

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra anorganické a organické chemie

**PŘÍPRAVA A STUDIUM *O*- A *N*-MODIFIKOVANÝCH
CERAMIDŮ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

Hradec Králové 2014

Ludmila Pavlíková

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

Ludmila Pavlíková

V Hradci Králové 2014

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat své školitelce doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za vstřícnost, trpělivost a ochotu pomoci při vypracování této diplomové práce a za finanční podporu grantům GAČR 13-23891S, SVV 260 062 a GAUK 652412.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie

Kandidát: Ludmila Pavlíková

Školitel: doc. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

Název diplomové práce: Příprava a studium *O*- a *N*-modifikovaných ceramidů

Ceramidy, látky skládající se z mastné kyseliny a bazického alkoholu, se přirozeně vyskytují v lidském organismu a hrají roli v řadě fyziologických pochodů. Známé je jako molekuly účastníci se buněčné signalizace, podílejí se na buněčné diferenciaci, proliferaci či apoptóze, ale jsou i strukturním elementem plazmatických membrán, a v neposlední řadě jsou součástí mezibuněčné hmoty stratum corneum, kde se podílí na bariérové funkci kůže.

Kromě výzkumu přirozeně se vyskytujících ceramidů, je třeba se pochopitelně věnovat i různým modifikacím těchto látek a hledáním souvislostí mezi strukturou ceramidů a jejich schopností plnit bariérovou funkci kůže.

1-deoxy, 3-deoxy a *N*-methyl analogy ceramidů, kterým se věnuji ve své diplomové práci, nebyly doposud zkoumány z hlediska jejich bariérové funkce. Před samotným měřením vlastností modelových membrán, jejichž součástí jsou tyto analogy, bylo třeba uskutečnit jejich syntézu.

Syntéza probíhala dvěma způsoby. První postup se skládal z přípravy acylačního činidla v podobě sukcinimid-*N*-ylesteru kyseliny lignocerové a následné acylace příslušného sfingosinu. Druhým způsobem přípravy byla reakce kyseliny lignocerové s *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimidem a následná reakce vzniklého produktu s příslušným sfingosinem.

Samotným permeačním pokusům předcházela příprava membrán, které mají být zjednodušeným modelem lipidové vrstvy ve stratum corneum. Ta se skládá z ekvimolárního množství cholesterolu, mastných kyselin a ceramidů, s pětiprocentním přídatkem cholesterol-sulfátu.

Permeabilita vytvořených modelových membrán byla studována pomocí elektrické impedance, relativní ztráty vody přes membránu a fluxu léčiv (theofylinu a indometacinu). Tyto charakteristiky srovnávané se standardem (místo analogu ceramidu použit fyziologický ceramid) celkově vypovídají o schopnosti připravených látek plnit bariérovou funkci kůže.

Z výsledků je zřejmé, že všechny připravené analogy mají horší bariérové schopnosti než standardní ceramid. Můžeme se tedy domnívat, že změna molekuly ceramidu, jako je odstranění hydroxylů v poloze 1 nebo 3, či navázání methylového zbytku na dusík, vede k narušení ceramidové dvojvrstvy ve stratum corneum a tím i k narušení ochranné funkce kůže.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Inorganic and Organic Chemistry

Candidate: Ludmila Pavlíková

Supervisor: doc. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Synthesis and study of *O*- and *N*-modified ceramides

Ceramides which are composed of fatty acid and basic alcohol, naturally occur in the human body and play a role in many physiological processes. They are known like molecules participating in the cell signaling, they take part in differentiation, proliferation and apoptosis of the cell but they are also structural elements of cell membrane. Last but not least, they are included in extracellular matrix of stratum corneum where they participate in the barrier function of the skin.

In addition to research of naturally occurring ceramides, of course it is necessary to study various modifications of these substances and to find connections between structure of ceramides and their ability to keep the barrier function.

1-deoxy, 3-deoxy a *N*-methyl analogues of ceramides, that I investigate in my diploma thesis, have not been examined yet in terms of their barrier function. Before the measuring of the properties of model membranes consisting of these analogues, it was necessary to synthesize these analogues.

Synthesis was performed in two ways. The first procedure consisted of the preparation of the acylating agent in the form of succinimid-*N*-ylester of lignoceric acid and acylation of the corresponding sphingosine analogue. The second way of preparation was the reaction of lignoceric acid with *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide and after it the reaction of the product with the corresponding sphingosine analogue.

Before permeation experiments the model ceramide membranes were prepared. They should be simplified models of lipid layer in the stratum corneum. The lipid layer contains equimolar amount of cholesterol, ceramides and fatty acids with the addition

five percent of cholesteryl sulfate.

The electrical impedance, the relative water loss through the membrane and the flux of drugs (theophylline and indomethacin) were measured on the prepared model membranes to define their barrier characteristics. These characteristics were compared with standard (physiological ceramide instead of the analogues) and they demonstrate the ability of analogues to maintain the barrier function of the skin.

From the results it is evident that all prepared analogues have worse barrier properties than the standard ceramide. We can therefore assume that the change of ceramide molecules, such as the elimination of the hydroxyl function in position 1 or 3 or the methylation of the nitrogen leads to a distortion of ceramide bilayers in the stratum corneum and so to disruption of the protective function of the skin.

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT.....	6
1. ÚVOD A CÍL PRÁCE.....	9
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1 CERAMIDY	10
2.1.1 <i>Struktura ceramidů</i>	10
2.1.2 <i>Tvorba ceramidů v organismu</i>	11
2.1.3 <i>Funkce ceramidů v organismu</i>	11
2.1.4 <i>Ceramidy v kůži</i>	12
2.2 ANALOGA CERAMIDŮ.....	13
2.2.1 <i>Důvod syntézy analogů ceramidů</i>	13
2.2.2 <i>1-deoxy analogy sfingosinu a ceramidů</i>	14
2.2.3 <i>N-methylsfingosin</i>	14
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	16
3.1 SYNTÉZA.....	16
3.1.1 <i>Chemikálie a přístroje</i>	16
3.1.2 <i>Postupy při syntéze 1-deoxy, 3-deoxy a N-methyl analogů ceramidu</i>	16
3.2 PERMEAČNÍ POKUSY	22
3.2.1 <i>Příprava modelových membrán</i>	22
3.2.2 <i>Příprava Franzových cel</i>	22
3.2.3 <i>Měření relativní ztráty vody přes membránu</i>	23
3.2.4 <i>Měření elektrické impedance</i>	24
3.2.5 <i>Měření permeability membrán pro modelová léčiva</i>	24
4. VÝSLEDKY	27
4.1 VÝSLEDKY MĚŘENÍ RELATIVNÍ ZTRÁTY VODY	27
4.2 VÝSLEDKY MĚŘENÍ ELEKTRICKÉ IMPEDANCE	28
4.3 VÝSLEDKY MĚŘENÍ PERMEABILITY MEMBRÁN PRO LÉČIVA.....	29
4.3.1 <i>Permeabilita membrán pro theofylin</i>	29
4.3.2 <i>Permeabilita membrán pro indometacin</i>	30
5. DISKUZE	32
6. ZÁVĚR	34
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	35
8. LITERATURA.....	36

1. Úvod a cíl práce

Ceramidy mají v lidském organismu celou řadu funkcí. Podílí se jako signální molekuly na proliferaci, diferenciaci a apoptóze buněk, jsou součástí plazmatických membrán, a v neposlední řadě tvoří složku mezibuněčné hmoty v nejsvrchnější části kůže, tedy ve stratum corneum (SC). V SC mají především bariérovou funkci – chrání před negativním působením okolního prostředí a zabraňují ztrátám vody^(1; 2).

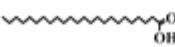
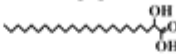
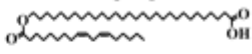
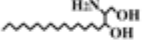
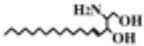
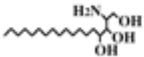
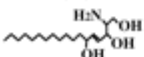
Kromě výzkumu přirozeně se vyskytujících ceramidů, je třeba věnovat se i výzkumu analogů těchto ceramidů, kvůli nalezení souvislostí mezi strukturou ceramidů a jejich schopností plnit bariérovou funkci kůže. Cílem mé práce byla syntéza 1-deoxy, 3-deoxy a *N*-methyl analogů ceramidu a následně výzkum permeability modelových membrán obsahujících právě tyto analogy.

2. Teoretická část

2.1 Ceramidy

2.1.1 Struktura ceramidů

Ceramidy jsou strukturně heterogenní sloučeniny, které mají v lidském organismu širokou škálu funkcí od buněčné signalizace po tvorbu bariéry v kůži. Skládají se ze dvou základních částí - bazického alkoholu a mastné kyseliny. Bazickým alkoholem může být sfingosin (S), fyto sfingosin (P), 6-hydroxysfingosin (H) nebo dihydro sfingosin (DS), na jejichž aminoskupinu se váže amidickou vazbou mastná kyselina (MK). Počet uhlíků MK se pohybuje mezi 16 až 34 uhlíky, avšak nejčastěji má 24 uhlíků. MK může být nesubstituovaná (N), α -hydroxylovaná (A) nebo ω -hydroxylovaná s esterově vázanou kyselinou linolovou (EO) (Obr. 1). Ceramidy jsou amfifilními sloučeninami skládajícími se z tzv. polární hlavy, tvořené amidickou vazbou a hydroxylovými skupinami, a dvou hydrofóbních řetězců pocházejících z alkylových řetězců bazického alkoholu a MK^(1;3).

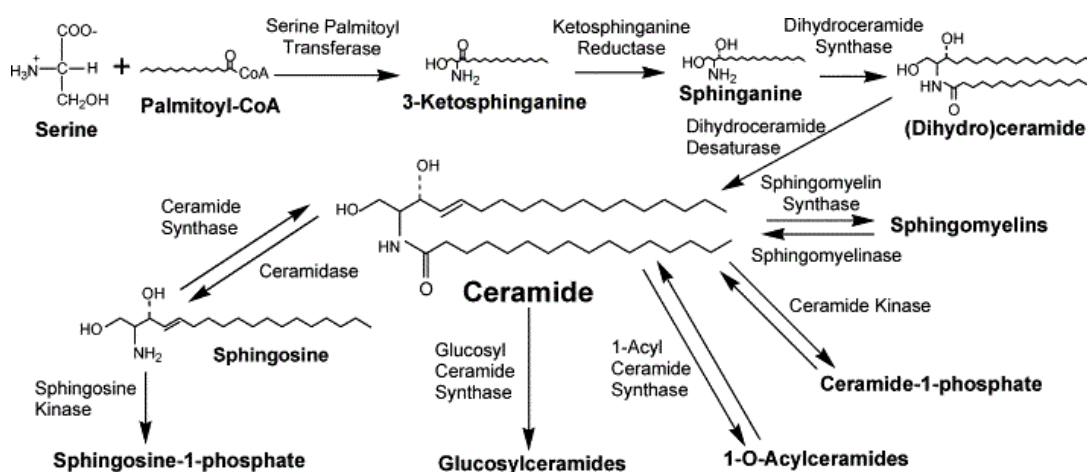
Fatty acid	Non-hydroxy fatty acid [N]	α -hydroxy fatty acid [A]	Esterified ω -hydroxy fatty acid [EO]
Sphingoid			
Dihydro sphingosine [DS] 	CER[NDS]	CER[ADS]	CER[EODS]
Sphingosine [S] 	CER[NS]	CER[AS]	CER[EOS]
Phytosphingosine [P] 	CER[NP]	CER[AP]	CER[EOP]
6-hydroxy sphingosine [H] 	CER[NH]	CER[AH]	CER[EOH]

Obr. 1: Struktura a názvy ceramidů vyskytujících se ve stratum corneum⁽³⁾.

2.1.2 Tvorba ceramidů v organismu

Ceramid může být vytvořen několika způsoby. Prvním z nich je syntéza de novo. Aminokyselina L-serin reaguje s palmitoyl-CoA za vzniku 3-ketosfinganinu. Reakce je katalyzována pomocí enzymu serinpalmitoyl-CoA-transferázy (SPT). 3-ketosfinganin se redukuje na sfinganin pomocí ketosfinganinreduktázy a následně reaguje v přítomnosti dihydroceramidsyntázy s acyl-CoA za vzniku dihydroceramidu. Dihydroceramiddesaturáza vytvoří dvojnou vazbu a vzniká ceramid⁽⁴⁾ (Obr. 2).

Ceramid může vzniknout také hydrolyzou sfingomyelinu (sfingomyelináza), ze sfingosinu (ceramidsyntáza) či z glykosfingolipidů. Ceramid se následně přeměňuje na sfingosin a sfingosin-1-fosfát, nebo se nabídne jako strukturní součást sfingomyelinů a glykosfingolipidů za uvolnění diacylglycerolu⁽²⁾.



Obr. 2: Schéma syntézy a dalšího metabolismu ceramidů⁽⁴⁾.

2.1.3 Funkce ceramidů v organismu

Ceramidy byly dříve považovány pouze za strukturní složku komplexních sfingolipidů (sfingomyeliny a glykolipidy), s jinak inertním metabolismem. Toto dogma bylo vyvráceno v 90. letech, kdy bylo zjištěno, že metabolismus sfingolipidů je složen z mnoha komplikovaně regulovaných biochemických drah, které mají vliv na různé funkce buňky. Z ceramidu se tak stala zkoumaná bioaktivní molekula, která se podílí na stresové reakci buňky, buněčném dělení i apoptóze⁽²⁾.

Hovoří se o tzv. sfingomyelinové-ceramidové signální cestě⁽⁵⁾. Nejen ceramidy se

totiž účastní signálních drah v buňce, ale stejně důležité jsou i sloučeniny účastnící se jejich metabolických cest, jako je sfingosin, sfingosin-fosfát, sfingomyeliny, ceramid-fosfát a další. Tyto všechny látky jsou také bioaktivními molekulami, které mají po navázání na cílové místo svoji specifickou buněčnou odpověď, ať už se jedná o spuštění apoptózy, vznik nádoru nebo angiogenezi ⁽²⁾.

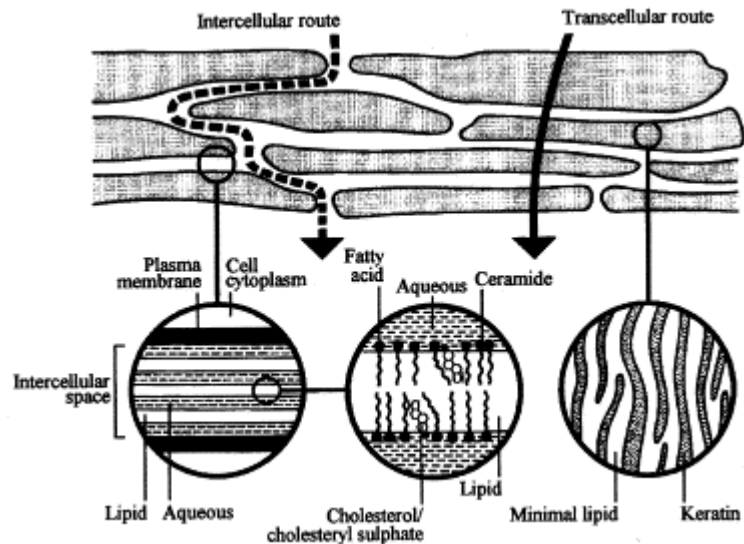
Kromě funkce ceramidu jako bioaktivní molekuly, je i součástí stratum corneum, kde vykonává svou bariérovou funkci.

2.1.4 Ceramidy v kůži

Kůže je největším lidským orgánem s plochou 1,8 m² a váhou 4,3-5 kg. Její hlavní funkcí je tvorba bariéry mezi vnitřním prostředím organismu a vnějšími vlivy. Zabraňuje mechanickému a chemickému poškození, ztrátám vody, či působení UV-zářením. Skládá se ze dvou vrstev - vnější epidermis a vnitřní dermis. Bariérová funkce kůže je soustředěna do nejsvrchnější vrstvy epidermis, tedy do stratum corneum (SC). Součástí SC je několik vrstev bezjaderných buněk tzv. korneocytů, které jsou vyplněny keratinem. Okolo korneocytů nacházíme lipidovou matrix, což je směs ceramidů (50 %), cholesterolu (25 %) a mastných kyselin (10 %). Dále zde nacházíme i menší množství esterů cholesterolu s organickými kyselinami, a to především cholesterol-sulfát ^(1; 6; 7).

Léčivo procházející skrze SC má dvě možnosti transportu - paracelulární (okolo korneocytů) a transcelulární (skrze korneocyty) ⁽¹⁾, přičemž upřednostňována je cesta paracelulární. Při cestě transcelulární je třeba překonat velké množství fázových rozhraní a proto je pro léčivo vhodnější paracelulární transport ^(8; 9) (Obr. 3).

V SC tvoří ceramidy několikvrstvou strukturu - tzv. lamely, vyplňující mezibuněčný prostor. Nalezneme zde 12 přirozeně se vyskytujících ceramidů, které se liší typem bazického alkoholu a typem acylu. Již zmíněné ceramidy, jejichž součástí je ω -hydroxylovaná kyselina s esterově vázanou kyselinou linoleovou, tvoří spojnici mezi jednotlivými ceramidovými lamelami ⁽¹⁾.



Obr. 3: Zjednodušená struktura stratum corneum s dvěma možnostmi transportu léčiva - paracelulární a transcelulární ⁽⁹⁾.

Důležitost ceramidů v mezibuněčném prostoru SC je nejlépe patrná při jejich nedostatku nebo nestandardním složení. Atopická dermatitida, způsobená narušenou tvorbou ceramidů a zvýšeným výskytem enzymu degradujícího jejich prekurzory, je nepříjemné chronické onemocnění při kterém je zvýšen prostup alergenů a mikrobu skrze kožní bariéru. Následkem jsou časté záněty kůže a vyvolání imunitní odpovědi organismu. Podobným příkladem je i psoriáza, při které se také vyskytuje menší množství ceramidů v SC, a to především těch, tvořených fytosfingosinem a 6-hydroxysfingosinem. Stejně jako u atopické dermatitidy se jako příčina onemocnění uvádí enzymatická porucha při tvorbě ceramidů ^(10; 11). Nejen onemocnění, ale dokonce i psychologický stres, může být příčinou snížené syntézy ceramidů ⁽¹⁾.

2.2 Analoga ceramidů

2.2.1 Důvod syntézy analogů ceramidů

Analoga ceramidů jsou syntetizována z více důvodů. Vzhledem k jejich vlivu na spouštění apoptózy se mezi nimi hledají potenciální nádorová chemoterapeutika, která by mohla být využita například jako prevence nádorového růstu u metastazující rakoviny tlustého střeva ⁽¹²⁾.

V případě kožních ceramidů je důvodem zkoumání struktury analogů snaha porozumět tomu, které strukturní prvky jsou v molekule ceramidů důležité, abychom mohli racionálněji navrhovat látky, které by mohly ovlivňovat permeabilitu kůže – např. látek pro regeneraci bariéry u kožních onemocnění nebo jako potenciálních akceleračních transdermálních permeací.

2.2.2 1-deoxy analogy sfingosinu a ceramidů

1-deoxy analogy sfingosinu a ceramidů vznikají v malém množství v lidském organismu v případě, že aminokyselina serin účastní se syntézy sfinganinu je nahrazena jinou aminokyselinou a to alaninem. Následkem této záměny je vznik 1-deoxysfinganinu, který je dále metabolizován za vzniku různých 1-deoxy analogů.

Kondenzace alaninu a palmitoyl-CoA je zajištěna enzymem SPT, jako je tomu při použití serinu. Tato skutečnost byla ověřována několika různými způsoby. Za první inkorporací značeného alaninu do 1-deoxysfinganinu, dále inhibicí produkce tohoto sfinganinu myriocinem (inhibitor SPT) a absencí inkorporovaného značeného palmitátu v značeném 1-deoxysfinganinu v buňkách bez SPT.

1-deoxysfinganin vzniká běžně v malém množství, ale jeho přítomnost byla zjištěna až při zkoumání toxických účinků mykotoxinu fumonisinu B1 (inhibitor ceramidsyntázy). Při otravě tímto toxinem vzniká nejen velké množství sfinganinu a sfinganin-1-fosfátu, ale právě i 1-deoxysfinganinu, který má dokonce nejvyšší podíl na toxicitě fumonisinu ⁽¹³⁾.

1-deoxysfingolipidy vznikají nadměrně i při poruše genu kódujícího SPT. Tato genová porucha, která způsobuje upřednostňování využití alaninu před serinem, způsobuje dědičnou sensorickou autonomní neuropatii typu 1, která je zapříčiněna právě zvýšenou tvorbou neurotoxických 1-deoxysfingolipidů ⁽¹⁴⁾.

2.2.3 N-methylsfingosin

Jak již bylo řečeno, sfingoidní baze jsou silně bioaktivní molekuly. Jejich působení je úzce spjato s funkcí proteinkinázy C, u níž je známá souvislost se vznikem rakoviny. Právě kvůli tomu jsou analogy sfingoidních bazí zkoumány z hlediska protirakovinného působení. U sfingosinu bylo zjištěno, že inhibuje indukci ornithindekarboxylázy (ODC) účastní se metabolismu polyaminů, jejíž nadměrná aktivita je spojena se vznikem rakoviny kůže. Dlouhodobé studie však vedly k poznání,

že sfingosin nemá ochrannou aktivitu a ve větším množství rakovinu sám způsobuje ^(15; 16).

N-methyssfingosin byl studován stejně jako sfingosin z hlediska působení proti rakovině kůže. Podrobil se celkem čtyřem testům na myších - vliv na ODC aktivitu, epidermální hyperplazii a dvě studie karcinogenity s různými iniciátory kancerogeneze. ODC aktivita během užívání klesla, ale méně než při užití sfingosinu. Hyperplazie kůže se užíváním sice nezhoršila, jako tomu bylo u sfingosinu, ale ani se nezlepšila. Nejzajímavější jsou studie karcinogenity, kdy byly myši vystaveny lokálnímu působení iniciátorů kancerogeneze a následně byly topicky chráněny před vznikem nádoru *N*-methyssfingosinem. Během studie bylo zaznamenáno o 20 % více přeživších myší ve chráněné skupině oproti skupině nechráněné *N*-methyssfingosinem ⁽¹⁶⁾.

3. Experimentální část

3.1 Syntéza

3.1.1 Chemikálie a přístroje

1-Deoxysfingosin, 3-deoxysfingosin, *N*-methylsfingosin a *N*-(tetrakosanoyl)-sfingosin (Cer) byly zakoupeny od Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Ostatní chemikálie použité při syntézách pochází od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo). Při tenkovrstvé chromatografii byly použity TLC desky se silikagelem 60 F₂₅₄ od firmy Merck (Darmstadt, Německo). NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Mercury – Vx BB 300, ¹H při 300 MHz a ¹³C při 75 MHz nebo VNMR S500 NMR, ¹H při 500 MHz a ¹³C při 125 MHz (Palo Alto, CA, USA). Při měření hmotnostní spektrometrie byl použit přístroj Acquity UPLC s MS/MS Quattro Micro detektorem (Micromass+Waters, Milford, MA, USA).

3.1.2 Postupy při syntéze 1-deoxy, 3-deoxy a *N*-methyl analogů ceramidu

Při syntéze analogů ceramidu byly zvoleny dva postupy. Postup A zahrnoval syntézu acylačního činidla v podobě sukcinimid-*N*-ylesteru kyseliny lignocerové a následnou acylaci příslušného sfingosinu. Tento postup byl prováděn u 1-deoxy analogu a *N*-methyl analogu, ale byl vhodný jen u 1-deoxy analogu. Postup B byla reakce kyseliny lignocerové s *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimidem (EDC) a následně reakce vzniklého produktu se sfingosinem. Postup B byl zvolen u 3-deoxy analogu a *N*-methyl analogu.

3.1.2.1 Postup A syntézy analogů ceramidu

Syntéza analogů ceramidu probíhala ve dvou krocích. Nejprve se jednalo o přípravu acylačního činidla sukcinimid-*N*-ylesteru kyseliny lignocerové **3** z kyseliny lignocerové **1** a *N*-hydroxysukcinimidu **2**. Následně byla provedena acylace 1-deoxysfingosinu a *N*-methylsfingosinu za vzniku příslušného analogu ceramidu: 1-deoxy analogu ceramidu (1-deO-Cer) **4**, resp. *N*-methyl analogu ceramidu (*N*-Me-Cer) **5** (Schéma 1).

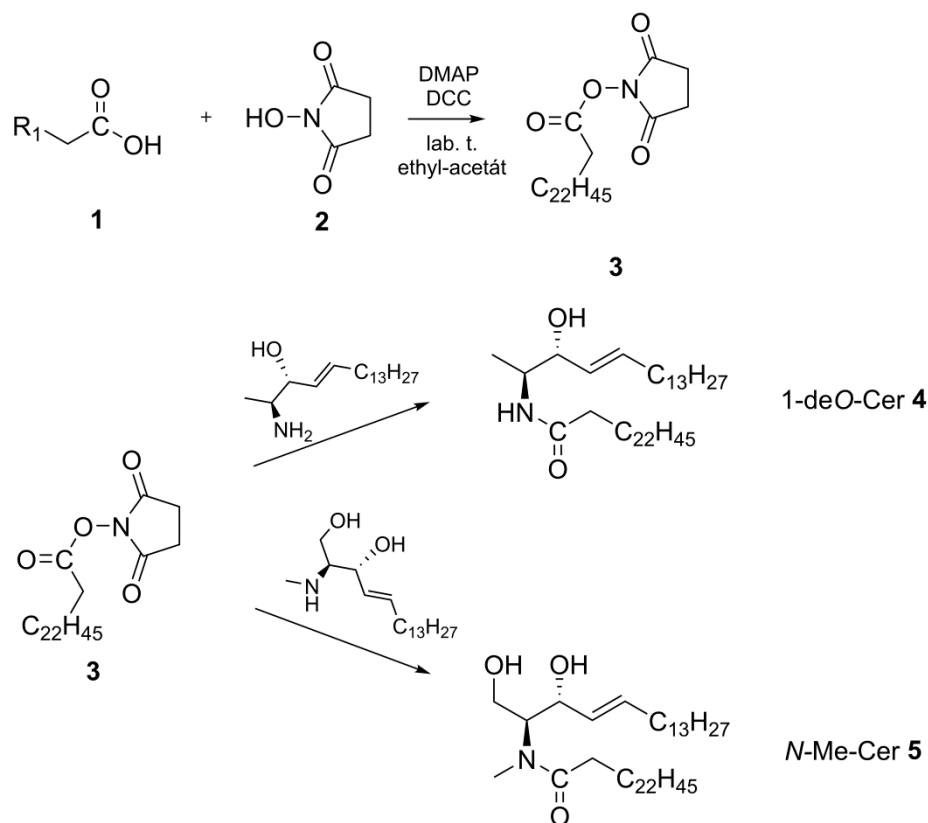
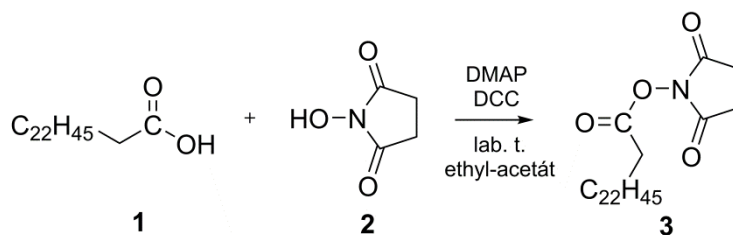


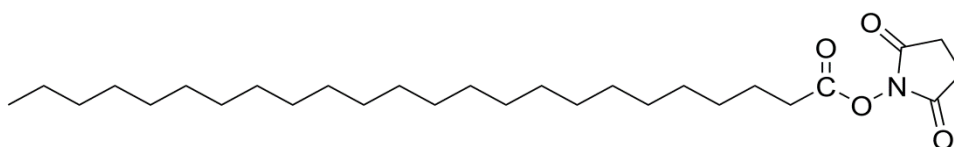
Schéma 1. Postup A syntézy analogů ceramidu

3.1.2.1.1 Příprava sukcinimid-*N*-ylesteru kyseliny lignocerové (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-tetrakosanoátu (3))



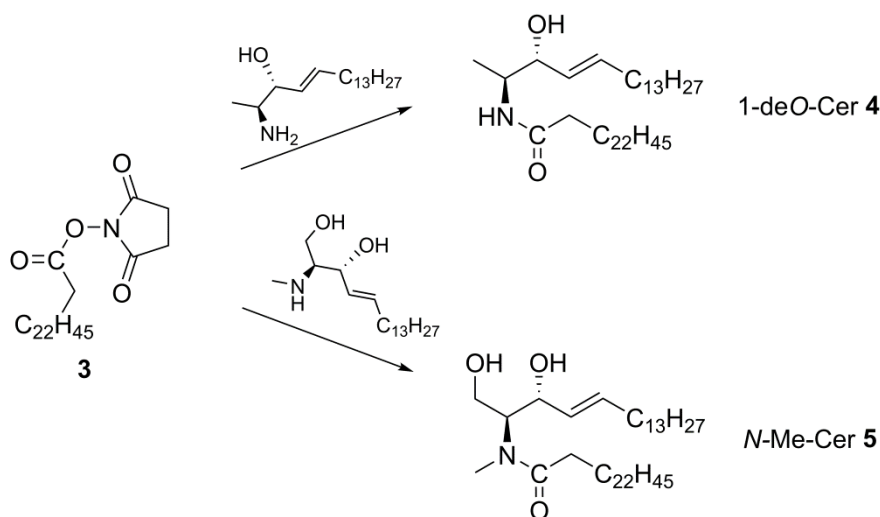
Výchozími látkami této syntézy byla kyselina lignocerová **1** a *N*-hydroxysukcinimid. **2** 0,5 g (1,36 mmol) kyseliny lignocerové **1**, 0,15 g (1,36 mmol) *N*-hydroxysukcinimidu **2**, 0,016 g (1,36 mmol), 4-dimethylaminopyridinu (DMAP) a 0,309 g (1,496 mmol) dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) bylo rozpuštěno v 50 ml ethyl-acetátu. Reakce byla prováděna bez přístupu vzdušné vlhkosti v dusíkové atmosféře, za laboratorní teploty a stálého míchání. Po 24 hodinách byla provedena tenkovrstvá chromatografie (TLC) (mobilní fáze chloroform, $R_f = 0,4$), která ukázala přítomnost velkého množství nezreagovaných výchozích látek. Reakce se tedy nechala

probíhat za stejných podmínek ještě týden. Následně byla znovu provedena TLC a reakce byla ukončena. Směs byla vytřepána mezi 150 ml okyselené vody (0,083 mol/l HCl) a ethyl-acetát. Organická fáze byla vytřepána ještě dvakrát, pokaždé se 150 ml vody. Organická fáze byla odpařena na vakuové odparce. Výsledný produkt byl vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 4:1).



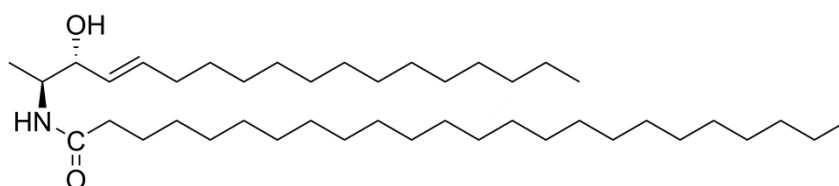
- 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-tetrakosanoát **3** je bílá krystalická látka. Výtěžek reakce byl 62%. TLC: mobilní fáze chloroform, $R_f = 0,4$. Molekulární hmotnost je 465,71 g/mol. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2,83 (s, 4H), 2,59 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,80 – 1,65 (m, 2H), 1,45 – 1,15 (m, 40H), 0,88 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 169,2, 168,7, 31,9, 30,9, 29,7, 29,7, 29,6, 29,5, 29,3, 29,1, 28,8, 25,6, 24,6, 22,7, 14,1.

3.1.2.1.2 Příprava analogů ceramidu z sukcinimid-N-ylesteru kyseliny lignocerové a příslušného sfingosinu



Při přípravě ceramidů byly použity komerčně dostupné sfingosiny: 1-deoxysfingosin a *N*-methylsfingosin. Reakce probíhala bez přístupu vzdušné vlhkosti za laboratorní teploty a stálého míchání. 15 mg (53 μmol) 1-deoxysfingosinu nebo 15 mg (48 μmol) *N*-methylsfingosinu bylo společně s 27 mg (58 μmol) kyseliny

lignocerové **3** rozpuštěno v 15 ml dichlormethanu. Reakce se nechala probíhat 4 dny za monitorování TLC směsí. Směs byla následně třikrát vytřepána s 3 x 20 ml 26% roztoku NaCl a jednou byla vodná fáze vytřepána s 20 ml chloroformu. Organické fáze byly spojeny, vysušeny pomocí suchého síranu sodného a odpařeny na vakuové odparce. 1-deO-Cer byl vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie, v případě *N*-Me-Cer se však produkt nepodařilo získat.



- *N*-((2*S*,3*R*,*E*)-3-hydroxyoktadec-4-en-2-yl)tetrakosanamid (1-deO-Cer) **4** je bílá krystalická látka. Výtěžek reakce byl 50,8%. TLC: mobilní fáze chloroform/methanol 10:1 $R_f = 0,8$. Při sloupcové chromatografii byla použita mobilní fáze chloroform/hexan 2:1. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 5,79 – 5,60 (m, 2H), 5,42 (dd, $J = 15,4, 6,1$ Hz, 1H), 4,20 – 4,05 (m, 2H), 2,20 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,08 – 1,98 (m, 2H), 1,69 – 1,55 (m, 2H), 1,39 – 1,10 (m, 62H), 1,06 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H), 0,88 (t, $J = 6,2$ Hz, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 173,9, 134,2, 128,1, 75,6, 50,2, 36,7, 32,4, 31,9, 30,9, 29,7, 29,7, 29,6, 29,5, 29,4, 29,3, 29,2, 28,8, 25,8, 25,6, 24,6, 22,7, 15,4, 14,1. MS (APCI+): m/z 635,8 ($\text{M} + \text{H}$)⁺; 617,0 ($\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}$)⁺.

3.1.2.2 Postup B syntézy analogu ceramidu

Syntéza analogů ceramidu probíhala ve dvou krocích v jedné reakční směsi. Nejprve reagovala kyselina lignocerová **1** s *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimidem (EDC) **7** za vzniku meziprojektu **8**. Následně byl přidán příslušný sfingosin, tedy *N*-methylsfingosin nebo 3-deoxysfingosin, za vzniku *N*-Me-Cer **5** resp. 3-deoxy analogu ceramidu tedy 3-deO-Cer **6** (Schéma 2).

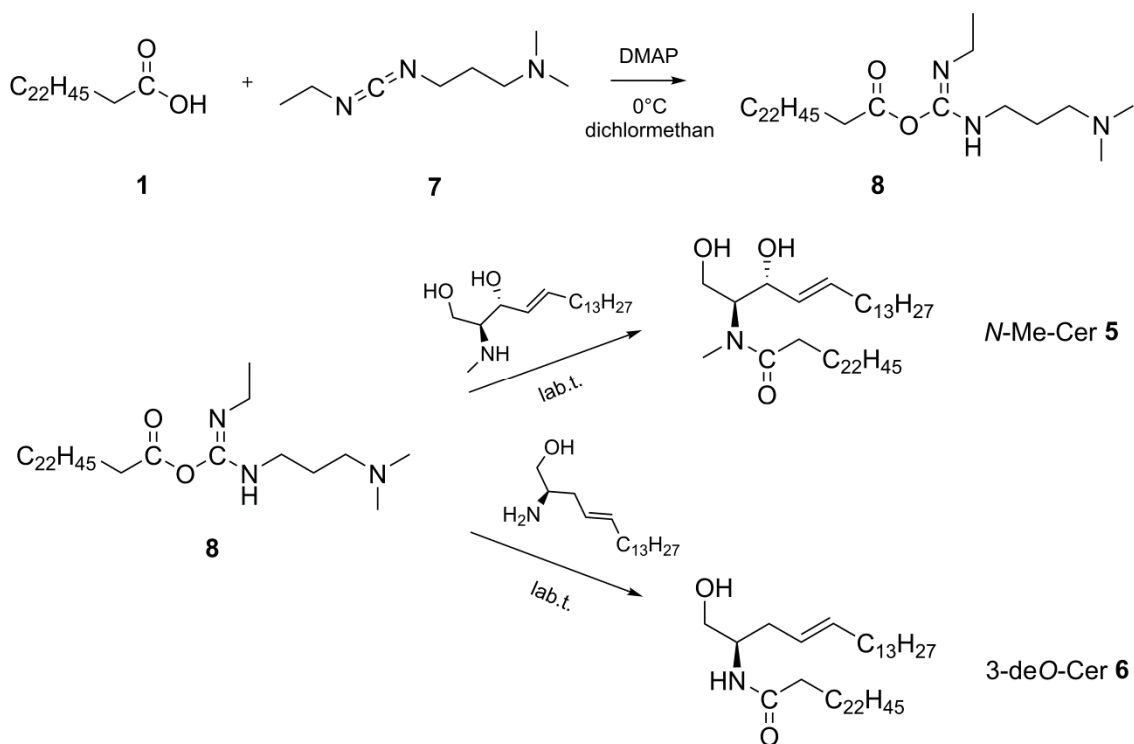
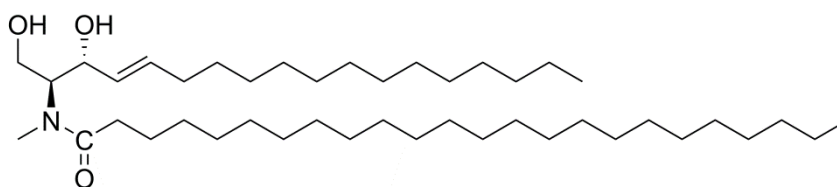


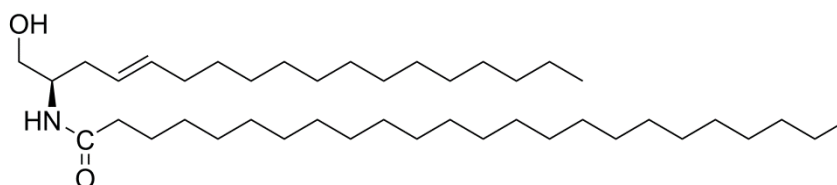
Schéma 2. Postup B syntézy analogů ceramidu

3.1.2.2.1 Příprava 3-deoxy a *N*-methyl analogů ceramidu

Při reakci bylo použito 15 mg (53 μ mol) 3-deoxysfingosinu nebo 15 mg (48 μ mol) *N*-methylsfingosinu. Sfingosiny jsou komerčně dostupné. 1,2 násobku ekvimolárního množství kyseliny lignocerové **1**, 1,2 násobku ekvimolárního množství EDC **7** a 0,1 násobku ekvimolárního množství DMAP bylo rozpuštěno v 15 ml dichlormethanu. Reakce probíhala bez přístupu vzdušné vlhkosti, za stálého míchání a byla chlazena ledem. Po půl hodině byl přidán *N*-methylsfingosin resp. 3-deoxysfingosin. Reakce dále probíhala za laboratorní teploty jeden týden za monitorování TLC. Reakční směs byla doplněna 15 ml chloroformu a vytřepána 3 x 30 ml okyselené vody (0,083 mol/l HCl). Organická fáze byla vysušena pomocí suchého síranu sodného a odpařena na vakuové odparce. Čistý produkt byl získán pomocí sloupcové chromatografie.



- *N*-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)-*N*-methyltetrakosanamid (*N*-Me-Cer) **5** je bílá krystalická látka. Výtěžek reakce byl 17%. TLC: mobilní fáze chloroform/methanol 10:1 $R_f = 0,25$. Při sloupcové chromatografii byla použita mobilní fáze hexan/ethylacetát 1:1. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 5,72 (dt, $J = 14,9, 7,3$ Hz, 1H), 5,55 – 5,45 (m, 1H), 4,54 – 4,48 (m, 1H), 4,04 – 3,89 (m, 2H), 3,78 – 3,65 (m, 1H), 3,00 (s, 3H), 2,29 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,10 – 1,96 (m, 2H), 1,68 – 1,53 (m, 2H), 1,45 – 1,06 (m, 62H), 0,89 (t, $J = 6,9$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 175,2, 134,4, 129,7, 71,7, 61,9, 58,4, 36,8, 34,5, 32,4, 32,3, 31,9, 30,9, 29,7, 29,6, 29,5, 29,5, 29,5, 29,4, 29,4, 29,3, 29,2, 29,0, 29,0, 25,0, 22,7, 14,1. MS (APCI⁺): m/z 664,9 ($\text{M} + \text{H}$)⁺; 647,0 ($\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}$)⁺; 628,9 ($\text{M} + \text{H} - 2\text{H}_2\text{O}$)⁺.



- (*R*,*E*)-*N*-(1-hydroxyoktadec-4-en-2-yl)tetrakosanamid (3dOCer) **6** je bílá krystalická látka. Výtěžek reakce byl 22,3%. TLC: mobilní fáze chloroform/methanol 10:1 $R_f = 0,75$. Při sloupcové chromatografii byla použita mobilní fáze chloroform/methanol 100:1. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 5,69 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H), 5,61 – 5,45 (m, 1H), 5,42 – 5,26 (m, 1H), 3,95 – 3,85 (m, 1H), 3,76 – 3,53 (m, 2H), 2,40 – 2,10 (m, 4H), 2,07 – 1,93 (m, 2H), 1,67 – 1,56 (m, 2H), 1,39 – 1,06 (m, 62H), 0,93 – 0,82 (m, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 174,4, 165,4, 134,9, 133,7, 129,7, 125,1, 66,0, 51,8, 36,8, 34,4, 32,5, 31,9, 29,7, 29,7, 29,5, 29,4, 29,4, 29,3, 29,2, 25,8, 22,7, 14,1. MS (APCI⁺): m/z 634,9 ($\text{M} + \text{H}$)⁺; 616,9 ($\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}$)⁺.

3.2 Permeační pokusy

3.2.1 Příprava modelových membrán

Pro sledování, jak ovlivňuje permeační vlastnosti SC přítomnost nasyntetizovaných analogů ceramidu (1-deO-Cer, 3-deO-Cer a N-Me-Cer), bylo třeba vytvořit modelové membrány obsahující tyto ceramidy místo běžně se v kůži vyskytujících ceramidů. Tyto modelové membrány obsahovaly ekvimolární množství cholesterolu, kyseliny lignocerové a příslušného analogu ceramidu. Kromě těchto látek bylo přidáno ještě 5 % z celkové hmotnosti cholesterol-sulfátu. Jako kontrolní vzorek byla použita směs cholesterolu, kyseliny lignocerové, cholesterol-sulfátu a Cer.

Po přesném navážení byla směs lipidů rozpuštěna v hexan/96% ethanol 2:1 v poměru 1 ml rozpouštědla na 4,5 mg lipidové směsi. Směs obsahující 3-deO-Cer vytvořila suspenzi, ačkoliv bylo přidáno dvojnásobné množství rozpouštědla. Suspenze byla tedy homogenizována za použití ultrazvukové lázně a byla použita obdobně jako roztoky ostatních lipidových směsí.

Polykarbonátové filtry Nucleopore s póry o průměru 15 nm byly namočeny na 5 minut do hexan/96% ethanol 2:1. Následně byly z lázně vyjmuty a vysušeny. Filtry byly upevněny do ocelových držáků s otvorem o průměru 1 cm a obsahu 0,79 cm². Nástřík lipidů byl proveden třikrát za použití 3 x 100 µl roztoku o koncentraci 4,5 mg/ml.

U suspenze obsahující 3-deO-Cer byl nástřík proveden 6 x 100 µl roztoku o koncentraci 2,25 mg/ml. Nástřík byl prováděn pod proudem dusíku za použití přístroje Linomat V (Camag, Muttenz, Switzerland) vybaveným přídatným pohybem po ose y⁽¹⁷⁾. Průtoková rychlost byla 10,2 µl/min na plochu 10 x 10 mm. Na 1 cm² bylo použito 1,35 mg směsi lipidů. Takto připravené membrány byly vysušeny v exsikátoru a následně zahřáty na 90 °C. Tato teplota byla udržována po dobu 20 minut, pak se nechaly membrány pomalu chladnout na 32°C. Při této teplotě byly inkubovány 24 h.

3.2.2 Příprava Franzových cel

Při měření permeace byly membrány vloženy do Franzových cel. Skleněná Franzova cela se skládá ze spodní – akceptorové a svrchní - donorové části. Válcovitá spodní část je opatřena raménkem pro odebírání vzorků a její objem je přibližně 6,5 ml.

Svrchní část je tvořena dutým skleněným válcem. Mezi spodní a svrchní část se vsouvá dvoudílný teflonový držák, mezi jehož spodní a svrchní díl se vkládá modelová membrána. Horní a dolní část cely, svírající teflonový držák, je spojena pomocí gumiček.

Akceptorová část cely je naplněna 10 mM izotonizovaným fosfátovým pufrům o pH=7,4 (PBS) obsahujícím 50 mg/l gentamicinu. Teplota akceptorové části je udržována na 32°C, což je přibližně teplota povrchu těla. Objem pufru musí být vzhledem k rozdílným objemům akceptorových částí cel měřen u každé cely individuálně a je zahrnut v kalkulacích. Po 12 hodinách vyrovnávání teploty na 32°C je změřena relativní ztráta vody přes membránu a následně i elektrická impedance. Po dalších 12 hodinách je měřena permeace dvou modelových léčiv (theofylinu a indometacinu) přes membránu.

3.2.3 Měření relativní ztráty vody přes membránu

Při měření relativní ztráty vody přes modelovou membránu bylo použito vybavení pro měření transepidermální ztráty vody (transepidermal water loss – TEWL), a to Tewameter[®] TM 300 sonda a Multi Probe Adapter Cutometer[®] MPA 580 (CK eectronic GmbH, Köln, Germany). Měření je prováděno na základě difuze v otevřené komoře. Tlakový gradient vodních par přecházejících přes membránu je měřen pomocí dvou párů senzorů (teplota a relativní vlhkost), které jsou umístěny ve dvou různých výškách v dutém válci (výška válce jsou 2 cm a průměr 1 cm). Hlava sondy, která je tvořena tímto válcem, je umístěna horizontálně na měřenou plochu, přičemž je vyvíjen konstantní tlak na tuto plochu. Minimální velikost hlavy snižuje vliv vzdušných turbulencí⁽¹⁸⁾. Při měření ztráty vody přes modelovou membránu byla sundána svrchní část Franzovy cely a hlava sondy byla přiložena na kruhový otvor v držáku membrán (0,5 cm²). Vzdálenost mezi uchycenou membránou a hlavou sondy byla 0,6 cm. TEWL byl měřen po dobu přibližně 100 – 160 s, dokud nedošlo k ustálení měřené hodnoty. Hodnoty byly měřeny v jednotkách [g/h/m²]. Podmínky měření byly přibližně stejné po celou dobu měření: teplota vzduchu 25-26 °C a relativní vlhkost vzduchu 40 – 44 %. Protože použití membránového držáku ovlivňuje výsledky měření (sonda není přiložena přímo na plochu membrány), získaná data násobena koeficientem 1,393, který byl získán kalibrací použitých držáků (P. Pullmannová, nepublikovaná data).

3.2.4 Měření elektrické impedance

Elektrická impedance byla měřena pomocí LCR metru 4080 (Conrad Electronic, Hirschau, Germany; rozsah měření od 20 Ω do 10 M Ω , měřeno v k Ω , chyby v hodnotách k Ω < 0,5%), který byl nastaven v paralelním režimu se střídavou frekvencí 120 Hz. Elektrická impedance se používá k neinvazivnímu a rychlému in vivo vyhodnocení integrity kůže. Ekvivalentní model jako je při měření impedance kůže, je obvod z paralelně zapojeného rezistoru a kondenzátoru ⁽¹⁹⁾. Impedance je míra odporu, který představuje obvod pro procházející střídavý proud. Zahrnuje nejen odpor střídavého proudu, ale i jeho kapacitu ⁽²⁰⁾. Odpor proudu procházejícího skrze kůži je tvořen odporem kůže a šířkou stratum corneum a je nepřímo úměrný k permeabilitě kůže pro ionty nebo polární látky. Pro dobrý odhad odporu kůže je elektrická impedance měřená v paralelním režimu při frekvenci 100 Hz ⁽²¹⁾. Při měření impedance modelových membrán bylo použito stejné nastavení LCR metru. Získané hodnoty jsou výsledkem měření odporu střídavého proudu.

Do donorové části Franzovy cely, přímo na modelovou membránu bylo přidáno 500 PBS o pH = 7,4. Impedance modelových membrán byla měřena pomocí dvou sond z nerezové oceli. Jedna z nich byla ponořena skrze raménko do akceptorové části cely a druhá byla vložena do PBS v donorové části cely. Měření bylo prováděno pro každou celu zvlášť a poté byl PBS z donorové části odstraněn.

3.2.5 Měření permeability membrán pro modelová léčiva

3.2.5.1 Příprava donorových vzorků léčiv

Modelovými léčivy použitými při permeačních pokusech byl indometacin a theofylin. Byly připraveny suspenze těchto léčiv – 5% (w/w) suspenze theofylinu (TH) a 2% suspenze indometacinu (IND) v 60% propylenglykolu. Vzorky byly protřepány a inkubovány při teplotě 32°C po dobu 12 hodin. Před jejich použitím byly opětovně protřepány.

3.2.5.2 Permeační pokusy na modelových membránách

Do donorové části cely, přímo na modelovou membránu, bylo aplikováno 100 μ l suspenze léčiva – buďto 5% TH nebo 2% IND. Každé dvě hodiny od aplikace léčiva byl z akceptorové části cely odebírán vzorek o objemu 300 μ l a zpět bylo vráceno stejné

množství PBS. Množství léčiva, které prošlo skrze membránu, bylo detekováno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Po deseti hodinách byla membrána opatrně vymyta pomocí PBS, pH 7,4, a zbytek PBS byl vysušen pomocí buničité vaty. Akceptorová část byla vylita a vypláchnuta a následně znovu naplněna PBS. 12 hodin byly cely ponechány v lázni, aby bylo dosaženo stálé teploty 32 °C a aby došlo k úplnému vysušení membrány. Celý pokus se opakoval s použitím suspenze druhého léčiva.

3.2.5.3 Detekce množství léčiv ve vzorcích pomocí HPLC

Vzorky odebrané během permeačních pokusů byly vyhodnocovány pomocí HPLC s izokratickou elucí za použití přístroje Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japan) skládajícím se z pumpy LC-20AD s odplyňovače DGU-20A3, autodávkače SIL-20A HT, kolony CTO-20AC, detektoru SPD-M20A a komunikačního modulu CBM-20A. Data byla analyzována za použití software LCsolutions 1.22. Separace TH bylo dosaženo na reverzní fázi na koloně LiChroCART 250-4 (LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, Merck, Darmstadt, Německo) při teplotě 35 °C za použití mobilní fáze methanol/0,1 M NaH₂PO₄ (v/v) a při průtokové rychlosti 2 ml/min. 20 µl vzorku bylo vstříknuto do kolony. Měření UV absorpance bylo prováděno při vlnové délce 272 nm. Retenční čas TH byl 3,2±0,1 min. Vzorky obsahující IND byly analyzovány pomocí kolony LiChroCART 250-4 (LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, Merck) za použití mobilní fáze acetonitril/voda/kyseliny octová v poměru 90:60:5 (v/v/v) při průtokové rychlosti 2 ml/min. 100 µl bylo vstříknuto do kolony nahřáté na 40°C. UV absorpance byla měřena při vlnové délce 260 nm, při šířce pásma 4 nm. Retenční čas IND byl 3,1±0,1 min. Obě metody byly již dříve validovány⁽²²⁾.

3.2.5.4 Vyhodnocení permeačních pokusů

Z výsledků permeačních pokusů nás nezajímaly jen koncentrace léčiva v daných časových intervalech, ale především kumulované množství a flux léčiv TH a IND v akceptorové části Franzovy cely. Ta byla spočítána ze zjištěných koncentrací léčiv v daných časových intervalech, zároveň však bylo nutno počítat s nahrazením odebraného vzorku pomocí PBS. Jako vzor výpočtu uvádím výpočet pro kumulaci léčiva v cele po 6 hodinách: $m_{6h} = (c_{6h} \cdot V + c_{4h} \cdot 0,3 + c_{2h} \cdot 0,3)/A$. m_{6h} zde označuje kumulativní hodnotu vzorku odebraného po 6 hodinách, V je objem akceptorové části,

A je difuzní plocha a c_{it} je koncentrace léčiva v daném čase. Kumulativní hodnoty byly dány do závislosti na čase a flux léčiva byl spočítán jako směrnice přímky, která vznikla lineární regresí funkce. Flux léčiva byl vypočítán v programu Excel.

3.2.5.5 Statistická analýza dat

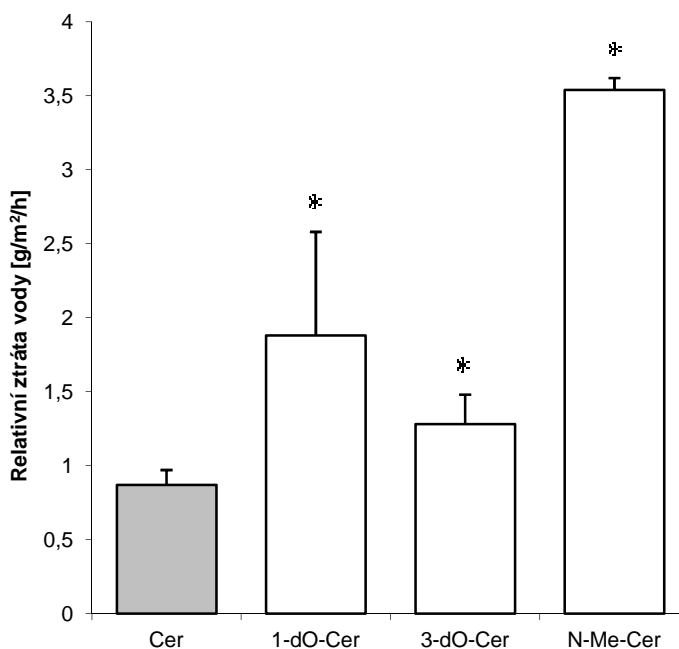
Všechna data jsou prezentována jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (SEM), počet opakování (n) je vyznačen u příslušného obrázku ve výsledcích. Pro srovnání charakteristik připravených membrán obsahujících modifikované ceramidy vzhledem ke kontrolnímu vzorku s přirozeným ceramidem byl použit pro vyhodnocení statistické významnosti nepárový Studentův t-test s dvoustranným rozložením, dvojvýběrový s nerovností rozptylů (na hladině pravděpodobnosti $p < 0,05$) v programu Excel.

4. Výsledky

4.1 Výsledky měření relativní ztráty vody

Relativní ztráta vody byla měřena pomocí TEWL metru v jednotkách $[g/m^2/h]$, ale na rozdíl od jeho in vivo použití, nebyla sonda přiložena přímo na membránu, ale mezi membránou a sondou byla vzdálenost 0,6 cm. Tuto okolnost je třeba zohlednit při interpretaci výsledků a hodnotu, která vyšla na TEWL metru, je třeba vynásobit konstantou 1,393, která byla získána kalibrací použitých držáků (P. Pullmannová, nepublikovaná data).

Porovnání jednotlivých analogů ceramidu s kontrolním vzorkem můžeme vidět na grafu (Graf 1). Je tu zřejmé navýšení relativní ztráty vody u všech analogů v porovnání se standardem. Zatímco se u Cer změřeny a vypočteny hodnoty $0,87 \pm 0,1 g/m^2/h$, tak u 3-dO-Cer to bylo $1,28 \pm 0,2 g/m^2/h$, u 1-dO-Cer $1,88 \pm 0,7 g/m^2/h$ a u N-Me-Cer vidíme dokonce více jak čtyřnásobné navýšení hodnot - $3,54 \pm 0,1 g/m^2/h$. Všechny výsledky měření jsou statisticky významně odlišné od standardu ($p < 0,05$).

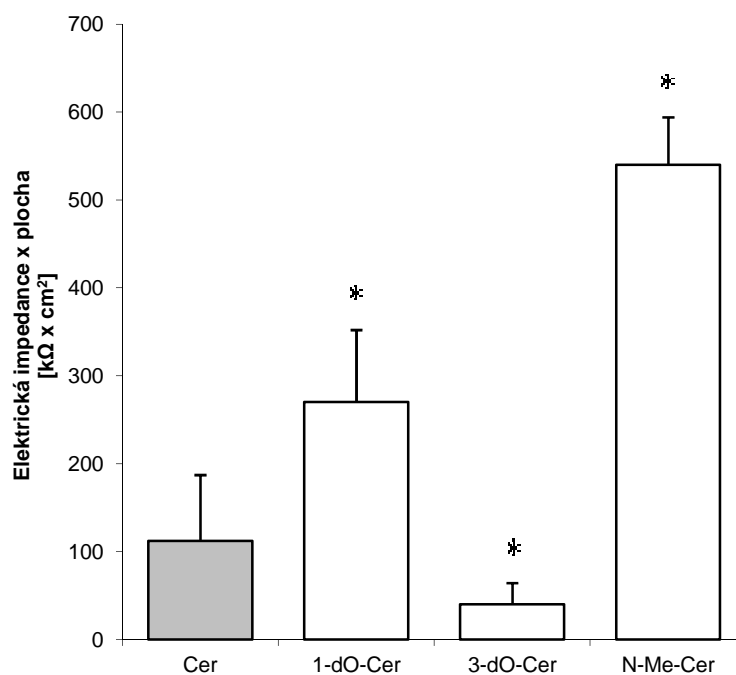


Graf 1: Výsledky měření relativní ztráty vody. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM, $n = 5-9$. * značí statisticky významné zvýšení ztráty vody oproti kontrolnímu vzorku ($p < 0,05$).

4.2 Výsledky měření elektrické impedance

Elektrická impedance byla měřena pomocí LCR metru a vyjadřuje odpor střídavého proudu procházejícího skrze membránu. Hodnoty elektrické impedance by měly být nepřímo úměrné fluxu iontů a polárních molekul skrze modelovou membránu. Hodnoty, které jsme získali měřením v rámci jednoho ceramidu se značně lišily. Srovnání elektrických impedancí jednotlivých analogů můžeme vidět na grafu (Graf 2).

Elektrická impedance membrány s přirozeným Cer byla 112 ± 75 k Ω . U 3-dO-Cer jsme jako u jediného zaznamenali hodnoty nižší, a to 40 ± 24 k Ω . U zbylých analogů byly hodnoty elektrické impedance vyšší: 1-dO-Cer 270 ± 82 k Ω a N-Me-Cer 540 ± 54 k Ω . Všechny výsledky měření jsou statisticky významně odlišné od standardu ($p < 0,05$).



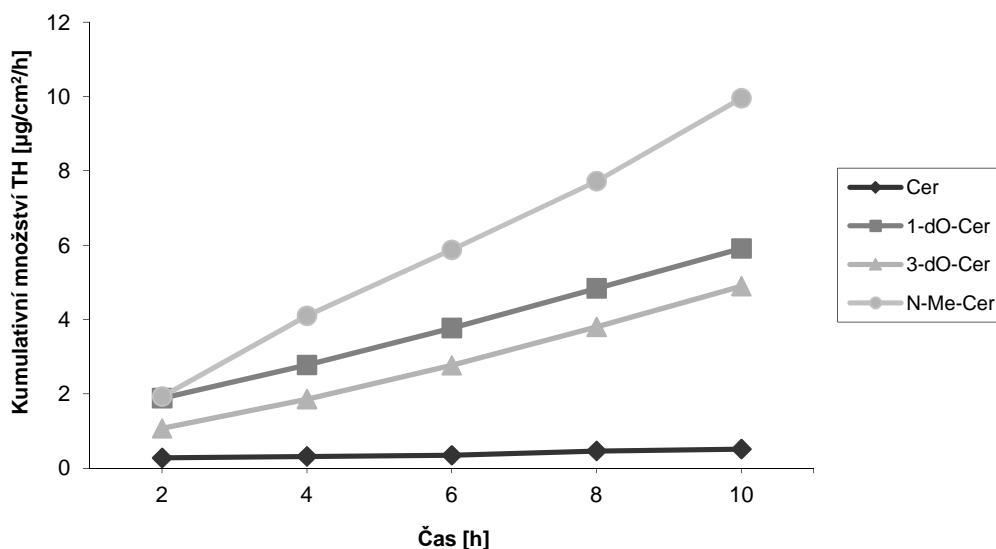
Graf 2: Výsledky měření elektrické impedance. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM, $n = 5-9$. * značí statisticky významnou změnu elektrické impedance oproti kontrolnímu vzorku ($p < 0,05$).

4.3 Výsledky měření permeability membrán pro léčiva

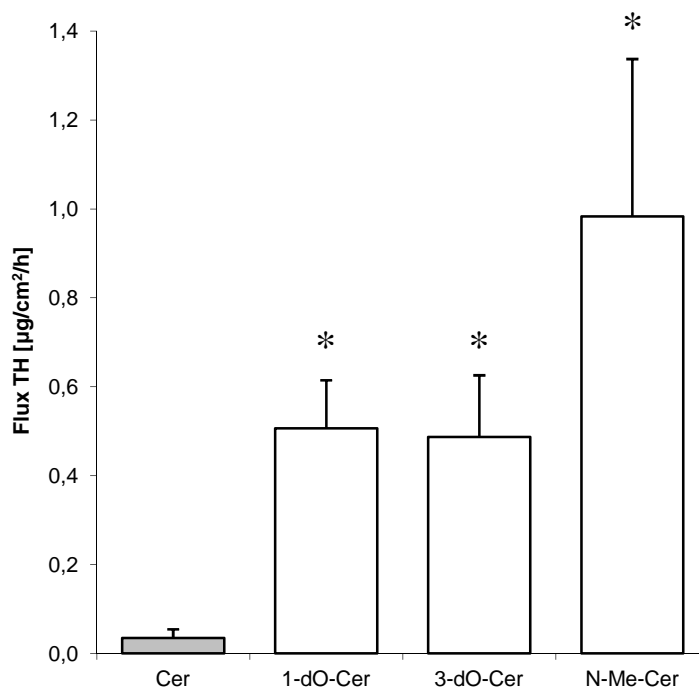
4.3.1 Permeabilita membrán pro theofylin

Při vyhodnocení permeability membrány pro TH byly použity výsledky měření koncentrace léčiva v odebíraných vzorcích. K určení koncentrace byla použita HPLC. Kromě zjištění koncentrací v jednotlivých časových obdobích, byla potřeba vypočítat kumulaci léčiva a jeho flux skrze modelovou membránu. Kumulaci léčiva v jednotlivých časových úsecích můžeme sledovat na grafu (Graf 3).

Flux léčiva byl vypočítán jako směrnice přímky vzniklé lineární regresi kumulace léčiva v závislosti na čase. Flux léčiva, skrze modelové membrány obsahující jednotlivá analoga ceramidu, můžeme vidět na grafu (Graf 4). Nejmenší permeabilitu pro TH vykazuje membrána obsahující standardní Cer: flux TH je $0,03 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Všechny ostatní membrány vykazují permeabilitu řádově vyšší: flux TH u 1-dO-Cer $0,51 \pm 0,11 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, u 3-dO-Cer $0,49 \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a u N-Me-Cer sledujeme nejvyšší flux TH, a to $0,99 \pm 0,35 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Všechny výsledky měření jsou statisticky významně odlišné od standardu ($p < 0,05$).



Graf 3: Výsledky měření kumulativního množství TH.

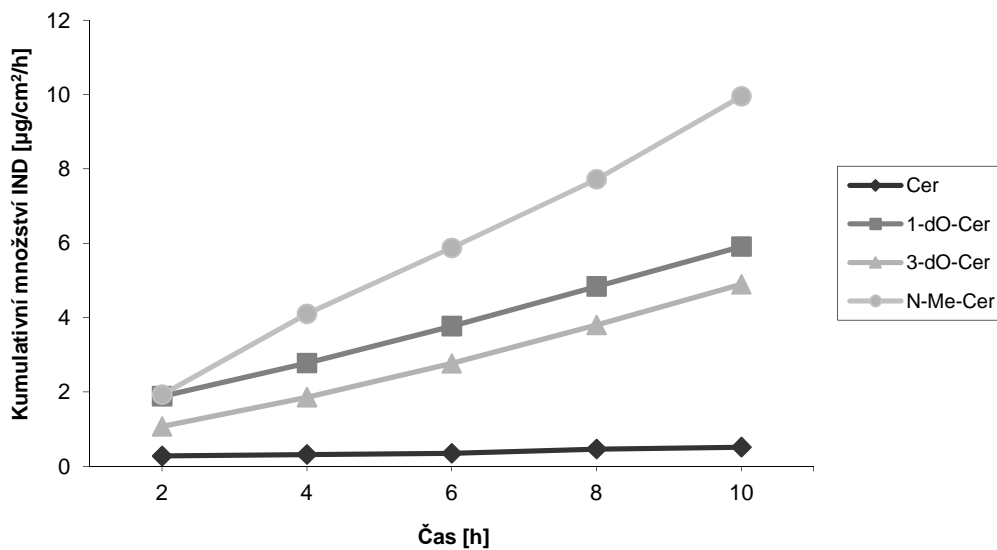


Graf 4: Výsledky měření fluxu TH. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM, $n = 5-9$. * značí statisticky významné zvýšení fluxu TH oproti kontrolnímu vzorku ($p < 0,05$).

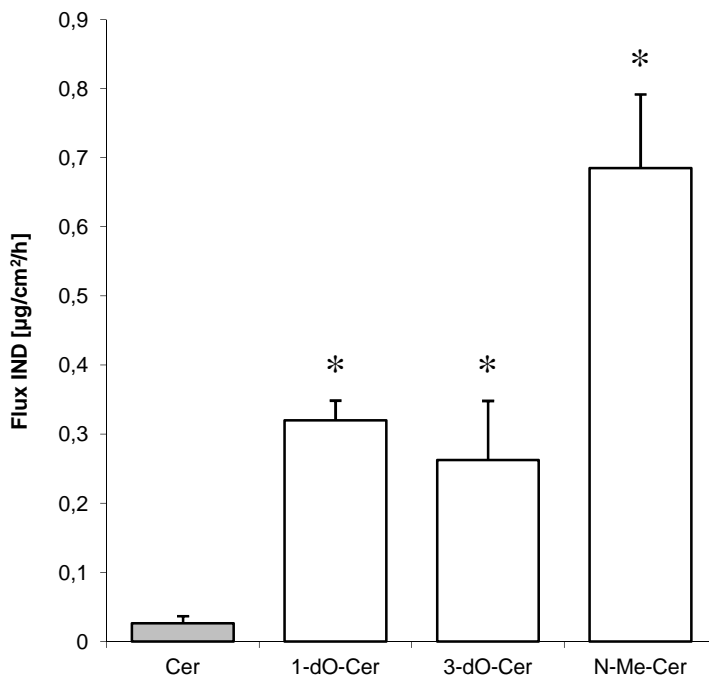
4.3.2 Permeabilita membrán pro indometacin

Při hodnocení permeability modelových membrán pro IND bylo postupováno obdobně jako u permeability pro TH. Kumulaci léčiva v jednotlivých časových úsecích sledujeme na grafu (Graf 5).

Flux IND skrze modelovou membránu můžeme sledovat na grafu (Graf 6). Nejmenší permeabilitu pro IND opět vykazuje membrána obsahující standardní ceramid Cer. Flux IND skrze standardní membránu je $0,03 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. U ostatních membrán pozorujeme řádově vyšší permeabilitu. Flux IND u 1-dO-Cer je $0,32 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, 3-dO-Cer je $0,26 \pm 0,09 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a u N-Me-Cer je $0,68 \pm 0,11 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Je zde vidět rozdíl mezi fluxem TH a IND, kdy u TH je přibližně o polovinu větší u všech ceramidů vyjma Cer. Všechny výsledky měření jsou statisticky významně odlišné od standardu ($p < 0,05$).



Graf 5: Výsledky měření kumulativního množství IND.



Graf 6: Výsledky měření fluxu IND. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM, $n = 5-9$. * značí statisticky významné zvýšení fluxu IND oproti kontrolnímu vzorku ($p < 0,05$).

5. Diskuze

Prvním úkolem diplomové práce byla syntéza analogů ceramidu v takovém množství, aby bylo možno z nich vytvořit statisticky adekvátní počet modelových membrán. V tomto případě bylo zvoleno minimální množství pěti membrán a tedy přibližně 4 mg analogu.

Postup A přípravy měl být původně použit u všech látek. V případě 1-dO-Cer probíhala syntéza dobře a výtěžky reakce byly dostačující pro tvorbu osmi membrán. Při syntéze *N*-Me-Cer se při hmotnostní spektrometrii ukázalo, že izolovaný produkt reakce neodpovídá tomu zamýšlenému a *N*-Me-Cer byl přítomen v reakci pouze v minimálním množství. Bylo tedy nutné zvolit jiný postup.

Postup B se ukázal pro syntézu *N*-Me-Cer vhodnější a bylo dosaženo potřebného výtěžku pro tvorbu pěti modelových membrán. Reakce byla tedy vyzkoušena i při tvorbě 3-dO-Cer s podobným úspěchem. Výtěžek reakce postačil na tvorbu šesti membrán.

Pro výzkum permeačních vlastností daných analogů se vytvořily modelové membrány napodobující lipidovou matrix ve SC. SC je nejdůležitější vrstvou kůže co se týče bariérové funkce⁽¹⁾. Vzhledem k tomu, že léčiva upřednostňují při průchodu skrze SC spíše cestu paracelulární a nikoliv transcelulární^(8; 9), není třeba při zkoumání bariérových funkcí brát v úvahu přítomnost korneocytů, ale postačí tvorba modelové membrány s přibližně stejným složením, jako má lipidová matrix. Lipidová vrstva SC se skládá ze směsi ceramidů, mastných kyselin, cholesterolu s přídavkem cholesterol-sulfátu. V modelové membráně byly mastné kyseliny zastoupeny kyselinou lignocerovou a místo směsi ceramidů byl použit daný analog ceramidu. Standardní ceramid (Cer, tj. *N*-lignoceroylsfiningosin) byl zvolen proto, že ceramidy s 24 uhlíkatým acylem jsou v SC zastoupeny nejčastěji⁽¹⁾.

Relativní ztráta vody skrze membránu je vysoce vypovídající veličina, co se týče bariérové funkce kůže. Nadměrná ztráta vody přes kůži se projevuje během kožních onemocnění jako je například atopická dermatitida, která je charakterizována vysušenou až šupinatou pokožkou⁽²³⁾. Všechny analogy, které byli zkoumány na relativní ztrátu vody se vyznačují větší propustností pro vodu než standardní ceramid, což je důkazem narušení kožní bariéry.

Při měření elektrické impedance zjišťujeme odpor kůže, který odpovídá

prostupnosti kůže pro ionty a polární molekuly ⁽²¹⁾. Dle výsledků můžeme soudit, že 3-deO-Cer je pro ionty a polární molekuly nejvíce propustný, dokonce více než Cer, což je v souladu s dalšími typy měření, která ukazují, že je jeho bariérová schopnost horší. Další dva analogy mají několikanásobně větší impedanci a tudíž tvoří lepší bariéru pro ionty a polární molekuly.

Léčiva TH a IND se kterými se provádějí pokusy na prostup léčiva membránou nejsou vybírány náhodně. Jsou to nedráždivé látky, které sami nijak neovlivňují kožní bariéru a zároveň je jejich množství snadno stanovitelné pomocí HPLC ⁽²²⁾.

TH i IND prochází membránami obsahujícími analogy desetkrát až dvacetkrát lépe, než těmi více než těmi obsahující běžný Cer, což je dalším důkazem horších bariérových schopností nasyntetizovaných analogů.

Všechny prováděné testy nás utvrzují v domněnce, že odstranění hydroxylové skupiny, či navázání methylu na dusík v ceramidech vede k rapidnímu zhoršení jejich bariérové funkce a stávají se tak potenciálními akceleranty transdermální permeace. Vysvětlení této skutečnosti vychází z dosavadního výzkumu akceleračtů transdermální permeace. Ty se skládají stejně jako ceramidy z polární hlavy a hydrofóbního řetězce a urychlují průnik léčiva interakcí s lipidovou matrix. V případě použití aminokyseliny glycinu místo L-serinu při syntéze permeačních akceleračtů, tedy odstranění hydroxymethylové skupiny, dostáváme akceleračt transdermální permeace ⁽²⁴⁾. Obdobná bude situace u mnou syntetizovaných analogů ceramidu, kdy odstranění hydroxyly jak z polohy 1 nebo 3 vedlo ke zvýšení permeability studovaných membrán. U N-Me-Cer sice nedošlo k odstranění hydroxyly, ale vazba methylu na amidický dusík znemožnila tvorbu vodíkové vazby vycházející z tohoto dusíku. Schopnost tvořit vodíkové vazby mezi jednotlivými ceramidy je přitom strukturální podmínkou správné funkce ceramidu jako bariéry ⁽²⁵⁾.

Dle výsledků srovnání 1-deO-Cer, 3-deO-Cer a N-Me-Cer lze usuzovat, že nejdůležitější z hlediska správné funkce ceramidu je ponechání vodíku na dusíku a tudíž, že větší roli než velikost polární hlavy může mít právě schopnost ceramidu tvořit vodíkové vazby. Co se týče hydroxylových skupin, obě jsou v molekule ceramidu velmi důležité a měly by být součástí látek syntetizovaných za účelem regenerace poškozené kožní bariéry.

6. Závěr

Cílem mé práce byla syntéza 1-deoxy, 3-deoxy a N-methyl analogů ceramidu a zkoumání permeačních vlastností modelových membrán, jejichž součástí jsou tyto analogy. Ceramidy byly připraveny dvěma různými postupy a následně byly použity při tvorbě membrán. Na membránách byla zkoumána elektrická impedance, relativní ztráta vody skrze membránu a flux IND a TH.

Výsledky zkoumání jednoznačně prokazují, že se změnou polární hlavy ceramidu jako je odebrání hydroxylové skupiny, či navázání methylu na dusík, dochází ke zhoršení bariérové funkce ceramidu.

7. Seznam použitých zkratek

1-deO-Cer	<i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> , <i>E</i>)-3-hydroxyoktadec-4-en-2-yl)tetrakosanamid
3-deO-Cer	(<i>R</i> , <i>E</i>)- <i>N</i> -(1-hydroxyoktadec-4-en-2-yl)tetrakosanamid
Cer	<i>N</i> -(tetrakosanoyl)-sfingosin
DCC	<i>N,N</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DMAP	dimethylaminopyridin
EDC	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylkarbodiimid
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IND	indometacin
MK	mastná kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
<i>N</i> -Me-Cer	<i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> , <i>E</i>)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)- <i>N</i> -methyltetrakosanamid
NMR	nukleární magnetická rezonance
ODC	ornithindekarboxyláza
PBS	fosfátový pufr se solemi
R _f	retenční faktor
SC	stratum corneum
SEM	standardní chyba průměru
SPT	serinpalmitoyl-CoA-transferáza
TEWL	trans-epidermal water loss
TH	theofylin
TLC	tenkovrstevná chromatografie
v/v	objem v objemu

8. Literatura

1. **Vávrová, K., Hrabálek, A.** Role ceramidů v kůži. *Prakt. Lékáren.* 2006, 2, pp. 55-58.
2. **Hannun, Y.A., Obeid, L.M.** The Ceramide-centric Universe of Lipid-mediated Cell Regulations: Stress Encounters of the Lipid Kind. *J. Biol. Chem.* 2002, Vol. 277, No. 29, pp. 25847-25850.
3. **Masukawa Y., Narita, H., Shimizu, E., Kondo, N., Sugai, Y., Oba, T., Homma, R., Ishikawa, J., Takagi, Y., Kitahara, T., Takema, Y., Kita, K.** Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *J. Lipid Res.* 2008, 49, pp. 1466-1476.
4. **Reynolds, C.P., Maurer, B.J., Kolesnick, R.N.** Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Lett.* 2003, 206, pp. 169-180.
5. **Ledvina, M., Stoklasová, A., Cerman, J.** *Biochemie pro studující medicíny I.díl.* Praha : Nakladatelství Karolinum, 2009. p. 180. ISBN: 978-80-246-1416-8.
6. **Madison, K.C.** Barrier Function of the Skin: „La Raison d’Être" of the Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 2003, 121, pp. 231-241.
7. **Menon, G.K.** New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2002, 54 Suppl. 1, stránky 3-17.
8. **Janůšová, B.** Vliv derivátů aminokyselin a ceramidů na bariérovou funkci kůže. *Doktorská disertační práce (UK v Praze, Faramaceutická fakulta v HK).* 2012.
9. **Barry, B.W.** Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001, 14, pp. 101-114.
10. **Coderch, L., Lopez, O., Maza, A.de la, Parra, J.L.** Ceramides and Skin Function. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2003, 4, pp. 107-129.
11. **Choi, M.J., Maibach, H.I.** Role of ceramides in Barrier Function of Healthy and Diseased Skin. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2005, 6, pp. 215-223.
12. **Selzner, M., Bielawska, A., Morse, M.A.** Induction of Apoptotic Cell Death and Prevention of Tumor Growth by Ceramide Analogues in Metastatic Human Colon Cancer. *Cancer Res.* 2001, 61, pp. 1233-1240.
13. **Zitomer, N.C., Mitchell, T., Voss, K.A., Bondy, G.S., Pruett, S.T., Garnier-Amblard, E.C., Liebeskind, L.S., Park, H., Wang, E., Sullards, M.C., Merrill, A.H., Riley, R.T.** Ceramide Synthase Inhibition by Fumonisin B1 Causes Accumulation of 1-Deoxysphinganine A Novel Category of Bioactive 1-Deoxysphingoid Bases and 1-Deoxydihydroceramides Biosynthesized by Mammalian Cell Lines and Animals. *J. Biol. Chem.* 2009, 284.8, pp. 4786-4795.

14. **Gerofalo, K., Penno, A., Schmidt, B.P., Lee, H., Frosch, M.P., Eckardstein, A., Brown, R.H., Hornemann, T., Eichler, F.S.** Oral L-serine supplementation reduces production of neurotoxic deoxysphingolipids in mice and humans with hereditary sensory autonomic neuropathy type 1. *J. Clin. Invest.* 2011, 121(12), pp. 4735-4745.
15. **Enkvetchakul, B., Barnett, T., Liotta, D.C., Geisler, V., Menaldino, D., Merrill, A.H., Birt, D.F.** Influences of sphingosine on two-stage skin tumorigenesis in Sencar mice. *Cancer Lett.* 1992, 62(1), pp. 35-42.
16. **Birt, D.F., Merrill, A.H., Barnett, T., Enkvetchakul, B., Pour, P.M., Liotta, D.C., Geisler, V., Menaldino, D.S., Schwartzbauer, J.** Inhibition of Skin Carcinomas but Not Papillomas by Sphingosine, N-Methylsphingosine, and N-Acetylsphingosine. *Nutrition and Cancer.* 1998, 31(2), pp. 119-126.
17. **Groen, D., Gooris, G.S., Bouwstra J.A.** Model Membranes Prepared with Ceramide EOS, Cholesterol and Free Fatty Acids Form a Unique Lamellar Phase. *Langmuir.* 2013, 29, pp. 15624-15633.
18. **De Paepe, K., Houben, E., Adam, R., Wiesemann, F., Rogiers, V.** Validation of the VapoMeter, a closed unventilated chamber system to assess transepidermal water loss vs. the open chamber Tewameter®. *Skin Res. Technol.* 2005, 11, pp. 61–69.
19. **Fasano, W.J., Hinderliter, P.M.** The Tinsley LCR Databridge Model 6401 and electrical impedance measurements to evaluate skin integrity in vitro. *Toxicol. in Vitro.* 2004, 18, pp. 725-729.
20. **Fish, R.M., Geddes, L.A., Babbs, C.F.** *Medical and Bioengineering Aspects of Electrical Injuries.* s.l. : Lawyers & Judges Publishing, 2003.
21. **White, E.A., Orazem, M.E., Bunge, A.L.** A critical analysis of single-frequency LCR databridge impedance measurements of human skin. *Toxicol. in Vitro.* 2011, 25, pp. 774-784.
22. **Novotný, J., Janůšová, B., Novotný, M., Hrabálek, A., Vávrová, K.** Short-Chain Ceramides Decrease Skin Barrier Properties. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2009, 22, pp. 22-30.
23. **Schmiedbergerová, R.** Eczema Atopicum. *Pediatric pro praxi.* 2005, 4, pp. 174-183.
24. **Vávrová, K., Hrabálek, A., Doležal, P., Holas, T., Zbytovská J.** L-Serine and glycine based ceramide analogues as transdermal permeation enhancers: polar head size and hydrogen bonding. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13(14), pp. 2351-2353.
25. **Vávrová, K., Hrabálek, A., Doležal, P., Šámalová, I., Palát, K., Zbytovská, J., Holas, T., Klimentová, J.** Synthetic ceramide analogues as skin permeation enhancers: structure–Activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11(24), pp. 5381-5390.