

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické technologie



Studium fázového chování vybraných směsí lipidů
Study on phase behaviour of selected lipid mixtures

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Jarmila Zbytovská, Dr. rer. nat.

Hradec Králové 2016

Klára Černochová

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 2016

Klára Černochová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce Mgr. Jarmile Zbytovské, Dr. rer. nat. za odborné vedení, trpělivost a pomoc při vypracování této práce.

Dále bych ráda poděkovala Ing. Barboře Amélii Čuříkové (VŠCHT, Praha) za cenné rady a čas, který mi věnovala při realizaci diplomové práce.

Velký dík patří i Prof. Ing. Františku Štěpánkovi, Ph. D. (VŠCHT, Praha) za umožnění naměření výsledků v jeho laboratoři.

Na závěr děkuji celé mé rodině za velkou podporu během celého studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Školitel: Mgr. Jarmila Zbytovská, Dr. rer. nat.

Posluchač: Klára Černochová

Název diplomové práce: Studium fázového chování vybraných směsí lipidů

Ceramidy, cholesterol a mastné kyseliny jsou hlavními složkami mezibuněčné lipidové matrix rohové vrstvy pokožky, stratum corneum (SC). Tyto lipidy hrají stěžejní roli pro udržení funkční kožní bariéry.

Cílem této práce je studium interakcí směsí zmíněných kožních lipidů na molekulární úrovni, charakterizace jejich mísitelnosti a teplotního fázového chování. K tomuto účelu byly připraveny modelové systémy lipidů napodobující přirozené složení mezibuněčné matrix SC. Připravené membrány obsahovaly jeden nebo více ceramidů (CerAP, CerNP, CerNS), cholesterol, kyselinu stearovou a cholesterol sulfát. Směsi byly studovány pomocí infračervené spektroskopie s využitím zahřívání ATR-krystalu. Z naměřených dat byla získána IČ spektra a teplotní závislosti polohy jednotlivých pásů, které byly detailně hodnoceny.

Výsledky práce ukázaly přítomnost vodíkových můstků u jednotlivých ceramidů. Tyto vazby byly také pozorovatelné u jedné ekvimolární lipidické směsi, a to ve směsi s CerNP. Naopak směsi lipidů obsahujících CerAP vykazovaly velmi dobrou mísitelnost jednotlivých složek. U víceceramidových směsí byly pozorovány charakteristické rysy směsí jednoceramidových. S využitím deuterovaného analogu kyseliny stearové bylo zjištěno, že ceramidy ovlivňují uspořádanost této kyseliny ve směsi a posouvají její fázovou tranzici do nižších teplotních hodnot. Tento vztah ovšem platí i opačně. Kyselina stearová má vliv na uspořádanost uhlovodíkových řetězců ostatních lipidů ve směsi a teplotní chování je v její nepřítomnosti zcela odlišné.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Pharmaceutical Technology

Consultant: Mgr. Jarmila Zbytovská, Dr. rer. nat.

Student: Klára Černochová

Title of Thesis: Study on phase behaviour of selected lipid mixtures

Ceramides, cholesterol and fatty acids are the main components of the stratum corneum (SC) intercellular lipid matrix. These lipids play the major role in maintaining the skin barrier function.

The goal of this work is to study the SC lipid mixtures on the molecular level, characterization of their miscibility and their temperature phase behavior. For this purpose, lipid model systems imitating natural structure of the SC intercellular lipid matrix were prepared. The membranes contained one or more ceramides (CerAP, CerNP, CerNS), cholesterol, stearic acid and cholesterol sulfate. The mixtures were studied by infrared spectroscopy using a heated ATR-crystal. From the measured data, IR spectra and temperature dependency of the position of the particular IR-modes were evaluated.

The results showed the presence of hydrogen bindings within the ceramides. These bonds were also observable in the equimolar lipid mixture based on CerNP. Otherwise, lipid mixtures containing CerAP showed very good miscibility of the individual components. The two- and three- ceramide mixtures showed characteristic features of the one- ceramide mixtures. Using deuterated stearic acid, it was discovered that ceramides affect the arrangement of stearic acid in the mixture and move its phase transition to lower temperatures. These effects were found to work vice versa as well. Stearic acid affected both the hydrocarbon chains order of the other lipids in the mixture and the thermotropic phase behavior..

OBSAH

Zadání	1
Seznam zkratek a symbolů	2
1 Úvod	3
2 Teoretická část	4
2.1 Kůže	5
2.1.1 Přehled funkcí kůže	5
2.1.2 Stavba kůže.....	5
2.1.2.1 Epidermis.....	6
2.1.2.2 Lipidy SC.....	8
2.1.2.2.1 Ceramidy.....	8
2.1.2.2.2 Cholesterol.....	9
2.1.2.2.3 Volné mastné kyseliny	10
2.1.2.2.4 Cholesterol sulfát.....	10
2.1.2.3 Molekulární organizace lipidů SC	10
2.1.2.3.1 Laterální organizace.....	11
2.1.2.3.2 Lamelární organizace	12
2.1.3 Kožní onemocnění spojená s poškozením bariéry SC.....	15
2.1.3.1 Atopická dermatitida (AD).....	15
2.1.3.2 Recesivní X-vázaná lamelární ichtyóza (RXLI)	16
2.1.3.3 Lupénka (psoriáza).....	16
2.2 Mechanismus průniku xenobiotika kůží.....	17
2.2.1 Urychlovače permeace	18
2.3 Studium lipidů SC infračervenou spektrometrií	21
3 Experimentální část	24
3.1 Použité suroviny a chemikálie	25
3.2 Použité přístroje	27

3.3	Použitý software	27
3.4	Pracovní postup	27
3.4.1	Příprava vzorků.....	27
3.4.2	Průběh měření.....	29
3.4.3	Zpracování dat.....	29
4	Výsledky a diskuze	30
4.1	IČ spektra	31
4.2	Teplotní závislosti spekter	35
4.2.1	Jednotlivé Cer a SA	35
4.2.2	Porovnání čistého Cer s jeho směsí	39
4.2.3	Srovnání teplotní závislosti CH ₂ a CD ₂ vibrací jednoceramidových směsí s dSA.....	42
4.2.4	Srovnání teplotní závislosti CH ₂ vibrací jednoceramidových směsí s nedeuterovanou a deuterovanou SA	45
4.2.5	Srovnání teplotní závislosti CH ₂ vibrací jednoceramidových a dvouceramidových směsí.....	47
4.2.6	Srovnání teplotní závislosti CH ₂ a CD ₂ vibrací dvouceramidových směsí s dSA.....	50
4.2.7	Srovnání teplotní závislosti CH ₂ a CD ₂ vibrací jedno- a dvouceramidových směsí s dSA.	53
4.2.8	Srovnání teplotní závislosti CH ₂ vibrací jedno- a dvouceramidových směsí s tříceramidovou směsí	59
4.2.9	Srovnání teplotní závislosti CH ₂ a CD ₂ vibrací tříceramidové směsi s dSA.....	61
4.2.10	Srovnání teplotní závislosti CH ₂ a CD ₂ vibrací jedno- a dvouceramidových směsí s dSA s tříceramidovou směsí s dSA	62
5	Závěr	66
6	Literatura	68

ZADÁNÍ

Lipidy tvoří významnou skupinu excipientů využívaných pro formulaci léčivých přípravků. Důležitou složkou preformulačních aktivit je studium jejich fyzikálně-chemických vlastností ať již samotných, nebo ve směsích s léčivými či jinými excipienty.

Cílem této diplomové práce je studium interakcí vybraných směsí lipidů na molekulární úrovni, charakterizace jejich mísitelnosti a teplotního fázového chování. Teoretická část práce bude zaměřena především na fyzikálně-chemické vlastnosti lipidů z hlediska jejich fázového chování a jejich využití v oblasti farmaceutické technologie. Dále budou shrnuty a přiměřeně vysvětleny současné možnosti charakterizace fázového chování lipidů a tvorby fázových diagramů. V praktické části práce budou připraveny směsi vybraných lipidů o různých koncentracích. Pomocí infračervené spektroskopie budou sledovány změny ve fázovém chování vyvolané změnou teploty. Dle potřeby bude do experimentální činnosti případně zařazena rentgenová difrakce či diferenciální skenovací kalorimetrie. Na základě získaných informací budou sestrojeny fázové diagramy daných směsí lipidů. Získané výsledky budou řádně diskutovány v souvislosti s aktuálními literárními zdroji.

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

AD	atopická dermatitida
Cer	ceramid
CerAP	ceramid AP, α -hydroxy-N-oktadekanoyllytosfingosin
CerAP/NP	lipidická směs obsahující CerAP i CerNP
CerAP/NP/NS	lipidická směs obsahující CerAP i CerNP i CerNS
CerAP/NS	lipidická směs obsahující CerAP i CerNS
CerNP	ceramid NP, N-oktadekanoyllytosfingosin
CerNP/NS	lipidická směs obsahující CerNP i CerNS
CerNS	ceramid NS, N-oktadekanoylsfingosin
CS	cholesterol sulfát
dSA	deuterovaná kyselina stearová
ekvimol.	ekvimolární
GlcCer	glukosylceramid
hm.	hmotnostní
Chol	cholesterol
IČ	infračervený
LPP	dlouhá periodická fáze (long periodicity phase)
MK	mastná kyselina
mol.	molární
RXLI	recesivní X-vázaná lamelární ichtyóza
SA	kyselina stearová
SB	bazální vrstva (<i>Stratum basale</i>)
SC	rohová vrstva (<i>Stratum corneum</i>)
SG	zrnitá vrstva (<i>Stratum granulosum</i>)
SL	vrstva jasných buněk (<i>Stratum lucidum</i>)
SM	sfingomyelin
SPP	krátká periodická fáze (short periodicity phase)
SS	trnitá vrstva (<i>Stratum spinosum</i>)
γ	deformační kyvadlová vibrace
δ	deformační nůžková vibrace
λ	vlnová délka
v_{as}	valenční asymetrické vibrace
v_s	valenční symetrické vibrace

1 ÚVOD

Nejdůležitější funkcí kůže je ochrana organismu před nepříznivými vlivy vnějšího prostředí. Za bariérové vlastnosti kůže zodpovídá nejsvrchnější vrstva pokožky - stratum corneum. Hlavní strukturní složkou stratum corneum jsou korneocyty obklopené intercelulární lipidovou matrix. Nejvýznamnějšími lipidy mezibuněčné matrix jsou ceramidy, dále pak cholesterol, mastné kyseliny a cholesterol sulfát. Největší role při zajištění správné kožní bariéry je připisována právě ceramidům. Ceramidy společně s ostatními lipidy vytváří lamelární uspořádání, které je nezbytné pro správnou bariérovou funkci.

Narušení kožní bariéry může být způsobeno změnami ve složení či organizaci lipidů v mezibuněčném prostoru. Projevem jsou pak různé kožní choroby. Při transdermálním podávání léčiv je však cílem kožní bariéru oslabit. K urychlení prostupu látek kůží se využívají pomocné látky, tzv. akceleranty transdermální permeace.

Během této práce byly připraveny směsi lipidů napodobující přirozené složení mezibuněčné lipidové matrix stratum corneum založené na třech typech ceramidů lišících se mezi sebou strukturou polární hlavy. Hlavním cílem práce bylo studium interakcí připravených směsí těchto lipidů na molekulární úrovni pomocí infračervené spektroskopie, charakterizace jejich mísitelnosti a teplotního fázového chování. Byl zjišťován vliv struktury polární hlavy ceramidu na tyto jevy.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kůže

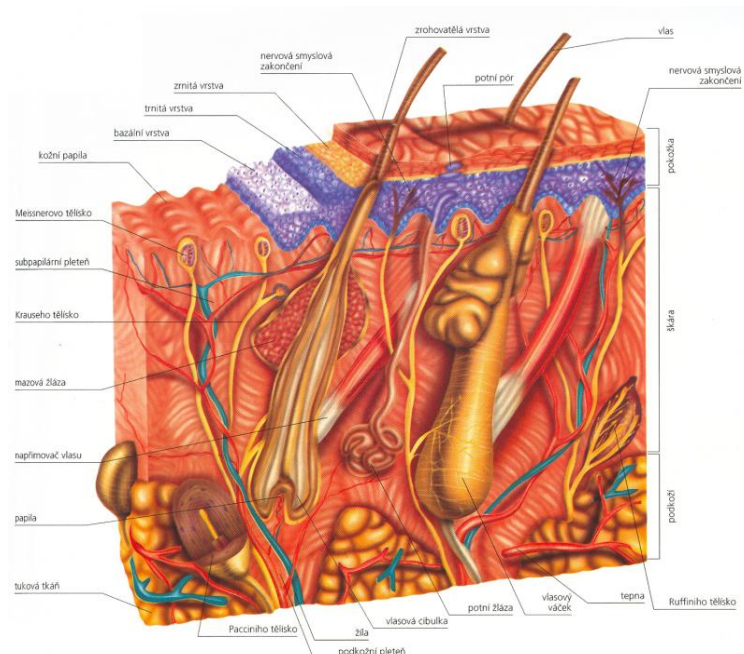
Kůže se řadí díky velkému povrchu a hmotnosti mezi jeden z největších orgánů lidského těla.

2.1.1 Přehled funkcí kůže

Hlavní funkcí kůže je ochrana organismu před škodlivými vnějšími vlivy, např. před poškozením UV zářením, teplem či chladem.¹

Kromě imunologické funkce Langerhansových ostrůvků je navíc povrch kůže suchý a kyselý, tedy nevhodný pro přežití mikroorganismů. Tvoří tak bariéru proti infekci. Kůže má společně s podkožní vrstvou tuku rozhodující vliv na termoregulaci. Dále obsahuje velké množství receptorů (dotykové, tlakové, termoreceptory, receptory pro bolesti) zajišťujících smyslovou funkci. Potní a mazové žlázy dávají kůži schopnost exkrece. Naopak její resorpční činnost je využívána při aplikaci zejm. lipofilních léčivých látek ve formě polotuhých léčivých přípravků.²

2.1.2 Stavba kůže



Obr. 1 Příčný řez kůží³

Kůže se skládá ze tří základních vrstev: pokožka (*Epidermis*), škára (*Corium, Dermis*) a podkožní vazivo (*Tela subcutanea, Subcutis*) (**Obr. 1**).

2.1.2.1 Epidermis

Pokožka tvoří horní vrstvu kůže. Dělí se dále na: *Stratum basale* (SB), *Stratum spinosum* (SS), *Stratum granulosum* (SG), *Stratum lucidum* (SL), *Stratum corneum* (SC) (*Obr. 2*).⁴



*Obr. 2 Schéma epidermis.*⁵

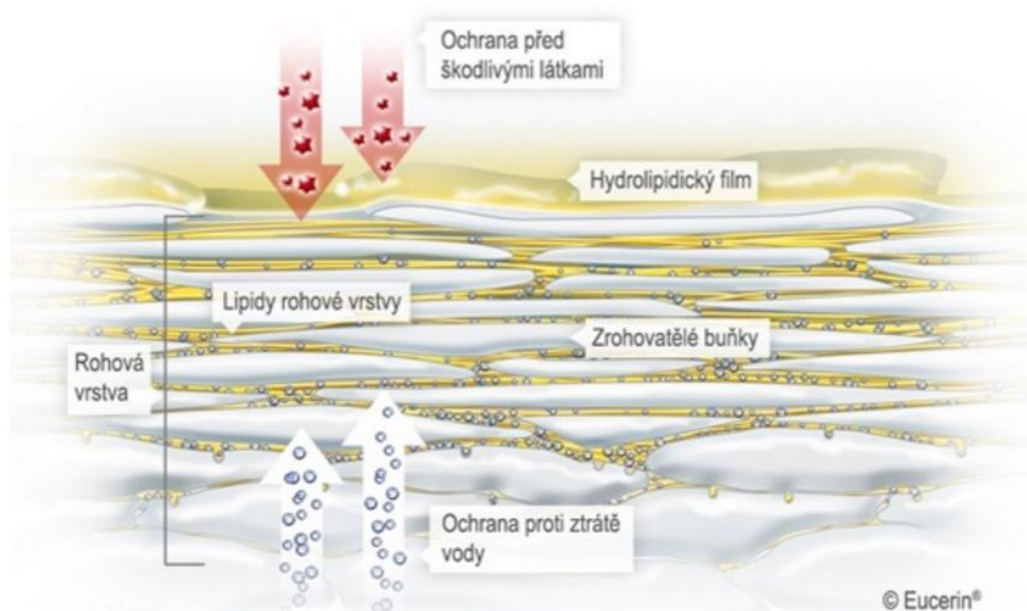
Stratum basale je složeno z jedné řady cylindrických keratinocytů, které jsou propojeny desmosomy. Ve spodní části jsou buňky SB připojeny pomocí hemidesmosomů k bazální membráně oddělující epidermis a škáru.¹ V bazální vrstvě se nachází v malém množství melanocyty, které syntetizují pigment melanin sloužící k ochraně před UV zářením.⁴

Stratum spinosum je charakterizováno několika řadami keratinocytů ostnitého tvaru. Buňky se směrem k povrchu oplošťují a v horní části této vrstvy dochází k diferenciaci keratinocytů a k produkci keratinu.¹

Stratum granulosum obsahuje až tři řady oploštělých buněk s granuly keratohyalinu, meziproductu rohovatění.^{1,4}

Stratum lucidum, přechod mezi SC a nezrohovatělou pokožkou, je výraznější na ploskách nohou a dlaních.

Stratum corneum (rohová vrstva) zodpovídá za bariérovou funkci kůže a zajišťuje dostatečnou hydrataci tím, že brání nadměrnému odpařování vody. SC je heterogenní soustava složená ze z keratinizovaných bezjaderných korneocytů v prostředí lamelární lipidové matrice. Bylo zjištěno, že zásadní roli ve funkci a udržení kožní bariéry hrají mezibuněčné lipidy.⁶ Struktura SC bývá připodobňována k modelu „cihel a malty“ (korneocyty představují cihly a mezibuněčná lipidová hmota maltu vyplňující prostory mezi korneocyty) (**Obr. 3**).^{7,8}



Obr. 3 Stratum corneum.⁹Dělí se dále na *stratum conjunctum*, kompaktní spodní část, a *stratum disjunctum*, olupující se horní část.¹

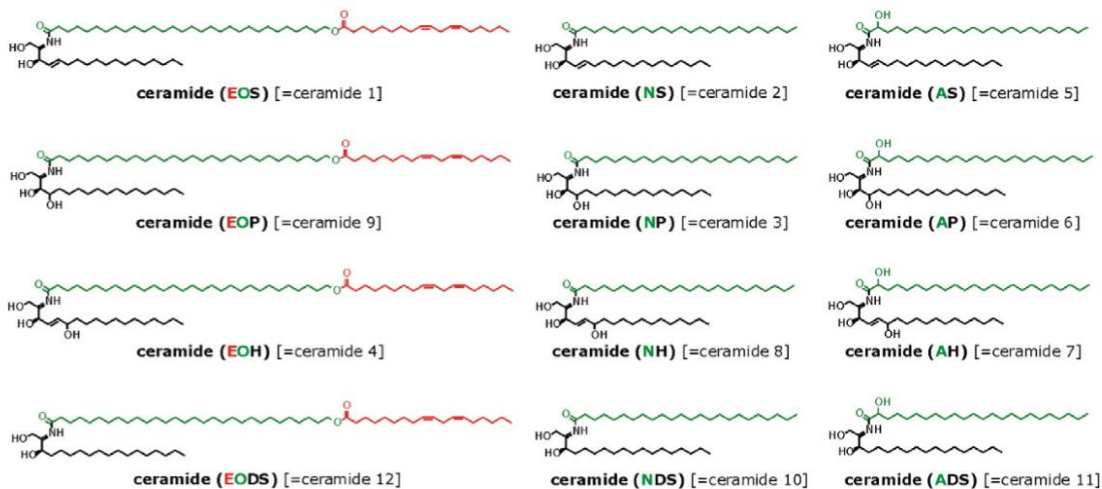
Nové buňky epidermis vznikají v SB proliferací kmenových buněk, pohybují se směrem k povrchu za postupné diferenciaci. Následuje specifická apoptóza (buněčné jádro se rozloží za zmenšení buňky), vznikne šupinka obsahující keratin a ta se nakonec odloupne z povrchu těla.¹⁰

2.1.2.2 Lipidy SC

Intercelulární matrix SC tvoří směs specifických lipidů a minimální množství vody. Je zde zastoupeno 45-50 hm. % ceramidů (Cer), 25 hm. % cholesterolu (Chol), 10-15 hm. % volných mastných kyselin (MK) a méně než 5 hm. % ostatních lipidů, z nichž nejdůležitější je cholesterol sulfát (CS).⁷

2.1.2.2.1 Ceramidy

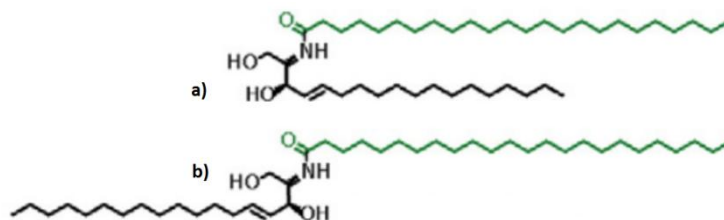
Ceramidy (N-acylsfingosiny) jsou látky amfifilního charakteru a patří do skupiny sfingolipidů.¹¹ Existuje minimálně 12 typů ceramidů (**Obr. 4**) vyskytující se v SC.¹² Polární hlava Cer je tvořena bazickým aminoalkoholem obsahujícím dlouhý nepolární řetězec, na jehož primární aminoskupině v poloze 2 je amidickou vazbou připojena další nepolární část zastoupená MK. MK může být v poloze α a nebo ω hydroxylována. ω -hydroxylované Cer obsahují 16- až 34-uhlíkaté MK, nejvíce však MK s 24 uhlíky.¹³



Obr. 4 Molekulární struktury volných Cer v lidské SC.

Terminologie byla navržena dle Motta a kol. a upravena Robsonem a kol. Tyto struktury jsou klasifikovány podle **sfingoidní báze** (černá, **S**: sfingozin, **P**: fytosfingozin, **H**: 6-hydroxysfingozin, **DS**: dihydrosfingozin = sfinganin) a **N-acylového zbytku** (**A**: α -hydroxylovaná MK, **O**: ω -hydroxylovaná MK, **N**: nehydroxylovaná MK). **Hydroxyskupina v poloze ω může být esterifikována** (**E**: acyl kyseliny linolové).¹⁴

Cer mohou být organizovány v rámci lamel ve dvou konformacích. Pokud oba alkylové řetězce Cer směřují stejným směrem, označujeme tuto konformaci vlásenkovou (**Obr. 5a**). Směřují-li alkylové řetězce opačným směrem, jedná se o otevřenou konformaci (**Obr. 5b**).¹⁵



Obr. 5 Molekulové konformace Cer: a) vlásenková, b) otevřená.

Syntéza Cer *de novo* probíhá v keratinocytech SG, konkrétně v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu.¹⁶ Prvním krokem syntézy je kondenzace palmitoyl-CoA a L-serinu pomocí serinpalmitoyltransferázy (SPT), což je klíčový enzym regulace syntézy sfingolipidů. Produktem je 3-dehydrosfinganin, který je dále redukován na sfinganin. Acylací sfinganinu vzniká dihydroceramid, jehož následná dehydratace vede k tvorbě ceramidu.^{11,17} Cer jsou dále metabolizovány na sfingomyeliny (SM) a glukosylceramidy (GlcCer).¹⁶ Ve formě lamelárních (též Odlandových) tělísek jsou SM a GlcCer transportovány do horních vrstev epidermis a pomocí enzymu β -glukocerebrosidázy a sfingomyelinázy přeměny zpět na Cer a začleněny do lipidové matrix SC.¹⁸

V organismu Cer hrají důležitou roli rovněž v metabolismu buněk. Jako sekundární poslové mají Cer především s kratšími řetězci význam při transdukci buněčných signálů. Slouží jako mediátory buněčného stárnutí, apoptózy a diference buněk.¹⁷

2.1.2.2.2 Cholesterol

Chol se vyskytuje ve všech biologických membránách. Je další klíčovou složkou bariéry SC. Při vysokých koncentracích udržuje lamelární strukturu SC. Překročení množství Chol nad jeho rozpustnost v dané membráně vede ale ke vzniku domén čistého krystalického Chol, a tím se zvyšuje riziko diskontinuity lamelární

struktury. Pro optimální bariérovou schopnost by mělo být tedy množství Chol max. 30 mol. %. Chol zvyšuje pohyblivost řetězců lipidů v gelové fázi, a tím přispívá k mechanické odolnosti. Rovněž podporuje mísitelnost lipidů. Vysoký poměr Chol/Cer snižuje citlivost lamelární struktury na změny ve složení lipidů SC.¹⁵

2.1.2.2.3 Volné mastné kyseliny

Ve SC se vyskytují především nasycené dlouhořetězcové volné MK, zejm. kyselina lignocerová (C24) a kyselina hexakosanová (C26). V lidském předloktí byly také detekovány ve stopovém množství nasycené a mononenasycené volné MK s velmi dlouhými řetězci (C32-C36).¹⁹ Většina MK může být syntetizována *de novo* keratinocyty. MK s řetězci o 16 uhlících jsou syntetizovány cytosolovými syntázami mastných kyselin.

Volné MK patří mezi hlavní původce kyselého pH na povrchu SC, čímž je zajištěna antimikrobiální bariéra. Dále se kyseliny podílí na regulaci permeability SC a účastní se modulace zánětlivých procesů.²⁰

2.1.2.2.4 Cholesterol sulfát

CS vzniká sulfokonjugací Chol za účasti enzymu sulfotransferázy v cytosolu buněk SB a SS v epidermis. Nejvyšší koncentrace dosahuje CS ve SG. Ve SC je hydrolyzován steroid-sulfatázou zpět na Chol. CS hraje významnou roli v diferenciaci keratinocytů a při vývoji epidermální bariéry.^{21,22}

2.1.2.3 Molekulární organizace lipidů SC

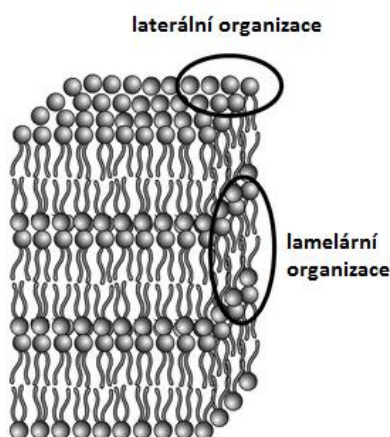
Pro odhalení principu bariérové funkce kůže je důležité znát nejen složení, ale i způsob organizace lipidů ve SC. Vypovídá o tom skutečnost, že v nemocné kůži bývá porucha kožní bariéry často připisována změně lipidového složení a zároveň i uspořádání.²³ Studium molekulární struktury kožní bariéry je také významné z hlediska dermálního a transdermálního podávání léčiv, které má řadu výhod oproti konvenční perorální aplikaci.²⁴

Kožní bariéra je předmětem studia již několik desítek let a ani v současnosti nejsou její principy dokonale vysvětleny.

Kolem r. 1850 se objevuje první teorie týkající se problematiky kožní bariéry, kdy Homolle a Duriau tvrdí, že i když kůže představuje těsnou bariéru, může absorbovat určité chemické látky rozpuštěné ve vodě. Téměř o 100 let později Winsor a Burch ukázali, že kožní bariéra ve skutečnosti spočívá v epidermální rohové vrstvě. Do této doby se myslelo, že jedinou funkcí SC byla funkce ochranná daná houževnatostí SC. Nyní se ale ukázalo, že právě SC zodpovídá za udržení tělesné homeostázy.

V letech 1951–1963 Berenson a Burch, Onken a Moyer prokázali, že permeabilita SC je závislá na množství obsaženého tuku. Brody v r. 1966 detekoval obsah tohoto tuku v extracelulárním prostoru SC. Brethnach a kol., a Elias a Friend v 70. letech díky elektronové mikroskopii zjistili, že mezibuněčné lipidy SC jsou organizovány do vrstev nad sebou.²⁴

Byla tedy takto popsána trojrozměrná struktura (**Obr. 6**), u níž rozlišujeme boční (laterální) a lamelární organizaci.²⁵



Obr. 6 Schéma trojrozměrné struktury lipidových lamel.²⁵

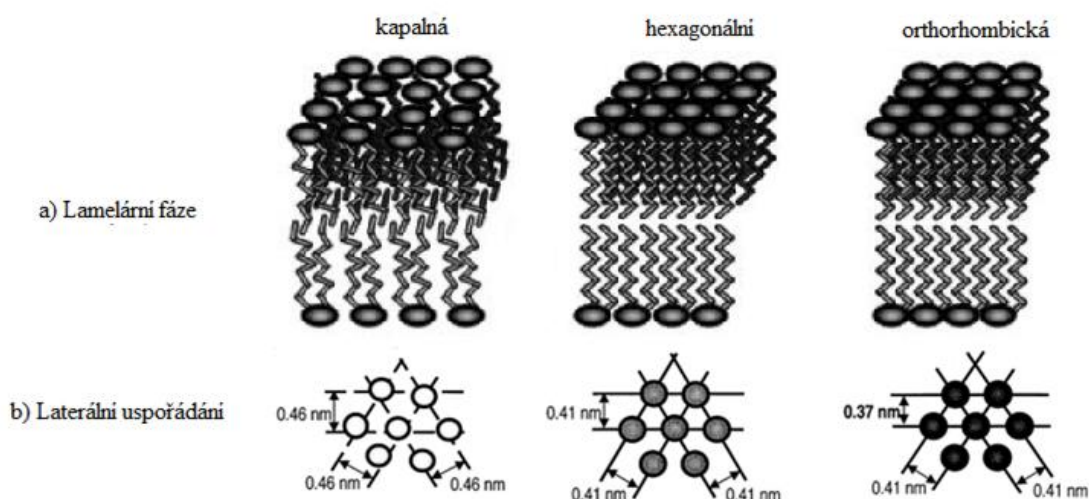
2.1.2.3.1 Laterální organizace

Obecně platí, že v lipidové lamelární dvojvrstvě se mohou vyskytovat tři typy bočního uspořádání (**Obr. 7**), které se liší v rotačních a translačních pohybech.

Prvním typem je nejvíce uspořádané, **orthorhombické** uspořádání, kde lipidové řetězce zaujímají *all-trans* konformaci a jsou organizovány v obdélníkové krystalové mřížce. V této fázi neexistuje rotační ani translační pohyb lipidových řetězců. Ve fázi **hexagonální** mají lipidové řetězce možnost rotačního pohybu podél jejich svislé osy.

Translační pohyby jsou omezeny. Studie ukázaly, že hexagonální laterální uspořádání je více přítomné v horních vrstvách SC než v hlubších vrstvách.²⁶

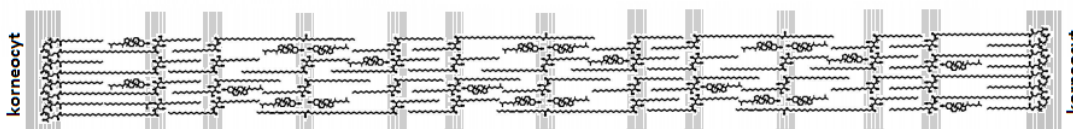
V **kapalně-krystalické** (fluidní) fázi vykazují řetězce lipidů vysoké množství *gauche* konformerů a téměř ztrácí laterální organizaci. Je zde také vysoká rotační a translační pohyblivost v rovině membrány.²⁵ Je všeobecně známo, že uhlovodíkové řetězce jsou v krystalickém stavu uspořádány především v uspořádané konformaci s vysokým počtem *trans* konformerů. S rostoucí teplotou množství *gauche* konformerů narůstá a tak postupně dochází k poklesu uspořádání řetězců a zvýšení jejich flexibility.²⁷



Obr. 7 Lamelární (a) a laterální (b) organizace lipidů SC (upraveno dle^{26,28}). V kapalně fázi je poloha lipidů obtížně definovatelná ve srovnání s hexagonálním a orthorhombickým krystalickým uspořádáním, u nichž jsou laterální pohyby minimální. Orthorhombická fáze má lipidy v jednom směru těsněji u sebe (0,37nm), je tedy pevnější, ale i méně permeabilní, oproti fázi hexagonální. Kapalná fáze je vysoce permeabilní.²⁸

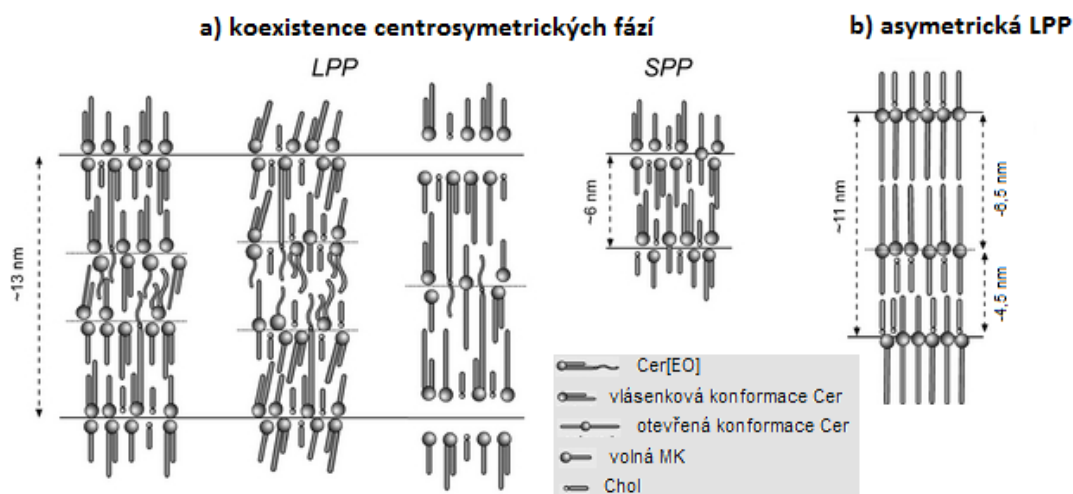
2.1.2.3.2 Lamelární organizace

V 80. letech Wertz, Schwartzendruher, Madison a Downing pomocí elektronové mikroskopie za použití oxidu rutheničelého objevili, že lipidová matrix se zobrazuje jako opakující se jednotky elektronově lucentních pásů v uspořádání široký-úzký-široký pás o délce 12,8 nm (**Obr. 8**).^{24,29}



Obr. 8 Model dle Schwartzendruber a kol. (1989) (upraveno dle³⁴)

V r. 1991 Bouwstra a kol. za použití rentgenové difrakce na izolovaném SC navrhla další teorii, a to přítomnost dvoucentrálně symetrických lamelárních fází: jedna s periodicitou cca 6 nm (SPP=krátká periodická fáze) a druhá s periodicitou cca 13 nm (LPP=dlouhá periodická fáze) (Obr. 9a). Z toho bylo zřejmé, že mezi korneocyty je více než jedna dvojvrstva lipidů. LPP se nachází mezi velkými plochými povrchy přilehlých korneocytů a SPP v blízkosti okrajů. V přítomnosti vody se ukázalo, že nedochází k bobtnání dvojvrstev, ale s rostoucí hydratací se snižuje uspořádání lipidů, což vysvětluje urychlovací účinky vody.^{25,30}

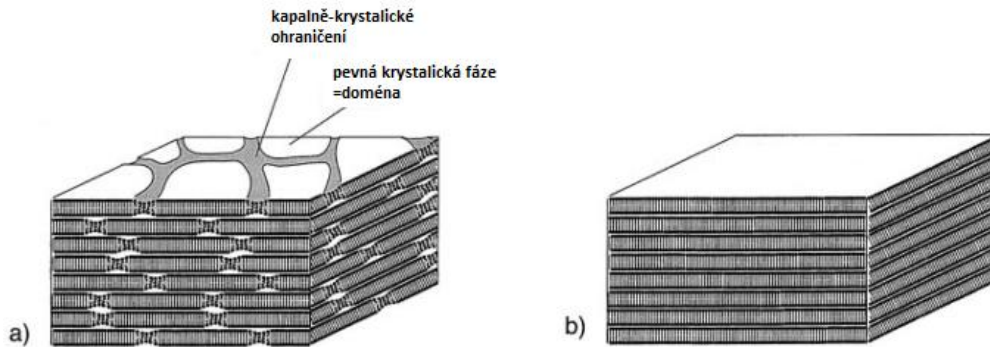


Obr. 9 Schématické modely navržené pro lamelární molekulární organizaci lipidů SC (upraveno dle²⁵)

S jinou teorií přišel Garson a kol. Podle jejich studie jsou Cer lokalizovány v mezibuněčných prostorech do dvojvrstev o dvou různých tloušťkách: 4,5 nm a 6,5 nm (Obr. 9b). Tato hypotéza je shodná s modelem Schwartzendruber a vysvětluje přítomnost úzkých a širokých pásů.³¹

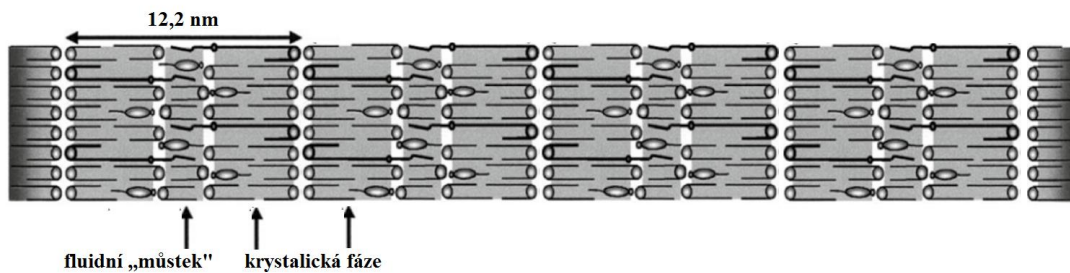
Forslind byl toho názoru, že pro bariérové vlastnosti kůže je důležitý fázový stav lipidové vrstvy. Definoval tzv. doménově mozaikový model (Obr. 10a), v němž

je část lipidů organizována do oblasti uspořádaných lipidů (pevná/gelová krystalická fáze - doména) a tyto oblasti jsou ohraničeny spojitou neuspořádanou fází, kde jsou lipidy ve fluidním stavu (kapalně-krystalická fáze).^{15,30,32,}



Obr. 10 Model lamelárního uspořádání lipidů SC a) dle Forslinda b) dle Norléna (upraveno dle¹⁵)

Později Bouwstra a kol. navrhli tzv. sandwichový model pro LPP, kde významnou roli molekulárního „můstku“ hrají ultra dlouhé Cer (EOS, EOP a EOH).³³



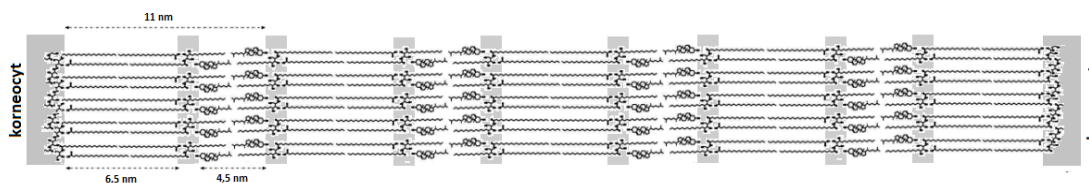
Obr. 11 „Sandwichový model“ (upraveno dle³³)

V r. 2001 Norlén tvrdí ve své teorii, že lipidová vrstva existuje jako jednotná a souvislá gelová fáze.³⁰ Na základě této teorie vznikl model jednotné gelové fáze (**Obr. 10b**).¹⁵

McIntosh pozoroval asymetrické rozložení molekul Chol v rámci modelových systémů.²⁴

V r. 2012 Iwai a kol. experimentálně prokázali, že lipidová vrstva je organizována do naskládaných dvojvrstev ceramidů, které jsou v plně otevřené konformaci. V extracelulárním prostoru se opakuje asymetrická lamelární jednotka o délce 11 nm, která se skládá z úzkých (4,5 nm) a širokých (6,5 nm) pásů (**Obr. 9b**,

Obr. 12). Molekuly Chol jsou asociovány se sfingoidní částí Cer. Tato jedinečná organizace logicky vysvětluje nejen nízkou propustnost epidermální bariéry, ale také její robustnost.^{24,34}



Obr. 12 Model dle Iwai et al. (2012) (upraveno dle³⁴)

2.1.3 Kožní onemocnění spojená s poškozením bariéry SC

V současné době je známo několik kožních onemocnění, jejichž hlavním nebo vedlejším patofyziologickým projevem je poškození bariérové funkce kůže se změnou propustnosti epidermis.³⁵

2.1.3.1 Atopická dermatitida (AD)

AD je chronické, zánětlivé onemocnění, podmíněné složitou interakcí genetické predispozice, vlivů vnějšího prostředí, neuro-imunologické nerovnováhy a porušené epidermální bariéry. Projevuje se suchostí, nadměrným odlupováním pokožky, svěděním a zánětem kůže.³⁶ Kůže pacientů s AD se vyznačuje zvýšenou citlivostí na dráždivé látky a alergenů.

Narušení kožní bariéry lze přičíst výraznému snížení hladiny Cer, které působí jako modulátory permeability a ovlivňují hydrataci pokožky.³⁷ U AD dochází k poklesu zejména CerEOS, který hraje dominantní roli při správné molekulární organizaci mezibuněčných lipidů.

Příčinou snížení hladiny Cer v SC je pozměněný metabolismus Cer spojený se zvýšenou expresí sfingomyelin-deacetylázy. Tento enzym převádí SM na volné MK a sfingosylfosforylcholin. SM není tak využit k tvorbě Cer. Následně je snížena tvorba sfingosinu (za normálních okolností vzniká z Cer účinkem ceramidázy v SC), u něhož je významná silná antimikrobiální aktivita na *Staphylococcus aureus*. Down-regulace sfingosinu je jedním z důvodů zranitelnosti pacientů s AD na tuto bakterii, což může vést k rozvoji zánětu.³⁵

2.1.3.2 Recesivní X-vázaná lamelární ichtyóza (RXLI)

Jedná se o kožní onemocnění způsobené genetickým defektem v metabolismu lipidů. Příčinou je nedostatek enzymu steroidní sulfatázy. Dochází k akumulaci CS a snížení hladiny Chol v epidermis a tedy ke změně poměru CS/Chol. Organizace lipidů je pozměněna a následkem je abnormální strukturální uspořádání mezibuněčných lipidových lamel ve SC. CS ovlivňuje i jiné biologické procesy, jako je proteázová aktivita v SC, což vede k nadměrné deskvamaci pokožky. Kromě inhibičního účinku na proteázy v SC působí CS také jako aktivační faktor eta-isoformy proteinové kinázy C, která je úzce spojena se zástavou buněčného cyklu a diferenciací.^{35,38}

2.1.3.3 Lupénka (psoriáza)

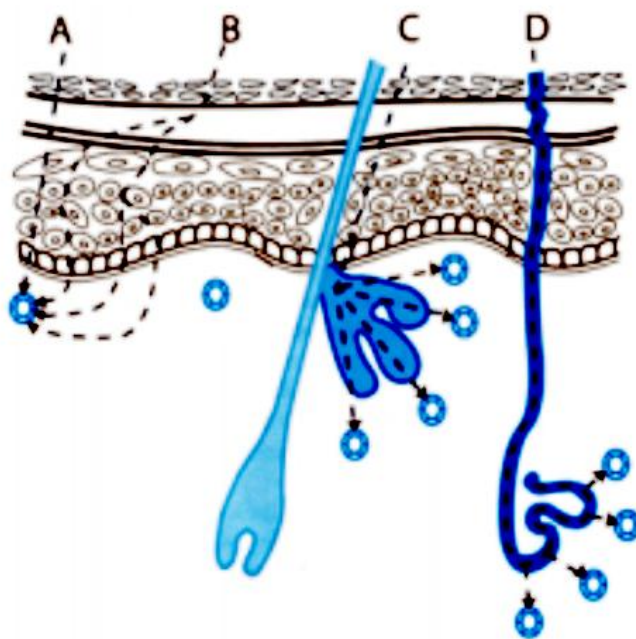
Lupénka je benigní zánětlivé onemocnění kůže s hyperproliferačí. V důsledku hyperproliferace je SC až desetkrát silnější než obvykle. Psoriatické SC postrádá schopnost zadržovat vodu a je charakterizováno abnormální soudržností.

Podobně jako u AD je zde pozměněna hladina Cer. Bylo zjištěno, že psoriatická ložiska vykazují nižší množství Cer esterifovaného kyselinou linolovou (CerEOS, EOP) a Cer obsahujícího fytosfingosin (CerNP, CerAP), naopak je zvýšený výskyt Cer s obsahem sfingosinu (CerNS, CerNP). Možnými příčinami je nedostatečné zpracování GlcCer na Cer pomocí enzymu glukocerebrosidázy nebo snížená koncentrace prosaposinu (prekurzor proteinu aktivujícího sfingolipidy).³⁹

2.2 Mechanismus průniku xenobiotika kůže

Léčiva, či jiné chemické látky při dermální expozici mohou pronikat do vnitřního prostředí organismu různými cestami (*Obr. 13*):

- A. transcelulárně (skrz korneocyty a keratinocyty),
- B. intercelulárně (mezibuněčnými prostory),
- C. transfolikulárně (vlasovými folikuly a mazovými žlázami),
- D. transglandulárně (vývody potních žláz).⁴⁰



Obr. 13 Mechanismy resorpce xenobiotika kůží⁴¹

Nejčastěji látky využívají přenosu intercelulární cestou, méně často prochází transcelulárně. Ostatní cesty mají, mimo aplikace pomocí nanonosičů, okrajový význam, protože žlázy a vlasové folikuly zabírají pouze 0,1% celkového povrchu kůže.⁴⁰

Dle Diembecka a spol. je transport látek rozdělen na adsorpci a absorpci. Při adsorpci se xenobiotikum nedostává do systémového oběhu, setrvává především ve SC, působí lokálně v místě aplikace a je eliminováno deskvamací pokožky. U absorpce látka proniká do hlubších vrstev epidermis, do šikry a prostřednictvím tkáňového moku a krevních kapilár se dostává do systémového řečiště.⁴²

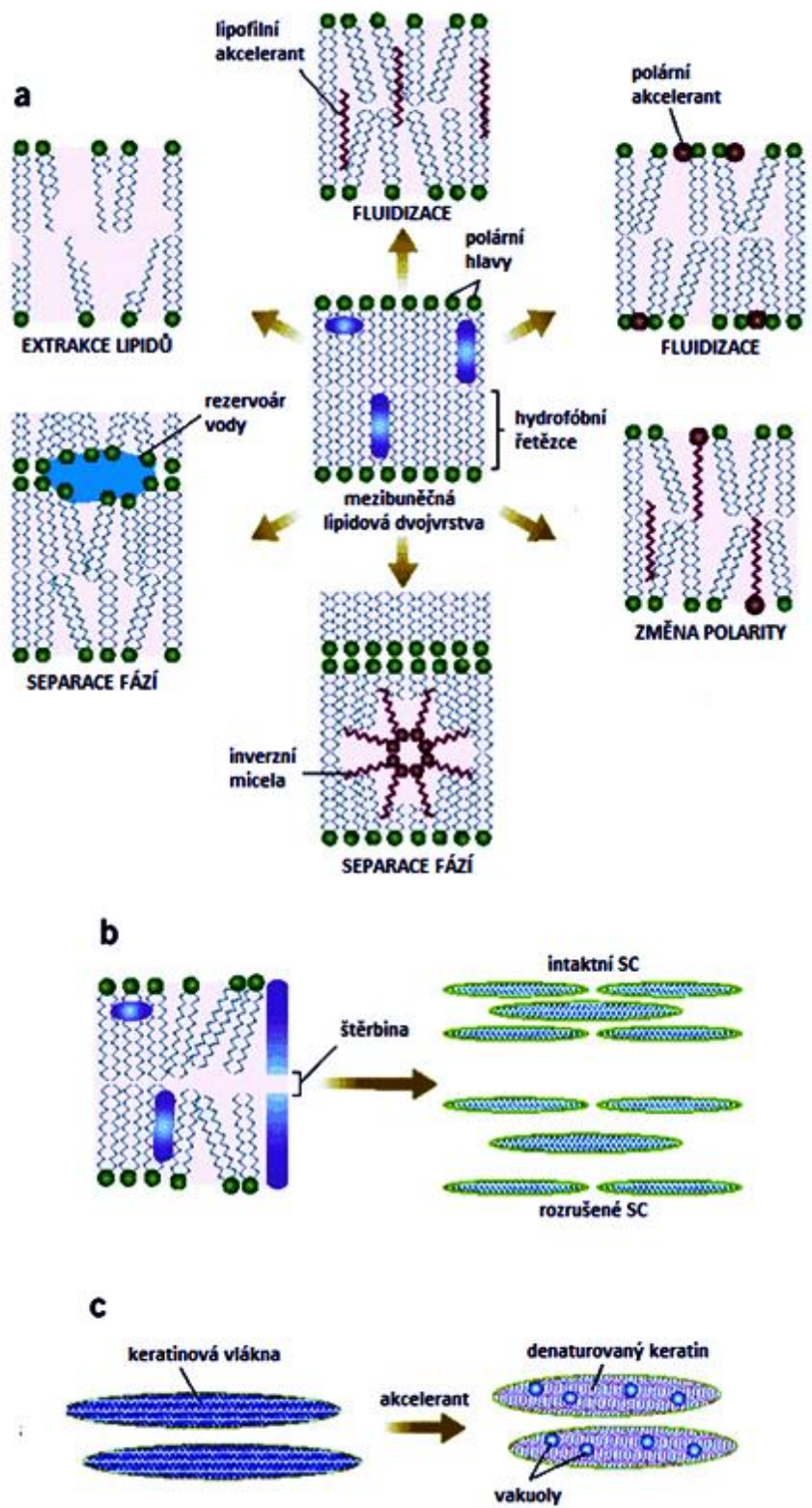
Dle WHO je dermální absorpce globální termín, který popisuje transport chemických látek z vnějšího prostředí kůže do krevního oběhu. Často se dále dělí na:

- penetraci (vstup látky do SC),
- permeaci (průnik látky do strukturně i funkčně odlišné vrstvy kůže),
- resorpci (přenos látky mizními a krevními cévami do systémového oběhu).⁴³

2.2.1 Urychlovače permeace

Existují pomocné látky, které urychlují absorpci léčiva při transdermální aplikaci. Tyto pomocné látky se označují jako urychlovače (akceleranty) transdermální penetrace (popř. permeace). Mohou usnadňovat průnik léčiva jednak nespecificky (např. překrvením v místě aplikace, zvýšením hydratace kůže) nebo specifickým působením na molekulární struktury epidermis.⁴⁴ B. W. Barry ve své lipidově-proteinově-rozdělovací teorii tvrdí, že akceleranty působí jedním ze tří následujících mechanismů, eventuálně jejich kombinací:

- 1) rozrušením struktur lipidů kůže, čímž dochází ke zvýšení jejich fluidity a tím i permeability (**Obr. 14a**),
- 2) interakcí s intracelulárními proteiny, zejm. α -keratinem (**Obr. 14c**), nebo s proteiny desmosomů (**Obr. 14b**),
- 3) optimalizací rozdělovacího koeficientu léčivo-kůže.^{45,46}



Obr. 14 Možné účinky transdermálních akceleraantů. a) Interakce s mezibuněčnými lipidy. b) Interakce s desmosomy a proteiny. c) Interakce s keratinem v korneocytech.⁴⁷

Z chemického hlediska můžeme akceleranty rozdělit na hydrofilní, hydrofóbní nebo amfifilní látky. Hydrofóbní a amfifilní sloučeniny (např. MK, monoterpeny, povrchově aktivní látky, Azony, či analogy ceramidů) ovlivňují hlavně lipidy SC, vykazují větší tendenci k fluidizaci lamel. Hydrofilní akceleranty interagují s polárními skupinami lipidů SC nebo proteinových struktur.⁴⁸ Např. dimethylsulfoxid díky své polaritě interaguje s hydrofilními skupinami lipidů za vzniku vodíkových vazeb. Vytěsňuje tak z vazby vodu, která vytvoří solvatační obal a dojde k rozvolnění organizované lipidové lamely.⁴⁵

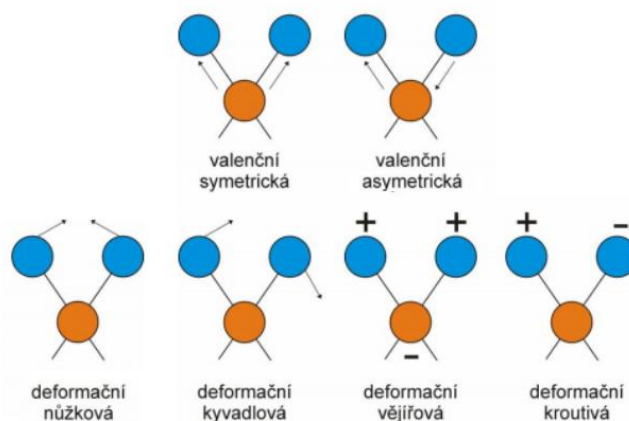
Ideální urychlovače permeace by měly splňovat tyto požadavky:

- nesmí být toxické, dráždivé, alergizující,
- nesmí mít vlastní farmakologický účinek,
- narušení kožní bariéry nesmí být ireverzibilní,
- nástup by měl být rychlý,
- po ukončení aplikace je kožní bariéra rychle a plně obnovena,
- penetrace by měla působit pouze v jednom směru, tzn. nesmí docházet ke ztrátám endogenních látek.⁴⁹

2.3 Studium lipidů SC infračervenou spektrometrií

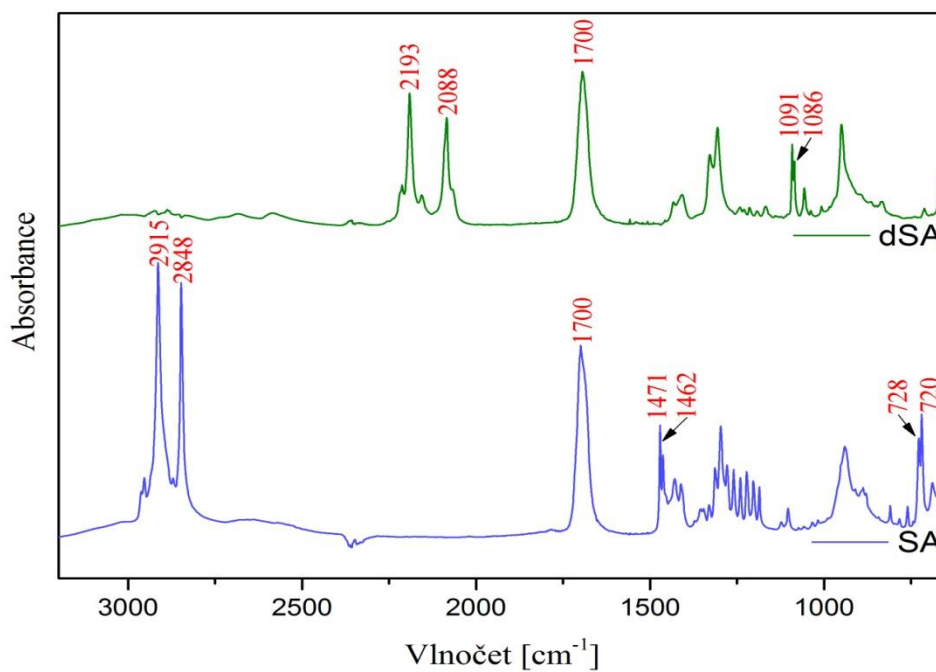
Infračervená (IČ) spektrometrie patří mezi spektrální metody, jejichž principem je měření intenzity záření, které je absorbováno zkoumanou látkou nebo jejím roztokem.⁵⁰ IČ spektrometrie pracuje v IČ oblasti, tedy v oblasti vlnových délek λ asi 800 nm–100 μm , tj. rozsah vlnočtů 12 000–10 cm^{-1} . IČ záření lze dále rozdělit na záření v oblasti blízké (12 000–4 000 cm^{-1}), střední (4 000–200 cm^{-1}) a vzdálené (200–10 cm^{-1}).⁵¹ Nejvýznamnější je oblast střední, kde se organické látky projevují největším počtem absorpčních pásů. Oblast mezi 650–1500 cm^{-1} je charakteristická pro každou organickou látku, tzn., že v této oblasti se nemohou stejně spektrálně projevovat dvě různé organické sloučeniny.⁵²

Elektromagnetické záření vlnových délek v IČ oblasti má menší energii než UV záření. Nedochozí tedy k excitaci π elektronů, ale ke změně vibračně-rotačního stavu molekuly (**Obr. 15**).⁵⁰ Při absorpci záření v rozmezí vlnočtu cca 4000–1500 cm^{-1} dochází ke změně vibrací přítomných vazeb a funkčních skupin v molekule, jedná se o tzv. *valenční vibrace* (ν). Změny valenčních úhlů nastávají při absorpci záření o vlnočtu cca 1500–500 cm^{-1} a tyto změny označujeme jako *deformační vibrace*.^{50,52} Důležitou podmínkou pro pozorování vibrací v IČ spektru je změna dipólového momentu (např. polární vazba C=O je aktivní, C=C vazba v IČ spektru aktivní není).⁵³ IČ spektrometrie tedy účinně popisuje polární skupiny molekul, včetně vodíkových vazeb.²⁷



Obr. 15 Některé typy vibrací⁵³

IČ spektrum (tj. závislost absorpce nebo transmittance na vlnočtu) se skládá z celé řady absorpčních pásů. Jednotlivé pásy jsou typické pro jednotlivé funkční skupiny a vazby v analyzované molekule.⁵⁰



Obr. 16 Příklad IČ spektra kyseliny stearové a jejího deuterovaného analogu. U SA pozorujeme dublet CH_2 rocking (kyvadlových) vibrací při vlnočtu 720 cm^{-1} a 728 cm^{-1} , to nám značí orthorhombické laterální uspořádání. Vlnočty 1462 cm^{-1} a 1471 cm^{-1} jsou typické pro pozice pásu CH_2 scissoring (nůžkových) vibrací a dublet opět značí orthorhombickou fázi. Při 1700 cm^{-1} se projevuje neionizovaná karboxylová skupina. Pro tuto práci jsou významné zejm. CH_2 symetrické valeční vibrace (2848 cm^{-1}) a CH_2 asymetrické valeční vibrace (2915 cm^{-1}). Deuterovaná SA obsahuje ve své molekule místo vodíku „těžší“ deuterium, čímž dochází k posunu polohy pásu CD_2 asymetrických a symetrických valečních vibrací do nižších hodnot vlnočtu (2193 cm^{-1} ; 2088 cm^{-1}). Dublet CD_2 nůžkových vibrací (1086 cm^{-1} ; 1091 cm^{-1}) nám indikuje orthorhombické uspořádání řetězce.

Valenční vibrace vazeb vodíku se vyskytují v intervalu $4000\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$. Volná vazba O-H absorbuje záření při vlnočtu kolem 3600 cm^{-1} a jednotlivé typy vazeb C-H v rozmezí $3300\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$.

Dvojně vazby absorbují záření v oblasti $1900\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$. Jako „oblast otisku palce“ je často nazývána oblast deformačních vibrací ($1500\text{--}500\text{ cm}^{-1}$), protože každá sloučenina má zde charakteristický soubor frekvencí a toho lze využít k určení totožnosti neznámé sloučeniny porovnáním s referenčními spektry.⁵²

Polohy pásů CH_2 valenčních symetrických vibrací (ν_s) jsou detekovatelné v rozmezí vlnočtu $2848\text{--}2854\text{ cm}^{-1}$.⁵⁴ Cer v pevném stavu vykazují vysoký stupeň uspořádání uhlovodíkových řetězců a absorpční pás $\text{CH}_2 \nu_s$ je detekovatelný v poloze 2848 cm^{-1} . Přejdem do fluidní fáze roste poměr *gauche* konformerů a poloha pásu se posunuje k hodnotě kolem 2853 cm^{-1} .²⁷ Podobná korelace existuje pro polohy pásů CH_2 valenčních asymetrických vibrací (ν_{as}) a to v rozmezí $2915\text{--}2924\text{ cm}^{-1}$. U deuterovaných sloučenin můžeme obdobně pozorovat polohy $\text{CD}_2 \nu_s$ mezi 2088 a 2097 cm^{-1} a polohy $\text{CD}_2 \nu_{as}$ v intervalu $2193\text{--}2198\text{ cm}^{-1}$ (**Obr. 16**) (**Tab. 1**).⁵⁴

Tab. 1 Další typy vibrací uhlovodíkového řetězce citlivých na konformaci a formování domén (upraveno dle⁵⁴)

typ vibrace	vlnočet [cm^{-1}]	citlivost
$\text{CH}_2 \nu_s$	2848–2854	
$\text{CH}_2 \nu_{as}$	2915–2924	
$\text{CD}_2 \nu_s$	2088–2097	
$\text{CD}_2 \nu_{as}$	2193–2198	
CH_2 nůžková (δ)	1462–1474	dublet značí orthorhombické uspořádání řetězce
	1468	hexagonální uspořádání řetězce
CD_2 nůžková (δ)	1086–1094	dublet značí orthorhombické uspořádání řetězce
	1089	hexagonální uspořádání řetězce
CH_2 kyvadlová (γ)	720, 728	singlet značí hexagonální fázi, dublet orthorhombickou

Pro objasnění molekulární organizace lipidů SC je důležité znát také polohy pásů polárních hlav. Vibrace karbonylové skupiny byla pozorována mezi 1690 a 1740 cm^{-1} . Se zvyšující se teplotou roste hodnota vlnočtu z 1690 cm^{-1} na $1695\text{--}1715\text{ cm}^{-1}$. Nízký vlnočet udává silné vodíkové vazby a oslabení těchto vazeb se projevuje zvýšením hodnoty. U Cer byly dále pozorovány silné pásy v oblastech spektra $1700\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$. Jsou za ně zodpovědné 2 typy amidových vibrací, které jsou vysoce citlivé na tvorbu vodíkových vazeb. Amidová vibrace I je detekovatelná v intervalu $1640\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$, vzniká z 80% z karbonylové vibrace a zapojením do vodíkových vazeb klesá hodnota jejího vlnočtu. Mezi $1540\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$ se projevuje poloha pásu amidové vibrace II, ta vychází z 60% z deformační N-H a z 40% z valenční C-N vibrace a oslabením vodíkových vazeb dochází k poklesu vlnočtu.⁵⁵

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

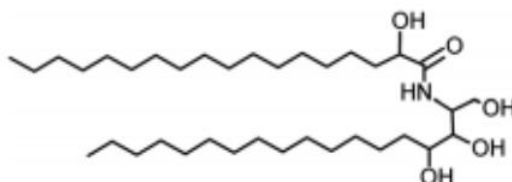
3.1 Použité suroviny a chemikálie

Byly vybrány 3 strukturně blízké typy ceramidů s významným zastoupením v kůži:

- kratší analog přirozeného CerAP:

α -hydroxy-N-oktadekanoylfytsfingosin (Cer VI; Evonik, Essen, Německo)

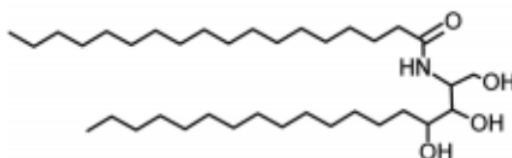
(dále jen CerAP)



- kratší analog přirozeného CerNP:

N-oktadekanoylfytsfingosin (Cer III; Evonik, Essen, Německo)

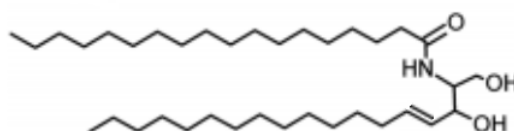
(dále jen CerNP)



- kratší analog přirozeného CerNS24:

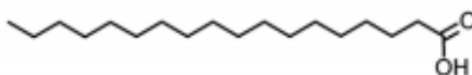
N-oktadekanoylsfingosin (CerNS; SigmaAldrich, Schnelldorf, Německo)

(dále jen CerNS)

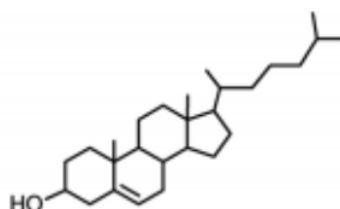


Pro přípravu lipidových směsí podobných složení SC byly dále použity:

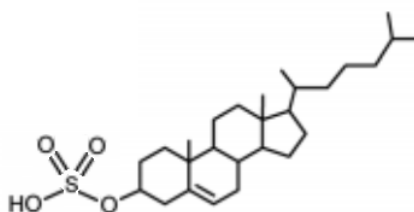
- **kyselina stearová (SA)**(Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Německo)
zástupce MK se stejnou délkou řetězce (C18) jako použité Cer



- **deuterovaný analog SA (dSA)** (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Německo)
 - všech 35 vodíků SA bylo nahrazeno deuteriem
 - pro rozlišení vibrací MK a ostatních lipidů
- **cholesterol (Chol)** (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Německo)



- **cholesterol sulfát (CS)** (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Německo)



Chemikálie použité pro přípravu lipidových membrán:

- **chloroform** (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Německo)
- **metanol** (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Německo)
 - obojí čistoty pro HPLC

3.2 Použité přístroje

Vlastní měření jsem prováděla pomocí IČ spektrometru s Fourierovou transformací Nicolet iZ10 (ThermoScientific, USA) v kombinaci s vyhřívaným ATR ZnSe krystalem o průměru 1,3 mm (*Obr. 17*). ATR je označení pro metodu zeslabeného úplného odrazu (Attenuated Total Reflectance).



Obr. 17 FT-IR spektrometr Nicolet iZ10

3.3 Použitý software

Spektrometr byl ovládán programem OMNIC (ThermoScientific, USA). Tento software umožňuje současné měření a zpracovávání spekter, jejich editování, modifikaci zobrazení, analyzování naměřených spekter, tvorbu protokolů, výpočet statistických spekter a matematické operace se spektry. Zároveň diagnostikuje aktuální stav spektrometru a umožňuje provádět jeho validace a kvalifikace.⁵⁶

Pro vyhodnocování dat a tvorbu grafů byl použit speciální počítačový program Origin (OriginLab Corporation, USA).

3.4 Pracovní postup

3.4.1 Příprava vzorků

Přečištění jednotlivých ceramidů

Čištěný Cer byl připraven rozpuštěním surového Cer ve směsi rozpouštědel chloroform/metanol v objemovém poměru 2:1. Získaný roztok Cer o koncentraci 40 mg/ml byl zahříván do rozpuštění. Během zahřívání a za stálého míchání byl přidáván po částech metanol (20-30 ml), aby došlo k odpaření chloroformu a nakonec se roztok dal chladit. Snížením teploty došlo k vysrážení již čistého Cer.

Příprava ceramidů pro IR-měření

Čištěný či surový Cer jsem zahřívala po dobu 20 minut při 95 °C. Poté jsem nechala vzorek vychladnout na laboratorní teplotu. Při této teplotě pak stál 24 hodin a déle. Po uplynutí této doby jsem změřila teplotní závislost IČ spekter.

Příprava vzorků lipidických směsí

Pro měření jsem dále připravovala lipidické směsi (**Tab. 2**) obsahující 5 hm.% cholesterol-sulfátu a 95 hm. % ekvimolární lipidické směsi z příslušného ceramidu, popř. směsi ceramidů v molárním poměru 1:1, respektive 1:1:1, cholesterolu a kyseliny stearové. Tj. podle vzorce: 95 hm. % (n(Cer) : n(Chol) : n(SA)) + 5 hm. % CS.

Tab. 2 Seznam měřených vzorků (v závorce jsou uvedeny zkratky pro jednodušší psaní textu)

jednotlivé Cer	ekvimol. lipidická směs z příslušného Cer	
	s SA	s dSA
CerAP - surový nezahřátý - surový zahřátý - čištěný nezahřátý - čištěný zahřátý	CerAP/Chol/SA/CS	CerAP/Chol/dSA/CS
	CerNP/Chol/SA/CS	CerNP/Chol/dSA/CS
	CerNS/Chol/SA/CS	CerNS/Chol/dSA/CS
CerNP CerNS	ekvimol. lipidická směs ze směsi Cer v mol. poměru 1:1	
	s SA	
	CerAP/CerNP/Chol/SA/CS (CerAP/NP)	CerAP/CerNP/Chol/dSA/CS
	CerNP/CerNS/Chol/SA/CS (CerNP/NS)	CerNP/CerNS/Chol/dSA/CS
	CerAP/CerNS/Chol/SA/CS (CerAP/NS)	CerAP/CerNS/Chol/dSA/CS
	ekvimol. lipidická směs ze směsi Cer v mol. poměru 1:1:1	
s SA		
CerAP/CerNP/CerNS/Chol/SA/CS (CerAP/NP/NS)	CerAP/CerNP/CerNS/Chol/dSA/CS	

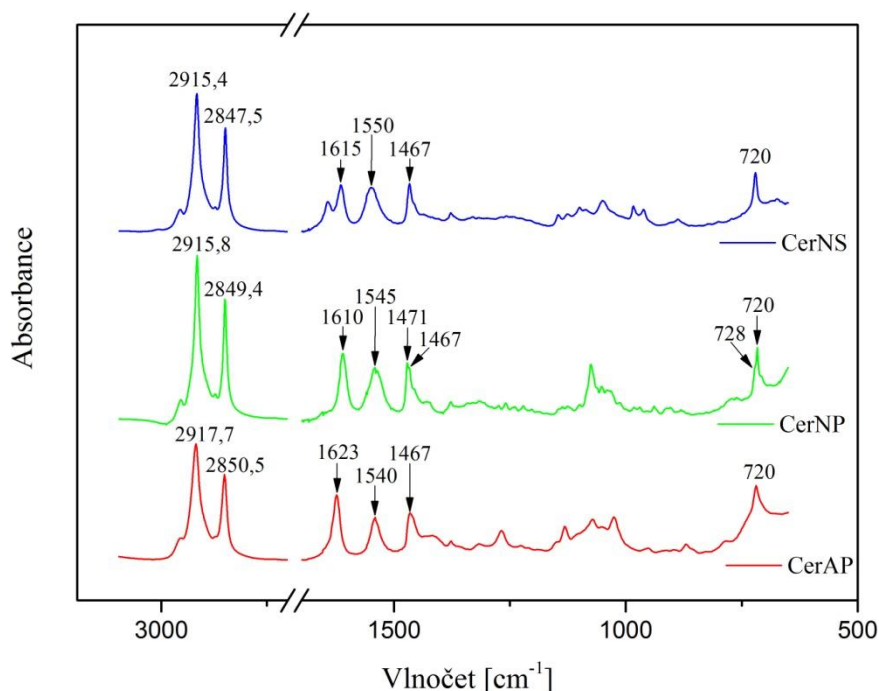
K přípravě jsem používala přečištěný CerAP a CerNP a surový CerNS. Vypočítané množství jednotlivých lipidů jsem odděleně rozpustila ve směsi rozpouštědel chloroformu s metanolem (v objemovém poměru 2:1) a to v takovém objemu rozpouštědel, abych získala koncentraci lipidů 10 mg/ml. Po důkladném rozpuštění a promíchání jsem vzorky zbavila rozpouštědla proudem stlačeného vzduchu a ponechala jsem je den v exsikátoru pod vakuem pro ještě důkladnější vysušení. Následující den jsem vzorky zahřívala po dobu 20 minut nad teplotu fázového přechodu (tj. cca 95 °C) a nechala vychladnout. Po 24 hodinách jsem provedla měření.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 IČ spektra

CerAP, CerNP, CerNS

Nejprve jsem provedla porovnání IČ spekter čištěného zahřátého CerAP a CerNP a surového zahřátého CerNS změřených při 32 °C (což je teplota povrchu kůže) (*Obr. 19*).



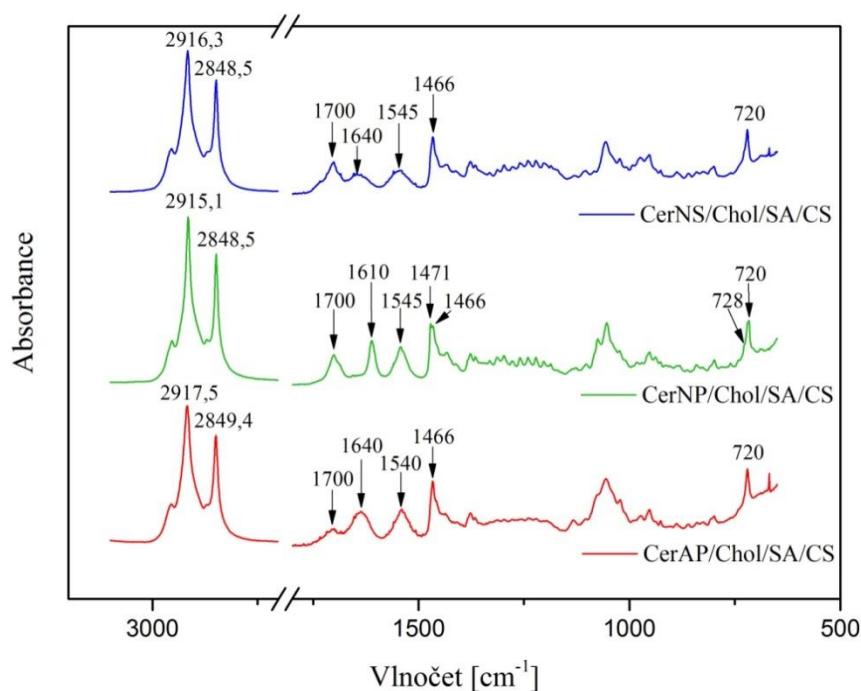
Obr. 19 IČ spektra CerAP, CerNP a CerNS při 32 °C.

Singlet CH_2 kyvadlových (720 cm^{-1}) a CH_2 nůžkových (1467 cm^{-1}) vibrací u CerAP a CerNS prozrazuje hexagonální uspořádání. U CerNP je při detailním zkoumání vidět náznak dubletu CH_2 nůžkových vibrací (1471 a 1467 cm^{-1}) a náznak raménka CH_2 kyvadlových vibrací při vlnočtu 728 cm^{-1} , což by znamenalo, že část molekul CerNP se vyskytuje v orthorhombickém uspořádání. Polohy pásů v rozmezí $1540\text{--}1550 \text{ cm}^{-1}$ určují amidové vibrace II polární hlavy Cer. Jsou zde viditelné i amidové vibrace I, avšak pravděpodobně v důsledku vodíkových můstků došlo k posunu poloh absorpčních pásů směrem k nižším hodnotám ($1610\text{--}1623 \text{ cm}^{-1}$). Analogické pozice pásů amidu I a II u CerNP byly popsány již dříve a označeny jako α krystalická modifikace CerNP.⁵⁷ Pás amidu I vzorku surového CerNS se štěpí

na dublet. Je zřejmé, že CerAP jeví nejslabší vodíkové interakce oproti CerNP i CerNS. Uhlovodíkové řetězce Cer se projevují CH₂ asymetrickými (cca 2915 cm⁻¹) a symetrickými (cca 2848 cm⁻¹) valenčními vibracemi. Nízké hodnoty vlnočtů těchto vibrací značí rigidní uspořádání molekul Cer. Nejvyšší uspořádanost řetězců jeví CerNS, naopak CerAP je nejméně uspořádaný, což může souviset i s nejslabšími vodíkovými můstky.

Jednoceramidové ekvimolární lipidické směsi s CerAP, CerNP a CerNS

V IČ spektru (při 32 °C) ekvimolárních směsí jednotlivých Cer se objevuje další významný absorpční pás (**Obr. 20**).



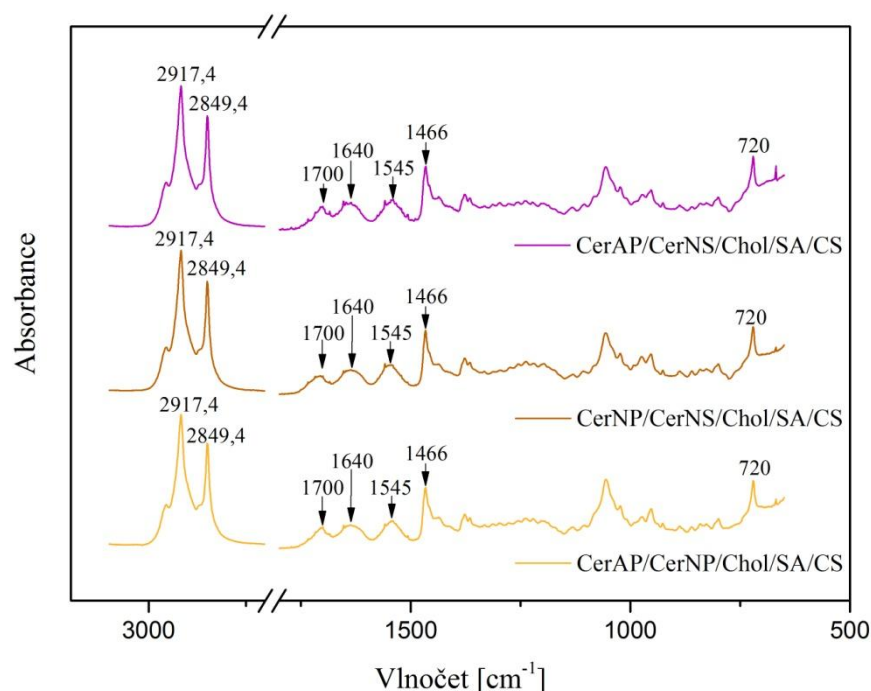
Obr. 20 IČ spektra jednoceramidových ekvimolárních směsí s jednotlivými Cer při 32 °C.

Při 1700 cm⁻¹ detekujeme pás karboxylové skupiny v neionizovaném stavu pocházející z SA. Opět v intervalu 1540–1545 cm⁻¹ u všech tří směsí pozorujeme amidický pás II. Rozdíly nastávají v poloze amidického pásu I. U směsi s CerNP můžeme sledovat posun tohoto pásu do polohy 1610 cm⁻¹, a to pravděpodobně v důsledku přítomnosti vodíkových můstků. Nízké hodnoty CH₂ asymetrických

(kolem 2915 cm^{-1}) a symetrických (kolem 2848 cm^{-1}) valenčních vibrací u všech směsí prozrazují velmi rigidní uspořádání uhlovodíkových řetězců. Podobně jako u čistých ceramidů nejvyšší mobilitu řetězců a nejslabší vodíkové interakce jeví směs s CerAP. Ekvimolární směsi s CerAP a CerNS vykazují hexagonální laterální uspořádání, což se projevuje singletem v oblasti nůžkových (1466 cm^{-1}) a kyvadlových CH_2 vibrací (720 cm^{-1}). Štěpení CH_2 nůžkové vibrace na dublet (1471 cm^{-1} ; 1466 cm^{-1}) a ramínko CH_2 rocking pásu v oblasti 728 cm^{-1} indikují, že určitá část lipidů ve vzorku s CerNP je uspořádána orthorhombicky.

Dvouceramidové ekvimolární lipidické směsi s Cer v mol. poměru 1:1

Ve spektrech ekvimolárních směsí obsahujících dva typy Cer v mol. poměru 1:1 pozorujeme dříve jmenované pásy při stejném vlnočtu (**Obr. 21**).



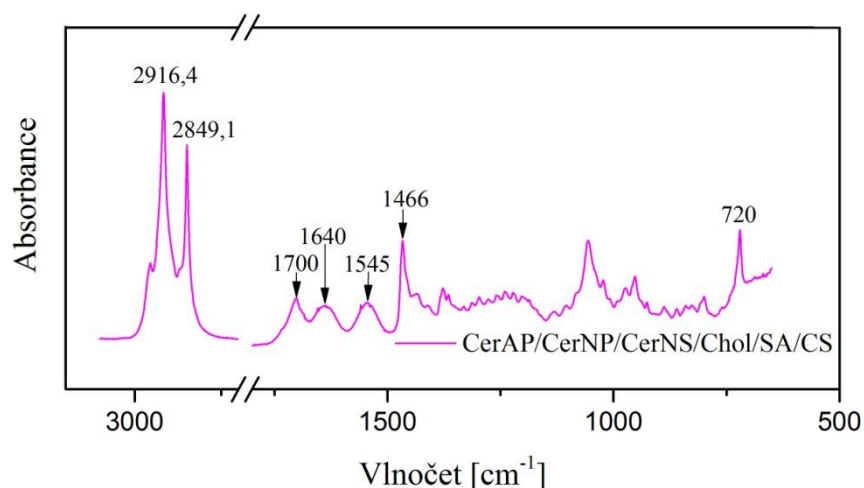
Obr. 21 IČ spektra dvouceramidových ekvimolárních směsí s Cer v molárním poměru 1:1 při $32\text{ }^{\circ}\text{C}$.

U směsí s CerNP oproti směsi se samostatným CerNP došlo k posunu amidického pásu I k tradičním hodnotám (1640 cm^{-1}), takže silné vodíkové můstky ovlivňující pozici pásu již nejsou přítomny. Z toho můžeme usoudit, že CerNP

netvoří mezimolekulární vodíkové vazby s jinými složkami směsi. Povaha vodíkových vazeb ve vzorku se samotným CerNP je zřejmě ale mezimolekulární, protože se snižujícím se zastoupením CerNP posun pásu mizí. To znamená, že vzdálenost mezi molekulami CerNP je příliš velká na vytvoření vodíkového můstku. Pokud by vodíkové vazby byly intramolekulární povahy, tak by snižující se koncentrace CerNP neměla vliv na spektrum a amidický pás I s nižším vlnočtem by byl přítomen.

Tříceraamidová ekvimolární lipidická směs s Cer v mol. poměru 1:1:1

IČ spektrum směsi obsahující všechny tři typy Cer jeví **Obr. 22** vzorové hodnoty absorpčních pásů uvedené v teoretické části. V oblasti polární hlavy můžeme vidět oba amidické pásy v poloze 1545 cm^{-1} ; 1640 cm^{-1} , která naznačuje slabší vodíkové vazby a rovněž i pás neionizované karboxylové skupiny (1700 cm^{-1}). Lipidy v této směsi jsou opět uspořádány hexagonálně (singlet v oblastech 720 cm^{-1} a 1466 cm^{-1}). Symetrické ($2849,1\text{ cm}^{-1}$) a asymetrické ($2916,4\text{ cm}^{-1}$) CH_2 valenční vibrace prozrazují nízkou mobilitu uhlovodíkových řetězců s výrazným zastoupením *trans* konformerů.



Obr. 22 IČ spektrum tříceraamidové ekvimolární směsi s Cer v molárním poměru 1:1:1 při 32 °C.

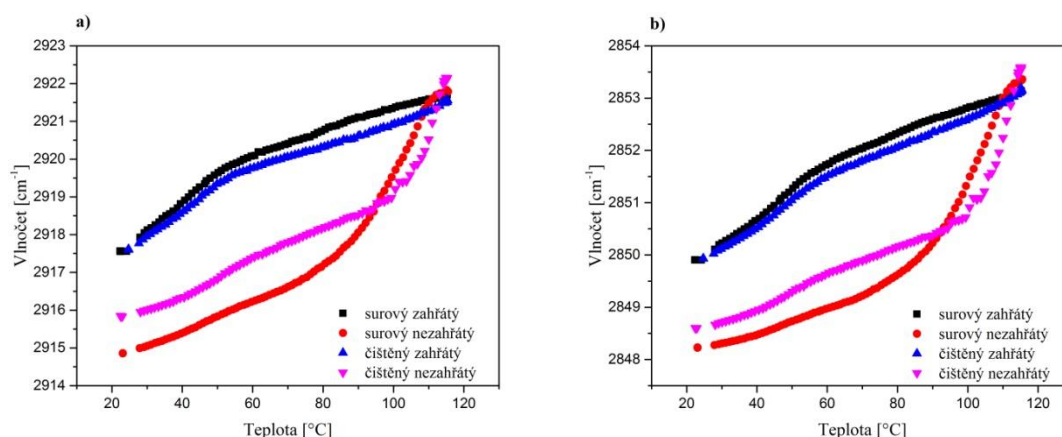
4.2 Teplotní závislosti spekter

Pozorování teplotních závislostí IČ spekter bylo hlavním přínosem IČ spektroskopie. Významné jsou oblasti, které nám určují fluiditu řetězců v membránách, tj. zejména CH_2 a CD_2 asymetrické a symetrické valenční vibrace.

4.2.1 Jednotlivé Cer a SA

Teplotní závislost spektra CerAP

Prvním úkolem bylo sledovat chování nepřečištěných a přečištěných vzorků samotného CerAP a určit, jaký vliv na teplotní závislost má proces rekrystalizace. Dále byl pozorován vliv předchozího zahřívání CerAP nad teplotu fázového přechodu na průběh teplotní závislosti.



Obr. 23 Teplotní závislost polohy pásu CH_2 a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací u čistého CerAP.

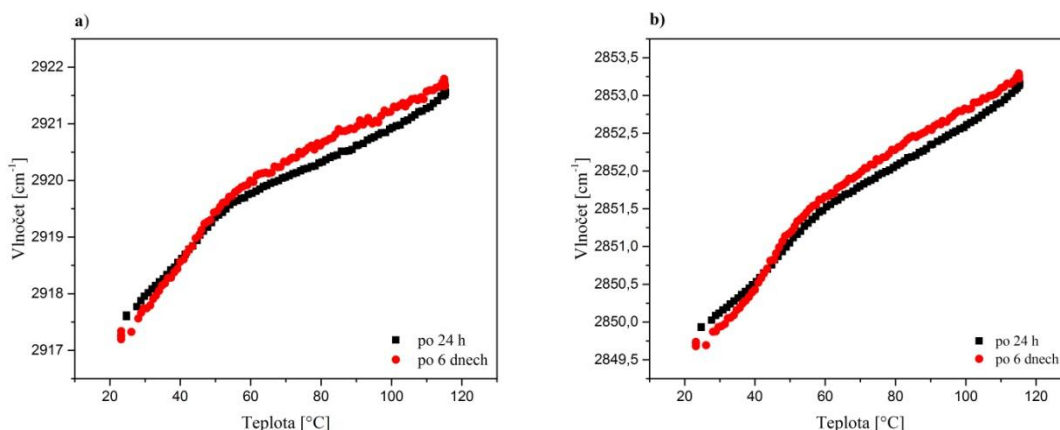
Na **Obr. 23** pozorujeme průběh teplotní závislosti CH_2 valenčních vibrací vzorků s CerAP. Na první pohled je zřejmý rozdíl mezi předem zahříványými a nezahříványými vzorky. K tání nezahřátých vzorků dochází v rozmezí 90 a 100 °C. Vzorky předem zahřáté tají při teplotě vyšší, jejíž hodnoty bohužel nevidíme, protože fázový přechod probíhal mimo měřené rozmezí. Zahřívání vzorky vykazují vyšší počáteční vlnočet pásu než vzorky nezahřáté. Je to dáno tím, že po procesu zahřátí CerAP krystalizuje v jiné krystalické struktuře, než pokud je čistě krystalizován z určitého rozpouštědla. Toto je v souladu i se zjištěním jiných autorů.⁵⁸

Rozdíl mezi surovým zahřátým a čištěným zahřátým CerAP je minimální. Jejich absorpční pásy jsou na počátku měření na přibližně stejné pozici ($2917,6 \text{ cm}^{-1}$) a i průběh teplotní závislosti je velmi podobný.

Mezi nezahřívány vzorky pozorujeme odlišnou pozici pásu při laboratorní teplotě (rozdíl cca 1 cm^{-1}). Čištěním surového CerAP se zvýšila teplota počátku fázového přechodu. Surový nezahřátý CerAP začíná tát při cca $90 \text{ }^\circ\text{C}$, čištěný pak kolem $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Vzhledem k velmi podobnému vývoji pozice CH_2 vibrací během druhého zahřátí, je pravděpodobné, že rozdílná pozice před prvním zahřátím není dána obsahem nečistot v surovém CerAP, ale spíše jinou krystalickou strukturou výchozí látky.

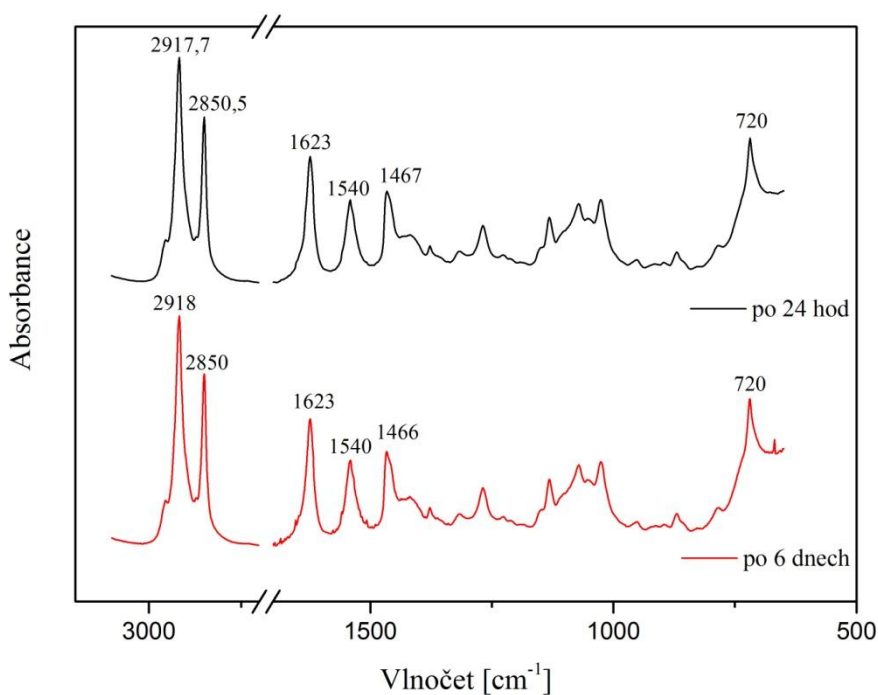
Stabilita krystalické fáze CerAP po zahřátí

Pro zjištění stability krystalické fáze, která v CerAP vzniká po zahřátí, byl přečištěný CerAP zahříván nad teplotu fázového přechodu a měřen ve dvou obdobích: po 24 hod a po 6 dnech. Vzorek byl v tomto období skladován při pokojové teplotě.



Obr. 24 Teplotní závislost polohy pásu CH_2 a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací při sledování stability krystalické fáze čištěného zahřátého CerAP.

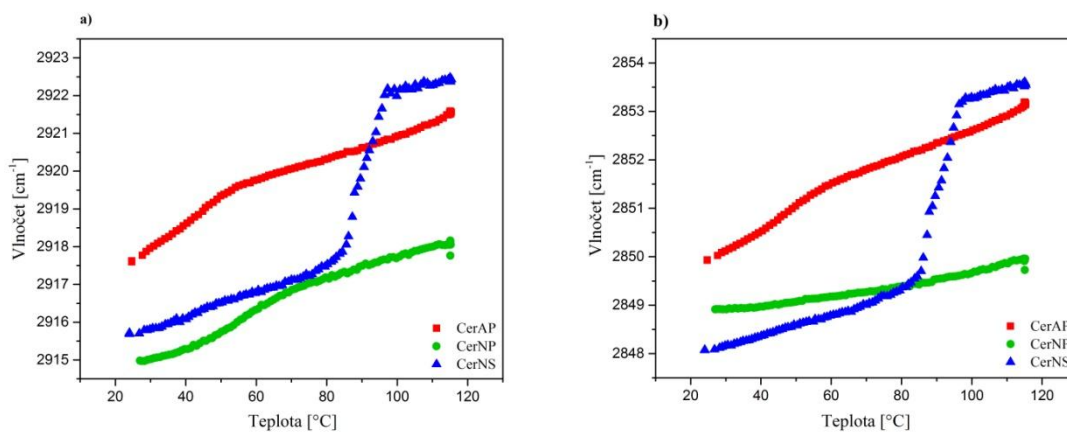
Z **Obr. 24** je vidět nepatrný rozdíl mezi CerAP měřeným po 24 hodinách a CerAP měřeným po 6 dnech. CerAP má po 6 dnech na počátku měření pozici absorpčního pásu o cca $0,5 \text{ cm}^{-1}$ níže než Cer po 24 hodinách a teplotní závislosti probíhá u něj o malinko strměji. Z toho vyplývá, že sledovaný časový úsek má minimální vliv na „stárnutí“ ceramidů, čemuž nasvědčuje i IČ spektrum na **Obr. 25**.



Obr. 25 IČ spektrum čištěného, předem zahřátého CerAP měřené po 24 hodinách a po 6 dnech.

Srovnání teplotní závislosti spekter čistých ceramidů

Cílem bylo porovnat teplotní závislost poloh pásů mezi třemi typy Cer: CerAP, CerNP a Cer NS.

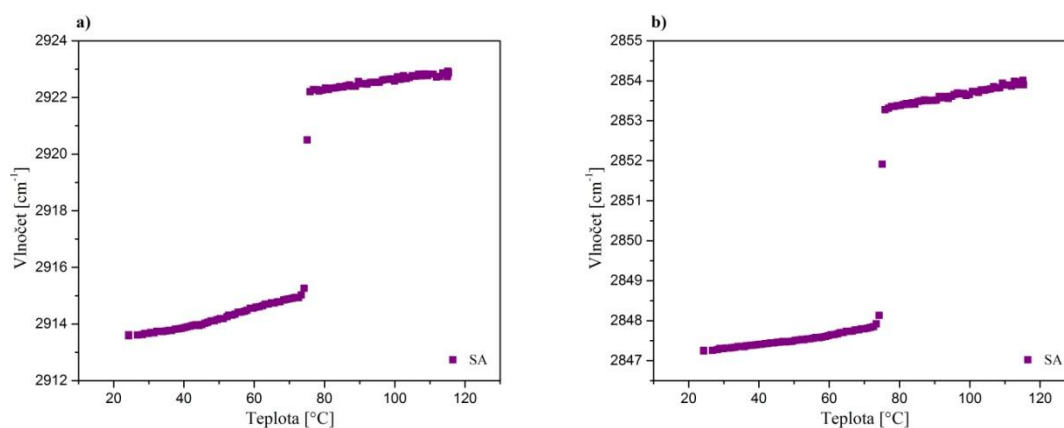


Obr. 26 Teplotní závislost polohy pásu CH_2 a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací čištěného zahřátého CerAP a CerNP a surového zahřátého CerNS.

Z **Obr. 26** je na první pohled patrné odlišné teplotní chování sfingosinového CerNS oproti oběma fytosfingosinovým Cer. U CerNS pozorujeme strmý průběh

fázového přechodu. Řetězce CerNS začínají tát již při cca 85 °C a přechod z krystalické fáze do kapalné je ukončen kolem 95 °C. To se shoduje s výsledky jiných autorů.⁵⁵ Teplotu tání CerAP a CerNP nelze specifikovat, jelikož k fázovému přechodu zřejmě dochází mimo rozsah měření (nad 120 °C). Teplotní závislost polohy pásu CH₂ symetrických valenčních vibrací se u CerNP shoduje s výsledky Garidela.⁵⁹ Polohy pásů u CerAP jsou na začátku měření výše než CerNP a CerNS. Z toho vyplývá, že jeho řetězce mají vyšší poměr *gauche* konformerů a jsou tedy mobilnější.

Teplotní závislost spektra samotné kyseliny stearové

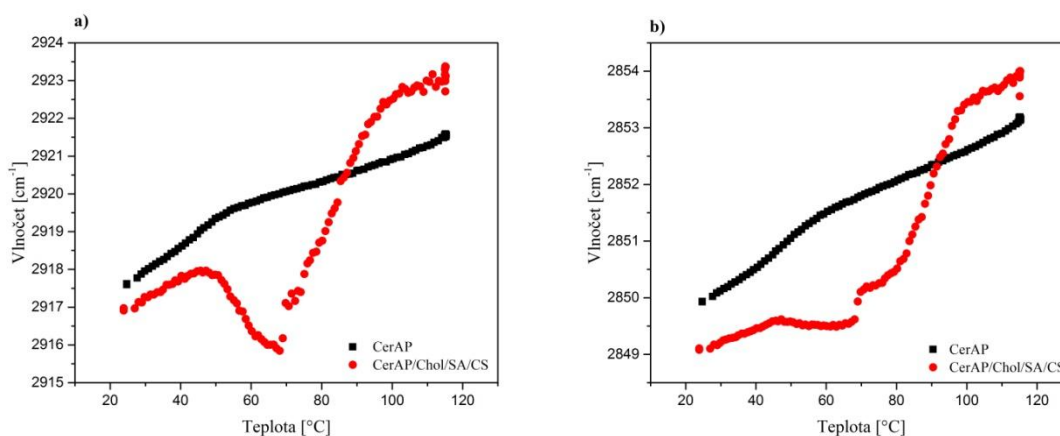


Obr. 27 Teplotní závislost polohy pásu CH₂ a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací SA

Na **Obr. 27** si můžeme všimnout ostrého bodu tání SA zhruba při 75 °C. Na počátku měření je SA ve vysoce uspořádané struktuře, protože se polohy pásu CH₂ asymetrických (2914 cm⁻¹) a symetrických (2847 cm⁻¹) valenčních vibrací projevují při nízkých vlnočtech.

4.2.2 Porovnání čistého Cer s jeho směsí

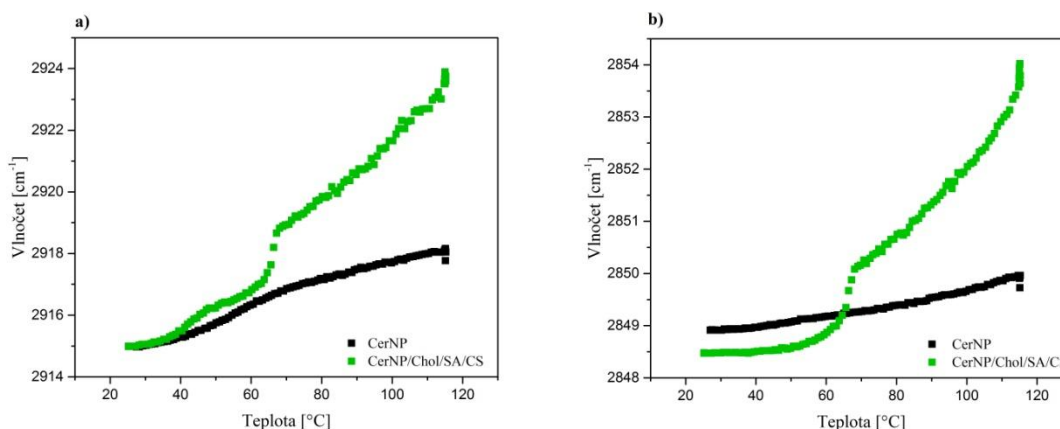
CerAP vs. jednoceramidová směs s CerAP



Obr. 28 Teplotní závislost polohy pásu CH₂ a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací vzorku s CerAP a s jeho směsí s SA, Chol a CS.

Směs s CerAP jeví na **Obr. 28** jiný průběh teplotní závislosti než samostatný CerAP. U směsi s CerAP pozorujeme na **Obr. 28a** výraznou pretranzici (cca 2 cm⁻¹) v rozmezí teplot 50 až 70 °C s následným strmým fázovým přechodem krystalické fáze do fáze fluidní, jenž je ukončen kolem 100 °C. Během pretranzice dochází k reorganizaci uhlovodíkových řetězců do rigidnějšího uspořádání, což je poměrně neobvyklý jev. Dle teplotní závislosti polohy pásu CH₂ symetrických valenčních vibrací (**Obr. 28b**) je pretranzice mírnější s následným chvilkovým táním při cca 70 °C, které je poté přerušeno a opětovné tání pokračuje od cca 80 °C do 100 °C. Naproti tomu k tání samotného CerAP dochází mnohem později, při teplotě vyšší než 120 °C (mimo měřené rozmezí). Poloha pásu u směsi s CerAP při laboratorní teplotě je posunuta o cca 1 cm⁻¹ níže, což znamená, že je směs uspořádána rigidněji než samostatný CerAP.

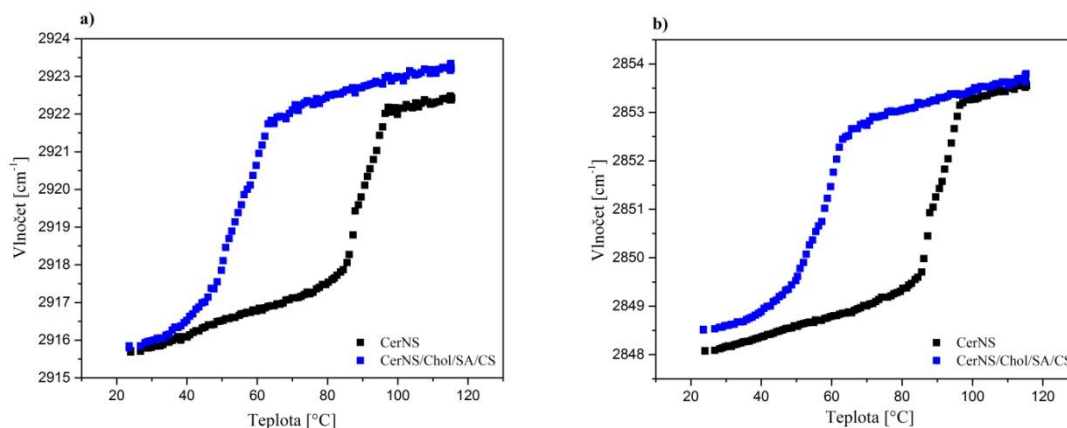
CerNP vs. jednoceramidová směs s CerNP



Obr. 29 Teplotní závislost polohy pásu CH₂ a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací vzorku s CerNP a s jeho směsí.

Na **Obr. 29** pozorujeme teplotní závislost čistěného, předem zahřátého CerNP a jeho ekvimol. směsi. U směsi s CerNP dochází k prudkému nárůstu pozice CH₂ vibrací při cca 65 °C a dále pokračuje fázový přechod pozvolna. Tání samotného CerNP, stejně jako u CerAP, nelze sledovat, protože probíhá v rozmezí teplot, které je mimo měřené rozmezí. Pozice pásu CH₂ asymetrických valenčních vibrací (**Obr. 29a**) u obou vzorků je na počátku měření přibližně podobná (2915 cm⁻¹). Jiná situace je na **Obr. 29b**, kde můžeme vidět u směsi s CerNP posun pásu CH₂ symetrických valenčních vibrací o necelý 1 cm⁻¹ níže, což by u ekvimol. směsi opět prozrazovalo větší zastoupení *trans* konformerů, tedy rigidnější uspořádání.

CerNS vs. jednoceramidová směs s CerNS



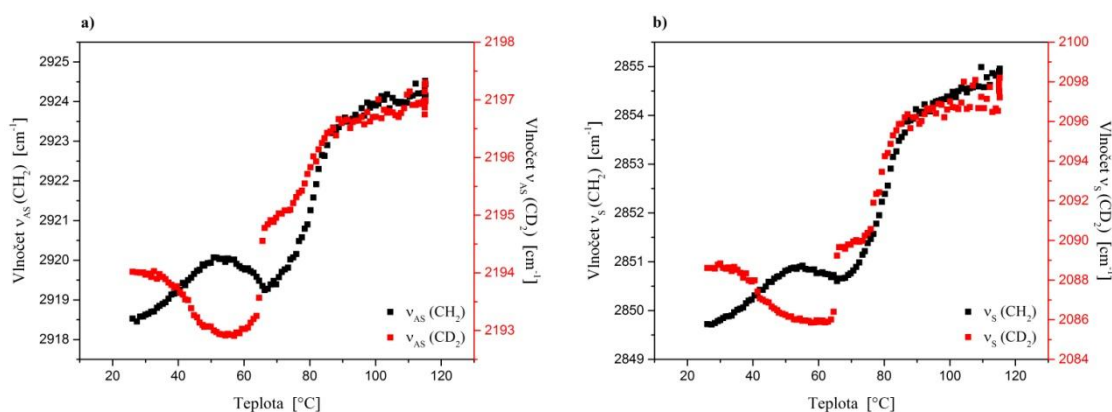
Obr. 30 Teplotní závislost polohy pásu CH₂ a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací vzorku s CerNS a s jeho směsí.

Teplotní závislost u CerNS a jeho ekvimol. směsi probíhala rozdílně ve srovnání s předchozími vzorky (**Obr. 30**). Křivka obou vzorků má jednoduchý sigmoidní tvar. Přejít krystalické fáze do fáze kapalné nastává u směsi s CerNS už při cca 45 °C a končí kolem 60 °C, což je o zhruba 40 °C méně než u samostatného CerNS. U CH₂ asymetrických valenčních vibrací jsou pásy na počátku měření na přibližně stejné pozici (2915,7 cm⁻¹). Poloha pásu CH₂ symetrických valenčních vibrací je při laboratorní teplotě u CerNS zhruba o 1 cm⁻¹ nižší než u samostatného CerNS. To znamená, že uhlovodíkové řetězce jsou v ekvimol. směsi poněkud mobilnější s větším zastoupením *gauche* konformerů. Tímto se CerNS opět odlišuje od obou fytosfingosinových ceramidů.

4.2.3 Srovnání teplotní závislosti CH₂ a CD₂ vibrací jednoceramidových směsí s dSA

Abychom zjistili, zda se mísí SA s ceramidy ve směsi, zaměnila jsem SA za její deuterovaný analog (dSA).

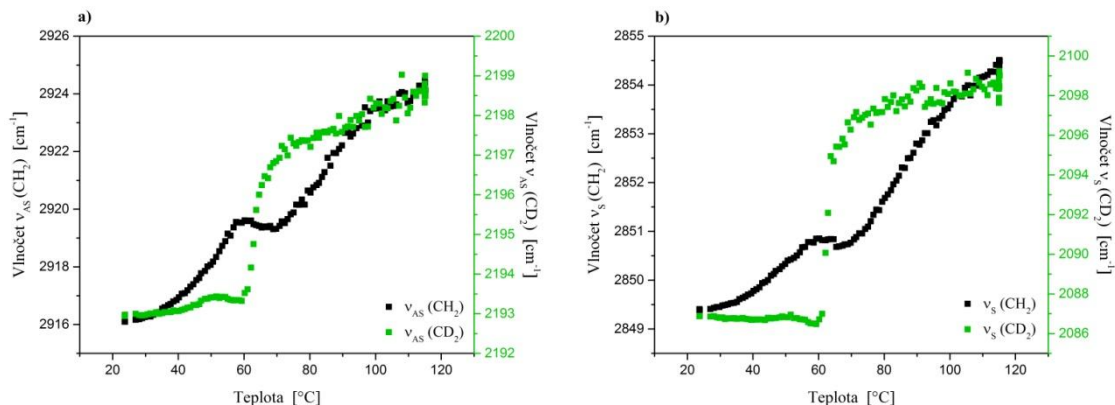
Jednoceramidová směs CerAP s dSA



Obr. 31 Porovnání teplotních závislostí CH₂ a CD₂ a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací směsi CerAP/Chol/dSA/CS.

Podobně jako u nedeuterovaného vzorku sledujeme u směsi CerAP a dSA fázovou pretranzici (**Obr. 31**). Zajímavé je, že zatímco během této pretranzice poloha CH₂ valenčních vibrací CerAP v zásadě stoupá, poloha CD₂ valenčních vibrací dSA klesá. Z toho vyplývá, že uhlovodíkové řetězce molekul Cer se stávají flexibilnější, zatímco u SA uspořádanější. U čistých látek tento jev není sledován. Je zřejmé, že za pokles pozice valenčních CH₂ vibrací ve směsi s nedeuterovanou SA (viz. **Obr. 28**), je zodpovědná SA a ne CerAP. Zajímavostí také je, že samostatná SA taje při teplotě kolem 75 °C bez pretranzice, ale zavedením do směsi dochází u ní k reorganizaci do uspořádanějšího stavu a fázová přeměna začíná již při 60 °C. Z toho vyplývá, že mísitelnost lipidů v této směsi je vysoká.

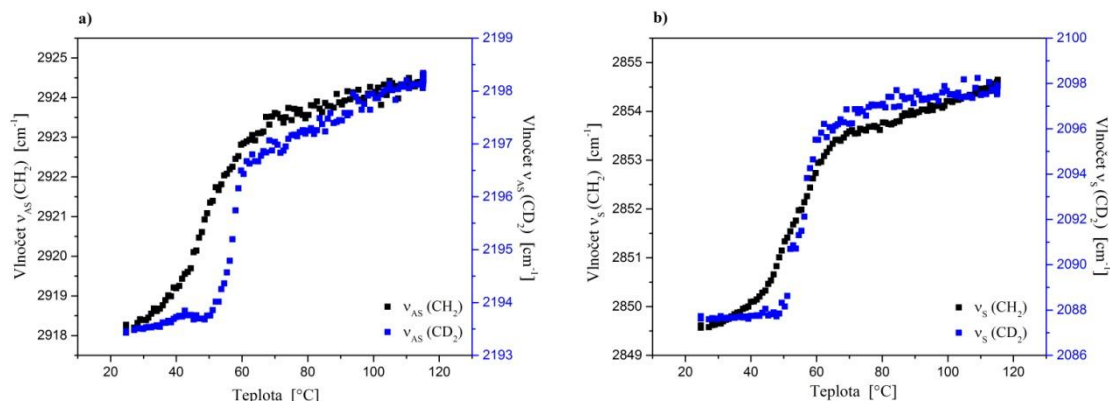
Jednoceramidová směs CerNP s dSA



Obr. 32 Porovnání teplotních závislostí CH₂ a CD₂ a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací směsi CerNP/Chol/dSA/CS.

Dle **Obr. 32** probíhá tání dSA ve směsi CerNP jinak než tání ostatních lipidů. U deuterovaných řetězců dSA pozorujeme velmi mírnou pretranzici (rozmezí cca 50–60 °C) s následným ostrým fázovým přechodem z pevné do fluidní fáze při zhruba 60–65 °C, což opět zcela neodpovídá teplotě tání samostatné SA a značí to, že ostatní lipidy ve směsi ovlivňují její teplotní chování. Uhlovodíkové řetězce zbylých lipidů tají pomaleji s přerušením mezi cca 60–70 °C, kde se jeví také mírná pretranzice. Fázový přechod pak pokračuje minimálně do 110 °C. Ve srovnání s CerAP směsí založené na CerNP jeví nižší mísitelnost lipidů.

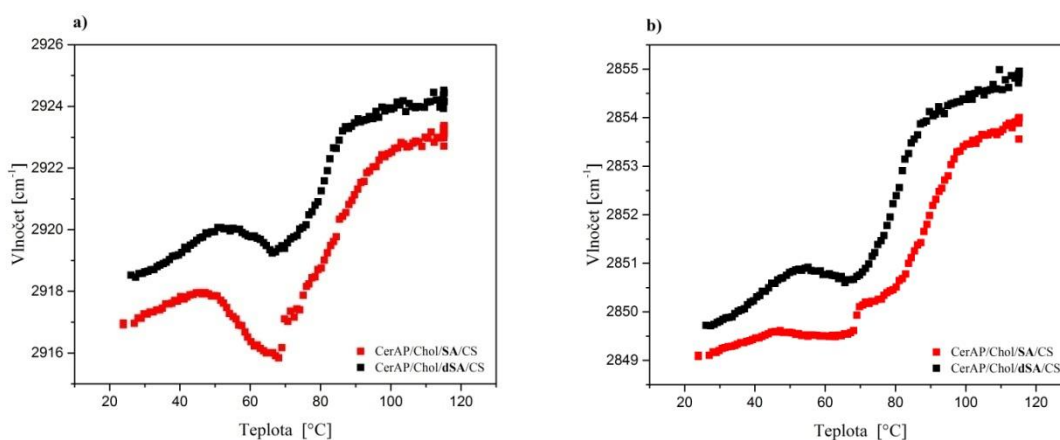
Jednoceramidová směs CerNS s dSA



Obr. 33 Porovnání teplotních závislostí CH_2 a CD_2 a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací směsi CerNS/Chol/dSA/CS.

Obr. 33a naznačuje mezi cca 40 a 50 $^{\circ}C$ slabou pretranzici řetězce dSA ve směsi s CerNS, která se u ekvimol. směsi s SA již neprojevuje. Tání deuterovaných řetězců bylo rychlé, začínalo při zhruba 50 $^{\circ}C$ a při 60 $^{\circ}C$ bylo ukončeno. Opět pozorujeme odlišnou teplotu fázové přeměny oproti samostatné SA. Uhlovodíkové řetězce ostatních lipidů směsi tály zhruba od 40 $^{\circ}C$ do 65 $^{\circ}C$. Dle teplotní závislosti polohy pásů CH_2 a CD_2 symetrických valenčních vibrací (**Obr. 33b**) probíhá fázová přeměna velmi podobně, obě křivky mají jednoduchý sigmoidní tvar. Vzhledem k poklesu teploty tání SA ve směsi, na rozdíl od čisté SA (viz. **Obr. 27**), lze usoudit dobré promísení lipidů ve směsi.

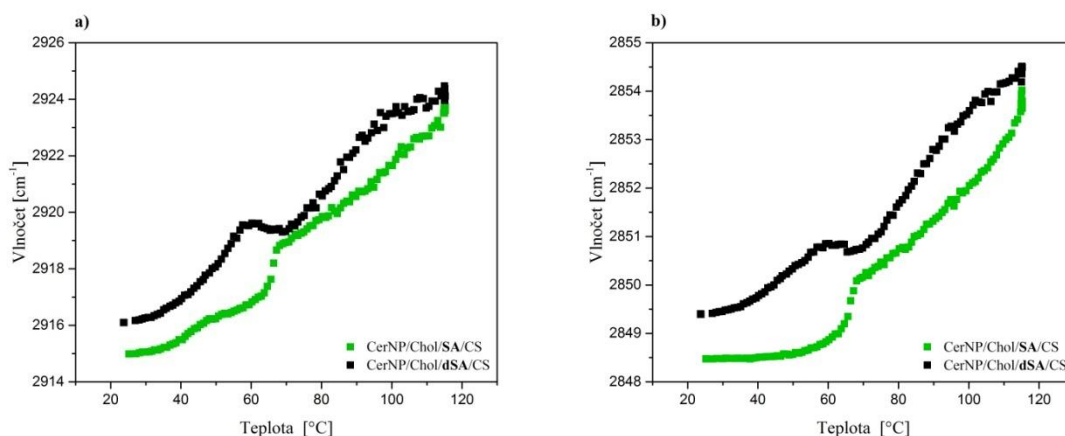
4.2.4 Srovnání teplotní závislosti CH_2 vibrací jednoceramidových směsí s nedeuterovanou a deuterovanou SA



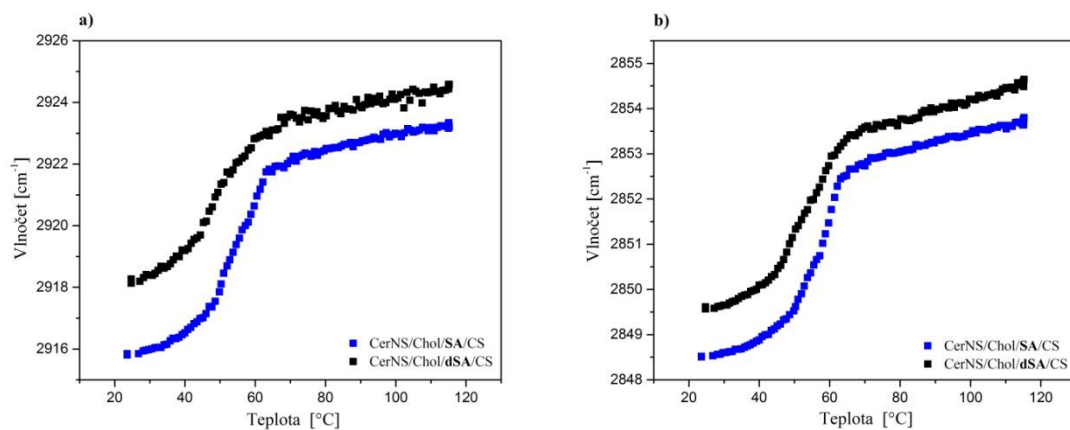
Obr. 34 Teplotní závislost polohy pásu CH_2 a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací směsí CerAP s SA a směsí CerAP s dSA.

Obr. 34 nám ukazuje fakt, že SA snižuje polohu pásu CH_2 asymetrických a symetrických valenčních vibrací o cca $1,5 \text{ cm}^{-1}$. Je tedy zřejmé, že řetězce CerAP jsou ve směsi méně uspořádané, než řetězce kyseliny.

Obdobně je tomu tak u směsi CerNP s SA v porovnání se směsí CerNP s dSA (**Obr. 35**) a u směsi CerNS s SA v porovnání se směsí CerNS s dSA (**Obr. 36**).



Obr. 35 Teplotní závislost polohy pásu CH_2 a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací směsí CerNP s SA a směsí CerNP s dSA.

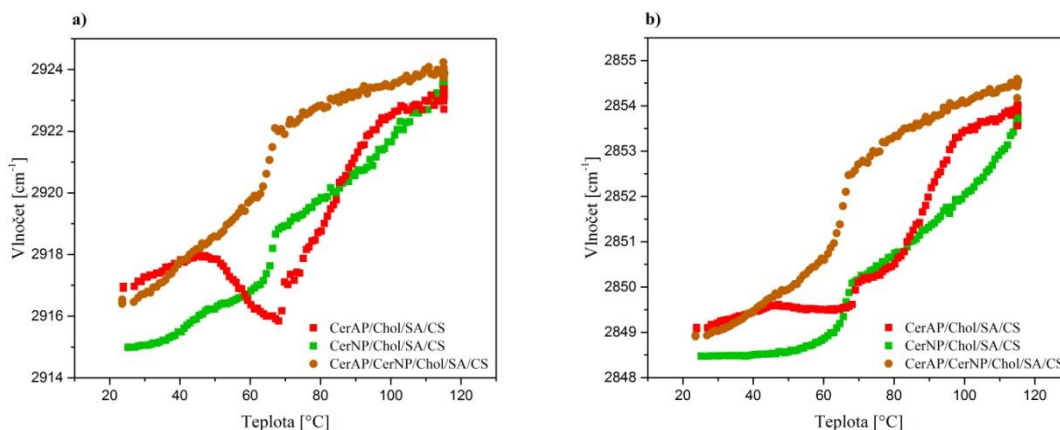


Obr. 36 Teplotní závislost polohy pásu CH₂ a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací směsi CerNS s SA a směsi CerNS s dSA.

4.2.5 Srovnání teplotní závislosti CH₂ vibrací jednoceramidových a dvouceramidových směsí

Směs CerAP vs. směs CerNP vs. směs CerAP/NP

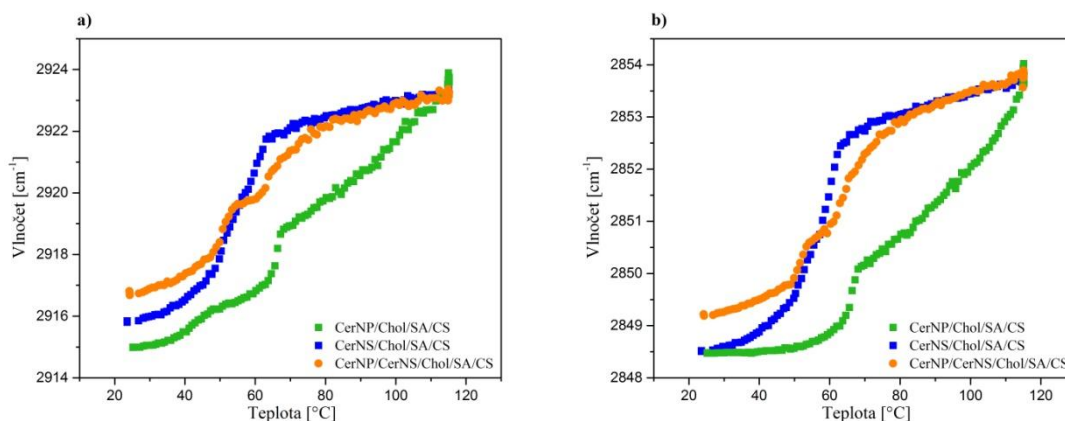
Na *Obr. 37* je popsán průběh teplotní závislosti CH₂ asymetrických a symetrických valenčních vibrací vzorků s ekvimol. směsí CerAP, CerNP a s ekvimol. směsí CerAP/NP v mol. poměru 1:1.



Obr. 37 Teplotní závislost polohy pásu CH₂ a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací vzorků obsahujících: směs CerAP, směs CerNP, směs CerAP/NP.

U směsi s CerAP pozorujeme v rozmezí teplot 50 až 70 °C výše zmíněnou pretranzici. Od 70 do 100 °C došlo k postupnému přechodu krystalické fáze do kapalné. U směsi s CerNP probíhala fázová přeměna ve dvou krocích. Nejdříve nastal prudký skok při 65 °C a pak následovalo pozvolné tání uhlovodíkových řetězců. Pokud ve vzorku byly obsaženy oba typy Cer zároveň, průběh teplotního chování se zcela změnil. Lipidické řetězce směsi CerAP/NP tály bez pretranzice pozvolna s prudkým vzestupem zhruba při 65 °C, což je daleko nižší teplota, než u obou vzorků s jednotlivými ceramidy. Za povšimnutí stojí rozdíl ve vlnočtu poloh pásů CH₂ valenčních vibrací, kde u směsi s CerAP/CerNP došlo k posunu do vyšších hodnot oproti samotné směsi s CerNP, což naznačuje vyšší mobilitu řetězců (vyšší podíl *gauche* konformerů) ve směsném vzorku.

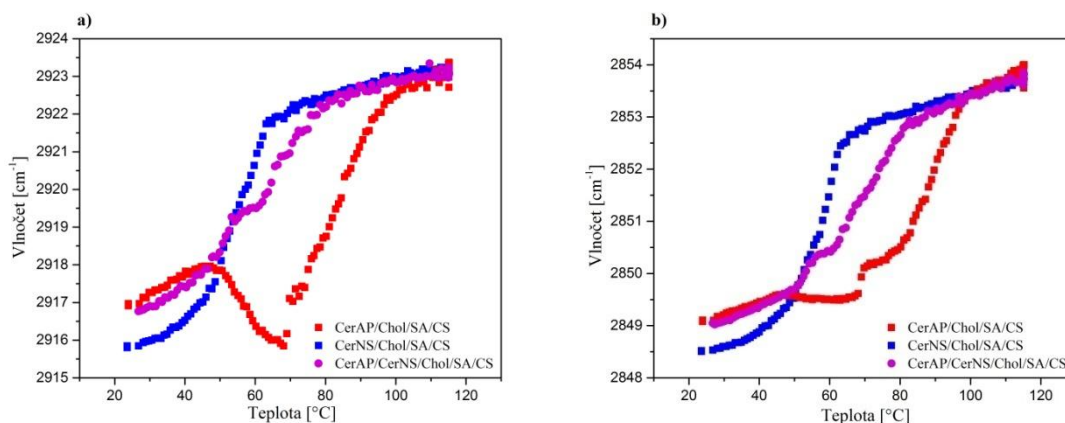
Směs CerNP vs. směs CerNS vs. směs CerNP/NS



Obr. 38 Teplotní závislost polohy pásu CH_2 a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací vzorků obsahujících: směs CerNP, směs CerNS, směs CerNP/NS.

Teplotní závislost vzorků s CerNP, CerNS a CerNP/NS se lišila (**Obr. 38**). Při laboratorní teplotě byly absorpční pásy CH_2 valenčních vibrací jednotlivých vzorků na různé pozici. Nejvyšší zastoupení *gauche* konformerů (nejvyšší pozice pásu) měla směs s CerNP/NS, méně směs s CerNS a nejméně směs s CerNP (ta je nejuspořádanější). Fázová přeměna směsi CerNP/NS probíhala ve dvou fázích, podobně jako směs s CerNP avšak s rozdílnou počáteční teplotou tání, která se více přibližuje směsi s CerNS. Ve směsném vzorku tak pozorujeme charakteristické rysy obou jednotlivých směsí s jedním Cer.

Směs CerAP vs. směs CerNS vs. směs CerAP/NS



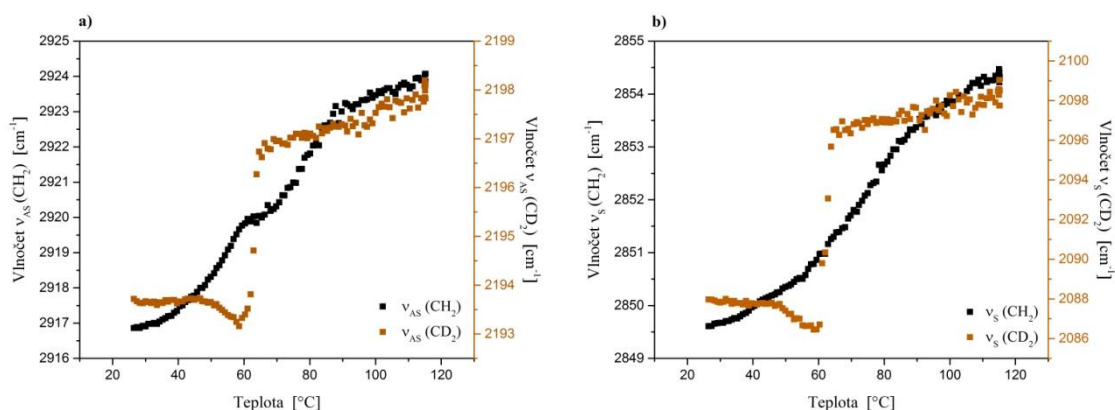
Obr. 39 Teplotní závislost polohy pásu CH₂ a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací vzorků obsahujících: směs CerAP, směs CerNS, směs CerAP/NS.

Křivka směsi CerAP a směsi CerNS byla popsána v předchozím textu, proto se budu více zabývat fialovou křivkou, která nám značí teplotní závislost směsi s CerAP/NS (**Obr. 39**). Uspořádání řetězců této směsi je ve srovnání se směsí s CerNS méně rigidní. Do zhruba 45 °C probíhá teplotní závislost směsi CerAP/NS přibližně stejně jako směs s CerAP. Pak u CerAP následuje přeuspořádání uhlovodíkových řetězců, ke kterému u komplexní směsi v důsledku přítomnosti CerNS nedochází. Na křivce systému CerAP/NS si ale můžeme povšimnout zlomu ve fázovém přechodu, za který je nejspíš zodpovědný CerAP. I u tohoto směsného vzorku vidíme jevy, které jsou typické pro obě směsi s jednotlivými Cer.

4.2.6 Srovnání teplotní závislosti CH_2 a CD_2 vibrací dvouceramidových směsí s dSA

Záměnou vodíků SA za deuterium můžeme opět odděleně pozorovat chování řetězců SA a ostatních lipidů ve směsném vzorku.

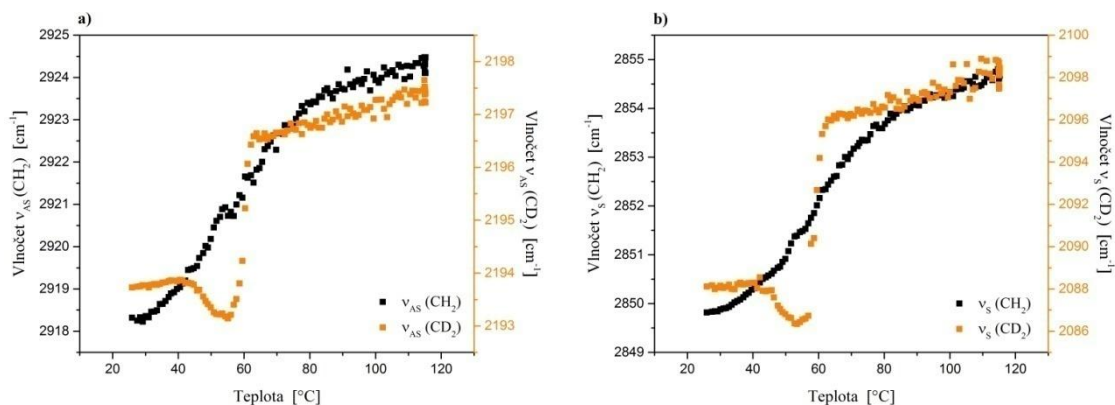
CerAP/CerNP/Chol/dSA/CS



Obr. 40 Porovnání teplotních závislostí CH_2 a CD_2 a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací vzorku s CerAP/CerNP/Chol/dSA/CS.

U vzorku s CerAP/NP a dSA pozorujeme na **Obr. 40** vliv přítomnosti SA v lipidické směsi. Tání deuterovaných řetězců dSA má velmi rychlý průběh při teplotě kolem 60 °C. Ostatní lipidy tak opět ovlivňují teplotu tání samostatné SA (při 75 °C). CerAP, CerNP a Chol ve směsi tají naopak velmi pomalu. U CH_2 řetězců začíná fázová tranzice dříve a končí mnohem později. Teplotní závislost asymetrických valenčních vibrací (**Obr. 40a**) naznačuje asi při 60 °C mírný zlom v průběhu tání. Při bližším zkoumání valenčních vibrací vycházejících pouze z SA si můžeme všimnout slabé pretranzice mezi 50 a 60 °C. U valenčních vibrací ostatních lipidů tento jev nenastává.

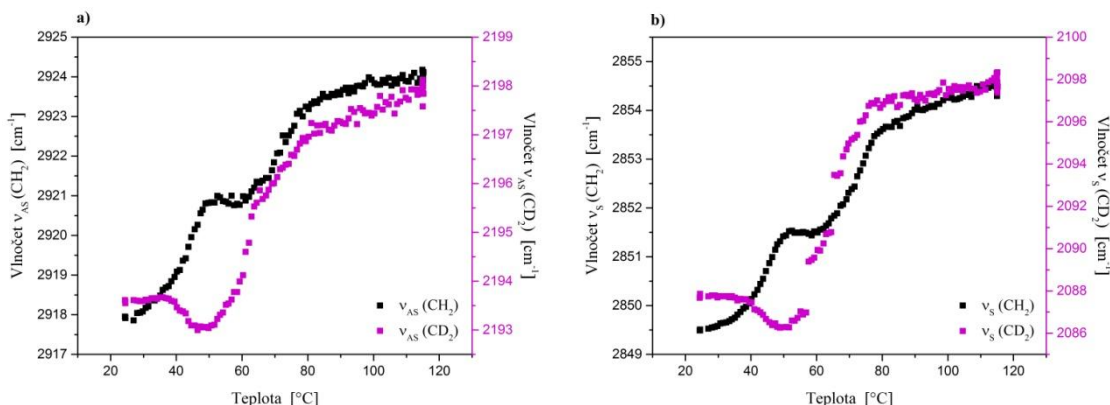
CerNP/CerNS/Chol/dSA/CS



Obr. 41 Porovnání teplotních závislostí CH_2 a CD_2 a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací vzorku s CerNP/CerNS/Chol/dSA/CS.

Velmi podobný průběh teplotní závislosti CH_2 a CD_2 valenčních vibrací vidíme i u směsi s CerNP/NS (**Obr. 41**). Mezi 40 až 55 °C je však pretranzice dSA výraznější. Toto stojí za povšimnutí, neboť v jednoceramidových směsích (jak CerNP, tak CerNS) tato pretranzice SA sledována nebyla. K tání deuterovaných řetězců dále dochází při 60 °C. U CH_2 asymetrických valenčních vibrací se jeví nepatrný zlom v průběhu pozvolné fázové přeměny uhlovodíkových řetězců ostatních lipidů směsi.

CerAP/CerNS/Chol/dSA/CS



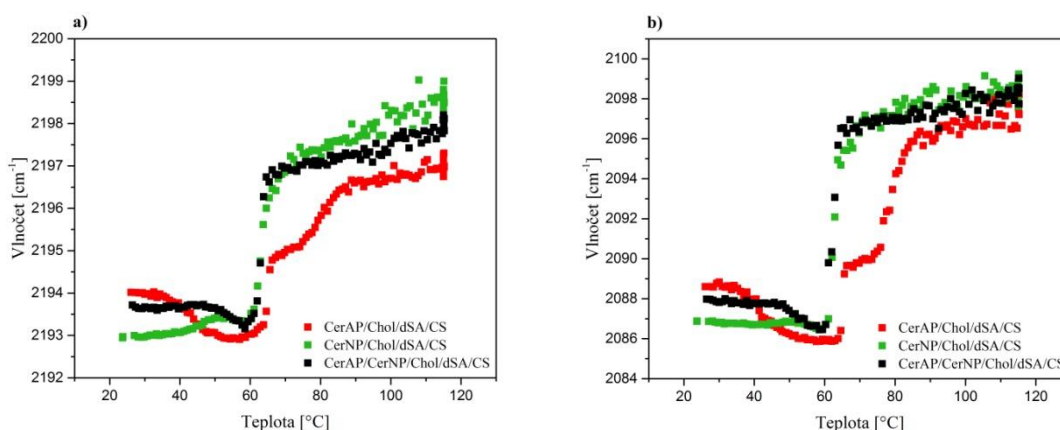
Obr. 42 Porovnání teplotních závislostí CH_2 a CD_2 a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací vzorku s CerAP/CerNS/Chol/dSA/CS.

Směs s CerAP/NS a dSA má ve srovnání s předchozími systémy odlišnější teplotní chování uhlovodíkových a deuterovaných řetězců (**Obr. 42**). Je zde nápadnější dvoufázový proces tání CH_2 řetězců lipidů. Začíná asi při 40 °C, zlom nastává zhruba při 50 °C, následuje přeuspořádání řetězců, fázová přeměna dále pokračuje od 60 °C a při 80 °C jsou řetězce již zkapalněny. Deuterovaná SA opět projevuje pretranzici, ale v tomto systému taje pomaleji a to v rozmezí asi 25 °C. Je zřejmé, že tato směs jeví vysokou mísitelnost jednotlivých složek.

4.2.7 Srovnání teplotní závislosti CH_2 a CD_2 vibrací jedno- a dvouceramidových směsí s dSA

Směs CerAP s dSA vs. směs CerNP s dSA vs. směs CerAP/NP s dSA

Na *Obr. 43* pozorujeme teplotní chování dSA ve směsi s CerAP, ve směsi s CerNP a ve směsi s CerAP/NP.

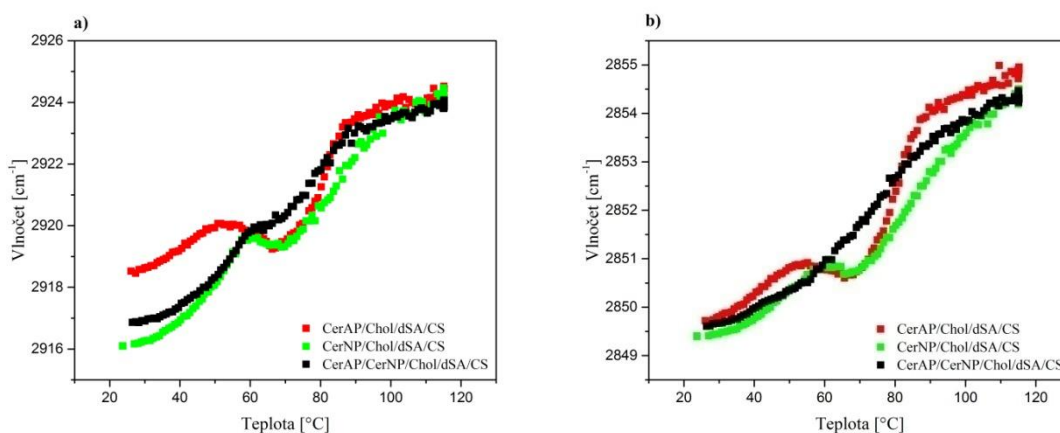


Obr. 43 Teplotní závislost polohy pásu CD_2 a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací u vzorků obsahujících: směs CerAP s dSA, směs CerNP s dSA, směs CerAP/NP s dSA.

Vývoj pozice valenčních CD_2 vibrací obou jednoceramidových směsí se liší. Na počátku tání řetězců je rigidněji uspořádána dSA ve směsi s CerNP (nejnižší poloha pásu CD_2 valenčních vibrací), avšak na konci fázového přechodu jsou její řetězce nejmobilnější (nejvyšší poloha pásu). Na rozdíl od směsi s CerNP, dSA ve směsi s CerAP jeví v rozmezí 30–60 °C pretranzici spojenou s přeuspořádáním řetězců a taje až při vyšších teplotách.

Ve dvouceramidové směsi sledujeme jevy podobné částečně jevům v obou jednoceramidových vzorcích. Pretranzice SA je rovněž zřejmá, i když zdaleka ne tak výrazná. Tání lipidových řetězců se posouvá k 60 °C, což koreluje se stejným jevem ve směsi založené čistě na CerNP.

Dále jsem porovnávala teplotní chování CH_2 valenčních vibrací uhlovodíkových řetězců Cer v týchž vzorcích (**Obr. 44**)

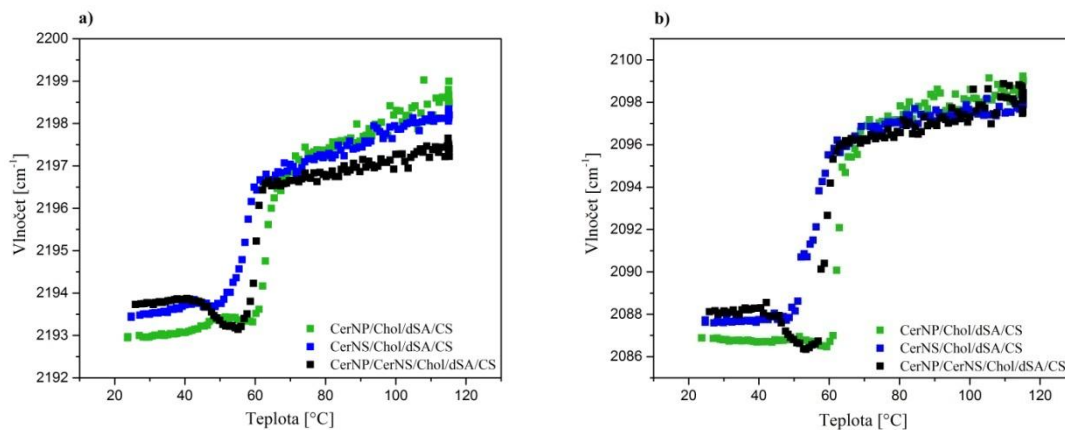


Obr. 44 Teplotní závislost polohy pásu CH_2 a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací u vzorků obsahujících: směs CerAP s dSA, směs CerNP s dSA, směs CerAP/NP s dSA.

Podle teplotní závislosti CH_2 asymetrických valenčních vibrací (**Obr. 44a**) jeví lipidové řetězce na počátku měření různý stupeň uspořádanosti. Naopak křivky teplotního chování řetězců sledované pomocí symetrických CH_2 vibrací na **Obr. 44b** vychází zhruba ze stejného počátku. U směsi s jedním Cer začíná fázový přechod při stejné teplotě (asi 65 °C), kterému předchází pretranzice lipidových řetězců. Tento jev u směsného vzorku mizí. Průběh tání potom je nejrychlejší u směsi s CerAP, pomaleji pak tají uhlovodíkové řetězce ve vzorku s CerNP a nejpomaleji u vzorku s CerAP/NP.

Směs CerNP s dSA vs. směs CerNS s dSA vs. směs CerNP/NS s dSA

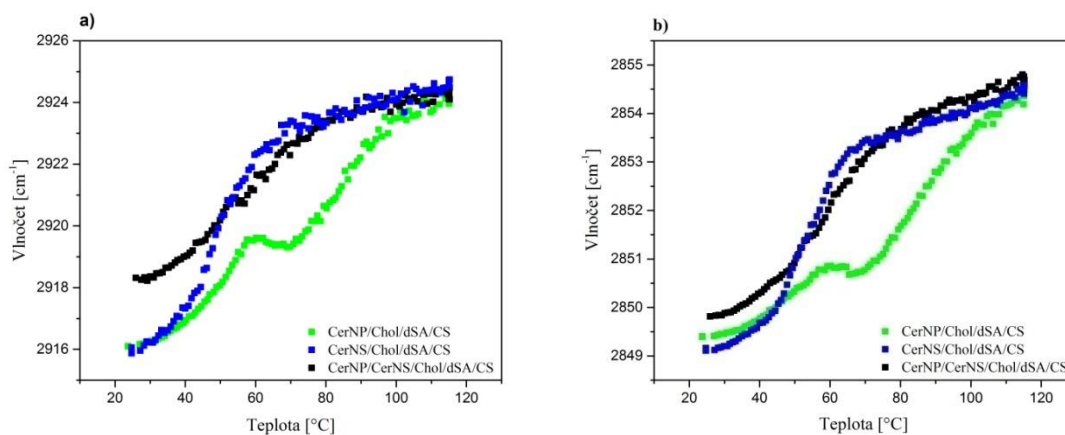
Analogicky jsem srovnala teplotní závislosti polohy pásu CD_2 valenčních vibrací dSA u směsí s CerNP, s CerNS a s CerNP/NS (*Obr. 45*).



Obr. 45 Teplotní závislost polohy pásu CD_2 a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací u vzorků obsahujících: směs CerNP s dSA, směs CerNS s dSA, směs CerNP/NS s dSA.

Průběhy teplotních závislostí CD_2 valenčních vibrací jednoceramidových směsí mají jednoduchý sigmoidní tvar, i když křivka směsi CerNS s dSA ukazuje malou pretranzici mezi 55–60 °C. U vzorku s CerNP/NS pozorujeme výraznou pretranzici ve srovnání s jednoceramidovými vzorky spojenou se zvýšením uspořádání řetězců. Na rozdíl od směsi s CerAP/NP nedochází ke zpomalení tání řetězců dSA.

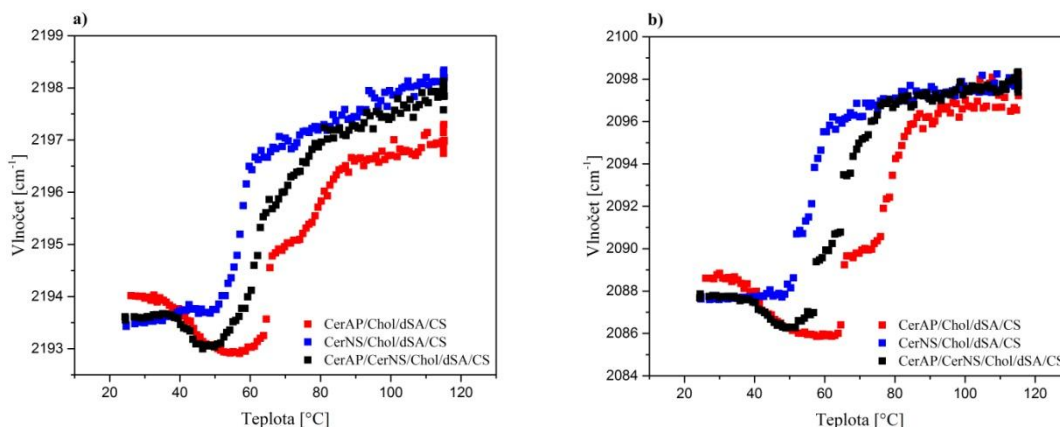
Na **Obr. 46** můžeme sledovat teplotní vývoj CH_2 valenčních vibrací uhlovodíkových řetězců Cer v týchž vzorcích.



Obr. 46 Teplotní závislost polohy pásu CH_2 a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací u vzorků obsahujících: směs CerNP s dSA, směs CerNS s dSA, směs CerNP/NS s dSA.

U směsi s CerNS a dSA dochází k fázové tranzici v rozmezí poměrně nízkých teplot (40–65 °C). Na počátku měření CH_2 řetězce této směsi vykazují z porovnávaných vzorků nejrigidnější uspořádání a na konci naopak nejmobilnější (nejvyšší pozice pásu). Směsný vzorek s CerNS/NP se svou teplotní křivkou podobá více systému s CerNS. Pretranzice uhlovodíkových řetězců Cer projevující se u směsi s CerNP byla v přítomnosti i CerNS potlačena.

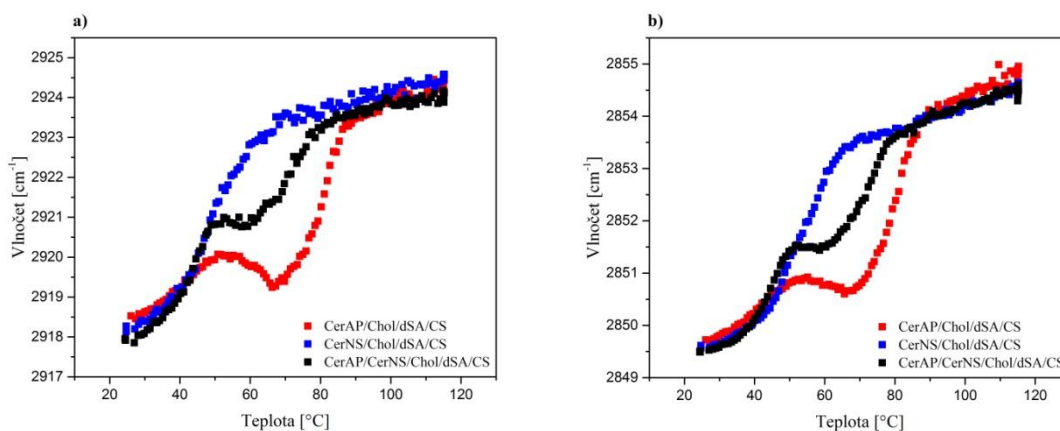
Směs CerAP s dSA vs. směs CerNS s dSA vs. směs CerAP/NS s dSA



Obr. 47 Teplotní závislost polohy pásu CD_2 a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací u vzorků obsahujících: směs CerAP s dSA, směs CerNS s dSA, směs CerAP/NS s dSA.

Pozice pásu CD_2 valenčních vibrací vzorku s CerAP/NS a dSA se téměř po celou dobu zahřívání pohybovala okolo střední hodnoty v porovnání s pozicemi pásů systémů pouze s jedním Cer (CerAP nebo CerNS). Zahříváním směsi CerAP/NS začíná dSA s přechodem do fluidní fáze kolem $50\text{ }^\circ\text{C}$, stejně jako ve směsi s CerNS, kde však deuterované řetězce tají rychleji. CerAP ve směsném vzorku zvyšuje teplotu tání dSA. CerNS zase snižuje intenzitu pretranzice, která je u směsi se samostatným CerAP výrazná. Téměř po celou dobu zahřívání vzorků jeví nejrigidnější uspořádání deuterované řetězce směsi s CerAP, s výjimkou počátku, kde jsou naopak nejmobilnější.

Obr. 48 popisuje teplotní vývoj CH_2 valenčních vibrací uhlovodíkových řetězců ceramidů v týchž vzorcích.

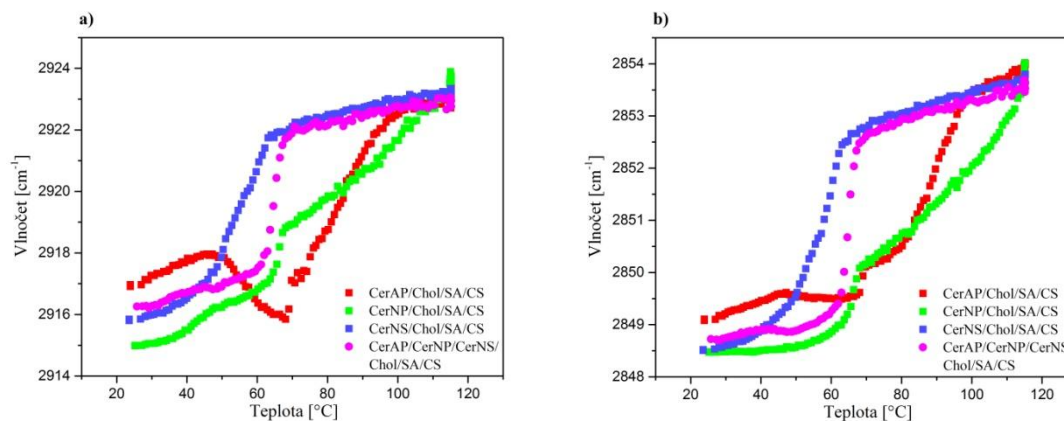


Obr. 48 Teplotní závislost polohy pásu CH_2 a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací u vzorků obsahujících: směs CerAP s dSA, směs CerNS s dSA, směs CerAP/NS s dSA.

Podle polohy pásu CH_2 valenčních vibrací vykazují uhlovodíkové řetězce těchto tří vzorků zhruba do 45 °C a dále od 85 °C stejnou uspořádanost. Mezi 45 a 85 °C se teplotní závislost směsí liší. Řetězce ve směsi s CerNS tají rychle a to do 65 °C, naopak u směsi s CerAP dochází k reorganizaci řetězců (mezi 55–65 °C) s následným rychlým fázovým přechodem, který je ukončen kolem 85 °C. Na teplotní závislosti směsí s CerAP/NS a dSA můžeme společně vidět typické znaky obou Cer. Projevuje se zde jak fázová pretranzice, za níž je zodpovědný CerAP a díky přítomnosti i CerNS je potlačena. Společnou souhrou obou Cer je tání uhlovodíkových řetězců ve směsném vzorku ukončeno asi v průměru teplot tání jednoceramidových směsí (což je asi 65 °C).

4.2.8 Srovnání teplotní závislosti CH₂ vibrací jedno- a dvouceramidových směsí s tříceramidovou směsí

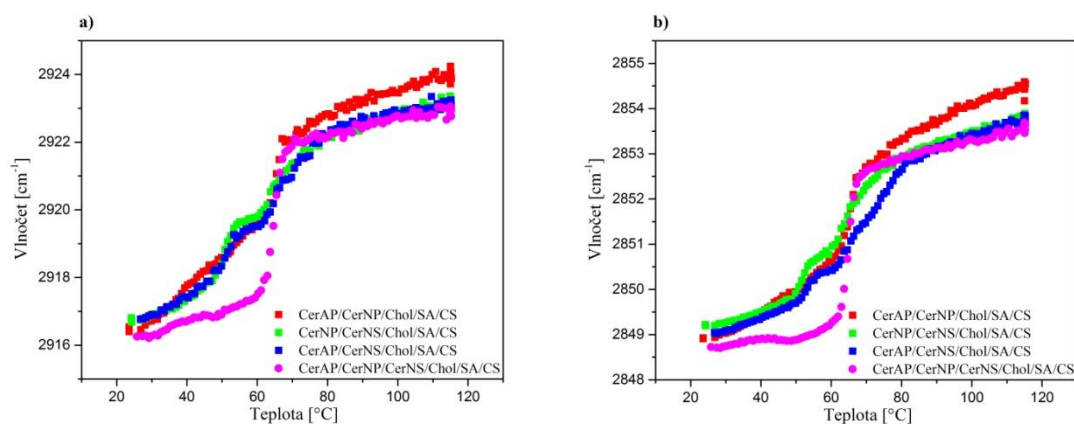
Směs CerAP vs. směs CerNP vs. směs CerNS vs. směs CerAP/NP/NS



Obr. 49 Teplotní závislost polohy pásu CH₂ a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací vzorků obsahujících: směs CerAP, směs CerNP, směs CerNS, směs CerAP/NP/NS.

Dále jsem porovnávala teplotní závislost CH₂ valenčních vibrací tříceramidové směsi se směsmi jednoceramidovými (**Obr. 49**). Charakteristické rysy jednoceramidových směsí jsou v komplexní směsi viditelné minimálně. Křivka tříceramidové směsi se nejvíce podobala teplotnímu chování směsi s CerNS (obě mají sigmoidní tvar). Jediným rozdílem je zvýšení teploty tání tříceramidové směsi asi o 10 °C oproti směsi s CerNS, což je způsobeno přítomností zbylých dvou Cer, u nichž fázová přeměna probíhá později a pomaleji. U CH₂ symetrických valenčních vibrací (**Obr. 49b**) je nepatrný náznak pretranzice.

Směs CerAP/NP vs. směs CerNP/NS vs. směs CerAP/NS vs. směs CerAP/NP/NS



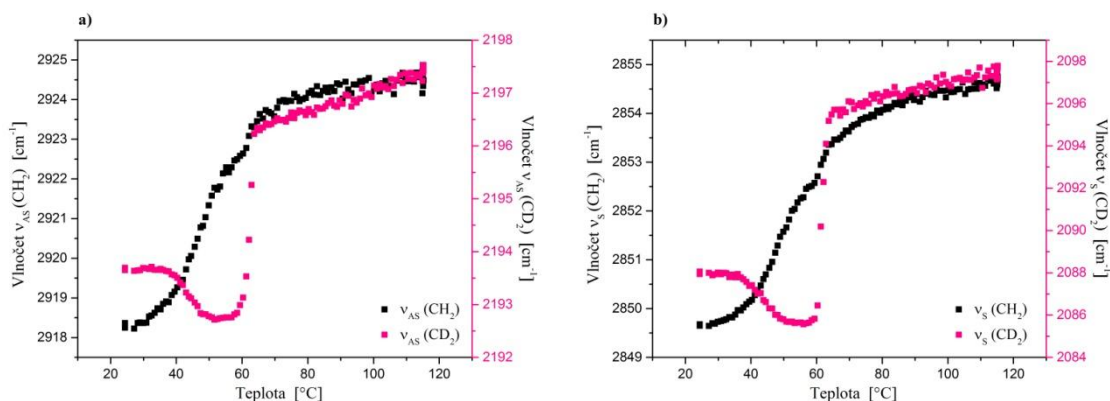
Obr. 50 Teplotní závislost polohy pásu CH_2 a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací vzorků obsahujících: směs CerAP/NP, směs CerNP/NS, směs CerAP/NS, směs CerAP/NP/NS.

Na **Obr. 50** je velkou zajímavostí, že teplotní závislosti CH_2 valenčních vibrací dvouceramidových směsí jsou si velmi podobné, avšak odlišné od teplotního průběhu směsi třiceramidové. Směsi obsahující dva typy Cer tají v delším teplotním rozmezí, zatímco směs třiceramidová přechází z pevné fáze do fáze fluidní velmi rychle (asi při 65 °C). Poté, co je fázový přechod hotový, se teplotní křivka směsi s CerAP/NP/NS setkává s křivkami směsí s CerNP/NS a s CerAP/NS a pokračují společně až do konce měření. Třiceramidová směs po téměř celou dobu zahřívání jeví nejnižší polohu CH_2 valenčních vibrací a tedy nejvyšší rigiditu uhlovodíkových řetězců.

4.2.9 Srovnání teplotní závislosti CH₂ a CD₂ vibrační třiceramidové směsi s dSA

Směs CerAP/CerNP/CerNS s dSA

Abych mohla pozorovat teplotní chování a mísitelnost jednotlivých složek třiceramidové směsi, opět jsem nahradila SA jejím nedeuterovaným analogem (dSA).

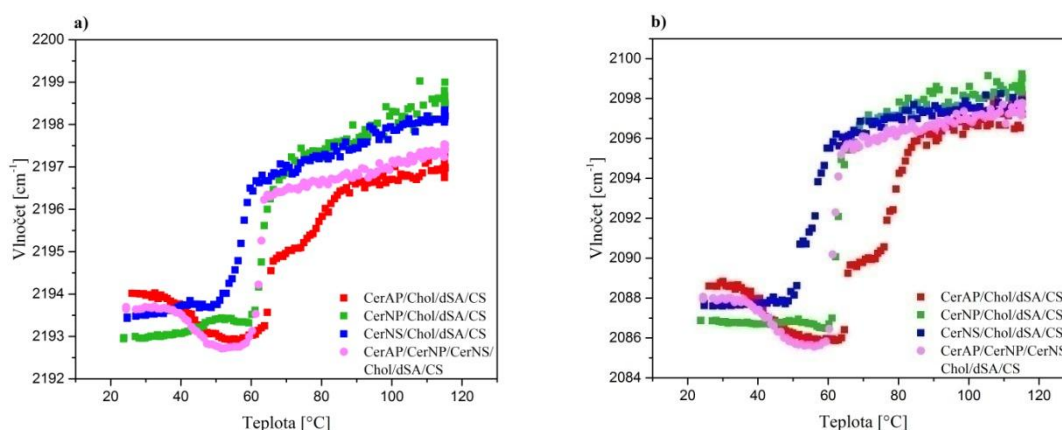


Obr. 51 Porovnání teplotních závislostí CH₂ a CD₂ a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací vzorku s CerAP/CerNP/CerNS/dSA/CS.

Teplotní závislost polohy pásu CD₂ valenčních vibrací dSA (**Obr. 51**) se i ve směsi se třemi Cer zřetelně liší od samostatné SA (**Obr. 27**). U deuterovaných řetězců dochází k výrazné pretranzici v rozmezí 35–60 °C s následným rychlým táním, což je o 15 °C dříve, než tání čisté SA. To znamená, že i v této směsi Cer ovlivňují teplotní chování SA. Ovšem je tomu i naopak, podíváme-li se na světle růžovou křivku na **Obr. 49** či **Obr. 50**, která popisuje teplotní chování třiceramidové směsi s nedeuterovanou SA, vidíme, že není shodná s teplotní závislostí CH₂ valenčních vibrací u směsi s dSA. U uhlovodíkových řetězců v třiceramidové směsi s dSA je proces fázové přeměny pomalejší a neprojevuje se pretranzice, která je u třiceramidové směsi s nedeuterovanou SA zřetelná. Z toho vyplývá, že i SA má vliv na uspořádanost a teplotní průběh Cer. Tyto děje tak vykazují opět dobrou mísitelnost SA s ostatními složkami třiceramidové směsi, což naznačuje i podobný průběh CH₂ a CD₂ valenčních vibrací asi od 70 °C do konce experimentu.

4.2.10 Srovnání teplotní závislosti CH₂ a CD₂ vibrací jedno- a dvouceramidových směsí s dSA s tříceraamidovou směsí s dSA

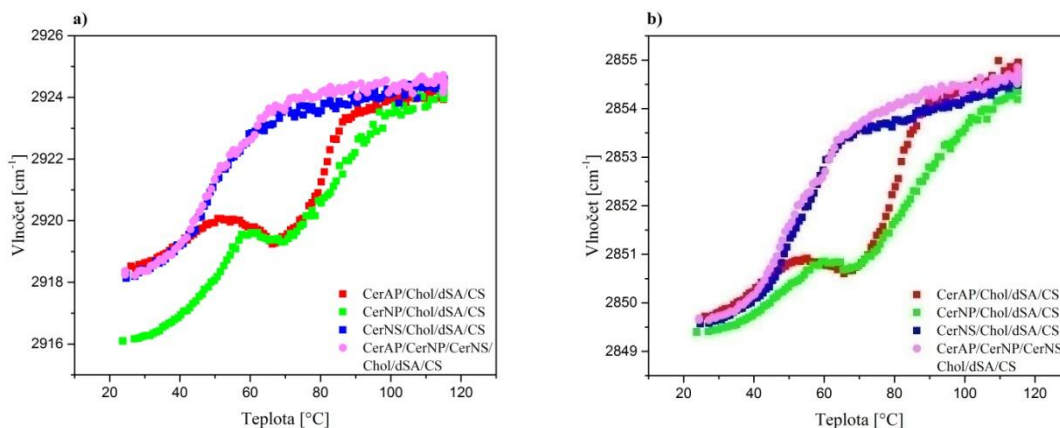
Směs CerAP s dSA vs. směs CerNP s dSA vs. směs CerNS s dSA vs. směs CerAP/NP/NS s dSA



Obr. 52 Teplotní závislost polohy pásu CD₂ a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací u vzorků obsahujících: směs CerAP s dSA, směs CerNP s dSA, směs CerNS s dSA a směs CerAP/NP/NS s dSA.

Pomocí teplotní závislosti polohy pásu CD₂ valenčních vibrací (**Obr. 52**) můžeme sledovat, jak se chová dSA v tříceraamidové směsi v porovnání s jednoceraamidovými směsmi. Lze zde krásně vidět, jak je teplotní chování ovlivněno všemi třemi Cer. Počátek teplotní závislosti je do 35 °C stejný jako systém s CerNS a dSA, následuje pretranzice, jejíž křivka je společná s křivkou směsi s CerAP a dSA a od 60 °C, kdy dochází k rychlému tání deuterovaných řetězců, se teplotní závislost ztotožňuje se směsí s CerNP. Během tání se pozice sledovaného pásu pohybovala kolem průměrných hodnot v porovnání s pozicemi pásů jednoceraamidových směsí. I z tohoto **Obr. 52** lze usoudit, že se kyselina mísí s ostatními složkami tříceraamidového systému.

U téže třiceramidové směsi s dSA jsem provedla srovnání teplotní závislosti valenčních vibrací uhlovodíkových řetězců ceramidů s jednoceramidovými směsmi s dSA (*Obr. 53*).

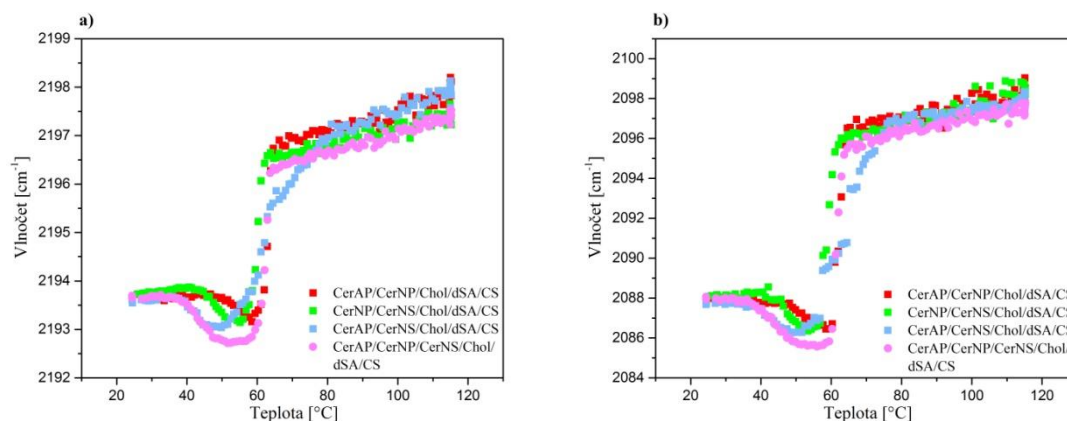


Obr. 53 Teplotní závislost polohy pásu CH_2 a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací u vzorků obsahujících: směs CerAP s dSA, směs CerNP s dSA, směs CerNS s dSA a směs CerAP/NP/NS s dSA.

Zajímavostí je velká podobnost křivky teplotního průběhu třiceramidové směsi s dSA ve srovnání s křivkou směsi s CerNS a dSA. Vzhledem k tomu, že u dvou jednoceramidových směsí (směs s CerAP a dSA a směs s CerNP a dSA) dochází k pretranzici uhlovodíkových řetězců, je tento jen v důsledku přítomnosti i CerNS potlačen. Současně CH_2 řetězce v třiceramidové směsi ve většině průběhu křivky vykazují nejvyšší hodnoty pozice CH_2 vibrací a tudíž nejvyšší mobilitu.

Směs CerAP/NP s dSA vs. směs CerNP/NS s dSA vs. směs CerAP/NS s dSA vs. směs CerAP/NP/NS s dSA

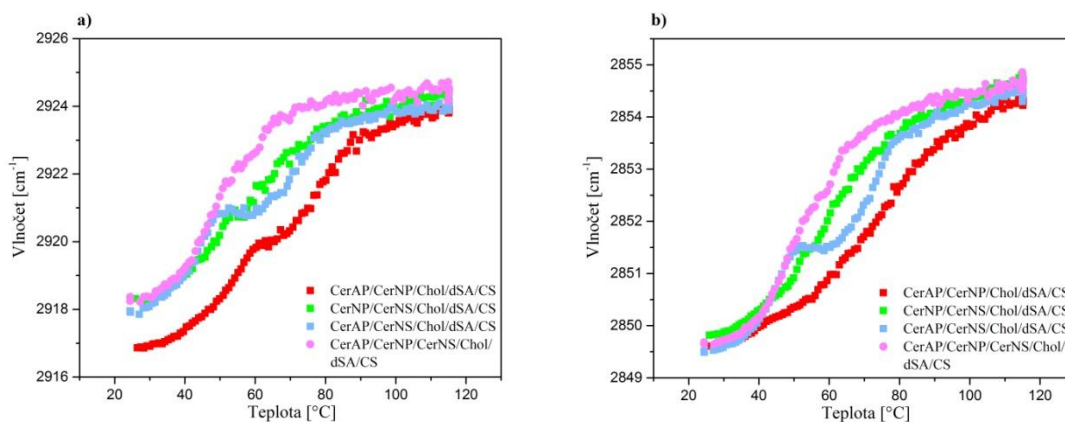
V poslední řadě se nabízelo porovnat teplotní závislost polohy pásu CD₂ a CH₂ valenčních vibrací třiceramidové směsi se směsmi dvouceramidovými.



Obr. 54 Teplotní závislost polohy pásu CD₂ a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací u vzorků obsahujících: směs CerAP/NP s dSA, směs CerNP/NS s dSA, směs CerAP/NS s dSA a směs CerAP/NP/NS s dSA.

Na **Obr. 54**, který popisuje teplotní závislost CD₂ valenčních vibrací, vidíme, jak se teplotní chování dSA ve směsích s dvěma typy Cer přibližuje podobnosti teplotního průběhu dSA v třiceramidové směsi. Avšak ani u jedné z dvouceramidových směsí není rigidita deuterovaných řetězců SA větší než u řetězců dSA ve směsi třiceramidové. SA v třiceramidové směsi jeví nejvýraznější pretranzici spojenou se zvýšením uspořádání řetězců ve srovnání se směsmi dvouceramidovými.

Na závěr jsem porovnávala teplotní chování CH_2 řetězců třiceramidové směsi s dSA s řetězci směsi třiceramidové obsahující dSA (**Obr. 55**).



Obr. 55 Teplotní závislost polohy pásu CH_2 a) asymetrických a b) symetrických valenčních vibrací u vzorků obsahujících: směs CerAP/NP s dSA, směs CerNP/NS s dSA, směs CerAP/NS s dSA a směs CerAP/NP/NS s dSA.

Teplotní závislost CH_2 symetrických valenčních vibrací (**Obr. 55b**) značí na počátku i na konci měření podobnou uspořádanost uhlovodíkových řetězců ve vzorcích s dvěma i třemi typy Cer a dSA. V průběhu zahřívání se ale situace lišila. Flexibilněji se chovaly řetězce třiceramidové směsi s dSA, která rovněž vykazovala nejrychlejší fázový přechod. Srovnáním s křivkou teplotní závislosti CH_2 valenčních vibrací třiceramidové směsi s nedeuterovanou SA (světle růžová na **Obr. 50**), která zde jeví nejrigidnější organizaci, můžeme usoudit, že SA má velmi důležitý vliv na uspořádanost uhlovodíkových řetězců v komplexní směsi se všemi třemi typy Cer.

5 ZÁVĚR

V této diplomové práci jsem se pomocí IČ spektroskopie zabývala studiem fázového chování lipidických směsí napodobujících složení mezibuněčné matrix SC. Po naměření dat jsem nejprve srovnávala IČ spektra vzorků při 32 °C a následně křivky teplotních závislostí poloh pásů CH₂ nebo CD₂ asymetrických a symetrických valenčních vibrací, abych mohla zkoumat fluiditu řetězců v daných membránách.

Pomocí IČ spekter jednotlivých Cer jsem zjistila, že největší uspořádanost uhlovodíkových řetězců vykazuje CerNS. CerAP a CerNS vykazují hexagonální laterální uspořádání. U CerNP se projevil náznak dubletu pásu CH₂ kyvadlových a nůžkových vibrací, což znamená, že se část molekul vyskytuje v orthorhombickém uspořádání. Dále jsem zaznamenala posun pásu amidu I směrem k nižším hodnotám vlnočtu, což souvisí s tvorbou vodíkových můstků. Nejsilnější vodíkové interakce se projevovaly u CerNP a nejslabší u CerAP.

Zavedením CerAP a CerNS do směsi s Chol, SA a CS, došlo k posunu pásu amidických vibrací I k hodnotám naznačujícím oslabení původních vodíkových vazeb. U lipidické směsi s CerNP tato změna nenastala, poloha pásu amidu I se stále projevovala při nižším vlnočtu a to zřejmě opět v důsledku působení vodíkových vazeb. Směs s CerNP stále naznačovala dublet CH₂ kyvadlových a nůžkových vibrací. Změna nastala v dvouceramidové směsi s CerNP, kde se již nízká poloha pásu amidických vibrací I a náznak dubletu neprojevuje. Z toho by se dalo vyvodit, že povaha vodíkových můstků v čistém CerNP je mezimolekulární, protože za přítomnosti dalšího typu Cer posun pásu amidu I mizí.

Pomocí sledování teplotního chování jsem zjistila, že po předchozím zahřátí Cer dochází k rekrystalizaci v jiné krystalické struktuře, což se projevilo zvýšením polohy pásu CH₂ valenčních vibrací.

V lipidických směsích s CerAP docházelo k reorganizaci uhlovodíkových řetězců do rigidnějšího uspořádání. Projevovala se zde fázová pretranzice, při které mobilita řetězců ceramidu narůstala, kdežto řetězce SA se stávaly rigidnějšími. Nejvýraznější pretrazici jsme mohli pozorovat u jednoceramidové směsi s CerAP, ve dvouceramidových směsích byl tento jev méně výrazný. U čistého CerAP, čisté

SA a u jednoceramidových směsí s CerNP a CerNS se tato pretranzice neprojevovala.

Zajímavé bylo, že směs CerNS/Chol/SA/CS jevila posun fázové tranzice o 40 °C dříve ve srovnání se samostatným CerNS.

Ve dvouceramidových směších lze vidět charakteristické rysy směsí s jednotlivými Cer.

U systémů s dSA jsme mohli odděleně sledovat teplotní tranzici deuterovaných řetězců SA a uhlovodíkových řetězců zejm. Cer. Řetězce SA ve směsi s ostatními lipidy tají dříve než samostatná SA a u víceceramidových směsí byla zřetelná výše popsaná fázová pretranzice. To znamená, že Cer ovlivňují uspořádanost SA. Současně však SA ovlivňuje uspořádanost Cer, protože lipidické směsi s SA vykazovaly nižší polohu CH₂ valenčních vibrací než směsi s dSA. Toto naznačuje, že řetězce ceramidů jeví vyšší mobilitu ve směších než v čistém stavu.

Třiceramidová lipidická směs jevila podle IČ spektra vysokou uspořádanost uhlovodíkových řetězců a její molekuly byly hexagonálně laterálně organizovány.

Teplotní chování této směsi bylo ovlivněno všemi třemi typy Cer. Rovněž zde byla zřejmá silná fázová pretranzice SA spojená se zvýšením rigidity jejích řetězců. Na rozdíl od většiny dvouceramidových směsí jevila tato směs výbornou mísitelnost všech lipidů, což je poměrně paradoxní při počtu daných složek.

6 LITERATURA

- ¹ ŠTORK, J., et al.: *Dermatovenerologie*, **2008**, Praha: Galén, 502 s., ISBN 978-80-7262-371-6.
- ² TROJAN S. ET AL.: *Lékařská fyziologie*, 4. vydání, **2003**, Praha: Grada, 772 s., ISBN 80-247-0512-5.
- ³ PARRAMÓN J. M., přel. PECHOVÁ M.: *Atlas anatomie*, **1996**, Praha: Svojtka & Vašut, 96 s., ISBN 80-7180-092-9.
- ⁴ DITRICHOVÁ D.: *Repetitorium dermatovenerologie*, **2002**, Epava, 304 s., ISBN 80-86297-08-X.
- ⁵ Úvod do problematiky nemelanomových kožních nádorů, 3.5.2013, k 12.4.2016.
https://www.mojemedicina.cz/files/moje-nemoc/obrazky/zh_nadory_kuze/o6_str_cor.png?h=d84
- ⁶ CHEN H., MENDELSON R., REREK M.E., MOORE D. J.: Effect of cholesterol on miscibility and phase behavior in binary mixtures with synthetic ceramide 2 and octadecanoic acid. Infrared studies. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, **2001**, 1512 s., s. 345-356, ISSN 0005-2736.
- ⁷ MADISON K. C.: Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *Journal of investigative dermatology*, **2003**, 121 (2), s. 231-241, ISSN 1523-1747
- ⁸ HRABÁLEK A., VÁVROVÁ K.: Lze překonat kožní bariéru? *Praktické lékařství*, **2005**, č. 1, s. 8-11, ISSN 1803-5329.
- ⁹ Jak kůže funguje. Struktura a funkce kůže. k 13.4.2016.
<http://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze>
- ¹⁰ ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*, **1997**, Ústí nad Labem: Espero, 740 s., ISBN 80-902906-0-4.
- ¹¹ CASTIEL-HIGOUNENC I., CHOPART M., FERRARIS C.: Stratum corneum lipids: specificity, role, deficiencies and modulation. *OCL:Oleagineux, Corps Gras, Lipides*, **2004**, 11(6), s. 401-406, ISSN 1258-8210.
- ¹² VAN SMEDEN J., et al.: LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *Journal of lipid research*, **2011**, 52.6, s. 1211-1221, ISSN 1539-7262.
- ¹³ VÁVROVÁ, K, HRABÁLEK, A.: Role ceramidů v kůži. *Praktické lékařství*, **2006**, č. 2, s. 55-58, ISSN 1803-5329.
- ¹⁴ BREIDEN B., SANDHOFF K.: The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeabilitybarrier formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **2014**, 1841 s., s. 441-452., ISSN 1388-1981.
- ¹⁵ NORLÉN L.: Skin barrier structure and function: the single gel phase model. *Journal of investigative dermatology*, **2001**, 117(4), s. 830-836, ISSN 0022-202X.
- ¹⁶ MADISON K. C., HOWARD, E. J.: Ceramides are transported through the Golgi apparatus in human keratinocytes in vitro. *Journal of investigative dermatology*, **1996**, 106(5), s. 1030-1035, ISSN 0022-202X.
- ¹⁷ MICHEL C., VAN ECHTEN-DECKERT J., ROHTER J., ET AL.: Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *The Journal of Biological Chemistry*, **1997**, 272, s. 22432-22437, ISSN 1083-351X.
- ¹⁸ HOLLERAN W. M., TAKAGI Y., UCHIDA Y.: Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS letters*, **2006**, 580(23), s. 5456-5466, ISSN 0014-5793.
- ¹⁹ NORLÉN L., NICANDER I., LUNSJÖ A., CRONHOLM T., FORSLIND B.: A new HPLC-based method for the quantitative analysis of inner stratum corneum lipids with special reference to the free fatty acid fraction. *Arch. Dermatol. Res.*, **1998**, 290, s. 508-516, ISSN 1432-069X.
- ²⁰ KHNYKIN D., MINER J. H., JAHNSEN F.: Role of fatty acid transporters in epidermis: Implications for health and disease. *Dermato-endocrinology*, **2011**, 3(2), s. 53-61, ISSN 1938-1980.
- ²¹ HANLEY K., ET AL.: Epidermal steroid sulfatase and cholesterol sulfotransferase are regulated during late gestation in the fetal rat. *Journal of investigative dermatology*, **1997**, 108(6), s. 871-875, ISSN 0022-202X.
- ²² STROTT Ch. A., HIGASHI Y.: Cholesterol sulfate in human physiology what's it all about? *Journal of lipid research*, **2003**, 44(7), s.1268-1278, ISSN 1539-7262.

-
- ²³ BOUWSTRA J. A., ET AL.: The role of ceramide composition in the lipid organisation of the skin barrier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1999**, 1419(2), s. 127-136., ISSN 0005-2736.
- ²⁴ NORLÉN L.: Current understanding of skin barrier morphology. *Skin pharmacology and physiology*, **2013**, 26(4-6), s. 213-216, ISSN 1660-5527.
- ²⁵ BONCHEVA, M.: The physical chemistry of the stratum corneum lipids. *International journal of cosmetic science*, **2014**, 36(6), s. 505-515, ISSN: 1468-2494.
- ²⁶ BOUWSTRA J. A., GOORIS G. S.: The lipid organisation in human stratum corneum and model systems. *Open Dermatology Journal*, **2010**, 4, s. 10-13, ISSN: 1874-3722.
- ²⁷ VÁVROVÁ K., ZBYTOVSKÁ J., HRABÁLEK A.: Amphiphilic transdermal permeation enhancers: structure-activity relationships. *Current medicinal chemistry*, **2005**, 12(19), s. 2273-2291, ISSN 0929-8673.
- ²⁸ PILGRAM G. S. K., ET AL.: Aberrant lipid organization in stratum corneum of patients with atopic dermatitis and lamellar ichthyosis. *Journal of Investigative Dermatology*, **2001**, 117 (3): s. 710-717, ISSN 1523-1747.
- ²⁹ MADISON K. C., ET AL.: Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum. *Journal of Investigative Dermatology*, **1987**, 88(6), s. 714-718, ISSN 0022-202X.
- ³⁰ BOUWSTRA J. A., ET AL.: Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering. *Journal of Investigative Dermatology*, **1991**, 97(6), s. 1005-1012, ISSN 1523-1747.
- ³¹ GARSON, J.-C., ET AL.: Oriented structure in human stratum corneum revealed by X-ray diffraction. *Journal of investigative dermatology*, **1991**, 96(1), s.43-49, ISSN 1523-1747
- ³² FORSLIND B. A.: Domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Derrn Venereol (Stockh)*, **1994**, 74, s. 1-6, ISSN 0001-5555.
- ³³ BOUWSTRA J., GOORIS G., PONEC M.: The Lipid Organisation of the Skin Barrier: Liquid and Crystalline Domains Coexist in Lamellar Phases. *Journal of Biological Physics*, **2002**, s. 211-223, ISSN 1573-0689.
- ³⁴ IWAI I., et al. The human skin barrier is organized as stacked bilayers of fully extended ceramides with cholesterol molecules associated with the ceramide sphingoid moiety. *Journal of Investigative Dermatology*, **2012**, 132(9), s. 2215-2225, ISSN 0022-202X.
- ³⁵ LEE S. H., JEONG S. K., AHN S. K.: An Update of the Defensive Barrier Function of Skin. *Yonsei Medical Journal*, **2006**, 47(3), 293-306, ISSN 0513-5796.
- ³⁶ PÁNKOVÁ R.: Atopická dermatitida - co je nového? *Medicína pro praxi*, **2015**, 12(1), s. 13-18, ISSN 1803-5310.
- ³⁷ IMOKAWA G., ISHIDA K.: Role of ceramide in the barrier function of the stratum corneum: Implications for the pathogenesis of atopic dermatitis. *Journal of Clinical & Experimental Dermatology Research*, **2014**, 206(5), s. 1-12, ISSN: 2155-9554.
- ³⁸ HIGASHI Y., ET AL.: Expression of cholesterol sulfotransferase (SULT2B1b) in human skin and primary cultures of human epidermal keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, **2004**, 122(5), s. 1207-1213, ISSN 0022-202X.
- ³⁹ ALESSANDRINI F., ET AL.: The level of prosaposin is decreased in the skin of patients with psoriasis vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology*, **2001**, 116(3), s. 394-400, ISSN 0022-202X.
- ⁴⁰ TROMMER H., NEUBERT R. H. H.: Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. *Skin pharmacology and physiology*, **2006**, 19(2), s. 106-121, ISSN 1660-5527.
- ⁴¹ ZÁHEJSKÝ J.: *Zevní dermatologická terapie a kosmetika*, **2011**, Praha: Grada Publishing, 133 s., ISBN 978-80-247-6328-6.
- ⁴² DIEMBECK W., ET AL.: Test guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, **1999**, 37(2), s. 191-205, ISSN: 0278-6915.
- ⁴³ KIELHORN J., MELCHING-KOLLMUSS S., MANGELSDORF. I.: *Dermal absorption*, **2006**, Geneva: World Health Organization, Environmental health criteria, 235 s., ISBN 978-92-4-157235-4.

-
- ⁴⁴ DOSTÁLEK M., ET AL.: *Farmakokinetika*, **2006**, Praha: Grada Publishing, 220 s., ISBN 80-247-1464-7.
- ⁴⁵ HRABÁLEK A., ET AL.: Akceleranty transdermální penetrace. *Chemické Listy*, **1999**, 93(2), s. 107-119, ISSN 1213-7103.
- ⁴⁶ BARRY B. W.: Lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *Journal of Controlled Release*, **1991**, 15(3), s. 237-248, ISSN 0168-3659.
- ⁴⁷ BARRY B. W.: Breaching the skin's barrier to drugs. *Nature biotechnology*, **2004**, 22(2), s. 165-167, ISSN 1546-1696.
- ⁴⁸ PHAM Q. D., ET AL.: Chemical penetration enhancers in stratum corneum—Relation between molecular effects and barrier function. *Journal of Controlled Release*, **2016**, 232, s. 175-187, ISSN: 0168-3659.
- ⁴⁹ PATHAN I. B., ET AL.: Chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery systems. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **2009**, 8(2), s. 173-179, ISSN 1596-9827.
- ⁵⁰ KLIMEŠ J., ET AL.: *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*, **2011**, Nucleus HK[®], 268 s., ISBN 978-80-87009-29-1.
- ⁵¹ NĚMCOVÁ I., ČERMÁKOVÁ L., RYCHLOVSKÝ P.: *Spektrometrické analytické metody I.*, **2004**, Praha: Karolinum, 166 s., ISBN: 80-246-0776-X.
- ⁵² OTYEPKOVÁ E., PRUCEK R., KVÍTEK L., PANÁČEK A., OTYEPKA M.: *Základy vybraných experimentálních chemických metod*, **2013**; k 2.8.2016.
http://fch.upol.cz/wp-content/uploads/2015/11/ZVEM_skripta.pdf
- ⁵³ NOVOTNÁ R., ŠILHA T., TRÁVNÍČEK Z.: *Spektrální metody studia chemických látek*, **2011**; k 2.8.2016.
http://agch.upol.cz/userfiles/file/pdf/Spektralni_metody.pdf
- ⁵⁴ MENDELSON R., MOORE D. J.: Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems, *Chemistry and Physics of Lipids*, **1998**, 96, s. 141-157, ISSN 0009-3084.
- ⁵⁵ GARIDEL P., ET AL.: The microstructure of the stratum corneum lipid barrier: mid-infrared spectroscopic studies of hydrated ceramide: palmitic acid: cholesterol model systems. *Biophysical chemistry*, **2010**, 150(1), s. 144-156, ISSN 0301-4622.
- ⁵⁶ Omnic 9; k 4.8.2016. http://www.nicoletcz.cz/omnic_9/
- ⁵⁷ RAUDENKOLB S., ET AL.: Polymorphism of ceramide 3. Part 1: an investigation focused on the head group of N-octadecanoylphyto sphingosine. *Chemistry and physics of lipids*, **2003**, 123(1), s. 9-17, ISSN 0009-3084.
- ⁵⁸ RAUDENKOLB S., WARTEWIG S., NEUBERT R. H. H.: Polymorphism of ceramide 6: a vibrational spectroscopic and X-ray powder diffraction investigation of the diastereomers of N-(α -hydroxyoctadecanoyl)-phyto sphingosine. *Chemistry and physics of lipids*, **2005**, 133(1), s. 89-102, ISSN 0009-3084.
- ⁵⁹ GARIDEL P.: Calorimetric and spectroscopic investigations of phyto sphingosine ceramide membrane organisation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2002**, 4(10), s. 1934-1942, ISSN 1463-9076.