

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

Skin Barrier Research Group



Diplomová práce

ŠTÚDIUM MIKROŠTRUKTÚRY MODELU KOŽNEJ BARIÉRY
POMOCOU DEUTEROVANÝCH CERAMIDOV

Martin Juhaščík

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Andrej Kováčik, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.

Hradec Králové

2019

Podakovanie

Týmto by som sa rád poďakoval predovšetkým svojmu školiteľovi PharmDr. Andrejovi Kováčikovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie, ústretovosť, trpezlivosť a za čas, ktorý mi počas vypracovania tejto práce venoval. Chcel by som sa taktiež poďakovať všetkým ostatným členom *Skin Barrier Research Group*, predovšetkým prof. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za to, že mi umožnila pracovať v jej laboratóriách a ďalej Mgr. Monike Kopečnej, PharmDr. Lukášovi Opálkovi, Ph.D. za ich cenné rady počas syntetickej časti tejto práce.

Prehlásenie

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname literatúry a v práci náležite citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové 2019

Martin Juhačík

Obsah

1	Abstrakt	6
2	Abstract	7
3	Použité skratky	8
4	Úvod a cieľ práce	9
5	Teoretická časť	10
5.1	Koža	10
5.2	Anatómia kože	10
5.2.1	<i>Tela subcutanea</i>	10
5.2.2	<i>Dermis</i>	10
5.2.3	<i>Epidermis</i>	11
5.3	Ceramidy v <i>stratum corneum</i>	12
5.4	Laterálna organizácia lipidov v <i>stratum corneum</i>	13
5.4.1	Konformácie ceramidov	14
5.5	Ochorenia spojené s poruchou bariérovej funkcie kože	15
5.6	Hodnotenie lipidov pomocou infračervenej spektroskopie	15
5.7	Grubbsova metatéza	19
5.7.1	Katalyzátory používané pri Grubbsovej metatéze	19
5.7.2	Mechanizmus Grubbsovej metatézy	20
6	Experimentálna časť	21
6.1	Chemická časť	21
6.1.1	Chemikálie a prístroje	21
6.1.2	Syntéza	21
6.1.3	Príprava (2-nitrofenyl)(pentadecyl)selanu- d_{31} (2)	23
6.1.4	Príprava pentadec-1-énu- d_{30} (3)	24
6.1.5	Príprava (<i>S</i>)- <i>terc</i> -butyl-4-((<i>R</i>)-1-hydroxyallyl)-2,2-dimetyloxazolidín-3-karboxylátu (5)	25
6.1.6	Príprava (<i>S</i>)- <i>terc</i> -butyl 4-((<i>R,E</i>)-1-hydroxyhexadec-2-en-1-yl)-2,2-dimetyloxazolidín-3- karboxylátu- d_{28} (6)	26
6.1.7	Príprava (2 <i>S,3R,4E</i>)-2-aminooktadec-4-en-1,3-diolu- d_{28} (<i>d</i> -sfingozín)	27
6.1.8	Príprava <i>N</i> -((2 <i>S,3R,4E</i>)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)-tetrakosanamidu- d_{28} (<i>d</i> -CerNS)	28
6.1.9	Príprava <i>N</i> -((2 <i>S,3R,4E</i>)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)-tetrakosanamidu- d_{28} - d_{47} (<i>dd</i> -CerNS)	29
6.2	Biofyzikálna časť	30
6.2.1	Chemikálie a prístroje	30
6.2.2	Príprava modelových membrán SC	30

6.2.3	Spracovanie dát	31
7	Výsledky a diskusia.....	32
7.1	Chemická časť.....	32
7.1.1	Príprava pentadec-1-énu- d_{30} (3).....	32
7.1.2	Vynylácia (S)-Garnerovho aldehydu (4)	32
7.1.3	Grubbsova metatéza.....	33
7.1.4	Syntéza <i>d</i> -CerNS a <i>dd</i> -CerNS	33
7.2	Biofyzikálna časť	34
7.2.1	Vyhodnotenie symetrických valenčných vibrácií.....	34
7.2.2	Vyhodnotenie nožnicových deformačných vibrácií	36
7.2.3	Vyhodnotenie termotropných meraní	37
8	Záver.....	40
9	Zdroje	41

1 Abstrakt

Ceramidy (Cer) sú sfingolipidy, ktoré sa v eukaryotických bunkách cicavcov podieľajú na rôznych biologických funkciách (bunková signalizácia, proliferácia, diferenciácia a apoptóza buniek). V koži cicavcov sa Cer nachádzajú v najvrchnejšej vrstve epidermis nazývanej tiež ako *stratum corneum* (SC). V tejto vrstve Cer spoločne s cholesterolom (Chol) a vyššími mastnými kyselinami (VMK) tvoria mnohvrstvé lamely intercelulárnej lipidovej matrix, ktorá sa považuje za vlastnú kožnú bariéru.

Dodnes nebolo úplne objasnené, ako sú lipidy v intercelulárnej kožnej matrix usporiadané. Na hodnotenie usporiadania kožných lipidov sa preto často používajú modely kožnej bariéry so značenými (deuterovanými) lipidmi. Cieľom tejto práce bolo pripraviť sfingozín s deuterovaným reťazcom a následne od neho odvodené deuterované Cer, tj. *N*-lignoceroyl sfingozín- d_{28} (s acylom kyseliny lignocerovej (C24); *d*-CerNS) a *N*-lignoceroyl- d_{47} sfingozín- d_{28} (*dd*-CerNS) a hodnotiť tak ich fázové chovanie a usporiadanie s ďalšími kožnými lipidmi pomocou štúdia modelových membrán.

Syntéza deuterovaných Cer vychádzala z eliminácie pentadekan-1-olu- d_{31} na terminálny deuterovaný alkén. Ďalším krokom bola Grubbsova metatéza terminálneho alkénu a intermediátu, ktorý bol výsledkom vinylácie (*S*)-Garnerovho aldehydu. Produkt Grubbsovej metatézy (chránený deuterovaný sfingozín) bol následovne odchránený v kyslom prostredí a voľná sfingoidná báza bola acylovaná protonovanou (deuterovanou) kyselinou lignocerovou pomocou vo vode rozpustného karbodiimidu. Pripravené *d*-CerNS a *dd*-CerNS boli potom prenesené do modelových membrán SC. Modelové zmesi obsahovali *d*-CerNS alebo *dd*-CerNS, (deuterovanú) kyselinu lignocerovú a Chol v ekvimolárnom pomere s prídavkom cholesterol-sulfátu (5% m/m). Celkom štyri typy modelových membrán, s rôznym zastúpením deuterovanej zložky boli hodnotené pomocou teplotne závislej infračervenej spektroskopie. Touto biofyzikálnou metódou bolo hodnotené fázové chovanie (konformácia, laterálne usporiadanie, miešateľnosť) reťazcov lipidov modelových membrán. Výsledky tejto práce by mohli byť nápomocné vo vysvetlení (pato)fyziológie usporiadania lipidov v SC.

2 Abstract

Ceramides (Cer) are sphingolipids, which participate in eucaryotic cells in various biological processes (cell signalling, proliferation, differentiation and cell apoptosis). In mammalian skin, Cer are localized in the uppermost layer of epidermis, *stratum corneum* (SC). In this layer, Cer along with cholesterol (Chol) and free fatty acids form multilayer lamellae of intercellular lipid matrix.

The skin lipid arrangement in SC is still unclear. To evaluate the skin lipid arrangement, skin membrane models with labelled (deuterated) lipids have been used. Therefore, the aim of this work was to synthesize sphingosine with deuterated chain and Cer based on deuterated sphingosine, *i.e.*, *N*-lignoceroyl sphingosine- d_{28} (with lignoceric acid acyl (C24); *d*-CerNS) and *N*-lignoceroyl- d_{47} sphingosine- d_{28} (*dd*-CerNS) and to study their phase behaviour and arrangement in model membranes by using biophysical studies.

Synthesis of deuterated Cer started from elimination of 1-pentadecanol- d_{31} to obtain a deuterated terminal alkene. Next, a vinylation of (*S*)-Garner's aldehyde led to obtain an intermediate, which was treated in Grubbs' metathesis with terminal alkene. The product of Grubbs metathesis (a protected deuterated sphingosine) was then deprotected under acid conditions; free sphingoid base was acylated by protonated or deuterated lignoceric acid using water soluble carbodiimide. Synthesized *d*-CerNS and *dd*-CerNS were incorporated into SC membrane models. Model mixtures contained *d*-CerNS or *dd*-CerNS, (deuterated) lignoceric acid and Chol in 1:1:1 molar ratio with an addition of cholesteryl sulfate (5 wt%). Overall, four types of model membranes with different representation of deuterated methylene (CD_2) chains, were studied by temperature depended infrared spectroscopy at temperature from 28°C to 100°C. A phase behaviour (conformation, lateral arrangement, and miscibility) of model lipid membranes was investigated. The results of this study could be helpful in explaining the (patho)physiological arrangement of SC lipids.

3 Použité skratky

Boc.....	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
BuOH	butanol
Cer	ceramid(y)
<i>d</i> -CerNS.....	<i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>E</i>)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)-tetrakosanamid- <i>d</i> ₂₈
<i>dd</i> -CerNS.....	<i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>E</i>)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)-tetrakosanamid- <i>d</i> ₂₈ - <i>d</i> ₄₇
<i>d</i> -sfingozín	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>E</i>)-2-aminooktadec-4-en-1,3-diol- <i>d</i> ₂₈
EtOH	etanol
GM.....	Grubbsova metatéza
HMPA.....	hexametylfosforamid
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
Chol	cholesterol
CholS.....	cholesterol-sulfát
IČ	infračervená (spektroskopia)
(<i>d</i>)-LIG	(deuterovaná) lignocerová kyselina
MeOH	metanol
MS	hmotnostná spektroskopia
NMR.....	nukleárna magnetická rezonancia
R _f	retenčný faktor
SC.....	rohová vrstva (lat. <i>stratum corneum</i>)
TFA.....	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
TLC.....	tenkovrstvová chromatografia
VMK.....	vyššia masťná kyselina/vyššie masťné kyseliny
WSC	1-ethyl-3-(3-dimetylamino)propyl)karbodiimid

4 Úvod a cieľ práce

Sfingolipidy tvoria pomerne rozsiahlu skupinu lipidov, ktorých hlavným spoločným znakom je prítomnosť 2-aminodiolov, označovaných aj ako **sfingoidné bázy**. Podľa substituentu na C1 a C2 sfingoidnej báze sa sfingolipidy delia na fosfosfingolipidy, glykosfingolipidy, a konečne **ceramidy** (Cer).^{1,2}

Cer sú druhom sfingolipidov, ktoré sú fyziologickou súčasťou všetkých eukaryotických buniek a podieľajú sa na bunkovej signalizácii, ktorá reguluje napr. proliferáciu, diferenciáciu a apoptózu buniek. V koži cicavcov sa nachádzajú v najvrchnejšej vrstve *epidermis*, nazývanej rohová vrstva (*stratum corneum*; SC). Práve v tejto vrstve, obsahujúcej odumreté keratinocyty, Cer spolu s cholesterolom (Chol) a voľnými mastnými kyselinami (VMK) tvoria lamely intercellulárnej lipidovej matrix, ktorá sa pokladá za vlastnú kožnú bariéru. Cer v nej hrajú esenciálnu rolu; spoločne s vyššie spomínanými látkami zabraňujú prieniku cudzorodých látok do organizmu a chránia organizmus pred jeho dehydratáciou.^{1,2}

Napriek tomu, že Cer sa tešia intenzívnemu záujmu mnohých výskumných pracovísk, ich funkcie a celkovo mikroštruktúra kožnej bariéry dodnes neboli úplne objasnené. Dodnes nie je úplne známe usporiadanie (konformácia) lipidov v kožnej bariére a rovnako dosiaľ nebol pripravený sfingozín s deuterovaným reťazcom, ktorý by bol veľmi nápomocný v objasnení usporiadania lipidov kožnej matrix. Preto bolo cieľom mojej diplomovej práce pripraviť označený (deuterovaný) sfingozín pomocou Grubbsovej metatézy, ktorý by bol následne acylovaný buď protonovanou kyselinou lignocerovou (LIG) alebo deuterovanou kyselinou lignocerovou (*d*-LIG). Z takto pripravených Cer bolo cieľom následne pripraviť jednoduché modely kožnej bariéry, ktoré by boli sledované pomocou teplotne závislej infračervenej spektroskopie.

5 Teoretická časť

5.1 Koža

Koža (lat. *cutis*, gréc. *derma*), je rozsiahly plošný orgán cicavcov, ktorý tvorí vonkajší povrch organizmu a tým aj bariéru organizmu voči podnetom z vonkajšieho prostredia. Zvyčajne nadobúda koža veľkosti v priemere 1,6 – 1,8 m². Jej hrúbka sa podľa oblasti tela pohybuje od 0,4 do 4 mm. V priemere má hmotnosť okolo 3 kg, ale v závislosti od hrúbky tukového tkaniva môže hmotnosť kože kolísať. Najtenšie oblasti ľudskej kože sú predovšetkým na očných viečkach a naopak, najhrubšie časti je možno nájsť je na chrbte.³

Koža predstavuje účinnú **bariéru** proti fyzikálnym, chemickým a biologickým vplyvom z okolia. Pomocou činnosti potných žliaz a zmenou prietoku krvi vo svojom krvnom riečisku účinne riadi termoreguláciu tela. Koža sa taktiež zúčastňuje na **dýchaní** a vďaka činnosti potných a mazových žliaz plní taktiež funkciu **exkrečnú**. Netreba však zabúdať ani na jej **imunitnú** funkciu, nakoľko sa v nej nachádza veľké množstvo buniek imunitného systému. Nachádzajú sa v nej tiež bohato vetvené nervové zakončenia, vďaka ktorým sa telo udržiava v kontakte s vonkajším prostredím. Nemenej dôležitá je aj jej úloha pri tvorbe **vitamínu D**, čím nepriamo ovplyvňuje metabolizmus vápniku v tele.³

5.2 Anatómia kože

Anatomicky sa koža delí na tri základné vrstvy. Sú to *epidermis*, *dermis* a *tela subcutanea*.^{3,4}

5.2.1 Tela subcutanea

Tela subcutanea (podkožné tukové väzivo) je najhlbšia vrstva kože, pričom spojuje *dermis* s nižšie položenými tkanivami (svaly a väzivá). Je tvorená prevažne z tukového tkaniva, tvoreného adipocytmi. Hrúbka tejto vrstvy značne kolíše v závislosti od časti tela. Typicky najväčšie zastúpenie má na bruchu, zadku a proximálnej časti stehien, a naopak nemusí sa vôbec nachádzať na očných viečkach.³

5.2.2 Dermis

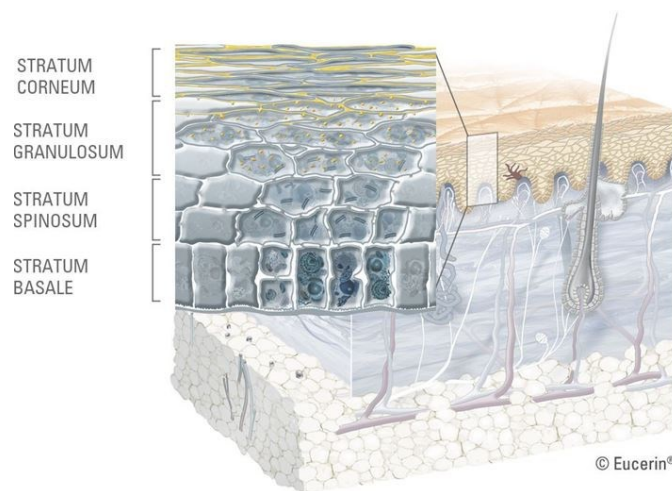
Dermis (lat. *corium*, zamša) je stredná vrstva kože o hrúbke 0,6 – 3 mm. Je tvorená prevažne kolagénovými a elastickými vláknami, vďaka ktorým zamša disponuje požadovanou pružnosťou a pevnosťou. Je to oblasť, kde je bohato rozvetvené krvné a lymfatické riečisko,

čoho sa využíva aj pri (trans)dermálnej aplikácii liečiv. Nachádza sa tu aj bohato vetvená nervová sieť, vlasové folikuly a potné a mazové žľazy.⁴

5.2.3 Epidermis

Epidermis (pokožka) je najvrchnejšia vrstva kože, ktorá prichádza do styku s vonkajším prostredím. Je tvorená bunkami viacvrstvového rohovatejúceho dlaždicového epitelu, keratinocytmi. Okrem nich sa tam nachádzajú aj iné bunky, napr. melanocyty (pigmentácia), Langerhansove (imunitná funkcia) a Merkelove bunky (zmyslová funkcia).⁴

Epidermis sa anatomicky delí na ďalších 4–5 vrstiev (**Obrázok 1**). Odsopdu smerom k povrchu tela sú to *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a *stratum corneum*.^{3,4}



Obrázok 1. Anatomické členenie epidermis cicavcov – *stratum corneum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* a *stratum basale*.⁵

Najhlbšou vrstvou *epidermis* je **stratum basale** (bazálna vrstva), ktorá je tvorená z jednej rady palisádovito radených cylindrických keratinocytov. Niekoľko radov keratinocytov nad bazálnou vrstvou tvorí ďalšiu vrstvu, **stratum spinosum** (trnitá vrstva). Jej bunky spravidla majú väčší objem než keratinocyty, pričom smerom k povrchu sa postupne oplošťujú. Bunky v spodnej časti tejto vrstvy majú, podobne ako bunky bazálnej vrstvy, schopnosť deliť sa. V hornej časti tejto vrstvy sa v keratinocytoch začína proces diferenciácie, teda proces premeny keratinocytov na výsledný kožný produkt **keratín** (tj. keratinocyty sú tvorené prakticky len keratínom). Nad vyššie spomínanými vrstvami sa nachádza **stratum granulosum** (zrnitá vrstva) a **stratum lucidum** známa ako vrstva jasných buniek. Nachádzajú sa tu

tzv. tranzitné keratinocyty, ktoré strácajú jadro aj všetky organely, a zároveň sa keratohyalinové granule menia na keratín.⁴

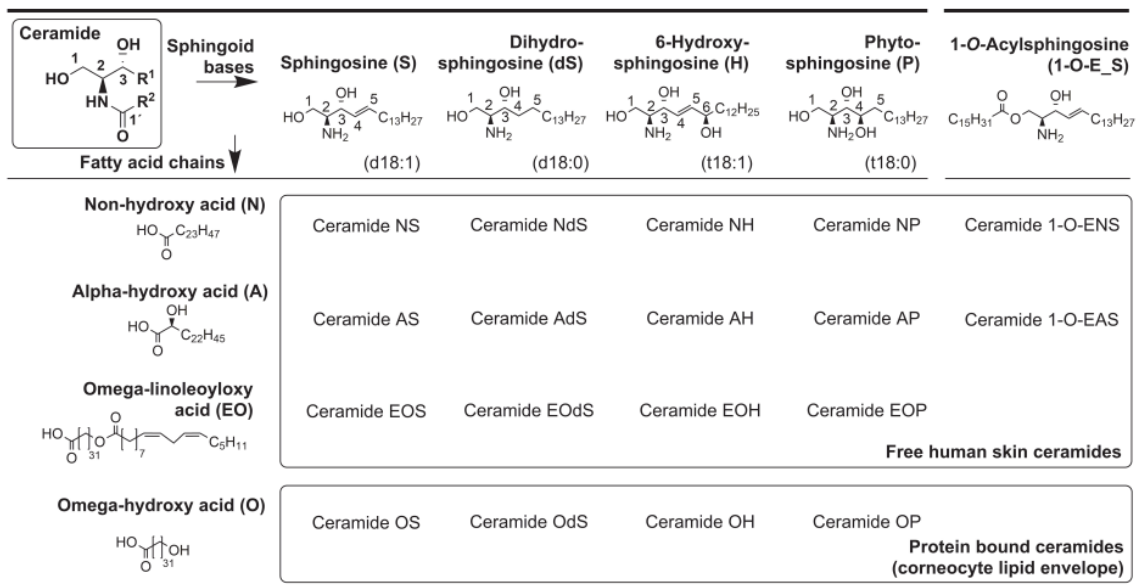
5.2.3.1 *Stratum corneum*

Stratum corneum (rohová vrstva; **Obrázok 1**), najvrchnejšia vrstva *epidermis*, je už tvorená keratinocytmi (tzv. **korneocytmi**), ktoré nemajú jadro a sú ploché a zrohovatené. Bežne sú zoradené v 15–20 vrstvách; sú však miesta na tele, kde vrstiev môže byť výrazne viac, napr. koža na chodidle môže mať aj 100 vrstiev korneocytov.⁴ Priestory medzi korneocytmi sú vyplnené lipidovou hmotou, zvanou taktiež **intercelulárna lipidová matrix**. Táto lipidová matrix, tvoriaca lamely, obsahuje VMK o rôznej dĺžke, ďalej Chol a Cer v približne ekvimolárnom množstve, tj. v pomere 1:1:1 (mol). Z ďalších látok sú to estery Chol alebo tiež cholesterol-sulfát (CholS), ktorý tvorí približne 5 % (m/m) hmotnosti lipidovej matrix.^{2,6}

Rohová vrstva *epidermis* je považovaná za kožnú bariéru a lipidová matrix má v nej neodmysliteľnú úlohu. Predovšetkým chráni telo pred nadmernou **stratou vody**.¹ Jej prítomnosť je teda nevyhnutná pre život cicavcov na súši. Extracelulárna lipidová matrix taktiež chráni telo pred prienikom nežiadúcich cudzorodých látok a podieľa sa tak na udržaní stálosti vnútorného prostredia (**homeostáze**).^{1,3,4}

5.3 *Ceramidy v stratum corneum*

Cer sú dominantné lipidy v intercelulárnej lipidovej matrix, kde sú zastúpené v množstve až 50 % (m/m). Tieto sfingolipidy majú relatívne malú polárnu hlavu a 2 hydrofóbne reťazce. Jeden reťazec patrí sfingoidnej báze a druhý acylu VMK, ktorý je naviazaný na sfingoidnú bázu amidovou väzbou. Zatiaľ bolo popísaných 15 základných rôznych štruktúrnych druhov Cer, ktoré sa vyskytujú buď v tzv. **voľnej podobe** alebo sú **kovalentne viazané** na glutamátové zvyšky korneocytov (**Obrázok 2**).¹

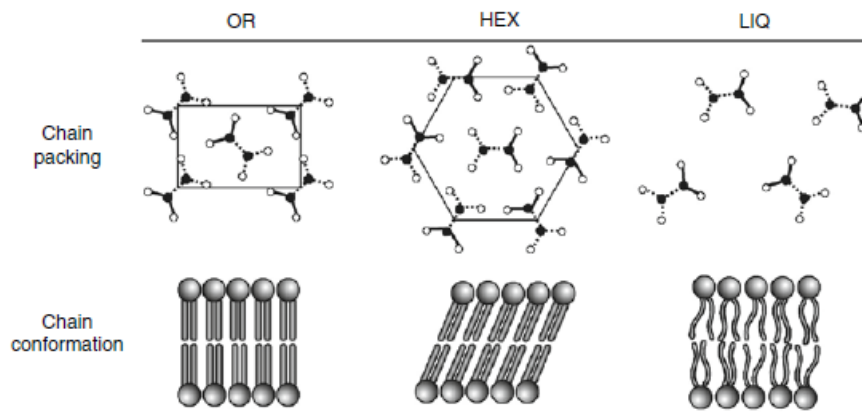


Obrázok 2. Názvoslovie kožných Cer podľa Motty et al.¹

Molekuly Cer sa skladajú zo sfingoidnej bázy, ktorou je zvyčajne 18-uhlíkatý aminoalkohol sfingozín (S), dihydrosfingozín (dS), fytosfingozín (P) alebo 6-hydroxysfingozín (H). Primárna aminoskupina sfingoidnej bázy je N-acylovaná VMK, ktorá je spravidla nasýtená a nerozvetvená. Acyly mastných kyselín sa podľa dĺžky reťazcov klasifikujú ako **dlhé** (približne 20–24 uhlíkov) a **ultradhé** (až do 38 uhlíkov). VMK môžu byť ďalej bez substitúcie (N), α-hydroxylované (A) alebo ω-hydroxylované (O), ktoré sú typické pre Cer s ultradlhým reťazcom. Na tento ω-hydroxyl môže byť ďalej viazaná linolénová (EO), prípadne sa môžu kovalentne viazať na glutamátové zvyšky proteínov (tzv. kovalentne viazané Cer alebo tiež Cer typu O). Na základe kombinácie sfingoidnej bázy a acylu VMK bolo vytvorené názvoslovie Cer podľa Motty a kol.⁷, ktoré je uvedené v **Obrázku 2**.

5.4 Laterálna organizácia lipidov v *stratum corneum*

Laterálna organizácia lipidov znamená usporiadanie kožných lipidov v lamelách SC, čo je kritické a má vplyv na bariérovú funkciu kože. Celkovo poznáme tri fyziologické typy (tzv. kryštalické mriežky; **Obrázok 3**) usporiadania lipidov v SC.^{8,9}

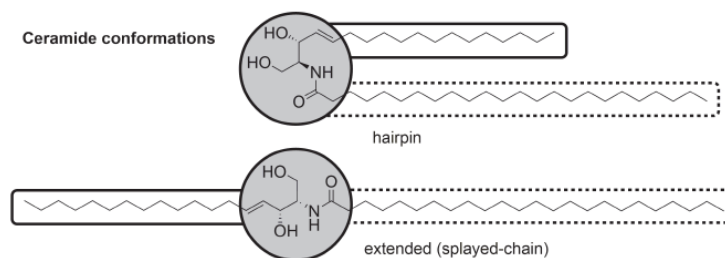


Obrázok 3. Usporiadanie (hore) a konformácia lipidov SC (dole).⁹ Skratky: OR – orthorhombická kryštalická mriežka (fáza), HEX – hexagonálna kryštalická mriežka (fáza), LIQ – kvapalno-kryštalická fáza.

Pre bariérovú funkciu kože je najdôležitejšie usporiadanie lipidov do tzv. **orthorhombickej kryštalickej mriežky (Obrázok 3)**, ktorá v zdravej ľudskej koži prevažuje najviac. V tomto type usporiadania sú lipidy naukladané veľmi tesne vedľa seba a sú pre ňu typické tzv. *all-trans* konforméry lipidov. *All-trans* usporiadanie odpovedá antiperiplanárnej konformácii, čo umožňuje už spomínané tesné usporiadanie, pri ktorom nie je možná mobilita reťazcov. Pre tento typ usporiadania sú zakázané akékoľvek laterálne pohyby (napr. difúzia). Druhým typom usporiadania lipidov je **hexagonálna kryštalická mriežka**, pre ktorú je typické menej tesné usporiadanie lipidov, spôsobené hlavne narastajúcim počtom voľnejšie usporiadaných *gauche* konformérov. V *gauche* konforméroch, na rozdiel od *all-trans* konformérov, je typická synklinálna konformácia. Toto usporiadanie umožňuje čiastočnú mobilitu reťazcov. Tretím typom usporiadania je **kvapalno-kryštalická fáza**, v ktorej sa nachádzajú len *gauche* konforméry. Toto minoritné usporiadanie lipidov umožňuje úplnú mobilitu reťazcov, čo pravdepodobne dodáva lipidovej matrix patričnú elasticitu.⁹

5.4.1 Konformácie ceramidov

Cer môžu v SC teoreticky zaujímať dve rozličné konformácie. Sú to tzv. otvorená (angl. *hairpin conformation*) a uzatvorená (angl. *extended conformation*) konformácia (**Obrázok 4**), pričom obe sú teoreticky možné. V **uzatvorenej konformácii** uhľovodíkové reťazce smerujú rovnakým, pričom v **otvorenej konformácii** smerujú uhľovodíkové reťazce opačným smerom.¹



Obrázok 4. Uzatvorená (angl. *hairpin*) a otvorená (angl. *extended*) konformácia kožných Cer.¹

5.5 Ochorenia spojené s poruchou bariérovej funkcie kože

Pri skúmaní patofyziológie kožných ochorení bolo zistené, že pri niektorých z nich dochádza k narušeniu pomeru lipidov v SC. Pri ochoreniach ako napr. **psoriáza** a **atopická dermatitída** dochádza k zmene v expresii enzýmov, ktoré zabezpečujú vznik alebo degradáciu Cer, výsledkom čoho je narušená bariérová funkcia SC, čo spôsobuje nadmernú transepidermálnu stratu vody (angl. *transepidermal water loss*, TEWL). Atopická dermatitída sa vyznačuje oblasťami suchej svrbivej kože, ktorú si pacient navyše mechanicky poškodzuje. Bolo preukázané, že pri tejto chorobe sú výrazne znížené hladiny Cer, a to predovšetkým, ultradlhých Cer (napr. Cer EOS). Taktiež boli zistené iné neobvyklé druhy Cer, ktoré majú potenciál pri diagnostike tohto ochorenia. Pri psoriáze môže byť zvýšená hladina TEWL až 20-násobne.^{10, 11}

Niektoré z týchto kožných ochorení môžu byť taktiež geneticky podmienené. Je to napríklad Gaucherova choroba (II. typ), Niemann-Pickova choroba (typ A a B) a Faberova choroba. Jedným z možných prístupov v terapii kožných onemocnení je topické podávanie kožných Cer alebo zmesi voľných VMK, Chol a Cer, čo imituje intercelulárne lipidy v SC.¹⁰

5.6 Hodnotenie lipidov pomocou infračervenej spektroskopie

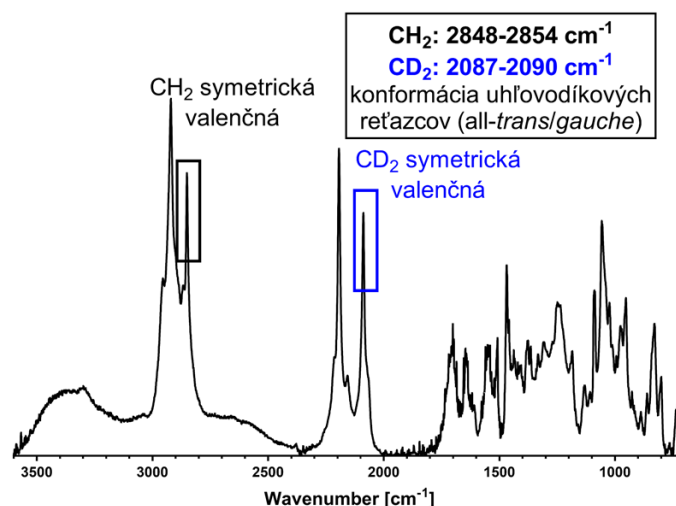
Infračervená spektroskopia (IČ) je jedna z metód, ktorá sa štandardne používa pri hodnotení mikroštruktúry kožných lipidov SC. Jej podstata spočíva v absorpcii infračerveného žiarenia molekulami lipidov, čo vyvoláva zmeny vo vibračno-rotáčnom stave molekúl. Výsledkom merania IČ je **spektrum**. Toto je graficky vyjadrená závislosť **transmitancie** (T [%]) alebo **absorbancie** (záporný dekadický logaritmus transmitancie) na **vlnočte** (prevrátená hodnota vlnovej dĺžky, cm^{-1}). Absorpcia IČ žiarenia zodpovedá najčastejšie zmenám vibrácii prítomných väzieb a funkčných skupín v molekule. Vtedy ide o tzv. **valenčné vibrácie** (**Obrázok 5**, vľavo). Ďalej môže dochádzať k zmenám valenčných uhlov. Vtedy hovoríme

o tzv. **deformačných vibráciách** (Obrázok 5, v strede a vpravo). Platí, že jednotlivé funkčné skupiny a väzby majú spravidla charakteristické vibrácie vždy v určitom intervale vlnočtu.¹²



Obrázok 5. Symetrická valenčná (angl. *symmetric stretching*; vľavo), nožnicová (angl. *scissoring*; uprostred) deformačná a kývavá deformačná (angl. *rocking*; vpravo) vibrácia.

Pri štúdií sfingolipidov sa často využíva **izotopová substitúcia**. Pri tejto substitúcii sú atómy vodíku nahradené ich ťažšími izotopmi, pri čom najviac používaný izotop je **²H (deutérium)**, pretože pri práci s deutériom nie sú potrebné špeciálne bezpečnostné opatrenia. Silové polia ľahkého a ťažkého vodíka sú približne rovnaké a zároveň platí, že protonované a deuterované reťazce kmitajú pri rôznych vlnočtoch^{13,14} (Obrázok 6 a 7). Z toho vyplýva, že je možné zároveň pozorovať nezávisle na sebe správanie protonovaných a deuterovaných reťazcov. CH₂ a CD₂ symetrické valenčné vibrácie (Obrázok 6) vypovedajú o usporiadaní reťazcov lipidov (*all-trans* vs. *gauche* konformácia). S narastajúcim vlnočtom klesá organizovanosť reťazcov. Ak majú CH₂ symetrické valenčné vibrácie svoje maximum **pod 2850 cm⁻¹** (reťazce CD₂ **pod 2090 cm⁻¹**), môžeme tvrdiť, že reťazce sú veľmi dobre usporiadané, teda sú v *all-trans* konformácii. Naopak, ak majú tieto vibrácie svoje maximum nad tieto hodnoty, reťazce sú usporiadané už horšie, zvyšuje sa počet menej usporiadaných *gauche* konformérov. Vyššie hodnoty vlnočtov a rozšírenie vibračného pásu ďalej značia vysoko neusporiadaný systém (reťazce sú prevážne v *gauche* konformácii).^{13,15}

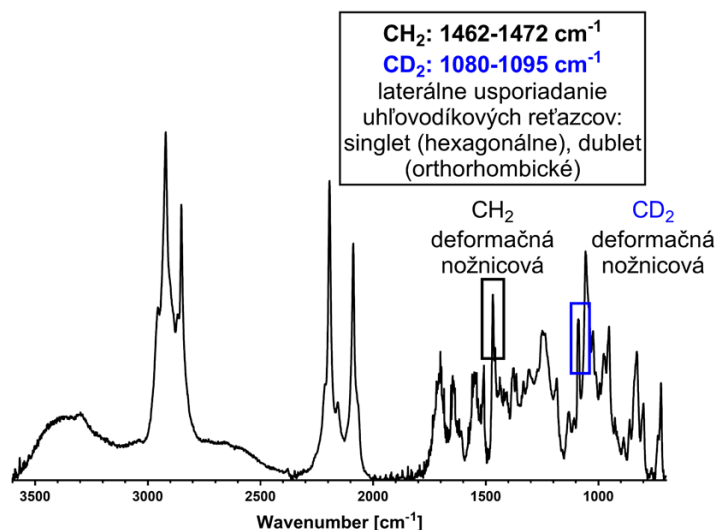


Obrázok 6. Vzorové IČ spektrum modelu kožnej bariéry (Cer/FFA/Chol/CholS) pri fyziologickej teplote kože (32 °C). Na obrázku sú zvýraznené CH₂ (čierna) a CD₂ (modrá) symetrické valenčné vibrácie, dôležité pre určenie konformácie (all-trans/gauche) uhľovodíkových reťazcov.

Vibračné spektrum nožnicových CH₂/CD₂ deformačných vibrácií (**Obrázok 7**) vypovedá o laterálnom usporiadaní kožných lipidov. V prípade že je pri CH₂ a CD₂ deformačnej nožnicovej vibrácii pás rozštiepený na tzv. **dublet**, toto značí veľmi tesné usporiadanie metylénových reťazcov lipidov (**orthorhombická** kryštalická mriežka). Dublet vzniká v dôsledku vibračného kaplingu medzi rovnakými izotopmi vodíku, ktoré sa nachádzajú veľmi tesne vedľa seba. V prípade, že sa v spektre pás zobrazí ako tzv. **singlet**, ide o menej tesné usporiadanie, teda o hexagonálnu kryštalickú mriežku.^{15, 16}

Pomocou tejto deformačnej nožnicovej vibrácie je možné sledovať aj **miešateľnosť lipidov**. Ak by sa v IČ spektre študovanej zmesi CerNS/LIG/Chol/CholS nachádzal v oblasti nožnicovej vibrácie **dublet** (tj. v dôsledku vibračného kaplingu medzi rovnakými izotopmi vodíku ¹H–¹H došlo k rozštiepeniu pásu), značí to prítomnosti tesného usporiadania, tj. orthorhombickej kryštalickej mriežky. Z takejto zmesi avšak nie je možné zistiť, či sa metylénové reťazce vzájomne miešajú alebo separujú. K objasneniu tejto skutočnosti sa používajú **deutériom** značené lipidy. Ak by sme v IČ spektre **značenej** zmesi CerNS/**d**-LIG/Chol/CholS pozorovali v protonovanej aj deuterovanej oblasti metylénovej nožnicovej vibrácie **singlety**, znamená to **dobrú miešateľnosť** lipidov; v tomto prípade nedochádza k vibračnému kaplingu izotopov rovnakého prvku (¹H vs. ²H); dublet orthorhombickej kryštalickej mriežky z neznačenej zmesi je teda prakticky tvorený dvomi singletmi. V prípade, že by sa v spektre **značenej** zmesi objavili **dublety**, toto znamená, že

lipidy sú navzájom už horšie zmiešané (tj. dochádza k vibračnému kaplingu medzi izotopmi toho istého prvku, ^1H – ^1H a zároveň ^2H – ^2H), pretože určité zložky zmesi sa začínajú separovať a tvoria samostatné domény.^{15, 17}



Obrázok 7. Vzorové IČ spektrum modelu kožnej bariéry pri fyziologickej teplote kože 32 °C. Na obrázku sú zvýraznené CH₂ a CD₂ nožnicové deformačné vibrácie, dôležité pre určenie laterálneho usporiadania uhľovodíkových reťazcov.

O laterálnom usporiadaní lipidov vypovedá aj metylénová **deformačná kývavá vibrácia** (**Obrázok 5**, vpravo), ktorá má svoje maximum v intervale vlnočtu okolo 715–730 cm⁻¹. Konsekvencie z hodnotenia tejto vibrácie sú veľmi podobné ako u nožnicovej metylénovej vibrácie.¹⁶

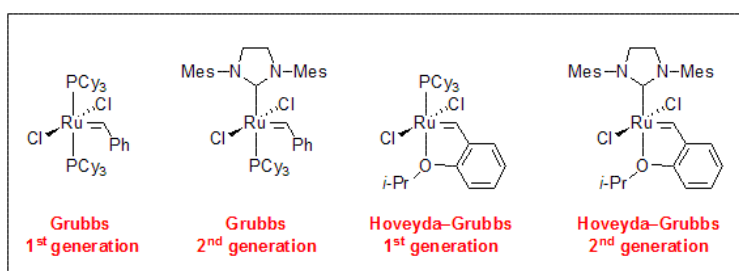
K objasneniu správania lipidov ďalej slúžia vibrácie, ktoré popisujú interakcie v oblasti polárnej hlavy Cer a VMK. K týmto vibráciám patria **valenčné vibrácie karbonylu karboxylovej** (1710–1690 cm⁻¹) a **amidovej skupiny**, ktorá je označovaná ako amid I (1690–1610 cm⁻¹).¹⁸⁻²⁰ Vibrácia karbonylu v nižších oblastiach vlnočtu vypovedá o zapojení skupiny do vodíkových väzieb. Oslabenie vodíkových väzieb sa teda prejaví zvýšením vlnočtu. Rovnako je to u vibrácie amid I, ktorej pokles vlnočtu taktiež naznačuje zapojenie skupiny do vodíkových väzieb. Opačne je to však pri vibrácii nazývanej amid II (1560–1510 cm⁻¹), ktorá je výsledkom valenčných C–H a deformačných N–H vibrácií. Pokles vlnočtu tejto vibrácie teda naznačuje oslabenie vodíkových interakcií.^{13, 21-23}

5.7 Grubbsova metatéza

Grubbsova metatéza (GM), nazývaná často aj metatéza olefínov, je reakcia, kde za prítomnosti katalyzátora reagujú dve molekuly alkénu. Samotný názov pochádza z gréčtiny zo slov *meta* (zmena) a *thitemi* (miesto). Dvojitá väzba sa pri tom rozštiepi a následne vznikne nová väzba C=C, zmení teda „svoje miesto“. Je to jeden z najvýznamnejších objavov v organickej chémii od druhej svetovej vojny a v roku z 2005 bola za jej objavenie a objasnenie mechanizmu udelená Nobelova cena trojici Grubbs, Chauvin a Schrock. Táto reakcia, ktorá existuje vo viacerých modifikáciách je katalyzovaná pomocou tzv. **Grubbsových katalyzátorov**.²⁴

5.7.1 Katalyzátory používané pri Grubbsovej metatéze

Historicky bolo pripravených mnoho katalyzátorov na báze ruténia, molybdénu, wolfrámu a titánu. Profesor Grubbs a jeho kolegovia sa zaoberali vývojom ruténiových katalyzátorov, ktoré sa osvedčili najviac a v praxi sú aj najviac používané vďaka ich lepšej schopnosti reaktivovať dvojitú väzbu. **Prvá generácia** Grubbsovho katalyzátora, ktorý mal dva fosfínové ligandy (**Obrázok 8**), bola používaná vďaka dobrej tolerancii rôznych funkčných skupín a vďaka dobrej stabilite. Pre zvýšenie aktivity katalyzátora zamenil Grubbs jeden z fosfínových ligandov za *N*-heterocyklický karbén, čím vznikla **druhá generácia** katalyzátora (**Obrázok 5**). Za zmienku stojí **tretia generácia** katalyzátorov, ktoré vznikli zamenením jedného fosfínového ligandu za labilnejší pyridinový ligand, vďaka ktorému sa výrazne zvýšila aktivita katalyzátora.²⁴⁻²⁷



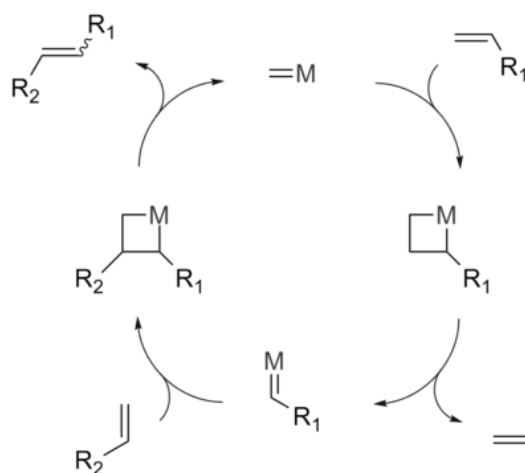
Obrázok 8. Zľava môžeme vidieť prvú generáciu Grubbsovho katalyzátora s charakteristickými fosfínovými ligandmi a jedným styrenovým ligandom. Ďalej nasleduje druhá generácia Grubbsovho katalyzátora, kde bol jeden fosfínový ligand vymenený za karbénový derivát. Ďalej dve generácie Hoveyda-Grubbsovho katalyzátora s ich charakteristickým izopropoxystyrenovým fragmentom. V prvej generácii sa nachádza fosfínový ligand, pričom

v druhej generácii bol vymenený za karbénový derivát. PCy_3 , tricyklohexylfosfín; Mes, mesitylén = 1,3,5-trimethylbenzen; *i*-Pr, izopropyl.^{24, 27}

Výskumná skupina profesora Hoveyda vyvinula tzv. **Grubbs-Hoveyda katalyzátory**. Ich typickým znakom je izopropoxystyrénový fragment, ktorý tvorí chelát s ruténium. Celkovo boli vyvinuté dve generácie týchto katalyzátorov (**Obrázok 8**). Oproti Grubbsovým fosfinovým katalyzátorom vykazujú väčšiu odolnosť proti vlhkosti, kyslíku a teplu, na úkor zhoršenej inicializácie.^{24, 27}

5.7.2 Mechanizmus Grubbsovej metatézy

V roku 1971 Hérisson a Chauvin uviedli mechanizmus GM, ktorý je dnes všeobecne akceptovaný. Zjednodušene pozostáva zo štyroch základných krokov. Prvým krokom je **koordinácia** alkénu do centra alkylidénového/karbénového komplexu. Tento krok je zvaný aj ako inicializácia. Druhým krokom je tzv. **[2+2] cykloadícia**, pri ktorej vzniká metallacyklobutánový intermediát. Tretím krokom je **cykloreverzia** a štvrtým **dekoordinácia** alkénu z metallakarbonového kruhu. Proces iniciácie a stabilita metallakarbonového intermediátu sú závislé od ligandov katalyzátora.^{24, 28} Popísaný mechanizmus prehľadne charakterizuje **Obrázok 9**.



Obrázok 9. Mechanizmus Grubbsovej metatézy – alkén s reťazcom R_1 reaguje cykloadíciou s katalyzátorom, ktorý obsahuje dvojitú väzbu, za vzniku metallakarbénového intermediátu. Tento intermediát sa rozpadne za vzniku nového alkénu (voľný ligand z katalyzátora, najčastejšie styrén). Komplex katalyzátora s reťazcom R_1 reaguje s alkénom, ktorý obsahuje R_2 . Aj tentokrát vzniká metallakarbénový intermediát, ktorý sa následne rozpadáva za vzniku želaného produktu.

6 Experimentálna časť

6.1 Chemická časť

6.1.1 Chemikálie a prístroje

Všetky chemikálie a rozpúšťadlá boli zakúpené od firiem Sigma-Aldrich a PENTA. Kyselina lignocerová- d_{47} a pentadekan-1-ol- d_{31} boli zakúpené od firmy C/D/N isotopes (Pointe-Claire, Kanada). Mikro-reaktory boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich. Pre stĺpcovú chromatografiu bol použitý Silikagel 60 (230–400). Priebeh reakcií a čistota produktov bola kontrolovaná pomocou tenkovrstvej chromatografie na hliníkových TLC doskách Silica gel 60 F254, ktoré boli zakúpené od firmy Merck (Darmstadt, Nemecko). K detekcii bola použitá UV lampa pri vlnovej dĺžke 254 nm a vypaľovacia detekčná zmes obsahujúca $Ce(SO_4)_2$, $H_3[P(Mo_3O_{10})_4]$, koncentrovanú kyselinu sírovú a vodu. Teploty topenia pevných látok boli merané pomocou Koflerovho bloku. 1H NMR a ^{13}C NMR spektrá všetkých látok boli zmerané v roztokoch $CDCl_3$ (+ MeOD) prístrojom VARIAN VNMR S500, Palo Alto, USA (500 MHz pre 1H NMR a 125 MHz pre ^{13}C NMR). Meranie IČ spektier bolo robené na prístroji NICOLET 6700 FT-IR vybavenom ATR sondou. Meranie hmotnostnej spektrometrie bolo robené prístrojom LCQ Max advantage, Thermo Finnigan, Thermo Finnigan, San Jose, USA.

6.1.2 Syntéza

Cieľom tejto syntetickej časti práce bolo pripraviť sfingozín s deuterovaným uhlíkovým reťazcom (***d*-sfingozín**), Cer s deuterovaným sfingozínovým reťazcom ***d*-CerNS** a Cer s deuterovaným sfingozínovým reťazcom a deuterovaným acylom ***dd*-CerNS**. Samotnú prípravu možno rozdeliť do štyroch fáz (**Schéma 1**).

V prvej fáze syntézy bol pripravený pentadec-1-én- d_{30} z komerčne dostupného pentadekan-1-olu- d_{31} (**1**). Pri príprave sa využil princíp Griecovej eliminácie, pri ktorej alkohol (**1**) reagoval s 2-nitrofenylselenokyanátom v prítomnosti tributylfosfínu a vzniknutý (2-nitrofenyl)(pentadecyl)selan- d_{31} (**2**) sa oxidoval peroxidom vodíku za vzniku terminálneho alkénu (**3**). Druhú fázu syntézy predstavuje vinylácia (*S*)-Garnerovho aldehydu (**3**) pomocou vinylmagnesium-bromidu za vzniku intermediátu (**5**).

V tretej fáze sa pomocou Grubbsovej metatézy spojil pentadekan-1-ol- d_{30} (**3**) s látkou (**5**) za vzniku chráneného deuterovaného sfingozínu (**6**). V štvrtej fáze boli u deuterovaného sfingozínu s chrániacimi skupinami (**6**) odstránené chrániace skupiny (kyslá hydrolyza)

a vzniknutý **d-sfingozín** bol acylovaný LIG za vzniku **d-CerNS** a **d-LIG** za vzniku **dd-CerNS** (Schéma 1).

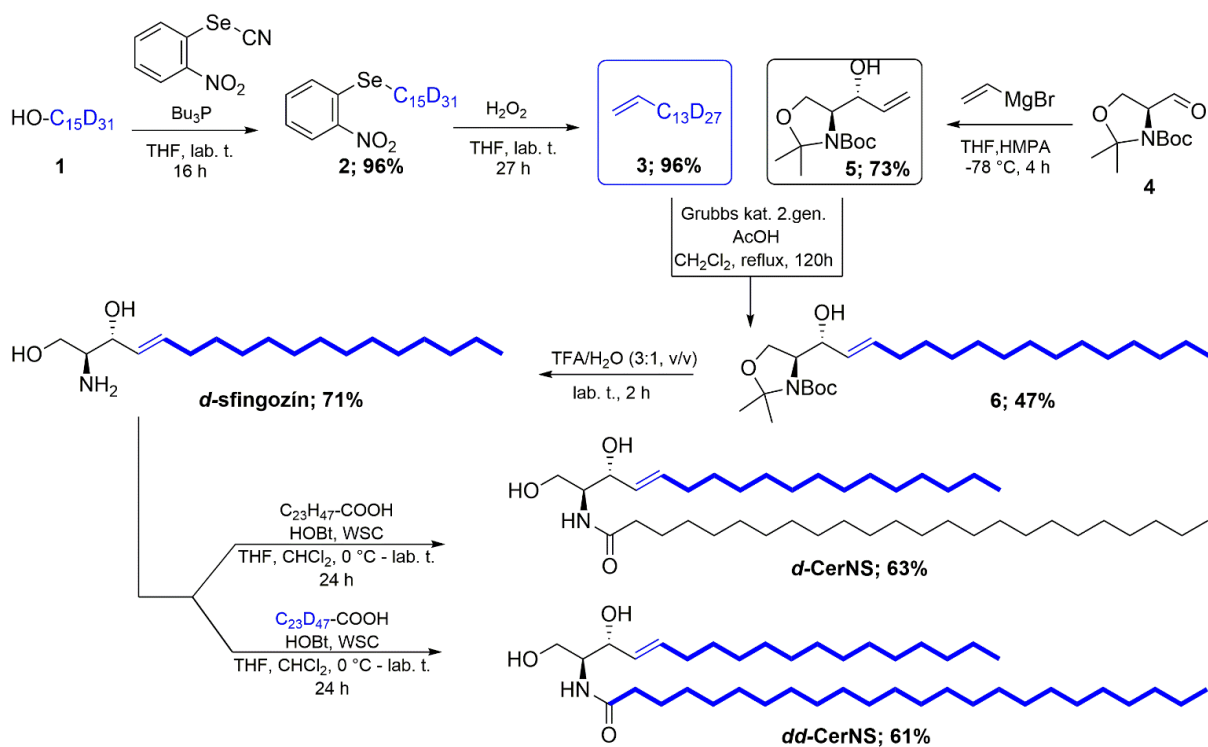
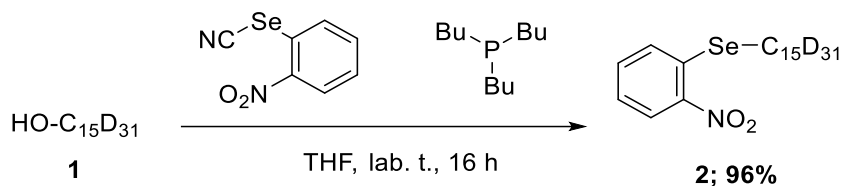


Schéma 1. Schéma syntézy deuterovaného sfingozínu (**d-sfingozín**) a Cer s protonovaným (**d-CerNS**) a deuterovaným acylom (**dd-CerNS**) odvodeným od LIG (C24).

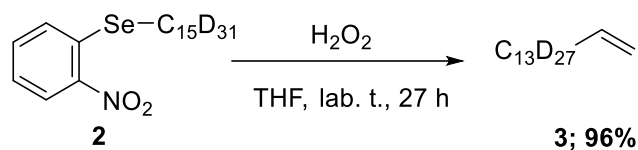
6.1.3 Príprava (2-nitrofenyl)(pentadecyl)selanu- d_{31} (**2**)



199 mg (0,77 mmol) pentadekan-1-olu- d_{31} (**1**) a 262 mg (1,15 mmol) 2-nitrofenylselenokyanátu bolo pod atmosférou argónu rozpustené v bezvodom THF (10 ml). Následne bolo injekčnou striekačkou prikvapnuté definované množstvo (0,3 ml, 1,15 mmol) tributylfosfínu. O 4 hodiny neskôr bolo urobené TLC, kde stále bolo vidno škvrnu zodpovedajúcu reaktantu ($R_f = 0,20$; hexán/dietyléter, 3:1) (**1**), preto sa reakčná zmes následne nechala ďalej miešať cez noc za laboratórnej teploty. Po 12 hodinách neustáleho miešania bolo urobené TLC reakčnej zmesi; intenzita škvry reaktantu bola výrazne nižšia; najzreteľnejšia bola škvrna vznikajúceho produktu (**2**) ($R_f = 0,71$; hexán/dietyléter, 3:1). Reakčná zmes bola zahustená na vákuovej odparke a prečistená pomocou stĺpcovej chromatografie (mobilná fáza hexán/dietyléter, 10:1). Celkovo bolo izolovaných 421,1 mg čistého produktu (**2**), výťažok reakcie bol 96 %.

(2-nitrofenyl)(pentadecyl)selan- d_{31} (2**).** Žltá kryštalická látka, molárna hmotnosť: 443,67 g/mol, **TLC:** $R_f = 0,71$ (hexán/dietyléter, 3:1), teplota topenia: 53–56 °C. **$^1\text{H NMR}$** (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.32 - 8.27$ (m, 1H), 7.57 – 7.46 (m, 2H), 7.35 – 7.29 (m, 1H) ppm. **$^{13}\text{C NMR}$** (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 146.89, 133.98, 133.42, 129.06, 126.46, 125.17, 28.33$ ppm. **IR (ATR):** ν_{max} 2192, 2089, 1509, 1333, 1308, 1099, 721 cm^{-1} .

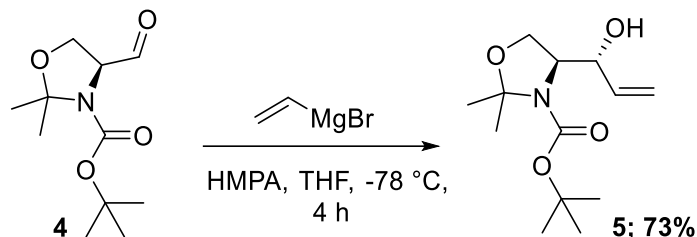
6.1.4 Príprava pentadec-1-énu- d_{30} (**3**)



511,5 mg (1,153 mmol) organického derivátu selanu (**2**) bolo rozpustených v THF (15,6 ml) a do reakčnej zmesi bolo následne pridaných 0,33 ml 50% H_2O_2 (11,529 mmol). Po 20 hodinách miešania reakčnej zmesi za laboratórnej teploty bolo urobené TLC (mobilná fáza hexán; $R_f = 0,96$), kde sa už reaktant nachádzal v malom množstve. O 7 hodín sa reakcia ukončila pridaním vody (20 ml) a reakčná zmes bola extrahovaná do hexánu (5×30 ml). Organická fáza bola premytá 20 ml 10% NaHCO_3 , vysušená Na_2SO_4 , prefiltrovaná cez vatú a zahustená na vákuovej odparke. Po prečistení pomocou stĺpcovej chromatografie (mobilná fáza: hexán) bolo získaných 0,27 mg pentadec-1-enu- d_{30} (**3**), výťažok reakcie bol 96 %.

Pentadec-1-én- d_{30} (3**).** Bezfarebná kvapalina, molárna hmotnosť: 237,57 g/mol, **TLC:** $R_f = 0,96$ (hexán). **^{13}C NMR** (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 113.94, 31.60, 29.72, 28.36, 28.20, 28.04, 22.66, 14.11$ ppm. **IR (ATR):** ν_{max} 2194, 2091, 1090, 711 cm^{-1} .

6.1.5 Příprava (*S*)-*tert*-butyl-4-((*R*)-1-hydroxyallyl)-2,2-dimetyloxazolidín-3-karboxylátu (**5**)

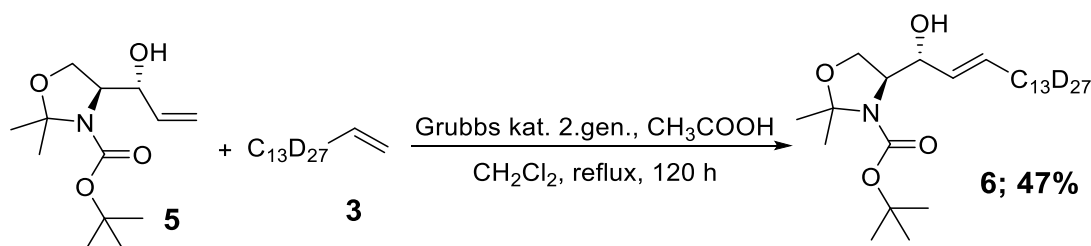


444 mg (1,937 mmol) (*S*)-Garnerovho aldehydu (**4**) bolo rozpustených v suchom THF (4 ml) a reakčná zmes bola pod atmosférou argónu ochladená na $-78\text{ }^\circ\text{C}$. Pomaly bol do reakčnej zmesi prikvapnutý 1M roztok vinylmagnesium-bromidu v THF (3,5 ml, 3,490 mmol) a HMPA (0,46 ml, 2,617 mmol). Po dvoch hodinách miešania pri tejto teplote bolo urobené TLC, ktoré potvrdilo vznikajúci produkt (**5**) (mobilná fáza: hexán/etyl-acetát, 3:1, $R_f = 0,34$). Do reakčnej zmesi bol pridaný ešte 1 ekvivalent vinylmagnesium-bromidu a po 1 hodine miešania pri rovnakej teplote bolo chladenie vypnuté. Po ohriatí na laboratórnu teplotu bola reakcia ukončená prikvapnutím nasýteného roztoku chloridu amónneho (15 ml) a päťkrát extrahovaná do 20 ml dietyléteru. Éterové frakcie boli vysušené síranom sodným, prefiltrované cez vatú a zahustené na vákuovej odparke. Po prečistení na stĺpcovej chromatografii (hexán:etyl-acetát, 5:1) bolo izolovaných 328,3 mg produktu (**5**). Výťažok reakcie bol 73 %.

(*S*)-*tert*-butyl-4-((*R*)-1-hydroxyallyl)-2,2-dimetyloxazolidín-3-karboxylát (**5**).

Bezfarebný olej, molárna hmotnosť: 257,33 g/mol, **TLC**: $R_f = 0,34$ (hexán/etyl-acetát, 3:1). **$^1\text{H NMR}$** (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.95 - 5.76$ (m, 1H), $5.43 - 5.31$ (m, 1H), $5.27 - 5.16$ (m, 1H), $4.43 - 4.24$ (m, 1H), $4.22 - 4.12$ (m, 1H), $4.08 - 3.98$ (m, 1H), $3.95 - 3.78$ (m, 1H), 1.55 (s, 3H), $1.52 - 1.43$ (m, 12H) ppm. **$^{13}\text{C NMR}$** (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 136.66, 116.20, 94.50, 81.14, 74.25, 64.72, 62.05, 28.33, 26.45, 24.47$ ppm. **IR (ATR)**: ν_{max} 2979, 1697, 1682, 1392, 1366, 1173, 1097, 848 cm^{-1} .

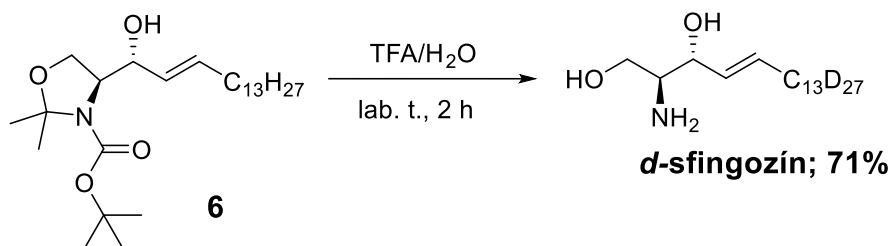
6.1.6 Príprava (*S*)-*tert*-butyl 4-((*R,E*)-1-hydroxyhexadec-2-en-1-yl)-2,2-dimetyloxazolidín-3-karboxylátu-*d*₂₈ (**6**)



31,4 mg (0,131 mmol) pentadec-1-enu-*d*₃₀ (**3**), 35,4 mg (0,138 mmol) intermediátu (**5**) a 11,2 mg (0,013 mmol) Grubbsovho katalyzátora 2. generácie boli pod atmosférou argónu rozpustené v suchom CH₂Cl₂. Potom bolo do reakčnej zmesi pridaných 2,25 μl (0,039 mmol) bezvodovej kyseliny octovej. Reakcia prebiehala v mikroreaktore s tesným uzáverom septa tak, aby nedošlo k odpareniu rozpúšťadla a porušeniu bezvodých podmienok. Mikro-reaktor bol vložený do kovového kúpeľa a reakcia prebiehala za stáleho miešania pri 40 °C 120 hodín. Zmes bola monitorovaná pomocou TLC s mobilnou fázou hexán/etyl-acetát (3:1), potom bola odparená na vákuovej odparke a chromatograficky prečistená na silikagéle (mobilná fáza: hexán/etyl-acetát, 9:1). Získané bolo 50 mg látky (**6**) a výťažok reakcie bol 47 %.

(S)-*tert*-butyl-4-((R,E)-1-hydroxyhexadec-2-en-1-yl)-2,2-dimetyloxazolidín-3-karboxylát-*d*₂₈ (6**).** Bezfarebný olej, molárna hmotnosť: 467,85 g/mol, **TLC:** *R*_f = 0,50 (hexán/etyl-acetát, 3:1). **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.44 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.26 – 4.08 (m, 2H), 4.06 – 3.93 (m, 1H), 3.91 – 3.73 (m, 1H), 1.66 – 1.32 (m, 12H) ppm. **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ = 154.16, 133.37, 128.03, 94.42, 81.01, 74.01, 64.91, 64.16, 62.30, 31.28, 29.69, 28.74, 28.36, 28.30, 28.02, 26.25, 25.34, 24.64, 23.71, 22.80, 16.56 ppm. **IR (ATR):** ν_{max} 2197, 2095, 1698, 1391, 1089, 759 cm⁻¹.

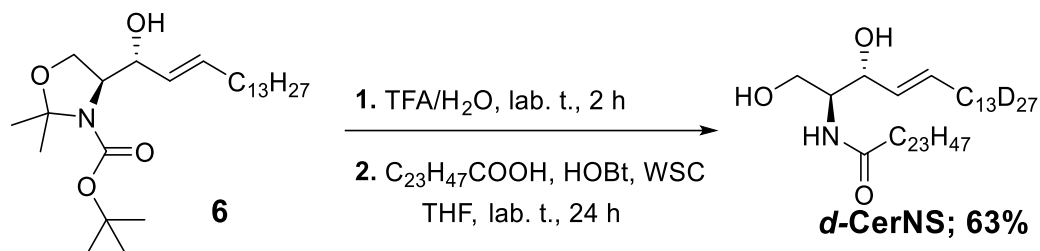
6.1.7 Príprava (2*S*,3*R*,4*E*)-2-aminooktadec-4-en-1,3-diolu-*d*₂₈ (*d*-sfingozín)



60 mg (0,128 mmol) chránenej sfingoidnej báze (**6**) bolo rozpustených v 2,25 ml roztoku kyseliny trifluoroctovej a vody v pomere 3:1 (v/v). Reakcia prebiehala za laboratórnej teploty. Po 30 minútach bolo urobené TLC, ktoré ukázalo, že reakcia zatiaľ neprebíha. Po 1 hodine bolo pridaných 0,5 ml roztoku kyseliny. Po 1 hodine miešania začal byť na TLC zjavný vznikajúci produkt ($R_f = 0$ pre mobilnú fázu hexán/etyl-acetát, 3:1; $R_f = 0,50$ pre mobilnú fázu BuOH/CH₃COOH/H₂O, 4:1:1). Reakcia bola ukončená pridaním 25 – 27% vodného roztoku NH₃ do pH 9. Zmes bola následne extrahovaná päťkrát s 30 ml CHCl₃. Chloroformové frakcie boli spojené, odparené a vysušené bezvodým Na₂SO₄. Po prečistení pomocou stĺpcovej chromatografie (gradientová mobilná fáza: CHCl₃/MeOH, 140:25; CHCl₃/MeOH/NH₃, 110:25:4; CHCl₃/MeOH/NH₃, 100:25:6) sa podarilo izolovať 29,9 mg sfingoidnej báze (***d*-sfingozín**). Výťažok reakcie bol 71 %.

(2*S*,3*R*,4*E*)-2-aminooktadec-4-en-1,3-diol-*d*₂₈ (*d*-sfingozín). Biela kryštalická látka, molárna hmotnosť: 327,67 g/mol, **TLC**: $R_f = 0,50$ (BuOH/CH₃COOH/H₂O, 4:1:1), teplota topenia: 37–39 °C. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃): 5.46 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 4.22 – 3.91 (m, 2H), 3.84 – 3.54 (m, 2H), 3.08 – 2.44 (m, 4H) ppm. **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 128.94, 113.93, 74.54, 63.62, 56.10, 30.94, 29.68, 28.47, 28.31, 24.06, 19.74, 16.65$ ppm. **IR (ATR)**: ν_{\max} 3369, 3245, 2193, 2089, 1088, 1044, 803 cm⁻¹.

6.1.8 Príprava *N*-((2*S*,3*R*,4*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)-tetrakosanamidu-*d*₂₈ (*d*-CerNS)

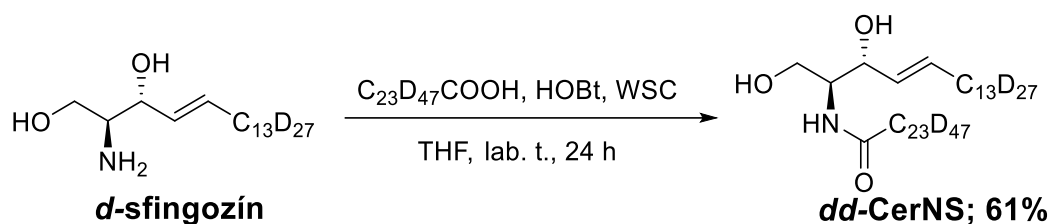


60 mg (0,128 mmol) chránenej sfingoidnej báze (**6**) bolo rozpustených v 2,25 ml roztoku kyseliny trifluorooctovej a vody v pomere 3:1 (v/v). Reakcia prebiehala za laboratórnej teploty. Po 30 minútach bolo urobené TLC, ktoré ukázalo, že reakcia zatiaľ neprebíha. Po 1 hodine bolo pridaných 0,5 ml roztoku kyseliny. O ďalších 30 minút začali byť na TLC zjavná výsledná látka ($R_f = 0$ pre mobilnú fázu hexán/etyl-acetát, 3:1, $R_f = 0,5$ pre mobilnú fázu BuOH/CH₃COOH/H₂O, 4:1:1). Reakcia bola ukončená pridaním 25–27% vodného roztoku NH₃ do pH 9. Zmes bola extrahovaná päťkrát s 30 ml CHCl₃. Chloroformové frakcie boli spojené, odparené a vysušené bezvodým Na₂SO₄. Takto získaný surový produkt (40,7 mg) sa vysušil na hlbokom vákuu a ihneď bol acylovaný.

40,7 mg surového produktu, 43,6 mg (0,118 mmol) LIG a 62,3 mg (0,461 mmol) 1-hydroxybenzotriazol hydrátu (HOBt) boli vysušené na vákuovej pumpe a rozpustené pod atmosférou argónu v zmesi 2,5 ml suchého CHCl₂ a 1,5 ml suchého THF pri teplote 0 °C. Injekčnou striekačkou bolo prikvapnutých 0,05 ml (0,249 mmol) *N*-(3-dimetylaminopropyl)-*N'*-etylkarbodiimid-hydrochloridu (WSC). O 24 hodín miešania reakčnej zmesi bolo urobené TLC (mobilná fáza: CHCl₃/MeOH, 10:1, $R_f = 0,40$), ktoré potvrdilo vznikajúci produkt. Zo zmesi bolo odparené rozpúšťadlo a zmes bola prečistená pomocou stĺpcovej chromatografie (mobilná fáza: CHCl₃/MeOH, 50:1). Získaných bolo celkom 54,4 mg látky (***d*-CerNS**). Celkový výtťažok oboch reakcií bol 63 %.

***N*-((2*S*,3*R*,4*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)-tetrakosanamid-*d*₂₈ (*d*-CerNS).** Biela kryštalická látka, molárna hmotnosť: 678,30 g/mol, **TLC:** $R_f = 0,40$ (CHCl₃/MeOH, 10:1), teplota topenia: 89–91 °C. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃): 6.25 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.53 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.38 – 4.25 (m, 1H), 4.02 – 3.87 (m, 2H), 3.77 – 3.65 (m, 1H), 2.24 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.72 – 1.54 (m, 2H), 1.46 – 1.09 (m, 40H), 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H) ppm. **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) $\delta = 173.89, 133.85, 128.72, 74.67, 62.52, 54.48, 36.84, 31.92, 29.35, 29.28, 25.75, 22.68, 14.10$ ppm. **IR (ATR):** ν_{max} 2918, 2850, 2194, 2089, 1640, 1555, 1467, 802, 729 cm⁻¹.

6.1.9 Príprava *N*-((2*S*,3*R*,4*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)-tetrakosanamidu-*d*₂₈-*d*₄₇ (*dd*-CerNS)



10 mg (0,031 mmol) ***d*-sfingoínu**, 14 mg (0,034 mmol) *d*-LIG, 15,3 mg (0,113 mmol) 1-hydroxybenzotriazol-hydrátu (HOBt) boli vysušené na vákuovej pumpe a rozpustených pod atmosférou argónu v zmesi 1,5 ml suchého CHCl₂ a 1,5 ml suchého THF pri teplote 0 °C. Injekčnou striekačkou bolo prikvapnutých 0,01 ml (0,061 mmol) *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-etylkarbodiimid-hydrochloridu (WSC). O 24 hodín bolo urobené TLC (mobilná fáza CHCl₃/MeOH, 10:1, *R*_f = 0,40), ktoré potvrdilo vznikajúci produkt. Zo zmesi bolo odparené rozpúšťadlo a zmes bola prečistená pomocou stĺpcovej chromatografie (mobilná fáza: CHCl₃/MeOH, 50:1). Získaných bolo celkom 13,6 mg látky (***dd*-CerNS**). Celkový výťažok reakcie bol 61 %.

***N*-((2*S*,3*R*,4*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)-tetrakosanamid-*d*₂₈-*d*₄₇ (*dd*-CerNS).**

Biela kryštalická látka, molárna hmotnosť: 725,59 g/mol, **TLC**: *R*_f = 0,40 (CHCl₃/MeOH, 10:1), teplota topenia: 92–94 °C. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = 6.26 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.53 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.32 (dd, *J* = 6.6, 3.9 Hz, 1H), 3.99 – 3.86 (m, 2H), 3.71 (dd, *J* = 11.3, 3.4 Hz, 1H) ppm. **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ = 174.02, 128.72, 114.00, 74.61, 68.73, 62.50, 54.51, 31.01, 29.69, 28.52, 28.37, 28.21, 28.04 ppm. **IR (ATR)**: ν_{max} 2193, 2089, 1642, 1568, 1090, 705 cm⁻¹.

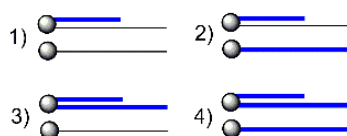
6.2 Biofyzikálna časť

6.2.1 Chemikálie a prístroje

Chemikálie a rozpúšťadlá boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich, Avanti Polar Lipids a PENTA (Praha, Česká republika). Deuterované lipidy (*d*-LIG) boli zakúpené od firmy C/D/N isotopes (Pointe-Claire, Kanada). IČ spektroskopía bola meraná s prístrojom Nicolet IMPACT 400D FTIR spektrometer (Thermo Scientific, Ontario, Kanada) s kryštálom MIRacle ATR ZnSe (PIKE Technologies, Madison, WI).

6.2.2 Príprava modelových membrán SC

Modelové membrány boli pripravené zmiešaním Cer, Chol a (*d*)-LIG (najviac zastúpená VMK v SC) v ekvimolárnom pomere s prídavkom 5 % (m/m) CholS. Celkovo boli pripravené štyri typy modelových membrán, ktoré sa líšili v rozdielnej deuterácií Cer alebo LIG. Všetky typy zmesí znázorňuje **Obrázok 10**.



Obrázok 10. Vybrané lipidy modelových membrán (Cer/LIG/Chol/CholS) hodnotených v tejto práci. Deuterované reťazce (Cer, LIG) sú pre ilustráciu znázornené modrou farbou. V zmesi č.1 bol použitý Cer s deuterovaným sfingozínom (*d*-CerNS) a protonovaným acylom a LIG. V zmesi č. 2 bol okrem iným zložiek použitý *d*-CerNS a *d*-LIG; zmes č. 3 pozostávala z plne deuterovaného Cer (*dd*-CerNS) a protonovanej LIG a napokon v zmesi č. 4 boli použité len deuterované zložky, tj. *dd*-CerNS a *d*-LIG.

Jednotlivé lipidy boli rozpustené v zmesi hexán/EtOH 96 % (2:1, v/v). CholS bol z dôvodu nízkej rozpustnosti rozpustený v EtOH 96 %. Takto rozpustené lipidy boli zmiešané v ekvimolárnom pomere (1:1:1, Cer/LIG/Chol) s prídavkom CholS (5 %, m/m). Výsledné roztoky boli zahustené a vysušené nad oxidom fosforečným v exsikátore. Lipidové zmesi (membrány) boli ohriate na 90 °C, čo je teplota nad hlavným fázovým prechodom lipidov. Po dosiahnutí tejto teploty boli ohrievané 10 min a následne 3 hodiny chladli pri laboratórnej teplote. Tento proces chladnutia je veľmi dôležitý; dochádza pri ňom k tvorbe organizovaných lipidových lamiel.²⁹ Následne boli za laboratórnej vlhkosti inkubované 24 hod pri teplote 32 °C. Takto pripravené modelové membrány SC boli zmerané pomocou IČ pri teplote od 28 °C do

100 °C, pričom spektrá boli zaznamenávané každé 2 °C. Po každom zvýšení teploty sa vzorka nechala 6 min stabilizovať. Každá zmes bola týmto spôsobom premeraná dvakrát.¹⁷

6.2.3 Spracovanie dát

Spracovaných bolo celkovo 296 IČ spektier. K spracovaniu dát z nich získaných, boli použité nasledujúce programy: OPUS (Bruker), X'Pert DataViewer, GraphPad a Microsoft Excel.

7 Výsledky a diskusia

7.1 Chemická časť

Základným krokom syntézy **d-CerNS** a **dd-CerNS** bola príprava deuterovaného pentadecénu (**3**) a vinylovaného (*S*)-Garnerovho aldehydu (**5**). Tieto dva intermediáty boli spojené pomocou Grubbovej metatézy za vzniku chráneného deuterovaného analógu sfingoínu (**6**), z ktorého po odstránení chrániacich skupín vznikol voľný **d-sfingoín**. Voľná primárna aminoskupina tejto sfingoidnej báze bola následne za pomoci WSC (vo vode rozpustný karbodiimid) acylovaná za vzniku chirálne čistých produktov **d-CerNS** a **dd-CerNS**.

7.1.1 Príprava pentadec-1-énu-*d*₃₀ (**3**)

Dve reakcie, vďaka ktorým tento intermediát vznikol, sa súhrnne nazývajú Griecova eliminácia. V prvej reakcii reagoval v prostredí bezvodého THF pod argónom pentadekan-1-ol-*d*₃₁ (**1**) s 2-nitrofenylselenokyanátom v prítomnosti tributylfosfínu za vzniku (2-nitrofenyl)(pentadecyl)selanu-*d*₃₁ (**2**). Táto reakcia bola vykonaná celkovo dvakrát. Výťažok reakcie bol 96 %. Pre porovnanie, rovnaká reakcia s protonovaným pentadekanolom mala výťažok 76 %.³⁰ Grieco *et al.*³¹ uvádzajú pre o 3 uhlíky kratší alkohol dodekanol výťažok 94 % v THF a 92 % v pyridíne. V druhej reakcii bol intermediát (**2**) oxidovaný peroxidom vodíku za vzniku pentadec-1-énu-*d*₃₀. Výťažky týchto reakcii činili 52–96 %. Výťažok 52 % bol pravdepodobne spôsobený málo kvalitným peroxidom vodíku, preto bola reakcia zopakovaná a jej výťažok (96 %) odpovedá výťažku pre protonovaný (2-nitrofenyl)(pentadecyl)selan, ktorý bol 94 %.³⁰

7.1.2 Vinylácia (*S*)-Garnerovho aldehydu (**4**)

V tejto reakcii bol (*S*)-Garnerov (**4**) aldehyd v prostredí suchého THF pod argónom vinylovaný pomocou vinyl-magnesium-bromidu v prítomnosti HMPA, ktoré zabezpečilo chirálnu čistotu. Táto reakcia dala vzniku vinylovanému (*S*)-Garnerovmu aldehydu (**5**). Reakcia bola celkovo vykonaná dvakrát (výťažky sa pohybovali v rozmedzí 40–73 %). Pre porovnanie výťažky z iných prác sú 22 %³² pri použití 0,975 g (*S*)-Garnerovho aldehydu (**4**) a HMPA a 44 % pri použití 0,5 g (*S*)-Garnerovho aldehydu (**3**) bez použitia HMPA,³⁰ po oddelení nežiadúceho enantioméru. *Amrita Gosh et al.*³³ uvádza výťažok až 92 % zmesi epimérov bez použitia HMPA.

7.1.3 Grubbsova metatéza

V tejto kľúčovej časti syntézy **d-CerNS** sa spojil deuterovaný pentadecen (**3**) s vynylovaným (S)-Garnerovým aldehydom (**5**), pomocou Grubbsovho katalyzátoru 2. generácie s prídavkom octovej kyseliny. Táto reakcia, pri ktorej vzniká intermediát (**6**), bola celkovo vykonaná päťkrát. Zaujímavé pritom je, že čím sa použilo väčšie množstvo reaktantov, tým bol výťažok za dodržania rovnakých podmienok menší. Tento fakt nás donútil reakciu vykonať viackrát a to v malých množstvách. Reakcia, ktorá prebehla s protonovaným pentadecénom mala výťažok 58 % pri použití 41 mg (0,194 mmol) tohto reaktantu. *Wisse et al.* uvádza pri veľmi podobnej reakcii, kde sa pripájala 3-hydroxypentadecén za vzniku 6-hydroxysfingozínu, výťažok 48 %.³⁴ *Amrita Ghosh et al.* uvádza dokonca výťažok 91 %.³³

7.1.4 Syntéza d-CerNS a dd-CerNS

Záverečná fáza chemickej časti tejto práce pozostávala z ochránenia intermediátu (**6**) za vzniku **d-sfingozínu** a z následnej acylácie pomocou LIG a d-LIG za vzniku d-CerNS a dd-CerNS.

Ochránenie intermediátu (**6**) prebiehalo v roztoku TFA a vody v pomere 3:1 (v/v) a bolo vykonané celkovo trikrát. V literatúre bolo uvedené, že reakcia trvá 90 minút.³⁰ Po 2 a pol hodinách však TLC analýza reakčnej zmesi nepreukázala, že reakcia prebieha. Nízka reaktivita bola pravdepodobne spôsobená prítomnosťou deuterovaného reťazca intermediátu (**6**). Do reakčnej zmesi bol teda pridaný ďalší roztok TFA a o 12 hodín bola reakcia ukončená. Surový produkt reakčnej zmesi bol následne acylovaný pomocou LIG alebo d-LIG. Pri TLC kontrole však bolo zistené, že nasyntetizované látky majú odlišné R_f ako kontrolný štandard (komerčne dostupný CerNS). Domnievali sme sa, že výrazne kyslé prostredie a dlhší reakčný čas mohli zmeniť konfiguráciu na niektorom z chirálnych centier. Napokon to potvrdila aj NMR analýza. Domnievame sa že zmena konfigurácie nastala na C₃ d-sfingozínu. Na presnú lokalizáciu zmeny konfigurácie by bolo potrebné vykonať pokročilú NMR analýzu, ktorá však nebola vykonaná. Ďalšie ochránenie prebiehalo bez komplikácií a trvalo 2 hodiny. Výťažok z tejto reakcie činil 72 %.

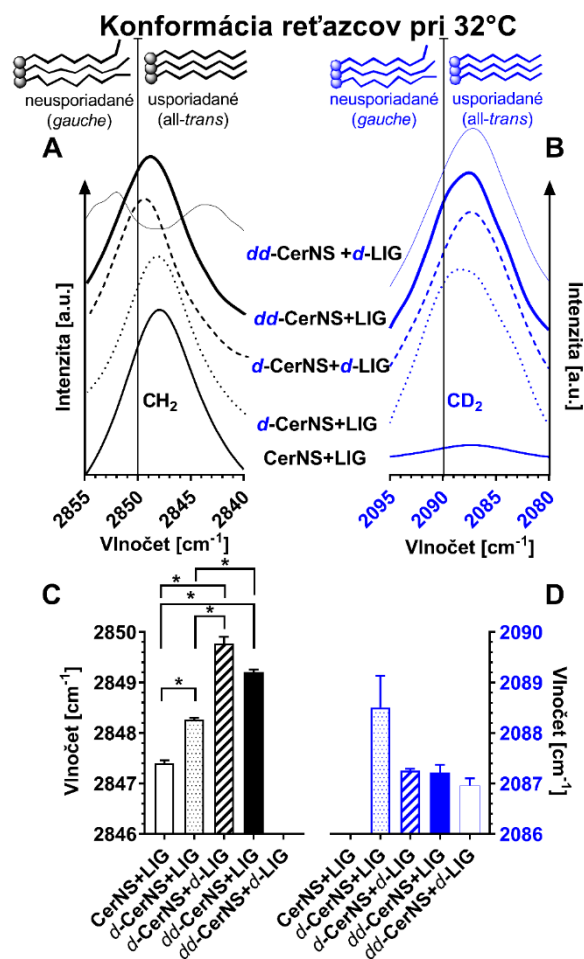
Nasledovala acylácia sfingoidnej báze jednotlivými kyselinami pomocou WSC a HOBT. Táto reakcia prebiehala buď z vyčisteného **d-sfingozínu** alebo zo surového produktu z reakčnej zmesi z predchádzajúcej reakcie. Acylácia s LIG prebiehala z reakčnej zmesi a výťažok oboch reakcií (ochránenie a acylácia) činil 63 %. Literatúra ďalej uvádza, že reakcia bez prítomnosti

deuterovaných zlúčenín mala výťažok z dvoch krokov 51 %.³⁰ *Kumar et al.*³⁵ uvádza výťažok z dvoch krokov 57 % za využitia deprotektie pomocou HCl a dioxánu pri teplote 100 °C a následnej acylácií s 4-nitrofenyloktadekanoátom pri laboratórnej teplote. Acylácia s *d*-LIG prebiehala z prečisteného ***d*-sfingozínu** a jej výťažok činil 61 %. *Školová et al.* pri acylácii protonovaného sfingozínu s *d*-LIG uvádza výťažok 83 %.¹⁷ Autorka taktiež uvádza výťažok až 98 % pri acylácii fytosfingozínu s LIG za vzniku CerNP24.³⁶

7.2 Biofyzikálna časť

7.2.1 Vyhodnotenie symetrických valenčných vibrácií

Ako už bolo spomenuté, hodnoty vlnočtu maxima CH₂ a CD₂ symetrických valenčných vibrácií vypovedajú o usporiadaní uhľovodíkových reťazcov v skúmaných modeloch kožnej bariéry. Je z nich teda možné zistiť či sa uhľovodíkové reťazce lipidov nachádzajú ***all-trans*** („cik-cak“) alebo ***gauche*** konformácii. Výsledky meraní modelových membrán kožnej bariéry zobrazuje **Obrázok 11**.

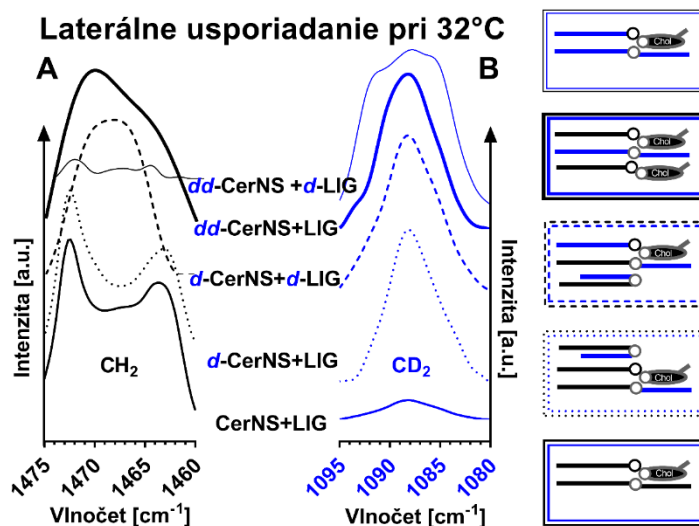


Obrázok 11. Panel A zobrazuje charakteristické IČ vibračné pásy jednotlivých CH₂ symetrických valenčných vibrácií modelových membrán kožnej bariéry pri fyziologickej teplote 32 °C. Panel B zobrazuje charakteristické IČ vibračné pásy jednotlivých CD₂ symetrických valenčných vibrácií pri fyziologickej teplote 32 °C. Panel C zobrazuje porovnanie maxím CH₂ symetrických valenčných vibrácií (stĺpcové grafy). Panel D zobrazuje porovnanie maxím CD₂ symetrických valenčných vibrácií. Hviezdička označuje štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$).

Na **Obrázku 11** možno vidieť, že žiadny vibračný pás z meraných zmesí nemá svoje maximum nad 2850 cm⁻¹, takže možno tvrdiť, že všetky reťazce sú dobre usporiadané, tj. nachádzajú sa v all-trans konformácii. K rovnakému záveru prišla aj Školová *et al.*, ktorá tiež hodnotila CerNS, avšak s neznačeným sfingozínom.¹⁷ Z hodnotenia symetrickej valenčnej vibrácie však vidíme rozdiely v usporiadaní protonovaných reťazcov. Reťazce sú síce dobre usporiadané (tj. hodnoty vlnočtov sú nižšie než 2850 cm⁻¹), ale ako je uvedené v **Obrázku 11C**, v usporiadaní protonovaných metylénových reťazcov boli pozorované štatisticky významné rozdiely.

7.2.2 Vyhodnotenie nožnicových deformačných vibrácií

Ako už bolo spomenuté, nožnicové deformačné vibrácie vypovedajú o laterálnom usporiadaní lipidov v modelových membránach. Je z nich teda možné zistiť či sa lipidy nachádzajú **orthorhombickej**, **hexagonálnej**, alebo **kvapalno-kryštalickej mriežke**. Výsledky meraní modelových membrán kožnej bariéry, hodnotených v tejto práci, zobrazuje **Obrázok 12**.



Obrázok 12. Panel A znázorňuje charakteristické IČ vibračné pásy CH_2 nožnicových deformačných vibrácií jednotlivých modelových membrán kožnej bariéry. Panel B zobrazuje charakteristické IČ vibračné pásy jednotlivých CD_2 nožnicových deformačných vibrácií pri fyziologickej teplote kože 32 °C. Na pravej strane sa nachádza možné usporiadanie lipidov v jednotlivých modelových membránach kožnej bariéry.

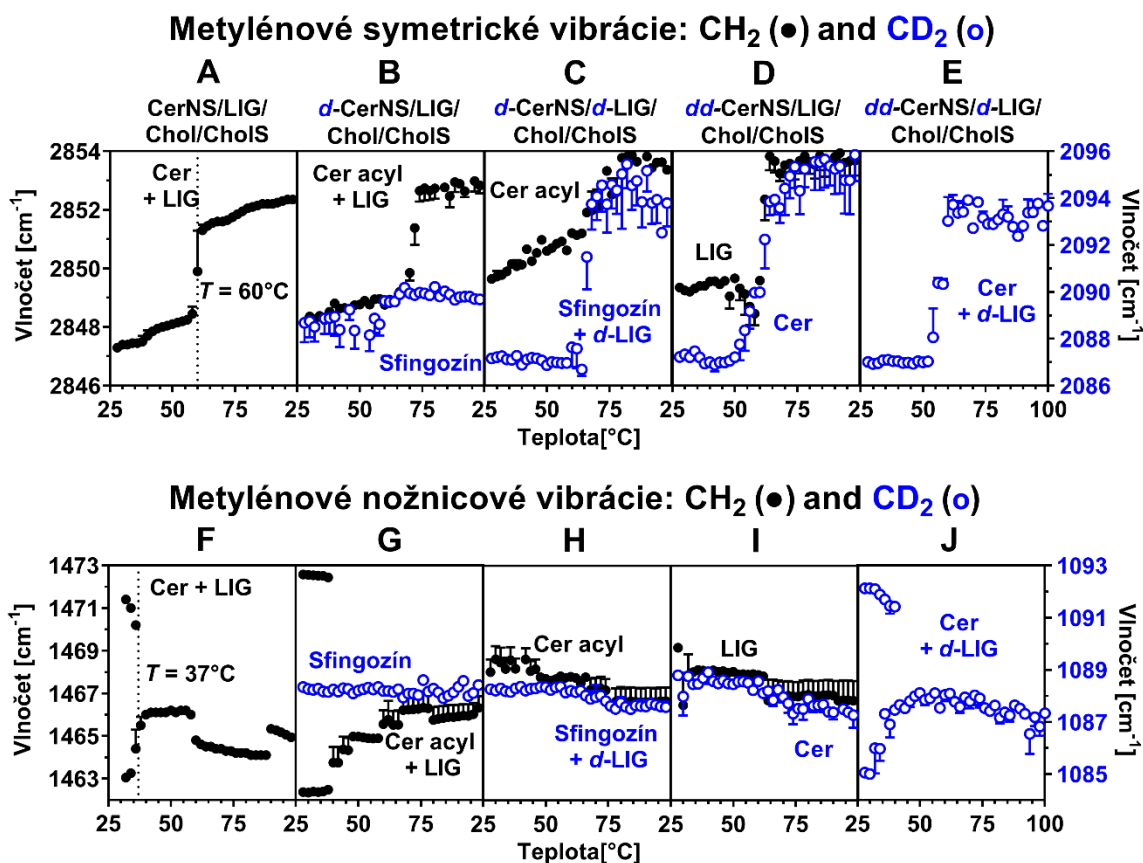
V plne protonovanej zmesi **CerNS + LIG** sa pás CH_2 nožnicovej deformačnej vibrácie rozštiepil na **dublet**, čo značí prítomnosť veľmi tesnej orthorhombickej kryštalickej mriežky. Keďže sa jedná o plne protonovanú zmes, CD_2 vibrácia sa **nezobrazila**. V zmesi s **d-CerNS + LIG** sa pás CH_2 nožnicovej deformačnej vibrácie rozštiepil na **dublet**, čo značí prítomnosť orthorhombickej kryštalickej mriežky. Vibračný pás CD_2 nožnicovej deformačnej vibrácie sa javí ako **singlet**, z čoho môžeme usudzovať, že deuterované a protonované reťazce sú medzi sebou pravdepodobne dobre miešateľné, pretože ak by sa v orthorhombickej kryštalickej mriežke nachádzali dva deuterované reťazce vedľa seba, v spektre by bol prítomný dublet. V tejto zmesi nevieme určiť, či sa Cer nachádza v otvorenej alebo uzatvorenej konformácii. Deuterované reťazce by teoreticky mohli byť v susedstve Chol (nedochádza k štiepeniu

reťazcov). V zmesi **d-CerNS + d-LIG** môžeme na spektre **CH₂** aj **CD₂** nožnicovej deformačnej vibrácie vidieť **singlet**, čo značí dobrú miešateľnosť deuterovaných a protonovaných reťazcov. Rovnako ako v predchádzajúcej zmesi, ani v tejto nevieme presne určiť konformáciu Cer. Podobné závery môžeme vyvodiť aj z hodnotenia zmesi **dd-CerNS + LIG**. Po podrobnejšom preskúmaní singletu v CH₂ oblasti tejto zmesi sme však prišli na to, že protonované reťazce LIG majú tendenciu tvorby domén (fázovo sa separujú; **Obrázok 12**). Podobné hypotézy a závery boli už pozorované v starších prácach^{17,36}, zaoberajúcich sa IČ spektroskopiou modelov kožnej bariéry. Najdôležitejší prínos tejto zmesi je však ten, že na rozdiel od predchádzajúcich zmesí, pri tejto zmesi je možné určiť konformáciu **dd-CerNS**, ktorý sa pravdepodobne nachádza v otvorenej konformácii (reťazce sfingozínu a acylu mastnej kyseliny smerujú na opačné konce), čím sme potvrdili hypotézy uverejnených prác.^{17,37,38} Školová *et al.*¹⁷ skúmali CH₂ a CD₂ nožnicové vibrácie na modeloch kožnej bariéry s neznačeným sfingozínom, ale deuterovaným acylom mastnej kyseliny. Výsledky tejto práce naznačujú, že Cer sa nachádza v otvorenej konformácii, tj. rovnaké závery, aké boli vyvedené v mojej práci. Autorka naznačuje hypotézu, že takáto konformácia môže mať niekoľko výhod. Medzi tieto výhody patrí predovšetkým možná zvýšená príľnavosť príľahlých lamiel. Nakoľko ďalšia zmes **dd-CerNS + d-LIG** je plne deuterovaná, spektrum je v podstate opakom plne protonovanej zmesi; reťazce sú v orthorhombickej kryštalickej mriežke (dublet v CD₂ oblasti).

7.2.3 Vyhodnotenie termotropných meraní

Fázové chovanie lipidov modelov kožnej membrány boli hodnotené pomocou termotropných (tepelne závislých) experimentov. Modelové zmesi (membrány) podstúpili zahrievanie od 28 °C do 100 °C, pričom každé 2 °C bolo zaznamenané spektrum aktuálneho stavu meranej zmesi. Výsledky týchto meraní (**termálna evolúcia maxím vibračných pásov valenčnej symetrickej a deformačnej metylénovej vibrácie**) zobrazuje **Obrázok 13**.

Pri zahrievaní zmesí lipidov dochádza k zmene usporiadania lipidových reťazcov. S narastajúcou teplotou (zvyšuje sa energia systému) dochádza k postupnému znižovaniu usporiadanosti (znižuje sa rigidita a zvyšuje mobilita reťazcov), teda narastá počet *gauche* na úkor *all-trans* konformérov (symetrická valenčná vibrácia; panely A-E v **Obrázku 13**) a zväčšuje sa zastúpenie menej usporiadanej hexagonálnej až kvapalno-kryštalickej mriežky (deformačná nožnicová vibrácia; panely F-J v **Obrázku 13**).



Obrázok 13. Obrázok zobrazuje diagramy závislosti vlnočtov jednotlivých vibrácií lipidov modelových membrán na teplote (28–100 °C). Maximá vlnočtov CH₂ vibrácii sú zobrazené čiernou farbou a body CD₂ vibrácii sú zobrazené modrou farbou. Panely A až E zobrazujú závislosti vlnočtu CH₂ a CD₂ symetrických valenčných vibrácií. Panely F až J zobrazujú závislosti vlnočtu CH₂ a CD₂ nožnicových deformačných vibrácií. Písmeno „T“ označuje teploty, pri ktorých bol zaznamenaný fázový prechod lipidov (tj. 60 °C ako hlavný fázový prechod a 37 °C ako stav, pri ktorom zaniká orthorhombická mriežka).

7.2.3.1 CerNS/LIG/Chol/ChoIS

V tejto modelovej membráne s deutériom neznačenými látkami možno vidieť na paneli A (evolúcia symetrickej valenčnej vibrácie) pozvoľný nárast neusporiadanosti reťazcov (narastá počet *gauche* konformérov) až do teploty 60 °C, kedy nastal fázový prechod zmesi (v tomto okamihu nie sú prítomné *all-trans* konforméry). Na paneli F (termálna evolúcia nožnicovej CH₂ vibrácie) možno pri nižších teplotách vidieť dublet, čo značí prítomnosť tesného usporiadania, tj. orthorhombickej kryštalickej mriežky, ktorá zaniká pri 37 °C a nahrádza ju menej tesná hexagonálna až kvapalno-kryštalickej mriežka.

7.2.3.2 *d*-CerNS/LIG/Chol/CholS

V tejto modelovej membráne bol použitý značený Cer s *d*-sfingoínovým reťazcom. Na paneli B možno vidieť s narastajúcou teplotou nárast neusporiadanosti lipidov až do fázového prechodu. Reťazce protonovaných a deuterovaných lipidov zanikajú pri približne podobnej teplote (60 °C), čo vypovedá o ich dobrej miešateľnosti. Na paneli G možno pri nižších teplotách vidieť dublet, čo značí prítomnosť orthorhombickej kryštalickej mriežky, ktorá s narastajúcou teplotou prechádza do hexagonálnej až kvapalno-kryštalickej mriežky.

7.2.3.3 *d*-CerNS/*d*-LIG/Chol/CholS

V tejto zmesi sa nachádza deutériom značený sfingoínový reťazec Cer a LIG. Na paneli C vidno veľmi blízky fázový prechod protonovaných a deuterovaných reťazcov, čo značí ich dobrú miešateľnosť. Túto skutočnosť potvrdzuje panel H, kde nie sú zobrazené dublety CH₂/CD₂.

7.2.3.4 *dd*-CerNS/LIG/Chol/CholS

V tejto zmesi sa nachádza Cer so značeným sfingoínovým reťazcom aj acylom. Na paneloch D a I je možné pozorovať ten istý trend a vyvodiť podobné konškvencie ako u predchádzajúcej zmesi.

7.2.3.5 *dd*-CerNS/*d*-LIG/Chol/CholS

Táto zmes je v podstate deuterovaný ekvivalent zmesi CerNS/LIG/Chol/CholS, na paneloch E a J, sa teda nenachádzajú CH₂ valenčné symetrické/nožnicové vibrácie. Na paneli J možno pri nižších teplotách vidieť dublet, čo značí prítomnosť orthorhombickej kryštalickej mriežky; so zvyšujúcou sa teplotou ustupuje a zaniká pri 37 °C.

8 Záver

Cieľom tejto diplomovej práce bolo nasyntetizovať sfingozín s deuterovaným reťazcom pomocou Grubbsovej metatézy, ktorý nie je komerčne dostupný a zatiaľ nebol pripravený ani popísaný. Ďalším cieľom tejto práce bolo hodnotiť Cer odvodené od tejto sfingoidnej báze pomocou IČ spektroskopie.

Zadané ciele tejto práce boli naplnené. Pomocou Grubbsovej metatézy bol pripravený sfingozín s deuterovaným reťazcom (**d-sfingozín**) a to v takom množstve, že z neho bolo možné pomocou LIG a *d*-LIG pripraviť **d-CerNS** a **dd-CerNS**. Celkovo z nich boli pripravené štyri typy modelových membrán kožnej bariéry (Cer/(*d*)-LIG/Chol/CholS), u ktorých bolo hodnotené ich biofyzikálne chovanie.

Po vyhodnotení výsledkov bolo zistené, že protonované a deuterované reťazce lipidov v modelových membránach sú pri fyziologickej teplote usporiadané v *all-trans* konformácii a v orthorhombickej kryštalickej mriežke. Taktiež bolo zistené, že protonované a deuterované reťazce sa medzi sebou veľmi dobre miešajú. Tento jav bol potvrdený aj termotropnými IČ meraniami. No snáď najdôležitejší prínos tejto práce je zistenie, že CerNS sa pravdepodobne nachádza v **otvorenej konformácii**, čím boli potvrdené hypotézy už publikovaných prác^{17, 37, 38}.

Je však potrebné poznamenať, že tieto výsledky boli získané iba z jednoduchých modelov kožnej bariéry, kde bol zastúpený iba jeden druh Cer a iba jeden druh VMK. Táto práca je však iba akýmsi odrazovým mostíkom v ďalšom skúmaní správania deuterovaných lipidov v modeloch kožnej bariéry. Do budúca sa plánujú vykonať merania zložitejších modelov kožnej bariéry s Cer s deuterovaným sfingozínovým reťazcom, kde už bude prítomných niekoľko druhov Cer a VMK a budú hodnotené nie len pomocou IČ ale aj pomocou NMR na pevnej fáze a neutrónovej difrakcie. Výsledky tejto práce by mohli byť nápomocné pri vysvetlení (patofyziológie usporiadania lipidov v SC.

9 Zdroje

1. Vávrová, K.; Kováčik, A.; Opálka, L., Ceramides in the skin barrier. *Eur. Pharm. J.* **2017**, *64* (2), 28.
2. Kovacik, A.; Roh, J.; Vavrova, K., The chemistry and biology of 6-hydroxyceramide, the youngest member of the human sphingolipid family. *ChemBioChem.* **2014**, *15* (11), 1555-62.
3. Čihák, R., Anatomie 3. *Grada Publishing* **1997**, 672 s. (1. vydání).
4. Štork, J., Dermatovenerologie. *Grada Publishing* **2013**, 502 s. (2. vydání).
5. Eucerin.cz, Struktura a funkce kůže. <http://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze> (online).
6. Pullmannová, P.; Pavlíková, L.; Kováčik, A.; Sochorová, M.; Školová, B.; Slepíčka, P.; Maixner, J.; Zbytovská, J.; Vávrová, K., Permeability and microstructure of model stratum corneum lipid membranes containing ceramides with long (C16) and very long (C24) acyl chains. *Biophys. Chem.* **2017**, *224*, 20-31.
7. Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Carelli, S.; Ghidoni, R., Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1182* (2), 147-51.
8. Pilgram, G.; Van der Meulen, J.; Gooris, G.; Koerten, H.; Bouwstra, J. A., The influence of two azones and sebaceous lipids on the lateral organization of lipids isolated from human stratum corneum. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes.* **2001**, *1511* (2), 244-254.
9. Boncheva, M., Molecular organization of the lipid matrix in stratum corneum and its relevance for the protective functions of human skin. In *Treatment of Dry Skin Syndrome*, Springer: 2012; pp 125-147.
10. Choi, M. J.; Maibach, H. I., Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2005**, *6* (4), 215-23.
11. Harding, C. R., The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol. Therapy* **2004**, *17* (s1), 6-15.
12. Klimeš, J., Kontrolně – analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami. *Nakladatelství Karolinum* **2015**, 265 s. (2. vydání).
13. Garidel, P.; Fölting, B.; Schaller, I.; Kerth, A., The microstructure of the stratum corneum lipid barrier: Mid-infrared spectroscopic studies of hydrated ceramide:palmitic acid:cholesterol model systems. *Biophys. Chem.* **2010**, *150* (1-3), 144-156.
14. Mendelsohn, R.; Moore, D. J., Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *96* (1-2), 141-57.
15. Mendelsohn, R.; Flach, C. R.; Moore, D. J., Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758* (7), 923-33.
16. Groen, D.; Poole, D. S.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., Is an orthorhombic lateral packing and a proper lamellar organization important for the skin barrier function? *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808* (6), 1529-37.
17. Skolova, B.; Hudska, K.; Pullmannova, P.; Kovacik, A.; Palat, K.; Roh, J.; Fleddermann, J.; Estrela-Lopis, I.; Vavrova, K., Different phase behavior and packing of ceramides with long (C16) and very long (C24) acyls in model membranes: infrared spectroscopy using deuterated lipids. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (35), 10460-70.
18. Janssens, M.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., Infrared spectroscopy studies of mixtures prepared with synthetic ceramides varying in head group architecture: coexistence of liquid and crystalline phases. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788* (3), 732-42.

19. Wang, X.; Ujihara, M.; Imae, T.; Ishikubo, A.; Sugiyama, Y.; Okamoto, T., Characterization of mimetic lipid mixtures of stratum corneum. *Coll. Surf. B: Biointerfaces* **2010**, *78* (1), 92-100.
20. Moore, D. J.; Rerek, M. E., Insights into the molecular organization of lipids in the skin barrier from infrared spectroscopy studies of stratum corneum lipid models. *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh)* **2000**, *208*, 16-22.
21. Arseneault, M.; Lafleur, M., Cholesterol sulfate and Ca²⁺ modulate the mixing properties of lipids in stratum corneum model mixtures. *Biophys. J.* **2007**, *92* (1), 99-114.
22. Moore, D. J.; Rerek, M. E.; Mendelsohn, R. J. T. J. o. P. C. B., FTIR spectroscopy studies of the conformational order and phase behavior of ceramides. *J. Phys. Chem B* **1997**, *101* (44), 8933-8940.
23. Rerek, M. E.; Van Wyck, D.; Mendelsohn, R.; Moore, D. J., FTIR spectroscopic studies of lipid dynamics in phytosphingosine ceramide models of the stratum corneum lipid matrix. *Chem. Phys. Lipids* **2005**, *134* (1), 51-58.
24. Delaude, L.; Noels, A., *Metathesis*. **2000**.
25. Lee, H.-K.; Choi, T.-L. J. A. M. L., Unusual Superior Activity of the First Generation Grubbs Catalyst in Cascade Olefin Metathesis Polymerization. **2018**, *7* (5), 531-535.
26. Balla, Á.; Al-Hashimi, M.; Hlil, A.; Bazzi, H. S.; Tuba, R., Ruthenium-Catalyzed Metathesis of Conjugated Polyenes. *ChemCatChem*. **2016**, *8* (18), 2865-2875.
27. Nelson, D. J.; Percy, J. M., The Influence of Structure on Reactivity in Alkene Metathesis. In *Adv. Phys. Org. Chem.*, Elsevier: **2014**; *48*, 81-188.
28. Adlhart, C.; Chen, P., Mechanism and activity of ruthenium olefin metathesis catalysts: The role of ligands and substrates from a theoretical perspective. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (11), 3496-3510.
29. Pullmannová, P.; Staňková, K.; Pospíšilová, M.; Školová, B.; Zbytovská, J.; Vávrová, K., Effects of sphingomyelin/ceramide ratio on the permeability and microstructure of model stratum corneum lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1838* (8), 2115-26.
30. Obrdlík, D., Syntéza ceramidu NS pomocí Grubbsovy metateze. **2017** (diplomová práce).
31. Grieco, P. A.; Gilman, S.; Nishizawa, M., Organoselenium chemistry. A facile one-step synthesis of alkyl aryl selenides from alcohols. *J. Org. Chem.* **1976**, *41* (8), 1485-1486.
32. Škarda, F., Syntéza fluorescenčních polyenových ceramidů. **2014**. (diplomová práce)
33. Ghosh, A.; Chattopadhyay, S. K., A diversity oriented synthesis of D-erythro-sphingosine and siblings. *Tetrahedron - Assymetry* **2017**, *28* (9), 1139-1143.
34. Wisse, P.; de Geus, M. A. R.; Cross, G.; van den Nieuwendijk, A. M. C. H.; van Rooden, E. J.; van den Berg, R. J. B. H. N.; Aerts, J. M. F. G.; van der Marel, G. A.; Codée, J. D. C.; Overkleeft, H. S., Synthesis of 6-Hydroxysphingosine and α -Hydroxy Ceramide Using a Cross-Metathesis Strategy. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (14), 7258-7265.
35. Kumar, G.; Kaur, S.; Singh, V. Efficient Synthesis of a Styryl Analogue of (2S, 3R, 4E)-N2-Octadecanoyl-4-tetradecasphingenine via Cross-Metathesis Reaction. *Helvet. Chim. Acta* **2011**, *94* (4), 650-655.
36. Skolova, B.; Kovacik, A.; Tesar, O.; Opalka, L.; Vavrova, K., Phytosphingosine, sphingosine and dihydrosphingosine ceramides in model skin lipid membranes: permeability and biophysics. *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1859* (5), 824-834.
37. Iwai, I.; Han, H.; den Hollander, L.; Svensson, S.; Ofverstedt, L. G.; Anwar, J.; Brewer, J.; Bloksgaard, M.; Laloef, A.; Nosek, D.; Masich, S.; Bagatolli, L. A.; Skoglund, U.; Norlen, L., The human skin barrier is organized as stacked bilayers of fully extended ceramides with

cholesterol molecules associated with the ceramide sphingoid moiety. *J. Invest. Dermatol.* **2012**, *132* (9), 2215-25.

38. Corkery, R. The anti-parallel, extended or splayed-chain conformation of amphiphilic lipids. *Coll. Surf. B: Biointerfaces* **2002**, *26* (1-2), 3-20.