

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra anorganické a organické chemie**



**Diplomová práce**

**SYNTÉZA A STUDIUM CERAMIDŮ  
S DEUTEROVANÝM ACYLEM**

**Klára Hudská**

Vedoucí práce: Doc. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

Hradec Králové 2014

# Poděkování

Tímto velmi děkuji své školitelce Doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za vedení, pomoc a cenné rady při vypracování této diplomové práce. Děkuji také všem, kteří mi jakkoliv umožnili tuto práci uskutečnit a pracovníkům Katedry anorganické a organické chemie za vstřícný přístup a ochotu. Za finanční pomoc děkuji Grantové agentuře České Republiky (13-23891S), grantu Specifického vysokoškolského výzkumu (260 062) a Grantové agentuře Univerzity Karlovy (652412).

# Prohlášení

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

V Hradci Králové 2014

Klára Hudská

# OBSAH

ABSTRAKT.....	6
ABSTRACT.....	7
1 CÍL PRÁCE .....	8
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2.1 Stavba a vlastnosti <i>stratum corneum</i> .....	9
2.2 Ceramidy - struktura, typy a konformace .....	9
2.3 Organizace lipidů <i>stratum corneum</i> .....	11
2.4 Infračervená spektroskopie ve studiu SC .....	13
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	17
3.1 Chemikálie, přístroje a analýza dat .....	17
3.2 Schéma syntézy .....	18
3.3 Syntéza <i>d</i> -CerNS4 ceramidu .....	18
3.4 Syntéza <i>d</i> -CerNS16 ceramidu .....	19
3.5 Syntéza <i>d</i> -CerNS24 ceramidu .....	20
3.6 Příprava vzorků lipidů pro FTIR spektroskopii .....	21
3.7 FTIR spektroskopie .....	21
4 VÝSLEDKY A DISKUZE .....	23
4.1 Syntéza .....	23
4.2 Čištění produktů .....	23
4.3 FTIR spektroskopie .....	24
4.3.1 CerNS24/LA/Chol/CholS .....	24
4.3.2 CerNS24/ <i>d</i> -LA/Chol/CholS .....	25
4.3.3 <i>d</i> -CerNS24/LA/Chol/CholS .....	26
4.3.4 <i>d</i> -CerNS24/ <i>d</i> -LA/Chol/CholS .....	26
4.3.5 CerNS16/LA/Chol/CholS .....	27
4.3.6 CerNS16/ <i>d</i> -LA/Chol/CholS .....	27
4.3.7 <i>d</i> -CerNS16/LA/Chol/CholS .....	29
4.3.8 <i>d</i> -CerNS16/ <i>d</i> -LA/Chol/CholS .....	29
4.3.9 CerNS4/LA/Chol/CholS .....	31
4.3.10 CerNS4/ <i>d</i> -LA/Chol/CholS .....	31
4.3.11 <i>d</i> -CerNS4/LA/Chol/CholS .....	32

4.3.12	<i>d</i> -CerNS4/ <i>d</i> -LA/Chol/CholS .....	32
5	ZÁVĚR .....	34
6	SEZNAM ZKRATEK .....	35
7	LITERATURA .....	36

# ABSTRAKT

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra anorganické a organické chemie**

**Kandidát:** Klára Hudská

**Školitel:** Doc. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Syntéza a studium ceramidů s deuterovaným acylem

Ceramidy jsou komplexní skupina lipidů patřící mezi sfingolipidy. Tvoří nejdůležitější složku *stratum corneum* a zásadně se podílejí na ochraně kůže před nadměrnými ztrátami vody a dalšími vnějšími vlivy. Přestože jsou ceramidy předmětem intenzivního výzkumu, přesný vliv jejich struktury na bariérovou funkci kůže nebyl dosud zcela objasněn.

Cílem této diplomové práce byla příprava série ceramidů odvozených od sfingosinu s deuterovanými acyly o délce 4, 16 a 24 uhlíků a jejich studium pomocí infračervené spektroskopie pro porozumění chování ceramidů v SC a pochopení vztahů mezi jejich strukturou a účinkem.

Studium připravených ceramidů pomocí ATR-FTIR spektroskopie prokázalo, že za fyziologické teploty kůže zaujímají řetězce lipidů orthorombické uspořádání převážně s *all-trans* konformací. Zatímco CerNS24 upřednostňuje v připravených lipidických směsích otevřenou konformaci, kdy je acyl CerNS24 asociovaný s acylem LA a cholesterol je asociovaný se sfingosinovým řetězcem, CerNS16 se s LA nemísí a zaujímá buď sponkovou konformaci nebo otevřenou konformaci s náhodnou distribucí sfingosinového a acylového řetězce. Výsledky této práce potvrdily, že pro správnou funkci kožní bariéry jsou nezbytné dlouhé hydrofobní řetězce v ceramidech typu NS.

# ABSTRACT

**Charles University in Prague**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Inorganic and Organic Chemistry**

**Candidate:** Klára Hudská

**Supervisor:** Doc. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

**Title of Diploma Thesis:** Synthesis and study of ceramides with deuterated acyl chain

Ceramides are a complex group of lipids belonging to sphingolipids. They are the most important component in *stratum corneum* and play an essential role in protecting the skin from excessive water loss and other environmental damages. Despite the fact that ceramides are a subject of intensive research, the exact effect of their structure on barrier skin function has not been fully explained.

The aim of this diploma thesis was to synthesize a series of ceramides derived from sphingosin with deuterated acyl chains with chain length 4C, 16C and 24C and their study using Fourier transform infrared spectroscopy to understand the behaviour of ceramides in SC and their structure-activity relationships.

The study of the synthesized ceramides using ATR-FTIR spectroscopy revealed that, at skin temperature, lipid chains are arranged in orthorhombic subcell, mostly with *all-trans* conformation. While the CerNS24 prefers extended conformation with its acyl associated with the acyl of LA and cholesterol associated with the sphingosin chain in prepared lipid mixtures, the CerNS16 does not mix with LA and adopts either hairpin conformation or extended conformation with random distribution of sphingosine and acyl chain. The results of this work confirmed that long hydrophobic chains in NS-type ceramides are necessary for the proper skin barrier function.

# 1 CÍL PRÁCE

Ceramidy jsou komplexní skupinou lipidů, patřící do rodiny sfingolipidů. Jsou nejdůležitější součástí *stratum corneum* (SC) a zásadně se podílejí na ochraně kůže před nadměrnými ztrátami vody a dalšími vlivy vnějšího prostředí. Přestože jsou ceramidy předmětem intenzivního výzkumu, přesný vliv jejich struktury na bariérovou funkci kůže nebyl dosud zcela objasněn.

Cílem této diplomové práce je příprava série ceramidů odvozených od sfingosinu s deuterovanými acyly o délce 4, 16 a 24 uhlíků a jejich studium pomocí infračervené spektroskopie. Deuterovaná analoga ceramidů lze s výhodou použít při objasňování stavby, organizace a biofyzikálních vlastností kožní bariéry. V této práci se plánují zabývat studiem vlivu délky acylového řetězce na konformaci ceramidu a jeho termotropního chování v lipidických směsích o podobném složení, jaké má lipidová matrix SC. Získané poznatky mohou být využity při navrhování analog ceramidů určených pro léčbu některých kožních onemocnění.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Stavba a vlastnosti *stratum corneum*

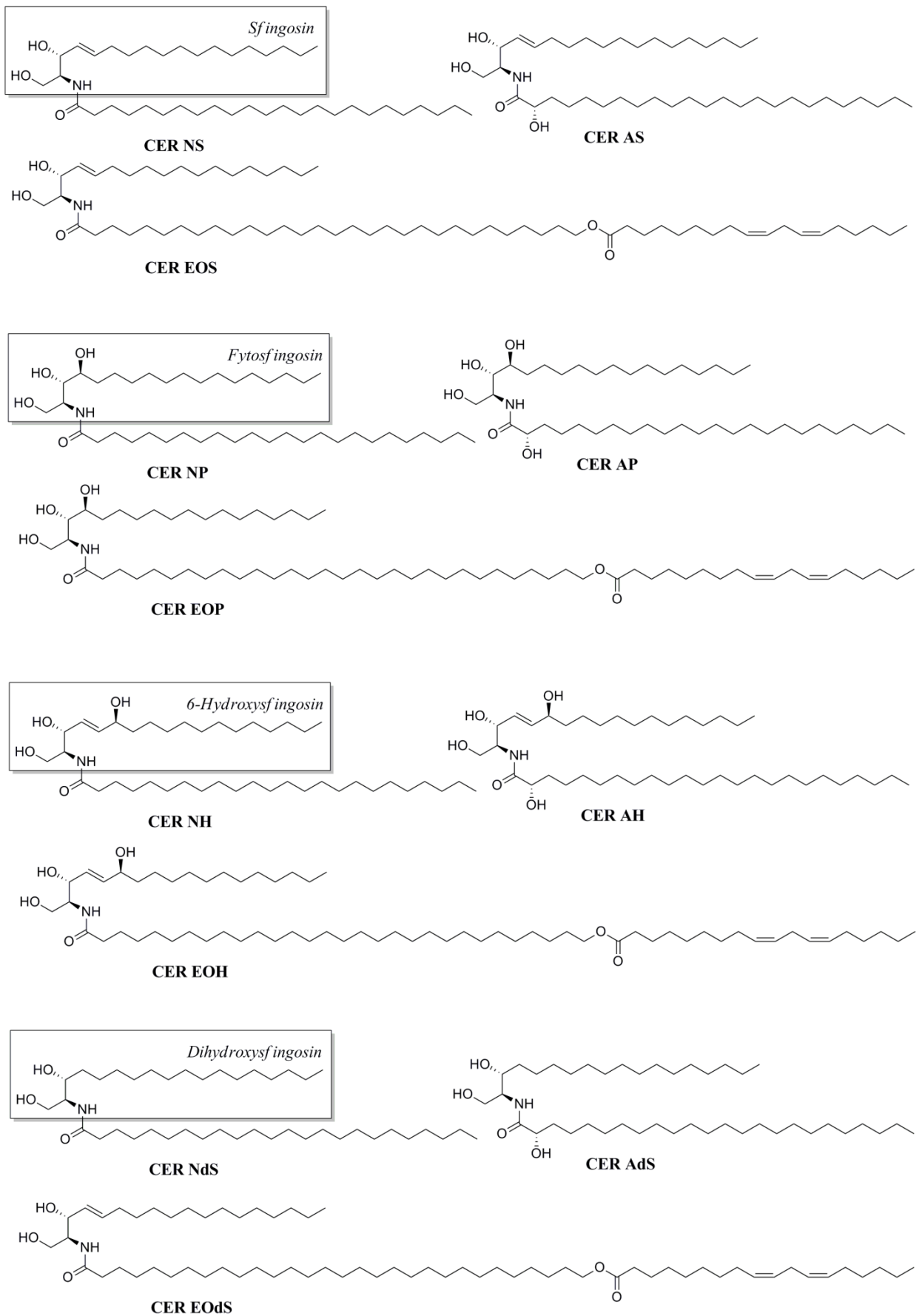
Kůže (latinsky *cutis*, řecky *derma*) je rozsáhlý plošný orgán tvořící zevní povrch organismu. Má povrch průměrně 1,8 m<sup>2</sup>, tloušťku v rozmezí 0,4 – 4 mm a hmotnost 4,3 – 5 kg.<sup>1</sup> Skládá se ze dvou základních složek: škály (dermis) a pokožky (epidermis). Její hlavní funkcí je chránit organismus před vnějšími vlivy a zabránit nadměrným ztrátám vody.<sup>2</sup>

Nesvrchnější vrstvou kůže je *stratum corneum* (SC), nazývaná také rohová vrstva, která plní funkci kožní bariéry.<sup>2</sup> Přibližně 90 % hmotnosti této vrstvy tvoří velké odumřelé bezjaderné buňky, které se nazývají korneocyty. Bariérovou funkci SC zajišťuje především intracelulární lipidová matrix v jejich okolí.<sup>3</sup> Tato struktura bývá označována jako model "cihel a malty", ve kterém korneocyty představují cihly a lipidová matrix vyplňuje prostory mezi nimi jako malta.

Lipidová matrix *stratum corneum* je tvořena přibližně ekvimolární směsí ceramidů (Cer), cholesterolu (Chol) a volných mastných kyselin. Méně než 5 % (w/w) jsou zastoupeny ostatní lipidy, z nichž nejdůležitější je cholesterol-sulfát (CholS).<sup>4</sup>

### 2.2 Ceramidy - struktura, typy a konformace

Ceramidy jsou strukturně různorodé amfifilní molekuly, které jsou tvořeny dvěma hydrofobními řetězci a malou polární hlavou. Z chemického hlediska se jedná o *N*-acylsfingosiny, které se řadí mezi sfingolipidy. Základ molekuly ceramidu tvoří bazický alkohol. Může se jednat o sfingosin (S), fytosfingosin (P), 6-hydroxysfingosin (H) nebo dihydroxfingosin (dS). Na tuto bázi je v poloze 2 amidickou vazbou navázána buď  $\alpha$ -hydroxy (A),  $\omega$ -hydroxy (O), nebo nehydroxylovaná (N) mastná kyselina. Délka řetězce mastné kyseliny se pohybuje mezi 16 až 34 uhlíky. Nejčastěji zastoupený acylový řetězec v  $\alpha$ -hydroxy a nehydroxylovaných ceramidech představuje kyselina lignocerová o 24 uhlících.<sup>5,6,7,8</sup>



**Obř. 1** Chemická struktura ceramidů, Mottova nomenklatura<sup>9</sup>

Existuje 12 typů ceramidů, zatím poslední typ byl popsán v roce 2011.<sup>10</sup> Původně byla ceramidům přiřazována arabská čísla s ohledem na jejich separaci při tenkovrstvé chromatografii (se zvyšující se polaritou se zvyšuje číslo). V souvislosti se zdokonalováním separace a objevováním nových struktur ceramidů bylo třeba zavést nové, systematické názvosloví. Tato nomenklatura, nazývaná dle Motty, je založena na kombinaci písmen zmíněných typů bází (S, P, H, dS) a acylových řetězců (A, O, N).<sup>9</sup> (Obr. 1) Poslední písmeno označuje bázi, před ním stojící písmeno navázanou mastnou kyselinu. Písmeno E na začátku kódu označuje esterově vázanou kyselinu linolovou.

Ceramidy mohou zaujímat sponkovou (vlásenkovou) konformaci, ve které oba řetězce směřují na stejnou stranu, nebo otevřenou konformaci, v níž směřují řetězce opačným směrem. Převažujícím názorem autorů zabývajících se studiem kožní bariéry bylo, že ceramidy zaujímají sponkovou konformaci, jelikož ji preferují jejich prekurzory, glukosylceramidy a sfingomyeliny, s ohledem na jejich velké a hydrofilní polární hlavy. Převrácení ceramidu ze sponkové do otevřené konformace však může být relativně rychlé<sup>11</sup> a otevřená konformace by znamenala několik výhod. Zvýšila by se koheze sousedních lipidových lamel, snížilo molekulární pnutí způsobené nepříznivým poměrem hydrofilních a hydrofobních částí na průřezu ceramidu ve sponkové konformaci a taková směs lipidů by se zbavila bobtnavých hydrofilních rozhraní.<sup>12</sup> Koncept otevřené konformace ceramidu dále rozvinul Iwai a kol. Podle nich je cholesterol asociovaný se sfingosinovým řetězcem ceramidu a mastná kyselina s acylovým řetězcem ceramidu, což umožňuje oddělení nemísitelného cholesterolu a dlouhého řetězce mastné kyseliny.<sup>13</sup>

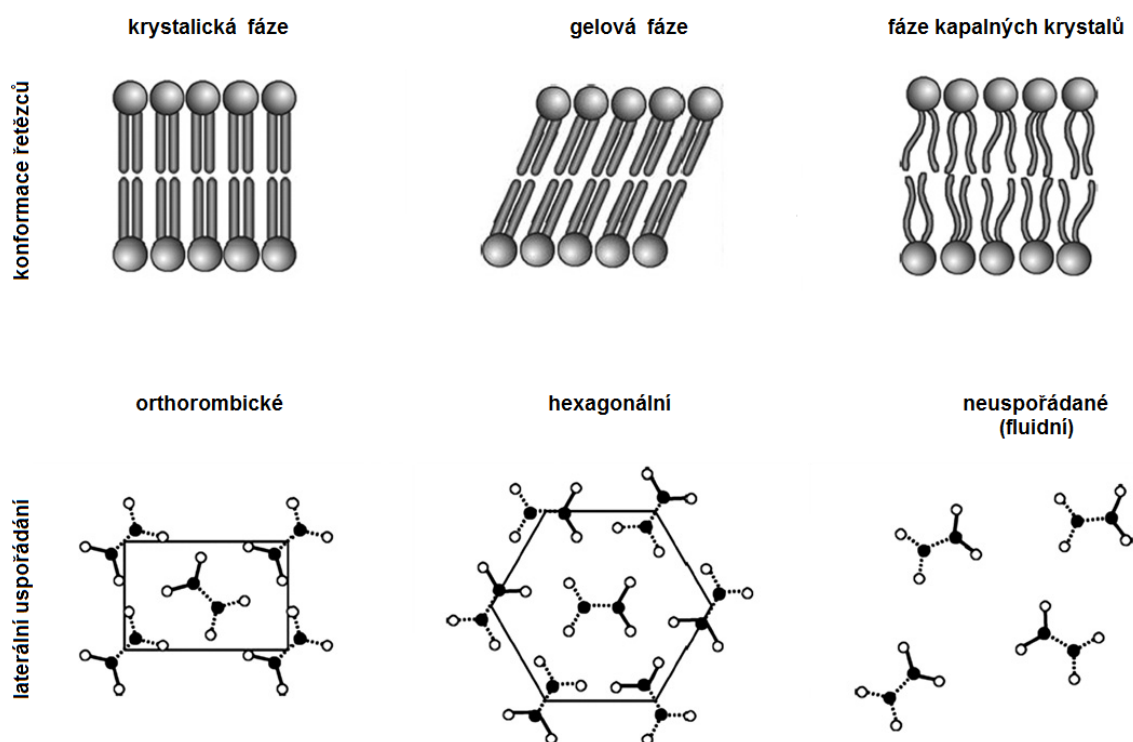
Význam studia ceramidů v SC má uplatnění při transdermálním podání léčivých látek<sup>14</sup> a také při terapii některých kožních onemocnění. Snížené nebo pozměněné koncentrace ceramidů, či výskyt ceramidů se zkrácenými řetězci, jsou výrazným znakem např. u atopické dermatitidy, psoriázy nebo ichtyózy.<sup>15,16</sup>

### **2.3 Organizace lipidů *stratum corneum***

Většina experimentálních důkazů o organizaci lipidů *stratum corneum* je konzistentní s doménovým mozaikovým modelem navrženým Forslindem v roce 1994, ve kterém jsou lipidy organizovány v uspořádaných doménách propojených

s neuspořádanou fází.<sup>17</sup> Existence lipidů v uspořádané (orthorombická a hexagonální) a neuspořádané (kapalně-krystalická) fázi byla prokázána v izolovaném SC<sup>18</sup> i v modelových směsích lipidů SC.<sup>19</sup>

Na Obr. 2 je zobrazeno schéma intramolekulární a intermolekulární organizace lipidů v lamelle SC. V krystalické fázi zaujímají alifatické řetězce *all-trans* konformaci (cik-cak uspořádání), jsou uspořádány v pravoúhlé rovinné mřížce s velmi těsným orthorombickým laterálním uspořádáním. V gelové fázi s *all-trans* hexagonálně uspořádanými řetězci s mírným nárůstem počtu *gauche* konformerů jsou alifatické řetězce nakloněny směrem ke krystalové rovině a jsou uspořádány v méně husté hexagonální mřížce. Ve fázi kapalných krystalů vykazují řetězce vysoké množství *gauche* izomerů, laterální organizace zcela chybí a řetězce se mohou pohybovat téměř volně.<sup>20,21</sup>



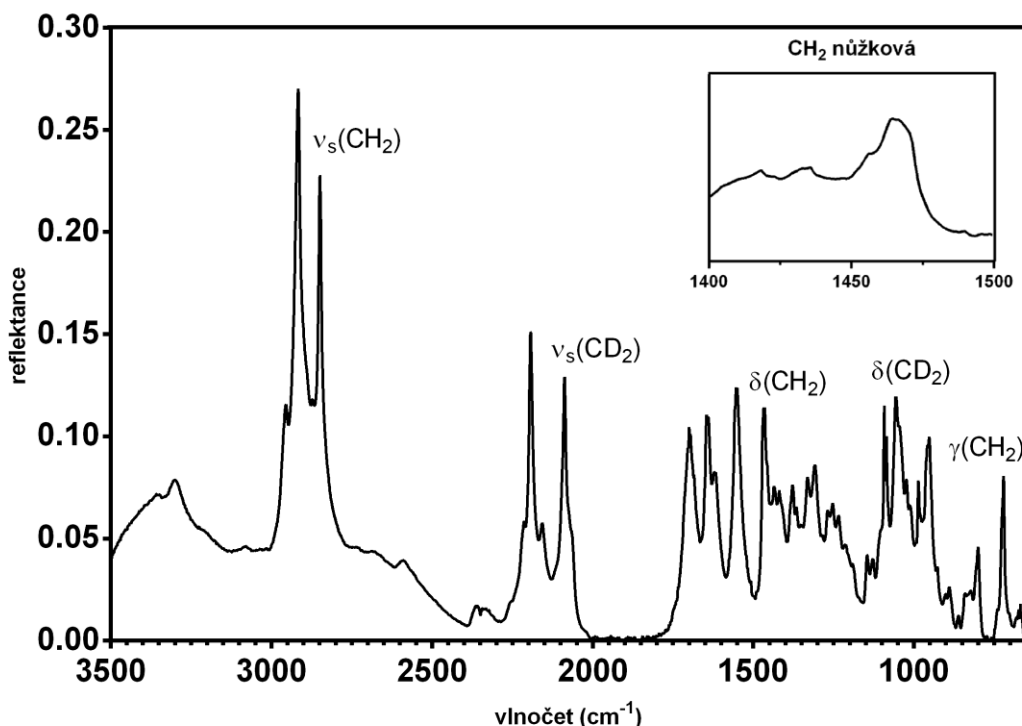
**Obr. 2** Molekulární organizace lipidů SC. Schéma konformace řetězců (horní řada) a laterálního uspořádání řetězců (spodní řada).<sup>22</sup>

## 2.4 Infračervená spektroskopie ve studiu SC

Ke studiu struktury a organizace lipidových dvojvrstev při teplotě kůže a během fázového přechodu lze použít infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací (FTIR).<sup>16</sup> Jde o téměř univerzální, efektivní, citlivou, rychlou a relativně levnou metodu<sup>23</sup> pro získání strukturálně a konformačně relevantních dat o všech různých polymorfních formách, ve kterých se mohou lipidy vyskytovat.<sup>24</sup>

Principem metody je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem, při níž dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Analytickým výstupem je infračervené spektrum, které je grafickým zobrazení funkční závislosti energie, většinou vyjádřené v procentech transmitance (T) nebo jednotkách absorbance (A) na vlnové délce dopadajícího záření. Transmitance (propustnost) je definována jako poměr intenzity záření, které prošlo vzorkem (I), k intenzitě záření vycházejícího ze zdroje ( $I_0$ ). Absorbance je definována jako dekadický logaritmus  $1/T$ . Závislost energie na vlnové délce je logaritmická, proto se používá vlnočty, který je definován jako převrácená hodnota vlnové délky a tedy uvedená závislost energie na vlnočtu bude funkcí lineární. Obecně rozlišujeme dva typy molekulových vibrací: valenční a deformační. U valenčních deformací se mění délka vazby, u deformačních dochází ke změně valenčního úhlu.<sup>25</sup>

K objasnění intramolekulární a intermolekulární organizace lipidů se využívá mnoho vibračních módů. Na Obr. 3 je zobrazeno FTIR spektrum lipidické směsi ceramidu CerNS16/*d*-LA/Chol/ChoS s označenými hlavními vibracemi, ze kterého lze odvodit organizaci uhlovodíkového řetězce i interakce v oblasti polární hlavy ceramidu. Použití deuterovaných lipidů, ať už ceramidů (*d*-Cer), nebo mastných kyselin (*d*-LA) umožňuje samostatné souběžné sledování dvou různých složek směsi díky posunu C-H/C-D vibrací. Můžeme tak získat informace o konformaci, laterálním uspořádání a mísitelnosti různých druhů lipidů v jedné směsi.<sup>26</sup> V této práci se budu podrobněji zabývat vibracemi řetězců.



**Obr. 3** FTIR spektrum směsi CerNS16/*d*-LA/Chol/CholS při teplotě 32 °C s vyznačenými vibracemi: symetrická CH<sub>2</sub> valenční, symetrická CD<sub>2</sub> valenční, nůžková CH<sub>2</sub>, nůžková CD<sub>2</sub>, kývavá CH<sub>2</sub>

Konformace řetězců a laterální uspořádání jsou snadno rozpoznatelné pomocí infračervené spektroskopie. Pozice a šířka píku v polovině CH<sub>2</sub> symetrické valenční vibrace jsou citlivými ukazateli konformační uspořádanosti řetězců. Zvýšený rotační pohyb alkylových řetězců během přechodu z orthorombické fáze do hexagonální a přítomnost *gauche* konformerů v řetězcích během přechodu z hexagonální fáze do fáze kapalných krystalů vedou k rozšíření pásu a posunu jeho vlnočtu do vyšších hodnot. Štěpení CH<sub>2</sub> kývavé vibrace a CH<sub>2</sub> nůžkové vibrace na dublet je charakteristickým znakem přítomnosti orthorombické fáze. Šířka dubletu je známkou množství meziřetězcových interakcí a velikosti domén s orthorombickým uspořádáním. Dublet se zužuje během tání a v čisté hexagonální fázi splyne v singlet.<sup>27,28,29</sup>

#### 2.4.1.1 CH<sub>2</sub> valenční vibrace

Symetrické a asymetrické methylenové valenční vibrace uhlovodíkových řetězců se nachází při vlnočtech okolo 2920 cm<sup>-1</sup> a 2850 cm<sup>-1</sup>. Pokud je některá složka lipidické směsi deuterovaná, vyskytuje se asymetrická vibrace CD<sub>2</sub> skupiny při vlnočtu

2190  $\text{cm}^{-1}$  a symetrická  $\nu_s(\text{CD}_2)$  při 2095  $\text{cm}^{-1}$  bez interferencí ostatních složek a může být specificky monitorována.

V Tab. 1 je přehled několika vibračních módů uhlovodíkových řetězců citlivých na konformaci a vzájemné interakce. Vlnočty  $\text{CH}_2$  valenční vibrace kvalitativně monitorují konformaci i laterální uspořádání řetězců. Citlivost konformačního uspořádání (*trans-gauche* izomerizace) se využívá ke studiu fázového přechodu lipidů a lipid-proteinových interakcí. Laterální uspořádání je důležité pro studium uspořádanosti domén a solid-solid tranzice ceramidů. Pozice  $\text{CH}_2$  methylenové symetrické valenční vibrace, která se pohybuje v rozmezí přibližně od 2848  $\text{cm}^{-1}$  do 2854  $\text{cm}^{-1}$ , vymezuje laterální uspořádání od konformačních efektů. Nižší hodnoty vlnočtů  $\nu_s(\text{CH}_2)$  pod 2850  $\text{cm}^{-1}$  naznačují přítomnost velmi těsně uspořádaných konformerů v *all-trans* konformaci po celé délce. Zvýšení teploty zapříčiní větší podíl *gauche* konformerů a zvýšení neuspořádanosti řetězce, což se projeví zvýšením vlnočtu  $\nu_s(\text{CH}_2)$  vibrace.<sup>20,21</sup>

**Tab. 1** Vibrace uhlovodíkových řetězců citlivých na konformaci a tvorbu domén<sup>21</sup>

Vibrace	Vlnočty ( $\text{cm}^{-1}$ )	Citlivost
Symetrická $\text{CH}_2$ valenční	2848–2854	Vlnočty kvalitativně odráží konformaci řetězců a laterální uspořádání
Asymetrická $\text{CH}_2$ valenční	2915–2924	
Symetrická $\text{CD}_2$ valenční	2088–2097	
Asymetrická $\text{CD}_2$ valenční	2193–2198	
$\text{CH}_2$ nůžková	1462–1474	Dublet orthorombické fáze
	1468	Hexagonální fáze
	1476	Neuspořádaná fáze
$\text{CD}_2$ nůžková	1085–1092	Dublet orthorombické fáze
	1089	Hexagonální fáze
	1087	Neuspořádaná fáze
$\text{CH}_2$ kývavá	720, 728	Dublet orthorombické fáze

#### 2.4.1.2 $\text{CH}_2$ nůžková vibrace

Zatímco methylenová valenční vibrace poskytuje kvalitativní popis meziřetězcového konformačního uspořádání a laterálního uspořádání, methylenová nůžková vibrace (1460–1475  $\text{cm}^{-1}$ ) poskytuje způsob, jak změřit mikroagregaci

v gelové lipidové fázi. Tato metoda je založena na pozorování rozšíření nebo rozštěpení nůžkové vibrace v orthorombických subcelách z důvodu meziřetězcových interakcí. Přítomnost orthorombického uspořádání indikuje rozštěp  $\delta$  ( $\text{CH}_2$ ) do dvou pásů, u hexagonálního uspořádání je přítomen pouze jeden pík. Stejná závislost platí i pro deuterované řetězce  $\delta$  ( $\text{CD}_2$ ) o vlnočtu v rozmezí  $1085\text{--}1092\text{ cm}^{-1}$ .<sup>21, 30</sup>

Snyder a jeho spolupracovníci, kteří pozorovali rozštěp píku  $\delta$  ( $\text{CH}_2$ ) detailněji, zjistili, že je tato interakce krátkého dosahu a je laterální, tzn. kolmo na směr řetězce. Pomocí jednoduchého modelu, ve kterém byly popsány interakce nůžkových vibrací mezi dvěma sousedícími řetězci, získali kvantitativní vztah mezi velikostí rozštěpu pásu a velikostí domény. Závislost štěpení na velikosti krystalu je však důležitá jen tehdy, když je krystal menší než  $\sim 100$  řetězců (odpovídá velikosti 50 fosfolipidových molekul v matici).<sup>30</sup>

V lipidických směsích, v nichž má jedna složka deuterované řetězce, nedochází k vibračním interakcím mezi  $\delta$  ( $\text{CH}_2$ ) a  $\delta$  ( $\text{CD}_2$ ), pokud jsou tyto složky smíseny, z důvodu velkého frekvenčního rozdílu mezi těmito vibracemi. K vibračnímu kaplingu dochází tedy pouze mezi řetězci stejného izotopu. Díky tomu můžeme ze vzhledu nůžkové vibrace určit charakter každé domény zvlášť, případně odhadnout velikost domény.<sup>21</sup>

#### **2.4.1.3 $\text{CH}_2$ kývavá vibrace**

$\text{CH}_2$  kývavé vibrace se nachází v rozmezí vlnočtů  $718\text{--}731\text{ cm}^{-1}$  a platí pro ně stejné závislosti jako pro nůžkovou vibraci. Rozštěp pásu na dublet indikuje orthorombické uspořádání řetězců do krystalické mřížky, zatímco singlet značí hexagonální uspořádání.<sup>31</sup>



# 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 3.1 Chemikálie, přístroje a analýza dat

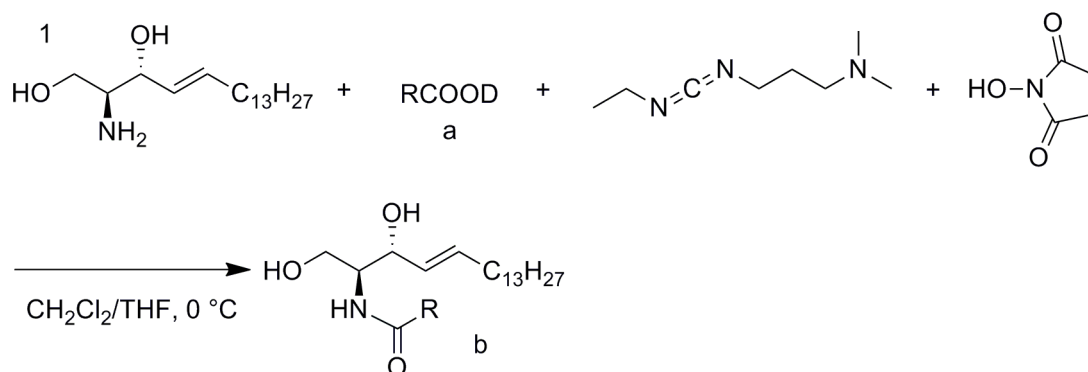
Sfingosin (syntetický, z více než 99 % stereochemicky čistý, (2*S*,3*R*,4*E*)) byl zakoupen u firmy Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Deuterované kyseliny (C4, C16, C24) byly zakoupeny u firmy C/D/N Isotopes (Pointe-Claire, Kanada), ostatní chemikálie a rozpouštědla byly pořízeny od firmy Sigma Aldrich (Schnelldorf, Německo).

Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na hliníkových TLC deskách Silica gel 60 F<sub>254</sub> od firmy Merck. Pro sloupcovou chromatografii byl použit silikagel 60 (velikost částic 0,040 – 0,063 mm). K detekci sloužila směs CeSO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>[P(Mo<sub>3</sub>O<sub>10</sub>)<sub>4</sub>] a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Veškeré reakce probíhaly za bezvodých podmínek v dusíkové atmosféře. Všechny součásti aparatury byly před použitím vysušeny při 120 °C a ponechány zchladnout.

Pro měření NMR spekter byly využity přístroje Varian Mercury Vx BB a Varian VNMR S500 (přístroj Varian, Palo Alto, USA). Měření <sup>1</sup>H NMR spekter probíhalo při 300 nebo 500 MHz, měření <sup>13</sup>C spekter při 75 nebo 125 MHz. Pro vyhodnocení spekter byl použit program MestReNova (verze 9.0.0-12821).

### 3.2 Schéma syntézy



a = deuterovaná kyselina máselná (2)    R = C<sub>3</sub>D<sub>7</sub>    b = *d*-CerNS4 ceramid (3)

a = deuterovaná kyselina palmitová (4)    R = C<sub>15</sub>D<sub>31</sub>    b = *d*-CerNS16 ceramid (5)

a = deuterovaná kyselina lignocerová (6)    R = C<sub>23</sub>D<sub>47</sub>    b = *d*-CerNS24 ceramid (7)

### 3.3 Syntéza *d*-CerNS4 ceramidu

K 27  $\mu$ l deuterované kyseliny máselné **2** (0,29 mmol), rozpuštěné v suchém dichlormethanu (5 ml), bylo přidáno 34 mg *N*-hydroxysukcinimidu (HoSu; 0,29 mmol). Směs byla zchlazena v ledu přibližně na 0 °C a posléze bylo přidáno 52  $\mu$ l WSC (0,29 mmol). Sfingosin **1** (80 mg, 0,27 mmol) byl rozpuštěn ve směsi suchého dichlormethanu a tetrahydrofuranu (1:1; 5 ml) a byl přes septum přikapán do reakční směsi. Směs se 30 min míchala, poté byla vytemperována na laboratorní teplotu a průběžně monitorována pomocí TLC (mobilní fáze chloroform/methanol 10:1). Po 12 hodinách míchání v dusíkové atmosféře bylo zjištěno, že reakční směs sice obsahuje malé množství produktu, ale rovněž také velké množství výchozího sfingosinu. Proto byly do reakce přidány výchozí látky do celkového množství 142 mg sfingosinu (0,47 mmol), 48  $\mu$ l deuterované kyseliny máselné (0,52 mmol), 60 mg HoSu (0,52 mmol) a 93  $\mu$ l WSC (0,52 mmol). Průběh reakce byl opět sledován na TLC (mobilní fáze chloroform/methanol 10:1).

Po 24 hodinách byla reakce ukončena a vytřepána s 0,1M HCl (20 ml) a vodou (2 $\times$  20 ml). Vodné vrstvy byly vytřepány 2 $\times$  dichlormethanem. Organické fáze byly

spojeny, vysušeny pomocí Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrvány a zahuštěny na vakuové odparce. Získaný produkt byl přečištěn na silikagelu pomocí sloupcové chromatografie, mobilní fází byl chloroform/methanol 20:1. Bohužel se směs úplně nerozdělila, a proto byla provedena znovu dvakrát sloupcová chromatografie s mobilní fází chloroform/methanol 50:1

### ***N*-((2*S*,3*R*, 4*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)butanamid[C<sub>2'-4'-d<sub>7</sub></sub>] (3)**

Produktem je bílá krystalická látka o výtěžku 9,52 % (17,0 mg), mol. hm. 376,62 g/mol. TLC: mobilní fáze chloroform/methanol 10:1, R<sub>f</sub> = 0,42 – 0,44. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.34 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.77 (dt, *J* = 15.8, 6.7 Hz, 1H), 5.56 – 5.44 (dd, *J* = 15.5, 6.5 Hz, 1H), 4.29 (dd, *J* = 6.5, 3.8 Hz, 1H), 3.9 – 3.87 (m, 2H), 3.69 (dd, *J* = 11.1, 3.2 Hz, 1H), 2.85 (s, 2H), 2.04 (dt, *J* = 7.1, 6.7 Hz, 2H), 1.40 – 1.35 (m, 2H), 1.35 – 1.20 (m, 20H), 0.88 (t, *J* = 6.7 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.9, 134.2, 128.7, 74.5, 62.4, 54.5, 32.3, 31.9, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 29.1, 22.7, 14.1. IR (ATR): 2919, 2850, 1645, 1556, 1467, 721 cm<sup>-1</sup>. MS (ESI+) *m/z* 359.6 (M+H<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O), 399.9 (M+Na<sup>+</sup>).

## **3.4 Syntéza *d*-CerNS16 ceramidu**

100 mg (0,35 mmol) deuterované kyseliny palmitové **4** bylo rozpuštěno v dichlormethanu (5 ml), byl přidán *N*-hydroxysukcinimid (40 mg, 0,35 mmol) a směs byla podchlazena v ledu na 0 °C. Poté byl přidán WSC (62 μl, 0,5 mmol). Sfingosin **1** byl rozpuštěn ve směsi suchého dichlormethanu a THF (5 ml, 1:1) a přidán k reakční směsi. Reakce byla za stálého míchání ponechána, aby došla na laboratorní teplotu, a pak se ještě 12 hodin míchala. Průběh reakce byl sledován na TLC (mobilní fáze chloroform/methanol 10:1). Směs byla extrahována mezi okyselenou vodou (0,1M HCl; 20 ml) a dichlormethanem (2× 20 ml). Organická fáze byla následně extrahována vodou (2× 20 ml), vysušena Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, přefiltrována a zahuštěna na vakuové odparce. Směs byla přečištěna na silikagelu nejprve s mobilní fází chloroform/methanol 20:1, poté znovu s mobilní fází chloroform/methanol 50:1.

### ***N*-((2*S*,3*R*, 4*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)hexadekanamid[C<sub>2'-16'-d<sub>31</sub></sub>] (5)**

Produkt je bílá krystalická látka o výtěžku 11,28 % (20,2 mg), mol. hm. 568,71 g/mol, mp = 92 – 95 °C. TLC: mobilní fáze chloroform/methanol 10:1, R<sub>f</sub> = 0,43 –

0,47.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.33 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 5.78 (dt,  $J = 14.2, 6.7$  Hz, 1H), 5.52 (dd,  $J = 15.6, 5.9$  Hz, 1H), 4.36 – 4.25 (m, 1H), 3.98 – 3.89 (m, 2H), 3.71 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1H), 2.15 – 1.95 (m, 2H), 1.40 – 1.17 (m, 22H), 0.88 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.1, 165.4, 134.3, 134.1, 128.7, 74.5, 62.5, 54.6, 32.3, 31.9, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 29.1, 28.5, 22.7, 14.1. IR (ATR): 3297, 2917, 2850, 2193, 2089, 1645, 1554, 146, 1090, 721  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI+)  $m/z$  551.9 ( $\text{M}+\text{H}^+-\text{H}_2\text{O}$ ), 591.9 ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ).

### 3.5 Syntéza *d*-CerNS24 ceramidu

Deuterovaná kyselina lignocerová **6** (100 mg, 0,24 mmol) a *N*-hydroxysukcinimid (30 mg, 0,26 mmol) byly rozpuštěny v suchém dichlormethanu (5 ml), zchlazeny v ledu na 0 °C a poté byl přidán WSC (43  $\mu\text{l}$ , 0,24 mmol). Sfingosin byl rozpuštěn v THF (5 ml) a přidán do reakce. Směs byla ponechána dojít na laboratorní teplotu a ponechána míchat. Reakce byla průběžně monitorována pomocí TLC (mobilní fáze chloroform/methanol 20:1). Po dvou dnech po porovnání se standardy CerNS24 ( $R_f = 0,39$ ) a kyselinou lignocerovou ( $R_f = 0,42$ ) nebyla v reakční směsi patrná přítomnost produktu, objevila se pouze skvrna na startu, která odpovídala nezreagovanému sfingosinu. Proto bylo do reakční směsi přidáno 50 mg (0,12 mmol) **6** a 15 mg HoSu (0,13 mmol), společně rozpuštěných v suchém dichlormethanu (3 ml). Směs byla ochlazená na 0 °C, a potom byl přidán WSC (15  $\mu\text{l}$ , 0,14 mmol). Směs byla ponechána míchat týden a průběžně monitorována pomocí TLC. Po týdnu bylo zjištěno pomocí TLC (mobilní fáze chloroform/methanol 20:1) porovnáním se standardy CerNS24 ( $R_f = 0,31$ ), *N*-hydroxysukcinimidylesterem ( $R_f = 0,86$ ) sfingosinem ( $R_f = 0$ ) a kyselinou lignocerovou ( $R_f = 0,41$ ) zjištěno, že reakční směs obsahuje *N*-hydroxysukcinimidylester a sfingosin. Na TLC se rovněž ukázala nevýrazná skvrna neidentifikované látky ( $R_f = 0,06$ ). Do reakce bylo přidáno 54 mg **1** (0,18 mmol) rozpuštěného v THF a reakce byla míchána 12 hodin. Na TLC (mobilní fáze chloroform/methanol 20:1) se ukázaly dvě skvrny odpovídající produktu a nezreagovanému sfingosinu. Reakce byla ukončena, vytřepána 0,1M kyselinou chlorovodíkovou (20 ml) a 2 $\times$  vodou. Vodné fáze byly vytřepány s dichlormethanem (2 $\times$  20 ml). Organické podíly byly spojeny. Směs byla vysušena pomocí  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , zfiltrována a zahuštěna na vakuové odparce. Směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií (mobilní fáze chloroform/methanol 20:1), ale nepodařilo se získat čistý

produkt. Sloupcová chromatografie byla provedena znovu se stejnou mobilní fází. Tentokrát byl produkt čistší, ale ne úplně. Byla provedena sloupcová chromatografie s mobilní fází chloroform/methanol 50:1 a následně znovu s mobilní fází chloroform/methanol 100:1. Směs byla rozdělena na dvě frakce, přičemž první byla odeslána k NMR analýze, druhá byla znovu přečištěna sloupcovou chromatografií (mobilní fáze chloroform/methanol 100:1) a poté spojena s první fází.

#### ***N*-((2*S*,3*R*, 4*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)tetrakosanamid[C<sub>21-24</sub>-d<sub>47</sub>] (7)**

Produkt je bílá krystalická látka o výtěžku 21,2 % (36,9 mg), mol. hm. 696,93 g/mol, mp = 89 – 92 °C. TLC: mobilní fáze chloroform/methanol 20:1, R<sub>f</sub> = 0,30 – 0,32. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.28 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 5.78 (dt, *J* = 14.4, 6.8 Hz, 1H), 5.51 (dd, *J* = 14.6, 5.4 Hz, 1H), 4.31 (dd, *J* = 7.2, 5.3 Hz, 1H), 4.00 - 3.82 (m, 1H), 3.76 – 3.61 (m, 1H), 3.47 (td, *J* = 6.4, 1.6 Hz, 1H), 2.59 – 2.46 (br s, 2H), 2.14 -1.93 (m, 2H), 1.43 – 1.01 (m, 22H), 0.87 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 174.0, 134.4, 129.0, 74.8, 62.5, 54.8, 32.6, 32.2, 29.9, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1, 28.6, 28.4, 28.1, 22.9, 14.4. IR (ATR): ν 3293, 2919, 2850, 2195, 2088, 1645, 1557, 1466, 1091, 1087, 721 cm<sup>-1</sup>. MS (ESI+) *m/z* 680.5 (M+H<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O).

### **3.6 Příprava vzorků lipidů pro FTIR spektroskopii**

Vzorky lipidů byl připraveny jako ekvimolární směs ceramidu (Cer) nebo deuterovaného ceramidu (*d*-Cer), cholesterolu, lignocerové kyseliny (LA) nebo perdeuterované lignocerové kyseliny (*d*-LA) s 5% hmotnostním přídatkem cholesterol-sulfátu (CholS). Jednotlivé lipidy byly rozpuštěny ve směsi chloroformu a methanolu v poměru 2:1 (v/v), cholesterol-sulfát byl rozpuštěn v čistém methanolu (96%). Poté byla rozpouštědla odpařena proudem dusíku a ponechána v exsikátoru vysušit pod vysokým vakuem přes noc. Poté byly vzorky zahřáty na 90 °C po dobu 20 minut a poté pomalu ochlazeny na laboratorní teplotu asi po dobu 3 hodin. Poté byly inkubovány při teplotě 32 °C při běžné vlhkosti vzduchu po 24 hodin.

### **3.7 FTIR spektroskopie**

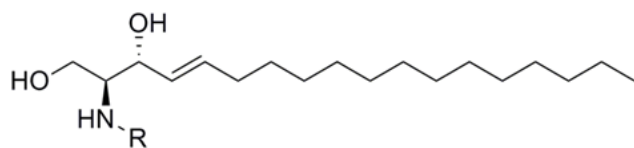
Pro měření infračervených spekter byl použit spektrometr Nicolet Impact 400 (Thermo Scientific, USA) s jednodrazovým ATR ZnSe krystalem MIRacle (PIKE technologies, Madison, USA). Byl použit upínací mechanismus s konstantním přítlačným tlakem. Jedno měření čítalo 256 skenů s rezolucí 4 cm<sup>-1</sup>. Teplotní závislost

IR spektra byla studována v teplotním rozmezí 28–100 °C po teplotním intervalu 2 °C. Po každém přírůstku teploty byl vzorek stabilizován po dobu 10 minut, než došlo k dalšímu měření. Spektra byla vyhodnocena pomocí softwaru Bruker OPUS. Přesné pozice píků byly určeny z druhé derivace spekter.

# 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

## 4.1 Syntéza

Syntéza každé ze tří syntetizovaných látek byla jednokroková a vycházela z komerčně dostupného sfingosinu a příslušné deuterované karboxylové kyseliny máselné, palmitové nebo lignocerové. Principem byla acylace primární aminoskupiny sfingosinu deuterovanou karboxylovou kyselinou pomocí *N'*-ethyl-*N*(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (WSC), který reaguje s kyselinou za vzniku klíčového meziprojektu *O*-acylisomočoviny, na nějž můžeme pohlížet jako na ester karboxylové kyseliny s aktivovanou odstupující skupinou. Do reakční směsi byl přidán *N*-hydroxysukcinimid z důvodu zvýšení výtěžku a snížení množství probíhajících vedlejších reakcí.



Ceramid	R
Sfingosin	-H
<i>d</i> -CerNS4	-COC <sub>3</sub> D <sub>7</sub>
<i>d</i> -CerNS16	-COC <sub>15</sub> D <sub>31</sub>
<i>d</i> -CerNS24	-COC <sub>23</sub> D <sub>47</sub>

**Obr. 4** Přehled struktur syntetizovaných ceramidů

## 4.2 Čištění produktů

Izolace některých konečných produktů byla problematická a často vznikaly těžko oddělitelné směsi. Pokaždé byla reakční směs vytřepána s 0,1M HCl a následně 2× s vodou. Vodné fáze byly vytřepány 2× s dichlormethanem, organické fáze byly spojeny, vysušeny pomocí Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrány a zahuštěny na vakuové odparce. Následovalo čištění na chromatografické koloně. Získané výtěžky byly bohužel velmi nízké. Ve dvou ze tří případů reakce napoprvé neproběhla v dostatečném výtěžku a musely být přidány znovu další výchozí látky.

Produkt *d*-CerNS4 byl přečišťován celkem třikrát, poprvé s mobilní fází chloroform/methanol 20:1, poté dvakrát s mobilní fází chloroform/methanol 50:1. Získaný výtěžek činil 9,5 %.

Produkt *d*-CerNS16 byl přečišťován dvakrát. Poprvé s mobilní fází chloroform/methanol 20:1, podruhé s mobilní fází chloroform/methanol 50:1. Získaný výtěžek činil 11,3 %.

Produkt *d*-CerNS24 byl přečištěn 2× s mobilní fází chloroform/methanol 20:1, poté byla provedena sloupcová chromatografie s mobilní fází chloroform/methanol 50:1 a následně s mobilní fází chloroform/methanol 100:1. Produkt byl rozdělen na dvě frakce, z nichž první byla odeslána k NMR analýze, která potvrdila přítomnost kýžené látky, druhá byla přečištěna ještě jednou s mobilní fází chloroform/methanol 100:1 s postupných přidáváním methanolu až na čistý methanol. Získaný výtěžek činil 21,2 %.

## 4.3 FTIR spektroskopie

### 4.3.1 CerNS24/LA/Chol/CholS

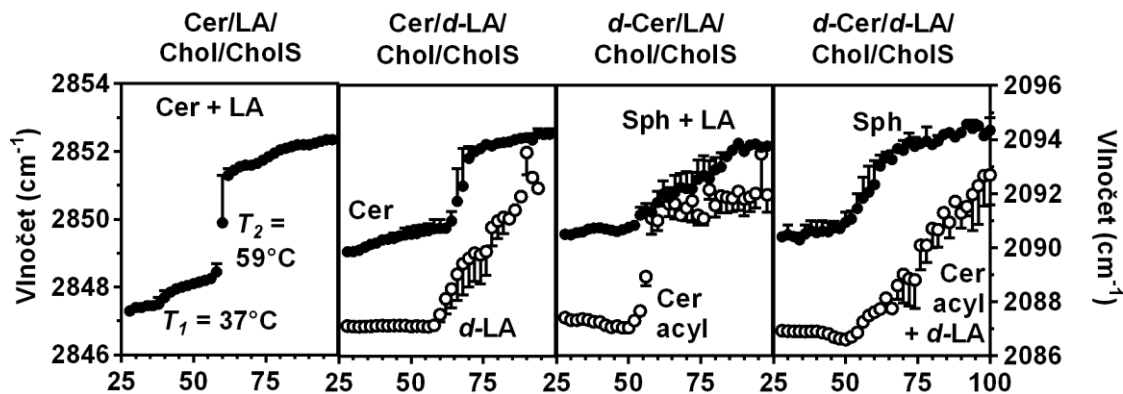
Na Obr. 5 (první grafy v panelu A a B) můžeme sledovat fázové chování methylenové symetrické valenční (panel A) a nůžkové (panel B) infračervené vibrace vzorků lipidů obsahujících CerNS24. Chování lipidových membrán obsahujících neznačené CerNS24 a LA byly popsány v předchozích pracích naší pracovní skupiny.<sup>16,32</sup> Při teplotě 32 °C, což odpovídá fyziologické teplotě kůže, zaujímá většina lipidů konformaci *all-trans*, jak se dá vyvodit z nízkého vlnočtu methylenové symetrické valenční vibrace (2847 cm<sup>-1</sup>). Štěpení methylenové nůžkové vibrace na dublet při 1463 cm<sup>-1</sup> a 1471 cm<sup>-1</sup> naznačuje, že řetězce lipidů jsou uspořádány v orthorombické subcele.

Při zahřátí se uspořádanost řetězce lipidů snižuje a methylenová symetrická vibrace se posunuje do hodnot vyšších vlnočtů, což lze využít ke zjištění teplot fázového přechodu. Při 37 °C splývá nůžkový dublet v singlet, zatímco nízký vlnočtet  $\nu_s(\text{CH}_2)$  při 2848 cm<sup>-1</sup> značí velmi dobře uspořádané řetězce lipidů. Toto chování odpovídá přechodu z orthorombické do hexagonální fáze. Při dalším zahřívání vlnočtet methylenové valenční vibrace plynule vzrůstá a při 59 °C dojde k hlavnímu fázovému přechodu, který je charakterizován náhlým vzrůstem vlnočtu  $\nu_s(\text{CH}_2)$  vibrace a

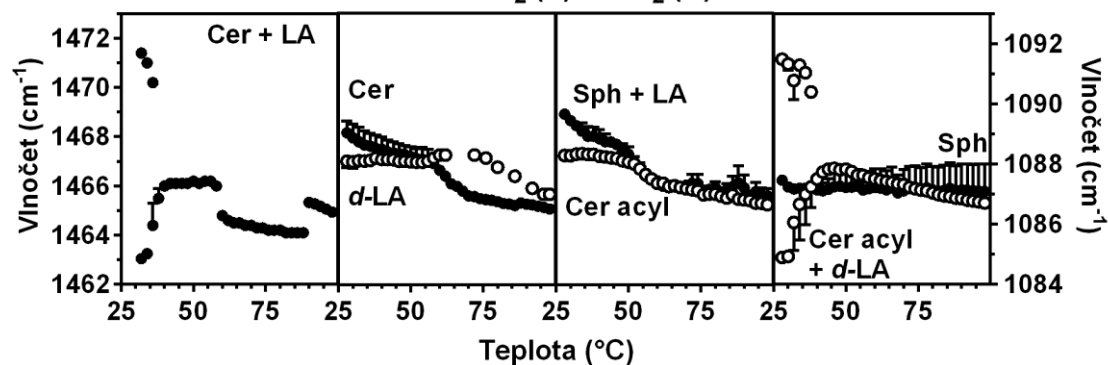


poklesem vlnočtu  $\delta(\text{CH}_2)$  na  $1465 \text{ cm}^{-1}$ . Po hlavním fázovém přechodu zůstávají řetězce ve fázi kapalných krystalů, což indikuje vlnočet  $2852 \text{ cm}^{-1}$ .<sup>33,34</sup>

### A - CerNS24 - symetrická valenční vibrace $\text{CH}_2$ (●) a $\text{CD}_2$ (○)



### B - CerNS24 - nůžková vibrace $\text{CH}_2$ (●) a $\text{CD}_2$ (○)



**Obr. 5** ATR-FTIR spektroskopie vzorků lipidů obsahujících CerNS24. Teplotní závislost methylenové symetrické valenční vibrace (panel A) a nůžkové vibrace (panel B) směsi obsahující neznačené a deuterované CerNS24/LA/Chol/CholS.  $\text{CH}_2$  vibrace jsou označené černými kroužky,  $\text{CD}_2$  prázdnými kroužky. Dva kroužky za dané teploty představují rozštěpení nůžkové vibrace na dublet, který naznačuje orthorombické uspořádání. Data jsou průměrem  $\pm$  SEM ze 2–3 měření.

#### 4.3.2 CerNS24/d-LA/Chol/CholS

V dalším vzorku byla ve směsi CerNS24/LA/Chol/CholS vyměněna LA za *d*-LA (Obr. 5, druhý sloupec grafu). Rozdílné vlnočty vibrací deuterovaných a neznačených řetězců nám umožňují studovat chování *d*-LA a CerNS24 odděleně. Obr. 5 ukazuje teplotní závislost symetrické valenční vibrace (panel A) a nůžkové vibrace (panel B)

buď CH<sub>2</sub> skupin, které odpovídají převážně vibračním CerNS24 řetězců (černé kroužky), nebo CD<sub>2</sub> skupin, které představují *d*-LA (prázdné kroužky). Symetrická vibrace naznačuje, že při 30 °C je CerNS24 méně uspořádaný (vlnčet 2849 cm<sup>-1</sup>) než *d*-LA (vlnčet 2087 cm<sup>-1</sup>). Hlavní fázové přechody obou těchto komponent začínají přibližně na 60 °C, což naznačuje společné tání jejich řetězců. Přítomnost singletů nůžkové vibrace jak u CH<sub>2</sub> tak i CD<sub>2</sub> oblastí značí mísení CerNS24 a *d*-LA. Jelikož se vibrační kapling orthorombicky uspořádaných řetězců (které se manifestují jako nůžkový dublet) vyskytuje pouze mezi stejnými izotopy, a ne mezi CH<sub>2</sub> a CD<sub>2</sub>, můžeme z toho vyvodit, že řetězce CerNS24 jsou smíšené s *d*-LA a naopak.

### 4.3.3 *d*-CerNS24/LA/Chol/CholS

Třetí část vzorků lipidů byla připravena s deuterovaným ceramidem (*d*-CerNS24/LA/Chol/CholS), jak je vidět na Obr. 5 v třetím sloupci grafu. V této směsi pochází CH<sub>2</sub> vibrace převážně ze sfingosinového řetězce *d*-CerNS24 a LA a CD<sub>2</sub> vibrace z acylového řetězce *d*-CerNS24. Acyl ceramidu se zdá být velmi dobře uspořádaný, jak se dá vyvodit z nízkého vlnčtu CD<sub>2</sub> symetrické vibrace (2087 cm<sup>-1</sup>). Zajímavé je, že uspořádání řetězce je velmi podobné jako *d*-LA v minulé lipidové směsi. Naopak CH<sub>2</sub> symetrická vibrace, popisující sfingosinový řetězec a LA, se objevuje na téměř 2850 cm<sup>-1</sup>, naznačuje v těchto řetězcích více *gauche* konformerů. Jelikož bylo zjištěno, že LA je velmi dobře uspořádána, s největší pravděpodobností pochází tyto *gauche* konformery ze sfingosinového řetězce *d*-CerNS24. Acyl ceramidu taje relativně prudce při 56 °C, zatímco teplotní závislost CH<sub>2</sub> nevykazuje žádný viditelný přechod, což naznačuje mísení části hydrogenovaného řetězce s cholesterolem. Jelikož je mísení LA a Chol velmi omezené<sup>35</sup>, toto chování naznačuje mísení sfingosinového řetězce s cholesterolem. Nůžkové vibrace znovu vykazují singlety CH<sub>2</sub> a CD<sub>2</sub>, což potvrzuje mísení LA a *d*-CerNS24 zmíněné výše, konkrétně s jeho deuterovaným acylovým řetězcem.

### 4.3.4 *d*-CerNS24/*d*-LA/Chol/CholS

Konečný důkaz uspořádání lipidů byl získán ze čtvrtého vzorku lipidů s oběma lipidy deuterovanými (*d*-CerNS24/*d*-LA/Chol/CholS), Obr. 5, čtvrtý sloupec grafu. V tomto vzorku pochází CH<sub>2</sub> vibrace převážně ze sfingosinového řetězce *d*-CerNS24

a CD<sub>2</sub> vibrace pochází jak z acylu *d*-CerNS24 tak *d*-LA. CH<sub>2</sub> vibrace potvrzují, že sfingosinový řetězec je méně uspořádaný (téměř 2850 cm<sup>-1</sup>) než acyl nebo *d*-LA. Acyl *d*-CerNS24 je smíšený s *d*-LA v jedné relativně velké doméně, která není významně zředěná ostatními složkami lipidového vzorku, jak naznačuje nůžkový dublet 1085 cm<sup>-1</sup> a 1091 cm<sup>-1</sup>.

Můžeme říci, že většina molekul CerNS24 je v těchto lipidových směsích SC v otevřené konformaci, kdy je acyl CerNS24 asociovaný s acylem LA a cholesterol je asociovaný se sfingosinovým řetězcem.

#### 4.3.5 CerNS16/LA/Chol/CholS

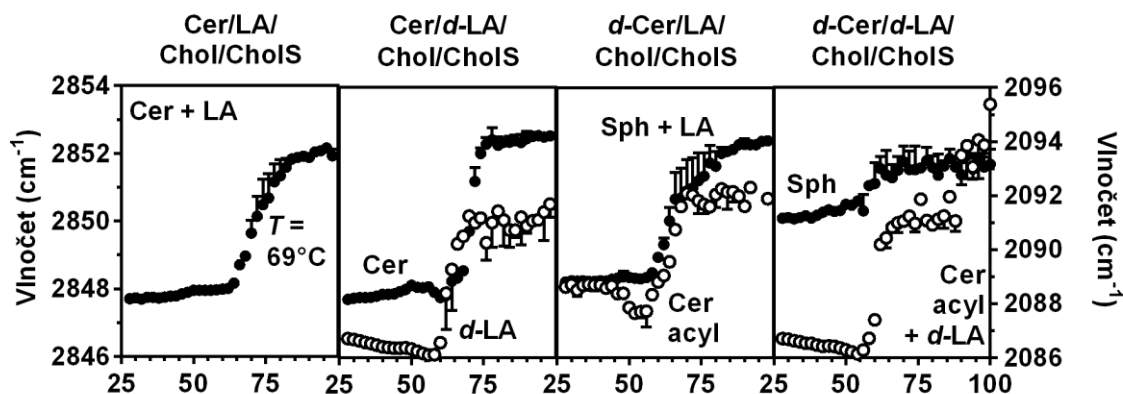
V další sadě vzorků byl CerNS24 nahrazen ceramidem s kratším řetězcem, CerNS16, s cílem přímo porovnat jejich schopnost mísit se s ostatními lipidy SC. Neznačené vzorky lipidů (CerNS16/LA/Chol/CholS) se při teplotě kůže zdají být podobné vzorku CerNS24. Lipidy jsou vysoce uspořádané s převažující konformací řetězců *all-trans* (methylenová symetrická vibrace pod 2848 cm<sup>-1</sup>) a těsně uspořádané v orthorombické subcele (methylenová nůžková vibrace rozštěpená do dvou částí při 1463 cm<sup>-1</sup> a 1471 cm<sup>-1</sup>, Obr. 6, první dva grafy v obou panelech. Velmi malá pretranzice je vidět při 48 °C. Hlavní fázový přechod začíná na 62 °C a je mnohem širší (přes 20 °C s centrem přibližně při 69 °C) než ten u lipidové směsi CerNS24. Nad 82 °C jsou lipidy s největší pravděpodobností uspořádané ve fázi tekutých krystalů (methylenová symetrická valenční vibrace při 2852 cm<sup>-1</sup>). Orthorombické uspořádání je teplotně stabilnější u vzorků CerNS16 než u CerNS24. Nůžkový dublet se zužuje s rostoucí teplotou a mizí při 66 °C, tedy během hlavního fázového přechodu.

#### 4.3.6 CerNS16/*d*-LA/Chol/CholS

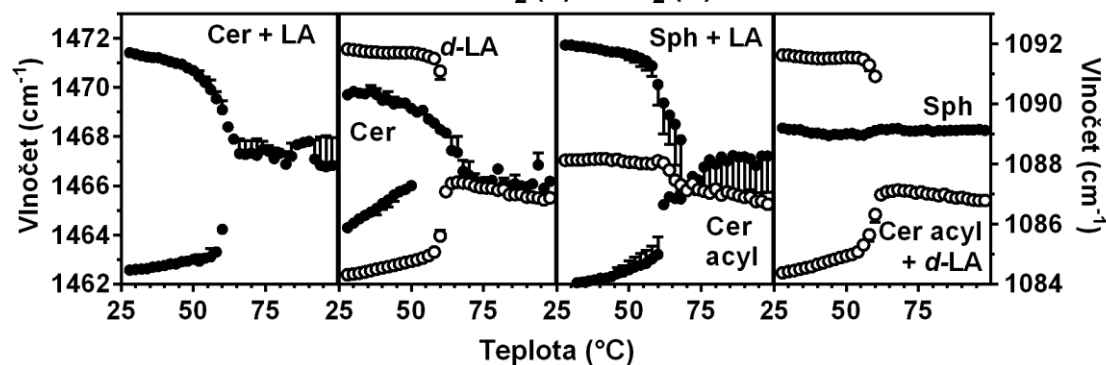
Ke zjištění mísitelnosti CerNS16 a LA v těchto vzorcích byla nahrazena LA deuterovanou LA (*d*-LA), viz Obr. 6, druhé sloupce v obou panelech. CH<sub>2</sub> i CD<sub>2</sub> vibrace se při teplotě kůže objevují při nízkém vlnočtu (2848 cm<sup>-1</sup> a 2087 cm<sup>-1</sup>), což naznačuje, že CerNS16 i *d*-LA jsou dobře uspořádané. Uspořádanost se snižuje přibližně při 60 °C. Fázový přechod *d*-LA je relativně prudký, se středem při 62 °C, zatímco vlnočty CH<sub>2</sub> vibrací nejprve mírně klesá, počínaje teplotou 56 °C, pak mírně vzroste mezi 60 °C a 68 °C, a pak proběhne hlavní fázový přechod při 71 °C.

Po fázových přechodech zůstávají oba řetězce (neznačený i deuterovaný) v jistém stupni uspořádání. Toto chování je vcelku podobné v lipidových směsích CerNS16 i CerNS24.

**A - CerNS16 - symetrická valenční vibrace CH<sub>2</sub> (●) a CD<sub>2</sub> (○)**



**B - CerNS16 - nůžková vibrace CH<sub>2</sub> (●) a CD<sub>2</sub> (○)**



**Obr. 6** ATR-FTIR spektroskopie vzorků lipidů obsahujících CerNS16. Teplotní závislost vlnočtu methylenové symetrické valenční vibrace (panel A) a nůžkové vibrace (panel B) buď pro CH<sub>2</sub> vibrace (černé kroužky) nebo CD<sub>2</sub> vibrace (prázdné kroužky). Data jsou průměrem ± SEM ze 2–3 měření.

V oblasti nůžkových vibrací je však velký rozdíl. CH<sub>2</sub> i CD<sub>2</sub> vibrace jsou rozštěpeny na dublety, což naznačuje, že CerNS16 a *d*-LA jsou většinou odděleně. Nůžkový dublet CD<sub>2</sub> dosahuje svého maxima při 1084 cm<sup>-1</sup> a 1092 cm<sup>-1</sup>, což naznačuje velké domény *d*-LA. Složky tohoto dubletu se poměrně ostře spojí při 62 °C, tedy během hlavního fázového přechodu *d*-LA. Nůžkový dublet CH<sub>2</sub> je užší (1465 cm<sup>-1</sup> a 1470 cm<sup>-1</sup>) než je maximální možné štěpení, což je 12 cm<sup>-1</sup>.<sup>36</sup> To naznačuje přítomnost menších orthorombických domén CerNS16 než *d*-LA, což je pravděpodobně způsobeno koexistencí orthorombického a hexagonálního uspořádání řetězců CerNS16. Tento

dublet se se stoupající teplotou postupně zužuje a spojuje se do jediné vibrace při 58 °C. Vlnčet tohoto singletu postupně klesá až do 70 °C, kdy dosáhne hodnot pod 1467 cm<sup>-1</sup>.

#### 4.3.7 *d*-CerNS16/LA/Chol/CholS

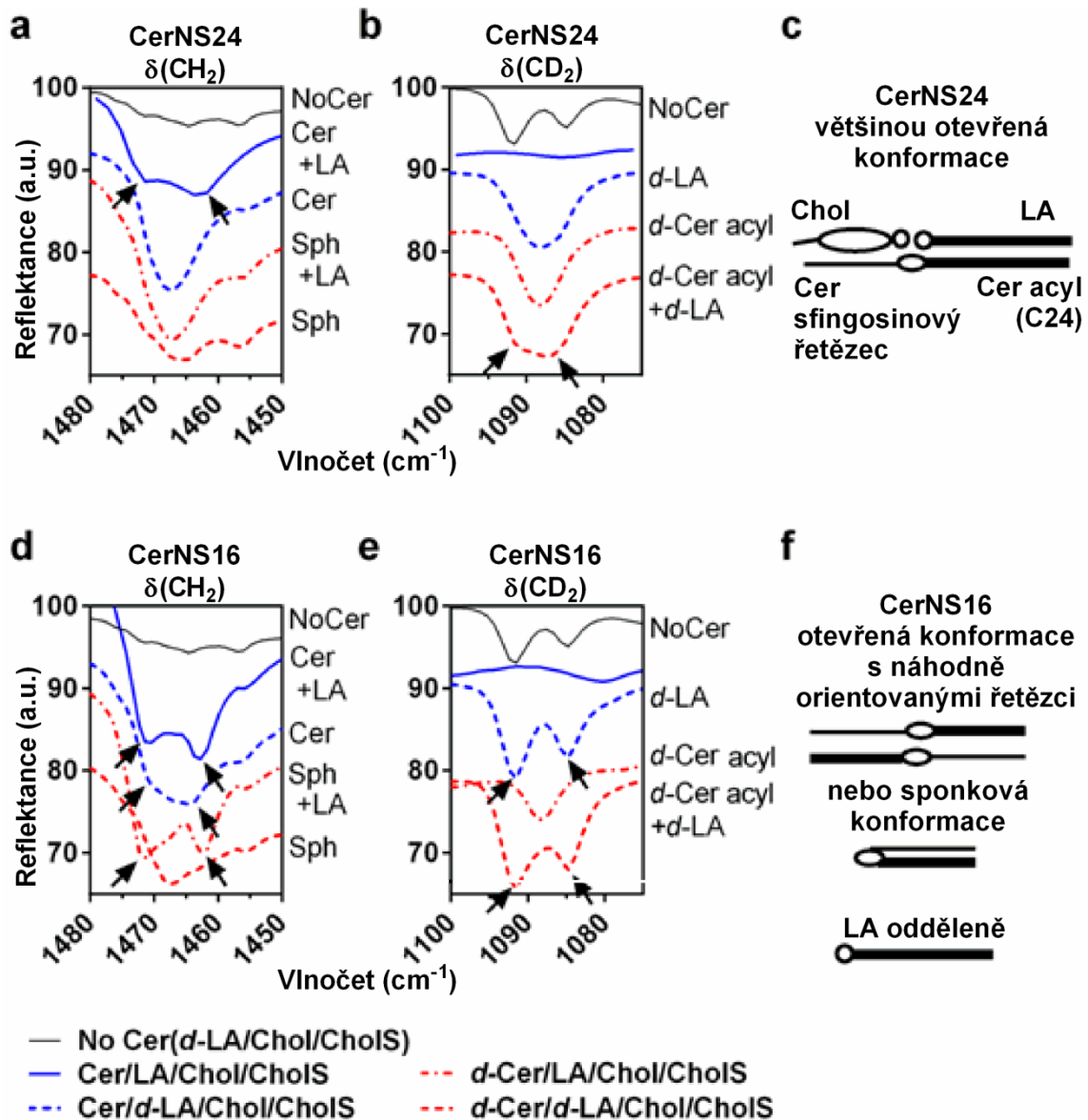
Ve třetí sadě vzorků byl CerNS16 nahrazen ceramidem s deuterovaným acylem, *d*-CerNS16 (Obr. 6, třetí sloupce v obou panelech). To umožnilo sledovat chování acylového řetězce *d*-CerNS16 (prázdné kroužky). V porovnání s *d*-CerNS24 je acyl *d*-CerNS16 za fyziologické teploty kůže méně uspořádaný (2089 cm<sup>-1</sup> pro acyl *d*-CerNS16 a 2087 cm<sup>-1</sup> pro acyl *d*-CerNS24). Při 48 °C dojde k uspořádání řetězce, což naznačuje pokles vlnčetu valenční vibrace o 1 cm<sup>-1</sup>. Hlavní fázový přechod začíná na 56 °C a končí přibližně při 70 °C. Nůžková vibrace CD<sub>2</sub> vykazuje singlet při 1088 cm<sup>-1</sup> a během hlavního fázového přechodu klesá o více než 1 cm<sup>-1</sup>. Tento singlet naznačuje, že je acyl buď v hexagonálním uspořádání, nebo se z části mísí s neznačeným řetězcem. Snížení uspořádanosti CH<sub>2</sub> řetězce, který představují sfingosinový řetězec a LA, začíná při 56 °C. Tyto řetězce tvoří relativně velké domény s orthorombickým uspořádáním (nůžkový dublet při 1462 cm<sup>-1</sup> a 1472 cm<sup>-1</sup>, které se spojí při 70 °C).

#### 4.3.8 *d*-CerNS16/*d*-LA/Chol/CholS

Informaci o sfingosinovém řetězci *d*-CerNS16 doplňuje vzorek, který obsahuje *d*-CerNS16 i *d*-LA. Vlnčet nůžkové vibrace nad 2850 cm<sup>-1</sup> naznačuje mnohem více *gauche* konformerů ve sfingosinovém řetězci v porovnání s acylem. Přibližně od 56 °C až do 62 °C se postupně snižuje uspořádanost řetězce, a poté vlnčet zůstává pod 2852 cm<sup>-1</sup>, což pravděpodobně odpovídá fázi kapalných krystalů. Deuterované řetězce jsou v průměru dobře uspořádané a jejich hlavní fázová tranzice začíná na 56 °C a končí při teplotě přibližně 66 °C. CD<sub>2</sub> nůžková vibrace vykazuje široký dublet, což naznačuje přítomnost velkých domén CD<sub>2</sub> řetězce. Dublet se náhle sbíhá mezi 56 °C a 62 °C. Sfingosinový řetězec naopak vykazuje pouze singlet. Když k tomu připočítáme fakt, že neznačný CerNS16 vykazuje dublet (Obr. 6, panel B, druhý graf, černé kroužky), zatímco jak jeho acylový řetězec (třetí graf, prázdné kroužky) tak sfingosinový řetězec (čtvrtý graf, černé kroužky) vykazují singlet, jsou tyto řetězce s největší pravděpodobností smíšené v jedné doméně. Toto chování naznačuje,

že CerNS16 zaujímá buď sponkovou konformaci, nebo otevřenou konformaci s náhodnou distribucí sfingosinového a acylového řetězce.

Přehled nůžkových vibrací v membránách s CerNS24 a CerNS16 spolu s návrhem možného uspořádání je zobrazen na Obr. 7.



**Obr. 7** Infračervená spektra lipidových směsí obsahujících ceramidy (Cer) s acyly o délce C24 (a–b) nebo C16 (d–e) s navrhovaným uspořádáním lipidů (c a f). Směsi lipidů byly složeny z ekvimolárního množství CerNS24 nebo CerNS16, LA, Chol s 5% přídatkem CholS. Cer a LA byly buď neznačené, nebo deuterované (znázorněno předponou *d*-). Pro porovnání jsou zobrazeny i vzorky bez ceramidu (značeny jako NoCer). Panely a a d ukazují  $\text{CH}_2$  nůžkové vibrace s neznačenými řetězci lipidů. Panely b a e ukazují  $\text{CD}_2$  nůžkové vibrace deuterovaných lipidových řetězů. Zkratka

Sph značí sfingosinový řetězec. Panely **c** a **f** znázorňují navrhované uspořádání CerNS24, respektive CerNS16 v připravených lipidických směsích.

#### 4.3.9 CerNS4/LA/Chol/CholS

V poslední sadě vzorků na Obr. 8 byl použit ceramid s krátkým řetězcem CerNS4. Při fyziologické teplotě kůže zaujímají lipidy podobně jako u předchozích vzorků převážně konformaci řetězců *all-trans*, jak lze vyvodit z nízké hodnoty methylenové symetrické valenční vibrace pod  $2848\text{ cm}^{-1}$ . Rozštěpení methylenové nůžkové vibrace do dvou částí při  $1463\text{ cm}^{-1}$  a  $1471\text{ cm}^{-1}$  naznačuje těsné uspořádání řetězců lipidů v orthorombické subcele. Hlavní fázový přechod je složen ze dvou částí: při  $52\text{ °C}$  dochází k mírné neuspořádanosti řetězců a při  $66\text{ °C}$  k přechodu do fáze tekutých krystalů. Při  $74\text{ °C}$  se lipidy vyskytují podobně jako u CerNS16 pravděpodobně v kapalně krystalické fázi.

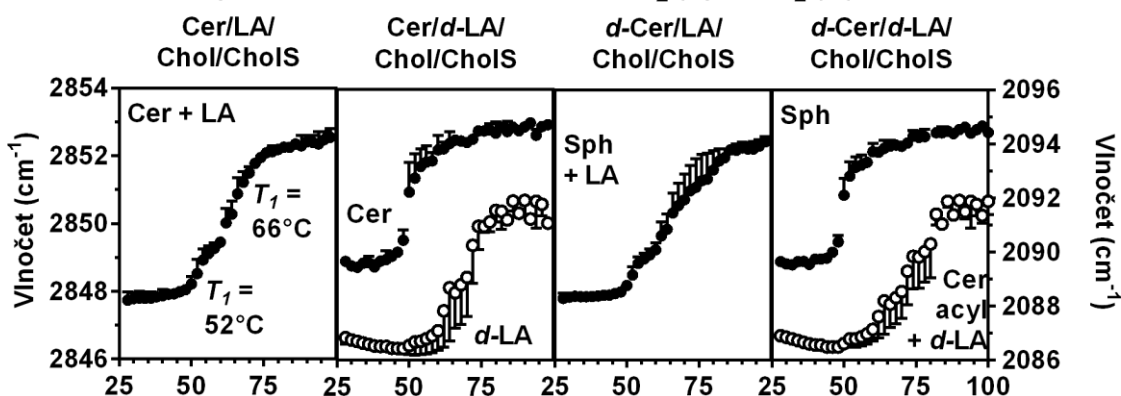
#### 4.3.10 CerNS4/*d*-LA/Chol/CholS

V dalším vzorku byla vyměněna LA za *d*-LA (Obr. 8, druhé sloupce). Na obrázku můžeme vidět teplotní závislost methylenové symetrické valenční vibrace (panel A) a nůžkové vibrace (panel B) buď  $\text{CH}_2$  skupin, které odpovídají vibracím CerNS4 řetězců (černé kroužky), nebo  $\text{CD}_2$  skupin, které představují *d*-LA (prázdné kroužky). Při teplotě  $32\text{ °C}$  je CerNS4 méně uspořádaný (vlnočet  $2849\text{ cm}^{-1}$ ) než *d*-LA (vlnočet  $2087\text{ cm}^{-1}$ ). Při  $34\text{ °C}$  je vidět malá pretranzice. Hlavní fázový přechod začíná při  $48\text{ °C}$  se středem přibližně při  $50\text{ °C}$ , což odpovídá první části fázového přechodu pozorovaného v předchozím vzorku. Chování řetězců je podobné jako ve směsích CerNS24 a CerNS16. Nůžková vibrace  $\text{CD}_2$  je rozštěpena na dublet s maximem při  $1084\text{ cm}^{-1}$  a  $1092\text{ cm}^{-1}$ , což naznačuje velké domény orthorombicky uspořádané *d*-LA. Dublet se nejprve mírně zužuje a při teplotě  $66\text{ °C}$  se spojí. Nůžková vibrace  $\text{CH}_2$  vykazuje singlet při  $1466\text{ cm}^{-1}$ , což znamená, že CerNS4 postrádá orthorombické uspořádání.

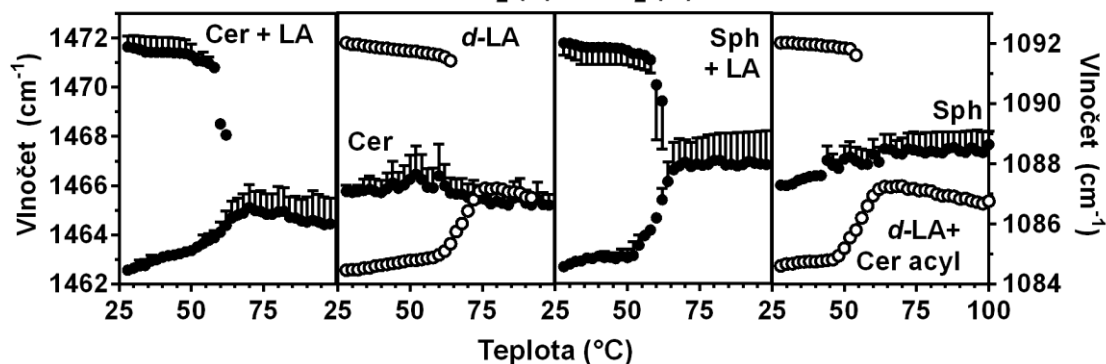
### 4.3.11 *d*-CerNS4/LA/Chol/CholS

Třetí část vzorků byla připravena s ceramidem s deuterovaným acylem (Obr. 8, třetí sloupce). Acylový řetězec *d*-CerNS4 je tak krátký, že se v grafu vůbec neukázal. Metylenová symetrická valenční vibrace CH<sub>2</sub> skupiny odpovídá sfingosinovému řetězci a LA. Nůžkový dublet se zužuje s rostoucí teplotou a mizí při 64 °C, tedy během hlavní fázové tranzice.

#### A - CerNS4 - symetrická valenční vibrace CH<sub>2</sub> (●) a CD<sub>2</sub> (○)



#### B - CerNS4 - nůžková vibrace CH<sub>2</sub> (●) a CD<sub>2</sub> (○)



**Obr. 8** ATR-FTIR spektroskopie vzorků lipidů obsahujících CerNS4. Teplotní závislost vlnočtu methylenové symetrické valenční vibrace (panel A) a nůžkové vibrace (panel B) buď pro CH<sub>2</sub> vibrace (černé kroužky) nebo CD<sub>2</sub> vibrace (prázdné kroužky). Data jsou průměrem ± SEM ze 2–3 měření.

### 4.3.12 *d*-CerNS4/*d*-LA/Chol/CholS

Ve čtvrtém vzorku lipidů jsou lipidy deuterované (*d*-CerNS4/*d*-LA/Chol/CholS), jak je vidět ve čtvrtých sloupcích grafu na Obr. 8. CH<sub>2</sub> vibrace pochází převážně



ze sfingosinového řetězce *d*-CerNS4. CD<sub>2</sub> vibrace pochází z acylového řetězce *d*-CerNS4 a LA. CH<sub>2</sub> vibrace potvrzují, že je sfingosinový řetězec méně uspořádaný (vlnočet 2851 cm<sup>-1</sup>) než acylový řetězec a *d*-LA. CD<sub>2</sub> nůžkové vibrace vykazují široký dublet, což naznačuje přítomnost velkých orthorombicky uspořádaných domén CD<sub>2</sub> řetězce. Dublet se ostře spojuje při 56 °C. Sfingosinový řetězec vykazuje podobně jako neznačený CerNS4 (druhý sloupec grafu) pouze singlet.

Při takto výrazném zkrácení acylového řetězce v CerNS4, acyl bohužel nejsme schopni v FTIR spektru detekovat. Ze získaných dat můžeme jen potvrdit, že se CerNS4 a LA nemísí a orthorombické uspořádání zaujímá jen LA. Uspořádání CerNS4 je převážně hexagonální, jeho konformaci však nemůžeme určit.

## 5 ZÁVĚR

V této diplomové práci byl studován vliv délky acylového řetězce ceramidu typu NS na jeho termotropní chování s cílem získání lepší představy o organizaci *stratum corneum* a funkci kožní bariéry.

Byla připravena série ceramidů odvozených od sfingosinu s deuterovaným acylovým řetězcem o délce 4C, 16C a 24C. Z nasyntetizovaných látek byly připraveny vzorky lipidů, které byly ekvimolární směsí ceramidu nebo deuterovaného ceramidu, lignocerové kyseliny nebo perdeuterované lignocerové kyseliny a cholesterolu s 5% hmotnostním přídatkem cholesterol-sulfátu. Termotropní chování těchto lipidických směsí bylo studováno pomocí infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací.

Bylo zjištěno, že délka acylu studovaných ceramidů má vliv na jejich konformaci. Většina molekul CerNS24 upřednostňuje v připravených lipidických směsích otevřenou konformaci, kdy je acyl CerNS24 asociovaný s acylem LA a cholesterol je asociovaný se sfingosinovým řetězcem. Oproti tomu CerNS16 se s LA nemísí a zaujímá buď sponkovou konformaci, nebo otevřenou konformaci s náhodnou distribucí sfingosinového a acylového řetězce. Dále můžeme potvrdit, že se CerNS4 s LA nemísí a tvoří samostatné domény. Konformaci CerNS4 bohužel určit nemůžeme z důvodu výrazného zkrácení acylového řetězce.

Výsledky této práce potvrdily, že pro správnou funkci kožní bariéry jsou zapotřebí ceramidy s velmi dlouhým acylovým řetězcem. Tyto poznatky mohou být využity při navrhování struktur analogů ceramidů určených pro léčbu dermatologických onemocnění.

## 6 SEZNAM ZKRATEK

ATR	zeslabená totální reflektance
Cer	ceramid
<i>d</i> -Cer	ceramid s deuterovaným acylovým řetězcem
<i>d</i> -LA	perdeuterovaná lignocerová kyselina
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
HoSu	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
Chol	cholesterol
CholS	cholesterol-sulfát
IR	infračervené spektrum
LA	lignocerová kyselina
NMR	nukleární magnetická rezonance
<i>R<sub>f</sub></i>	retenční faktor
SEM	standardní chyba průměru
Sph	sfingosinový řetězec ceramidu
SC	<i>stratum corneum</i>
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
WSC	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylkarbodiimid
$\gamma(\text{CH}_2)$	$\text{CH}_2$ kývavá deformační vibrace
$\delta(\text{CH}_2)$	$\text{CH}_2$ nůžková deformační vibrace
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	$\text{CH}_2$ asymetrická valenční vibrace
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	$\text{CH}_2$ symetrická valenční vibrace

## 7 LITERATURA

---

<sup>1</sup>Menon, G. K.: New Insights into skin structure: scratching the surface. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2002**, 54 (Suppl 1): S3-17

<sup>2</sup> Čihák, R.: *Anatomie 3*. 1. vydání. Praha 7: Grada Publishing, spol. s r. o., **1997**. 672 s. ISBN 80-7169-140-2. Integumentum commune – Kůže a kožní orgány, s. 559.

<sup>3</sup> Caussin, J.; Gooris, G.S.; Bouwstra, J.A.: FTIR studies show lipophilic moisturizers to interact with stratum corneum lipids, rendering the more densely packed, *Biochim. Biophys. Acta*, **2008**, 1778, 1517–1524.

<sup>4</sup> Madison, K. C.: Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **2003**, 121 (2), 231-41.

<sup>5</sup> Vávrová, K.; Hrabálek, A.: Role ceramidů v kůži. *Prakt. Lékáren.*, **2006**, 2, 55-58.

<sup>6</sup> Wertz, P. W.; van den Bergh, B.: The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chem. Phys. Lipids*, **1998**, 91, 85-96.

<sup>7</sup> Ponec, M.; Weerheim, A.; Lankhorst, P.; Wertz, P.: New acylceramide in native and reconstructed epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **2003**, 120 (4), 581-8.

<sup>8</sup> Zbytovská, J.; Vávrová, K.: Neutron Scattering in Skin Research. Neutron Scattering Methods and Studies, Lyons MJ, ed. Nova Science Pub, **2011**, ISBN-10: 1611225213, 89-110.

<sup>9</sup> Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Cerelli, S.; Ghidoni, R.: Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim. Biophys. Acta*, **1993**, 1182, 147-151.

<sup>10</sup> van Smeden, J.; Hoppel, L.; van der Heijden, R.; Hankemeier, T.; Vreeken, R. J.; Bouwstra, J. A.: LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *J. Lipid Res.*, **2011**, 52 (6), 1211-21.

<sup>11</sup> Lopez-Montero, I.; Rodriguez, N.; Cribier, S.: Rapid transbilayer movement of ceramides in phospholipid vesicles and in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280:25811-9.

<sup>12</sup> Corkery, R.W.: The anti-parallel, extended or splayed-chain conformation of amphiphilic lipids. *Colloid Surf.*, **2002**, B 26:3-20.

<sup>13</sup> Iwai, I.; Han, H.; den Hollander, 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**, 132:2215-25.

- 
- <sup>14</sup> Hrabálek, A.; Vávrová, K.: Lze překonat kožní bariéru? *Prakt. Lékařn.*, **2005**, 1, 8-11.
- <sup>15</sup> Novotný, J.; Hrabálek, A.; Vávrová, K.: Synthesis and Structure-Activity Relationships of Skin Ceramides. *Curr. Med. Chem.*, **2010**, 17, 2301-2324.
- <sup>16</sup> Školová, B.: Ceramides in the Skin Lipid Membranes: Length Matters. *Langmuir*, **2013**, 29(50):15624-15633.
- <sup>17</sup> Forslind, B.: A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Derm. Venereol*, **1994**, 74 (1), 1-6.
- <sup>18</sup> Babita, K.; Kumar, V.; Rana, V.; Jain, S.; Tiwary, A.: Thermotropic and spectroscopic behavior of skin: Relationship with percutaneous permeation enhancement. *Curr. Drug Deliv.*, **2006**, 3, 95-11366
- <sup>19</sup> Lafleur, M.: Phase behaviour of model Stratum corneum lipid mixtures: an infrared spectroscopy investigation, *Can. J. Chem.*, **1998**, 76, 1501-1511
- <sup>20</sup> Macphail, R. A.; Strauss, H. L.; Snyder, R. G.; Elliger, C. A.: C-H stretching modes and the structure of normal-alkyl chains .2. Long, all-trans chains. *J. Phys. Chem.*, **1984**, 88 (3), 334-341.
- <sup>21</sup> 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.
- <sup>22</sup> Boncheva, M.; Damien, F.; Normand, V.: Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **2008**, 1778 (5), 1344-55.
- <sup>23</sup> Smith, Brian C.: *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. 2. vydání. Taylor and Francis Group, LLC, **2011**, 194 s. ISBN 978-1-4200-6929-7. s. 9
- <sup>24</sup> Lewis, R.; McElhaney, R. N.: The structure and organization of phospholipid bilayers as revealed by infrared spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids*, **1998**, 96 (1-2), 9-12.
- <sup>25</sup> Garidel, P.; Boese, M.: Non-Invasive Fourier Transform Infrared Microspectroscopy and Imaging Techniques: Basic Principles and Applications. *Modern Research and Educational Topics.*, 7 ed.; Méndez-Vilas, A.; Días, J., Eds. Formatex: **2007**; pp 132-143
- <sup>26</sup> Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A.: Infrared spectroscopic study of stratum corneum model membranes prepared from human ceramides, cholesterol, and fatty acids. *Biophys. J.*, **2007**, 92 (8), 2785-95.

- 
- <sup>27</sup> Lewis, R.N.A.H.; McElhaney, R.N.: FTIR spectroscopy in the study of hydrated lipids and lipid bilayer membranes. *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*. (Mantsch, H. H.; Chapman, D.; Eds.), John Wiley & Sons, New York, **1996**, 159-202.
- <sup>28</sup> Dluhy, R.A.; Chowdhry, B.Z.; Cameron, D.G.: IR characterization of conformational differences in the lamellar phases of DPPC. *Biochim. Biophys. Acta*, **1985**, 821, 437–444.
- <sup>29</sup> Umemura, J.; Cameron D.G.; Mantsch, H. H.: A FTIR study of the molecular interaction of cholesterol with DPPC, *Biochim. Biophys. Acta*, **1980**, 602, 32–44.
- <sup>30</sup> Snyder, R. G.; Liang, G. L.; Strauss, H. L.; Mendelsohn, R.: IR spectroscopic study of the structure and phase behavior of long-chain diacylphosphatidylcholines in the gel state. *Biophys J*, **1996**, 71 (6), 3186-3198.
- <sup>31</sup> Moore, D. J.; Rerek, M. E.; Mendelsohn, R.: Lipid domains and orthorhombic phases in model stratum corneum: evidence from Fourier transform infrared spectroscopy studies. *Biochem Biophys Res Commun*, **1997**, 231 (3), 797-801.
- <sup>32</sup> Janůšová, B.; Zbytovská, J.; Lorenc, P.: Effect of ceramide acyl chain length on skin permeability and thermotropic phase behavior of model stratum corneum lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, 1811:129-37.
- <sup>33</sup> Arseneault, M.; Lafleur, M.: Cholesterol sulfate and Ca<sup>2+</sup> modulate the mixing properties of lipids in stratum corneum model mixtures. *Biophys. j.*, **2007**, 92:99-114.
- <sup>34</sup> Pare, C.; Lafleur, M.: Formation of liquid ordered lamellar phases in the palmitic acid/cholesterol system. *Langmuir*, **2001**, 17:5587-94.
- <sup>35</sup> Ouimet, J.; Lafleur, M.: Hydrophobic match between cholesterol and saturated fatty acid is required for the formation of lamellar liquid ordered phases. *Langmuir*, **2004**, 20:7474-81.
- <sup>36</sup> Mendelsohn, R.; Liang, G. L.; Strauss, H. L.: IR spectroscopic determination of gel state miscibility in long-chain phosphatidylcholine mixtures. *Biophys. J.*, **1995**, 69:1987-98.