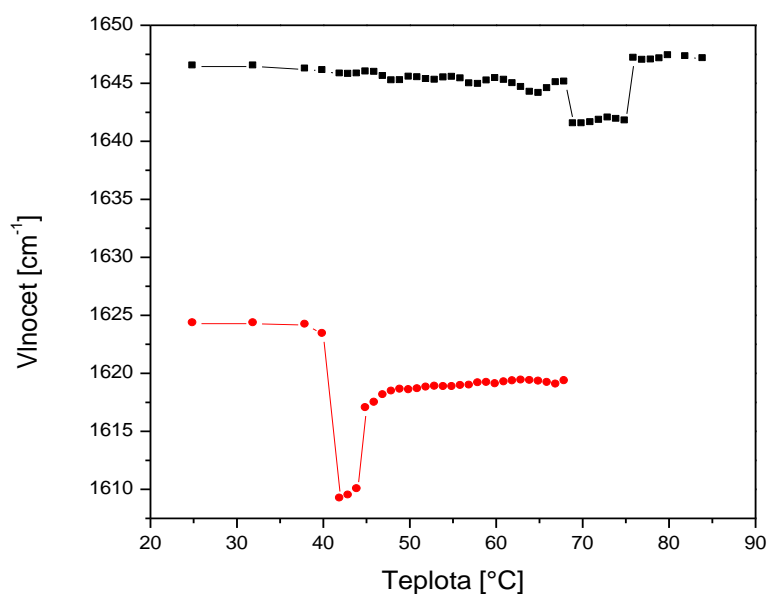


Obr. 32 Teplotní vývoj deformační  $\text{CH}_2$  rocking vibrace ceramidu C6.

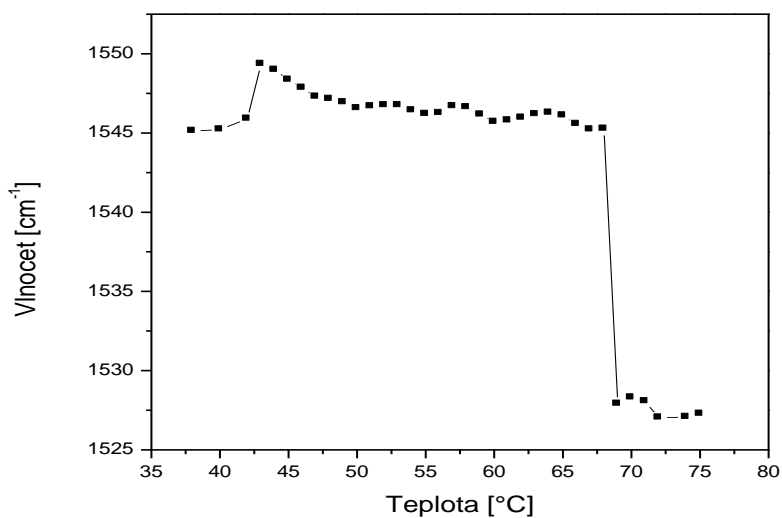
### d) Oblast $\text{C}=\text{O}$ vibrací amidové struktury

Valenční vibrace karbonylu (Amid I) je pozorována při  $1624,3$  a  $1646,5 \text{ cm}^{-1}$  za pokojové teploty (Obr. 28). Při teplotě  $42 \text{ }^\circ\text{C}$ , při které došlo k prvnímu fázovému přechodu se pozice posouvá na  $1609,2 \text{ cm}^{-1}$  a  $1645,8 \text{ cm}^{-1}$ . Při teplotě po druhém fázovém přechodu je pozorovatelný pouze jednotlivý pás při  $1641,7 \text{ cm}^{-1}$  (Obr. 29). Teplotní vývoj amidu I je pozorovatelný na Obr. 33.

Deformační vibrace  $\text{NH}$  skupiny (Amid II) má pozici při vlnočtu  $1546,2 \text{ cm}^{-1}$  při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Během první fázové tranzice při  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  došlo k posunu k  $1545,9 \text{ cm}^{-1}$  a zvýšením teploty ke  $43 \text{ }^\circ\text{C}$  je zřetelné zvýšení pozice na  $1549,3 \text{ cm}^{-1}$ . Dosažením teploty hlavní tranzice ( $70 \text{ }^\circ\text{C}$ ) došlo k poklesu na hodnotu  $1528,3 \text{ cm}^{-1}$  (Obr. 34).



Obr. 33 Teplotní vývoj valenční vibrace amidu I ceramidu C6.



Obr. 34 Teplotní vývoj deformační vibrace amidu II ceramidu C6.

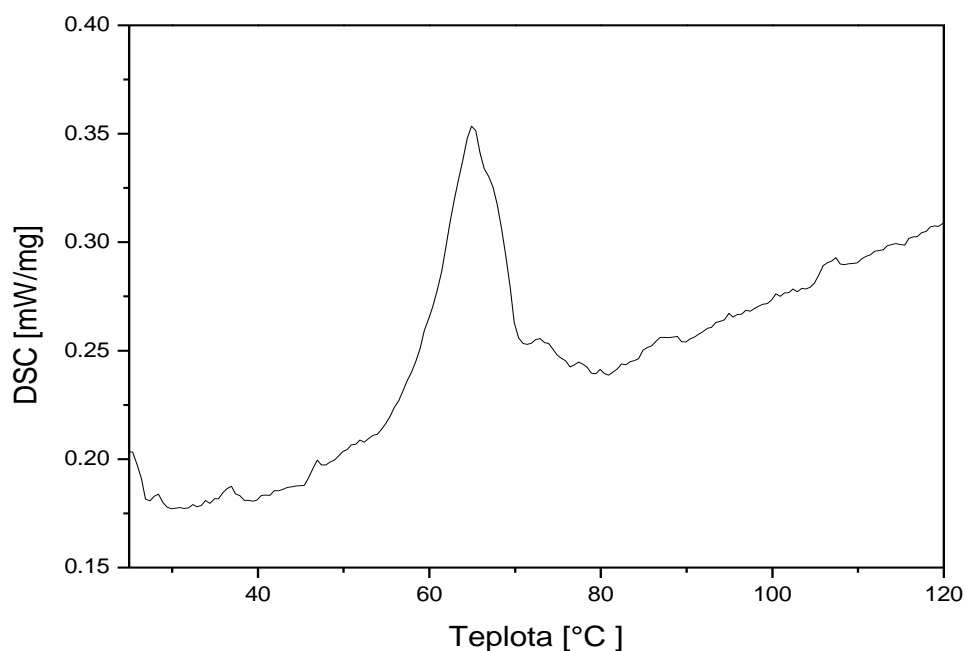
#### e) NH a OH vibrace

Pozice vibrací obou skupin splývá v jednotlivý vibrační pás při hodnotě vlnočtu  $3279,5 \text{ cm}^{-1}$  za laboratorní teploty. Po proběhlé hlavní tranzici při teplotě  $75 \text{ °C}$  došlo k posunu k hodnotě  $3325,5 \text{ cm}^{-1}$ .

## 4.4. Ceramid C8

### 4.4.1. DSC

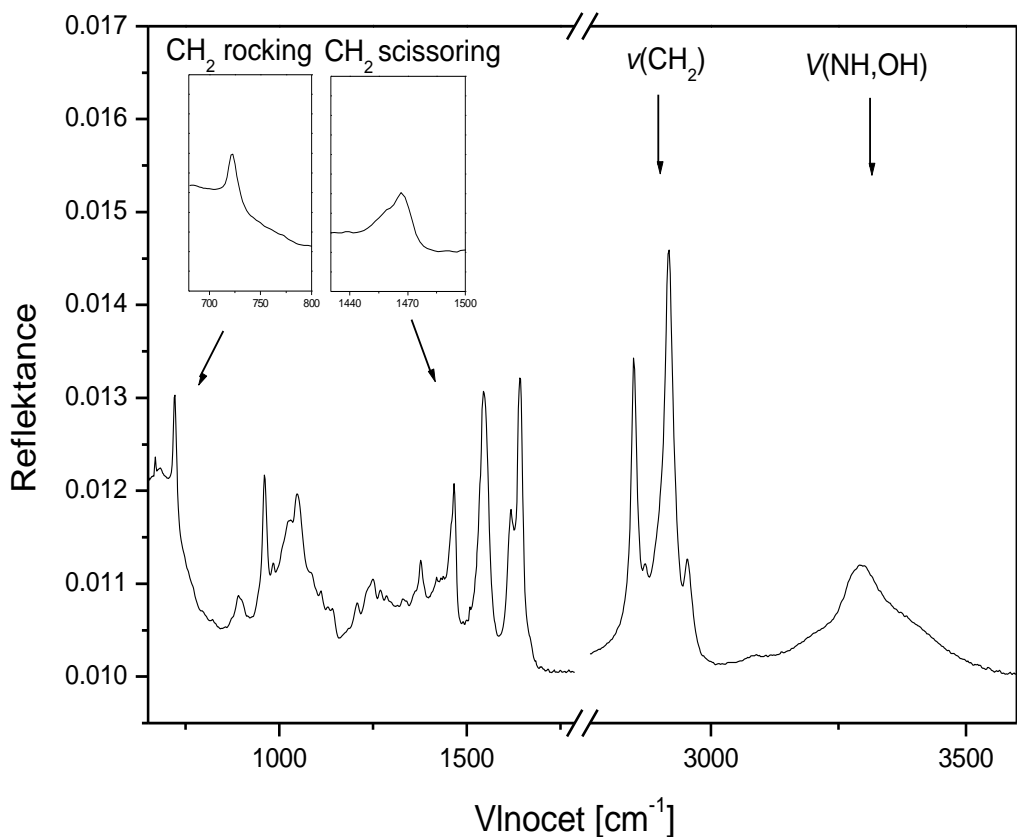
Obr. 35 znázorňuje DSC termogram ceramidu C8 s širokým endotermním fázovým přechodem při teplotním onsetu 58,5 °C a doprovázený změnou entalpie 30,6 kJ/mol.



Obr. 35 DSC křivka ceramidu C8.

### 4.4.2. ATR-FTIR spektroskopie

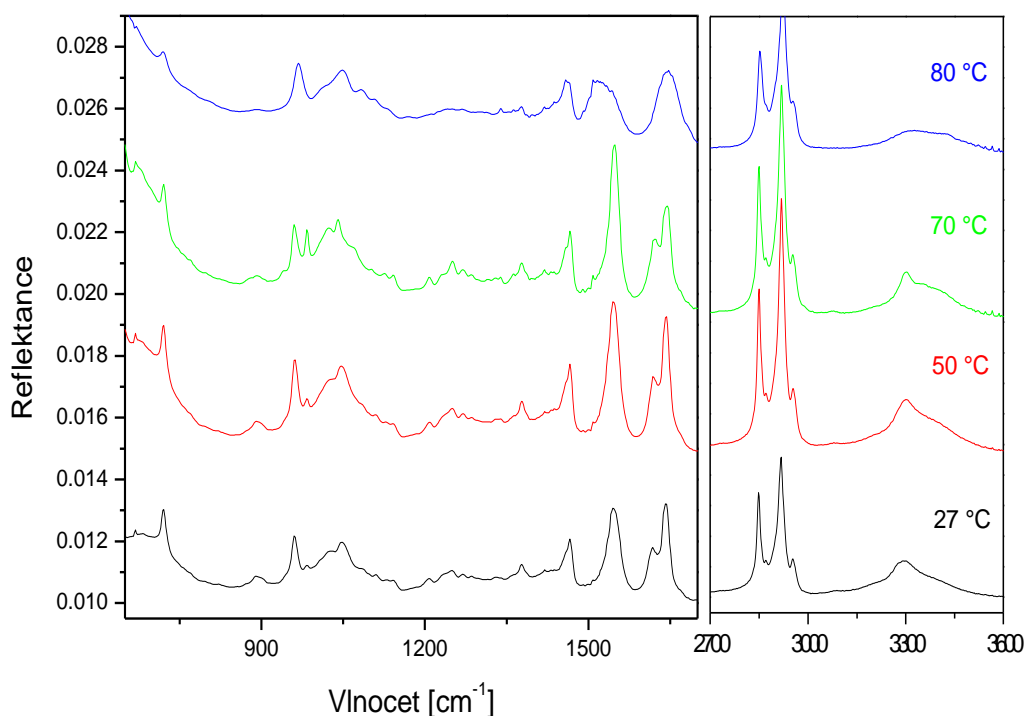
IR měření probíhalo v teplotním intervalu od 27 °C do 85 °C. Při 70 °C teplotě došlo k fázovému přechodu. Záznam IR spektra ceramidu C8 při 25 °C je znázorněn na Obr. 36, šipky znázorňují hlavní absorpční pásy charakteristické pro lipidy, které jsou přiřazeny jednotlivým funkčním skupinám v Tab. 4. IR spektra při teplotách před a po fázovém přechodu znázorňuje Obr. 37.



Obr. 36 IR spektra ceramidu C8 při laboratorní teplotě s vybranými úseky vlnočtu charakteristickými pro lipidy.

Tab. 4 Přiřazení vybraných IR pásů C8 při pokojové teplotě a při teplotě po fázových tranzicích.

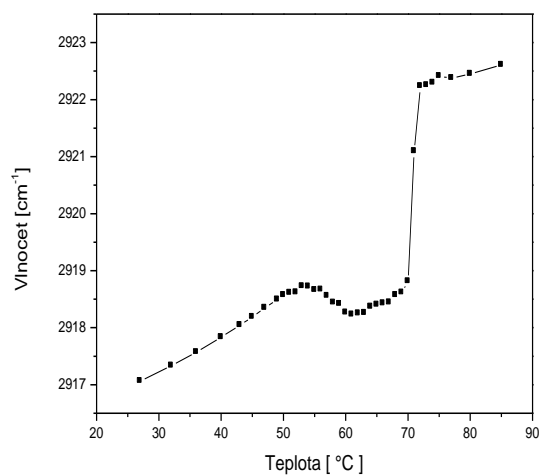
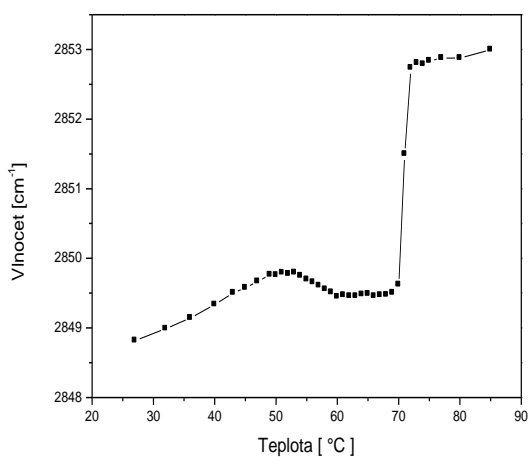
IR (cm <sup>-1</sup> )		Přiřazení pásu
<b>27 °C</b>	<b>80 °C</b>	
720,4	720	δ(CH <sub>2</sub> ) rocking
960,9	968,2	out-of-plane C-H bending C=C
1047,4	1048,8	ν(C-O) CH <sub>2</sub> -OH
1465,7	1458,2	δ(CH <sub>2</sub> ) scissoring
1545,3	1508,6	δ(NH) amid II
1617,5		ν(C=O) amid I
1642	1646,9	
2848,8	2852,9	ν <sub>s</sub> (CH <sub>2</sub> ) symetrická stretching
2917,1	2922,4	ν <sub>as</sub> (CH <sub>2</sub> ) asymetrická stretching
3291,5	3326	ν(NH,OH)



Obr. 37 Teplotní závislost IR spektra ceramidu C8 při teplotách 27, 50, 70 °C před proběhlou tranzicí a při 80 °C po tranzici.

#### a) Oblast CH<sub>2</sub> valenčních vibrací

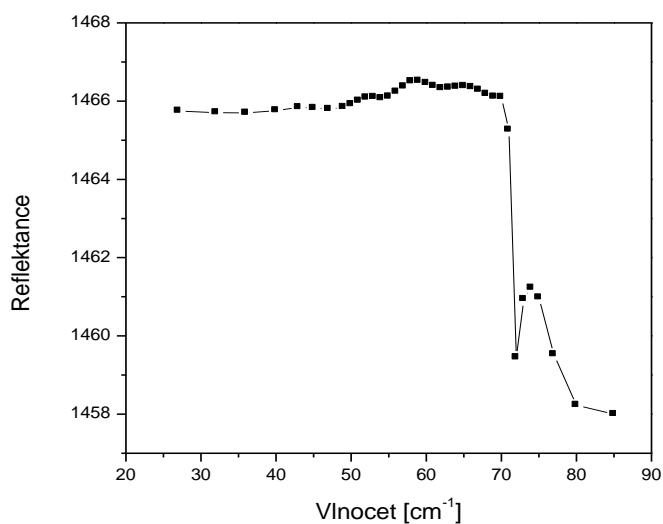
Symetrická valenční vibrace je zaznamenána na IR spektru při pokojové teplotě při 2848,8 cm<sup>-1</sup> a asymetrická má hodnotu vlnočtu 2917,1 cm<sup>-1</sup>. Na Obr. 38 je zobrazena teplotní závislost těchto vibrací. Nejprve je pozorovatelný pozvolný nárůst pozice  $\nu_s$ CH<sub>2</sub> i  $\nu_{as}$ CH<sub>2</sub> k 50 °C s hodnotami vlnočtu  $\nu_s$  2849,8 cm<sup>-1</sup> a  $\nu_{as}$  2918,6 cm<sup>-1</sup> a pak opět pokles na 2849,4 cm<sup>-1</sup> a 2918,2 cm<sup>-1</sup>. Dramatický vzestup nastal při teplotě 70 °C na hodnoty  $\nu_s$  2851,5 cm<sup>-1</sup> a  $\nu_{as}$  2921,1 cm<sup>-1</sup>.



Obr. 38 Teplotní závislost C8 symetrické a asymetrické CH<sub>2</sub> valenční vibrace.

### b) CH<sub>2</sub> nůžková vibrace

Na Obr. 36 můžeme pozorovat singlet při 1465,8 cm<sup>-1</sup> přiřazený této vibraci. Při teplotě 80 °C po proběhlém fázovém přechodu dochází k posunu k 1458,2 cm<sup>-1</sup> (Obr. 36). Na Obr. 39 můžeme shlédnout teplotní vývoj nůžkové vibrace.

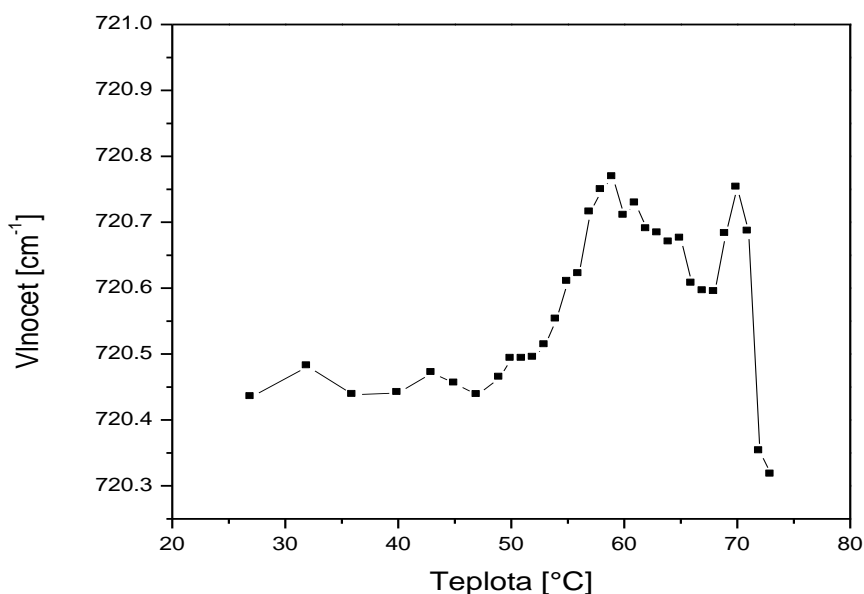


Obr. 39 Teplotní závislost deformační nůžkové vibrace pro ceramid C8.



### c) Oblast CH<sub>2</sub> deformační (rocking) vibrace

Za pokojové teploty je tento vibrační pás zřetelný jako singlet při 720,4 cm<sup>-1</sup> (Obr. 36). Při 80 °C došlo k nepatrnému posunu k 720,0 cm<sup>-1</sup> (Obr. 37). Obr. 40 znázorňuje teplotní průběh rocking vibrace.

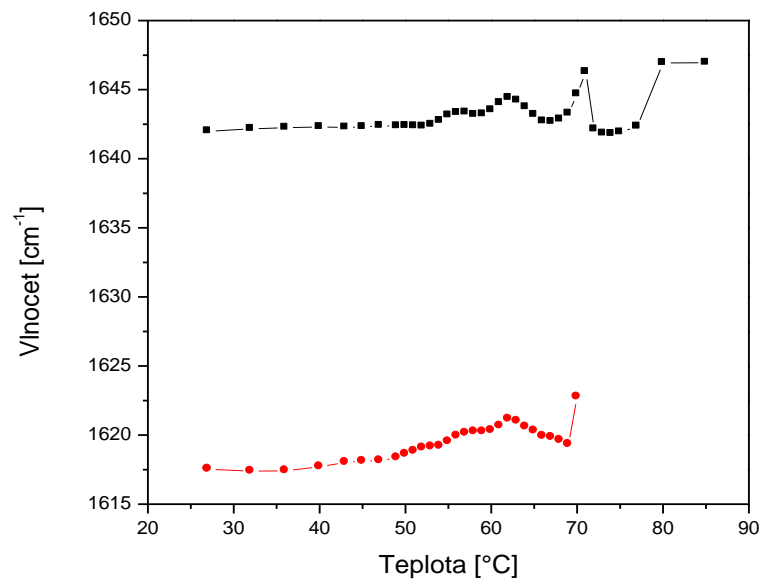


Obr. 40 Teplotní vývoj deformační CH<sub>2</sub> vibrace pro ceramid C8.

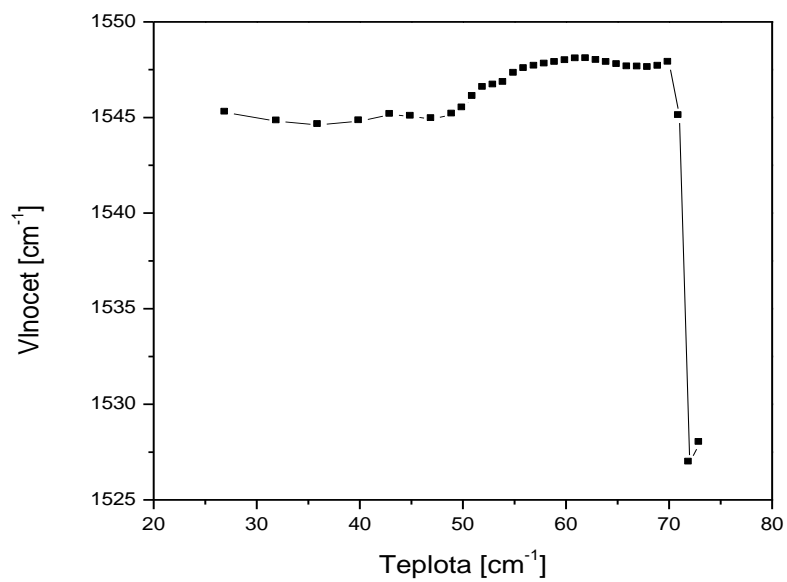
### d) Oblast vibrací amidové skupiny

Valenční vibrace amidu I je při laboratorní teplotě pozorovatelná při hodnotách 1617,5 a 1642,0 cm<sup>-1</sup> (Obr. 36). Při 50 °C je patrný vzestup pozice, další vzestup při 60 °C k hodnotám 1620,3 a 1643,5 cm<sup>-1</sup> a velká změna nastává při 70 °C, kdy je pozorovatelný pouze jeden vibrační pás při vlnočtu 1644,6 cm<sup>-1</sup> (Obr. 37). Teplotní průběh vibrace amidu I je znázorněn na Obr. 41.

Vibrační pás amidu II je při pokojové teplotě viditelný při vlnočtu 1545,3 cm<sup>-1</sup> (Obr. 36). Zvýšením teploty k 50 °C dochází k pomalému vzestupu pozice s maximem při teplotě 62 °C a vlnočtu 1548,0 cm<sup>-1</sup>. Dosažením teploty 72 °C dochází k prudkému snížení k hodnotě 1526,9 cm<sup>-1</sup> (Obr. 42).



Obr. 41 Teplotní vývoj valenční vibrace amidu I pro ceramid C8.

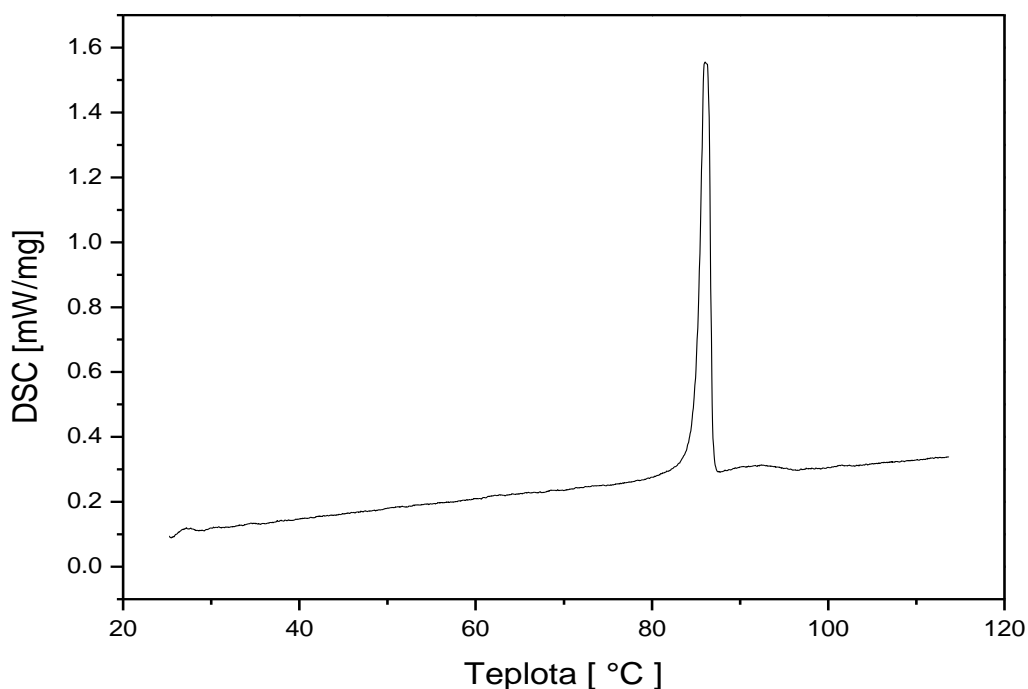


Obr. 42 Teplotní vývoj deformační vibrace amidu II pro ceramid C8.

## 4.5. Ceramid C12

### 4.5.1. DSC

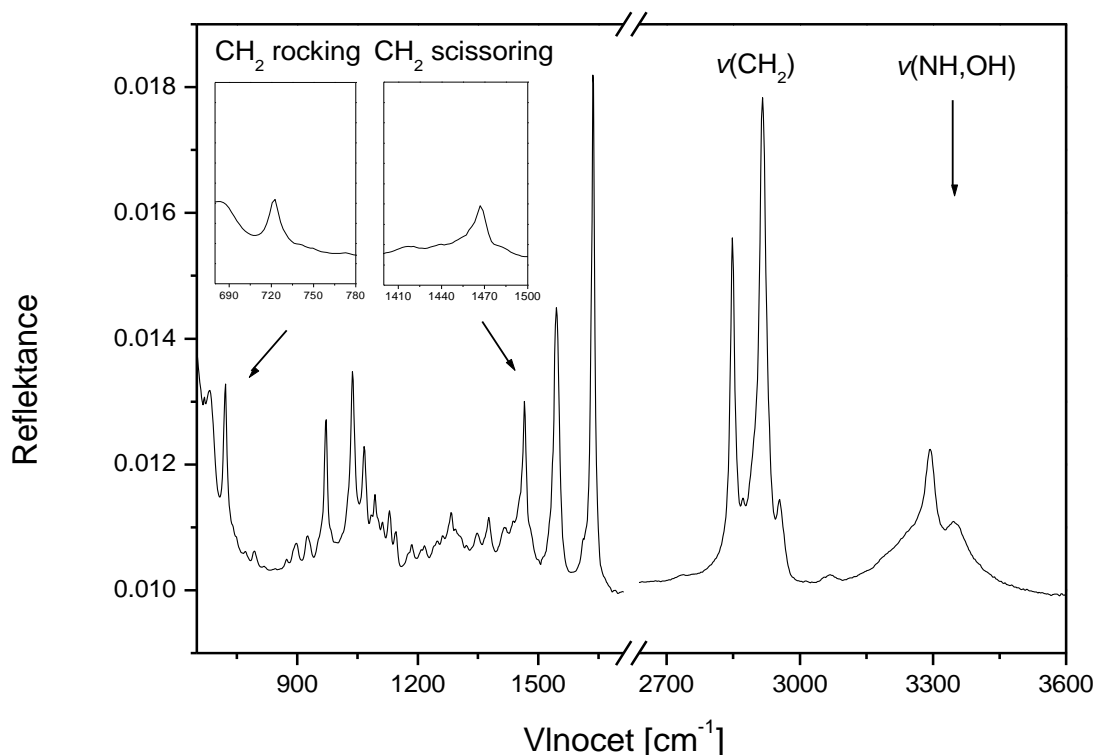
DSC křivka zobrazující teplotní průběh endotermního fázového přechodu u vzorku ceramidu C12 je zobrazena na Obr. 43. Je zřetelný jeden ostrý fázový přechod při onsetu 85 °C se změnou entalpie 62,9 kJ/mol.



Obr. 43 DSC termogram C12.

### 4.5.2. ATR-FTIR spektroskopie

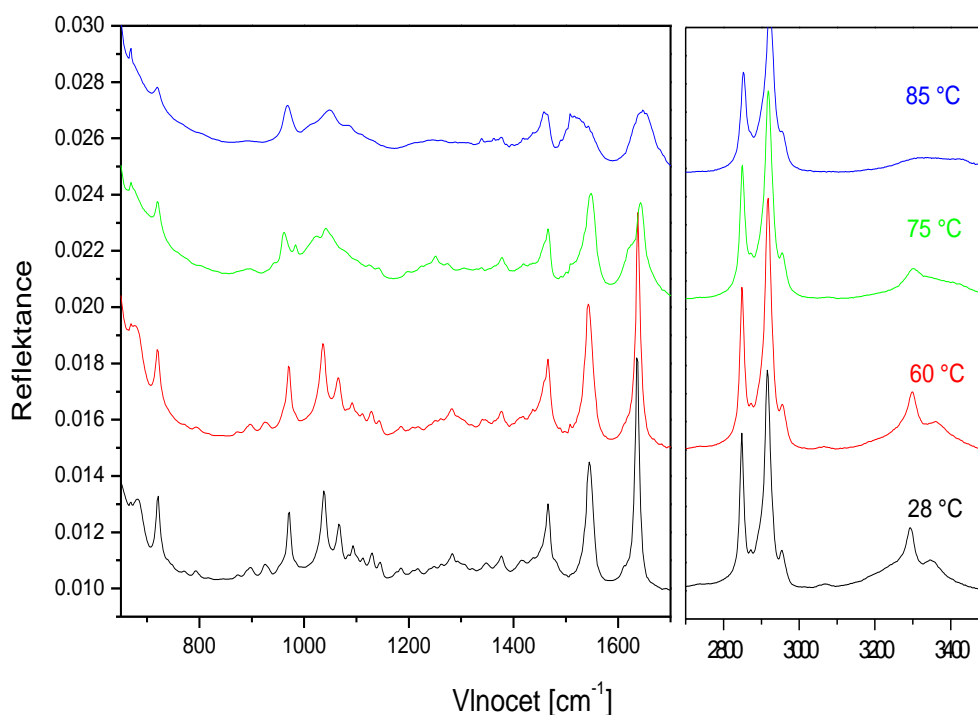
Měření infračervených spekter probíhalo v teplotním intervalu od 28 do 89 °C, zpočátku po 5 °C, poté po 2 °C a při blízkosti se teplotě fázové tranzice po 1 °C. Fázový přechod určující tání ceramidu byl dvoufázový, začínal při 75 °C, druhá fáze pak nastala při 83 °C. Záznam IR spektra při pokojové teplotě je zobrazen na Obr. 44 se zvětšenými absorpčními pásy stěžejními CH<sub>2</sub> rocking a scissoring vibracemi. Tab. 5 zahrnuje přiřazení hlavních absorpčních pásů funkčním skupinám v molekule ceramidu.



Obr. 44 Záznam IR spektra C12 při pokojové teplotě s vyznačenými hlavními absorpčními pásy.

Tab. 5 Přiřazení hlavních absorpčních pásů charakteristických pro lipidy při teplotě před a po fázovém přechodu.

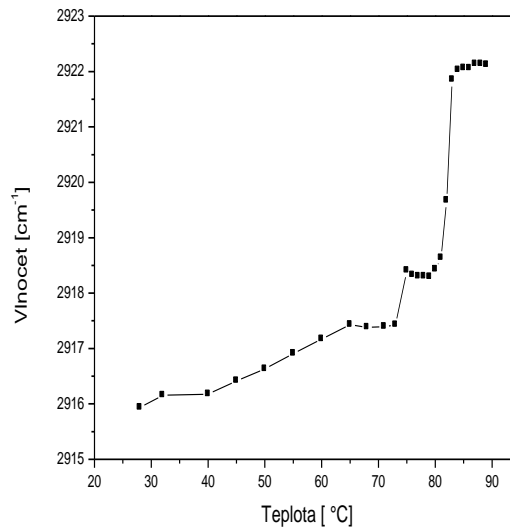
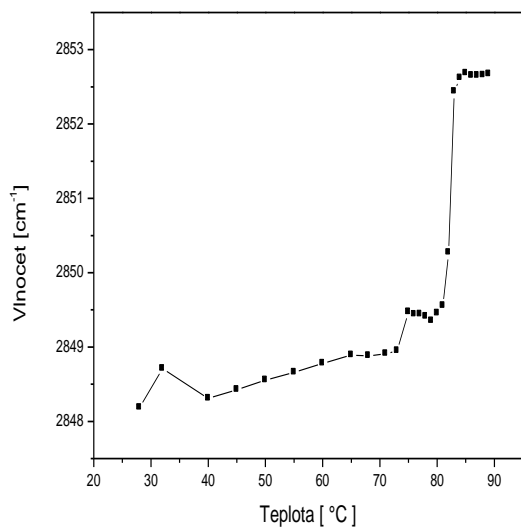
IR (cm <sup>-1</sup> )		Přiřazení pásu
<b>28 °C</b>	<b>85 °C</b>	
720,7	719,4	δ(CH <sub>2</sub> ) rocking
971,2	968,2	out-of-plane C-H bending C=C
1066,9		ν(C-O) CH <sub>2</sub> -OH struktury
1465,9	1458,2	δ(CH <sub>2</sub> ) scissoring
1545	1508,5	δ(NH) amid II
1636,2	1647,2	ν(C=O) amid I
2848,2	2852,7	ν <sub>s</sub> (CH <sub>2</sub> ) symetrická stretching
2915,9	2922,1	ν <sub>as</sub> (CH <sub>2</sub> ) asymetrická stretching
3293,1	3339,8	ν(NH)
3344		ν(OH)



Obr. 45 Teplotní závislost IR spekter při teplotách 28, 60, 75 a 85 °C a vlnočtu 650-1700 cm<sup>-1</sup> a 2700-3500 cm<sup>-1</sup>.

#### a) CH<sub>2</sub> stretching valenční vibrace

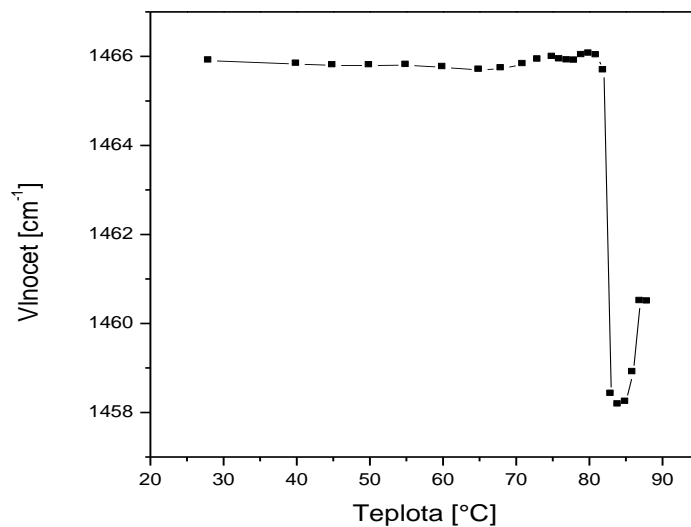
Fázový přechod u obou vibrací je dvoustupňový. Nejprve při 75 °C pozice symetrické vibrace stoupá na 2849,5 cm<sup>-1</sup> a následuje určitá stagnace na této pozici pak prudký vzestup při 83 °C na 2852,4 cm<sup>-1</sup>. Stejná situace je pozorovatelná u asymetrické vibrace při 75 °C stoupá k 2918,4 cm<sup>-1</sup> a poté prudký vzrůst při 83 °C na 2921,8 cm<sup>-1</sup>. Teplotní závislost těchto dvou absorpčních pásů je zobrazena na Obr. 46.



Obr. 46 Teplotní závislost symetrické a asymetrické CH<sub>2</sub> stretching vibrace ceramidu C12.

### b) CH<sub>2</sub> nůžková vibrace

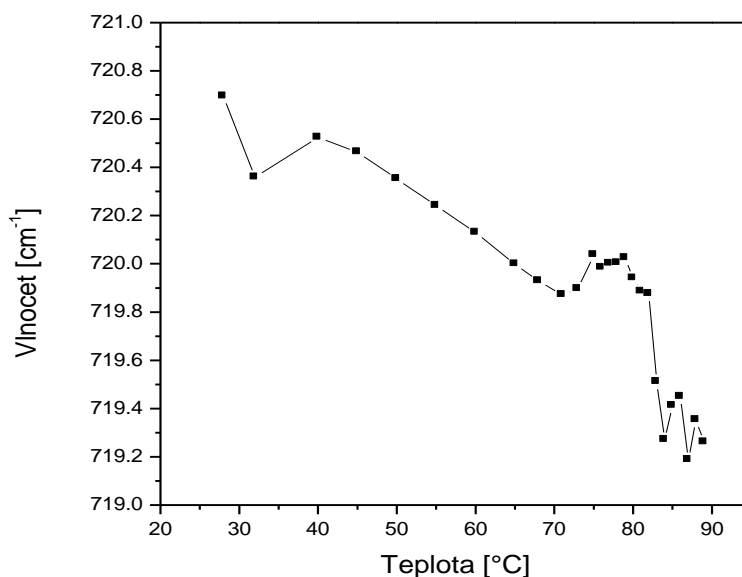
Na záznamu IR spektra na Obr. 44 je tento vibrační pás znázorněn jako singlet bez náznaku štěpení při vlnočtu 1465,9 cm<sup>-1</sup>. Při teplotě tání došlo k posunu k 1458,2 cm<sup>-1</sup>. Teplotní průběh je znázorněn na Obr. 47.



Obr. 47 Teplotní vývoj deformační nůžkové vibrace ceramidu C12.

### c) CH<sub>2</sub> deformační (rocking) vibrace

Na Obr. 44 je tento absorpční pás zvětšený a patrný jako jednotlivý pás bez štěpení při pokojové teplotě a vlnočtu 720,7 cm<sup>-1</sup>. Teplotní závislost při teplotách před a po tranzici je vyznačena na Obr. 48. Při teplotě 85 °C dojde k nepatrnému posunu k 719,4 cm<sup>-1</sup>. Nepřítomností štěpení do dvou absorpčních pásů rocking a scissoring vibrace lze vyloučit orthorhombické uspořádání při teplotách pod 70 °C.



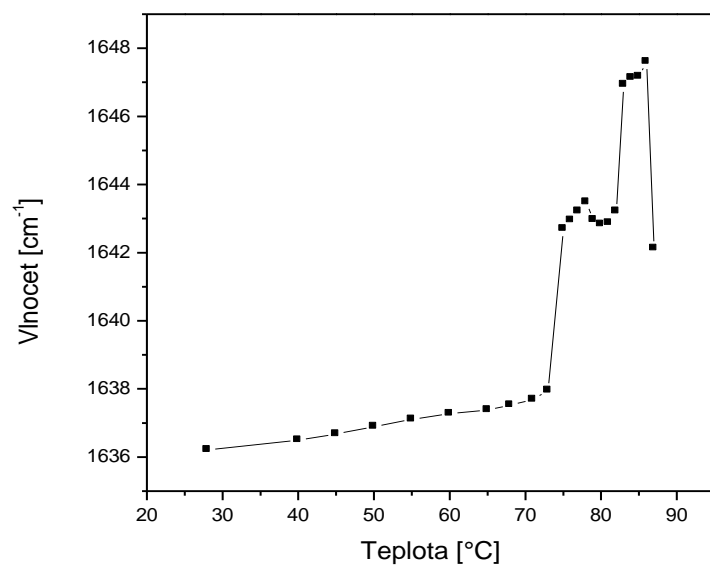
Obr. 48 Teplotní vývoj deformační (rocking) CH<sub>2</sub> vibrace pro ceramid C12.

### d) Vibrace amidové struktury

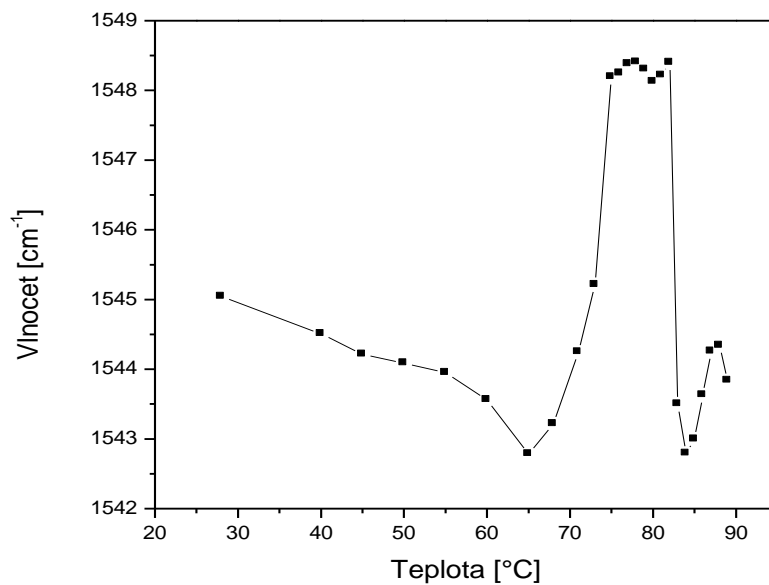
Vibrační pás karbonylu (Amid I) je přiřazený vlnočtu 1636,2 cm<sup>-1</sup>. Fázový přechod opět probíhá ve dvou fázích. Nejprve je patrný vzestup při 75 °C k hodnotě vlnočtu 1642,7 cm<sup>-1</sup> a při teplotě 83 °C dochází k dalšímu vzestupu k 1646,9 cm<sup>-1</sup> (Obr. 49).

Deformační vibrace NH skupiny (Amid II) je pozorovatelná při 1545,0 cm<sup>-1</sup>. Nejprve dochází k prudkému zvýšení pozice při 75 °C na hodnotu 1548,2 cm<sup>-1</sup> a dosažením teploty 82 °C můžeme pozorovat velkou změnu a snížení pozice k 1543,5 cm<sup>-1</sup> (Obr. 50).

Valenční vibrace NH skupiny je zaznamenána při 3293,1 cm<sup>-1</sup> spolu s OH skupinou při 3344,0 cm<sup>-1</sup>. Při teplotě 83 °C je pozorován pouze jeden široký vibrační pás při 3339,8 cm<sup>-1</sup>.



Obr. 49 Teplotní vývoj vibrace amidu I.



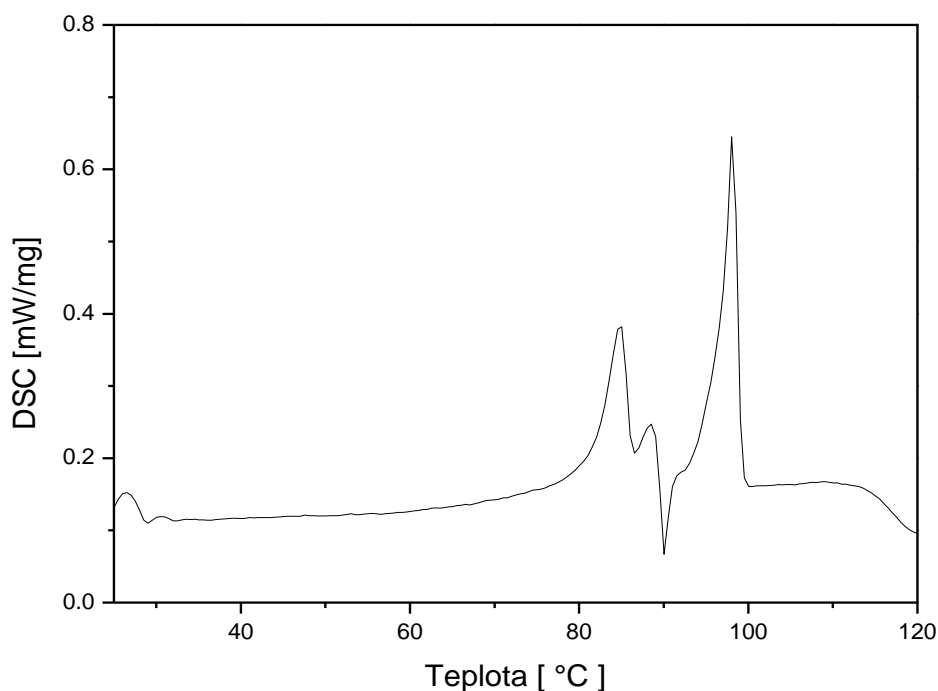
Obr. 50 Teplotní vývoj vibrace amidu II.



## 4.6. Ceramid C24 [NS]

### 4.6.1. DSC

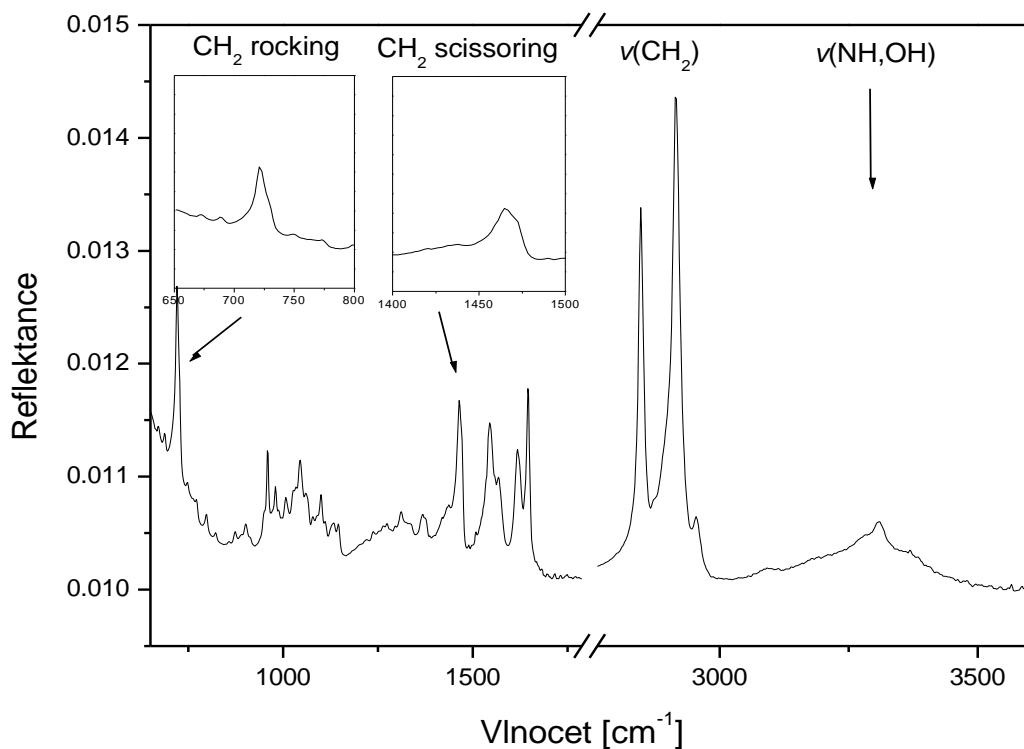
DSC křivka ceramidu [NS] (Obr. 51) vykazuje dvě endotermní fázové tranzice. První je charakterizována onsetem při teplotě 79,2 °C a je doprovázena změnou entalpie 31,5 kJ/mol – druhá tranzice onsetem při teplotě 99,4 °C se změnou entalpie 52,8 kJ/mol.



Obr. 51 DSC termogram ceramidu NS

### 4.6.2. ATR-FTIR spektroskopie

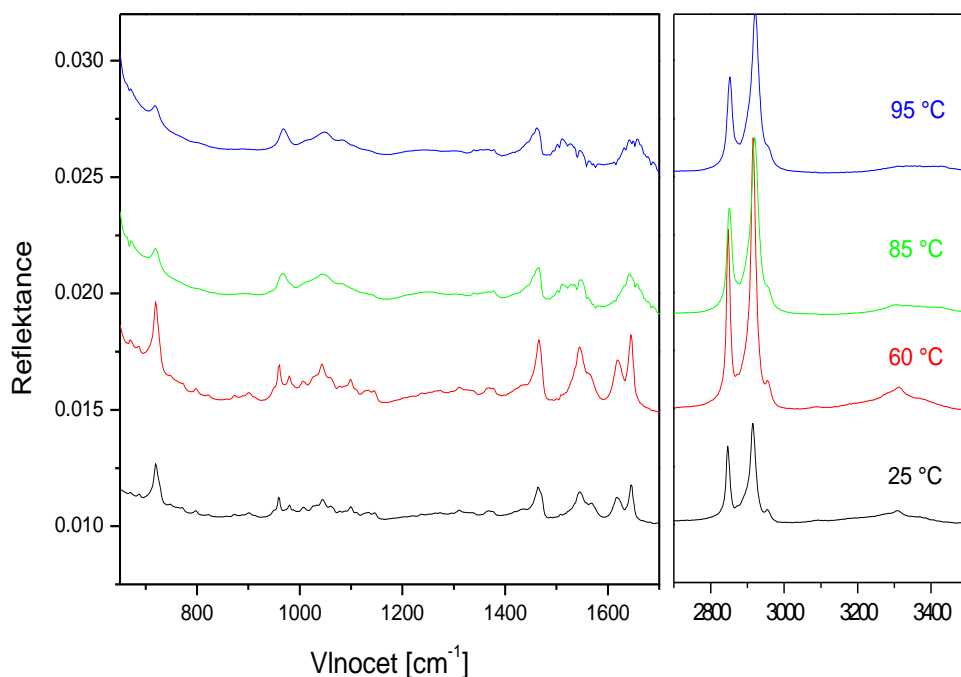
Měření probíhalo v teplotním intervalu od 25 °C do 105 °C. Jako u DSC měření jsou zřetelné dva fázové přechody při 73 a 86 °C. Obr. 52 znázorňuje IR spektrum při 25 °C s vyznačením hlavních absorpčních pásů. Přiřazení absorpčních pásů vibračním jednotlivých funkčních skupin v molekule ceramidu je popsáno v Tab. 6. Teplotní vývoj spektra je zobrazen na Obr. 53.



Obr. 52 Záznam IR spektra C24 při pokojové teplotě.

Tab. 6 Přiřazení absorpčních pásů vibračním jednotlivých funkčních skupin.

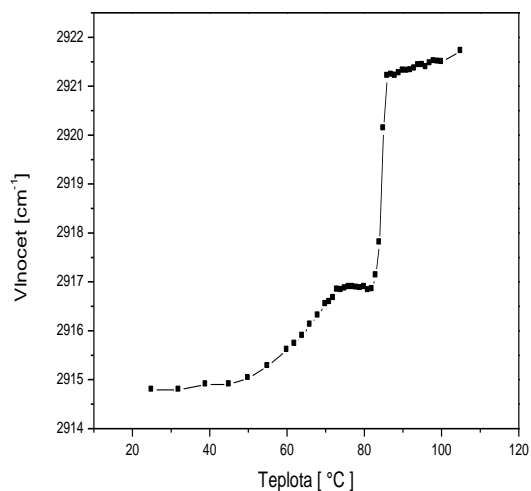
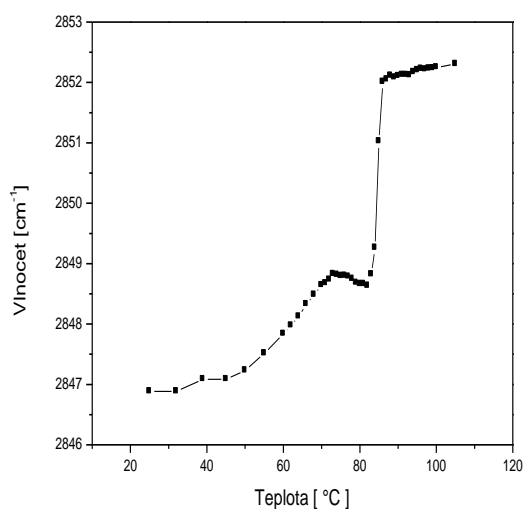
IR (cm <sup>-1</sup> )		Přiřazení pásu
<b>25 °C</b>	<b>88 °C</b>	
719,7	718,3	δ(CH <sub>2</sub> ) rocking
959,3	968,3	out-of-plane C-H bending C=C
1044,5	1048,6	ν(C-O) CH <sub>2</sub> -OH
1464,2	1461,6	δ(CH <sub>2</sub> ) scissoring
1545,2	1546,3	δ(NH)
1617,7		ν(C=O)
1645,7	1657,3	
2846,9	2852,1	ν(CH <sub>2</sub> ) symetrická stretching
2914,8	2921,2	ν(CH <sub>2</sub> ) asymetrická stretching
3309,4	3368,9	ν(NH,OH)



Obr. 53 Teplotní závislost IR spektra ceramidu C24 při teplotách 25, 60, 85 a 95 °C v rozmezí vlnočtů od 650-1700  $\text{cm}^{-1}$  a 2700-3500  $\text{cm}^{-1}$ .

#### a) Oblast $\text{CH}_2$ stretching vibrací

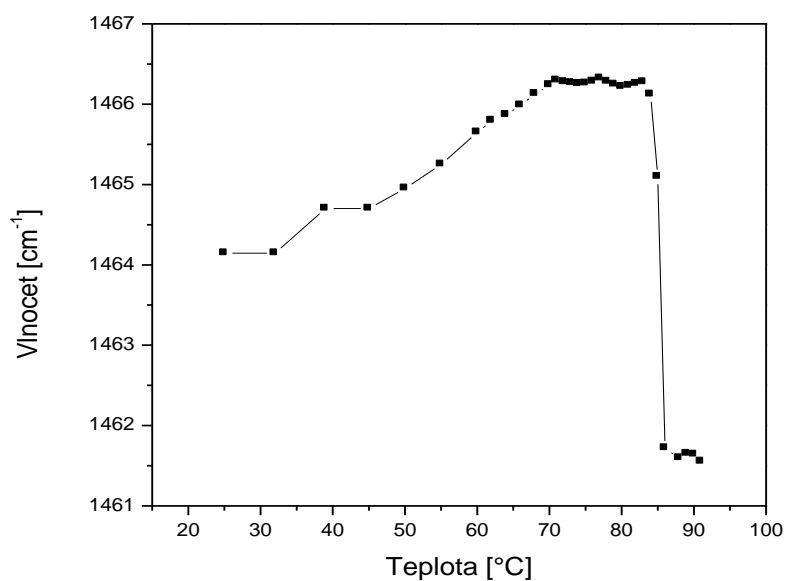
Při teplotě 25 °C jsou pozorovány symetrické vibrace při 2846,9  $\text{cm}^{-1}$  a asymetrické při 2914,8  $\text{cm}^{-1}$ . Nižší pozice vypovídají o vysoce uspořádaných trans konformerech v lipidových řetězcích. Při teplotě 60 °C lze pozorovat první fázovou tranzici s posunem symetrické vibrace k hodnotě 2847,8  $\text{cm}^{-1}$  a asymetrické k hodnotě vlnočtu 2915,6  $\text{cm}^{-1}$ . Zvyšováním teploty a dosažením druhé tranzice při teplotě 85 °C dochází ke zvýšení hodnot vlnočtu ke 2852,1  $\text{cm}^{-1}$  symetrické vibrace a ke 2921,2  $\text{cm}^{-1}$  asymetrické. Teplotní závislosti těchto vibračních pásů jsou zobrazeny na Obr. 54.



Obr. 54 Teplotní závislost symetrické a asymetrické CH<sub>2</sub> valenční vibrace ceramidu C24.

### b) CH<sub>2</sub> nůžková vibrace

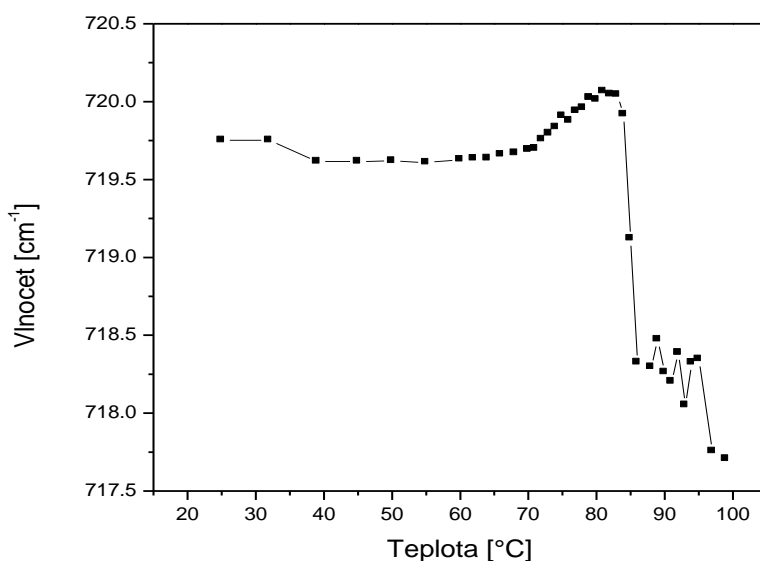
Nůžková vibrace CH<sub>2</sub> skupin je zaznamenána na IR spektru při 1464,2 cm<sup>-1</sup> a na Obr. 52 ji můžeme pozorovat jako jednotlivý pás. Dosažením teploty tranzice došlo k posunu k 1461,6 cm<sup>-1</sup>. Teplotní závislost je zobrazena na Obr. 55.



Obr. 55 Teplotní vývoj deformační CH<sub>2</sub> nůžkové vibrace ceramidu C24.

### c) CH<sub>2</sub> deformační rocking vibrace

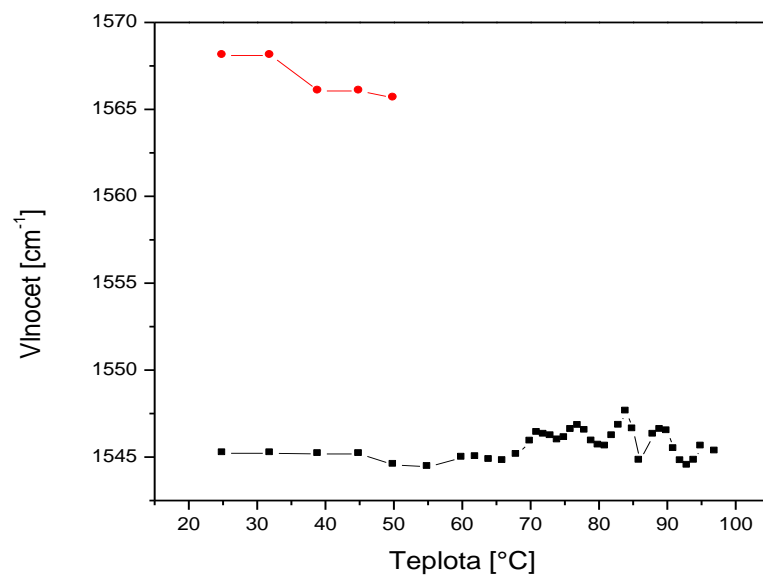
Při 25 °C se tato deformační vibrace vyskytuje při 719,8 cm<sup>-1</sup> za pokojové teploty. Tvar tohoto absorpčního pásu je zobrazen na Obr. 52, na kterém je patrný jednotlivý pás. Se zvýšením teploty ke změně nedochází, až dosažením teploty fázového přechodu dochází k nepatrnému posunu ke 718,3 cm<sup>-1</sup>. Teplotní závislost je na Obr. 56. Absencí dubletu rocking a scissoring vibrací můžeme vyloučit orthorhombické uspořádání.



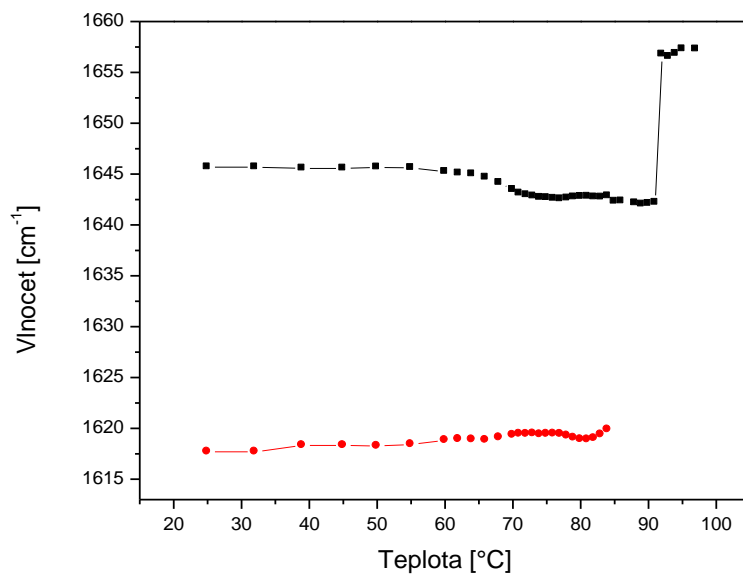
Obr. 56 Teplotní vývoj deformační CH<sub>2</sub> rocking vibrace ceramidu C24.

### d) Oblast vibrací amidové struktury

Vibrační pás karbonylu je možno pozorovat při 1617,7 a 1645,7 cm<sup>-1</sup> jako dublet (Obr. 52). Kolem teploty 70 °C pozice této vibrace slabě klesá na 1642,9 cm<sup>-1</sup>. Při 83 °C je viditelný pouze jeden vibrační pás při vlnočtu 1642,8 cm<sup>-1</sup> (Obr. 53). Teplotou tání pak dochází k nárůstu k 1657,3 cm<sup>-1</sup>. Deformační vibrace NH skupiny je pozorovatelná při 1545,2 a 1568,1 cm<sup>-1</sup> při 25 °C. Při 50 °C lze pozorovat pouze jednotlivý pás při 1544,6 cm<sup>-1</sup>, teplotou tání tj. 86 °C je pozice posunuta k 1546,3 cm<sup>-1</sup>. Teplotní závislosti jsou zobrazeny na Obr. 57 a 58. Valenční vibrace NH skupiny má pozici pásu při 3309,4 cm<sup>-1</sup> spolu s OH skupinou ve stejné oblasti se oba vibrační pásy překrývají. Teplotou tranzice pak dochází k posunu k 3368,9 cm<sup>-1</sup>.



Obr. 57 Teplotní vývoj deformační vibrace amidu II ceramidu C24.



Obr. 58 Teplotní vývoj vibrace amidu I pro ceramid C24.

## 5. DISKUZE

Ceramidy nacházející se v nativním stratum corneum jsou tvořeny bazí, což je buď sfingosin, fytosfingosin nebo  $\alpha$ -hydroxysfingosin, na kterou je amidicky vázána mastná kyselina. Délka řetězců takovýchto mastných kyselin se pohybuje mezi 16 až 30 uhlíků. Největší zastoupení má ovšem kyselina behenová (22 uhlíků) a tetrakosanová (24 uhlíků). Z tohoto důvodu bylo zvoleno fázové chování ceramidu C24 jako výchozí standard pro srovnání s ostatními krátkořetězcovými analogy.

### *Ceramid C24*

Při měření ceramidu C24 byly zaznamenány dva fázové přechody. DSC měřením tranzice nastaly při 79,2 °C a 99,4 °C, zatímco IR spektroskopie zaznamenala fázové přechody při teplotě 73 °C a 86 °C. Rozdíl v těchto teplotách odpovídá odlišnému způsobu měření u obou metod.

**Valenční CH<sub>2</sub> vibrace.** Za laboratorní teploty je pozice symetrické vibrace nejnižší ze všech vzorků ceramidů při vlnočtu 2846,9 cm<sup>-1</sup>, což naznačuje velmi vysoký stupeň uspořádání (*all-trans*) uhlovodíkových řetězců. Při 50 °C začíná pozice narůstat a při 73 °C dosahuje 2848,8 cm<sup>-1</sup>. Z toho lze soudit, že uspořádanost řetězců zahříváním klesá a postupně narůstá podíl *gauche* konformerů až do určité metastabilní fáze při 73 °C. Při druhé tranzici dojde k posunu pozice vlnočtu na hodnotu 2852 cm<sup>-1</sup> za teploty 86 °C, což odpovídá vysokému podílu *gauche* konformerů v lipidických řetězcích, které je typické pro fluidní fázi lipidů. Teplotní vývoj CH<sub>2</sub> asymetrické vibrace probíhá stejným způsobem jako  $\nu_s$ CH<sub>2</sub>.

**Deformační CH<sub>2</sub> vibrace.** Za pokojové teploty je vibrační pás CH<sub>2</sub> rocking vibrace zaznamenán jako jednotlivý. Nicméně detailní analýza tohoto pásu pomocí druhé derivace spektra potvrdila rozštěpení na dva píky při 719,2 a 727,0 cm<sup>-1</sup>. Toto štěpení mizí při první tranzici za teploty 73 °C a CH<sub>3</sub> rocking vibrace se posouvá na 719,8 cm<sup>-1</sup>. Zvyšováním teploty dochází stále k nárůstu pozice až na maximum vlnočtu 720 cm<sup>-1</sup> při 81 °C, potom dochází k prudkému poklesu na hodnotou 718,3 cm<sup>-1</sup> při 86 °C. Nůžková CH<sub>2</sub> vibrace za pokojové teploty sice též působí jako jednotlivý vibrační pás, ale i zde bylo potvrzeno štěpení na dva píky při 1464 a 1471 cm<sup>-1</sup>. Při 71 °C dochází ke splynutí obou pásů do jednoho na pozici 1466,3 cm<sup>-1</sup>. Poté nastává prudký pokles na hodnotu 1461,7 cm<sup>-1</sup> za teploty 86 °C.

Štěpení CH<sub>3</sub> rocking a CH<sub>2</sub> scissoring vibračních pásů do dubletů je typické pro uspořádání lipidických řetězců do rigidní orthorombické subcely. Při první fázové tranzici štěpení mizí a zároveň stoupá pozice valenční symetrické CH<sub>2</sub> vibrace, což naznačuje, že lipidy přecházejí do hexagonálního uspořádání s větší možností pohybu řetězců (30).

**Amid I a II vibrace.** Vibrační pás přiřazený valenční vibraci amidu I je za pokojové teploty pozorován jako dublet při vlnočtu 1617,7 a 1645,7 cm<sup>-1</sup>. K výrazným změnám dochází při hlavní tranzici při teplotě 84 °C, při které můžeme pozorovat pouze jednotlivý pás při vlnočtu 1642,8 cm<sup>-1</sup>. Podobnou situaci můžeme pozorovat i u amidu II, který je zřetelný jako dublet při vlnočtech 1545,2 a 1568,1 cm<sup>-1</sup>. Nízká pozice amidu I a vysoká pozice amidu II naznačuje existenci intermolekulárních vodíkových vazeb ve struktuře (30).

Při teplotě 50 °C dochází ke splnutí amidu II, což naznačuje, že první fázová tranzice je doprovázená změnou ve vodíkových vazbách v polární hlavě lipidu.

## **Ceramid C2**

Ceramid C2 je nejkratší analog použitý v sérii tohoto měření. Jeho termotropní chování vykazuje jeden fázový přechod při 83,6 °C (měřeno pomocí DSC) a při 74 °C (stanoveno pomocí IR).

**Valenční CH<sub>2</sub> vibrace.** Symetrická vibrace je při pokojové teplotě pozorována při vlnočtu 2848,2 cm<sup>-1</sup>, což vypovídá o vyšším počtu *gauche* konformerů a tím nižší uspořádanosti řetězců ve srovnání s ceramidem C24. Se zvyšující se teplotou počet *gauche* konformerů postupně dále narůstá. Dosažením teploty 76 °C po proběhlém fázovém přechodu nastává posun k hodnotě 2852,5 cm<sup>-1</sup>, což naznačuje přechod do fluidní fáze.

**Deformační CH<sub>2</sub> nůžkové a rocking vibrace.** Podobně jako u ceramidu C24 jsou po detailní analýze oba tyto vibrační pásy při pokojové teplotě viditelné jako dublety, δ(CH<sub>2</sub>) rocking při vlnočtu 718,2 a 726,3 cm<sup>-1</sup> a nůžková vibrace při 1464,2 a 1470,4 cm<sup>-1</sup>. Po proběhlém fázovém přechodu při teplotě 76 °C lze pozorovat vibrační pás δ(CH<sub>2</sub>) rocking jako jednotlivý při vlnočtu 718,3 cm<sup>-1</sup>. Štěpení obou těchto vibračních pásů naznačuje upořádání řetězců do orthorombické subcely.

**Amid I a II vibrace.** Termotropní chování na polární hlavě ceramidu je charakterizováno změnou pozic amidických vibračních pásů, ze kterých lze určit také



přítomnost vodíkových vazeb. Za pokojové teploty lze pozorovat u obou vibrací jednotlivé pásy bez náznaku štěpení. Vibrační pás amidu I je pozorovatelný za pokojové teploty při  $1646,9 \text{ cm}^{-1}$  a amidu II při  $1555,8 \text{ cm}^{-1}$ . Tyto pozice opět naznačují silné vodíkové vazby ve struktuře. Teplotní změny na polární hlavě probíhají současně se změnami na nepolární části pouze při hlavním fázovém přechodu za teploty  $75 \text{ °C}$ .

### ***Ceramid C4***

DSC metodou byly zaznamenány dva fázové přechody při  $53,2 \text{ °C}$  a  $70,9 \text{ °C}$ . IR spektroskopii lze pozorovat fázové přechody při teplotách  $47$  a  $67 \text{ °C}$ .

**Valenční  $\text{CH}_2$  vibrace.** Symetrická valenční vibrace je za pokojové teploty pozorována při vlnočtu  $2847,5 \text{ cm}^{-1}$ , což vypovídá o vysoce uspořádaném stavu lipidových řetězců s vysokým počtem *trans* konformerů. Tato pozice je nižší než u C2 ale zároveň vyšší než u C24. S prvním fázovým přechodem dochází k posunu na  $2849,2 \text{ cm}^{-1}$ , což vypovídá o narůstajícím počtu *gauche* konformerů. Dosažením druhého fázového přechodu je hodnota vlnočtu této vibrace pozorována při  $2852,8 \text{ cm}^{-1}$ , což je typické pro fluidní fáze lipidů.

**Deformační  $\text{CH}_2$  vibrace.** Deformační rocking vibraci lze pozorovat při laboratorní teplotě jako rozštěpený vibrační pás při vlnočtech  $718,2$  a  $728,8 \text{ cm}^{-1}$ . Při teplotě  $42 \text{ °C}$  je zaznamenán pouze jeden vibrační pás při vlnočtu  $718,2 \text{ cm}^{-1}$  a dosažením druhého fázového přechodu při teplotě  $67 \text{ °C}$  se stává vibrační pás nepozorovatelným. Deformační nůžková vibrace je při  $25 \text{ °C}$  rovněž pozorovaná s rozštěpením vibračního pásu s hodnotami vlnočtu  $1460,9$  a  $1472 \text{ cm}^{-1}$ . Při teplotě  $42 \text{ °C}$  rozštěpení vymizelo a byl pozorovatelný pouze jeden vibrační pás při  $1461,6 \text{ cm}^{-1}$ . Zvýšením teploty k  $46 \text{ °C}$  došlo k posunu k hodnotě  $1465,1 \text{ cm}^{-1}$  a při teplotě  $68 \text{ °C}$ , po proběhlém fázovém přechodu je pozorován při nižší hodnotě vlnočtu  $1461,2 \text{ cm}^{-1}$ . Štěpení obou pásů při pokojové teplotě je typické pro orthorhombické uspořádání lipidických řetězců. Splnutí dubletů během první fázové tranzice naznačuje přechod do méně uspořádané hexagonální subcely.

**Amid I a II vibrace.** Při nižším vlnočtu je zobrazen vibrační pás vibrace amidu II, za pokojové teploty je jeho hodnota při vlnočtu  $1541,6 \text{ cm}^{-1}$ . K významné změně dochází pouze při teplotě  $45 \text{ °C}$  k hodnotě  $1549,9 \text{ cm}^{-1}$ . Dalším zvyšováním teploty nedochází k výrazné změně, pouze k pozvolnému poklesu vlnočtu. Vibrační pás vibrace amidu I je pozorovatelný s patrným rozštěpením za pokojové teploty při vlnočtu  $1624,5$

a  $1642,1 \text{ cm}^{-1}$ . Při prvním fázovém přechodu při teplotě  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  dochází k posunu k hodnotám  $1618,6$  a  $1641,9 \text{ cm}^{-1}$ . Při teplotě  $66 \text{ }^\circ\text{C}$  je pozorovatelný jeden vibrační pás při  $1642,3 \text{ cm}^{-1}$ , u kterého je patrná změna až při teplotě  $71 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pozice obou amidických pásů opět vypovídají o silných vodíkových vazbách v polární části molekuly. Změny v těchto vazbách doprovázejí jak první tak i druhou fázovou tranzici.

### **Ceramid C6**

Stejně jako u předchozího ceramidu byly sledovány dva fázové přechody. DSC měřením byl první fázový přechod zjištěn při teplotě  $49,8 \text{ }^\circ\text{C}$  a druhý při  $74,7 \text{ }^\circ\text{C}$ . IR spektroskopii nastaly tranzice při teplotě  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $69 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Valenční  $\text{CH}_2$  vibrace.** Za pokojové teploty je pozice symetrické valenční vibrace pozorována při vlnočtu  $2848,6 \text{ cm}^{-1}$ , což je poměrně vyšší pozice než u ceramidu C24. Během první tranzice dochází k posunu k hodnotě  $2849,1 \text{ cm}^{-1}$ , což je spojeno s nárůstem počtu *gauche* konformerů v řetězcích. Dosažením teploty  $69 \text{ }^\circ\text{C}$  nastává druhý fázový přechod se změnou pozice vlnočtu k  $2852,8 \text{ cm}^{-1}$ , což naznačuje přechod lipidu do fluidní fáze.

**Deformační  $\text{CH}_2$  vibrace.** Deformační rocking vibrační pás můžeme pozorovat jako jednotlivý při vlnočtu  $720,9 \text{ cm}^{-1}$ . Během první tranzice nedochází k výrazným změnám. Dosažením druhé tranzice dochází k posunu na hodnotu  $719,8 \text{ cm}^{-1}$ . Deformační nůžková vibrace je za laboratorní teploty pozorovatelná jako singlet při  $1465,6 \text{ cm}^{-1}$ . Rovněž zde nedochází k většímu posunu vibračního pásu během první fázové tranzice. Druhým fázovým přechodem při  $69 \text{ }^\circ\text{C}$  dochází k posunu pásu k vlnočtu  $1460 \text{ cm}^{-1}$ .

Absence štěpení těchto vibračních pásů vypovídá, že na jednu subcelu připadá jeden lipidický řetězec. Může se tedy jednat o triklinické nebo hexagonální uspořádání. Vzhledem k vývoji pozice valenční  $\text{CH}_2$  symetrické vibrace se stoupající teplotou lze usoudit, že ceramid C6 je při pokojové teplotě uspořádán do triklinické subcely. S první fázovou tranzicí dochází k přechodu do hexagonální struktury.

**Amid I a II vibrace.** Změna pozice vibračního pásu amidu II je patrná již při prvním fázovém přechodu při  $42 \text{ }^\circ\text{C}$ , kdy dochází k posunu pozice z vlnočtu  $1545,9 \text{ cm}^{-1}$  na hodnotu  $1549,3 \text{ cm}^{-1}$ . Další změna je pozorovatelná při druhé tranzici s posunem k hodnotě  $1527,9 \text{ cm}^{-1}$ . Vibrační pás amidu I je pozorovatelný při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  jako dvojitý pás s vlnočty  $1624,3 \text{ cm}^{-1}$  a  $1646,4 \text{ cm}^{-1}$ . Při  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  dochází ke změně pozice pouze jednoho

pásu na hodnotu  $1609,2 \text{ cm}^{-1}$ , druhý pás je pozorován bez větších změn. Při druhém fázovém přechodu při  $69 \text{ }^\circ\text{C}$  dublet vymizí a vibrační pás je zaznamenán při  $1641,5 \text{ cm}^{-1}$ . Pozice amidu I a II naznačují silné vodíkové interakce mezi molekulami ceramidu. Termotropní změny probíhají ve dvou fázích současně na polární i nepolární části molekuly.

### ***Ceramid C8***

Fázový přechod zaznamenaný DSC měřením byl zaznamenán při teplotě onsetu  $58,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Jelikož je takto detekovaný fázový přechod velmi široký, nelze v něm rozeznat dva separátní fázové přechody, které byly následně popsány pomocí IR spektroskopie při  $50$  a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Valenční  $\text{CH}_2$  vibrace.** Symetrická valenční vibrace má při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  pozici vlnočtu  $2848,8 \text{ cm}^{-1}$ . Tato pozice je opět vyšší než u ceramidu C24. Dosažením  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  dochází k posunu na hodnotu  $2849,8 \text{ cm}^{-1}$ , což naznačuje navýšení počtu *gauche* konformerů a pokles míry uspořádanosti v řetězci. Dalším zvyšováním teploty se pozice mírně snižuje, což není pro lipidy úplně obvyklé chování. Pravděpodobně tím dochází ke stabilizaci vzniklé mezofáze. Při teplotě  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  dojde k prudkému vzrůstu vlnočtu na  $2852,7 \text{ cm}^{-1}$ , což značí přechod ceramidu do fluidní fáze. Stejný průběh probíhá i u asymetrické valenční vibrace.

**Deformační  $\text{CH}_2$  vibrace.** Deformační rocking vibrace je zaznamenána jako jednotlivý pás za pokojové teploty při vlnočtu  $720,4 \text{ cm}^{-1}$ . Při  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  dochází k pozvolnému nárůstu k  $720,8 \text{ cm}^{-1}$  a s dalším zvyšováním teploty dojde k poklesu pozice. Při teplotě  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  se pozice pásu vrací na hodnotu  $720,8 \text{ cm}^{-1}$ . Dochází k velmi malým změnám v hodnotách vlnočtu. Deformační nůžková vibrace je pozorovaná také jako jednotlivý pás bez štěpení při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  s hodnotou vlnočtu  $1465,7 \text{ cm}^{-1}$ . K viditelné změně dochází během druhé fázové tranzice, při které je patrné snížení pozice k hodnotě  $1459,4 \text{ cm}^{-1}$ . Podobně jako u ceramidu C6 ani u C8 není zřetelné štěpení pásů deformačních  $\text{CH}_2$  vibrací při pokojové teplotě. Vezmeme-li v úvahu pozici symetrické  $\text{CH}_2$  valenční vibrace, lze usoudit, že lipidické řetězce jsou uspořádány do triklinické subcely. Během první tranzice uspořádání pravděpodobně přechází do hexagonální subcely.

**Amid I a II vibrace.** Vibrační pás amidu II je při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  viditelný jako jednotlivý pás při vlnočtu  $1545,3 \text{ cm}^{-1}$ . Dosažením  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  dochází k postupnému zvyšování

hodnoty vlnočtu k  $1548\text{ cm}^{-1}$ . Při  $70\text{ °C}$ , kdy dochází k hlavní tranzici, je patrný výrazný pokles na hodnotu  $1527\text{ cm}^{-1}$ . Vibrační pás amidu I můžeme pozorovat jako dublet s vlnočty  $1617,5\text{ cm}^{-1}$  a  $1642\text{ cm}^{-1}$ . Během první fázové tranzice dochází k mírnému zvýšení pozice obou píků, nicméně štěpení pásu zůstává zachováno. K výraznější změně dochází během přechodu do fluidní fáze při  $70\text{ °C}$ , kdy vymizí dublet a pás je pozorovatelný při  $1646,3\text{ cm}^{-1}$ . Z tohoto je zřejmé, že, podobně jako u ostatních ceramidů, ke změně v polární části molekuly dochází v souladu se změnami v uhlovodíkových řetězcích. Vysoká pozice amidu I a zároveň nižší pozice amidu II naznačují silné vodíkové vazby mezi molekulami.

### ***Ceramid C12***

DSC termogram vykazuje jeden ostrý pík při teplotě onsetu  $85\text{ °C}$ . Nicméně, pomocí IR spektroskopie byly dokázány dvě fázové tranzice při  $73\text{ °C}$  a  $83\text{ °C}$ .

**Valenční  $\text{CH}_2$  vibrace.** Za pokojové teploty je pozice symetrické vibrace při vlnočtu  $2848,2\text{ cm}^{-1}$ , což vypovídá o poměrně vysokém uspořádání lipidových řetězců. Termotropní změny valenční symetrické vibrace probíhají dvoustupňově. Nejprve dochází k nárůstu pozice při  $75\text{ °C}$  na hodnotu  $2849,5\text{ cm}^{-1}$ , poté následuje určitá stagnace a prudký vzestup při  $83\text{ °C}$  na hodnotu vlnočtu  $2852,3\text{ cm}^{-1}$ , což je spojeno s táním lipidu. Podobný průběh lze pozorovat i u asymetrické valenční vibrace.

**Deformační  $\text{CH}_2$  vibrace.** Deformační rocking vibrace je při pokojové teplotě pozorovatelná jako jednotlivý pás bez štěpení při vlnočtu  $720,7\text{ cm}^{-1}$ . Se zvyšující se teplotou nedochází k výrazným změnám, až při  $85\text{ °C}$  je patrný posun k vlnočtu  $719,4\text{ cm}^{-1}$ . Stejně tak jako rocking vibrace je i nůžková vibrace zobrazená jako singlet bez štěpení s pozicí vlnočtu při  $25\text{ °C}$   $1465,9\text{ cm}^{-1}$ . K výraznému poklesu pozice vlnočtu je při teplotě  $83\text{ °C}$  na hodnotu  $1458,4\text{ cm}^{-1}$ . Podobě jako u C6 a C8 potvrzuje IR spektroskopie, že řetězce jsou uspořádány do trikliniké subcely. Vzhledem k minimálním změnám během první tranzice v deformačních  $\text{CH}_2$  vibracích zůstává trikliniká pravděpodobně nadále zachována a rovnou přechází do fluidní fáze.

**Amid I a II vibrace.** Teplotní změny vibrace amidu II probíhá také ve dvou fázích. Nejprve změna z pozice  $1545\text{ cm}^{-1}$  na  $1548,2\text{ cm}^{-1}$  při  $75\text{ °C}$  a zvýšením teploty k  $83\text{ °C}$  prudký pokles na hodnotu  $1543,5\text{ cm}^{-1}$ . U vibrace amidu I lze popsat taky dvofázový průběh. Při pokojové teplotě je pozice amidu I při  $1636,2\text{ cm}^{-1}$ . Nejprve je patrný vzestup při  $75\text{ °C}$  k hodnotě vlnočtu  $1642,7\text{ cm}^{-1}$  a při teplotě  $83\text{ °C}$  dochází

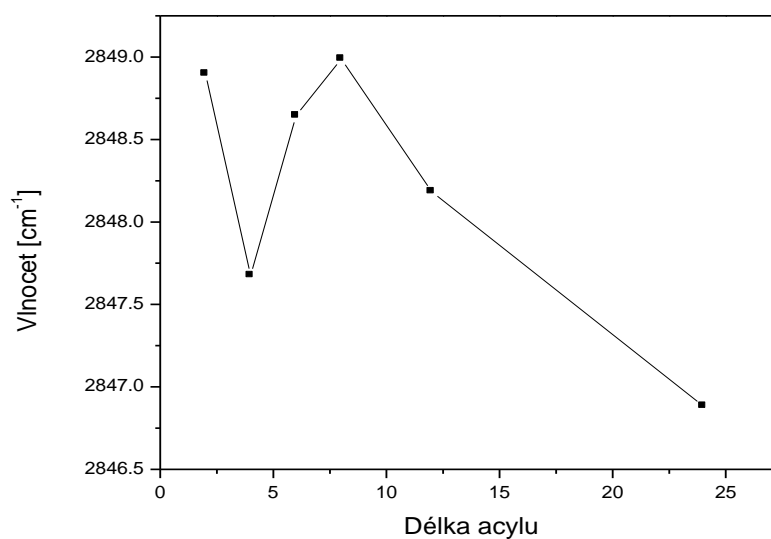
k dalšímu vzestupu k  $1646,9 \text{ cm}^{-1}$ . Termotropní změny tedy probíhají současně na nepolární i polární části ceramidu. Zajímavé je, že u ceramidu C12 nedochází ke štěpení ani jednoho amidického pásu.

## Shrnutí

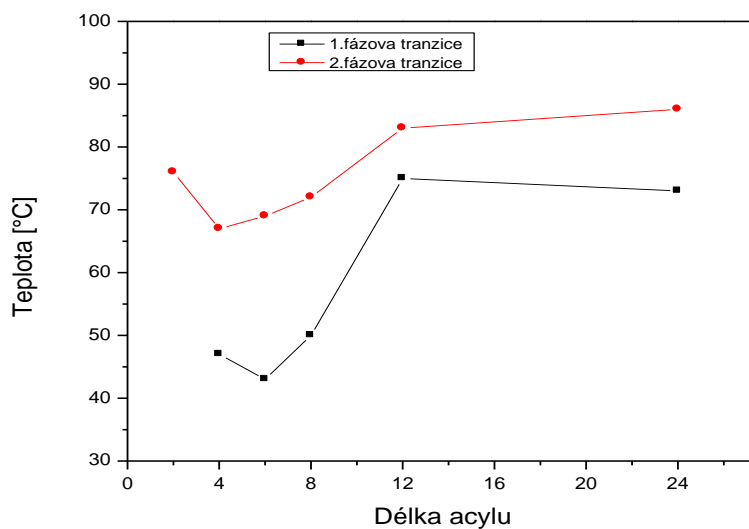
Nejdůležitější informace získané v této práci pomocí DSC a IR spektroskopie jsou shrnuty v tabulce (Tab. 7).

Tab. 7 Fyzikálně-chemické charakteristiky získané metodou DSC a IR spektroskopie.

Vzorky ceramidů	Teploty tranzicí (°C)		Pozice $\nu_s\text{CH}_2$ při 32 °C ( $\text{cm}^{-1}$ )	Typ subcely při 32 °C	Pozice amidu při 32 °C ( $\text{cm}^{-1}$ )	
	DSC	IR			amid I	amid II
C2	83,6	74	2848,9	ortorhombická	1646,8	1556,7
C4	53,2 70,9	42 65	2847,7	ortorhombická	1628,8 1642,1	1541,7
C6	49,8 74,7	42 69	2848,6	triklinická	1617,4 1642,2	1544,8
C8	58,5	50 70	2849,0	triklinická	1617,5 1642,2	1544,8
C12	85,0	73 83	2848,7	triklinická	1642,9	1549,6
C24	79,2 99,4	73 86	2846,9	ortorhombická	1617,7 1645,7	1545,2 1568,1



Obr. 59 Závislost pozic  $\nu_s(\text{CH}_2)$  na délce acylu jednotlivých ceramidů.



Obr. 60 Závislost teplot tání jednotlivých vzorků ceramidů na délce acylu. Pouze u ceramidu C2 probíhal fázový přechod jednostupňově, u ostatních ceramidů jsou patrné dva fázové přechody.

Krátkořetězcové ceramidy ztrácí svou bariérovou funkci, naopak zvyšují propustnost kůže (14). Ceramidy použité v této práci byly podrobeny také permeačním studiím, ve kterých byla srovnávána akcelerační aktivita jednotlivých ceramidů v závislosti na délce acylu s použitím modelových léčiv (31). Můžeme tedy srovnat vztahy mezi fyzikálně-chemickými vlastnostmi zjištěnými DSC měřením a IR spektroskopii a aktivitou těchto ceramidových analogů. Jako modelové látky byly použity indometacin a teofylin (Obr. 61). Bylo prokázáno, že ani ceramid C24 ani jeho analogy se středně dlouhým řetězcem (C8 a C12) nemají vliv na urychlení permeace žádné z modelových látek. Naproti tomu, krátkořetězcové analogy C4 a C6 výrazně ovlivnily permeaci jak indometacinu (až 2.7krát) tak i teofylinu (až 3.8krát). Zajímavé je, že nejkratší analog C2 vykazoval poměrně nižší aktivitu než C4 a C6.

Na Obr. 59 je zobrazena závislost  $\nu_s(\text{CH}_2)$  na délce acylu u jednotlivých ceramidů při 32 °C. Z grafu je patrná nejnižší pozice u ceramidu C24 [NS] s hodnotou vlnočtu 2846,9  $\text{cm}^{-1}$ , což svědčí o vysokém stupni uspořádanosti lipidových řetězců, a tedy o výjimečných bariérových schopnostech v kůži. Paradoxní je rovněž velice nízká pozice u C4. Z těchto závěrů lze soudit, že míra uspořádanosti lipidických řetězců při 32°C daná poměrem *trans/gauche* konformerů není zcela úměrná urychlovací schopnosti krátkořetězcových ceramidů.

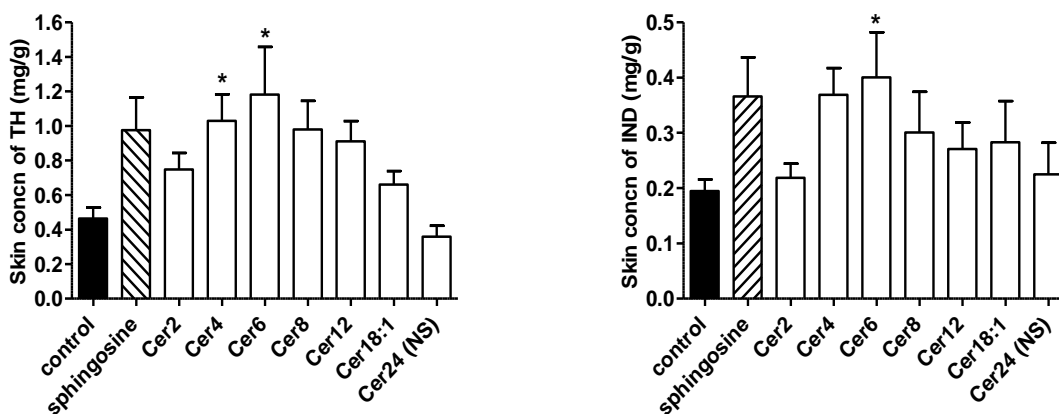
Teploty, při kterých došlo k fázovým přechodům u jednotlivých ceramidů jsou vyjádřeny v grafu na Obr. 60, opět v závislosti na délce acylu. U všech ceramidů s výjimkou ceramidu C2 probíhají fázové tranzice dvoustupňově. Jedná se pravděpodobně o přechod z orthorhombické (C4, C24) nebo triklinické (C6, C8, C12) subcely do hexagonální, která je charakteristická nižším stupněm uspořádanosti řetězců. Nejvyšší teploty, při kterých došlo k fázovým tranzicím vykazují ceramidy s nejdelšími acyly (ceramid C12, 24). Paradoxně ceramid s nejkratším acylem (C2) má teplotu druhého fázového přechodu 76 °C, což je vyšší teplota než u ceramidu C8.

Z výsledků je patrné, že ani mezi typem uspořádání lipidických řetězců při 32 °C a urychlovací aktivitou neexistuje jednoduchá korelace.

Na druhou stranu stojí za povšimnutí podobnost mezi urychlovací aktivitou (viz. výše) s teplotou prvního fázového přechodu zkoumaných ceramidů. Bylo prokázáno, že první fázová tranzice souvisí s přechodem do struktury s méně uspořádanými řetězci pravděpodobně do hexagonální subcely. Ceramid C4 a C6 mají tuto teplotu velmi nízkou ve srovnání s ostatními ceramidy. Pokud se tyto ceramidy smísí s lipidy stratum

corneum může dojít, díky eutektickému chování lipidů, k dalšímu snížení teploty první fázové tranzice až k 32°C, což může způsobit vyšší propustnost kožní bariéry.

Odlišné fázové chování ceramidu C2 (absence první fázové tranzice, vysoká hodnota pozice  $\nu_s(\text{CH}_2)$  při 32 °C) naznačuje, že fyzikálně-chemické vlastnosti tohoto ceramidu nejsou typické pro řadu našich analogů. Z toho lze očekávat, že se tato látka ve stratum corneum bude pravděpodobně chovat jiným způsobem než ostatní měřené ceramidy a může to souviset i s nižší urychlovací aktivitou než u C4 a C6.



Obr. 61 Grafy znázorňující koncentraci teofylinu a indometacinu v kůži po přidání ceramidů. Nejvyšší koncentraci léčiva můžeme pozorovat po přidání ceramidu C4 a C6 u teofylinu a ceramidu C6 u indometacinu (31).



## 6. ZÁVĚR

Předmětem studia této práce je termotropní fázové chování u série vybraných krátkořetězcových ceramidů pomocí dvou experimentálních metod, které umožňují získat vztah mezi fyzikálně-chemickými vlastnostmi a urychlovací aktivitou. Fyzikálně-chemické vlastnosti krátkořetězcových ceramidů byly srovnávány s vlastnostmi přirozeně se vyskytujícího ceramidu C24 [NS], který je součástí SC a vykazuje výborné bariérové schopnosti.

Z naměřených výsledků IR spektroskopie můžeme usoudit nižší stupeň uspořádanosti lipidových řetězců u krátkořetězcových ceramidů v porovnání s ceramidem C24. Rozdílná urychlovací aktivita u jednotlivých ceramidů zjištěná z permeačních studií (31) by mohla souviset s odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, konkrétně fázovými přechody. Ceramidy C4 a C6 vykazovaly maximální urychlovací aktivitu, což může být dáno podobným termotropním chováním, které probíhá ve dvou stupních a ve stejném teplotním rozmezí. Teploty prvních fázových přechodů jsou výrazně nižší než u ostatních ceramidů, což by také mohlo přispívat k vysvětlení jejich aktivity. Naopak nejkratší analog ceramid C2 neměl vliv na urychlení permeace. Důvodem by mohla být vysoká teplota fázového tranzice srovnatelná s ceramidem C24, fázová tranzice probíhající v jednom stupni, vyšší pozice  $\nu_s\text{CH}_2$  a pozice vibrací amidu I a II, vypovídajících o existenci pevných vodíkových vazeb, které zvyšují teplotu fázové tranzice a jejich přítomnost by mohla negativně ovlivnit urychlovací aktivitu .

Tato práce je součástí širšího výzkumu, zabývajícím se možnostmi urychlení kožní permeace. Výsledky této práce jsou obsaženy v publikaci zaslané k posouzení (31).

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

1. D.J. Moore and M.E. Rerek. Insights into the Molecular Organization of Lipids on the Skin Barrier from Infrared Spectroscopy Studies of Stratum Corneum Lipid Models. International Specialty Products, Wayne, NJ USA. Acta Derm Venereol 2000, Supp 208: 16-22
2. M.W. de Jager, G.S. Gooris, I.P. Dolbnya, W. Bras, M. Ponc, J.A. Bouwstra. Novel Lipid Mixtures based on synthetic ceramides reproduce the unique stratum corneum lipid organization. Department of Drug Delivery Technology, University of Leiden, The Netherlands. Journal of Lipid Research, May 2004, Vol.45: 923-932
3. J. Novotný, B. Janůšová, M. Novotný, A. Hrabálek, K. Vávrová. Short-Chain Ceramides Decrease Skin Barrier Properties. Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Czech Republic. Skin Pharmacol Physiol 2009, 22:22-30
4. A.G. Gibbs. The Role of Lipid Physical Properties in Lipid Barriers. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of California, Irvine, California. Amer. Zool. 1998, 38:268-279
5. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Lipidy>, staženo 06/2009
6. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic-art/457489/92244/Phospholipids-can-be-used-to-form-artificial-structures-called-liposomes>, staženo 06/2009
7. J.M. Boggs. Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. Department of Biochemistry, Hospital for Sick Children, Canada. Biochim Biophys. Acta 1987, 906(3):353-404
8. R. Mendelsohn, D.J. Moore. Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. Department of Chemistry, Rutgers University, Newark College of Arts and Science, 73 Warren Street, Newark, NJ 07102, USA. Chemistry and Physics of Lipids 1998, 96:141-157
9. M. Boncheva, F. Damien, V. Normand. Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. Biochim Biophys. Acta 2008, 1778:1344-1355

10. D.M. Small. The Behavior of Biological Lipids. Biophysics Institute, Boston University Medical Center, Boston, Ma. 02118, USA. Pure & Appl. Chem. 1981, 53:2095-2103
  
11. H. Vavrysová. Fyzikálně-chemické vlastnosti potenciálních urychlovačů transdermální permeace. Diplomová práce. Katedra farm. technologie. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, 2007
  
12. K. Vávrová, J. Zbytovská, A. Hrabálek. Amphiphilic Transdermal Permeation Enhancers: Structure-Activity Relationships. Charles University, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové. Current Medicinal Chemistry 2005, 12:2273-2291
  
13. K. Vávrová, A. Hrabálek. Role ceramidů v kůži. Praktické lékárenství 2006, 2:55-58
  
14. W.M. Holleran, Y. Takagi, Y. Uchida. Epidermal sphingolipids: Metabolism, function and roles in skin disorders. FEBS Letters 2006, 580: 5456-5466
  
15. S. Wartewig, R.H.H. Neubert. Properties of Ceramides and Their Impact on the Stratum Corneum Structure. Martin Luther University Halle-Wittenberg. Skin Pharmacol Physiol 2007, 20:220-229
  
16. Megha, P. Sawatzki, T. Kolter, R. Bittman, E. London. Effect of ceramide N-acyl chain and polar headgroup structure on the properties of ordered lipid domains. Biochimica et Biophysica Acta 2007, 1768:2205-2212
  
17. K. Vávrová, A. Hrabálek, P. Doležal, T. Holas, J. Zbytovská. L-Serine and Glycine Based Ceramide Analogues as Transdermal Permeation Enhancers: Polar Head Size and Hydrogen Bonding. Faculty of Pharmacy, Charles University, HK. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2003, 13:2351-2353
  
18. R.B. Walker, E.W. Smith. The role of percutaneous penetration enhancers. School of Pharmaceutical Sciences, Rhodes University, Grahamstown, South Africa. Advanced Drug Delivery Reviews 1996, 18:295-301
  
19. K. Vávrová, A. Hrabálek, P. Doležal, L. Šámalová, K. Palát, J. Zbytovská, T. Holas, J. Klimentová. Synthetic Ceramide Analogues as Skin Permeation Enhancers: Structure-Activity Relationships. Faculty of Pharmacy, Charles University, HK. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2003, 11:5381-5390

20. A. Hrabálek, K. Vávrová. Lze překonat kožní bariéru?. Praktické lékařství 2005, 1:8-11.
21. M. Krönke. Biophysics of ceramide signaling: interaction with proteins and phase transition of membranes. University of Cologne, Goldenfelsstr, Köln. Chemistry and Physics of Lipids 1999, 101:109-121
22. [https://www.zdravcentra.sk/cps/rde/xchg/zcsk/xsl/3141\\_1479.html](https://www.zdravcentra.sk/cps/rde/xchg/zcsk/xsl/3141_1479.html) staženo 06/2009
23. S. Chiantia, N. Kahya, P. Schwille. Raft Domain Reorganization Driven by Short- and Long-Chain Ceramide: A combined AFM and FCS Study. Biotechnologisches Zentrum, Technische Universität, Tatzberg. Langmuir 2007, 23:7659-7665
24. A. Gidwani, H.A. Brown, D. Holowka, B. Baird. Disruption of lipid order by short-chain ceramides correlates with inhibition of phospholipase D and downstream signaling by FCεRI. Department of Chemistry and Chemical Biology, Cornell University, Ithaca, NY. Journal of Cell Science 2003, 116:3177-3187
25. D. Allan. Lipid metabolit changes caused by short-chain ceramides and the connection with apoptosis. Department of Physiology, University College London, University Street, London. Biochem J. 2000, 345:603-610
26. C.P. Reynolds, B.J. Maurer, R.N. Kolesnick. Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. Cancer Letters 2004, 206:169-180
27. B. Ogretmen, B.J. Pettus, M.J. Rossi, R. Wood, J. Usta. Biochemical Mechanism of the Generation of Endogenous Long Chain Ceramides in Response to Exogenous Short Chain Ceramide in the A549 Human Lung Adenocarcinoma Cell Line. The Journal of Biological Chemistry 2002, 277:12960-12969
28. N.S. Radin. Designing Anticancer Drugs Via the Achilles Heel: Ceramide, Allylic Ketones and Mitochondria. Mental Health Research Institute, University of Michigan, Ann Arbor, USA. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2003, 11:2123-2142
29. <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Ceramid.svg> staženo 06/2009
30. D.J. Moore, M.E. Rerek, R. Mendelsohn. FTIR spectroscopy studies of the conformational order and phase behaviour of ceramides. J. Phys. Chem. B 1997, 101, 8933-8940.

31. K. Vávrová, J. Zbytovská, B. Janůšová, P. Lorenc, H. Vavrysová, A. Hrabálek.  
Short vs. long-chain ceramides: evidence for different skin barrier properties.  
Department of Inorganic and Organic Chemistry and Department of Pharmaceutical  
Technology, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové, 2010,  
zasláno k posouzení.

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

V Hradci Králové dne

