

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANORGANICKÉ A ORGANICKÉ CHEMIE

SYNTÉZA A STUDIUM 1-O-ACYLCERAMIDŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vojtěch Jon

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

Konzultant: Mgr. Andrej Kováčik

Hradec Králové 2017

Poděkování

Zde bych chtěl poděkovat své školitelce doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za lidský přístup a vysokou míru profesionality při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat za ochotu a pomoc Mgr. Andrejovi Kováčikovi, Mgr. Monice Kopečné, PharmDr. Jaroslavu Rohovi, Ph.D. a RNDr. Jaroslavu Maixnerovi, CSc. V neposlední řadě také ostatním pracovníkům Katedry anorganické a organické chemie, Grantové agentuře ČR (projekt 16-25687J) a Grantové agentuře Univerzity Karlovy (88615).

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

Vojtěch Jon

V Hradci Králové 2017

.....

podpis

Obsah

1. ABSTRAKT	7
2. ABSTRACT	9
3. ÚVOD A CÍL PRÁCE.....	11
4. TEORETICKÁ ČÁST.....	12
4.1 Kůže.....	12
4.1.1 Stratum corneum	13
4.2 Ceramidy	14
4.2.1 Uspořádání lipidů v zdravém SC.....	16
4.2.1.1 Lamelární uspořádání.....	16
4.2.1.2 Laterální uspořádání	16
4.2.2 1-O-acyl-Cer.....	17
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST-SYNTÉZA	19
5.1 Chemikálie a přístroje	19
5.2 Syntéza.....	19
5.2.1 Příprava Cer-24NS16.....	22
5.2.1.1 Postup A	22
5.2.1.2 Postup B	22
5.2.1.3 Postup C	23
5.2.1.3.1 Cer-24NS16	23
5.2.2 Příprava Cer-16NS16.....	24
5.2.2.1.1 Cer-16NS16	24
5.2.3 Příprava Cer-24AS16	25
5.2.3.1 Syntéza 2-brompalmitové kyseliny ⁴⁰	25
5.2.3.1.1 2-brompalmitová kyselina	25
5.2.3.2 Syntéza 2-hydroxypalmitové kyseliny ⁴⁰	26
5.2.3.2.1 2-hydroxypalmitová kyselina	26
5.2.3.3 Syntéza Cer-AS16	27
5.2.3.3.1 Cer-AS16.....	27

5.2.3.4	Syntéza Cer-24AS16	28
5.2.3.4.1	Cer-24AS16.....	29
5.2.3.4.2	Cer-24AS16-24	29
6.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST – HODNOCENÍ MODELOVÝCH LIPIDOVÝCH MEMBRÁN	31
6.1	Chemikálie a přístroje	31
6.2	Příprava modelových membrán.....	31
6.2.1	Jednoduchý model	31
6.2.2	Komplexní model	33
6.3	Měření bariérových vlastností modelových lipidových membrán.....	34
6.3.1	Měření ztráty vody membránou	34
6.3.2	Měření elektrické impedance	35
6.3.3	Měření permeability modelových membrán pro TH a IND	35
6.3.3.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	36
6.3.4	Hodnocení mikrostruktury modelových membrán.....	37
6.3.4.1	IČ spektroskopie.....	37
6.3.4.2	RPD.....	38
6.4	Zpracování dat.....	38
7.	VÝSLEDKY.....	39
7.1	Syntéza.....	39
7.2	Výsledky hodnocení – jednoduchý model	39
7.2.1	Ztráta vody membránou	39
7.2.2	Elektrická impedance	40
7.2.3	Permeabilita modelových membrán pro TH a IND	41
7.2.3.1	Flux TH.....	41
7.2.3.2	Flux IND	42
7.2.4	IČ spektroskopie.....	44
7.2.4.1	Symetrické valenční vibrace.....	44
7.2.4.2	Deformační nůžkové vibrace.....	44
7.2.5	RPD.....	45
7.3	Výsledky hodnocení – komplexní model.....	48
7.3.1	Ztráta vody membránou	48
7.3.2	Elektrická impedance	48
7.3.3	Permeabilita modelových membrán pro TH a IND	48

7.3.3.1	Flux TH.....	48
7.3.3.2	Flux IND	49
8.	DISKUZE	52
8.1	Syntéza	52
8.2	Hodnocení modelových membrán.....	53
8.2.1	Jednoduchý model	53
8.2.2	Komplexní model	55
9.	ZÁVĚR	57
10.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	58
11.	POUŽITÁ LITERATURA.....	59

1. ABSTRAKT

Extracelulární matrix nejsvrchnější vrstvy kůže tzv. *stratum corneum* (SC), je složena z ceramidů (Cer), cholesterolu (Chol), volných mastných kyselin (FFA) a cholesterol-sulfátu (CholS). Cer hrají důležitou roli ve správné bariérové funkci savčí epidermis. V nedávné době byl v lidské SC nalezen nový typ sfingolipidů tj. 1-*O*-acyl-Cer, jejich role v SC je však neznámá. Tyto druhy Cer tvoří sfingosin (S), jenž je *N*-acylován nehydroxylovanou nebo α -hydroxylovanou mastnou kyselinou a navíc je hydroxy skupina v poloze 1 sfingosinu acylována další mastnou kyselinou (lignocerovou kyselinou, C24 nebo palmitovou kyselinou, C16). Protože 1-*O*-acyl-Cer nejsou komerčně dostupné, dali jsme si za cíl připravit fyziologické 1-*O*-acyl-Cer tj. Cer-24NS16, Cer-16NS16 a Cer-24AS16. Naším dalším cílem je studium jejich vlivu na permeabilitu a mikrostrukturu modelových kožních lipidových membrán.

1-*O*-acyl-Cer byly syntetizovány acylací primárního hydroxyly Cer-NS16 nebo Cer-AS16 palmitovou nebo lignocerovou kyselinou pomocí *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimidu s 4-dimethylaminopyridinem. Cer-AS16 byl připraven α -bromací palmitové kyseliny, substitucí bromidu hydroxylovou skupinou a *N*-acylací sfingosinu touto připravenou kyselinou v přítomnosti *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimidu a 1-hydroxybenzotriazolu.

Následně jsme připravili jednoduchý model SC lipidových membrán s následujícím složením: Cer-NS24/FFA C₁₆₋₂₄/Chol/CholS jako kontrolní membrána a poté 5, 10, 20, 30, nebo 100 % Cer-NS24 bylo nahrazeno Cer-24NS16. Druhý komplexní model SC lipidových membrán byl tvořen izolovanými Cer z lidského SC/FFA C₁₆₋₂₄/Chol/CholS, kde 10% podíl SC Cer byl nahrazen Cer-24NS16, Cer-16NS16, Cer-24AS16 nebo Cer-24AS16-24. Permeabilita modelových lipidových membrán SC byla měřena ve Franzových difúzních celách, pomocí fluxu teofylinu a fluxu indometacinu, elektrické impedance a ztráty vody membránou. Vliv 1-*O*-acyl-Cer na biofyzikální chování membrán SC byl zkoumán pomocí infračervené spektroskopie a rentgenové práškové difrakce.

Na základě výsledků permeačních pokusů jsme zjistili, že 10% podíl 1-*O*-acyl-Cer v modelových membránách (jednoduchý model) vede k poklesu permeability pro vodu

a ionty. Na druhou stranu přítomnost 10% podílu 1-*O*-acyl-Cer v komplexním modelu nevedla k změně permeability nebo ji mírně zvýšila. Pomocí IČ spektroskopie jsme zjistili, že vliv 1-*O*-acyl-Cer na konformaci lipidových řetězců, fázové přechody i laterálním uspořádání lipidů v modelových membránách není příliš významný. Lamelární uspořádání modelových lipidových membrán bylo dále hodnoceno pomocí rentgenové práškové difrakce. Ve všech studovaných membránách byla přítomna fáze separovaného Chol a krátká lamelární fáze s periodicitou přibližně 5,3–5,7 nm.

Tato práce poskytuje první charakterizaci 1-*O*-acyl-Cer, jakožto složek extracelulární matrix SC. Tyto lipidy bariérovou funkci studovaných membrán s lidskými Cer buď neovlivňují, nebo mírně zhoršují; mezi jednotlivými strukturními typy 1-*O*-acyl-Cer jsme nepozorovali významné rozdíly.

2. ABSTRACT

The extracellular matrix of the uppermost layer of the skin, the *stratum corneum* (SC), consists of ceramides (Cer), cholesterol (Chol), free fatty acids (FFA) and cholesteryl sulfate (ChoS). Cer play an important role in the correct barrier function of mammalian epidermis. A new type of sphingolipids, *i.e.*, 1-*O*-acyl-Cer, have been found in human SC very recently; however, their role in the SC is unknown. These Cer species contain sphingosine (S) that is *N*-acylated with non-hydroxylated or α -hydroxylated fatty acid, and moreover, hydroxyl group at C1 in sphingosine is esterified by an additional fatty acid (lignoceric acid, C24 or palmitic acid, C16). Because 1-*O*-acyl-Cer are not commercially available, we aimed to synthesize physiological 1-*O*-acyl Cer, *i.e.*, Cer-24NS16, Cer-16NS16 and Cer-24AS16. Moreover, we aimed to study their behaviour on permeability and microstructure of model skin lipid membranes.

The 1-*O*-acyl-Cer were synthesized by an acylation of Cer-NS16 or Cer-AS16 with palmitic or lignoceric acid using *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide and 4-dimethylaminopyridine. Cer-AS16 was prepared by α -bromination of palmitic acid, substitution of bromine by hydroxyl and *N*-acylation of sphingosine by the prepared acid in the presence *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide and 1-hydroxybenzotriazole.

Afterward, simple model SC lipid membranes were prepared with the following composition: Cer-NS24/FFA C₁₆₋₂₄/Chol/ChoS as a control membrane and then 5, 10, 20, 30, or 100% of Cer-NS24 was replaced by Cer-24NS16. Next, the complex model SC lipid membranes were composed of isolated Cer from human SC/FFA C₁₆₋₂₄/Chol/ChoS, in where 10% of SC Cer were replaced by Cer-24NS16, Cer-16NS16, Cer-24AS16 or Cer-24AS16-24. The permeability of model lipid membranes SC was assessed in Franz-type diffusion cells using the following permeability markers: flux of theophylline and flux of indomethacin, electrical impedance and water loss through the membrane. To elucidate the mechanisms of 1-*O*-acyl-Cer on skin permeability, their effects on the membrane biophysics was investigated by infrared spectroscopy and X-ray powder diffraction.

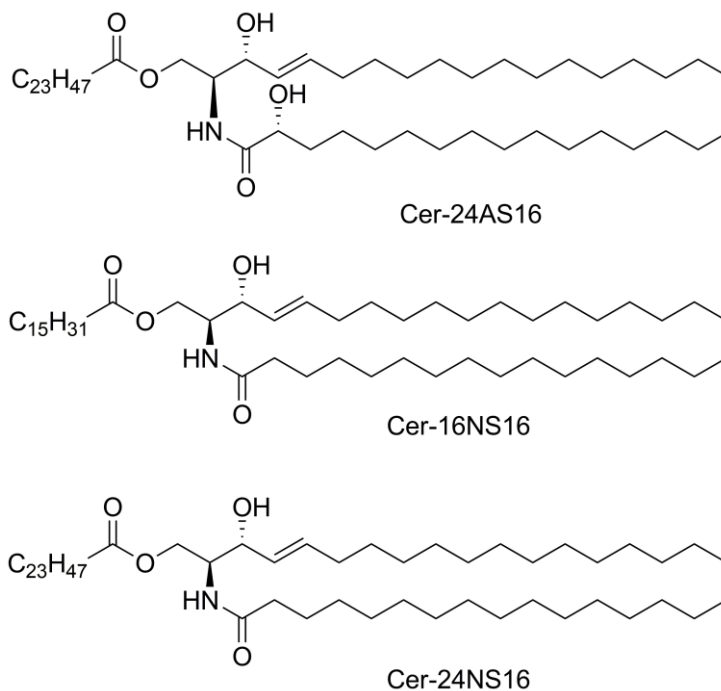
From the results of permeation studies we found out that a 10% addition of 1-*O*-acyl-Cer in model membranes (simple model) led to decrease of permeability for water and ions. On the other hand, the presence of 10% of 1-*O*-acyl-Cer in complex model did not change the permeability or slightly increased it. Using IR spectroscopy we found that the effect of 1-*O*-acyl-Cer on the conformation of the lipid chains, phase transitions and lateral arrangement of lipids in model membranes is not very significant. Lamellar arrangement of model lipid membranes was further evaluated by X-ray powder diffraction. In all studied membranes was present phase of separated Chol and short lamellar phase with a periodicity of approximately 5.3 to 5.7 nm.

This work provides the first characterization of 1-*O*-acyl-Cer, as the components of extracellular matrix SC. These lipid do not affect or slightly deteriorate the barrier function of studied membranes with the human Cer; between different structural types of 1-*O*-acyl-Cer we did not observe significant differences.

3. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Kůže je největším orgánem lidského těla, její hlavní funkcí je ochrana proti vnějším vlivům, zejména zamezení nadměrným ztrátám vody a udržení homeostázy organismu. Kožní bariéra, umístěná v nejsvrchnější vrstvě epidermis (*stratum corneum*), je tvořena korneocyty a lipidy, které vyplňují extracelulární prostory v této vrstvě. Hlavní složkou těchto lipidů jsou ceramidy (Cer). Cer je molekula tvořena nejčastěji jednou ze čtyř sfingoidních bází (sfingosin, dihydrosfingosin, fytosfingosin a 6-hydroxysfingosin) a acylem mastné kyseliny navázaným na aminoskupinu v poloze 2. V nedávné době byl v lidské epidermis objeven nový druh Cer s acylem mastné kyseliny esterově vázaným také na hydroxylovou skupinu v poloze 1 sfingosinu (1-*O*-acyl-Cer). Význam těchto 1-*O*-acyl-Cer není dosud objasněn.

Proto bylo cílem této práce připravit fyziologické 1-*O*-acyl-Cer a hodnotit jejich bariérové vlastnosti studiemi modelových kožních membrán. Permeabilita modelových membrán byla hodnocena pomocí čtyř markerů (ztráta vody membránou, elektrická impedance, flux teofylinu a flux indometacinu); jejich mikrostruktura byla hodnocena infračervenou spektroskopií a práškovou rentgenovou difrakcí.



Obrázek 1. Struktury 1-*O*-acyl-Cer, jejichž syntéza a hodnocení je cílem této práce.

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1 Kůže

Při ploše 1,5–2 m² a hmotnosti kolem 3 kg je kůže největší orgán lidského těla.¹ Mezi její nejdůležitější funkce patří ochrana před vnějšími vlivy (mikroby, toxiny, záření aj.), termoregulace, látková výměna, syntéza vitamínu D, zabránění nadměrné ztrátě vody a další.^{1, 2}

Kůže je tvořena třemi základními vrstvami: 1) dermis,

2) epidermis,

3) subkutánní tuková tkáň.

Dermis (škára) je tvořena vazivovými vlákny, která jsou důležitá pro pevnost a pružnost kůže. V hlubších vrstvách obsahuje také buňky hladkého svalstva. Tato vrstva je také protkána krevními cévami. Epidermis (pokožka) je svrchní avaskularizovaná vrstva, která je tvořena buňkami pokožky a to především keratinocyty (Obrázek 2).¹

Epidermis se skládá z následujících vrstev: *stratum basale*,

stratum spinosum,

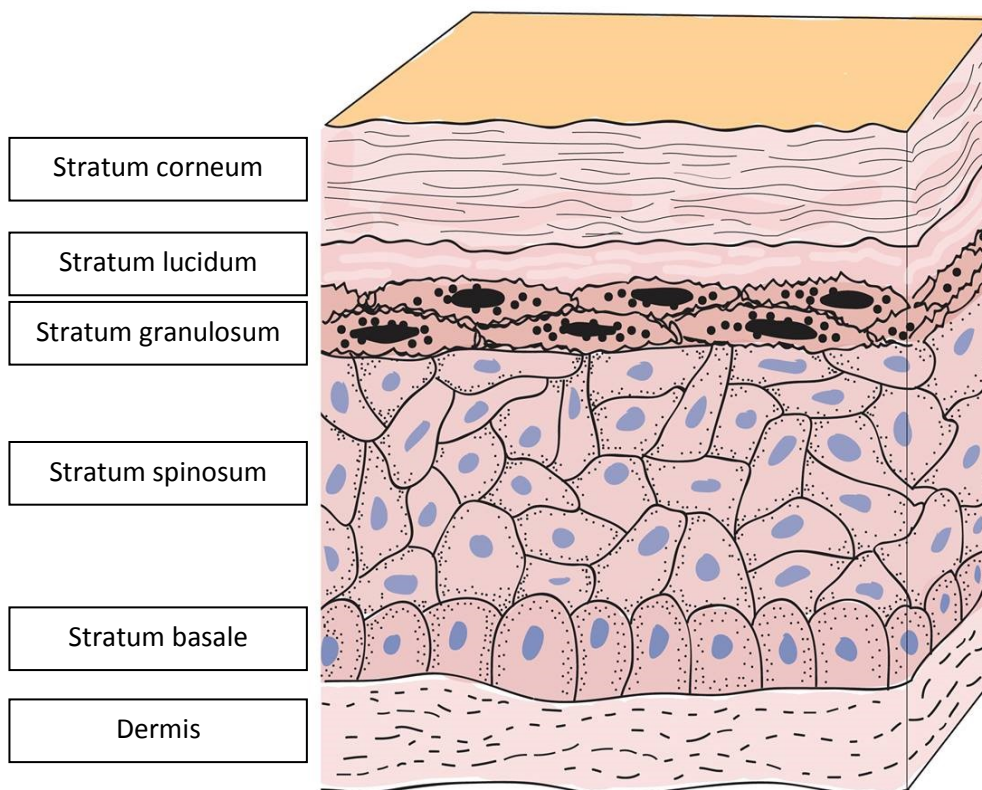
stratum granulosum,

stratum lucidum,

stratum corneum.

Stratum basale (SB) je nejvnitřnější vrstva tvořena cylindrickými kmenovými buňkami, jež zajišťují buněčné dělení. *Stratum spinosum* (SS) je tvořena buňkami, které se postupně oplošťují a dostávají charakteristický kopinatý tvar. *Stratum granulosum* (SG) tvoří oploštělé keratinocyty, jež obsahují keratohyalinní granula (jejichž obsahem je hlavně lorikrin, profilagrin, keratin), postupně migrující k nejsvrchnější vrstvě *stratum corneum* (SC). Kromě těchto vrstev můžeme na dlaních a chodidlech nalézt další vrstvu mezi SC a SG, tzv. *stratum lucidum*.^{1, 3} Oblast SC, kde vlivem proteolytických enzymů dochází k degradaci a následně přirozené deskvamaci kůže, se

nazývá *stratum disjunctum*.^{4, 5} SB, SS a SG jsou části živé epidermis o tloušťce 50–100 μm . SC s tloušťkou 10–20 μm je vrstvou tvořenou neživými buňkami (Obrázek 2).⁶



Obrázek 2. Schématické znázornění lidského kůže, tj. škáry (dermis) a jednotlivých vrstev pokožky (epidermis).

4.1.1 Stratum corneum

SC neboli rohová vrstva se nachází v nejsvrchnější vrstvě epidermis. Je tvořena 10–25 vrstvami korneocytů, které jsou terminálním stadiem diferenciací keratinocytů. Tyto ploché, vodou a keratinem vyplněné buňky s degradovanými organelami jsou navzájem spojeny desmozomy a jejich povrch je dále zpevněn tzv. korneocytární obálkou, která je tvořena především zesíťovanými bílkovinami involucrin a lorikrin. Právě v SC je lokalizována kožní bariéra pro většinu látek. Mezi korneocyty se nachází hydrofobní lipidová matrix. Tato struktura se někdy popisuje jako model „cihel“ (korneocyty) a „malty“ (lipidová matrix).^{7, 8}

Lipidová matrix tvoří kolem 20 % hmotnosti SC, a přesto právě mezibuněčné lipidy jsou dnes považovány za hlavní složku kožní bariéry.⁹ Lidská SC je tvořena

přibližně ekvimolárním poměrem Cer, cholesterolu (Chol) a volných mastných kyselin (angl. *free fatty acids*; FFA), které jsou především nasycené. Tyto majoritní složky jsou dále doplněny menším podílem esterů Chol a cholesterol-sulfátem (ChoS).^{2, 10, 11}

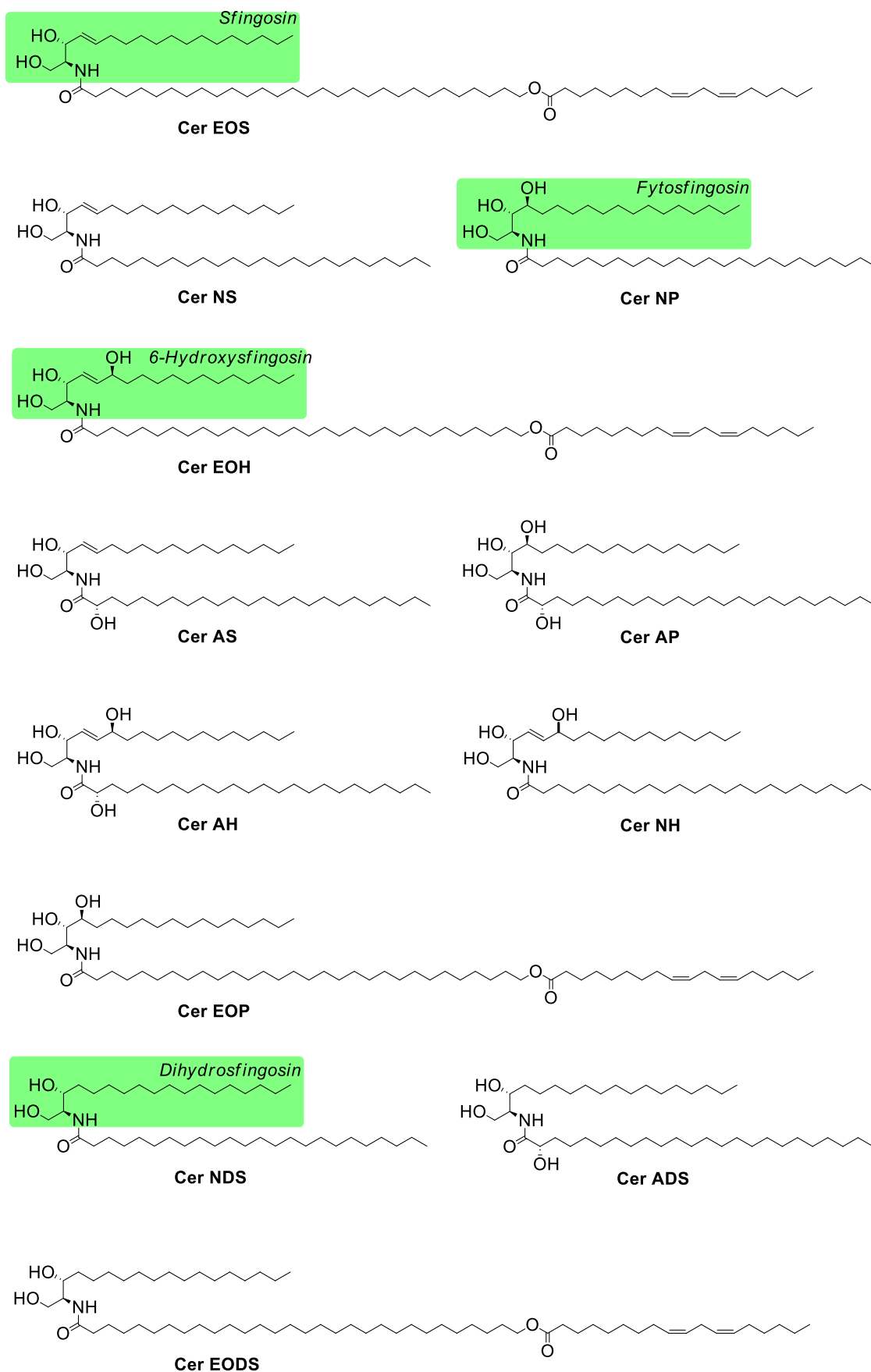
Studium Cer, jakožto esenciálních složek kožní bariéry, má velký význam pro výzkum transdermálního podání léčiv.¹² Další oblastí zájmu je terapie kožních onemocnění, při nichž bývá narušena kožní bariéra, např. psoriáza či atopická dermatitida. Tyto anomálie lidské epidermis často souvisí s nedostatkem či abnormálním zastoupením Cer.¹³

4.2 Ceramidy

Cer patří spolu s fosfosfingolipidy a glykosfingolipidy mezi sfingolipidy. Základem jejich struktury je jeden z bazických aminoalkoholů, a to buď sfingosin (S), fytosfingosin (P), 6-hydroxysfingosin (H) nebo dihydrosfingosin (DS), na jehož primární aminoskupinu se váže amidovou vazbou acyl mastné kyseliny. Mastná kyselina (13–34 uhlíků) může být nehydroxylovaná (N), α -hydroxylovaná (A) nebo ω -hydroxylovaná (O). Koncový ω -hydroxyl je dále esterifikován kyselinou linolovou (EO).

Cer je tvořen malou polární hlavou a dlouhými hydrofobními uhlovodíkovými řetězci. Díky této struktuře má molekula Cer amfifilní charakter.¹⁴⁻¹⁶ Za zmínku stojí prostorové uspořádání jednotlivých hydrofobních řetězců. První konformace je konformace vlásenková, kdy oba řetězce směřují stejným směrem. Druhá konformace je konformace otevřená, kdy řetězce míří každý na opačnou stranu.¹⁷⁻¹⁹

Strukturní variabilita Cer dává vzniknout široké škále zástupců, kteří se mohou lišit aminoalkoholem, typem či délkou obou řetězců. V minulosti byly jednotlivé strukturní typy Cer označovány arabskou číslicí, kvůli přibývajícím typům bylo však potřeba zavést systematickou nomenklaturu. Dnes se uplatňuje především nomenklatura dle Motty, kde se využívá kombinace písmen (viz výše), která jsou přiřazena k jednotlivým typům aminoalkoholů a acylům mastných kyselin.²⁰ Např. Cer-NS je tvořen sfingosinem a nehydroxylovaným acylem (N). Základní strukturní typy Cer (značených nomenklaturou dle Motty) jsou zobrazeny v Obrázku 3.



Obrázek 3. Dvanáct základních typů Cer podle nomenklatury dle Motty.²⁰

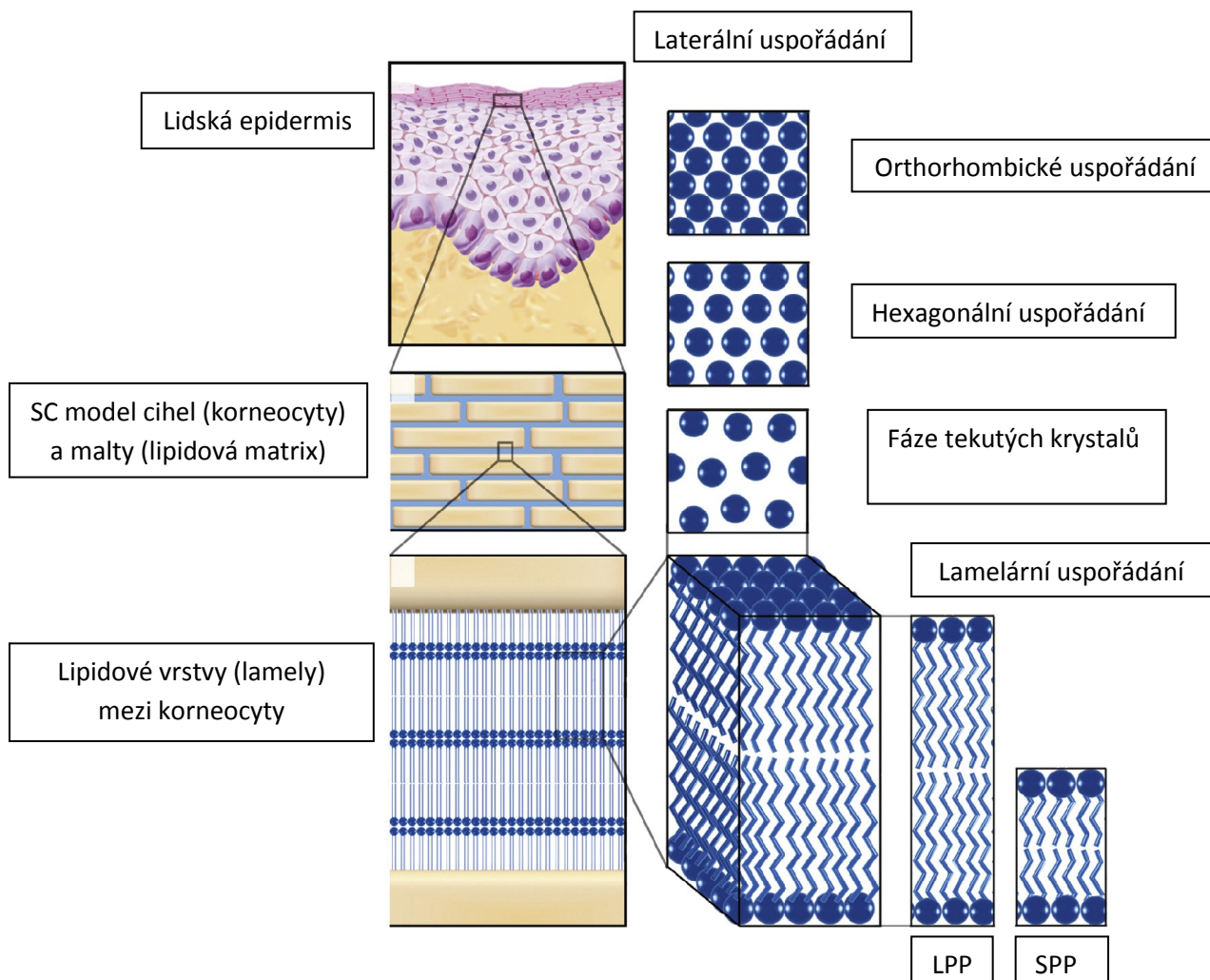
4.2.1 Uspořádání lipidů v zdravém SC

4.2.1.1 Lamelární uspořádání

Cer jsou v SC uspořádány do lamelárních struktur, které tvoří spolu s Chol, FFA, CholS a estery Chol. V těchto strukturách orientují Cer hydrofobní řetězce dovnitř lamel a polární hlavy zase vně.⁹ Zatímco hydrofobní řetězce interagují hydrofobními interakcemi, polární hlavy mohou tvořit vodíkové vazby.^{14, 21} Na rozdíl od fosfolipidů mají Cer menší polární hlavu, což jim umožňuje těsnější uspořádání lamel. Cer také netvoří dvojvrstvy jako fosfolipidy, ale právě vícevrstevné struktury (lamely). Díky tomuto uspořádání se SC vyznačuje tak vysokou mírou nepropustnosti.^{15, 22, 23} Lipidy SC člověka tvoří tzv. krátkou lamelární fázi (~ 5–6 nm, angl. *short periodicity phase*; SPP), dlouhou lamelární fázi (~ 12–13 nm, angl. *long periodicity phase*; LPP) a také fázi separovaného Chol (~ 3,4 nm).²⁴⁻³⁰

4.2.1.2 Laterální uspořádání

Organizace lipidů v lamelách potom označujeme jako laterální uspořádání. Ve zdravém lidském SC je nejčastějším typem laterální organizace velmi těsné (orthorhombické) uspořádání. V tomto uspořádání jsou lipidy pevně uspořádány. Druhý typ uspořádání je tzv. hexagonální. Tento volnější typ organizace lipidů v lamelě umožňuje jejich částečnou rotaci. Lipidy se mohou nacházet i ve třetím typu organizace známé jako fáze tekutých krystalů. V této fázi lipidy již vykonávají rotační i translační pohyby. Všechny tyto tři typy organizace lipidů můžeme nalézt ve zdravém lidském SC (Obrázek 4).³¹⁻³⁴



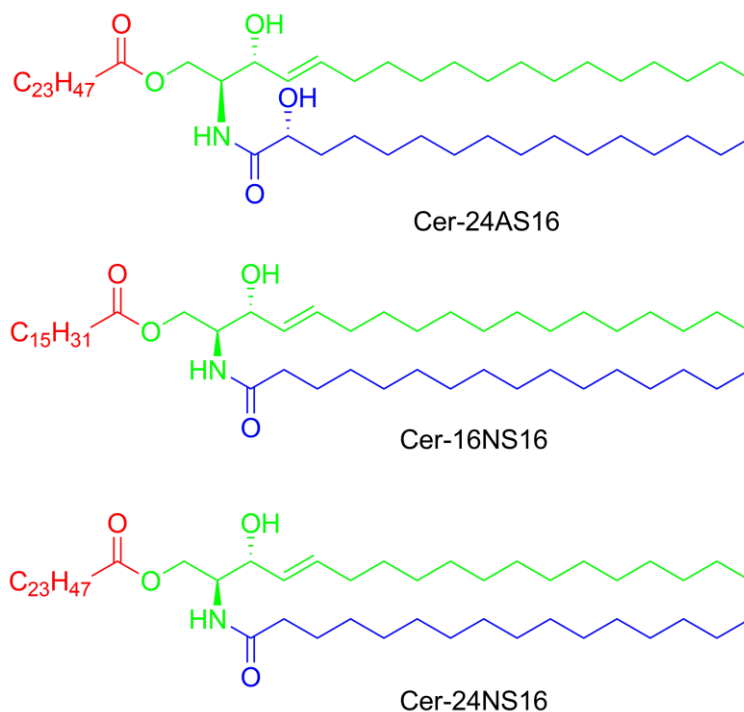
Obrázek 4³⁵. Uspořádání lipidů v SC. Vlevo nahoře lidská epidermis a její vrstvy. Vlevo uprostřed znázorněn detail SC („cihel a malty“), které je tvořeno korneocyty a lipidovou matrix. Vlevo dole je detail lipidové matrix s lipidy v lamelárním uspořádání mezi korneocyty. Vpravo nahoře laterální uspořádání (orthorhombické, hexagonální, tekuté krystalů). Vpravo dole ukázka lamelárního uspořádání LPP (~ 12–13 nm) a SPP (~ 5–6 nm).³⁵

4.2.2 1-O-acyl-Cer

Poprvé byly 1-O-acyl-Cer objeveny v mozku potkanů.³⁶ Dále pak byly nalezeny i v dalších tkáních, kde za jejich biosyntézou stojí enzym LPLA₂ (lysosomální fosfolipáza A₂).³⁷ Práce Rabionet a kol.³⁸ poprvé popisuje 1-O-acyl-Cer jako novou skupinu Cer v lidské epidermis. Bylo zjištěno, že jejich biosyntéza v epidermis neprobíhá pomocí LPLA₂. Přesná lokalizace této biosyntézy epidermálních 1-O-acyl-Cer není zatím určena,

avšak předpokládá se její umístění v endoplazmatickém retikulu kožní buňky, kde by mohly být 1-*O*-acylovány pomocí enzymu DGAT2 (diacylglycerol *O*-acyltransferáza 2), který normálně acyluje diacylglyceroly.³⁸ DGAT2 je homologii enzymu Dga1p (diacylglycerol *O*-acyltransferáza), který se podílí na 1-*O*-acylaci Cer u kvasinek.³⁹ Strukturně se jedná o velmi bohatou skupinu látek; bylo nalezeno několik desítek druhů 1-*O*-acyl-Cer.³⁸ Množství těchto Cer je přibližně 5 % ze všech esterifikovaných Cer nebo také 2,3 % ze všech Cer v lidské epidermis.

Strukturně tyto 1-*O*-acyl-Cer (odvozené od sfingosinu) obsahují kromě acylu mastné kyseliny amidově vázaném na aminoskupině v poloze 2 sfingosinu také acyl esterově vázaný na primárním hydroxyly v poloze 1 sfingosinu. Oba tyto acyly jsou tvořeny nasycenými mastnými kyselinami o délce 16–20 (dlouhé) a 22–26 uhlíků (velmi dlouhé). Amidově vázaný acyl může být nehydroxylovaný (N) nebo hydroxylovaný v poloze alfa (A) a to v délce nejčastěji 16 uhlíků. Struktura 1-*O*-acyl-Cer je znázorněna na obrázku 5. Typickými zástupci 1-*O*-acyl-Cer jsou např. 1-*O*-lignoceroyl-Cer(d18:1;h16:0), 1-*O*-palmitoyl-Cer(d18:1;16:0) a 1-*O*-lignoceroyl-Cer(d18:1;16:0).³⁸ Struktury těchto zástupců a jejich označení viz Obrázek 5.



Obrázek 5. Nejvíce zastoupené typy 1-*O*-acyl-Cer (Cer-24AS16, Cer-16NS16 a Cer-24NS16). Červeně je vyznačen 1-*O*-acyl, modře *N*-acyl a zeleně sfingoidní báze.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST-SYNTÉZA

5.1 Chemikálie a přístroje

Chemikálie a rozpouštědla pro syntézu Cer byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich a Avanti Polar Lipids. Pro tenkovrstvou chromatografii (TLC) byly využívány desky Silica gel 60 F254 (Merck). K jejich hodnocení poté sloužila detekční směs se složením: $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$, kyselina sírová a voda. Sloupcová chromatografie byla prováděna s využitím Silikagelu 60 (230–400). Charakterizace látek byla prováděna s využitím APCI na přístroji Agilent 500 Ion Trap LC/MS, spektrofotometr Nicolet Impact 6700 (IR spektra), Varian Mercury-Vx BB 300 (NMR analýza; $^1\text{H}/300$ MHz a $^{13}\text{C}/75$ MHz), Varian VNMR S500 ($^1\text{H}/500$ MHz a $^{13}\text{C}/125$ MHz), teplota tání látek byla stanovena na Koflerově přístroji. Optickou otáčivost jsme měřili na přístroji Krüss optronic P3000 (Krüss GmbH, Hamburg, Německo).

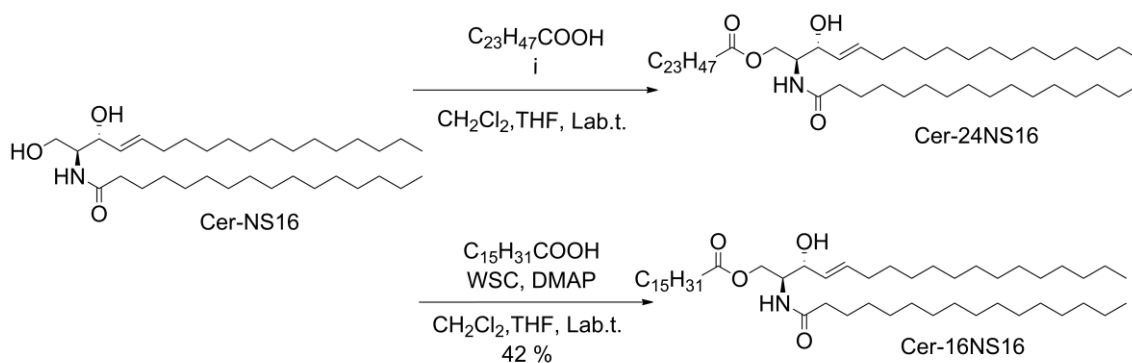
5.2 Syntéza

Syntéza 1-*O*-acyl-Cer nebyla dosud publikována, a proto jsme se snažili nalézt nejvhodnější postup pro jejich přípravu. Vyzkoušeli jsme tři postupy 1-*O*-acylace komerčně dostupného Cer-NS16 s využitím různých reakčních činidel s cílem připravit **Cer-24NS16**. Nejdříve jsme k acylaci Cer-NS16 jako činidla použili 4-dimethylaminopyridinu (DMAP) a *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimidu (WSC). V druhém případě jsme DMAP zaměnili za 1-hydroxybenzotriazol (HOBt). Pro třetí postup jsme využili tzv. Yamaguchiho esterifikaci (Schéma 1).

Poznatky ze syntézy **Cer-24NS16** poté sloužily k syntéze **Cer-16NS16**, jenž byl připraven z komerčně dostupného Cer-NS16 a kyseliny palmitové, již s využitím činidel DMAP a WSC (Schéma 1).

Při přípravě **Cer-24AS16** jsme si v prvním kroku připravili kyselinu 2-brompalmitovou, a to halogenací kyseliny palmitové, tzv. Hell-Volhard-Zelinského reakcí.⁴⁰ V druhém kroku jsme atom bromu 2-brompalmitové kyseliny substituovali hydroxylem a získali jsme 2-hydroxypalmitovou kyselinu. Ve třetím kroku jsme připravili Cer-AS16 acylací sfingosinu 2-hydroxypalmitovou kyselinou. V tomto kroku

jsme použili jako činidla pro acylaci WSC a HOBt. Jelikož kyselina 2-brompalmitová byla směsí dvou ekvimolárně zastoupených enantiomerů, získali jsme touto acylací dva diastereoizomery. V dalším kroku jsme pracovali pouze s Cer s fyziologickou (2'*R*)-konfigurací (Schéma 1). Ve čtvrtém kroku jsme opět opakovali postup jako v případě syntézy předešlých 1-*O*-acyl-Cer. **Cer-24AS16** jsme připravili reakcí kyseliny lignocerové (C24) s Cer-AS16 pomocí WSC a DMAP. Čtvrtý krok kromě předpokládaného **Cer-24AS16** poskytl ještě **Cer-24AS16-24**, který vznikl v průběhu syntézy jako vedlejší produkt (Schéma 1).



i = 1. Pokus: WSC, DMAP, 43 %
 2. Pokus: WSC, HOBT, 29 %
 3. Pokus: 2,4,6-trichlorbenzoylchlorid, DMAP, TEA, 25 %

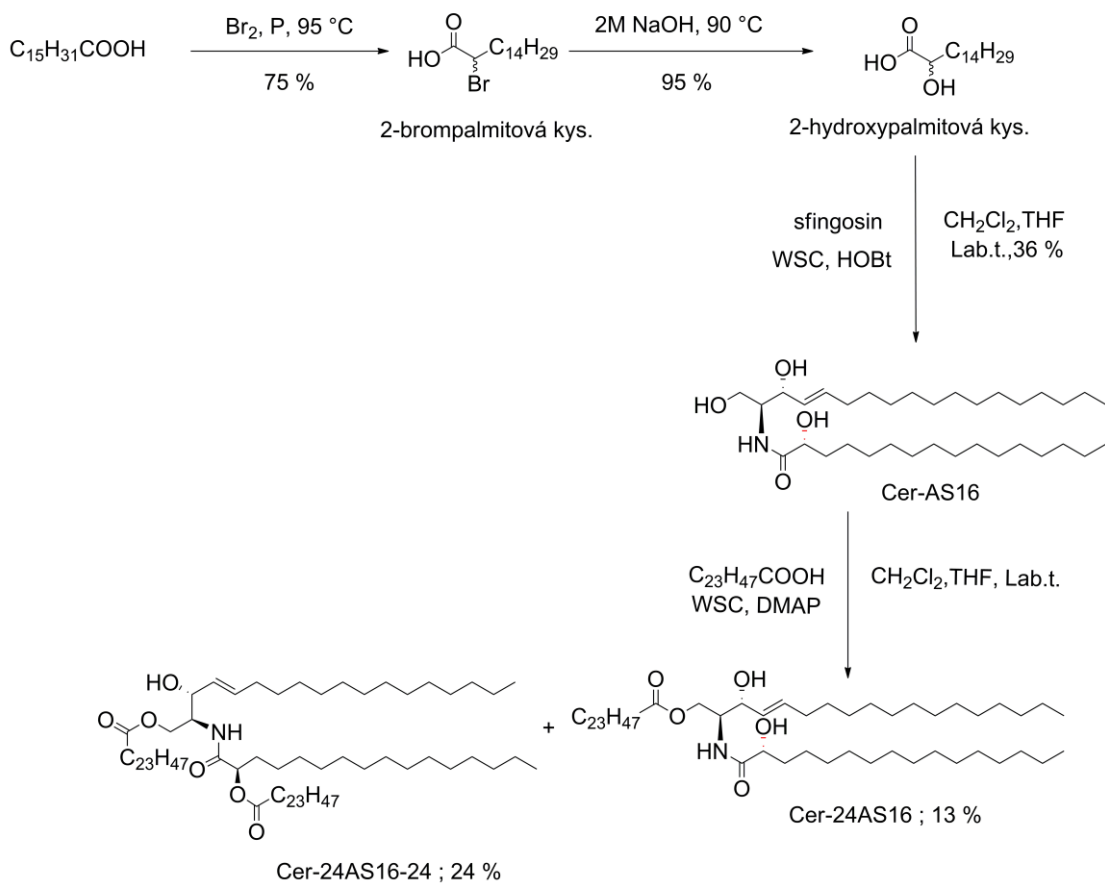
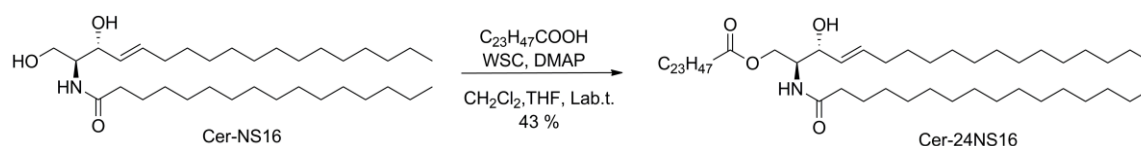


Schéma 1. Přehled syntézy 1-O-acyl-Cer, tj. **Cer-24NS16**, **Cer-16NS16**, **Cer-24AS16** a **Cer-24NS1624**.

5.2.1 Příprava Cer-24NS16

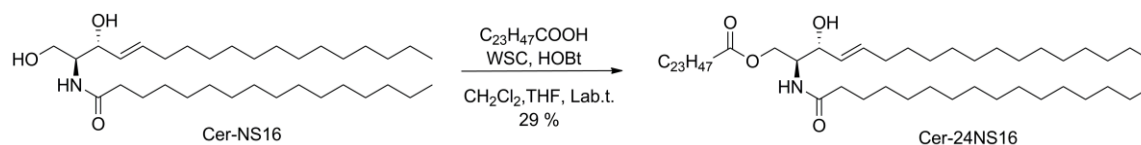
Jako výchozí látku k přípravě **Cer-24NS16** jsme použili komerčně dostupný Cer-NS16, který byl esterifikován lignocerovou kyselinou v prostředí dichlormethanu (DCM) a tetrahydrofuranu (THF) v poměru 5:1. Reakce probíhala třemi postupy (A–C) s využitím různých reakčních činidel (viz níže).

5.2.1.1 Postup A



Reakce probíhala v bezvodých podmínkách se suchými rozpouštědly. Při postupu A byla jako činidla pro přípravu 1-*O*-acyl-Cer použita WSC a DMAP. Směs Cer-NS16 (33 mg, 0,061 mmol) a lignocerové kyseliny (22,6 mg, 0,061 mmol) byla v molárním poměru 1:1 spolu s 0,1 ekvivalentem DMAP (0,75 mg, 0,006 mmol) rozpouštěna v 5 ml DCM a 1 ml THF pomocí ultrazvuku. Směs byla zchlazena v ledové lázni na 0°C a za stálého míchání byl po kapkách přes septum přidán ve dvojnásobném ekvivalentu WSC (21,6 μ l, 0,123 mmol). Reakce probíhala za stálého míchání při laboratorní teplotě pod argonem 24 hodin. Následně byla reakce ukončena přidáním 15 ml 0,1M roztoku HCl, a poté 4 \times vytřepána s 10 ml chloroformu v dělicí nálevce. Organickou fází jsme vysušili malým množstvím bezvodého Na_2SO_4 . Po filtraci byla směs zahuštěna na vakuové odparce a následně přečištěna sloupcovou chromatografií (mobilní fáze chloroform/aceton 20:1). Výtěžek reakce činil 43 %.

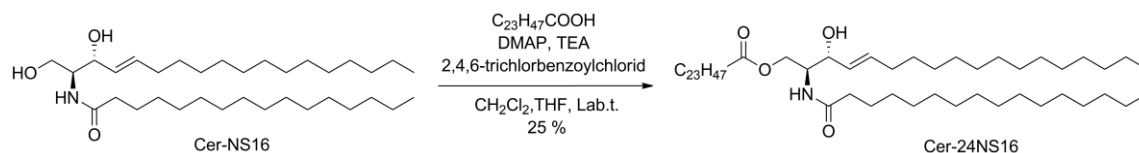
5.2.1.2 Postup B



Pro tento pokus jsme využili WSC a HOBT. Reakce probíhala v bezvodých podmínkách se suchými rozpouštědly DCM a THF v poměru 5:1. V pokusu reagoval Cer-NS16 (26,77 mg, 0,05 mmol) s lignocerovou kyselinou (18,59 mg, 0,05 mmol); do reakční směsi jsme poté přidali HOBT (20,17 mg, 0,149 mmol). Po ochlazení reakční

směsi v ledové lázni na 0°C byl přikapán WSC (17,6 µl, 0,1 mmol). Reakce následně probíhala za stálého míchání při laboratorní teplotě pod atmosférou argonu 24 hodin. Ukončení a čištění reakce byly totožné jako v Postupu A. Výtěžek reakce činil 29 %.

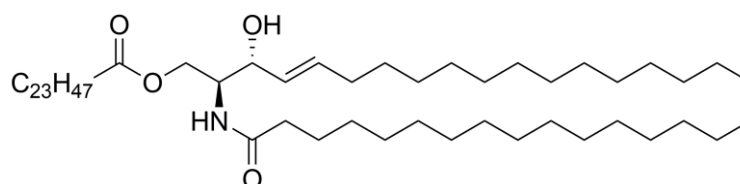
5.2.1.3 Postup C



Jako poslední alternativu v syntéze **Cer-24NS16** jsme využili tzv. Yamaguchiho esterifikaci.⁴¹ Nejprve jsme smísili Cer-NS16 (27 mg, 0,05 mmol) s kyselinou lignocerovou (18,5 mg, 0,05 mmol) v 5 ml bezvodého THF. Poté jsme přidali 2,4,6-trichlorobenzoylchlorid (7,81 µl, 0,05 mmol) a reakční směs 2 minuty nechali míchat. Dále byl do reakční směsi přidán triethylamin (TEA) (13,86 µl, 0,1 mmol) a DMAP (0,60 mg, 0,005 mmol). Reakce probíhala v bezvodém THF za stálého míchání při laboratorní teplotě pod argonem 24 hodin. Zpracování a vyčištění produktu bylo stejné jako v Postupu A. Výtěžek reakce činil 25 %.

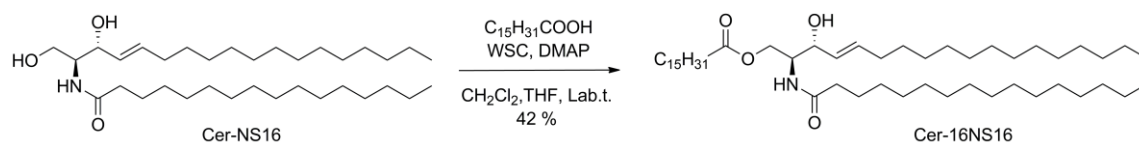
5.2.1.3.1 Cer-24NS16

(2S,3R,E)-3-hydroxy-2-palmitamidooktadec-4-en-1-yl tetrakosanoát



Cer-24NS16 je bílá krystalická látka, $R_f = 0,65$ (chloroform/aceton, 20:1), 0,90 (chloroform/MeOH, 10:1), teplota tání: 89–91 °C, $[\alpha]_D^{25} = -1,54$ ($c = 13$ mg/ml, chloroform). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.83$ (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 5.79 – 5.67 (m, 1H), 5.52 – 5.40 (m, 1H), 4.36 – 4.29 (m, 1H), 4.28 – 4.20 (m, 1H), 4.20 – 4.09 (m, 2H), 2.30 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.18 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.08 – 1.97 (m, 2H), 1.39 – 1.19 (m, 90H), 0.94 – 0.83 (m, 9H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 174.14, 173.80, 134.61, 128.08, 73.38, 62.74, 53.44, 36.82, 34.22, 32.31, 31.93, 29.71, 29.64, 29.51, 29.43, 29.40, 29.37, 29.30, 29.26, 29.20, 29.17, 29.12, 25.74, 24.91, 22.69, 14.12$ ppm. **IR (ATR)**: ν_{max} 2916, 2850, 1718, 1645, 1558, 1471, 717 cm^{-1} . **MS (APCI⁺)**: $m/z = 871.1$ [$\text{M} + \text{H}^+ - \text{H}_2\text{O}$].

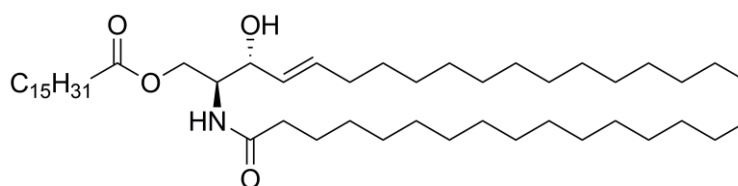
5.2.2 Příprava Cer-16NS16



Pro postup přípravy **Cer-16NS16** jsme využili zkušeností z předchozích syntéz. Reakce probíhala podle Postupu A v bezvodých podmínkách ve směsi DCM a THF. Cer-NS16 (20,0 mg, 0,037 mmol), kyselina palmitová (9,53 mg, 0,037 mmol) a DMAP (0,46 mg, 0,004 mmol) v poměru 1:1:0,1 byly rozpuštěny v 6 ml směsi suchých rozpouštědel (DCM/THF, 5:1). Pro dokonalé rozpuštění reaktantů nebylo potřeba využít lázně s ultrazvukem. Reakční směs byla následně míchána v ledové lázni při 0°C a po kapkách jsme přidali dva ekvivalenty WSC (13,1 μl , 0,074 mmol). Reakce probíhala pod argonem při laboratorní teplotě za stálého míchání 24 hodin. K ukončení reakce jsme použili 15 ml 0,1M roztoku HCl a směs vytřepali 5 \times v dělicí nálevce s 10 ml chloroformu a přidavkem 20 ml 10% roztoku KBr. Organická fáze byla vysušena malým množstvím bezvodého Na_2SO_4 , zfiltrována a následně zahuštěna na vakuové odparce. Čištění probíhalo sloupcovou chromatografií (mobilní fáze chloroform/aceton 20:1). Výtěžek reakce činil 42 %.

5.2.2.1.1 Cer-16NS16

(2S,3R,E)-3-hydroxy-2-palmitamidooktadec-4-en-1-yl palmitát



Cer-16NS16 je bílá krystalická látka s retenčními faktory $R_f = 0,62$ (chloroform/aceton, 20:1), 0,88 (chloroform/MeOH 10:1) a teplotou tání 86–87 °C, $[\alpha]_D^{25} = -9,23$ ($c = 6,5$ mg/ml, chloroform). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.84$ (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.80 – 5.70 (m, 1H), 5.52 – 5.43 (m, 1H), 4.33 (dd, $J = 11.4, 6.8$ Hz, 1H), 4.29 – 4.20 (m, 1H), 4.16 (m, $J = 11.9, 11.4, 4.8$ Hz, 2H), 2.32 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.22 – 2.15 (m, 2H), 2.08 – 2.02 (m, 2H), 1.42 – 1.13 (m, 74H), 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 9H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 174.12, 173.77, 134.59, 128.12, 73.38, 62.74, 53.45, 36.81, 34.21, 32.30, 31.92, 29.69, 29.65, 29.62, 29.53, 29.50, 29.49, 29.90, 29.35, 29.29,$

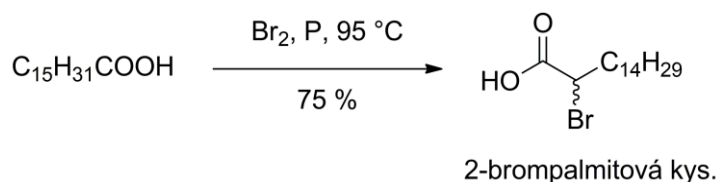
29.26, 29.24, 29.17 ppm. **IR (ATR):** ν_{\max} 2917, 2850, 1722, 1639, 1555, 1466, 720 cm^{-1} .

MS (APCI⁺): $m/z = 758.74$ [$M + H^+ - H_2O$].

5.2.3 Příprava Cer-24AS16

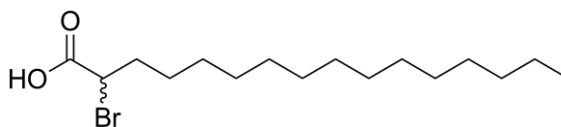
Příprava **Cer-24AS16** probíhala v několika krocích, tj. syntéza 2-brompalmitové kyseliny, její převedení na 2-hydroxypalmitovou kyselinu, která posléze reagovala s sfingoidní bází za vzniku Cer. Tento vzniklý Cer jsme dále acylovali na primární hydroxyskupině kyselinou lignocerovou za vzniku 1-O-acyl-Cer (viz níže).

5.2.3.1 Syntéza 2-brompalmitové kyseliny⁴⁰



Halogenace palmitové kyseliny probíhala pomocí tzv. Hell-Volhard-Zelinského reakce. Směs palmitové kyseliny (1 g, 3,9 mmol) a červeného fosforu (0,155 g, 5,03 mmol) jsme za stálého míchání zahřívali (95 °C), dokud nedošlo ke vzniku taveniny. Do takto vzniklé taveniny jsme následně opatrně přikapávali brom (4,98 g, 1,6 ml, 31,2 mmol). Reakční směs jsme poté zahřáli na teplotu 95 °C a při této teplotě míchali 12 hodin. Reakce byla ukončena přidáním 15 ml vody a dále míchána 20 minut. Přebytné množství bromu jsme odstranili přidáním 5 ml 10% roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Reakční směs byla 3 × vytřepána v dělicí nálevce s 10 ml diethyletheru a 3 ml 10% roztoku KBr. Organická část byla poté vysušena malým množstvím bezvodého Na_2SO_4 a zfiltrována.⁴⁰ Po zahuštění na vakuové odparce byla reakční směs čištěna sloupcovou chromatografií (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 9:1 + 1 % CH_3COOH). Výtěžek reakce byl 75 %.

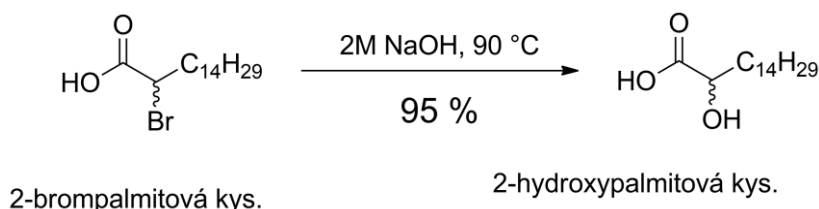
5.2.3.1.1 2-brompalmitová kyselina



2-brompalmitová kyselina je bílá krystalická látka s retenčními faktory $R_f = 0,42$ (hexan/ethyl-acetát, 2:1), 0,55 (chloroform/MeOH, 10:1). **¹H NMR** (500 MHz, CDCl_3): δ

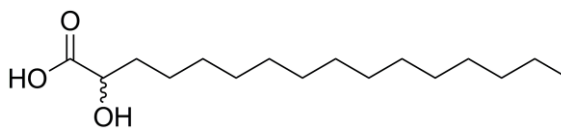
= 10.90 – 10.22 (s, 1H), 4.27 – 4.21 (m, 1H), 2.14 – 2.05 (m, 2H), 2.03 – 1.95 (m, 2H), 1.29 – 1.25 (m, 22H), 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 175.74, 45.57, 34.67, 31.91, 29.65, 29.64, 29.62, 29.57, 29.47, 29.11, 29.34, 29.28, 27.18, 24.62, 22.67, 14.09$ ppm.

5.2.3.2 Syntéza 2-hydroxypalmitové kyseliny⁴⁰



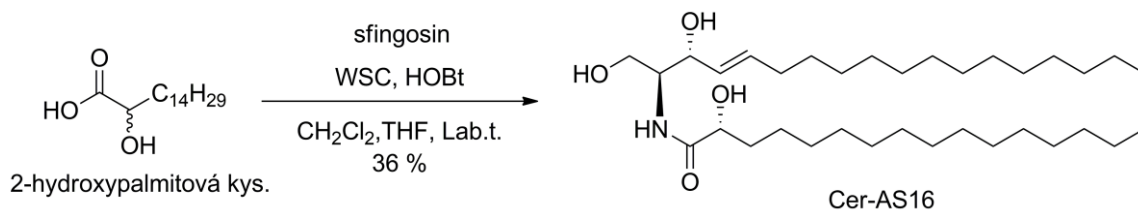
Pro syntézu 2-hydroxypalmitové kyseliny jsme použili kyselinu 2-bromopalmitovou (500 mg, 1,49 mmol) z předchozí reakce, ke které jsme přidali 10 ml 2M roztoku NaOH. Reakce probíhala 40 hodin pod vzdušným chladičem za stálého míchání při 90 °C. Pro ukončení reakce jsme přidali 20 ml 0,1M roztok HCl a reakční směs vytřepali v dělicí nálevce 3 × s 10 ml diethyletheru a 20 ml 10% roztoku KBr. Organickou část jsme poté vysušili bezvodým Na_2SO_4 , zfiltrovali a opatrně zahustili pomocí vakuové odparky.⁴⁰ Produkt jsme následně vyčistili pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze chloroform/diethylether 10:1 +1 % CH_3COOH). Výtěžek reakce byl 95 %.

5.2.3.2.1 2-hydroxypalmitová kyselina



2-hydroxypalmitová kyselina je bílá krystalická látka s retenčními faktory $R_f = 0,29$ (hexan/ethyl-acetát, 2:1), 0,44 (chloroform/MeOH, 10:1). Další charakterizace: ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.94 - 3.88$ (m, 1H), 1,49 – 1.39 (m, 2H), 1.28 – 1.17 (m, 2H), 1.15 – 1.00 (m, 22H), 0.66 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 178.12, 74.28, 38.17, 35.74, 33.50, 33.47, 33.43, 33.34, 33.23, 33.17, 28.84, 26.48, 24.40, 17.72$ ppm.

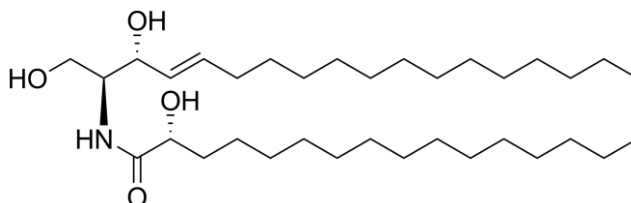
5.2.3.3 Syntéza Cer-AS16



Směs sphingosinu (43 mg, 0,144 mmol), 2-hydroxypalmitové kyseliny (39 mg, 0,143 mmol) a HOBT (71,5 mg, 0,529 mmol) jsme rozpustili v 6 ml suchých rozpouštědel (DCM/THF, 1:1) v ultrazvuku. Poté jsme baňku s reaktanty ochladili v ledové lázni na 0°C a po kapkách přidali 2 ekvivalenty WSC (50,6 μ l, 0,286 mmol). Reakce za stálého míchání pod argonem probíhala 22 hodin při laboratorní teplotě. Po 2 hodinách se roztok postupně změnil v jemnou suspenzi, která se opět po několika hodinách rozpustila, a vznikl roztok. Reakce byla ukončena přidáním 15 ml 0,1M roztoku HCl, následně jsme směs vytřepali 3 \times v dělicí nálevce s 10 ml chloroformu a přidavkem 20 ml 10% roztoku KBr. Poté byla organická část vysušena bezvodým Na₂SO₄, zahuštěna na vakuové odparce a čištěna sloupcovou chromatografií (chloroform/MeOH, 100:1). Jelikož kyselina použitá pro tuto reakci byla racemická, reakce poskytla dva diastereoizomery. Izolovali jsme Cer v konfiguraci (2'R) a (2'S). Fyziologický Cer s konfigurací (2'R) má nižší hodnoty retenčních faktorů a to $R_f = 0,44$ (chloroform/MeOH, 10:1), 0,26 (chloroform/MeOH, 19:1). Cer s konfigurací (2'S) má hodnoty $R_f = 0,51$ (chloroform/MeOH, 10:1), 0,31 (chloroform/MeOH, 19:1). Výtěžek reakce tudíž činil 36 % Cer (2'R). Výtěžek Cer (2'S) byl 38 %.

5.2.3.3.1 Cer-AS16

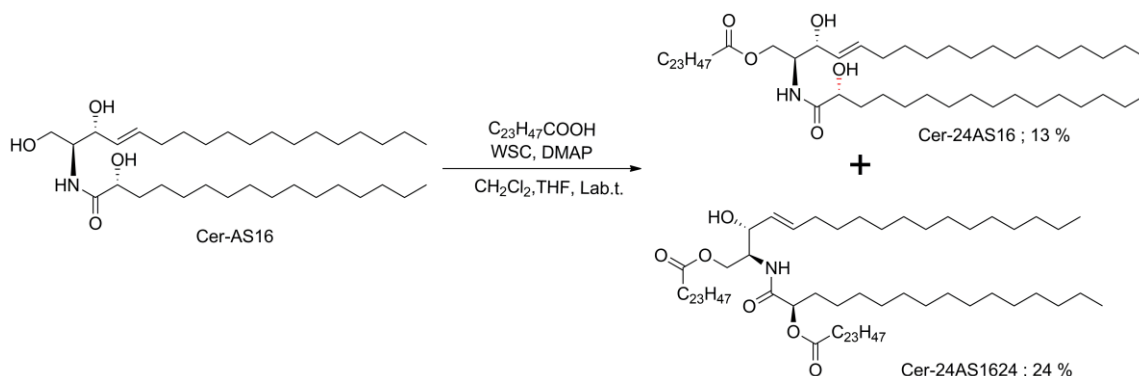
(R)-N-((2S,3R,E)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)-2-hydroxyhexadekanamid



Cer-AS16 je krystalická látka bílé barvy s retenčními faktory $R_f = 0,44$ (chloroform/MeOH, 10:1), 0,26 (chloroform/MeOH, 19:1). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃/MeOD 5:1): $\delta = 6.76$ (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 5.74 – 5.66 (m, 1H), 5.45 – 5.38 (m, 1H),

4.02 – 3.95 (m, 1H), 3.84 – 3.72 (m, 3H), 3.67 – 3.61 (m, 1H), 2.04 – 1.94 (m, 2H), 1.77 – 1.68 (m, 2H), 1.39 – 1.15 (m, 46H), 0.83 (t, $J = 6.8$ Hz, 6H) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 5:1): $\delta = 175.81, 134.01, 128.46, 73.21, 72.00, 61.43, 54.25, 34.28, 32.19, 31.78, 30.82, 29.56, 29.51, 29.43, 29.38, 29.36, 29.21, 29.18, 29.00, 25.10, 22.53, 13.91$ ppm.

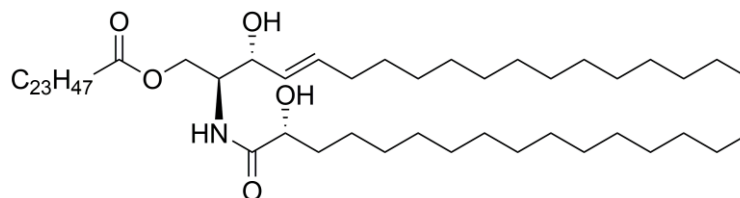
5.2.3.4 Syntéza Cer-24AS16



Poslední krok syntézy **Cer-24AS16** využívá předchozích znalostí (viz výše). Cer-AS16 (26,5 mg, 0,048 mmol), lignocerovou kyselinu (17,64 mg, 0,048 mmol) a DMAP (0,58 mg, 0,005 mmol) jsme rozpustili ve směsi 2 ml suchého DCM a 1 ml THF. Pro dokonalé rozpuštění reaktantů jsme míchali reakční směs 10 minut v lázni s ultrazvukem. Následně jsme reakční směs ochladili na 0°C a za stálého míchání po kapkách přidali WSC (16,9 μl , 0,096 mmol). Za stálého míchání, pod argonem a při laboratorní teplotě, jsme nechali reakci probíhat 24 hodin. Reakci jsme ukončili přidáním 15 ml 0,1M roztoku HCl, a poté jsme soustavu vytřepali 4 \times s 10 ml chloroformu a 20 ml 10% roztoku KBr v dělicí nálevce a spojené organické frakce poté vysušili bezvodým Na_2SO_4 a zahustili na vakuové odparce. Produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií (chloroform/aceton, 50:1). Byly izolovány dva produkty; první byl izolován **Cer-24AS16** s výtěžkem 13 %, jenž měl nižší hodnotu retenčního faktoru. Druhým produktem byl **Cer-24AS16-24** s výtěžkem 24 %.

5.2.3.4.1 Cer-24AS16

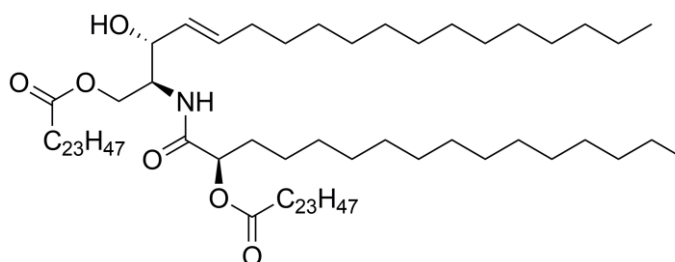
(2S,3R,E)-3-hydroxy-2-((R)-2-hydroxyhexadekanamido)oktadec-4-en-1-yl tetrakosanoát



Cer-24AS16 je bílá krystalická látka s retenčními faktory $R_f = 0,4$ (chloroform/aceton, 20:1), 0,52 (chloroform/MeOH 10:1), teplota tání 87–89 °C, $[\alpha]_D^{25} = -20$ ($c = 2$ mg/ml, chloroform/MeOH 5:1). **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃/MeOD 5:1): $\delta = 6.81 - 6.76$ (m, 1H), 5.76 – 5.68 (m, 1H), 5.46 – 5.38 (m, 1H), 4.29 – 4.23 (m, 1H), 4.18 – 4.08 (m, 3H), 4.01 – 3.96 (m, 1H), 2.27 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.04 – 1.96 (m, 2H), 1.79 – 1.71 (m, 2H), 1.61 – 1.47 (m, 4H), 1.26 – 1.19 (m, 84H), 0.85 (t, $J = 7.0$ Hz, 9H) ppm. **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃/MeOD 5:1): $\delta = 175.26, 174.35, 134.67, 127.90, 72.54, 71.86, 62.75, 52.69, 34.61, 34.15, 32.30, 31.88, 29.65, 29.54, 29.48, 29.45, 29.36, 29.28, 29.25, 29.12, 29.12, 25.09, 24.81, 22.64, 14.03$ ppm. **IR (ATR):** ν_{\max} 2920, 2851, 1732, 1647, 1558, 1447, 720 cm⁻¹. **MS (APCI⁺):** $m/z = 942.9$ [M + K⁺].

5.2.3.4.2 Cer-24AS16-24

(R)-1-(((2S,3R,E)-1-(tetrakosanoxyloxy)-3-hydroxyoktadec-4-en-2-yl)amino)-1-oxohexadekan-2-yl tetrakosanoát



Cer-24AS16-24 je bílá krystalická látka s retenčními faktory $R_f = 0,78$ (chloroform/aceton, 20:1), 0,95 (chloroform/MeOH 10:1), teplota tání 88–91 °C, $[\alpha]_D^{25} = -13,33$ ($c = 3$ mg/ml, chloroform/MeOH 5:1). **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃/MeOD 5:1): $\delta = 6.59$ (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 5.79 – 5.69 (m, 1H), 5.44 (dd, $J = 15.4, 6.2$ Hz, 1H), 5.08 – 5.01 (m, 1H), 4.36 – 4.28 (m, 1H), 4.20 – 4.06 (m, 3H), 2.43 – 2.35 (m, 2H), 2.26 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.05 – 1.97 (m, 2H), 1.84 – 1.68 (m, 2H), 1.67 – 1.52 (m, 2H), 1.43 – 1.14 (m,

128H), 0.86 (t, $J = 6.9$ Hz, 12H) ppm. **^{13}C NMR** (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 5:1): $\delta = 174.36$, 172.88, 170.89, 134.45, 127.90, 73.78, 72.56, 62.34, 53.34, 34.14, 32.30, 31.96, 31.89, 29.66, 29.63, 29.57, 29.50, 29.43, 29.32, 29.28, 29.25, 29.13, 29.08, 24.84, 24.81, 22.65, 14.05 ppm. **IR (ATR)**: ν_{max} 2918, 2850, 1737, 1641, 1547, 1451, 720 cm^{-1} . **MS (APCI $^+$)**: $m/z = 1237.3$ [$\text{M} + \text{H}^+ - \text{H}_2\text{O}$].

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST – HODNOCENÍ MODELOVÝCH LIPIDOVÝCH MEMBRÁN

V této části jsou popsány metody, které jsme využili k hodnocení modelových lipidových membrán obsahující 1-*O*-acyl-Cer. Hodnocení membrán s přídavkem připravených 1-*O*-acyl-Cer jsme rozdělili do dvou samostatných experimentů.

6.1 Chemikálie a přístroje

Chemikálie a rozpouštědla byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich a Avanti Polar Lipids. Směs lidských Cer byla získána na Katedře anorganické a organické chemie podle již validovaného postupu.⁴² Přístrojové vybavení použité v tomto experimentu zahrnuje LINOMAT 5 (Camag, Muttenz, Švýcarsko; příprava membrán), Tewameter[®] TM 300 a Multi Probe Adapter Cutometer[®] MPA 580 (CK electronic GmbH, Kolín, Německo; měření ztráty vody membránou). Elektrická impedance byla měřena přístrojem LCR 4080 (Conrad Electronic, Hirschau, Německo). HPLC Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) použito v tomto experimentu mělo následující konstrukci: pumpa LC-20AD s odplyňovačem DGU-20A3, kolony CTO-20AC, auto-dávkače SIL-20A HT, detektor SPD-M20A a komunikační modul CBM-20A. Mikrostruktura membrán byla hodnocena IČ spektroskopií s využitím Nicolet IMPACT 400D FTIR spektrometr (Thermo Scientific, Ontario, Kanada) s krystalem MIRacle ATR ZnSe (PIKE Technologies, Madison, WI) a pro RPD byl použit práškový difraktometr X'Pert PRO θ - θ (PANalytical B.V., Almelo, Nizozemsko).⁴²

6.2 Příprava modelových membrán

6.2.1 Jednoduchý model

První experiment (jednoduchý model) probíhal na modelových membránách se složením: FFA, Chol, CholS, Cer-NS24 a **Cer-24NS16**. FFA byly namíchány podle složení, jenž odpovídá poměrům FFA v lidské kůži: (1,8 % kyselina palmitová, 4,0 % kyselina stearová, 7,6 % kyselina arachidová, 47,8 % kyselina behenová, a 38,8 % kyselina lignocerová – vše v molárních %).⁴² Konkrétní složení modelových membrán je

znázorněno v Tabulce 1. Zde jsou uvedeny molární poměry jednotlivých složek; všechny membrány navíc obsahovaly 5% hmotnostní přídavek CholS. Cer-NS24 je v membránách postupně nahrazován 5, 10, 20, 30 a 100 % Cer-24NS16.

Typ membrány	Cer-NS24	Cer-24NS16	Chol	FFA	CholS
Kontrola	1	0	1	1	5%
5%	0,95	0,05	1	1	5%
10%	0,90	0,10	1	1	5%
20%	0,80	0,20	1	1	5%
30%	0,70	0,30	1	1	5%
100%	0	1	1	1	5%

Tabulka 1. Složení modelových membrán prvního experimentu (jednoduchý model). Uvedeny jsou molární poměry Cer, Chol a FFA, obsah CholS byl ve všech membránách 5 hmotnostních %.

Jednotlivé lipidy byly rozpuštěny ve směsi hexan/ethanol 96 % (2:1, v/v); CholS byl rozpuštěn pro jeho špatnou rozpustnost pouze v ethanolu 96 %. Roztoky lipidů SC byly namíchány tak, aby roztok odpovídal požadovanému složení membrány. Roztok byl poté zahuštěn a rozpuštěn ve směsi hexan/ethanol 96 % (2:1, v/v) na koncentraci lipidů 4,5 mg/ml. Následně jsme tyto lipidové směsi nastříkali pomocí přístroje LINOMAT 5 (3 × 100 µl na 1 cm²) na polykarbonátové filtry (Nuclepore, s porozitou 15 nm). Filtry byly uloženy v kovových držácích. Každá modelová membrána o ploše 1 cm² celkově obsahovala 1,35 mg lipidů, tj. Cer/FFA/Chol/CholS. Membrány pro měření rentgenové práškové difrakce byly nanášeny obdobně, avšak místo podpůrných filtrů byla použita borosilikátová krycí sklička s rozměry 22 x 22 mm.⁴²

Po nástřiku lipidů byly modelové membrány vysušeny v exsikátoru s P₄O₁₀ a tuhým parafínem. Membrány jsme poté zahřáli na 90 °C po dobu 10 minut. Tato teplota odpovídá hodnotě nad teplotou fázového přechodu všech lipidů. Následně membrány pomalu chladly přibližně tři hodiny. Toto chladnutí umožňuje uspořádání lipidů do organizovaných lamelárních struktur. Poté jsme membrány nechali 24 hodin inkubovat v termostatu při teplotě 32 °C.⁴²

6.2.2 Komplexní model

Modelové lipidové membrány komplexního (složitějšího) modelu byly připraveny obdobným postupem (viz výše) jako membrány jednoduchého modelu s drobnými rozdíly: CerNS24 byl nahrazen izolovanými Cer lidského SC a 10 % této Cer frakce tvořily připravené 1-*O*-acyl-Cer, tj. **Cer-24NS16**, **Cer-16NS16**, **Cer-24AS16** nebo **Cer-24AS16-24**. Další složky, tj. FFA, Chol a 5% hmotnostní přídavek CholS zůstaly beze změny. (Tabulka 2).

Typ membrány	Cer-24NS16	Cer-16NS16	Cer-24AS16	Cer-24AS16-24	Směs Cer-SC	Chol	FFA	CholS
Kontrola	-	-	-	-	1	1	1	5%
1	0,1	-	-	-	0,9	1	1	5%
2	-	0,1	-	-	0,9	1	1	5%
3	-	-	0,1	-	0,9	1	1	5%
4	-	-	-	0,1	0,9	1	1	5%

Tabulka 2. Složení modelových membrán druhého experimentu (komplexní model).

6.3 Měření bariérových vlastností modelových lipidových membrán

Před samotným měřením permeačních parametrů jsme membrány umístili z kovových držáků mezi teflonové držáky s otvorem o průměru 0,5 cm². Membrána uchopená mezi teflonové držáky se poté vkládá mezi vrchní a spodní díl Franzovy cely. Ve spodní části cely je přibližně 6,5 ml fosfátového pufru o pH 7,4 (simulace fyziologických podmínek v kůži) a magnetické míchadlo. Takto sestavená Franzova cely byla umístěna do lázně s termostatem a magnetickou míchačkou. Lázeň byla naplněna vodou o teplotě 32 °C, což je teplota lidské kůže.⁴²

6.3.1 Měření ztráty vody membránou

Pro měření ztráty vody membránou byl použit přístroj Tewameter[®] TM 300 a Multi Probe Adapter Cutometer[®] MPA 580 (CK electronic GmbH, Kolín, Německo). Toto zařízení se v dermatologii využívá k měření epidermální ztráty vody (angl. *transepidermal water loss*; TEWL). Právě nadměrné ztráty přes lipidovou vrstvu SC mohou být jedním z indikátorů poškozené bariérové funkce kůže. Tato charakteristika byla rovněž použita i na modelových membránách SC. Tewameter[®] TM 300 pracuje na principu měření gradientu tlaku vodní páry. Tento gradient je měřen dvojicí čidel, jež jsou umístěny nad sebou v hlavě sondy. Sonda přístroje se umístí do zakryté komory těsně nad modelovou membránu a provádí se měření. Důvodem měření v této komoře je zabránění turbulencím vzduchu a tím ovlivnění značně citlivého měření ztráty vody. Důležitá je také konstantní teplota a relativní vlhkost v místnosti, což je monitorováno příslušnými čidly. Jednotlivá měření probíhala při teplotě 26–28 °C a relativní vlhkosti vzduchu 39–41 %. Naměřené hodnoty ztráty vody představují hmotnost vody, jež projde přes membránu za časovou jednotku a určitou plochou [g/h/m²]. Každou membránu jsme měřili dvakrát.^{42, 43}

Naměřené hodnoty ztráty vody membránou před samotným zhodnocením byly vynásobeny koeficientem 1,393. Tento (empiricky získaný a validovaný) koeficient se do výpočtu zavádí z důvodu, že sonda nebyla přiložena přímo na membránu, ale na

držák v němž je umístěna. Výsledky ztráty vody membránou jsou uváděny v jednotkách [g/h/m²].⁴²

6.3.2 Měření elektrické impedance

Elektrická impedance je dalším z parametrů, kterým můžeme hodnotit vlastnosti (propustnost) modelových membrán. Elektrická impedance je měrný odpor, který je nepřímo úměrný propustnosti membrány hlavně pro ionty. Měříme tedy odpor, který klade modelová membrána střídavému proudu na jednotku plochy [kΩ × cm²].^{42, 44} K měření elektrické impedance jsme použili přístroj LCR metr 4080 (Conrad Electronic, Hirschau, Německo, s rozpětím 20 Ω–10 MΩ, chyby v hodnotách kΩ < 0,5%) a dvě nerezové sondy. Jedna je zavedena do spodní části Franzovy cely s fosfátovým pufrům a druhá je přikládána do horní části cely k membráně. Samotnému měření předcházelo nanesení 500 μl fosfátového pufru (pH 7,4) na membránu v horní části Franzovy cely, kam byla přikládána druhá sonda přístroje. Měření elektrické impedance spočívá v tvorbě paralelního obvodu, jímž prochází střídavý proud.^{42, 45} Měření všech membrán jsme provedli dvakrát. Po odečtení naměřených hodnot elektrické impedance jsme opatrně odstranili zbytky naneseného pufru z membrány.⁴²

Výsledky elektrické impedance měřených membrán uvádíme v [kΩ × cm²]. Výsledné hodnoty se následně násobí 0,5. Tímto číslem násobíme výsledky, protože průměr držáku, v němž byla membrána umístěna, je 0,5 cm².⁴²

6.3.3 Měření permeability modelových membrán pro TH a IND

Permeabilitu neboli propustnost modelových lipidových membrán pro molekuly větší než voda a ionty jsme zkoumali pomocí TH (M_w = 180.164 g/mol; log P ~ 0) a IND (M_w = 357.787 g/mol; log P ~ 4.3). Tato modelová léčiva (permeanty) byla zvolena záměrně pro své fyzikálně – chemické vlastnosti. TH je poměrně malá molekula s vyváženou lipofilitou, kdežto druhé modelové léčivo (IND) nám modeluje molekuly s větší molekulovou hmotností a lipofilnějším charakterem.⁴²

Před samotným permeačním pokusem jsme si museli připravit 5% (w/v) suspenzi TH a 2% (w/v) IND v 60% vodném roztoku propylenglykolu. Takto připravené suspenze jsme homogenizovali a poté 12 hodin temperovali na teplotu 32 °C. Před

nanesením modelových léčiv na membrány bylo nutné opět tyto suspenze homogenizovat pomocí automatické třepačky.⁴²

Permeabilitu modelových membrán jsme zkoumali pro každé modelové léčivo odděleně. Jako první jsme zvolili molekulu TH. Na membrány jsme nanášeli automatickou pipetou vždy 100 µl 2% suspenze TH a to do horní (donorové) části Franzovy cely. Z dolní (akceptorové) části Franzovy cely bylo poté odebíráno vždy 300 µl vzorku a to v pravidelných dvou hodinových intervalech, tj. po 2, 4, 6, 8 a 10 hodinách od začátku experimentu. Odebrané množství pufru bylo pokaždé nahrazeno stejným objemem fosfátového pufru (300 µl). Takto odebírané vzorky jsme poté hodnotili s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Před nanesením suspenze IND jsme museli naše membrány nejprve velmi opatrně očistit o zbytky suspenze TH a opláchnout fosfátovým pufr; rovněž jsme vyměnili fosfátový pufr v akceptorové části Franzovy cely. Následné provedení druhého permeačního pokusu s IND bylo stejné jako v prvním případě s TH.⁴²

S využitím HPLC jsme získali hodnoty koncentrací modelových léčiv (TH a IND). Tyto koncentrace sloužily k výpočtu kumulativního množství [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$] a toku (tzv. fluxu) léčiva [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]. Kumulativní množství bylo vypočítáno z naměřené koncentrace léčiva, objemu Franzovy cely, korigováno o objem fosfátového pufru navraceného do akceptorové části Franzovy cely (300 µl). Například výpočet kumulativního množství v čase 4 h popisuje tato rovnice: $m_{4\text{ h}} = (C_{4\text{ h}} \times V \times C_{2\text{ h}} \times 0,3)/A$, kde $m_{4\text{ h}}$ je kumulativní množství v čase 4 hodiny, $C_{2\text{ h}}$ je koncentrace [mg/ml] v čase 2 hodiny, V je objem akceptorové části v ml a A [cm^2] je plocha membrány. Hodnoty kumulativního množství byly vyneseny proti času [h] a flux léčiva byl poté vypočítán ze směrnice přímky. Ta byla získána lineární regrese kumulativního množství léčiva v závislosti na čase.⁴²

6.3.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Kumulativní množství [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$] modelového léčiva a jeho flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$] jsme získali výpočtem z naměřených hodnot koncentrací pro jednotlivá léčiva pomocí HPLC. TH byl separován pomocí reverzní fáze na koloně LiChroCART 250-4 (LiChrospher 100 RP-18,5 µm, Merck, Darmstadt, Německo) při teplotě 35 °C, mobilní fáze směs

methanol/0,1 M NaH₂PO₄ v poměru 4:6 (v/v), nástřik autosamplerem 10 µl, průtoková rychlost 1,2ml/min. Jako detekce sloužila UV absorbance s vlnovou délkou 272 nm. Retenční čas TH byl 3,2±0,1 min.¹⁴ IND byl separován pomocí reverzní fáze na koloně kolony LiChroCART 250-4 (LiChrospher 100 RP–18,5 µm, Merck) při teplotě 40 °C, mobilní fáze acetonitril/voda/kyseliny octová v poměru 90:60:5 (v/v/v), nástřik autosampleru 100 µl, průtoková rychlost 2ml/min. Jako detekce sloužila UV absorbance s vlnovou délkou 260 nm. Retenční čas IND byl 3,1±0,1 min.¹⁴

6.3.4 Hodnocení mikrostruktury modelových membrán

6.3.4.1 IČ spektroskopie

Mikrostrukturu modelových membrán je možné studovat za pomoci IČ spektroskopie. Molekula při absorpci IČ záření vykazuje změny ve vibračně-rotacním energetickém stavu. Tyto změny nastávají v závislosti změny dipólového momentu. V případě IČ záření používáme převrácenou hodnotu vlnové délky, tzv. vlnočtu v [cm⁻¹], jenž popisuje změny vibračně-rotacního energetického stavu molekuly. Výsledné IČ spektrum představuje nejčastěji závislost absorbance na vlnočtu.⁴⁶

Hodnoty získaných vlnočtů u vybraných typů vibrací přinášejí představu, např. o uspořádání lipidů v modelové membráně. Prostorové uspořádání uhlovodíkových řetězců kožních lipidů můžeme poté popsat několika typickými vibracemi.^{47, 48} V našem měření jsme pro měření modelových membrán použili spektrometr Nicolet 6700 FTIR s jednodrazovým ATR krystalem s modulem řídícím teplotu (PIKE). Vzorky byly proměřeny v rozmezí 28–100 °C po 2 °C.⁴⁷ Takto získána spektra byla poté vyhodnocena v programu OPUS (Bruker).

6.3.4.2 RPD

RPD využívá krátkovlnné elektromagnetické záření s vlnovou délkou $0,1 \times 10^{-10}$ až 100×10^{-10} m. Přístroj pro měření RPD se skládá ze zdroje rentgenova (RTG) záření, monochromátoru a detektoru.^{49, 50} Těto metody se využívá při studiu struktury pevných látek. Pro naše účely můžeme získat díky RPD představu o mikrostruktuře lipidů v modelových membránách.⁴⁹ Podstatou metody je difrakce RTG záření po dopadu na molekuly látky pod určitým úhlem Θ . Toto odražené záření, vychýlené o určitý úhel, po difrakci následně analyzujeme. Difraktogram poté představuje intenzitu jako funkci vektoru rozptylu (scattering vektor) Q [nm^{-1}], jenž je úměrná úhlu Θ podle rovnice $Q = 4\pi \sin\theta/\lambda$, kde $\lambda=0,15418$ nm (vlnová délka použitého RTG záření).^{42, 51}

Uspořádání lipidů do tzv. lamelární fáze je charakterizováno mezivinnou vzdáleností d [nm] (pravidelná vzdálenost souběžných dvojrstev tvořících jednodimenzionální mřížku; angl. *repeat distance*). Vzniklé difraktogramy poskytují tzv. reflexe (signály), ke kterým řadíme Braggovy hodnoty (celá kladná čísla) tak, aby tvořily přímku. Následně převrácená hodnota směrnice této přímky, kterou jsme získali výpočty v programu Excel, udává výslednou délku lamely.^{42, 49, 51} Pomocí dalších výpočtů získáváme představu o počtu a délkách jednotlivých lamelárních fází v modelové membráně.⁴⁹

Příprava modelových membrán proběhla stejně jako u membrán použitých na permeační pokusy (viz výše). Samotné měření probíhalo na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze. Měření RPD bylo provedeno práškovým difraktometrem X'Pert PRO θ - θ (PANalytical B.V., Almelo, Nizozemsko) s $\text{CuK}\alpha$ zářením ($\lambda = 1.5418$ Å, $U = 40$ kV, $I = 30$ mA) s detektorem X'Celerator s rozsahem 0.0167° (2θ). Výsledky jsme poté vyhodnotili v programu X'Pert DataViewer (PANalytical B.V., Almelo, Holandsko).⁴²

6.4 Zpracování dat

Pro zpracování výsledků a tvorbu grafů byly použity následující programy: Microsoft Excel, OPUS (Bruker), X'Pert DataViewer a GraphPad. Statistická analýza dat byla provedena pomocí programu GraphPad se statistickým zpracováním pomocí ANOVA s Dunettovým post-testem.

7. VÝSLEDKY

V této kapitole jsou popsány výsledky syntézy a permeačních pokusů. Ke všem hodnoceným parametrům jsou přiloženy grafy pro srovnání konkrétních hodnot.

7.1 Syntéza

Cer-24NS16 byl připraven třemi postupy, přičemž nejvyššího výtěžku jsme dosáhli použitím WSC a DMAP tj. 43 %. Druhým postupem s činidly WSC a HOBt jsme získali 29 % výtěžku. Nejnižší výtěžek 25 % byl dosažen kombinací 2,4,6-trichlorbenzoylchlorid, DMAP a TEA. Na základě těchto poznatků jsme pro přípravu **Cer-16NS16** použili jako činidla WSC a DMAP. Výtěžek acylace byl 42 %. Poslední zástupce **Cer-24AS16** byl syntetizován ve více krocích. První krok přípravy 1-*O*-acyl-Cer byla bromace palmitové kyseliny. Výtěžek této reakce byl 75 %. V druhém kroku přípravy 2-hydroxypalmitové kyseliny byl výtěžek 95%. Následná acylace sfingosinu připravenou kyselinou 2-hydroxypalmitovou poskytl dva diastereoizomery. Oba Cer-AS16 v konfiguraci (2'*R*) a (2'*S*) jsme izolovali a vyčistili s výtěžky 36 % Cer (2'*R*) a 38 % Cer (2'*S*). Nefyziologický Cer (2'*S*) bychom dále zkoumali v případě zajímavých výsledků s (2'*R*)-izomerem. V posledním kroku syntézy **Cer-24AS16** jsme acylovali pouze Cer (2'*R*) pomocí WSC a DMAP, tento terminální krok poskytl výtěžek 13 %. V posledním kroku vznikl navíc jako vedlejší produkt **Cer-24AS16-24** s výtěžkem 24 %.

7.2 Výsledky hodnocení – jednoduchý model

Hodnocení modelů zahrnovalo měření ztráty vody membránou, měření elektrické impedance a hodnocení permeability membrán pro modelová léčiva (teofylin, TH a indometacin, IND). Mikrostruktura modelových membrán (laterální a lamelární uspořádání lipidů) byla hodnocena infračervenou (IČ) spektroskopií a rentgenovou práškovou difrakcí (RPD).

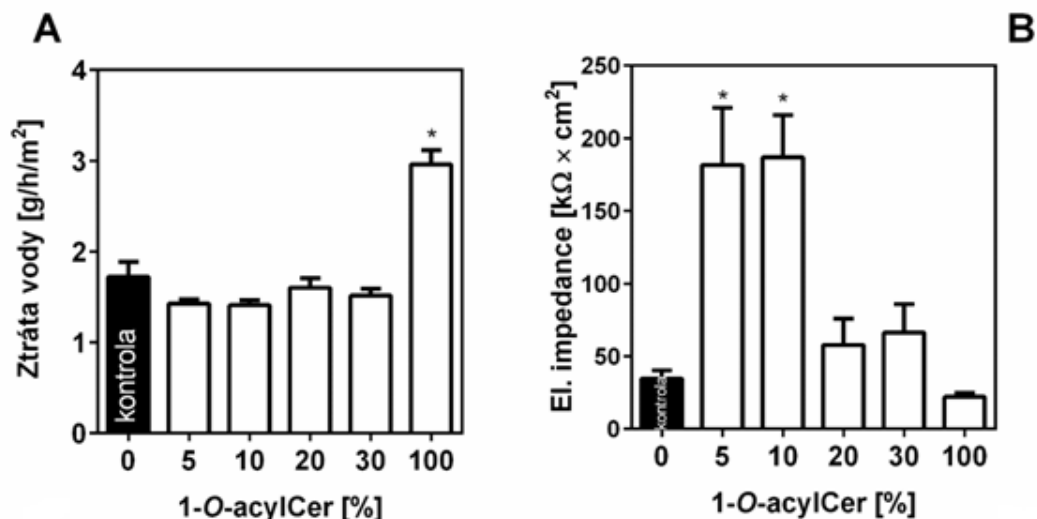
7.2.1 Ztráta vody membránou

V níže uvedeném Obrázku 6 (graf A) jsou porovnány výsledky měření modelových membrán s 5, 10, 20, 30 a 100% zastoupením **Cer-24NS16** v rámci Cer

frakce. Tyto výsledky jsou porovnány s kontrolou (Cer-NS24/FFA/Chol/CholS). Membrány o složení 5% **Cer-24NS16**/95% Cer-NS24/FFA/Chol/CholS měly ztrátu vody membránou $1,43 \pm 0,04$ g/m²/h. Membrány s přídavkem 10% **Cer-24NS16** měly hodnotu ztráty vody $1,41 \pm 0,05$ g/m²/h, s přídavkem 20% **Cer-24NS16** ztráta vody dosáhla hodnot $1,60 \pm 0,10$ g/m²/h. V případě membrány s 30% **Cer-24NS16** to byla hodnota $1,51 \pm 0,08$ g/m²/h, a u membrány s 100% **Cer-24NS16** byla dosažená hodnota ztráty vody $2,96 \pm 0,16$ g/m²/h. U kontrolní membrány (Cer-NS24/FFA/Chol/CholS) jsme získali hodnoty $1,72 \pm 0,16$ g/m²/h. Pouze výsledek ztráty vody u membrány s 100% zastoupením **Cer-24NS16** byl statisticky významný ($p < 0,05$) oproti kontrole.

7.2.2 Elektrická impedance

Výsledky jednotlivých membrán jsou porovnány v Obrázku 6 (graf B). Kontrolní membrány (Cer-NS24/FFA/Chol/CholS) měly hodnotu elektrické impedance 35 ± 6 k Ω \times cm². Modelové membrány s podílem **Cer-24NS16** dosáhly následující hodnoty: 182 ± 39 k Ω \times cm² (5% **Cer-24NS16**), 187 ± 29 k Ω \times cm² (10% **Cer-24NS16**), 58 ± 18 k Ω \times cm² (20% **Cer-24NS16**) 66 ± 20 k Ω \times cm² (30% **Cer-24NS16**). Modelová membrána o složení 100% **Cer-24NS16**/FFA/Chol/CholS dosáhla nízké hodnoty elektrické impedance (22 ± 3 k Ω \times cm²). Membrány s 5 a 10% zastoupením **Cer-24NS16** vykazaly oproti kontrolní modelové membráně výsledky statisticky významné ($p < 0,05$).

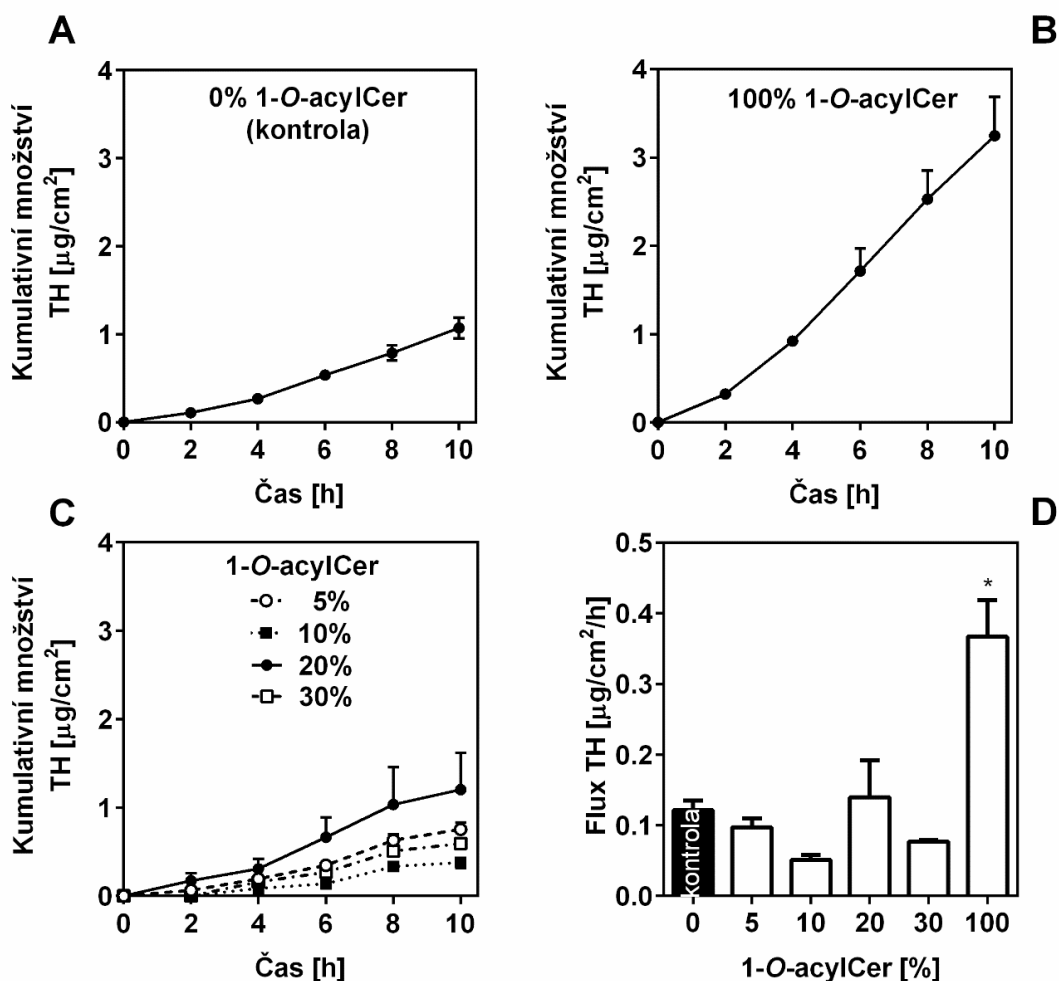


Obrázek 6. Permeabilita modelových lipidových membrán (jednoduchý model): (A) ztráta vody membránou, (B) elektrická impedance. Data jsou prezentována jako průměr všech naměřených hodnot (n) \pm standardní chyba průměru (angl. *standard error of mean*; SEM); $n = 4-6$, * značí statisticky významný rozdíl hodnot oproti kontrole ($p < 0,05$).

7.2.3 Permeabilita modelových membrán pro TH a IND

7.2.3.1 Flux TH

Hodnoty pro flux TH můžeme sledovat níže v Obrázku 7 (graf D). Kontrolní membrána (Cer-NS24/FFA/Chol/CholS) dosáhla hodnoty fluxu $0,12 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, membrány s 5% **Cer-24NS16** ($0,10 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) a 10% **Cer-24NS16** ($0,05 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) dosáhly o něco nižších hodnot. Snižující se trend fluxu TH však u membrán ve složení 20% **Cer-24NS16**/80% Cer-NS24/FFA/Chol/CholS nepokračuje ($0,14 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$). Modelové membrány obsahující 30% **Cer-24NS16** dosáhly hodnot $0,08 \pm 0,00 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Statisticky významného rozdílu oproti kontrole ($p < 0,05$) dosáhly hodnoty fluxu TH u membrány s 100% zastoupením **Cer-24NS16**, a to $0,37 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Dále můžeme na Obrázku 7 (graf A-C) porovnat permeační profily TH, kde vidíme kumulativní množství [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$] jednotlivých membrán, ze kterých byl následně vypočítán flux TH.

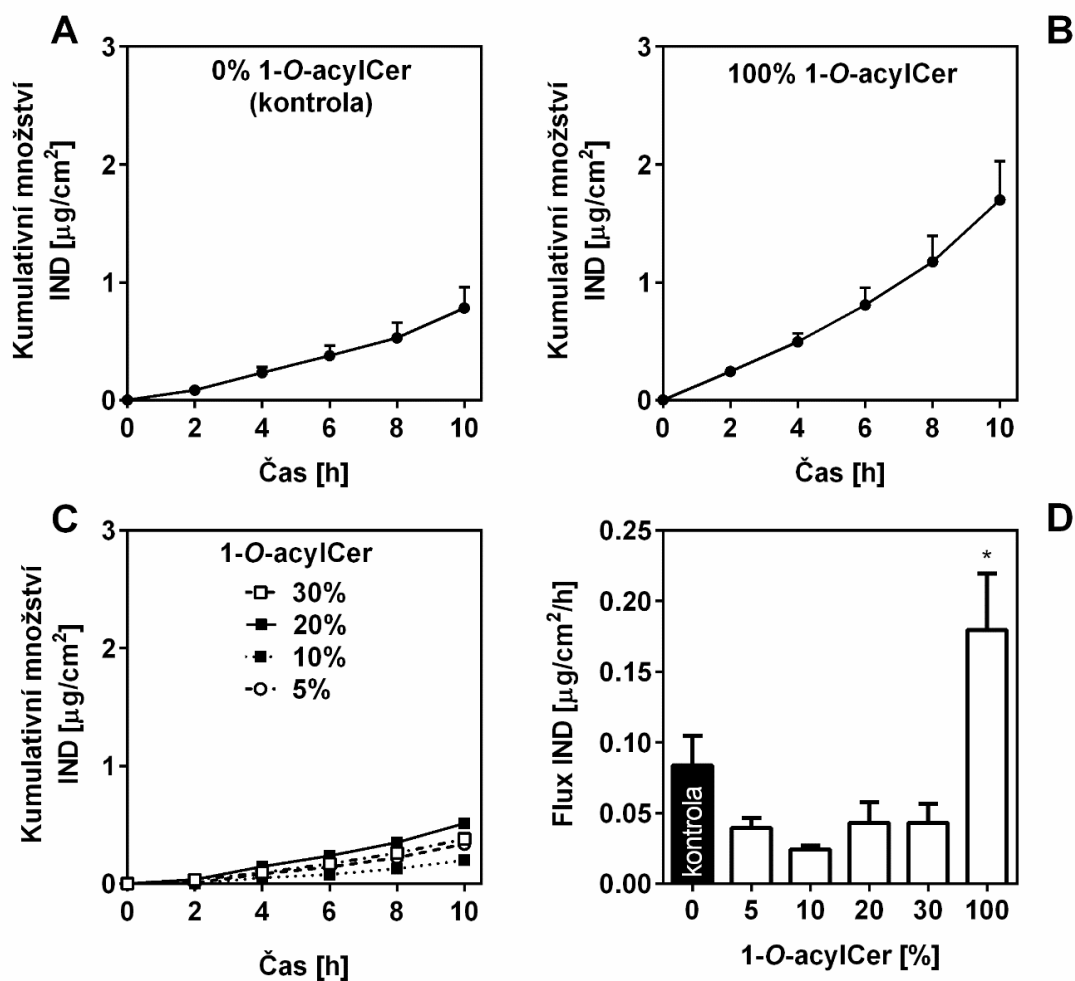


Obrázek 7. Výsledky měření permeability modelových membrán (jednoduchý model) pro TH: (A) kumulativní množství kontrolní membrány (Cer-NS24/FFA/Chol/CholS), (B) kumulativní množství membrány s 100% **Cer-24NS16**, (C) kumulativní množství 5, 10, 20 a 30% **Cer-24NS16** v membránách, (D) flux TH. Data jsou prezentována jako průměr všech naměřených hodnot ($n \pm \text{SEM}$; $n = 4-6$; * značí statisticky významné rozdíly hodnot oproti kontrolní membráně ($p < 0,05$).

7.2.3.2 Flux IND

Hodnoty pro flux IND vidíme níže v Obrázku 8 (graf D). Výsledky tohoto parametru korelují s výsledky pro flux TH, až na výše zmíněnou hodnotu pro membránu s 20% zastoupením **Cer-24NS16**. Modelové kontrolní membrány dosáhly hodnotu fluxu $0,08 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. V případě membrán obsahující 5%, 20% a 30%

podíl **Cer-24NS16** vykazují velmi podobné hodnoty fluxu ($0,04 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$). U membrány 10% **Cer-24NS16** byla výsledná hodnota nejnižší ($0,02 \pm 0,00 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$). Membrány ve složení 100% **Cer-24NS16**/FFA/Chol/ChoIS vykazovaly statisticky významně vyšší hodnotu fluxu pro IND ($0,18 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) vůči kontrole, tj. Cer-NS24/FFA/Chol/ChoIS. Permeační profily IND s kumulativním množstvím jednotlivých membrán, jež slouží k výpočtu fluxu, jsou znázorněny na Obrázku 8 (graf A-C).



Obrázek 8. Výsledky měření permeability modelových membrán (jednoduchý model) pro molekulu IND: (A) kumulativní množství kontrolní membrány (Cer-NS24/FFA/Chol/ChoIS), (B) kumulativní množství membrány s 100% zastoupením **Cer-24NS16**, (C) kumulativní množství 5, 10, 20 a 30% **Cer-24NS16** v membránách, (D) flux IND. Data jsou prezentována jako průměr všech naměřených hodnot ($n \pm \text{SEM}$; $n = 4-6$; * značí statisticky významné rozdíly oproti kontrolní membráně ($p < 0,05$).

7.2.4 IČ spektroskopie

Výsledky měření IČ termotropní spektroskopie modelových membrán (vzorků) u vybraných vibrací uvádíme jako závislost vlnočtu [cm^{-1}] vybraných vibrací na teplotě [$^{\circ}\text{C}$] (Obrázek 9). Každý jednotlivý bod v této závislosti představuje spektrum změřené při dané teplotě. IČ spektra byla měřena v rozmezí 28–100 $^{\circ}\text{C}$ ve dvoustupňových intervalech.

7.2.4.1 Symetrické valenční vibrace

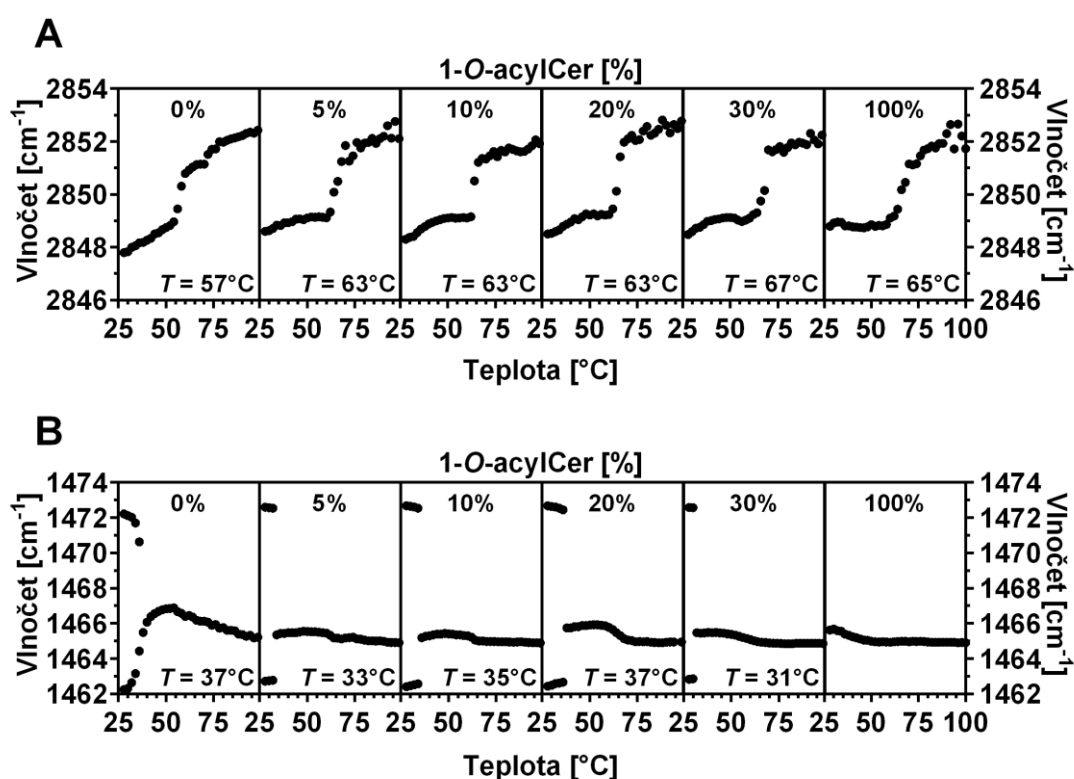
Výsledky těchto vibrací nám dávají představu o konformaci lipidových řetězců v lamele a vlivu **Cer-24NS16** na toto uspořádání. Z této vibrace lze sledovat a stanovit hodnoty teplot fázového přechodu (pokud hodnoty vlnočtu pro CH_2 přesáhly hodnotu 2850 cm^{-1}). Hodnoty teploty fázového přechodu poté představují přechod z uspořádaného stavu lipidových řetězců do stavu neuspořádaného, kde zaniká pravidelné uspořádání lipidů. Námi zkoumané modelové membrány vykazovaly při 32 $^{\circ}\text{C}$ (fyziologická teplota kůže) hodnoty kolem 2848 cm^{-1} , což svědčí o vysoké míře uspořádání lipidových řetězců.

Příslušné hodnoty fázového přechodu jednotlivých lipidových membrán jsou uvedeny v Obrázku 9A. U kontrolní membrány Cer-NS24/FFA/Chol/CholS dochází k fázovému přechodu při teplotě 57 $^{\circ}\text{C}$. Pro membrány s 5, 10 a 20% zastoupením **Cer-24NS16** byla teplota fázového přechodu zaznamenána při 63 $^{\circ}\text{C}$. Mírně vyšší hodnotu teploty fázového přechodu zaznamenaly membrány obsahující 30% **Cer-24NS16** (67 $^{\circ}\text{C}$) a membrána se 100% **Cer-24NS16** (65 $^{\circ}\text{C}$). Na základě těchto výsledků můžeme konstatovat, že přidavek **Cer-24NS16** do modelových membrán obsahujících Cer-NS24, případně jeho úplné nahrazení 1-*O*-acyl-Cer, příliš neovlivňuje konformaci lipidů v membráně ani jejich fázové přechody.

7.2.4.2 Deformační nůžkové vibrace

Tento typ methylenových vibrací (oblast vlnočtů 1462–1472 cm^{-1}) vypovídá o laterálním uspořádání lipidových řetězců v membránách (Obrázek 9B). Pokud se ve spektru objevuje tzv. dublet, vypovídá to o přítomnosti velmi těsného orthorhombického uspořádání lipidových řetězců. Tento dublet se nachází v kontrolní

membráně a také v membránách s 5, 10, 20 a 30% zastoupením **Cer-24NS16**, pouze v membráně 100% **Cer-24NS16**/FFA/Chol/ChoS vidíme pouze jeden signál (singlet). Orthorhombické uspořádání poté s narůstající teplotou zaniká, což pozorujeme jako zánik dubletu v singlet; v obrázku 9B jsou rovněž uvedeny teploty, při kterých dublety zanikají. Pro kontrolní membránu je teplota zániku orthorhombického uspořádání 37 °C. Membrány s obsahem 5% **Cer-24NS16** (33 °C), 10% **Cer-24NS16** (35 °C), 20% **Cer-24NS16** (37 °C) a 30% **Cer-24NS16** (31 °C) měly velmi podobné hodnoty teplot. Je zajímavé, že u membrány s 30% zastoupením **Cer-24NS16** zaniklo orthorhombické uspořádání dříve, než bylo dosaženo hodnoty fyziologické teploty kůže, tj. 32 °C.



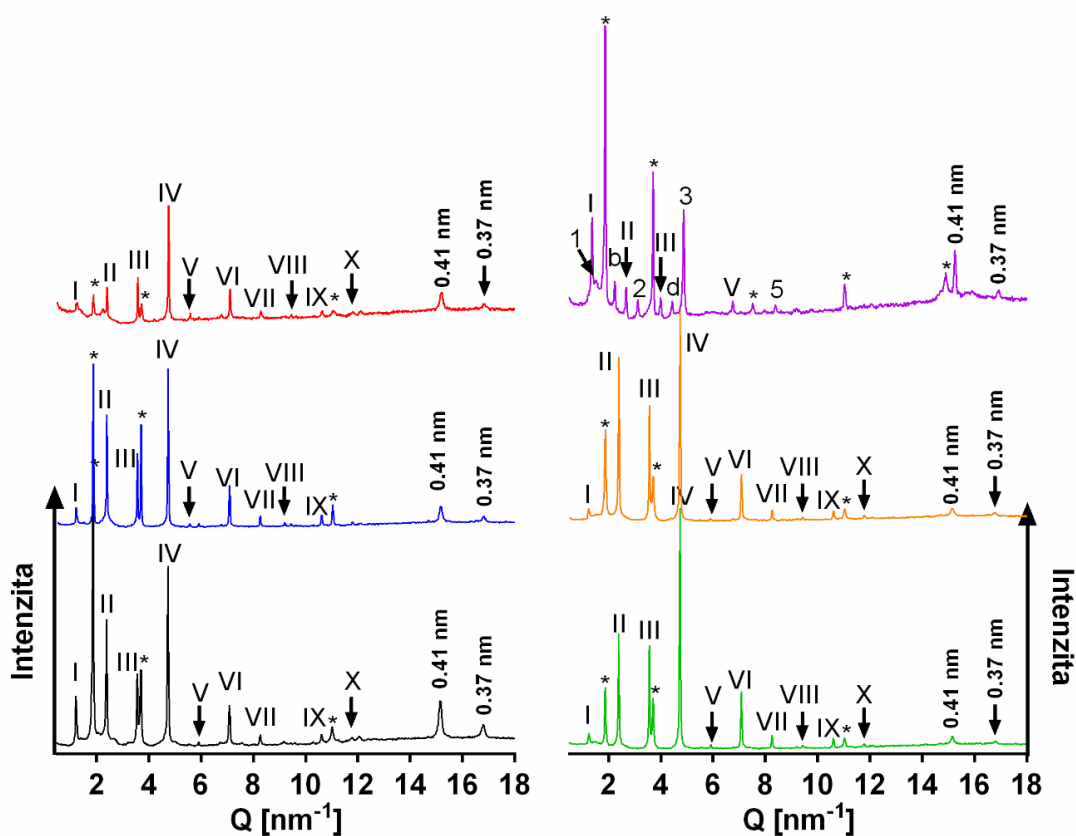
Obrázek 9. Termotropní IČ spektra modelových membrán obsahujících 1-O-acyl-Cer (**Cer-24NS16**) v různých poměrech/Cer-NS24/FFA/Chol/ChoS: (A) symetrické valenční vibrace s uvedenou hodnotou teploty fázového přechodu, (B) deformační nůžkové vibrace s uvedenou teplotou zániku orthorhombického uspořádání.

7.2.5 RPD

RPD je metoda hodnocení lamelárního uspořádání modelových lipidových membrán. V Obrázku 10 jsou znázorněny difraktogramy jednotlivých modelových

membrán obsahující 1-*O*-acyl-Cer. Na obrázku jsou zobrazeny difraktogramy, kde na ose x vidíme tzv. rozptylový faktor (Q) a na ose y je intenzita reflexí. Reflexe tzv. krátkých lamelárních fází L_a (angl. *short periodicity phase*; SPP²⁴⁻²⁶ s periodicitou lamelární struktury $\sim 5,3\text{--}5,7$ nm jsou v difraktogramech označeny římskou číslicí. L_a fáze byla přítomna jak v kontrolní membráně (Cer-NS24/FFA/Chol/CholS), tak ve všech ostatních membránách s přidavkem 1-*O*-acyl-Cer (**Cer-24NS16**); viz tabulka v Obrázku 10. Reflexe druhé krátké fáze (L_b : $d = 4,66$ nm) jsou v difraktogramu označeny písmeny abecedy; fáze byla nalezena pouze v membráně se 100% zastoupením **Cer-24NS16**. V membráně 100% byla nalezena ještě třetí krátká fáze (L_c : $d = 3,73$ nm); její reflexe jsou v difraktogramu označeny arabskou číslicí. Lamelární struktura modelových membrán byla dále tvořena fází tzv. separovaného Chol s délkou $\sim 3,4$ nm. Tento typ fáze byl nalezen ve všech modelových membránách. Konkrétní periodicity všech lamelárních fází jsou zobrazeny v tabulce pod difraktogramy obrázku 10.

Dále můžeme z difraktogramů (Obrázek 10) v tzv. oblasti širokých úhlů ($Q = 14\text{--}17$ nm⁻¹) určit laterální uspořádání lipidů v membránách. Tato metoda může sloužit k doplnění informací o laterálním uspořádání, které jsme zjistili pomocí IČ spektroskopie. V případě, že se v difraktogramu objevují dva píky ($\sim 0,41$ nm a $\sim 0,37$ nm), mluvíme o těsném orthorombickém uspořádání, pakliže difraktogram obsahuje pouze jeden pík ($\sim 0,41$ nm), jedná se o volnější hexagonální uspořádání. V našem experimentu všechny modelové membrány byly uspořádány v těsném orthorombickém uspořádání (Obrázek 10).



Fáze	0%	5%	10%	20%	30%	100%	značka
La	5.33	5.34	5.33	5.34	5.35	5.65	I,II,III,...
Lb	-	-	-	-	-	4.66	a,b,c,...
Lc	-	-	-	-	-	3.73	1,2,3,...
Chol	3.42	3.42	3.4	3.42	3.42	3.38	*

Obrázek 10. Difraktogramy modelových lipidových membrán obsahující Cer-NS24 (černě), který je postupně nahrazován 5 % (modře), 10 % (červeně), 20 % (zeleně), 30 % (oranžově) a 100 % (fialově) **Cer-24NS16**/Cer-NS24/FFA/Chol/ChoIS. Pod difraktogramy je uvedena tabulka s periodicitami a označením lamelárních fází přítomných v modelových membránách SC.

7.3 Výsledky hodnocení – komplexní model

V této kapitole jsou popsány výsledky permeability modelových membrán s 10% zastoupením různých typů fyziologických 1-*O*-acyl-Cer.

7.3.1 Ztráta vody membránou

U všech testovaných membrán byly hodnoty ztráty vody vyšší než u kontrolní membrány ve složení Cer SC/FFA/Chol/CholS ($2,75 \pm 0,04$ g/m²/h). Membrány s přídavkem **Cer-24NS16** měly nejvyšší hodnotu ztráty vody a to $4,48 \pm 0,79$ g/m²/h; tato hodnota je statisticky významná ($p < 0,05$) oproti kontrole. Ostatní membrány měly hodnoty podobné: $3,88 \pm 0,20$ g/m²/h (**Cer-16NS16**), $3,81 \pm 0,19$ g/m²/h (**Cer-24AS16**). Hodnoty ztráty vody u membrán obsahující 10 % **Cer-24AS16-24**/90 % Cer SC/FFA/Chol/CholS byly nejnižší ($3,47 \pm 0,11$ g/m²/h; Obrázek 11, graf A).

7.3.2 Elektrická impedance

Výsledné hodnoty elektrické impedance byly u testovaných membrán výrazně nižší nežli hodnota u kontrolní membrány. Hodnota elektrické impedance u kontroly byla 17 ± 1 k Ω \times cm². Membrány s 10% zastoupením zkoumaných Cer vykázaly nižší a statisticky významné ($p < 0,05$) rozdíly. Membrány obsahující **Cer-24NS16** měly elektrickou impedanci 5 ± 1 k Ω \times cm², **Cer-16NS16**-membrány měly hodnotu 9 ± 3 k Ω \times cm², **Cer-24AS16**-membrány dosáhly hodnot 5 ± 1 k Ω \times cm². Poslední typ membrán obsahující 10 % **Cer-24AS16-24** nabyl hodnot 7 ± 1 k Ω \times cm² (Obrázek 11, graf B).

7.3.3 Permeabilita modelových membrán pro TH a IND

Stejně jako v jednoduchém modelu jsme i zde pro studium permeability modelových membrán využili modelová léčiva TH a IND.

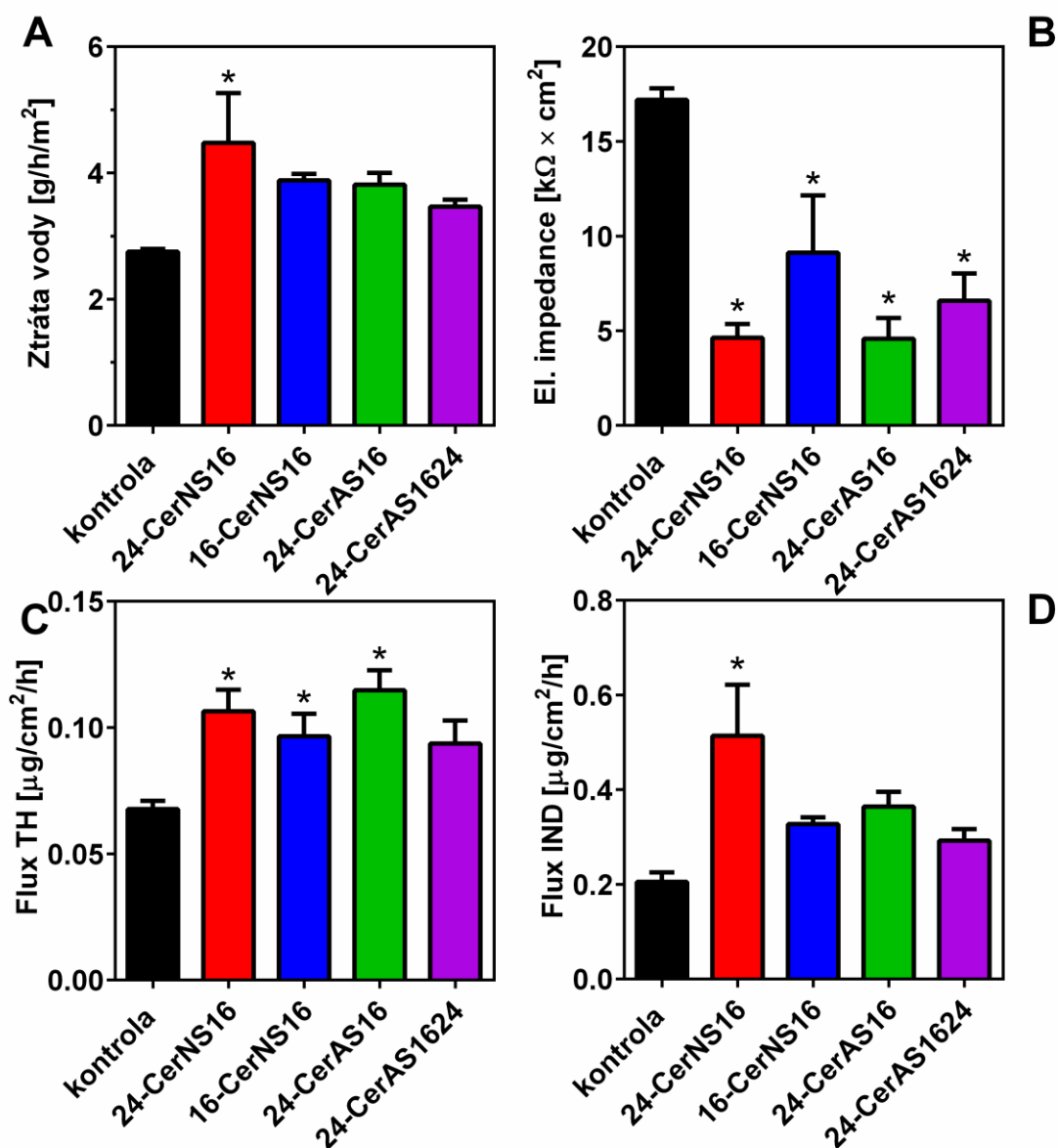
7.3.3.1 Flux TH

Naměřené hodnoty fluxu TH u membrán s 10% zastoupením 1-*O*-acyl-Cer byly vyšší než je hodnota u kontrolní membrány Cer SC/FFA/Chol/CholS ($0,07 \pm 0,00$ μ g/cm²/h). Membrána s 10 % **Cer-24AS16-24** vykazovala v porovnání s ostatními 1-*O*-

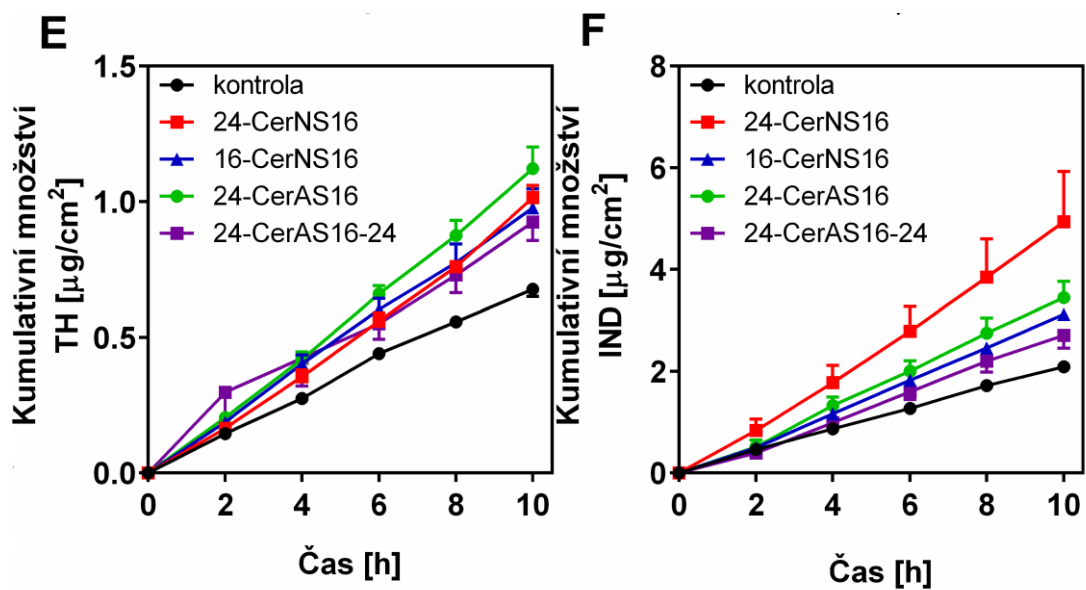
acyl-Cer nižší výsledek a to $0,09 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. **Cer-24NS16**-membrány měly flux TH $0,11 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, **Cer-16NS16**-membrány $0,10 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a membrány obsahující **Cer-24AS16** dosáhly hodnot $0,12 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. U všech membrán se jedná o výsledky statisticky významné ($p < 0,05$; Obrázek 11, graf C).

7.3.3.2 Flux IND

Výsledné hodnoty fluxů jsou zobrazeny v grafu D Obrázku 11. Hodnota kontrolní membrány Cer SC/FFA/Chol/CholS ($0,21 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) je nižší než dalších zkoumaných membrán. Flux **Cer-24NS16**-membrán byl $0,51 \pm 0,11 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, tento výsledek je statisticky významně ($p < 0,05$) vyšší oproti kontrole. Podobné hodnoty jsme naměřili u **Cer-16NS16**-membrán ($0,33 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$), **Cer-24AS16**-membrán ($0,36 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) a hodnota fluxu u **Cer-24AS16-24**-membrán byla $0,29 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, přičemž tato hodnota byla nejnižší v rámci membrán s 1-*O*-acyl-Cer.



Obrázek 11. Výsledky permeabilit komplexního modelu: (A) ztráta vody membránou, (B) elektrická impedance, (C) flux TH, (D) flux IND. Data jsou prezentována jako průměr všech naměřených hodnot ($n \pm \text{SEM}$; $n = 4-6$; * značí statisticky významné zvýšení hodnot oproti kontrole ($p < 0,05$).



Obrázek 12. Výsledky měření permeability modelových membrán (komplexní model): (E) kumulativní množství TH (F) kumulativní množství IND. Data jsou prezentována jako průměr všech naměřených hodnot (n) \pm SEM; $n = 4-6$.

8. DISKUZE

8.1 Syntéza

Význam 1-*O*-acyl-Cer, jakožto nového strukturního typu lidských kožních Cer, není dosud znám. Tento typ esterifikovaných Cer byl již v minulosti objeven v různých tkáních³⁷, přesto až práce Rabionet a kol. popsala zastoupení a složení těchto molekul v lidské SC.³⁸ Naším cílem bylo připravit tyto látky a následně studovat jejich bariérové vlastnosti. 1-*O*-acyl-Cer jakožto složky lidské SC představují 5 % v rámci všech esterifikovaných Cer (EOS-, POS-, 1-*O*-acyl-Cer) a 2,3 % ze všech Cer. Jejich struktura je tvořena sfingosinem, *N*-acylem a 1-*O*-acylem. Bylo detekováno velké množství jednotlivých strukturních typů 1-*O*-acyl-Cer, v největším zastoupení to byl 1-*O*-lignoceroyl-Cer(d18:1; h16:0), 1-*O*-palmitoyl-Cer(d18:1; 16:0) a 1-*O*-lignoceroyl-Cer(d18:1;16:0), s nimiž jsme pracovali v rámci této práce (**Cer-24AS16** resp. **Cer-16NS16**, **Cer-24NS16**).³⁸

Příprava **Cer-24NS16** probíhala třemi způsoby pro optimalizaci postupu s ohledem na syntézu dalších 1-*O*-acyl-Cer. Příprava esterů s činidly DMAP a WSC přinesla nejvyšší výtěžek (43 %)⁵², reakce s HOBt a WSC o něco nižší (29 %); Yamaguchiho esterifikací⁴¹ bylo dosaženo rovněž nízkých výtěžků (25 %). **Cer-16NS16** byl již syntetizován využitím DMAP a WSC s výtěžkem 42 %.

Syntéza **Cer-24AS16** probíhala ve více krocích, protože jsme neměli k dispozici výchozí Cer-AS16. Příprava 2-hydroxypalmitové kyseliny probíhala podle Masudy a Moriho.⁴⁰ V prvním kroku jsme připravili 2-brompalmitovou kyselinu pomocí tzv. Hell-Volhard-Zelinského reakce, pro zvýšení výtěžku jsme použili Br₂ v osminásobném nadbytku vůči palmitové kyselině a reakce probíhala 12 hodin při teplotě 95 °C. Pro získání čistého produktu se rekrystalizace z hexanu nejevila jako dobrý postup, proto jsme využili sloupcové chromatografie. V druhém kroku reagovala 2-brompalmitová kyselina s 2M NaOH za vzniku 2-hydroxypalmitové kyseliny s 95 % výtěžkem. Pro zvýšení výtěžku tato reakce probíhala 40 hodin při teplotě 90 °C. V následné syntéze Cer-AS16 jsme použili komerčně dostupný sfingosin a námi připravenou 2-hydroxypalmitovou kyselinu. V této reakci jsme nijak nechránili OH- skupiny sfingosinu.

Jako činidla jsme použili WSC a HOBt. Jelikož použitá kyselina byla racemická, tato reakce poskytla dva diastereoizomery. Vzniklé diastereoizomery jsme oddělili pomocí sloupcové chromatografie; fyziologický Cer s konfigurací (2'R)- měl nižší hodnoty $R_f = 0,44$ (chloroform/MeOH, 10:1), $0,26$ (chloroform/MeOH, 19:1) než jeho diastereoizomer s (2'S)-konfigurací: $R_f = 0,51$ (chloroform/MeOH, 10:1), $0,31$ (chloroform/MeOH, 19:1). Fyziologický (2'R)- diastereoizomer (výtěžek 36 %) vykazoval horší rozpustnost v chloroformu než druhý diastereoizomer s konfigurací (2'S)- (výtěžek 38 %). Posledním krokem syntézy **Cer-24AS16** byla acylace primární hydroxylové skupiny (2'R)- diastereoizomeru Cer-AS16 pomocí DMAP a WSC. Velkým problémem se ukázala rozpustnost Cer-AS16, kdy po dlouhém míchání v ultrazvukové lázni sice vznikl roztok, ten však po čase opět přecházel v suspenzi. Vznik této suspenze zřejmě stál za nežádaným **Cer-24AS16-24** (výtěžek 24 %), který měl acylovanou i hydroxylovou skupinu na acylovém řetězci, vedle žádaného produktu **Cer-24AS16** (výtěžek 13 %), což si vysvětlujeme neochráněním hydroxylové skupiny v poloze 2'. Oba tyto 1-O-acyl-Cer bylo možné oddělit sloupcovou chromatografií. Pokud by bylo potřeba v budoucnu připravit požadovaný **Cer-24AS16** znovu, bylo by lepší ochránit hydroxylovou skupinu 2-hydroxypalmitové kyseliny a pak pokračovat v syntéze. Přestože **Cer-24AS16-24** nebyl popsán ve SC, rozhodli jsme se ho zařadit do dalšího hodnocení.

8.2 Hodnocení modelových membrán

8.2.1 Jednoduchý model

V tomto experimentu bylo naším cílem určit vliv 1-O-acyl-Cer na bariérové vlastnosti lipidových membrán, které simulují některé důležité vlastnosti lipidů SC, jako je poměrné zastoupení hlavních složek a jejich uspořádání. Nejdříve byl vybrán jeden zástupce 1-O-acyl-Cer, **Cer-24NS16**, jehož vliv na permeabilitu a biofyzikální vlastnosti membrán byl studován v jednoduchém modelu, kde Cer-NS24 byl postupně nahrazován 1-O-acyl-Cer.

Získané hodnoty ztráty vody modelových membrán ukazují, že vzorky s 5, 10, 20 a 30% zastoupením **Cer-24NS16** (z celkového množství Cer) vykazaly oproti kontrolní membráně (Cer-NS24/FFA/Chol/CholS) mírně menší propustnost pro molekuly vody (ne však statisticky významně). Membrána obsahující 100% 1-O-acyl-Cer naopak

vykázala výrazně statisticky významně vyšší propustnost pro vodu, a tím i horší bariérové vlastnosti. Dalším hodnoceným parametrem byla elektrická impedance. Výsledky této veličiny byly naopak u membrány s 5, 10, 20 a 30% obsahem **Cer-24NS16** vyšší než u kontrolní. Tento fakt potvrzuje předešlé hodnoty ztráty vody. Především statisticky významně vyšší hodnoty pro membrány s 5% a 10% **Cer-24NS16** dávají informaci o nízké propustnosti těchto membrán pro ionty, a tím o dobrých bariérových vlastnostech.

Permeabilita modelových membrán byla dále sledována pomocí dvou modelových látek s rozdílnými fyzikálně - chemickými vlastnostmi, TH a IND. Flux TH u membrán s 5%, 10% a 30% **Cer-24NS16** byl nižší než u kontrolní membrány, kromě membrány s 20% **Cer-24NS16**, která vykazovala velkou variabilitu. Pro flux IND u 5%, 10%, 20% a 30% byly naměřeny hodnoty nižší než pro kontrolní membránu. Výsledky fluxu jak TH, tak IND přes membrány s 100% **Cer-24NS16** byly statisticky významně vyšší než u kontroly. Získané výsledky permeability jednoduchého modelu pro všechny použité markery tedy naznačují spíše pozitivní účinek **Cer-24NS16** na permeabilitu, a to hlavně u 10% koncentrace **Cer-24NS16**.

Pomocí IČ spektroskopie jsme studovali vliv **Cer-24NS16** na konformace lipidových řetězců, fázové přechody i laterálním uspořádání lipidů v modelových membránách. Hodnoty teplot fázového přechodu (symetrická valenční vibrace) byly velmi podobné, a tudíž lze tvrdit, že přitažlivé síly v membránách nebyly přítomností **Cer-24NS16** významně ovlivněny. Dále z vlnočtů této vibrace při 32°C můžeme tvrdit, že různé koncentrace 1-*O*-acyl-Cer nemají vliv na konformaci lipidových řetězců v membránách. Další informaci o mikrostruktuře nám poskytla methylenová deformační nůžková vibrace: přidavek **Cer-24NS16** do membrány nezměnil laterální uspořádání řetězců, ve všech membránách se směsí **Cer-24NS16** a Cer-NS24 byla patrná orthorhombická struktura, která přechází v hexagonální mezi 31 a 37 °C. Zajímavým výsledkem je, že v případě membrány obsahující 100 % 1-*O*-acyl-Cer nebylo přítomné orthorhombické uspořádání, což je v rozporu s výsledky z RPD (viz dále). V této membráně bylo zřejmě množství orthorhombicky uspořádaných lipidů sníženo tak, že nebylo pomocí IČ spektroskopie pozorovatelné.

Lamelární uspořádání modelových lipidových membrán bylo hodnoceno pomocí RPD. Ve všech studovaných membránách byla přítomna fáze separovaného Chol a krátká lamelární fáze s periodicitou přibližně 5,3–5,7 nm. Obě zmíněné fáze jsou fyziologické a byly nalezeny ve zdravé kůži, kde délka krátké lamelární fáze měří ~ 5–6 nm a fáze separovaného Chol ~ 3,4 nm.²⁴⁻²⁶ Kromě těchto fází se v zdravé lidské SC nachází tzv. dlouhé lamelární fáze (~ 12–13 nm)²⁴⁻²⁶, jež však u 1-*O*-acyl-Cer nalezeny nebyly. To je způsobeno absencí ultradlouhých ω -*O*-acylCer (např. Cer EOS) v tomto jednoduchém modelu. Z toho plyne, že 1-*O*-acyl-Cer zřejmě nemohou ω -*O*-acylCer nahradit. Zajímavý výsledek byl nalezen u membrány obsahující 100 % 1-*O*-acyl-Cer. V těchto membránách byly (kromě separovaného Chol a krátké lamelární fáze) přítomny i další lamelární struktury s kratší periodicitou. Navíc bylo v oblasti širokých úhlů v difraktogramech všech studovaných membrán nalezeno orthorhombické uspořádání lipidových řetězců. Jedinou změnou, která je pozorovatelná v difraktogramech s **Cer-24NS16**, je změna v poměru intenzit reflexí krátké lamelární fáze a reflexí Chol. S nárůstem koncentrace **Cer-24NS16** klesá relativní poměr Chol, což naznačuje jeho lepší mísitelnost s krátkou lamelární fází. Toto chování by mohlo vysvětlovat pokles v permeabilitě membrán s obsahem **Cer-24NS16**.

8.2.2 Komplexní model

První část práce naznačila, že **Cer-24NS16**, zejména v 10% koncentraci, mírně zlepšoval bariérové vlastnosti připravených lipidových membrán. Dalším cílem této práce bylo tento výsledek ověřit na složitějším membránovém modelu a porovnat připravené strukturní typy 1-*O*-acyl-Cer. Komplexitu modelu jsme zvýšili nahrazením Cer-NS24 směsí izolovaných Cer z lidského SC. Měřenými parametry u modelových membrán byly (stejně jako v předešlém experimentu) ztráta vody membránou, elektrická impedance a flux modelových léčiv (TH a IND).

Permeabilita membrán s 10% podílem **Cer-24NS16**, **Cer-16NS16**, **Cer-24AS16** nebo **Cer-24AS16-24** byla studována celkem dvakrát (z každého Cer bylo připraveno 4–6 nezávislých membrán), přesto jsme nebyli schopni potvrdit pozitivní vliv 1-*O*-acyl-Cer pozorovaný u jednoduchého modelu. Jednotlivé měřené parametry lze interpretovat jako stejné nebo horší než hodnoty kontrolních membrán, tj. 10 % 1-*O*-acyl-Cer

nezlepšují bariérové vlastnosti modelových membrán připravených z izolovaných lidských Cer, v několika parametrech je možno pozorovat dokonce zhoršení jejich bariérové funkce. Co se týče srovnání připravených 1-*O*-acyl-Cer, žádné významnější rozdíly mezi nimi jsme nenalezli.

9. ZÁVĚR

1-*O*-acyl-Cer jakožto fyziologické složky lidského SC jsou poměrně novým typem Cer s dosud neznámým vlivem na bariérové vlastnosti kůže.³⁸ Cílem této diplomové práce byla příprava několika zástupců těchto 1-*O*-acyl-Cer, následná příprava modelových membrán s těmito molekulami a posouzení jejich vlivu na bariérové vlastnosti připravených membrán.

Podařilo se nám připravit tři typy fyziologických 1-*O*-acyl-Cer (**Cer-24NS16**, **Cer-24AS16**, **Cer-16NS16**) a jeden typ nefyziologického Cer (**Cer-24AS16-24**).

Následně jsme připravili modelové membrány s obsahem **Cer-24NS16**, kde jsme zjistili, že s 10% podílem 1-*O*-acyl-Cer dosáhly nižší permeability než kontrolní membrány s Cer-NS24 (měřeno pomocí ztráty vody membránou, elektrické impedance a fluxů dvou modelových léčiv). Dále jsme studovali mikrostrukturu těchto membrán pomocí IČ spektroskopie a RPD a zjistili jsme, že i přes pokles v permeabilitě se biofyzikální chování membrán příliš neliší, kromě odlišné fázové separace Chol.

V poslední části jsme připravili modelové membrány s 10% podílem jednotlivých 1-*O*-acyl-Cer (**Cer-24NS16**, **Cer-24AS16**, **Cer-16NS16**, **Cer-24AS16-24**), kdy jsme modelovou složku Cer-NS24 nahradili směsí lidských izolovaných Cer SC. Výsledky měření ztráty vody membránou, elektrické impedance a fluxu modelového léčiva však nepotvrdily lepší bariérové vlastnosti těchto membrán, které byly pozorované u jednoduchého membránového modelu. Hodnoty permeačních parametrů byly srovnatelné nebo dokonce horší oproti kontrolním membránám. Tyto výsledky potvrzují, že jednoduché modely nejsou bohužel k některým experimentům vhodné a mohou poskytovat zavádějící výsledky.

Tato práce poskytuje první charakterizaci 1-*O*-acyl-Cer, jakožto složek extracelulární matrix SC. Tyto lipidy bariérovou funkci studovaných membrán s lidskými Cer buď neovlivňují, nebo mírně zhoršují; mezi jednotlivými strukturálními typy 1-*O*-acyl-Cer jsme nepozorovali významné rozdíly.

10. POUŽITÉ ZKRATKY

DCM	dichlormethan
DMAP	4-dimethylaminopyridin
Cer	ceramid
FFA	free fatty acid
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
Chol	cholesterol
CholS	cholesterol-sulfát
IND	indometacin
LPP	fáze s dlouhou periodicitou
NMR	nukleární magnetická rezonance
R_f	retenční faktor
RPD	rentgenová prášková difrakce
SC	stratum corneum
SPP	fáze s krátkou periodicitou
TEA	triethylamin
TEWL	ztráta vody kůží
TH	teofylin
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
WSC	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylkarbodiimid

11. POUŽITÁ LITERATURA

1. Čihák, R. Anatomie 3. *Grada Publishing* **1997**, 672, (1. vydání).
2. Feingold, K. R. Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J Lipid Res* **2007**, *48*, (12), 2531-46.
3. Eckert, R. L. Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol Rev* **1989**, *69*, (4), 1316-1346.
4. Fartasch, M.; Bassukas, I.; Diepgkn, T. Structural relationship between epidermal lipid lamellae, lamellar bodies and desmosomes in human epidermis: an ultrastructural study. *Br J Dermatol* **1993**, *128*, (1), 1-9.
5. Germany, B. M. Stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase which may be generally present in the stratum corneum and with a possible involvement in desquamation. *Acta Derm Venereol (Stockh)* **1991**, *71*, 471-474.
6. van Smeden, J.; Janssens, M.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1841*, (3), 295-313.
7. Menon, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv Drug Deliv Rev* **2002**, *54*, S3-S17.
8. Harding, C. R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol Ther* **2004**, *17*, (s1), 6-15.
9. Vávrová, K. H., Alexandr. Role ceramidů v kůži. *Prakt Lékáren* **2006**, *2*, 55-58.
10. Wartewig, S.; Neubert, R. H. Properties of ceramides and their impact on the stratum corneum structure: a review. Part 1: ceramides. *Skin Pharmacol Physiol* **2007**, *20*, (5), 220-9.
11. Weerheim, A.; Ponec, M. Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Arch Dermatol Res* **2001**, *293*, (4), 191-199.
12. Hrabálek, A. V., Kateřina. Lze překonat kožní bariéru? *Prakt Lékáren* **2005**, *1*, 8-11.
13. Novotný, J.; Hrabálek, A.; Vávrová, K. Synthesis and structure-activity relationships of skin ceramides. *Curr Med Chem* **2010**, *17*, (21), 2301-24.
14. Novotny, J.; Janusova, B.; Novotny, M.; Hrabalek, A.; Vavrova, K. Short-chain ceramides decrease skin barrier properties. *Skin Pharmacol Physiol* **2009**, *22*, (1), 22-30.
15. 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*, (2), 85-96.
16. 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*, (7), 1466-76.
17. Norlén, L. Skin barrier formation: the membrane folding model. *J Invest Dermatol* **2001**, *117*, (4), 823-829.
18. Corkery, R. W. The anti-parallel, extended or splayed-chain conformation of amphiphilic lipids. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2002**, *26*, (1-2), 3-20.
19. Iwai, I.; Han, H.; den Hollander, L.; Svensson, S.; Ofverstedt, L. G.; Anwar, J.; Brewer, J.; Bloksgaard, M.; Laloef, A.; Nosek, D.; Masich, S.; Bagatolli, L. A.; Skoglund, U.; Norlen, L. The human skin barrier is organized as stacked bilayers of fully extended ceramides with cholesterol molecules associated with the ceramide sphingoid moiety. *J Invest Dermatol* **2012**, *132*, (9), 2215-25.
20. Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Carelli, S.; Ghidoni, R. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta* **1993**, *1182*, (2), 147-51.
21. Janusova, B.; Zbytovska, J.; Lorenc, P.; Vavrysova, H.; Palat, K.; Hrabalek, A.; Vavrova, K. Effect of ceramide acyl chain length on skin permeability and thermotropic phase behavior of model stratum corneum lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **2011**, *1811*, (3), 129-37.

22. Wertz, P. W. Lipids and barrier function of the skin. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* **2000**, *208*, 7-11.
23. Madison, K. C. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol* **2003**, *121*, (2), 231-41.
24. Boncheva, M. The physical chemistry of the stratum corneum lipids. *Int J Cosmet Sci* **2014**, *36*, (6), 505-15.
25. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; van der Spek, J. A.; Bras, W. Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering. *J Invest Dermatol* **1991**, *97*, (6), 1005-12.
26. Garson, J. C.; Doucet, J.; Leveque, J. L.; Tsoucaris, G. Oriented structure in human stratum corneum revealed by X-ray diffraction. *J Invest Dermatol* **1991**, *96*, (1), 43-9.
27. White, S. H.; Mirejovsky, D.; King, G. I. Structure of lamellar lipid domains and corneocyte envelopes of murine stratum corneum. An X-ray diffraction study. *Biochemistry* **1988**, *27*, (10), 3725-3732.
28. de Jager, M. W.; Gooris, G. S.; Ponec, M.; Bouwstra, J. A. Lipid mixtures prepared with well-defined synthetic ceramides closely mimic the unique stratum corneum lipid phase behavior. *J Lipid Res* **2005**, *46*, (12), 2649-2656.
29. McIntosh, T.; Stewart, M.; Downing, D. X-ray diffraction analysis of isolated skin lipids: reconstitution of intercellular lipid domains. *Biochemistry* **1996**, *35*, (12), 3649-3653.
30. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Dubbelaar, F. E.; Weerheim, A. M.; Ijzerman, A. P.; Ponec, M. Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *J Lipid Res* **1998**, *39*, (1), 186-96.
31. Bouwstra, J. A.; Ponec, M. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1758*, (12), 2080-95.
32. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Dubbelaar, F. E.; Ponec, M. Phase behavior of lipid mixtures based on human ceramides: coexistence of crystalline and liquid phases. *J Lipid Res* **2001**, *42*, (11), 1759-70.
33. Damien, F.; Boncheva, M. The extent of orthorhombic lipid phases in the stratum corneum determines the barrier efficiency of human skin in vivo. *J Invest Dermatol* **2010**, *130*, (2), 611-4.
34. Norlen, L. Skin barrier structure and function: the single gel phase model. *J Invest Dermatol* **2001**, *117*, (4), 830-6.
35. Janssens, M.; van Smeden, J.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Portale, G.; Caspers, P. J.; Vreeken, R. J.; Hankemeier, T.; Kezic, S.; Wolterbeek, R.; Lavrijsen, A. P.; Bouwstra, J. A. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J Lipid Res* **2012**, *53*, (12), 2755-66.
36. Okabe, H.; Kishimoto, Y. In vivo metabolism of ceramides in rat brain. Fatty acid replacement and esterification of ceramide. *J Biol Chem* **1977**, *252*, (20), 7068-7073.
37. Abe, A.; Shayman, J. A.; Radin, N. S. A Novel Enzyme That Catalyzes the Esterification of N-Acetylsphingosine METABOLISM OF C2-CERAMIDES. *J Biol Chem* **1996**, *271*, (24), 14383-14389.
38. Rabionet, M.; Bayerle, A.; Marsching, C.; Jennemann, R.; Grone, H. J.; Yildiz, Y.; Wachten, D.; Shaw, W.; Shayman, J. A.; Sandhoff, R. 1-O-acylceraamides are natural components of human and mouse epidermis. *J Lipid Res* **2013**, *54*, (12), 3312-21.
39. Voynova, N. S.; Vionnet, C.; Ejsing, C. S.; Conzelmann, A. A novel pathway of ceramide metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **2012**, *447*, (1), 103-114.
40. Masuda, Y.; Mori, K. Synthesis and Absolute Configuration of 6-Hydroxylated New Ceramides in Human Skin, Ceramides B, 4, 7 and 8. *Eur J Org Chem* **2005**, *2005*, (22), 4789-4800.
41. Opálka, L. s.; Kováčik, A.; Sochorová, M.; Roh, J.; Kunes, J.; Lenčo, J.; Vávrová, K. i. Scalable Synthesis of Human Ultralong Chain Ceramides. *Org Lett* **2015**, *17*, (21), 5456-5459.

42. Pullmannová, P.; Staňková, K.; Pospíšilová, M.; Školová, B.; Zbytovská, J.; Vávrová, K. Effects of sphingomyelin/ceramide ratio on the permeability and microstructure of model stratum corneum lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1838*, (8), 2115-26.
43. 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*, (1), 61-9.
44. 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*, (4), 774-784.
45. 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*, (5), 725-9.
46. Láznířková, A.; Kubíček, V., *Základy fyzikální chemie*. Charles University in Prague: 2014.
47. Garidel, P.; Folting, B.; Schaller, I.; Kerth, A. The microstructure of the stratum corneum lipid barrier: mid-infrared spectroscopic studies of hydrated ceramide:palmitic acid:cholesterol model systems. *Biophys Chem* **2010**, *150*, (1-3), 144-56.
48. Skolova, B.; Hudska, K.; Pullmannova, P.; Kovacik, A.; Palat, K.; Roh, J.; Fleddermann, J.; Estrela-Lopis, I.; Vavrova, K. Different phase behavior and packing of ceramides with long (C16) and very long (C24) acyls in model membranes: infrared spectroscopy using deuterated lipids. *J Phys Chem B* **2014**, *118*, (35), 10460-70.
49. Valvoda, V. P., M; Lukáč, P. *Základy strukturní analýzy*. Nakladatelství Karolinum **1992**.
50. Friedel, F.; Winkler, U.; Holtz, B.; Seyrich, R.; Ullrich, H. J. Material analysis with X-ray microdiffraction. *Crystal Research and Technology* **2005**, *40*, (1-2), 182-187.
51. Kittel, C.; Matyáš, M., *Úvod do fyziky pevných látek*. Academia: 1985.
52. Kovacik, A.; Opalka, L.; Silarova, M.; Roh, J.; Vavrova, K. Synthesis of 6-hydroxyceramide using ruthenium-catalyzed hydrosilylation-protodesilylation. Unexpected formation of a long periodicity lamellar phase in skin lipid membranes. *RSC Advances* **2016**, *6*, (77), 73343-73350.