

Sfingozinske baze u mlijeku

Slavica Ribar, Ivana Karmelić, Marko Mesarić

Izvorni znanstveni rad - Original scientific paper

UDK: 637.04:546/547

Sažetak

Sfingolipidi su sastojci membrana prisutni u svim eukariotskim stanicama. Definirani su kao spojevi koji kao okosnicu imaju dugolančanu sfingozinsku bazu. Najčešće dugolančane baze u većini sisavaca su D-erythro-sfinganin i sfingozin. Sfingolipida se, u manjim količinama, može naći u raznim vrstama hrane. Mliječna mast sadržava različite vrste sfingolipida. Iako se prvobitno pretpostavljalo da su sfingolipidi važni kao strukturne komponente membrane, danas se zna da imaju i značajnu fiziološku ulogu. Sfingolipidi iz hrane sve su značajniji zbog svoje moguće uloge u inhibiciji karcinoma kolona. Svrha ovog rada bila je odrediti koncentracije slobodnog i ukupnog sfinganina i sfingozina u mlijeku (majčino, kravlje, ovčje, kozje i sojino mlijeko). Sfingolipidi su ekstrahirani iz mlijeka, a slobodne i ukupne sfingozinske baze su dobivene baznom, odnosno kiselom hidrolizom. Sfinganin i sfingozin su određeni pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na razliku u koncentracijama sfingozinskih baza u kravljem mlijeku različitog udjela mliječne masti. Koncentracije slobodnog sfingozina i sfinganina u kravljem mlijeku bile su niže nego u majčinom mlijeku, dok su koncentracije ukupnih sfingozinskih baza u ovčjem i kozjem mlijeku bile više od onih u majčinom i kravljem mlijeku. Pasterizacijom se smanjuje količina većine sfingozinskih baza.

Ključne riječi: mlijeko, sfinganin, sfingozin

Uvod

Sfingolipide je prvi definirao J. L. W. Thudicum (Thudicum, 1884.) kao «enigmatsku» skupinu novih spojeva koje je izolirao dok je proučavao kemijske sastojke mozga. To su spojevi koji kao okosnicu imaju dugolančanu sfingozinsku bazu. Najčešća dugolančana baza u sisavaca je D-erythro-sfingozin (sl. 1), ali su poznate i neke druge, manje zastupljene baze, koje se razlikuju u duljini alkilnih lanaca, broju i položaju dvostrukih veza, prisutnosti hidroksilnih grupa na četvrtom ugljikovom atomu te u razgranjenosti alkilnog

lanca. Na amino-grupu sfingozinske baze vezana je masna kiselina (s različitim brojem ugljikovih atoma, zasićena ili nezasićena, sa ili bez hidroksilne skupine na α -C atomu). Složeni sfingolipidi imaju na prvom ugljikovom atomu vezanu polarnu skupinu (sl. 2). Sfingolipidi su skupina lipida koji se nalaze u svim eukariotskim i nekim prokariotskim stanicama. Nalaze se u staničnim membranama, lipoproteinima i drugim lipidima bogatim strukturama. Imaju brojne funkcije: sudjeluju u regulaciji staničnog rasta i diferencijacije, međustaničnoj komunikaciji, interakcijama stanice sa supstratom te u signalnoj transdukciji. Neki sfingolipidi djeluju kao drugi glasnici za faktore rasta, citokine, faktore diferencijacije i toksine (Kolesnick i Krönke, 1998.; Merrill i sur., 1997.). Nalaze se u mnogim namirnicama, no do danas još nije poznato jesu li sfingolipidi iz hrane neophodni za rast ili preživljavanje. Poznato je da su složeni sfingolipidi, kao i njihovi razgradni produkti, bioaktivni spojevi koji utječu na staničnu regulaciju. Procjenjuje se da ih se dnevno konzumira 0,3 do 0,4 g (Vesper i sur., 1999.). Sfingolipidi se razgrađuju u probavnom sustavu pri čemu nastaju bioaktivni metaboliti (ceramidi i sfingozinske baze) (Schmelz i sur., 1994.; Sugawara i sur., 2003.) koji inhibiraju rast stanica raka i induciraju diferencijaciju i apoptozu in vitro (Merrill i Sandhoff, 2002.). Sfingolipidi bi prema tome mogli djelovati kao biokativne komponente hrane koje sprječavaju razvoj karcinogeneze (Merrill i Schmelz, 2000.). Poznati su brojni stanični ciljevi ceramida i sfingozinskih baza, a to su uglavnom intracelularni signalni putevi (Cuvillier, 2002.; Pettus i sur., 2002.) koji uključuju protein kinazu C (Bourbon i sur., 2002.), fosfatidilinozitol-3 kinazu (Calcerrada i sur., 2002.) i regulacijske proteine staničnog ciklusa (Lee i sur., 2000.). Sve to ukazuje da bi sfingolipidi iz hrane mogli imati značenje u tretmanu karcinoma ili drugih bolesti. Iako do sada još ne postoje detaljne studije o udjelu i sastavu sfingolipida u hrani, poznato je da su mlijeko i mliječni proizvodi dobar izvor složenih sfingolipida, pogotovo sfingomijelina koji čini približno jednu trećinu fosfolipida mlijeka. Kako se pretpostavlja da bi sfingolipidi iz mlijeka mogli imati ulogu u razvoju nekih bolesti, svrha ovog rada bila je odrediti koncentracije slobodnog i ukupnog sfingozina i sfinganina u raznim vrstama mlijeka.

Materijali i metode rada

Uzorci

Za analizu je korišteno pasterizirano kravlje mlijeko s 0,9 %, 2,8 % i 3,8 % mliječne masti (Dukat d.o.o., Zagreb, Croatia), uzorak sirovog i pasteriziranog kravljeg mlijeka (2,8 % mm, Dukat d.o.o., Zagreb, Croatia), sirovo ovčje mlijeko te pasterizirano kozje (Vindija d.o.o., Varaždin, Croatia) i sojino mlijeko (Alinor, Italija). Koncentracije slobodnog i ukupnog sfingozina i sfinganina određene su u 20 uzoraka mlijeka zdravih žena u razdoblju od trećeg do četrdesetdrugog dana laktacije (uzorci su skupljeni u Klinici za ženske bolesti i porode, Petrova 13, Zagreb).

Kemikalije

Od otapala za ekstrakciju korišteni su CH₃OH i CHCl₃, proizvodi Riedel de Hähn AG, Seelze, Njemačka. Za tekućinsku kromatografiju upotrijebljeni su CH₃OH i H₂O (HPLC čistoće), Riedel de Hähn AG, Seelze, Njemačka. Standardi sfingozinskih baza (C18 D-sfingozin i C18-DL-*eritro*-dihidrosfingozin), ortoftaldialdehid (OPA), kao i 2-merkaptotanol, kupljeni kod Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka. Sve ostale kemikalije nabavljene su u Kemiki, Zagreb.

Ekstrakcija sfingolipida

Sfingolipidi su ekstrahirani iz mlijeka pomoću kloroforma i metanola, nakon čega je provedena bazna (Riley i sur., 1994.) i kisela hidroliza (Yoo i sur., 1996.).

Svrha bazne hidrolize je otpuštanje slobodnog sfingozina i sfinganina cijepanjem acilglicerolipida i hidrolizom lizosfingolipida. Provodi se tako da se suhi ekstrakt, koji je dobiven ekstrakcijom, otopi u 1 mL smjese 0,1 M metanolne KOH : CHCl₃ = 4 : 1 (v / v), stavi se 1 minutu u ultrazvučnu kupelj, a nakon toga se inkubira na 37 °C tijekom jednog sata. Smjesa se ohladi te se doda 1 mL CHCl₃, 1 mL alkalne vode i lagano se promiješa. Centrifugira se 20 minuta pri 3 000 o/min, nakon čega se ukloni gornja vodena faza, a donja kloroformska faza se opere s 2 mL alkalne vode. Još se jednom centrifugira 10 minuta pri 3000 o/min, nakon čega se ukloni vodena faza, a kloroformska faza se upari do suhog te se čuva pod dušikom na -20 °C do HPLC analize.

Svrha kisele hidrolize je oslobađanje tzv. ukupnog sfingozina i sfinganina iz kompleksnih sfingolipida. Kiselim tretmanom dolazi do hidrolize amidno vezane masne kiseline i bilo koje skupine esterificirane na C1 atomu

sfingozinske baze. Provodi se tako da se suhom ekstraktu preostalom nakon ekstrakcije doda 0,5 mL vodene metanolne HCl (1N HCl, priprema se neposredno prije upotrebe), epruveta se začepi teflonskim čepom i ostavi stajati približno 15 sati na 68 °C. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu doda se 0,5 mL zasićene metanolne KOH (30 g KOH se otopi u 100 mL CH₃OH te se profiltrira kroz nabrani filter papir), 0,5 mL alkalne vode, 0,1 mL otopine 2N NH₄OH i 0,6 mL CHCl₃, te se sve promiješa. Centrifugira se 20 minuta pri 3 000 o/min, nakon čega se vodeni sloj odbaci, a kloroformski sloj se ispere 3 puta s 0,9 mL alkalne vode i upari se do suhog te drži pod dušikom na -20 °C do HPLC analize.

Metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Analiza sfingozinskih baza provedena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Za derivatizaciju sfingozinskih baza prije nanošenja na kolonu upotrijebljen je ortoftaldialdehid (OPA) reagens koji reagira sa sfingozinskom bazom preko njezine amino-grupe. Za HPLC upotrijebljena je sljedeća oprema proizvođača Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, SAD: izokratna pumpa s jednim klipom (Series 10, Liquid Chromatograph); fluorescentni detektor (Model LC 240); interface (Series 900); autosampler (Series 200), pećnica za kolonu (Series 200) i računalni program za kromatografiju (TOTALCHROM 6.2.0.). Za HPLC upotrijebljena je analitička kolona (Radial-PakTM Cartridge, Nova-PakTM C₁₈, 10 cm x 0,8 cm, 4 μm), modul za kolonu (RCM 8x10) i nosač s predkolonskim filterom (Guard-Pak assembly, Nova-Pak C₁₈, 4 μm), Waters Corporation, Milford, Massachusetts. Upotrijebljena je aparatura za filtraciju otapala za HPLC koja se sastoji od lijevka (300 mL), nosača za filter papir, nitroceluloznog filter papira (47 mm, 0,45 μm) i staklene boce od 1L koja se spaja na vakuum (Millipore).

Uzorak za HPLC pripremljen je tako da je suhom ekstraktu (dobiven baznom ili kiselom hidrolizom) dodano 250 μL mobilne faze, miješano 1 minutu miješalicom, nakon čega je dodano 50 μL OPA reagensa (priprema se tako da se 5 mg reagensa i 5 μl 2-merkaptetanola otopi u 0,1 mL etanola i nadopuni se do 10 ml s bornim puferom - pH prilagođen na 10,5 pomoću 1M KOH). Nakon toga je uzorak miješan 30 sekundi miješalicom, profiltriran centrifugiranjem kroz filter veličine pora 0,45 μm i ostavljen 1 sat na sobnoj temperaturi prije injektiranja. Identitet pojedinačnih sfingozinskih baza u uzorku određen je usporedbom kromatograma uzorka s kromatogramom smjese standarda. Svi uzoci su analizirani u triplikatu.

Kao mobilna faza korištena je smjesa $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O} = 9 : 1$ (v / v), profiltrirana na uređaju za filtriranje uz upotrebu nitroceluloznog filter papira veličine pora $0,45 \mu\text{m}$, te degazirana propuštanjem helija. Radni protok bio je $2 \text{ mL}/\text{min}$, a tlak 6 MPa . Analize su provedene pri valnoj duljini emisije 440 nm i ekscitacije od 334 nm . Volumen injektiranog uzorka je iznosio $100 \mu\text{L}$.

Rezultati i rasprava

U ovome radu provedena je analiza sfingozinskih baza u raznim vrstama mlijeka. Sfingozinske baze su određene u kravljem mlijeku različitog udjela mliječne masti (0,9%; 2,8%; 3,8%). Na temelju dobivenih rezultata (usporedbom srednjih vrijednosti) može se zaključiti da se mlijeko različitog udjela mliječne masti razlikuje u količini sfingozinskih baza. Najmanje koncentracije slobodnog sfingozina i sfinganina (sl. 3, 4) bile su u mlijeku najmanjeg udjela mliječne masti (0,9 %), a najveće u mlijeku s najvećim udjelom mliječne masti (3,8 %). Koncentracije ukupnog sfingozina i sfinganina (sl. 5, 6) također su bile najmanje u mlijeku s najmanjim udjelom mliječne masti (0,9%), a najveće u mlijeku s najvećim udjelom mliječne masti (3,8 %), što ukazuje na korelaciju između količine lipida i sfingozinskih baza. Koncentracije slobodnih sfingozinskih baza u kravljem mlijeku su bile približno dva puta manje nego u majčinom (sl. 3, 4). Koncentracije ukupnog sfinganina u svim uzorcima kravljeg mlijeka bile su veće u odnosu na majčino mlijeko, dok su koncentracije ukupnog sfingozina bile veće samo u mlijeku s 3,8% mliječne masti.

Jedan od ciljeva ovog rada bio je utvrditi da li tijekom prerade mlijeka dolazi do promjena u količini sfingolipida, pa su zbog toga određene koncentracije slobodnih i ukupnih sfingozinskih baza u kravljem mlijeku prije i nakon pasterizacije. Uočeno je da su u kravljem mlijeku nakon obrade manje koncentracije slobodnog sfingozina i sfinganina, kao i ukupnog sfingozina (sl. 7, 8).

Koncentracije sfingozinskih baza su određene i u ovčjem (sirovo mlijeko) i kozjem mlijeku (pasterizirano). Koncentracije slobodnog sfingozina i sfinganina bile su manje i u ovčjem i u kozjem mlijeku u odnosu na kravlje mlijeko najvećeg udjela mliječne masti (sl. 3, 4). Koncentracije ukupnog sfingozina u ovčjem i kozjem mlijeku bile su značajno veće u odnosu na kravlje mlijeko (sl. 5), dok su koncentracije ukupnog sfinganina bile veće samo u ovčjem mlijeku u odnosu na kravlje mlijeko (sl. 6). Koncentracije slobodnog sfingozina i sfinganina u ovčjem i kozjem mlijeku bile su manje u

odnosu na majčino mlijeko (sl. 3, 4), dok su koncentracije ukupnog sfingozina i sfinganina bile veće nego u majčinom mlijeku (sl. 5, 6). Kozje mlijeko postaje sve popularnije u prehrani dojenčadi, te dobiva epitet "zdravog" mlijeka. No, u usporedbi s kravljim mlijekom nema većih nutritivnih vrijednosti. Njegova prednost je u tome što sadrži veću količinu srednjelančanih masnih kiselina (C8 i C10) koje se bolje resorbiraju nego masne kiseline kravljeg mlijeka (Razafindrakoto i sur., 1994.). Važan nedostatak kozjeg mlijeka su male količine folne kiseline zbog čega djeca, koja su isključivo hranjena kozjim mlijekom, razvijaju megaloblastičnu anemiju. Kozje mlijeko sadrži veću količinu proteina s obzirom na kravlje mlijeko. No, količina kazeina i α -laktalbumina je manja u kozjem mlijeku, ali su veće količine albumina, proteaza, peptaza i neproteinskog dušika. Uvriježeno je mišljenje o hipoalergenosti kozjeg mlijeka, no treba imati na umu da hipoalergena hrana ne znači i nealergijska (Fisher, 1993.). Osmolalitet kozjeg mlijeka je veći nego kravljeg, te stoga ni kozje mlijeko ne bi trebalo preporučivati za prehranu dojenčadi.

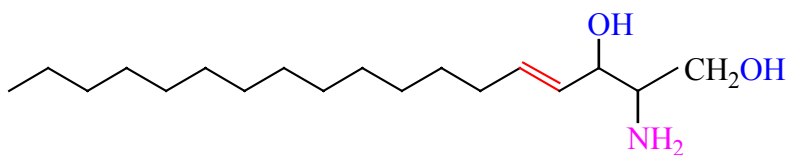
Prema sadašnjim spoznajama ovčje mlijeko se ne preporučuje za prehranu dojenčadi zbog velikog udjela bjelančevina, kalcija i ostalih mineralnih tvari te visokog osmolaliteta.

Koncentracije slobodnog i ukupnog sfingozina i sfinganina, određene u ovom radu, bile su nešto veće u ovčjem mlijeku u odnosu na kozje mlijeko (sl. 3, 4, 5, 6).

Sfingolipidima iz soje, mlijeka i mliječnih proizvoda nije posvećena tolika pažnja kao nekim drugim tvarima, (npr. izoflavonima, (Messina i Bennink, 1998.), no ipak neka epidemiološka istraživanja ukazuju da se konzumiranjem soje rjeđe javlja karcinom kolona (Adlercreutz, 1990.). Stoga su u ovom radu određene koncentracije slobodnog i ukupnog sfingozina i sfinganina u sojinom mlijeku. Koncentracije slobodnog sfingozina i sfinganina bile su podjednake kao u kravljem mlijeku najvećeg udjela mliječne masti (3,8%), veće s obzirom na ovčje i kozje mlijeko (sl. 3, 4), a manje nego u majčinom mlijeku (sl. 3, 4). Koncentracija ukupnog sfingozina u sojinom mlijeku bila je manja nego u svim ostalim vrstama mlijeka (sl. 5). Koncentracija ukupnog sfinganina bila je manja nego u kravljem, ovčjem i kozjem mlijeku, a veća nego u majčinom mlijeku (sl. 6).

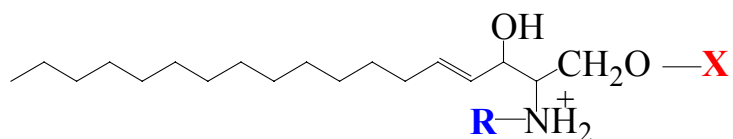
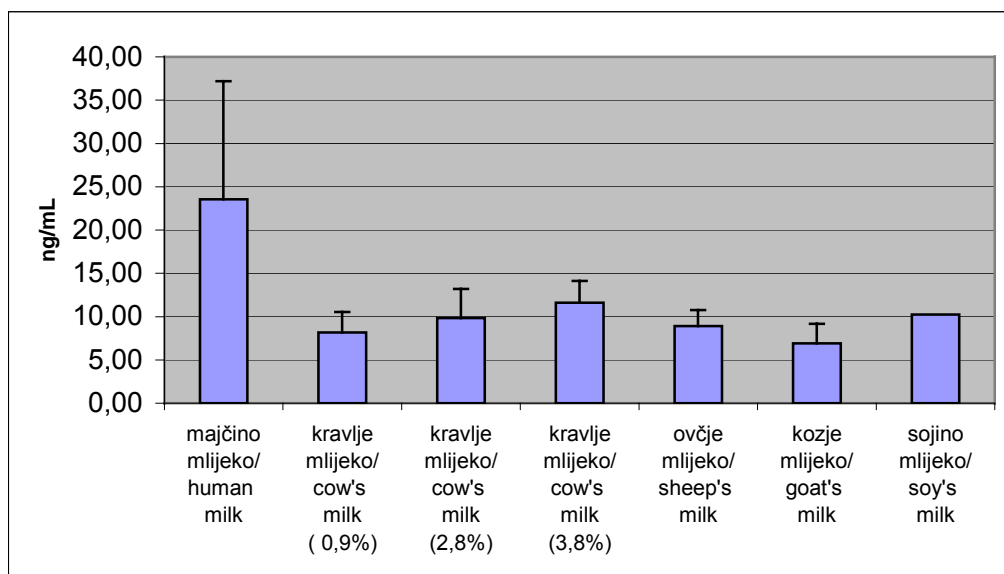
Sfingolipidi iz mlijeka inhibiraju rane i kasne faze karcinogeneze u miševa kod kojih je tumorogeneza kemijski inducirana 1,2-dimetilhidrazinom (Schmelz i sur., 1997; Schmelz i sur., 2000.) ili inducirana nasljednim

genetičkim defektom. Brojni sfingolipidi iz mlijeka, koji se razlikuju u polarnim glavnim skupinama vezanim na C1 položaju ceramida, sprječavaju tumorogenezu. U pokusu, u kojem je u hranu za CF1 miševe dodano 0,1 % sfingomijelina, nije došlo do promjene u tjelesnoj masi, ali je približno za 70% reduciran broj aberantnih kripti kolona i smanjen broj adenokarcinoma (Dillehay i sur., 1994.). Sfingolipidi iz hrane se međusobno razlikuju u sfingozinskoj bazi te u skupinama vezanim na C1 ceramida. Istraživanje utjecaja okosnice sfingolipida pokazalo je da je sfingomijelin (koji sadrži sfinganin) djelotvorniji od sfingomijelina sa sfingozinskom okosnicom u redukciji stvaranja aberantnih kripti (Schmelz i sur., 1997.). Kako je poznato da je za signalizaciju ceramidom potrebna 4,5-*trans*-dvostruka veza (Bielawska i sur., 1993.), pretpostavlja se da je inhibicija stvaranja aberantnih kripti kolona pomoću (dihidro) sfingomijelina iz hrane vjerojatno posljedica djelovanja slobodnih sfingozinskih baza (sfingozina, sfinganina), a ne ceramida. No, do sada još nisu provedena klinička niti epidemiološka istraživanja koja bi utvrdila utjecaj sfingolipida na karcinom ljudi. Kako je poznato da su sintetički sfingolipidi djelotvorni u sprječavanju vezanja bakterija i virusa (Fantini i sur., 1997.), smatra se mogućim da se sfingolipidi iz hrane također natječu za vezivna mjesta i olakšavaju eliminaciju patoloških organizama iz probavnog sustava, što može pridonijeti zaštiti od bakterijskih toksina i infekcija. Kako se pretpostavlja da je inhibicija stvaranja aberantnih kripti posljedica djelovanja slobodnih sfingozinskih baza, te s obzirom na to da su mlijeko i mliječni proizvodi glavni izvor sfingolipida u hrani, svrha ovog rada bila je odrediti koncentracije slobodnog i ukupnog sfingozina i sfinganina u raznim vrstama mlijeka da bi se dobio uvid o njihovoj količini koja se takvom hranom unosi u organizam.



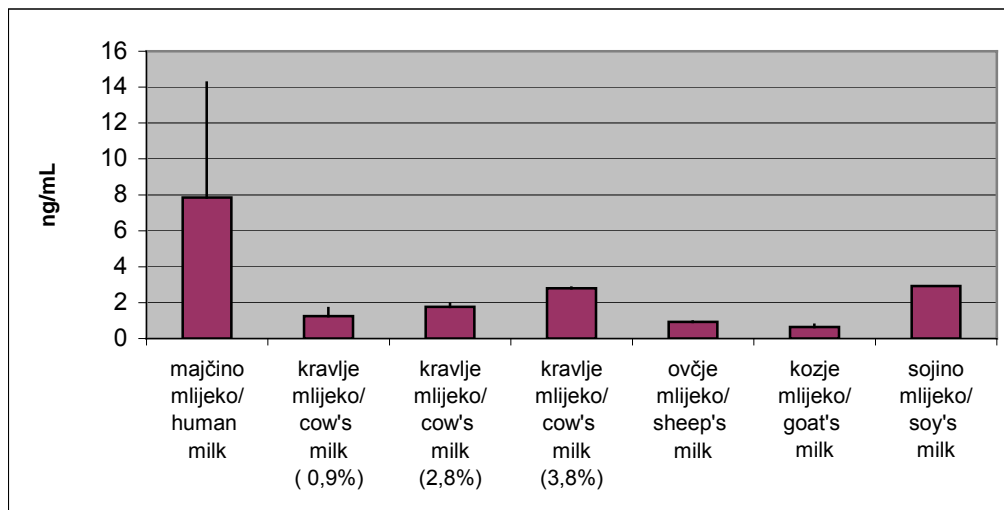
Slika 1: Struktura sfingozina

Figure 1: The structure of sphingosine

Slika 2: Složeni sfingolipid (R =masna kiselina; X =polarna skupina)Figure 2: Complex sphingolipid (R =fatty acid; X =polar group)Rezultati su prikazani kao sr. vr. \pm st. dev.Results are expressed as mean \pm st. dev.

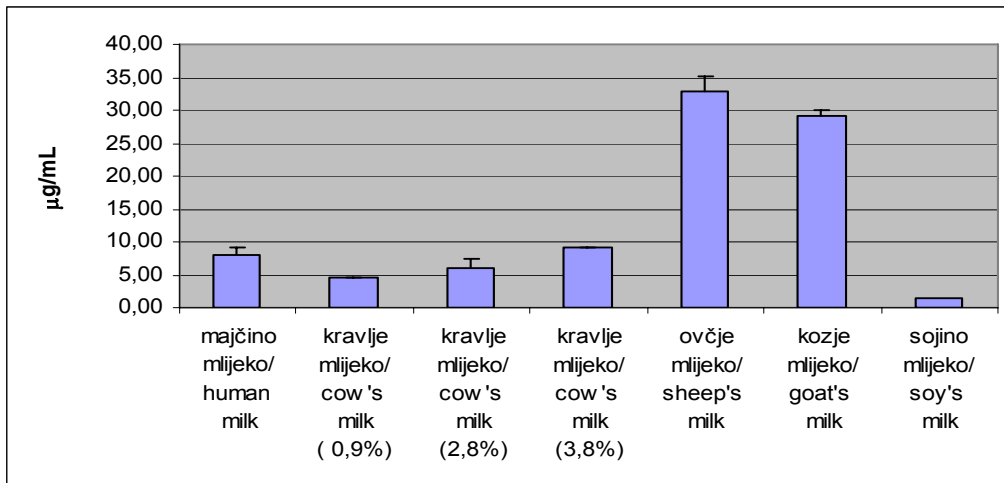
Slika 3: Koncentracije slobodnog sfingozina u raznim vrstama mlijeka

Figure 3: The concentrations of free sphingosine in different milk types



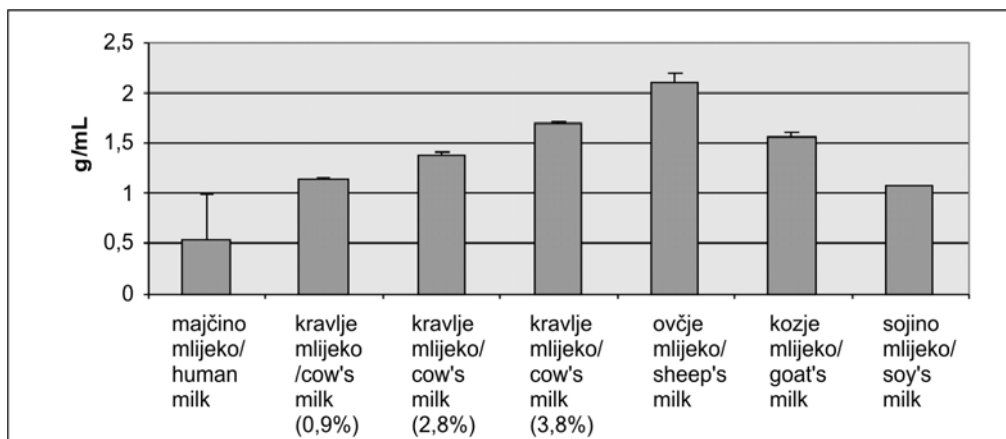
Rezultati su prikazani kao sr. vr. \pm st. dev.
Results are expressed as mean \pm st. dev.

Slika 4: Koncentracije slobodnog sfinganina u raznim vrstama mlijeka
Figure 4: The concentrations of free sphinganine in different milk types



Rezultati su prikazani kao sr. vr. \pm st. dev.
Results are expressed as mean \pm st. dev.

Slika 5: Koncentracije ukupnog sfingosina u raznim vrstama mlijeka
Figure 5: The concentrations of total sphingosine in different milk types

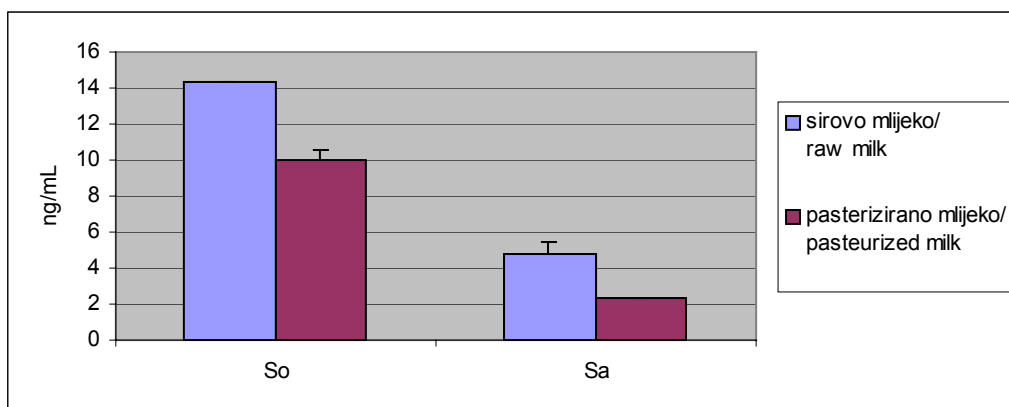


Rezultati su prikazani kao sr. vr. \pm st. dev.

Results are expressed as mean \pm st. dev.

Slika 6: Koncentracije ukupnog sfinganina u raznim vrstama mlijeka

Figure 6: The concentrations of total sphinganine in different milk types



Rezultati su prikazani kao sr. vr. \pm st. dev.

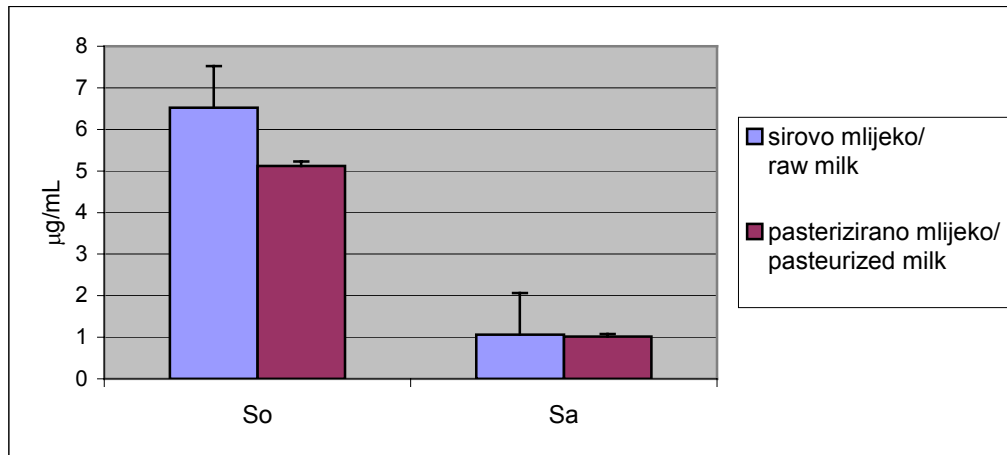
Results are expressed as mean \pm st. dev.

So=sfingozin/sphingosine

Sa=sfinganin/sphinganine

Slika 7: Koncentracije slobodnih sfingozina i sfinganina u uzorku kravljeg mlijeka prije i poslije pasterizacije

Figure 7: The concentrations of free sphingosine and sphinganine in cow's milk before and after pasteurization



Rezultati su prikazani kao sr. vr. \pm st. dev.

Results are expressed as mean \pm st. dev.

So=sfingozin/sphingosine

Sa=sfinganin/sphinganine

Slika 8: Koncentracije ukupnih sfingozina i sfinganina u uzorku kravljeg mlijeka prije i poslije pasterizacije

Figure 8: The concentrations of total sphingosine and sphinganine in cow's milk before and after pasteurization

SPHINGOSINE BASIS IN MILK

Summary

Sphingolipids are widespread membrane components that are found in all eukaryotic cells. They are defined as compounds having a long-chain sphingoid base as the backbone. The most frequent long-chain bases in most of the mammals are D-erythro-sphinganine and sphingosine. Sphingolipids can be expected in minor quantities in all food products. Milk fat contains a number of different sphingolipid classes. Originally they were presumed to contribute to the structural integrity of membranes, but there nowadays it is confirmed that they have an important physiological role. Dietary sphingolipids have gained attention because of their possibility to inhibit colon cancer. The aim of this study was to determine the concentrations of free and total sphinganine and sphingosine in milk (human, cow's, sheep's, goat's, soy's) Sphingolipids were extracted from milk. Free and total sphingoid

bases were obtained by alkaline and acid hydrolysis respectively. Sphinganine and sphingosine were determined by means of high-performance liquid chromatography. The results of this research illustrate the differences between the concentrations of sphingoid bases in cow's milk with various content of milk fat. The concentrations of free sphingosine and sphinganine in cow's milk were lower than in human milk. In sheep's and goat's milk, the concentrations of total sphingoid bases were higher than in human and cow's milk. Quantity of the most sphingoid bases decreased during pasteurization.

Key words: milk, sphinganine, sphingosine

Literatura

- ADLERCREUTZ, H. (1990): Western diet and western diseases: Some hormonal and biochemical mechanism and associations. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 50(1), 31-36.
- BIELAWSKA, A., CRANE, H. M., LIOTTA, D. C., OBEID, L. M., HANNUN, Y. A. (1993): Selectivity of ceramide-mediated biology. Lack of activity of erythro-dihydro-ceramide. *J. Biol. Chem.* 268, 26226-26232.
- BOURBON, N. A., SANDRASEGARANE, L., KESTER, M. (2002): Ceramide-induced inhibition of Akt is mediated through protein kinase C ξ : implications for growth arrest. *J. Biol. Chem.* 277, 3286-3292.
- CALCERRADA, M. C., MIGUEL, B. G., MARTIN, L., CATALAN, R. E., MARTINEZ, A. M. (2002): Involment of phosphatidylinositol 3-kinase in nuclear translocation of protein kinase C zeta induced by C2-ceramide in rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 514, 361-365.
- CUVILLIER, O. (2002): Sphingosine in apoptosis signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* 1585, 153-162.
- DILLEHAY, D. L., WEBB, S. J., SCHMELZ, E. M., MERRILL, A. H. (1994): Dietary sphingomyelin inhibits 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in CF1 mice. *J. Nutr.* 124, 615-620.
- FANTINI, J., HAMMACHE, D., DELEZAY, O., YAHY, N., ANDRE-BARRES, C., RICO-LATTES, I., LATTES, A. (1997): Synthetic soluble analogs of galactosylceramide (GalCer) bind to the V3 domain of HIV-1 gp120 and inhibit HIV-1-induced fusion and entry. *J. Biol. Chem.* 272, 7245-7252.
- FISHER, T. (1993): Allergy and immunological disorders in children, In: *Pediatric Nutrition in Chronic Diseases and Developmental Disorders*, S.W. Ekvall (Editor), Oxford University Press, New York, pp. 243-255.
- KOLESNICK, R. N., KRÖNKE, M. (1998): Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 643-665.

- LEE, J. Y., BIELAWSKA, A. E., OBEID, L. M. (2000): Regulation of cyclin-dependent kinase activity by ceramide. *J. Biol. Chem.* 277, 303-311.
- MERRILL, A. H., SANDHOFF, K. (2002): Sphingolipids: metabolism and cell signaling, In: *New Comprehensive Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes*, D. E. Vance and J.E. Vance (Editors), 4th ed. Elsevier Science, New York, NY, pp. 373-407.
- MERRILL, A. H., SCHMELZ, E. M. (2000): Sphingolipids: mechanism-based inhibitors of carcinogenesis produced by animals, plants and other organisms, In: *Handbook of Nutraceutical and Functional Foods*, R.E.C Wildman (Editor), CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 377-391.
- MERRILL, A. H., SCHMELZ, E. M., DILLEHAY, D. L., SPIGEL, S., SHAYMAN, J. A., SCHROEDER, J. J., RILEY, R. T., WANG, E. (1997): Sphingolipids: The enigmatic lipid class: biochemistry, physiology and pathophysiology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142, 208-225.
- MESSINA, M., BENNINK, M. (1998): Soyfoods, isoflavones and risk of colonic cancer: a review of the in vitro and in vivo data. *Bailliers. Clin. Endocrinol. Metab.* 12(4), 707-728.
- PETTUS, B. J., CHALFANT, C. E., HANNUN, Y. A. (2002): Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim. Biophys. Acta.* 1585, 114-125.
- RAZAFINDRAKOTO, O., RAVELOMANANA, N., RASOLOFO, A., GOURGUE, P., COQUIN, P., BRIEND, A., DESJEUX, J. F. (1994): Goat's milk as a substitute for cow's milk in undernourished children: a randomized double-blind clinical trial. *Pediatrics.* 94(1), 65-69.
- RILEY, R. T., WANG, E., MERRILL, A. H. (1994): Liquid chromatographic determination of sphinganine and sphingosine: use of the free sphinganine to sphingosine ratio as biomarker for consumption of fumonisins. *J. AOAC Int.* 77, 533-540.
- SCHMELZ, E. M., BUSHNEV, A. S., DILLEHAY, D. L., LIOTTA, D. C., MERRILL, A. H. (1997): Suppression of aberrant colonic crypt foci by synthetic sphingomyelins with saturated or unsaturated sphingoid base backbone. *Nutr. Cancer.* 28, 81-85.
- SCHMELZ, E. M., CRALL, K. J., LAROCQUE, R., DILLEHAY, D. L., MERRILL, A. H. (1994): Uptake and metabolism of sphingolipids in isolated intestinal loops of mice. *J. Nutr.* 124, 702-712.
- SCHMELZ, E. M., SULLARDS, M. C., DILLEHAY, D. L., MERRILL, A. H. (2000): Colonic cell proliferation and aberrant crypt formation are inhibited by dairy glycosphingolipids in 1,2-dimethylhydrazine-treated CF1 mice, *J. Nutr.* 130, 522-527.
- SUGAWARA, T., KINOSHITA, M., OHNISHI, M., NAGATA, J., SAITO, M. (2003): Digestion of maize sphingolipids in rats and uptake of sphingadienine by Caco-2 cells, *J. Nutr.* 133, 2777-2782.
- THUDICUM, J. L. W. (1884): In: *A Treatise on the Chemical Constitution of Brain*, Bailliere, Tindall and Cox, UK, London, pp. 149.

VESPER, H., SCHMELZ, E. M., NIKOLOVA-KARAKASHIAN, M., DILLEHAY, D. L., MERRILL, A. H. (1999): Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids in nutrition. *J. Nutr.* 129,1239-1250.

YOO, H. S., NORRED, W. P., RILEY, R. T. (1996): A rapid method for quantifying free sphingoid bases and complex sphingolipids in microgram amounts of cells following exposure to fumonisin B₁. *Toxicol. in vitro.* 10, 77-84.

Adrese autora - Author's addresses:

Dr. sc. Slavica Ribar
Ivana Karmelić, dipl. ing.
Prof. dr. sc. Marko Mesarić

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Zavod za kemiju i biokemiju
Šalata 3, Zagreb

Prispjelo - Received: 11.05.2006.

Prihvaćeno - Accepted: 04.10.2006.