

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra organické a bioorganické chemie
Skin Barrier Research Group

**STUDIUM VLIVU HYDROXYLACE CERAMIDŮ NA PERMEABILITU
A MIKROSTRUKTURU MODELOVÝCH LIPIDOVÝCH MEMBRÁN**

Disertační práce

Andrej Kováčik

2017

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. 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 využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, 2017

Andrej Kováčik

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval zejména své školitelce prof. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D., za pomoc a cenné rady, které mi během mého doktorského studia poskytla.

Dále děkuji PharmDr. Lukáši Opálkovi, Ph.D., Mgr. Michaele Šilarové, Mgr. Petře Pullmannové, Ph.D., kolegům z pracovní skupiny *Skin Barrier Research Group* a také ostatním pracovníkům Katedry organické a bioorganické chemie.

Děkuji rovněž kolegům z Vysoké školy chemicko-technologické v Praze, zejména RNDr. Jaroslavu Maixnerovi, CSc., z Centrálních laboratoří, který se podílel na rentgenové difrakční analýze vzorků.

Rád bych také poděkoval prof. Dr. rer. nat. habil. Danielu Husterovi, Dr. rer. nat. Alexandru Vogelovi a dalším pracovníkům z Institutu lékařské fyziky a biofyziky Lékařské fakulty Univerzity Lipsko (Lipsko, Spolková republika Německo), se kterými jsem se v rámci své šestiměsíční stáže podílel na společném projektu.

Za finanční podporu děkuji Grantové agentuře České republiky (13-23891S a 16-25687J), Univerzitě Karlově (PRVOUK P40, PROGRES Q42, GAUK 1868214, 936216, 88615, 652412, 1404213 a SVV 260 401) a programu Erasmus⁺, z něž byla financována moje praktická stáž v zahraničí.

Za jazykovou úpravu této práce děkuji PharmDr. Janu Babicovi, Ph.D. Za osobní podporu a zázemí děkuji své rodině a přátelům.

OBSAH

ABSTRAKT	7
ABSTRACT	9
SEZNAM ZKRATEK	11
1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE	13
2. KŮŽE – VLASTNOSTI A STAVBA	14
2.1. VÝZNAM A FUNKCE KŮŽE	14
2.2. ANATOMIE (STAVBA) KŮŽE	14
2.3. ROHOVÁ VRSTVA KŮŽE – KOŽNÍ BARIÉRA	15
3. LIPIDY ROHOVÉ VRSTVY KŮŽE – STRUKTURA, VÝZNAM A USPOŘÁDÁNÍ	17
3.1. LIPIDOVÁ MATRIX.....	17
3.2. CHOLESTEROL A VOLNÉ MASTNÉ KYSELINY	17
3.3. CERAMIDY.....	17
3.3.1. STRUKTURA	17
3.3.1.1. SFINGOSINOVÁ ČÁST	17
3.3.1.2. ACYLOVÁ ČÁST	18
3.3.2. NÁZVOSLOVÍ	19
3.3.3. BIOSYNTÉZA.....	19
3.3.3.1. DIHYDROCERAMIDY	19
3.3.4. FYTOCERAMIDY A 6-HYDROXYCERAMIDY	19
3.3.4.1. DEPOTNÍ FORMY CERAMIDŮ	20
3.4. USPOŘÁDÁNÍ A ORGANIZACE KOŽNÍCH LIPIDŮ	21
4. STUDIUM KOŽNÍ BARIÉRY – METODY HODNOCENÍ LIPIDŮ ROHOVÉ VRSTVY	24
4.1. MODELY KOŽNÍ BARIÉRY	24
4.1.1. MIKROSTRUKTURA MODELOVÝCH MEMBRÁN.....	24
4.1.1.1. INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE	24
4.1.1.2. RENTGENOVÁ DIFRAKCE.....	26
4.1.2. PERMEABILITA MODELOVÝCH MEMBRÁN	26
5. SOUHRNNÉ KOMENTÁŘE PUBLIKOVANÝCH PRACÍ	28
5.1. C-4 HYDROXYLACE CERAMIDŮ MÁ NEGATIVNÍ VLIV NA PERMEABILITU A LAMELÁRNÍ USPOŘÁDÁNÍ LIPIDŮ MODELOVÝCH MEMBRÁN (JEDNODUCHÝ MODEL).....	28
5.2. 6-HYDROXYCERAMIDY – OD SYNTÉZY K MODELOVÝM MEMBRÁNÁM.....	33
5.2.1. 6-HYDROXYCERAMIDY JAKO RELATIVNĚ NOVÁ SKUPINA SFINGOLIPIDŮ	33
5.2.2. SYNTÉZA 6-HYDROXYCERAMIDŮ	34

5.2.3.	C-6 HYDROXYLACE CERAMIDŮ MÁ SMÍŠENÝ VLIV NA PERMEABILITU A MIKROSTRUKTURU MODELOVÝCH MEMBRÁN. CERAMID NH STOJÍ ZA VZNIKEM LAMELÁRNÍ FÁZE S NEZVYKLE DLOUHOU PERIODICITOU.....	35
5.3.	VLIV STEREOCHEMIE CERAMIDŮ NA PERMEABILITU A MIKROSTRUKTRU MODELOVÝCH MEMBRÁN.....	40
6.	ZÁVĚR.....	44
7.	SEZNAM PŘÍLOH.....	45
8.	SEZNAM OBRÁZKŮ, SCHÉMAT A TABULEK.....	46
9.	LITERATURA.....	47
10.	CURRICULUM VITAE.....	56
	PŘÍLOHY	59

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Kandidát: **Mgr. Andrej Kováčik**

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

Název disertační práce: **Studium vlivu hydroxylace ceramidů na permeabilitu a mikrostrukturu modelových lipidových membrán**

Ceramidy (Cer) se nachází v mezibuněčných prostorech nejsvrchnější vrstvy savčí epidermis, *stratum corneum*, kde společně s dalšími lipidy (volné mastné kyseliny, cholesterol) tvoří lipidovou kožní bariéru.

Kromě sfingosinových (Cer NS) a dihydrosfingosinových Cer (Cer NdS) se ve zdravé savčí epidermis nachází i polární Cer, tj. Cer odvozené od fytosfingosinu (s hydroxylovou skupinou v poloze 4 sfingoidní báze, tzv. fytoceramidy) a 6-hydroxysfingosinu (s hydroxylovou skupinou v poloze 6, tzv. 6-hydroxyceramidy). Doposud však nebylo objasněno, jaké postavení mají polární fytoceramidy (Cer NP) a 6-hydroxyceramidy (Cer NH) v bariérové funkci kůže. 6-hydroxyceramidy nejsou navíc komerčně dostupné. Proto bylo prvním cílem práce připravit fyziologické 6-hydroxyceramidy. Byly syntetizovány 6-hydroxylované Cer, tj. Cer NH s dlouhým (C₂₄:o), a Cer EOH s ultradlouhým acylem s esterově vázanou kyselinou linolovou. Trojná vazba byla na *trans*-dvojnou redukována pomocí selektivní aplikované Trostovy hydrosilylace-protodesilylace za katalýzy [Cp**Ru*(CH₃CN)₃]PF₆ v bezvodém acetonu.

Rozmanitost Cer v kůži a důvod, proč savčí epidermis syntetizuje fytoceramidy, jsou doposud nejasné. Cílem této disertační práce bylo hodnocení vlivu hydroxylace Cer v poloze 4 na bariérové vlastnosti a fázové chování fytoceramidů v modelových membránách. Modelové membrány byly připraveny jako ekvimolární směs Cer NP nebo Cer NdS nebo Cer NS, kyseliny lignocerové a cholesterolu s přídavkem cholesterol-sulfátu. Modely byly hodnoceny v permeačních a biofyzikálních (infračervená spektroskopie a prášková rentgenová difrakce) experimentech. Hydroxylace Cer v poloze 4 způsobuje, že lipidy v modelu jsou hůře uspořádány, fázově se separují a membrány obsahující Cer NP jsou propustnější pro různé látky ve srovnání s membránami obsahujícími Cer NS nebo Cer NdS. Použitím deuterované kyseliny lignocerové v modelových membránách bylo zjištěno, že hydroxylace Cer v poloze 4 u fytoceramidů omezuje mísitelnost lipidů s mastnou kyselinou. Z této studie lze vyvodit závěr, že fytoceramidy v epidermis pravděpodobně neplní pouze bariérovou funkci, ale podílejí se i na jiných procesech.

Doposud nebyla objasněna jedinečnost 6-hydroxyceramidů v savčí epidermis. Proto bylo cílem této práce studovat Cer odvozené od 6-hydroxysfingosinu (Cer NH) pomocí modelových membrán. Mnohvrstvé lipidové membrány byly připraveny ve složení Cer NH/směs mastných kyselin (C₁₆-C₂₄)/cholesterol/cholesterol-sulfát. Hydroxylace Cer v poloze 6 nejenom že zvyšuje propustnost modelových membrán obsahujících Cer NH pro vodu nebo lipofilní látky, ale také zvyšuje rezistenci modelových membrán vůči prostupu iontů. Hydroxylace Cer v poloze 6 navíc brání dobré mísitelnosti Cer NH s mastnými kyselinami v modelu. Z hodnocení mikrostruktury modelových membrán bylo zjištěno, že Cer NH stojí za vznikem lamelární fáze s neobvykle dlouhou periodicitou. Dlouhá lamelární fáze je esenciální pro správnou bariérovou funkci epidermis. Tento fakt by mohl vysvětlovat jedinečné postavení 6-hydroxyceramidů v kůži.

Pro objasnění významu fyziologické *D-erythro* konfigurace sfingosinových a dihydrosfingosinových ceramidů bylo cílem práce připravit nefyziologické *L-threo*-(dihydro)ceramidy. Z hodnocení bariérových vlastností a fázového chování *L-threo*-Cer NS a *L-threo*-Cer NdS v modelových lipidových membránách bylo zjištěno, že změna stereochemie v polární hlavě Cer vede ke zvýšení přitažlivých sil mezi lipidy v membránách. Zatímco *L-threo* konfigurace Cer nemá na lamelární uspořádání lipidů žádný vliv, změna stereochemie vede ke snížení

mísitelnosti deuterovaných mastných kyselin s *L-threo*-Cer NS nebo *L-threo*-Cer NdS a rovněž ke zvýšení permeability modelových lipidových membrán.

Použité modely přispěly k lepšímu pochopení významu vztahu struktura-účinek ceramidů v bariérové funkci kůže. Získané poznatky z této práce by mohly najít uplatnění při topickém podávání ceramidů (např. Cer NH) v léčbě atopické dermatitidy.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Candidate: **Mgr. Andrej Kováčik**

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

Title of doctoral thesis: **Study of Effect of Ceramide Hydroxylation on Permeability and Microstructure of Model Lipid Membranes**

Ceramides (Cer) occur in intracellular spaces of the *stratum corneum*, the outermost mammalian epidermal layer, where they along with other lipids (free fatty acids, cholesterol) form a skin lipid barrier.

Besides sphingosine- (Cer NS) and dihydrosphingosine-based Cer (Cer NdS), in the healthy mammalian epidermis some polar Cer are present, *i.e.*, Cer based on phytosphingosine (with hydroxyl group in position 4, *i.e.*, phytoceramides) and Cer based on 6-hydroxysphingosine (with hydroxyl group in position 6, *i.e.*, 6-hydroxyceramides). However, the role of phytoceramides (Cer NP) and 6-hydroxyceramides (Cer NH) in the skin barrier function has not been clarified. Moreover, 6-hydroxyceramides are not commercially available. Therefore, the first aim of this work was to synthesize physiological 6-hydroxyceramides. The synthesis of 6-hydroxylated Cer, *i.e.*, Cer NH with long (C_{24:0}) and Cer EOH with ultralong acyl with ester-linked linoleic acid is reported. The triple bond was reduced into *trans*-double bond by using selective applied Trost hydrosilylation-protodesilylation catalyzed by [Cp**Ru*(CH₃CN)₃]PF₆ in dry acetone.

The diversity of Cer in the skin and the reason why epidermis synthesizes phytoceramides, are still unknown. The aim of this thesis was to investigate the effect of C-4 hydroxylation of Cer on barrier properties and phase behaviour of phytoceramides in model membranes. Model membranes were prepared as a molar mixture of Cer NP, or Cer NdS, or Cer NS, lignoceric acid, and cholesterol with an addition of cholesteryl sulfate. Models were investigated by permeation and biophysical (infrared spectroscopy and X-ray powder diffraction) experiments. Hydroxylation of Cer in position 4 leads to less ordered lipids in models, lipids are phase separated and model Cer NP membranes are more permeable than those based on Cer NS or Cer NdS. Using deuterated lignoceric acid in model membranes we found out that hydroxylation in position 4 in phytoceramides restricts the miscibility of lipids with deuterated fatty acid. From this study, we can conclude that phytoceramides have not only barrier function in epidermis but they probably play a role in other processes.

The uniqueness of 6-hydroxyceramides in mammalian epidermis has not been clarified. Therefore, the aim of this work was to study Cer based on 6-hydroxysphingosine (Cer NH) in model membranes. Multilayer lipid membranes were prepared in following composition: Cer NH/mixture of free fatty acids (C₁₆-C₂₄)/cholesterol/cholesteryl sulfate. Hydroxylation of Cer in position 6 increases the model membrane permeability to water and lipophilic molecules, but also increases the opposition to electrical current. Moreover, the 6-hydroxylation prevents the good mixing of Cer NH with deuterated fatty acids. Using the investigation of model membrane microstructure, we found out that Cer NH probably facilitates the formation of lamellar phase with unusual long periodicity. Long periodicity phase is essential for the correct barrier function. This fact could explain the unique role of 6-hydroxyceramides in the skin.

To elucidate the role of physiological *D-erythro* configuration in sphingosine and dihydrosphingosine Cer, the aim of this work was to synthesize non-physiological *L-threo*-(dihydro)ceramides. From the investigation of barrier properties and phase behaviour of *L-threo*-Cer NS and *L-threo*-Cer NdS in model membranes, we found out that the stereochemistry conversion in Cer polar head leads to increase of cohesive forces of lipids in model membranes. While *L-threo* configuration has no effect on lamellar lipid organization, the change of Cer stereochemistry

leads to decrease of miscibility of deuterated fatty acids with *L-threo*-Cer NS or *L-threo*-Cer NdS and to increase of permeability of model lipid membranes as well.

Model systems used in this thesis contributed to better understanding the role of structure-activity relationships of Cer in skin barrier function. The pieces of knowledge from this work could be used in the topical application of Cer (*e.g.*, Cer NH) in atopic dermatitis treatment.

SEZNAM ZKRATEK

Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
Cer	ceramid(y)
dihydroCer	dihydroceramid(y)
DMF	dimethylformamid
fytoCer	fytoceramid(y)
glukosylCer	glukosylceramid(y)
HMPA	hexamethylfosforamid
6-hydroxyCer	6-hydroxyceramid(y)
Chol	cholesterol
CholS	cholesterol-sulfát
IF ₂₀₁₆	impakt faktor v roce 2016
IND	indometacin
IR	infračervená spektroskopie
(<i>d</i>)-LIG	(deuteroaná) kyselina lignocerová (C ₂₄ :0)
LPP	lamelární fáze s dlouhou periodicitou (angl. <i>long periodicity phase</i>)
SC	rohová vrstva (lat. <i>stratum corneum</i>)
S-Cer	sfiningosinový ceramid
SL	sfingolipid(y)
SM	sfingomeryelin(y)
SPP	lamelární fáze s krátkou periodicitou (angl. <i>short periodicity phase</i>)
TBAF	tetrabutylamonium-fluorid
TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
TBSCI	<i>tert</i> -butyldimethylsilylchlorid
TFA	trifluoroctová kyselina
TH	theofylin
THF	tetrahydrofuran
TMS	trimethylsilyl
(<i>d</i>)-VMK	(deuteroané) volné mastné kyseliny
WSC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
XRPD	rentgenová prášková difrakce (angl. <i>X-ray powder diffraction</i>)

1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Sfingolipidy (SL) tvoří velkou rodinu lipidů. Název, který jim v roce 1884 přidělil J. L. W. Thudichum (1829–1901), pochází z řecké mytologie, jelikož jak Velká sfinga v Gíze, tak chování a význam SL byly pro vědce na konci devatenáctého století velmi záhadné. SL se vyskytují ve všech eukaryotních buňkách. Zde plní funkci v buněčné signalizaci; podílí se na růstu, metabolismu a diferenciaci buněk a při programované buněčné smrti – apoptóze.¹⁻³ Nejpočetnější podtřída SL, **ceramidy** (Cer), se rovněž nachází v mezibuněčných prostorech nejsvrchnější vrstvy savčí kůže, v **rohové vrstvě** (*stratum corneum*; SC). Zde plní funkci bariéry, tj. společně s dalšími lipidy zabraňuje vstupu cizorodých látek do organismu a zároveň chrání organismus před jeho dehydratací.⁴⁻⁷

Cer jsou amidy 2-aminodiolů (tzv. **sfingoidních bází**), u kterých je volná aminoskupina acylována zbytkem vyšší mastné kyseliny. Mezi nejčastěji zastoupené sfingoidní báze v molekulách kožních Cer patří sfingosin, dihydro-sfingosin, fytosfingosin a pro kůži zcela jedinečný **6-hydroxysfingosin**. Cer odvozené od této sfingoidní báze, tzv. **6-hydroxyceramidy** (**6-hydroxyCer**), byly poprvé objeveny v devadesátých letech minulého století⁸ a jejich struktura byla potvrzena teprve nedávno.⁹ Jejich **jedinečnost v epidermis**,¹⁰ nepřítomnost v jiných tkáních, nejasná biosyntéza a snížené hladiny v epidermis u mnoha kožních onemocnění nebyly doposud objasněny vzhledem k tomu, že 6-hydroxyCer nejsou komerčně dostupné. Proto bylo **cílem této práce 6-hydroxyCer připravit a studovat jejich bariérové vlastnosti a jedinečné postavení mezi kožními Cer**. 6-hydroxyCer byly hodnoceny pomocí modelových mnohvrstevných membránových systémů. U modelových lipidových membrán byla hodnocena jejich permeabilita a také jejich chování za použití biofyzikálních charakteristik, jako jsou infračervená spektroskopie a prášková rentgenová difrakce.

Dalším dílčím cílem této práce bylo **hodnocení permeability a mikrostruktury modelových membrán obsahujících Cer odvozené od fytosfingosinu** (tzv. **fyto-ceramidy**; fytoCer), které společně s 6-hydroxyCer patří mezi nejpolarnější Cer vůbec. Cílem práce tedy bylo srovnání vlivu typu sfingoidní báze (fytosfingosin vs. dihydro-sfingosin vs. sfingosin) studovaných Cer na permeabilitu a mikrostrukturu modelových membrán SC.

Z pohledu stereochemie jsou všechny savčí sfingoidní báze v **D-erythro konfiguraci**, což v absolutní konfiguraci znamená (2*S*,3*R*)- pro (dihydro)sfingosin a 6-hydroxysfingosin, avšak fytosfingosin má absolutní konfiguraci (2*S*,3*S*)-, jelikož se zde mění pořadí (priorita) substituentů.¹¹ Doposud však nebylo potvrzeno, jak důležitá je fyziologická D-erythro konfigurace Cer ve SC. Proto bylo **cílem této disertační práce připravit a charakterizovat Cer s nefyziologickou konfigurací** (konkrétně **L-threo konfigurací**). Připravené (2*S*,3*S*)-(dihydro)Cer byly převedeny do modelových membrán SC a hodnoceny čtyřmi parametry permeability (ztrátou vody přes membránu, elektrickou impedancí a měřením toku, tzv. fluxu, dvou modelových látek přes membránu). Mikrostruktura membrán a mísitelnost lipidů v modelových membránách SC byly hodnoceny pomocí práškové rentgenové difrakce a infračervené spektroskopie.

Předkládaná práce je rozdělena do několika tematických kapitol. Druhá kapitola se věnuje základní problematice lidské kůže, její stavbě, funkci a významu kožní bariéry. Třetí kapitola rozebírá strukturu, význam a uspořádání lipidů kožní bariéry. Součástí této kapitoly je podkapitola o Cer, jejich názvosloví a biochemii. Čtvrtá kapitola se zaměřuje na metody hodnocení modelových membrán obsahujících kožní lipidy, například infračervenou spektroskopii nebo práškovou rentgenovou difrakci. Pátá kapitola je **souhrnným komentářem k původní práci studující fytoCer v modelových membránách**, dále **komentářem ke čtyřem pracím týkajících se syntézy a hodnocení 6-hydroxyCer** (tři původní a jedna práce rešeršní) a konečně **komentářem k původní práci, která pojednává o významu stereochemie funkčních skupin v polární hlavě Cer**. Všechny práce publikované v odborných časopisech, komentované v kapitole 5, jsou na konci disertační práce uvedeny jako její přílohy. Poslední kapitolou je odborný životopis autora předkládané práce včetně výčtu jeho dosavadní publikační aktivity.

2. KŮŽE – VLASTNOSTI A STAVBA

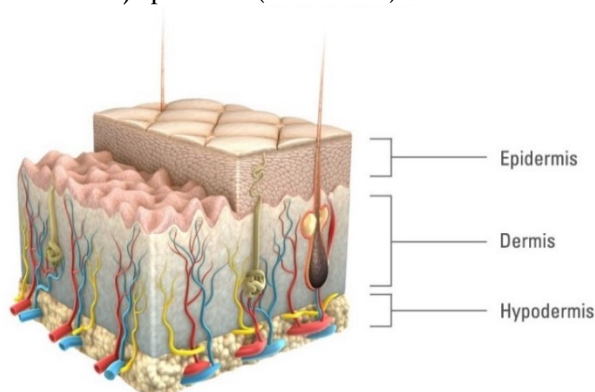
2.1. VÝZNAM A FUNKCE KŮŽE

Udržování stability vnitřního prostředí neboli **homeostázy** (řec. *homoios*, stejný; řec. *stasis*, trvání, stání) je nezbytnou podmínkou fungování a existence živého (lidského) organismu. Na zabezpečení homeostázy se podílí řada orgánů a tkání, mezi něž patří také kůže.

Kůže (lat. *cutis*, řec. *derma*) je největším orgánem savců. Tvoří hranici mezi vnitřním (organismus) a vnějším prostředím (okolí) a pokrývá celý organismus. Kůže chrání před nežádoucími vlivy vnějšího prostředí, tvoří **mechanickou bariéru** proti cizorodým vlivům chemického, fyzikálního a biologického původu. Také se podílí na **termoregulaci** (díky přítomnosti potních žláz a bohatého cévního zásobení) a látkové výměně mezi organismem a prostředím, což je dáno činností potních a mazových žláz nacházejících se v tomto orgánu (**vylučovací** a **respirační** funkce). Mezi další neméně důležité funkce kůže patří funkce **smyslová** (nervová zakončení), funkce **zásobní** (dána přítomností podkožního tuku, který je zde ukládán; tento představuje pro tělo významný zdroj energie) a **imunitní** funkce. Kůže je nezbytným orgánem pro tvorbu **vitamínu D** (kalciferolu), který je nepostradatelný při metabolismu (resorpci) vápníku a fosforu.¹²⁻¹³

2.2. ANATOMIE (STAVBA) KŮŽE

Kůže člověka může být považována za největší lidský orgán. Její plocha u průměrného jedince činí 1,6 – 2,0 m² a její hmotnost dosahuje přibližně 3 kg. Anatomicky se lidská kůže klasifikuje do tří základních vrstev. Na vnitřní orgány a svalovou tkáň se upíná první kožní vrstva, podkožní vazivo, následuje škára a poslední vrstvou je pokožka (**Obrázek 1**).^{12, 14}

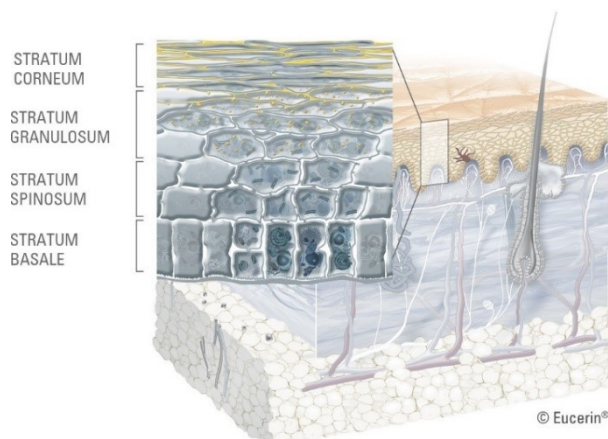


Obrázek 1 – Schématické znázornění základních vrstev lidské kůže. Převzato z *eucerin.cz*.¹⁵ Na vnitřní orgány se upíná podkožní vazivo (*hypodermis*), které pokrývá živá škára (*dermis*) přecházející v pokožku (*epidermis*).

Podkožní vazivo (lat. *tela subcutanea*, řec. *hypodermis*) je živá tuková a vazivová tkáň, která spojuje kosterní nebo svalovou tkáň s vyššími úseky kůže. V této vrstvě je ukládán podkožní tuk, který chrání organismus před mechanickými vlivy, fyzickým stresem a představuje energetickou zásobu. Tato vrstva nemusí být přítomna na všech oblastech těla; existují místa (např. oční víčka), kde tato vrstva dokonce chybí.¹²

Škára (lat. *corium*, řec. *derma*) je nejtlustší (3–5 mm) část kůže. Tato živá vrstva obsahuje převážně kolagenová vlákna, která dodávají celé tkáni patřičnou pevnost a elasticitu. Škára je bohatě zásobena, protože se zde nachází cévní a lymfatické řečiště. Jsou zde zakotvena nervová zakončení, vlasové folikuly, dále pak mazové a potní žlázy.¹²

Pokožka (*epidermis*) je třetí a nejtenčí (0,06 – 0,8 mm) vrstvou kožní tkáně. Na rozdíl od předchozích, pokožka neobsahuje žádné cévy ani nervová zakončení. Je to vrstva, která je tvořena převážně kožními buňkami (**keratinocyty**). V pokožce jsou však přítomné i další buňky jako **melanocyty** (pigmentují kůži), dále pak **Langerhansovy buňky** (imunitní funkce) aj.^{12, 14}

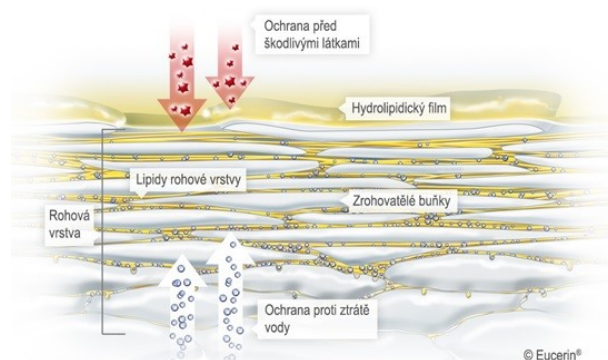


Obrázek 2 – Schématické znázornění jednotlivých vrstev lidské pokožky. Převzato z eucerin.cz.¹⁵ Na škáru nasedá bazální vrstva (*stratum basale*), dále pak vrstva trnitá (*stratum spinosum*), zrnitá (*stratum granulosum*) a nakonec neživá rohová vrstva (*stratum corneum*).

Pokožka se histologicky člení na čtyři vrstvy. První odspodu směrem k povrchu kůže je **bazální vrstva** (*stratum germinativum* nebo také *stratum basale*), ve které probíhá buněčné dělení. Tato vrstva zahrnuje i tzv. cylindrickou vrstvu (*stratum cylindricum*). Dále následuje **vrstva trnitá** (*stratum spinosum*), v níž keratinocyty získávají svůj typický špičatý tvar. Pro **zrnitou vrstvu** (*stratum granulosum*) je typická přítomnost prekurzorů keratinu, které jsou zde ve formě granul. Na zrnitou vrstvu nasedá nejsvrchnější **rohová vrstva** (*stratum corneum*), která je tvořena již odumřelými (bezjadernými) keratinocyty, tzv. **korneocyty** (Obrázek 2). Téměř 80 % celkové hmotnosti rohové vrstvy tvoří látky bílkovinného charakteru (keratiny) obsažené v korneocytech.^{12, 14}

2.3. ROHOVÁ VRSTVA KŮŽE – KOŽNÍ BARIÉRA

Kožní bariéra je situována v nejsvrchnější vrstvě kůže, v rohové vrstvě. **Rohová vrstva** (*stratum corneum*; SC) se skládá z patnácti až pětadvaceti vrstev oploštěných a zrohovatělých korneocytů, které obklopuje směs kožních lipidů, známá pod pojmem **lipidová matrix**¹⁶ (Obrázek 3). Tato tvoří kolem 20 % hmotnosti SC. Jde o přibližně ekvimolární směs **cholesterolu** (Chol), **volných mastných kyselin** (VMK) a **ceramidů** (Cer). Poměr jednotlivých lipidů SC (Chol/VMK/Cer, 1 : 1 : 1 mol) hraje klíčovou roli v bariérové funkci kůže; jakákoliv změna v tomto poměru vede k jejímu poškození.^{4-6, 17-18}



Obrázek 3 – Schématické znázornění lidské rohové vrstvy (*stratum corneum*; SC), nejsvrchnější vrstvy kůže. Převzato z eucerin.cz.¹⁵ SC je tvořeno 15–25 vrstvami zrohovatělých korneocytů (šedě), mezi kterými se nachází lipidy (tzv. lipidová matrix; žlutě). Kůže má dvě zcela zásadní funkce – zamezuje vstupu cizorodých látek do organismu (červené šipky) a chrání organismus před ztrátou vody (bílé šipky).

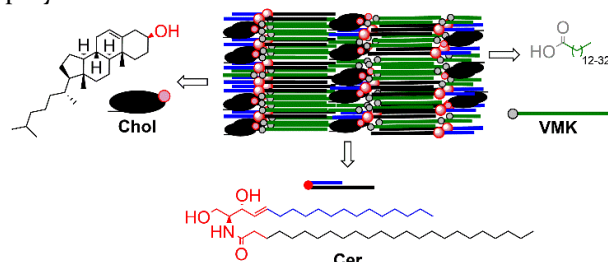
Lipidy SC **zamezují nadměrným ztrátám vody** kůží a tím zabraňují dehydrataci organismu. Lipidy SC jsou zcela **nepostradatelné**, protože stojí za přežitím savců při evolučním přechodu

z vodního prostředí na souš. Lipidy SC se rovněž podílí na **zamezení vstupu cizorodých (škodlivých) látek** (chemických a mechanických nečistot, ultrafialového světla, alergenů, mikroorganismů atd.) do organismu (**Obrázek 3**), čímž se podílí na udržení homeostázy organismu.⁶

3. LIPIDY ROHOVÉ VRSTVY KŮŽE – STRUKTURA, VÝZNAM A USPOŘÁDÁNÍ

3.1. LIPIDOVÁ MATRIX

Lipidy mezibuněčných prostor SC tvoří přibližně ekvimolární směs tří druhů lipidů – Chol, VMK a Cer (Obrázek 4).¹⁹⁻²⁰ Kromě nich se zde nachází různé typy sterolů, estery Chol a organických kyselin a cholesterol-sulfát (CholS). Zajímavé je, že ve SC nenajdeme, na rozdíl od buněčných membrán, žádné fosfolipidy.²¹



Obrázek 4 – Bariérové lipidy *stratum corneum* (SC) – ekvimolární směs cholesterolu (Chol), volných mastných kyselin (VMK) a ceramidů (Cer). Délka VMK je v rozmezí 12-32 uhlíků (nejčastěji C22, C24 a C26); délka řetězce sfingoidní báze (na obrázku sfinosin) je nejčastěji 18 uhlíků (modře), délka acylu v molekulách Cer se pohybuje v rozmezí 24–38 uhlíků (na obrázku je acyl od kyseliny lignocerové, C24:o; černě).

3.2. CHOLESTEROL A VOLNÉ MASTNÉ KYSELINY

Chol je nejvíce zastoupeným steroidem lipidové matrix (Obrázek 4); tvoří přibližně jednu čtvrtinu hmotnosti lipidů SC. Funkce Chol je ve SC zcela klíčová; tento je zodpovědný za správné **lamelární** (organizace lipidů do lamel) a **laterální** (organizace lipidů v rámci jedné lamely; viz dále) uspořádání lipidů SC. Na rozdíl od buněčných membrán, kde Chol zvyšuje pevnost (rigiditu) lipidové dvojvrstvy, ve SC se naopak podílí na zachování kapalnosti (**fluidity**) lipidů v lamelách.^{6, 22} Bylo prokázáno, že ve zdravém SC se část Chol vyděluje od ostatních lipidů, tj. vytváří samostatnou fázi. Doposud však není známá příčina této separace.

CholS je nejčastěji zastoupeným esterem Chol. Význam CholS, který představuje přibližně 5 % hmotnosti lipidů SC,²⁰ není doposud znám. Pravděpodobně se zúčastňuje procesů v udržení soudržnosti (**koheze**) a odlupování (**deskvamace**) svrchních částí SC.²³

Kyselinová složka SC je zastoupena volnými nasycenými a nerozvětvenými mastnými kyselinami, jejichž délka řetězců se pohybuje mezi 14 až 34 uhlíky; nejčastěji zastoupenými VMK ve zdravém SC jsou kyselina **behenová** (C22:o) a **lignocerová** (C24:o; **LIG**), které činí přibližně polovinu hmotnosti VMK ve SC.^{5, 11, 24}

3.3. CERAMIDY

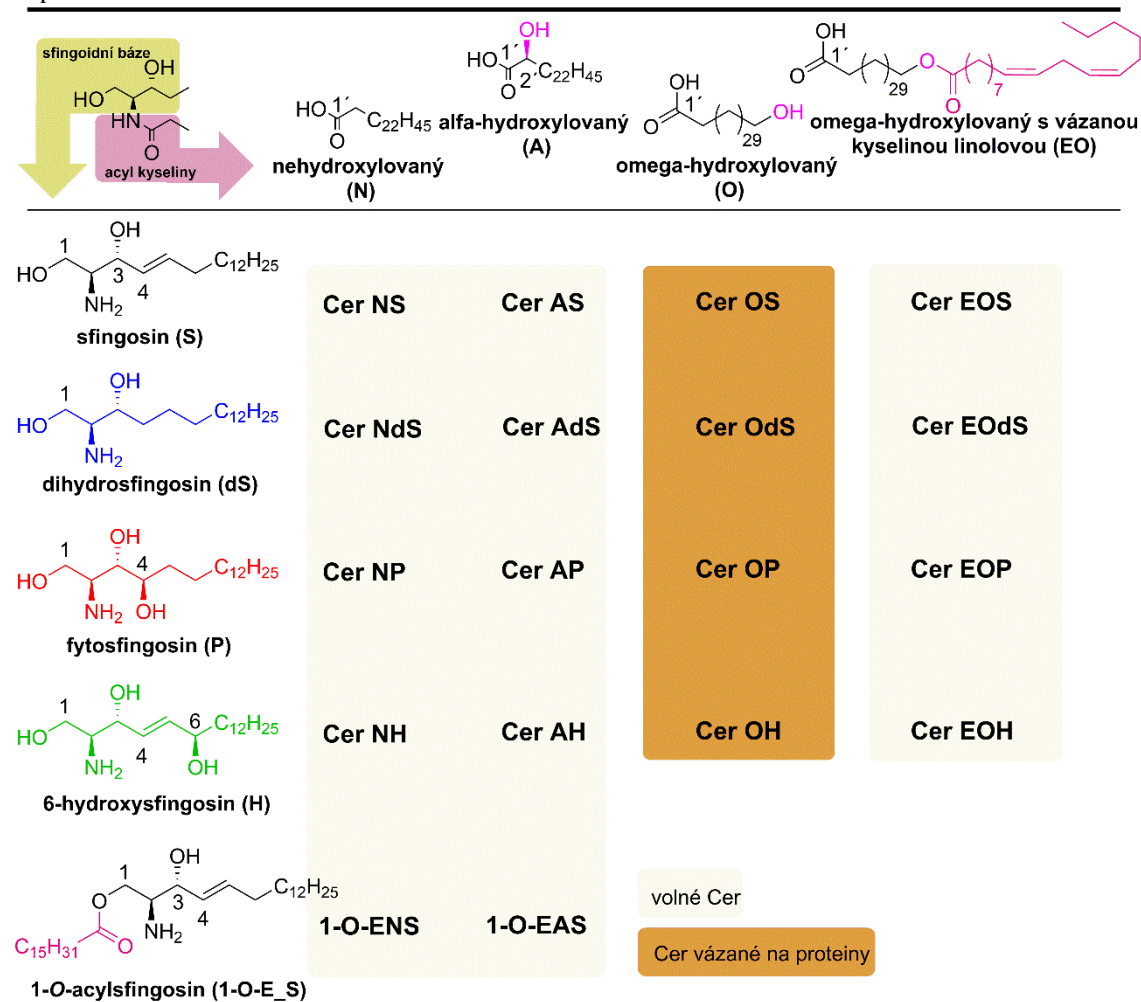
3.3.1. STRUKTURA

Přibližně 50 % hmotnosti lipidů SC tvoří látky z rodiny SL – Cer.⁵ Cer jsou SL obsahující malou polární (hydrofilní) hlavu a dva lipofilní uhlovodíkové řetězce. První z řetězců pochází ze sfingoidní báze (derivátu sfinosinu), což je nerozvětvený 2-aminoalkohol o délce nejčastěji 18 uhlíků.¹¹ Druhý řetězec, jehož délka v molekulách Cer se pohybuje v rozmezí 24–38 uhlíků, je acylem mastné kyseliny (nejčastěji 24 u dlouhých a 30–32 u ultradlouhých Cer).^{4, 25} Mastná kyselina je amidovou vazbou napojena na primární aminoskupinu sfingoidní báze⁴ (Obrázek 4).

3.3.1.1. SFINGOSINOVÁ ČÁST

Kožní Cer představují heterogenní skupinu SL. Tato různorodost plyne ze strukturálních odlišností (hydroxylace a/nebo dvojná vazba) zejména v polární hlavě Cer. Sfinoidní báze v molekulách

kožních Cer jsou nejčastěji odvozeny od **sfiningosinu (S)**, tj. sfinroidní báze s *trans*-dvojnou vazbou na čtvrtém uhlíku. Fyziologické prekurzory Cer, dihydroceramidy (dihydroCer; viz dále), jsou Cer odvozené od **dihydrosfiningosinu (dS)**, v jejichž molekulách *trans*-dvojná vazba chybí. Pro kožní Cer jsou také typické hydroxylované sfinroidní báze – **fytosfiningosin** (s hydroxylovou skupinou v poloze 4; P) a **6-hydroxysfiningosin** (s *trans*-dvojnou vazbou na čtvrtém a hydroxylovou skupinou na šestém uhlíku; H; **Tabulka 1**). V nedávné době byly dokonce objeveny i Cer se sfinroidní bází obsahující čtyři hydroxyly (T), avšak jejich poloha v řetězci a absolutní konfigurace uhlíků sfinroidní báze nebyla doposud určena.²⁶



Tabulka 1 – Názvosloví ceramidů (Cer) podle nomenklatury dle Motty.²⁷ Základem názvu Cer je kombinace písmen sfinroidních bází (S, dS, P, H nebo 1-O-E_S) a acylů mastných kyselin, které mohou být nehydroxylované (N), hydroxylované v poloze α' (A) nebo ω - (O) nebo hydroxylované v poloze ω -, u nichž je na ω -hydroxyl esterově vázán acyl kyseliny linolové (EO). V tabulce jsou zobrazeny jak volné Cer lidského *stratum corneum* (žlutě), tak Cer vázané na proteiny (Cer typu O, kovalentně vázané Cer; hnědě).

3.3.1.2. ACYLOVÁ ČÁST

Acyl v molekulách Cer je většinou tvořen dlouhou nerozvětvenou nasycenou mastnou kyselinou, která je buď **nesubstituovaná** (N), nebo je naopak **substituovaná hydroxylovou skupinou**. Tato substituce může být v poloze α - (A) nebo ω - (O). Na ω -hydroxylovou skupinu může být dále esterově navázána **kyselina linolová** (EO). Tento hydroxyl však také může být navázán na bílkoviny (involukrin), které jsou na povrchu korneocytů (tzv. **kovalentně vázané Cer**; viz dále) a tvoří tzv. **korneocytární lipidovou obálku** (angl. *corneocyte lipid envelope*).¹⁹ Poměrně nedávno byly v lidském SC nalezeny i sfiningosinové Cer, u kterých je acyl (nejčastěji od kyseliny palmitové; C16) esterově navázán na primární hydroxylovou skupinu v poloze 1 (1-O-E_S; **Tabulka 1**).²⁸

3.3.2. NÁZVOSLOVÍ

Kromě systematického názvosloví dle IUPAC se Cer označují i jinými nomenklaturními systémy. První a dodnes nejčastěji používaný názvoslovný systém²⁹ pro sfingoidní báze vyjadřuje počet hydroxylových skupin sfingoidní báze písmeny „d“ (di-) nebo „t“ (tri-). Za tímto písmenem následuje číselné vyjádření počtu uhlíků v řetězci a počet dvojných vazeb. Tímto způsobem je osmnáctiuhlíkatý S označen jako **d18:1** nebo také **4E-d18:1**, kde je kladen důraz na konfiguraci a polohu dvojně vazby sfingoidní báze.²⁹

V oblasti výzkumu role Cer v kůži byla původně zavedena nomenklatura označující Cer arabskými číslicemi, přičemž číslo znamenalo pořadí daného Cer na tenkovrstvé chromatografii při izolaci těchto SL ze SC.³⁰ S objevy dalších strukturálních podtypů Cer byl tento nomenklaturní systém nahrazen **názvoslovím dle Motty**²⁷ s pozdějšími úpravami.^{8, 18, 31} Jeho základním principem je kombinace písmen označujících typy sfingoidních bází (S, dS, P, H nebo 1-O-E_S) a acylů (N, A, O nebo EO). Například název pro Cer EOS, podle předchozí nomenklatury označovaný jako Cer 1 pro jeho nejnižší polaritu ze všech Cer, je odvozen od S a ω-hydroxylovaného acylu, který je esterifikován kyselinou linolovou (EO). Nomenklatura dle Motty je univerzálním systémem, jímž bylo jednoduše popsáno osmnáct strukturálních podtypů Cer nalezených ve zdravém SC (**Tabulka 1**). Jednotlivé podtypy Cer se pak vzájemně liší délkou jednotlivých řetězců, což vede ke stovkám typů jednotlivých Cer.⁴

3.3.3. BIOSYNTÉZA

3.3.3.1. DIHYDROCERAMIDY

Syntéza Cer *de novo* probíhá v endoplazmatickém retikulu kožní buňky. Prvním krokem v biosyntéze Cer je kondenzace aminokyseliny **L-serinu** a palmitoyl-koenzymu A katalyzovaná serinpalmitoyl-CoA-transferázou. Kondenzační produkt, **3-ketodihydrosfingosin** (3-ketosfinganin), je redukován 3-ketosfinganin-reduktázou na (2*S*,3*R*)-**dihydrosfingosin** (*D-erythro*-dihydrosfingosin nebo také sfinganin; dS), který je následně acylován jednou ze šesti typů ceramid-syntáz, což vede ke vzniku **dihydroCer** (**Schéma 1**).^{4, 18, 32-33}

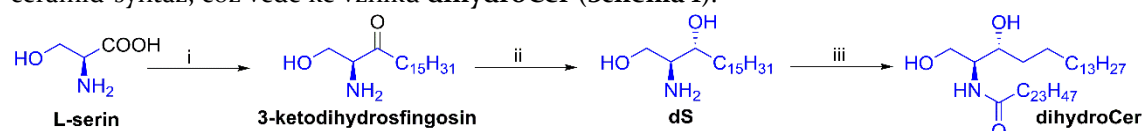


Schéma 1 – Biosyntéza dihydroceramidů (dihydroCer). V prvním kroku reaguje L-serin s palmitoyl-koenzymem A za katalýzy serinpalmitoyl-CoA-transferázy (i). Kondenzační produkt, 3-ketodihydrosfingosin, je dále redukován 3-ketosfinganin-reduktázou (ii) na dihydrosfingosin (dS). Tento je pak acylován účinkem ceramid-syntázy (iii) na dihydroCer (na obrázku je zobrazen Cer NdS s acylem od kyseliny lignocerové; LIG, C24:0).

Acyl v molekulách (dihydro)Cer je po navázání na sfingoidní bázi ceramid-syntázou dále upravován. Řetězec je prodlužován jednou ze sedmi typů elongáz.^{18, 34} V případě α- a ω-hydroxylovaných acylů Cer se hydroxylace zúčastňuje řada hydroxyláz, včetně enantioselektivní (2'*R*)-hydroxylázy, která zavádí hydroxyl do polohy alfa. Navíc u Cer typu EO je kyselina linolová esterově vázaná na terminální hydroxyl acylového řetězce.³⁵

3.3.4. FYTOCERAMIDY A 6-HYDROXYCERAMIDY

Do molekul dihydroCer může být působením desaturázy 1 (Δ4-desaturáza)³⁶ zavedena *trans*-dvojná vazba, což vede k tvorbě sfingosinových Cer (S-Cer), tj. Cer odvozených od (2*S*,3*R*,4*E*)-**sfingosinu** (*D-erythro*-sfingosin; S). DihydroCer mohou být dále hydroxylovány desaturázou 2 (C4-hydroxyláza; **Schéma 2**) v poloze 4, což vede k tvorbě **fytoCer**. Tyto jsou tedy odvozené od hydroxylované sfingoidní báze (2*S*,3*S*,4*R*)-**fytosfingosinu** (*D-ribo*-fytosfingosin; P).¹¹

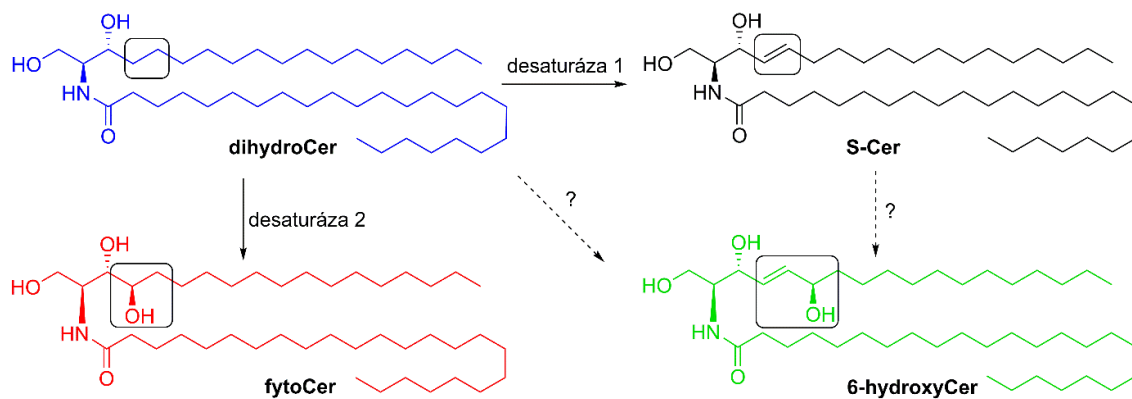
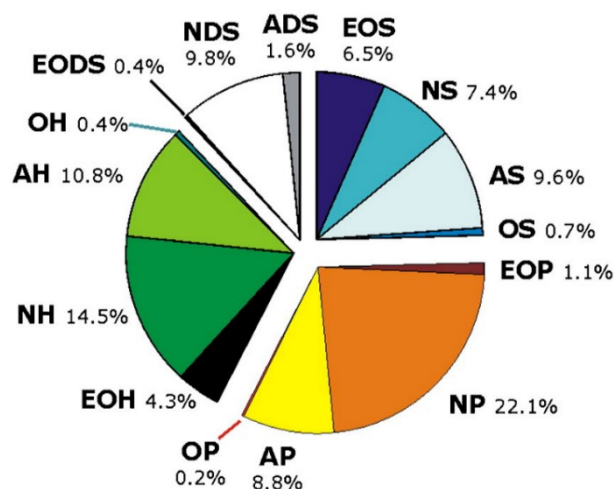


Schéma 2 – Biosyntéza hydroxylovaných ceramidů (Cer). Dihydroceramidy (dihydroCer) jsou desaturovány (desaturáza 1) za vzniku sfingosinových ceramidů s (4E)-dvojnou vazbou (S-Cer). Působením desaturázy 2 (C4-hydroxyláza) je na dihydroCer zaveden hydroxyl do polohy (4R)-, což vede ke vzniku fytoceramidů (fytoCer). Biosyntéza 6-hydroxyceramidů (6-hydroxyCer) není objasněna. Pravděpodobně dochází k hydroxylaci S-Cer doposud neobjevenou C6-hydroxylázou, která zavádí hydroxylovou skupinu do polohy (6R)-. Na obrázku jsou zobrazeny Cer Nds (modře), Cer NS (černě), Cer NP (červeně) a Cer NH (zeleně), všechny s acylem od kyseliny lignocerové (C24:0).

FytoCer³⁷⁻⁴⁰ byly poprvé nalezeny v rostlinné říši a říši hub (rod *Amanita*), z čehož pochází i označení této rodiny sfingolipidů (řec. *phytos*, rostlina).⁴¹⁻⁴² V lidském SC jsou fytoCer nejvíce zastoupeny v podobě Cer NP (22 %) a Cer AP (přibližně 9 %), v menší míře jako Cer OP a Cer EOP (Obrázek 5).⁴



Obrázek 5 – Procentuální zastoupení ceramidů (Cer) ve zdravé rohové vrstvě epidermis. Převzato z Breiden *et al.*⁴ Označení Cer je podle nomenklaturního systému dle Motty.²⁷

Fyziologická biosyntéza pro kůži jedinečných **6-hydroxyCer**, odvozených od (2S,3R,4E,6R)-6-hydroxysfingosinu (viz dále), není doposud známá. Pravděpodobně pomocí hydroxylázy (podobná desaturáze 2) dochází k hydroxylaci S-Cer v poloze 6, jelikož allylová poloha 6 je náchylná k oxidaci (Schéma 2).⁴³

Cer odvozené od 6-hydroxysfingosinu byly nalezeny pouze v epidermis; tyto se pravděpodobně nepodílí na buněčné signalizaci. Nejčastěji jsou ve zdravém SC zastoupeny v podobě volných Cer NH (přibližně 15 %) a Cer AH (přibližně 11 %) a také kovalentně vázaného Cer OH (0,4 %).⁴

Hydroxylace Cer, tj. zavedení další hydroxylové skupiny u fytoCer a 6-hydroxyCer, má pravděpodobně klíčové postavení mezi Cer SC, jelikož pokles jejich hladin byl zaznamenán u mnoha kožních onemocnění, jako jsou atopická dermatitida⁴⁴⁻⁴⁵ nebo psoriáza.^{27, 46} Navíc pokles hladin Cer NP se výrazně podepisuje na zvýšení ztráty vody kůží.⁴⁴

3.3.4.1. DEPOTNÍ FORMY CERAMIDŮ

Klíčovými molekulami v metabolismu Cer jsou S-Cer. Tyto Cer mohou být dále chemicky upravovány. Modifikace může vést k tvorbě glykosfingolipidů. Pro tyto je typická cukerná složka glykosidicky navázaná na hydroxylovou skupinu sfingoidní báze v poloze 1. Třídou glykosfingolipidů

nejčastěji tvoří **glukosylceramidy** (glukosylCer) s jednou nebo **gangliosidy** se dvěma či více molekulami cukru, kterým může být nejčastěji D-glukóza nebo D-galaktóza.⁴⁷

Mezi další modifikace molekul Cer patří také **sfinomyeliny** (SM), pro něž je typický aminoalkohol (fosforylcholin nebo fosforylethanolamin) navázaný na C-1-hydroxyl sfinoidní báze.⁴⁸⁻⁵⁰

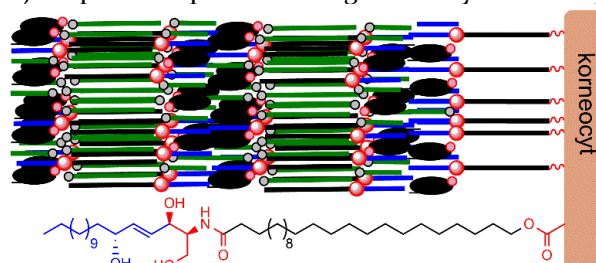
GlukosylCer a SM představují depotní formy Cer v kůži. V případě nedostatku volných Cer ve SC jsou depotní formy hydrolyzovány (glukosylCer β -glukocerebrozidázou a SM sfinomyelinázou⁵¹), čímž poskytují Cer pro tvorbu kožní bariéry. Zajímavé je, že na rozdíl od glukosylCer, které představují prekurzory pro všechny podtypy Cer, hydrolyzou SM jsou získávány pouze Cer NS a Cer AS.⁵²⁻⁵⁴

Depotní formy Cer vznikají v Golgiho aparátu kožní buňky ve spodních úsecích epidermis. Zde jsou vznikající glukosylCer a SM uskladňovány v tzv. **lamelárních (Odlandových) tělíscích** (angl. *lamellar bodies* nebo *Odland bodies*), v nichž jsou kromě prekurzorů Cer přítomny prekurzory dalších bariérových lipidů a řada hydrolytických enzymů, které umožňují uvolnění obsahu tělísek do mezibuněčných prostor. Toto uvolnění nastává splnutím lamelárních tělísek s plazmatickou membránou keratinocyту v místech, kde buňka dosáhne rozhraní zrnité a rohové vrstvy.^{13, 18}

Jak sfinoidní báze, tak Cer mohou být **fosforylovány** (zbytek kyseliny fosforečné je esterově vázán na hydroxylovou skupinu v poloze 1). Příslušný **sfinosin-1-fosfát** nebo **ceramid-1-fosfát** hrají roli zejména při migraci buněk a regulaci buněčného cyklu. Fosforylovaný S nebo Cer však mohou být použity i pro syntézu volných Cer. Nejdříve musí být sfinosin-1-fosfát příslušnou **fosfatázou** hydrolyzován, poté dochází k acylaci volného S, což vede ke vzniku Cer.⁵⁵⁻⁵⁷

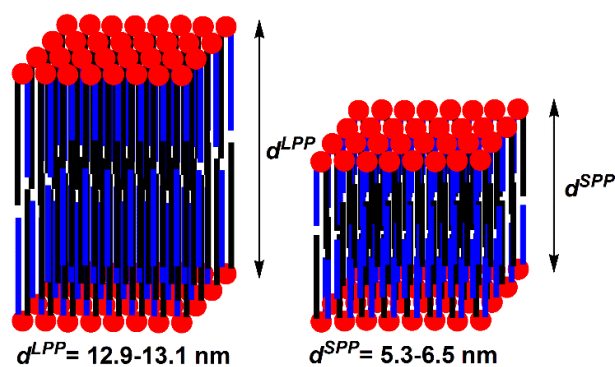
3.4. USPOŘÁDÁNÍ A ORGANIZACE KOŽNÍCH LIPIDŮ

Lipidy SC, na rozdíl od fosfolipidů v buněčných dvojvrstvách, tvoří mnohvrstevné lamelární systémy (**lamely**), které jsou ukotveny na povrchu korneocytů. Tohoto ukotvení se významně zúčastňují tzv. **kovalentně vázané Cer** (Cer vázané na proteiny). Tyto Cer, jejichž metabolickými prekurzory jsou ultradlouhé Cer typu EO, mají ω -hydroxyl (Cer typu O) esterově vázán na glutamátové zbytky bílkovin na povrchu korneocytů (nejčastěji involucrin a lorikrin). Kovalentně vázané Cer zřejmě slouží jako předloha pro tvorbu organizovaných lamel lipidů SC (**Obrázek 6**).



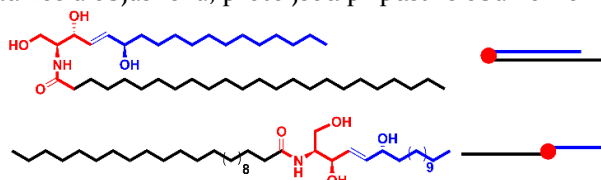
Obrázek 6 – Schématické znázornění kovalentně vázaných ceramidů (Cer). Acyl Cer vázaných na proteiny je substituován hydroxylem v poloze ω - a esterovou vazbou jsou na tento vázané povrchové bílkoviny kožních buněk (korneocytů; hnědě). Kovalentně vázané Cer slouží jako předloha ke správnému vytvoření lipidových lamel. Ve spodní části obrázku je zobrazen kovalentně vázaný Cer OH.

Lipidy SC (Cer, VMK a Chol) vytváří lamely o různých délkách mezirovinných (lamelárních) vzdáleností. Pro správnou funkci SC jako bariéry je nezbytná přítomnost tzv. **dlouhé lamelární fáze** (angl. *long periodicity phase*; LPP),^{22, 58-61} jejíž mezirovinná vzdálenost se pohybuje v rozmezí 11,9 – 13,1 nm. Tato fáze, pro jejíž vytvoření je zapotřebí ultradlouhých Cer (acylCer, Cer typu EO, např. Cer EOS), je pro udržení správné funkce SC jako bariéry zcela klíčová. V lamelách zdravého SC lze rovněž nalézt tzv. **krátkou lamelární fázi** (angl. *short periodicity phase*; SPP)⁶⁰⁻⁶⁵ s délkou lamel kolem 5,3 – 6,5 nm (**Obrázek 7**) a fázi separovaného Chol s mezirovinnou vzdáleností přibližně 3,4 nm.⁶⁶⁻⁶⁷



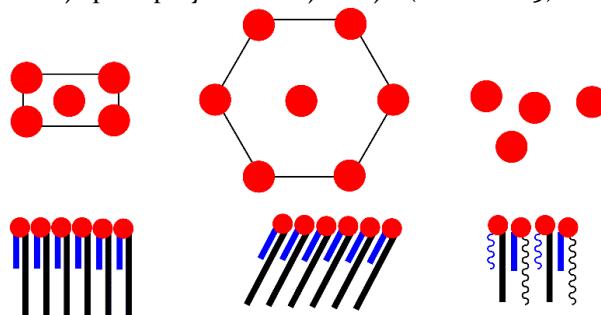
Obrázek 7 – Lamelární uspořádání lipidů *stratum corneum* (SC). Lipidy ve zdravém SC tvoří v lamelách tzv. dlouhou fázi (LPP) s mezirovinnou vzdáleností přibližně 13 nm a krátkou fázi (SPP) s délkou lamel přibližně 6 nm.

Řetězce molekul Cer mohou v lamelách SC zaujmout dvě možné konformace. První, tzv. **vláseňková (uzavřená) konformace**, se vyznačuje tím, že oba řetězce molekul Cer jsou orientovány vedle sebe (paralelně). Podstatou druhé, tzv. **otevřené konformace**, je uspořádání řetězců molekul Cer tak, že každý z nich směřuje do opačného směru (Obrázek 8). Konformace lipidů však není doposud zcela objasněna, proto jsou přípustné oba konformační stavy.^{5, 68-70}



Obrázek 8 – Dvě možné konformace ceramidů (Cer) v kožní lipidové bariéře. První, tzv. vláseňková konformace (angl. *hairpin conformation*; nahoře) je charakteristická tím, že oba řetězce jsou umístěny vedle sebe. Otevřená konformace (angl. *fully-extended* nebo *splayed-chain conformation*; dole) je typická protilehlou orientací obou řetězců molekuly Cer. Na obrázku jsou zobrazeny konformace Cer NH.

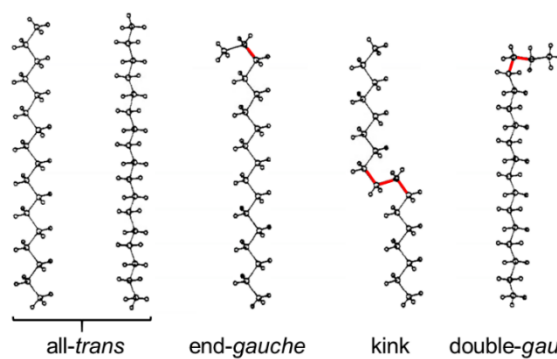
V lamelách zdravého SC mohou být lipidy organizovány v těsném, tzv. **ortorombickém**, uspořádání, pro které je typická tzv. *all-trans* konformace. Tato kosočtverečná mřížka brání volné rotaci jednotlivých řetězců a je pro lipidy ve SC nejčastější (Obrázek 9).



Obrázek 9 – Laterální uspořádání lipidů rohové vrstvy epidermis. Vlevo je zobrazena tzv. ortorombická (krystalická) fáze, uprostřed méně organizovaná hexagonální (gelová) a vpravo kapalná fáze řetězců lipidů, která je pravděpodobně zodpovědná za udržení elasticity kůže. Všechny tři typy uspořádání lze nalézt ve zdravé epidermis.

Lipidy SC však mohou být uspořádány i **hexagonálně**, tj. do šesterečné soustavy (gelová fáze; Obrázek 9), v níž je umožněna větší rotace a pohyb lipidů, což je dáno větším procentem méně uspořádaných *gauche* konformerů. Posledním a nejméně častým typem uspořádání lipidů SC je tzv. **kapalně-krystalická** fáze (Obrázek 9). Pro ni je typická tzv. *gauche* konformace, která se vyznačuje nepravidelným uspořádáním.^{5, 61, 71-76} Mezi více neuspořádané konformace lipidových

řetězců, které byly popsány u nasycených alkanů, patří tzv. *end-gauche*, kink nebo *double-gauche* konformace,⁷⁷ které jsou znázorněny na **Obrázku 10**.



Obrázek 10 – Konformace řetězců lipidů. Převzato z Maroncelli *et al.*⁷⁷ Vlevo je zobrazená tzv. *all-trans* konformace (nejvýhodnější, s nejnižší energií), směrem doprava jsou zobrazeny defektní konformace: *end-gauche*, kink (nebo také *gtg* konformace) a *double-gauche*. Na obrázku je znázorněn nasycený uhlovodíkový řetězec, jehož defektní konformační formy jsou zvýrazněny červeně.

4. STUDIUM KOŽNÍ BARIÉRY – METODY HODNOCENÍ LIPIDŮ ROHOVÉ VRSTVY

4.1. MODELÝ KOŽNÍ BARIÉRY

Častým způsobem hodnocení kožní bariéry, zejména mezibuněčných prostor SC, je studium **modelových systémů**. Nejbližším a nejvěrohodnějším modelem je **izolovaná lidská kožní tkáň** či kůže z modelových zvířat, nejčastěji prasete domácího (*Sus scrofa*),⁷⁸⁻⁸⁰ známé jsou rovněž tkáňové modely kůže *in vitro*.⁸¹⁻⁸²

Kromě izolovaných či kultivovaných kožních tkání lze k hodnocení kožní bariéry použít i jednodušší modely. Starší práce popisují první modely kožní bariéry jako směs extrahovaných lipidů SC včetně extrahovaných kožních buněk (korneocytů).⁸³⁻⁸⁴ Navíc existují i práce, ve kterých jsou modely SC připraveny ze směsi komerčně dostupných Cer.^{64, 75, 85-86} Snížením počtů složek v modelu (**modelové membráně**), v krajním případě až použitím jen jednoho typu Cer místo ceramidové frakce izolované ze SC, lze studovat chování daného lipidu v modelu.⁸⁷⁻⁹⁰

4.1.1. MIKROSTRUKTURA MODELOVÝCH MEMBRÁN

Vnitřní stavba SC, kterou Elias přirovnal k modelu „cihel“ představujících korneocyty a „malty“ reprezentující mezibuněčnou lipidovou matrix,¹⁶ není doposud objasněna. Právě proto je studiu složení a uspořádání lipidů v mezibuněčných prostorech SC věnována velká pozornost. Mezi často využívané zobrazovací techniky modelů kožní bariéry patří např. **fluorescenční mikroskopie**. Je to velmi citlivá zobrazovací technika, která však vyžaduje přítomnost fluorescenčně značené látky (lipidu) ve studovaném vzorku (membráně).⁹¹⁻⁹² Limitem této techniky je povaha (lipofilita a velikost) samotného fluoroforu, který může do značné míry (negativně) ovlivnit uspořádání lipidů SC.

Atomová silová mikroskopie je metoda, kterou lze zkoumat povrch (morfologii) modelové membrány. Je založena na měření silových interakcí mezi povrchem vzorku (membránou) a sondou, která je v její těsné blízkosti. Sondou se v tomto případě rozumí ostrý vodivý hrot, jehož pohybem podél vzorku lze povrch vzorku skenovat.⁹³⁻⁹⁴

Studium modelových membrán **polarizační mikroskopii**⁹⁴ bylo nahrazeno **mikroskopii elektronovou**. Tato má daleko větší rozlišovací schopnost než optická mikroskopie, protože vzorek je ozařován proudem elektronů, nikoli fotonů. Lze tak dosáhnout zvětšení, jímž lze pozorovat uspořádání lipidů SC do orientovaných dvojrůstev, tvořených polárními oblastmi s vyšší a alkylovými řetězci s nižší elektronovou hustotou.⁹⁵⁻⁹⁷

Pomocí **diferenciální skenovací kalorimetrie** lze charakterizovat **teplotní vlastnosti lipidů v membránách**.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Touto technikou lze pozorovat fázové chování lipidů měřením teploty skleného přechodu (teplota, při níž se lipid stává elastičtější a pružnější), teploty krystalizace nebo teploty tání.^{76, 88, 94, 101}

Podmínkou hodnocení modelových membrán **²H nukleární magnetickou rezonancí v pevné fázi** je přítomnost alespoň jedné ze složek s deuterovaným řetězcem. Jedná se o výkonnou techniku, jejíž pomocí lze charakterizovat strukturu, dynamiku a fázové stavy (krystalická/gelová, kapalná nebo izotropní fáze) lipidů ve vzorcích.^{76, 101-107}

K dalším velmi často používaným technikám charakterizace laterálního uspořádání patří **infračervená a Ramanova spektroskopie**.^{74, 108-111} V případě hodnocení lamelárního uspořádání lipidů SC se často využívá difrakčních metod, jako jsou **rentgenová** nebo **neutronová difrakční analýza**.^{61-62, 112-114} Jelikož jsou infračervená spektroskopie a prášková rentgenová difrakce metody, jimiž byly hodnoceny modelové membrány SC v této disertační práci, jsou zmíněným technikám věnovány samostatné kapitoly.

4.1.1.1. INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE

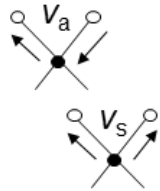
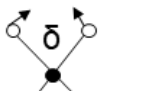
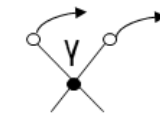
Infračervená (angl. *infrared*; IR) spektroskopie je rychlá a nedestruktivní analytická metoda, která je využívána v hodnocení chování a uspořádání lipidů SC.^{73, 109, 115} Podstatou IR spektroskopie je pohlcení (**absorpce**) monochromatického elektromagnetického záření (fotonů), konkrétně infračerveného světla nejčastěji od $2,5 \times 10^{-6}$ do $2,5 \times 10^{-5}$ m, tzn. ve střední IR oblasti, molekulou. To má za následek **změnu vibračně-rotálních pohybů** (energetických stavů) molekuly v závislosti na

změnách dipólového momentu této molekuly. Dochází tedy ke zvětšení amplitudy vibrace a zrychlení rotace molekuly.¹¹⁶

V biofyzice SL je často využívána infračervená spektroskopie **zeslabeného úplného odrazu** (angl. *attenuated total reflectance*; ATR) s aplikací matematické metody **Fourierovy transformace**, která umožňuje transformaci spektra z časové domény do domény frekvenční (angl. *Fourier transformation infrared spectroscopy*; FTIR). ATR-FTIR je biofyzikální metoda, při níž paprsek IR světla dopadá pod určitým úhlem do speciálně upraveného hranolu (např. krystalu germania) a při dopadu dochází k úplnému odrazu paprsku.¹¹⁶⁻¹¹⁷

Výsledkem měření IR spektroskopie je **spektrum** (vibrační pás), což je graficky vyjádřená závislost energie na **vlnočtu** v jako převrácené hodnoty vlnové délky [cm^{-1}]. Nejčastěji je energie IR záření vyjadřována propustností (**transmitancí**) T [%] nebo **absorbancí** A , tedy záporným dekadickým logaritmem hodnoty transmitance.¹¹⁶⁻¹¹⁷

V IR spektru můžeme sledovat několik typů vibrací. **Valenční vibrace** jsou způsobeny změnami délky vazeb atomů.¹¹⁸ Druhý typ vibrací (**deformační vibrace**) je způsoben změnami vazebných úhlů mezi atomy. Frekvence valenčních vibrací jsou vždy vyšší než frekvence vibrací deformačních, jelikož na natažení vazby mezi atomy je potřeba více energie než na její ohnutí. Proto valenční vibrace nacházíme v levé části IR spektra, tedy oblasti vyšších frekvencí, resp. vlnočtů. Mezi nejčastěji studované valenční vibrace patří methylenová vibrace asymetrická (ν_a) a symetrická (ν_s), z nichž lze zjistit konformaci lipidových řetězců v modelových membránách. Nejčastěji hodnocené vibrace vypovídající o laterálním uspořádání lipidů jsou **rovinná deformační CH_2 nůžková** (angl. *scissoring*; δ) a **deformační kývavá vibrace** (angl. *rocking*; γ). Přehled vybraných vibrací ve studiu SL (včetně vibrací v polární oblasti) je uvedený v **Tabulce 2**.

	vibrace	vlnočet [cm^{-1}]	charakteristika
	asymetrická (ν_a)	2920–2915 2194–2198 ^a	konformace řetězců ^b
	symetrická (ν_s)	2848–2854 2087–2090 ^a	
	karboxyl	1710–1690	podílení se na tvorbě H-vazeb ^c
	amid I	1690–1610	
	amid II	1560–1510	
	nůžková (δ)	1462–1472 1094–1084 ^a	uspořádání řetězců do krystalické mřížky ^d
	kývavá (γ)	730–718	

Tabulka 2 – Charakteristické vibrace v infračervené (IR) spektroskopii sfingolipidů (SL). Vlnočty valenčních CH_2 (modře) a deformačních CH_2 vibrací (zeleně). ^aU vybraných typů vibrací je uveden vlnočet pro CD_2 vibrace (deuterované řetězce).^{108, 110} ^bAsymetrická a symetrická CH_2/CD_2 vibrace charakterizují konformaci molekul; pokud jsou hodnoty vlnočtů u symetrické CH_2 vibrace nižší než 2850 cm^{-1} , jsou řetězce uspořádány v *all-trans* konformaci.^{108, 110} Se vzrůstající hodnotou vlnočtu se zvyšuje i podíl méně uspořádaných, tzv. *gauche*-konformerů.^{74, 98, 119} ^cV polární oblasti (hnědě) lze pozorovat působení vodíkových můstků mezi lipidy v modelových membránách. Vibrace karboxylu v nižších oblastech vlnočtů představuje zapojení karboxylové skupiny volných mastných kyselin (VMK) do vodíkových vazeb.^{109, 120-121} Tento fakt může být rovněž pozorován u vibrace známé pod pojmem amid I, která je výsledkem valenční vibrace karbonylové funkční skupiny.^{110, 120-121} Zvýšení hodnot vlnočtů u karboxylové a amidové vibrace I značí oslabení mezimolekulárních vodíkových přitažlivých sil. V případě nárůstu vlnočtů u vibrace, která je výsledkem valenčních C-H a deformačních N-H vibrací (amid II) je tomu naopak.^{110, 115, 122-123} ^dZ deformační nůžkové nebo kývavé CH_2/CD_2 vibrace lze zjistit laterální uspořádání lipidů do krystalové mřížky.^{69, 110} Pokud je v oblastech těchto vibrací nalezen dublet jako výsledek spřažení vibrací sousedících řetězců daného izotopu (např. u nůžkové vibrace 1462 a 1472 cm^{-1}),¹⁰⁸ tento vypovídá o těsném (ortorombickém) uspořádání. Pokud je však ve spektru nalezen pouze singlet (v případě nůžkové vibrace kolem 1468 cm^{-1}), lipidy jsou ve volnějším (hexagonálním) uspořádání.^{69, 108, 110, 124-126}

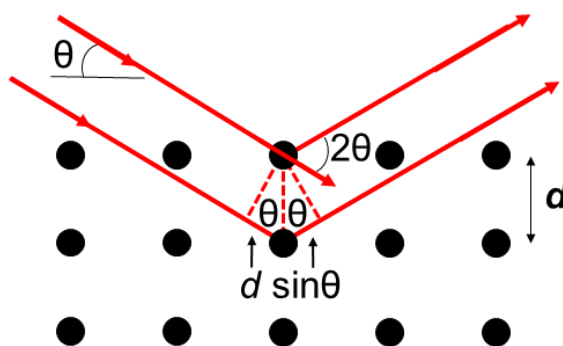
Ve studiu SL je často využívána **izotopová substituce**, tj. atomy vodíku jsou v molekule nahrazeny jejich těžšími izotopy. Izotopy atomů (např. deuterium, ^2H), se kterými lze pracovat bez jakýchkoliv bezpečnostních opatření, mají přibližně stejné silové pole, ale hodnoty vlnočtů

vibračních pásů jsou rozdílné (Tabulka 2). V případě použití lipidové směsi s částečnou nebo úplnou náhradou vodíku za deuterium v jedné ze složek směsi je možné sledovat chování vodíkových řetězců (C-H vibrace) nezávisle na chování řetězců deuterovaných (C-D vibrace).¹⁰⁸

4.1.1.2. RENTGENOVÁ DIFRAKCE

Podstatou (práškové) rentgenové difrakce (angl. *X-ray powder diffraction*; XRPD) je **ohyb (difrakce)** paprsku rentgenového záření (z oblasti $0,1 \times 10^{-10}$ m až do 100×10^{-10} m) po jeho dopadu na vzorek (lipidy modelové membrány uspořádané do souvislých vrstev). Lipidy tohoto vzorku se samy stávají zdrojem záření se stejnou vlnovou délkou λ [nm] a produkují paprsky, které vzájemně interferují a vytváří tak difraktované záření, jehož směr je odlišný od směru záření dopadajícího na vzorek.¹²⁷

V případě, že paprsek rentgenového záření dopadá na rovnoběžné (v membráně se pravidelně opakující) strukturální roviny lipidů pod úhlem θ [°], dochází k difrakci záření. **Difraktované paprsky zesílí v maximum pouze v případě, že je jejich dráhový rozdíl roven vlnové délce [nm] nebo jejímu celočíselnému násobku.** Pokud při dopadu svazku paprsků na vzorek je určitá strukturální rovina v takové orientaci, že je splněna **Braggova rovnice** (viz dále; Obrázek 11), dochází ke konstruktivní interferenci difraktovaného záření (paprsky se skládají a sílí) a toto je pak detektorem zaznamenáno. Výše popsany děj charakterizuje rovnice **$n\lambda = 2d \sin \theta$ (Braggův zákon)**, ve které je n kladný celočíselný násobek (**řád difrakce**) vlnové délky λ použitého záření, θ je Braggův úhel dopadu na strukturální roviny lipidů a d [nm] je **mezirovinná vzdálenost** (angl. *repeat distance*), jejíž pomocí lze určit **délku lamel lipidů** (lamelární fáze) v modelové membráně.⁸⁹



Obrázek 11 – Schématické znázornění Braggovy rovnice. Paprsek rentgenového záření (červeně) dopadá na periodicky se opakující strukturální roviny vzorku (lipidů v modelové membráně; černé body) pod úhlem θ [°], ohýbá se (nastává difrakce), konstruktivně interferuje s dalšími paprsky, které dopadají na detektor. Rozpětí d mezi strukturálními rovinami je tzv. mezirovinná vzdálenost [nm], jejíž pomocí lze charakterizovat délku lipidových lamel v membráně.

Výsledkem měření XRPD je difrakční záznam (**difraktogram**), v němž jsou na ose x vidět difrakční píky (**reflexe**) při určitých hodnotách **difrakčního úhlu 2θ** [°] a na ose y je poté intenzita reflexí. V levé části difraktogramu se nachází tzv. **oblast malých úhlů** (angl. *small-angle region*), v jeho pravé části je **oblast širokých úhlů** (angl. *wide-angle region*), z níž lze zjistit **laterální uspořádání** řetězců lipidů ve studované modelové membráně.¹²⁸⁻¹³¹

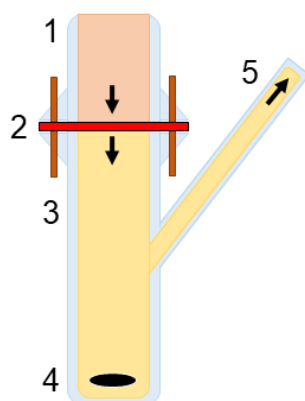
Na podobném principu jako XRPD pracuje **neutronová difrakční analýza**, s tím rozdílem, že použité neutrony, kterými je vzorek ostřelován, mají nižší absorpci. Proto je nutné použít větší množství vzorku. Samotné měření také vyžaduje zdroj neutronového záření (atomový reaktor).¹³² Výhodou neutronové difrakce je **rozlišení izotopů lehkých prvků**, proto lze použitím deuterovaných lipidů studovat uspořádání protonovaných a deuterovaných řetězců v modelových membránách SC.^{22, 65}

4.1.2. PERMEABILITA MODELOVÝCH MEMBRÁN

V biofyzice SL je neméně důležitou charakteristikou modelových systémů SC jejich **permeabilita** (propustnost). Existuje řada modelů, na kterých byla zkoumána permeabilita pro látky s nejrůznější velikostí molekuly, lipofilitou apod. Velká řada studií hodnotila permeabilitu modelů kožní bariéry

s prasečími SL nebo lipidy izolovanými ze SC či nervové tkáně.^{83, 133-139} Práce, v níž byly modelové membrány SC zhotoveny z komerčních Cer využívaných v kosmetice ve složení podobném složení zdravého SC, je zaměřena na měření permeability membrán pro kyselinu *p*-aminobenzoovou a její deriváty ve srovnání s izolovaným SC ze zdravého jedince.⁷⁵

Řada novějších prací hodnotí permeabilitu modelových membrán pro menší látky s vyváženou hydrofilně-lipofilní konstantou (nejčastěji využívanou modelovou látkou je theofylin; TH). Pro charakterizaci propustnosti modelových membrán pro větší molekuly s výrazněji vyšší hodnou lipofility se používá indometacin (IND).^{87-90, 140-141} Modelové membrány, na nichž jsou prováděny permeační experimenty, jsou umístěné ve **Franzových difuzních celách (Obrázek 12)**. Franzovou celu lze popsat jako skleněnou nádobku s donorovou částí, do které se vkládá látka, pro niž je permeabilita hodnocena (např. 2% suspenze IND v 60% propylenglykolu).⁸⁹ V části akceptorové je kapalina (nejčastěji pufr o definovaném pH), do které studovaná látka prostupuje přes membránu. Mezi donorovou a akceptorovou částí celý, která je temperována na fyziologickou teplotu 32 °C, je držák, v němž je uchycena modelová membrána SC.^{75, 88}



Obrázek 12 – Schématické znázornění Franzovy difuzní cely. Skleněná nádobka se skládá z donorové (1, oranžově) a akceptorové části (3, žlutě), mezi nimiž je studovaná membrána (2, červeně). Z akceptorové části, v níž se nachází pufr s magnetickým míchadlem (4, černě), vychází raménko (5) sloužící k odběru studovaného permeantu, který prošel membránou. Směr průchodu permeantu znázorňují černé šipky.

Dalším často využívaným parametrem permeability modelových membrán je **měření ztráty vody**. V dermatologii je tato technika známá pod pojmem transepidermální ztráta vody (angl. *transepidermal water loss*), v případě modelových membrán SC je však výstižnější termín **transmembránová ztráta vody**. Metoda, jíž se hodnotí množství vodní páry, která prostupuje bariérou (membránou), vztahené na jednotku plochy membrány v čase, je často využívanou v *in vitro*¹⁴²⁻¹⁴⁵ a *in vivo* studiích.⁴⁶

5. SOUHRNNÉ KOMENTÁŘE PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

5.1. C-4 HYDROXYLACE CERAMIDŮ MÁ NEGATIVNÍ VLIV NA PERMEABILITU A LAMELÁRNÍ USPOŘÁDÁNÍ LIPIDŮ MODELOVÝCH MEMBRÁN (JEDNODUCHÝ MODEL)

Původní práce

Školová B, **Kováčik A**, Tesař O, Opálka L, Vávrová K. Phytosphingosine, Sphingosine and Dihydrosphingosine Ceramides in Model Skin Lipid Membranes: Permeability and Biophysics. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*. 2017, 1859(5): 824-834 (IF₂₀₁₆ = 3,498; Příloha 1).

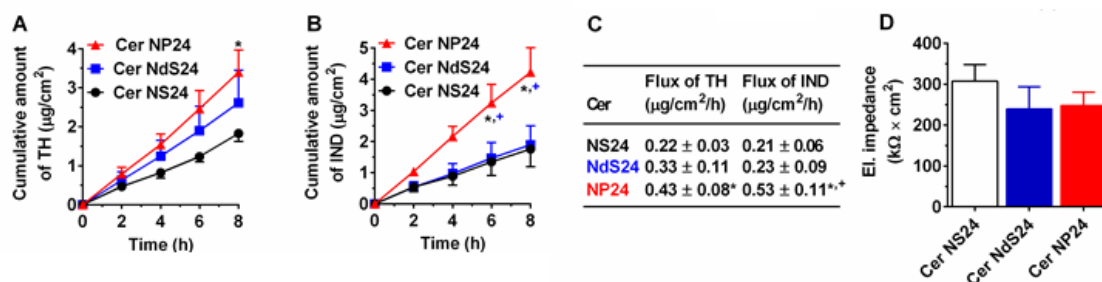
Komentář

Cer odvozené od **fytofingosinu** (4-hydroxysfinganinu; P), které byly poprvé objeveny v rostlinné říši, lze nalézt i v lidské kůži. FytoCeramidy (fytoCer) tvoří přibližně třetinu volných Cer vyskytujících se ve zdravém SC. Přítomnost této rodiny Cer je zcela esenciální pro správnou bariérovou funkci kůže. Snížení jejich hladin bylo pozorováno u některých kožních onemocnění, jako jsou **atopická dermatitida** (atopický ekzém)⁴⁴⁻⁴⁵ nebo **psoriáza**.²⁷

Existuje řada studií, které se zabývaly fázovým chováním, konformací řetězců nebo mísitelností fytoCer s ostatními lipidy v modelových membránách.^{70, 94, 110, 120, 123, 146-148} Avšak není známá studie, která by hodnotila vliv fytoCer na membránovou permeabilitu. Proto bylo **cílem této práce studovat vliv C-4 hydroxylace u fytoCer na permeabilitu a mikrostrukturu modelových membrán**. Dílčím cílem této práce bylo **srovnání permeability a mikrostruktury modelových membrán obsahujících fytoCer s modelovými membránami na bázi (dihydro)Cer**. Byly připraveny modelové membrány obsahující příslušný Cer (Cer NP, Cer NS nebo Cer NdS s acylem odvozeným od LIG; C₂₄:0), LIG a Chol v ekvimolárním množství s přidavkem CholS (5 hmotnostních %). Celkově byly připraveny tři typy modelových membrán, které se lišily pouze v Cer složce, díky čemuž bylo možné srovnávat vliv dvojnásobné vazby a/nebo hydroxylace v poloze 4 sfingoidních bází molekul Cer.

Modelové lipidové membrány, které lze chápat jako tenké lipidové filmy o tloušťce přibližně 11 μm, byly připraveny nastříknutím roztoků výše zmíněných lipidů na polykarbonátový filtr pod proudem inertního plynu, následným zahřátím těchto filmů zbařených organických rozpouštědel nad teplotu hlavního fázového přechodu a pomalým zchlazením k docílení tvorby lamelárního uspořádání.^{88-89, 141, 149}

U modelových membrán byla hodnocena propustnost pro různé typy látek (permeantů). První látkou bylo modelové léčivo **theofylin** (TH; **Obrázek 13A, C**), které simuluje průchod látek **s vyváženou lipofilitou** ($\log P = 0$) a s relativně **malou hmotností** ($M_w = 180,2$ g/mol). Z permeačních profilů, tj. závislosti korigované koncentrace TH na čase a směrnici těchto závislostí (toků; angl. *flux*), lze konstatovat, že modelové membrány ve složení Cer NP/LIG/Chol/CholS byly téměř dvakrát propustnější pro TH než kontrolní membrány (Cer NS/LIG/Chol/CholS) a o třetinu více propustné než membrány odvozené od dihydroCer (Cer NdS/LIG/Chol/CholS). Podobné závěry lze pozorovat u permeačního profilu pro **indometacin** (IND), což je druhé modelové léčivo představující látku o **větší hmotnosti** ($M_w = 357,8$ g/mol) a **větší lipofilitě** ($\log P = 4,3$; **Obrázek 13B, C**).

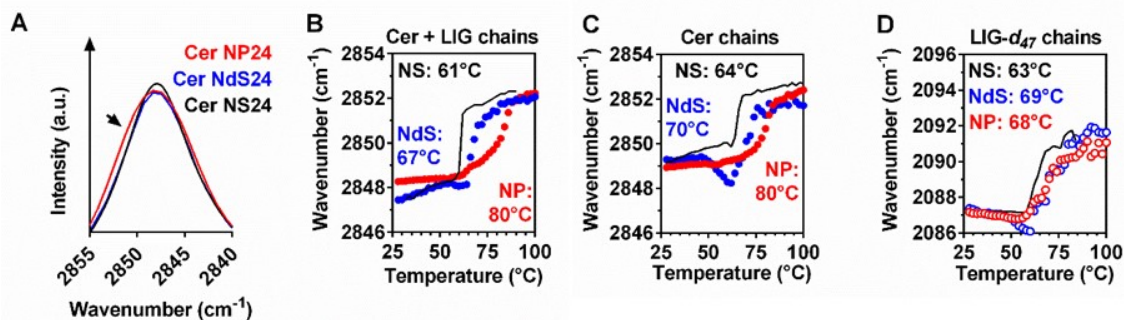


Obrázek 13 – Vliv C-4 hydroxylace ceramidů (Cer) na bariérové vlastnosti modelových membrán. Převzato z Školová *et al.*¹⁵⁰ Srovnání parametrů permeability modelových membrán SC obsahujících Cer NS (Cer NS24; černě) nebo Cer NdS (Cer NdS24; modře) nebo Cer NP (Cer NP24; červeně) s acylem odvozeným od kyseliny lignocerové (C24:0), kyselinu lignocerovou, cholesterol a cholesterol-sulfát. Graf A znázorňuje permeační profil pro theofylin (TH), graf B permeační profil pro indometacin (IND). Hodnoty toků (fluxů) modelových léčiv jsou uvedeny v panelu C. Graf D zobrazuje propustnost modelových membrán SC pro ionty (elektrická impedance). Data jsou prezentována jako průměry hodnot ± standardní chyba průměru, $n = 9-12$; * značí statisticky významný rozdíl oproti membránám odvozeným od Cer NS ($p < 0,05$) a † značí statisticky významný rozdíl oproti membránám odvozeným od Cer NdS ($p < 0,05$).

Dalším parametrem permeability studovaným u modelových membrán byla **elektrická impedance**. Nejvyšší hodnota odporu dané modelové membrány vůči průchodu střídavého proudu byla pozorována u kontrolních membrán odvozených od Cer NS. Nepřítomnost *trans*-dvojně vazby (Cer NdS) nebo hydroxylace v poloze 4 (Cer NP) vedla ke snížení hodnot elektrické impedance modelových membrán, avšak bez statisticky významných rozdílů vzhledem ke kontrole (**Obrázek 13D**). Z permeačních pokusů lze tedy pozorovat stejný trend: hydroxylace v poloze 4 u fytoCer (Cer NP) v námi použitém modelu jednoznačně vede ke zhoršení bariérových vlastností membrán SC.

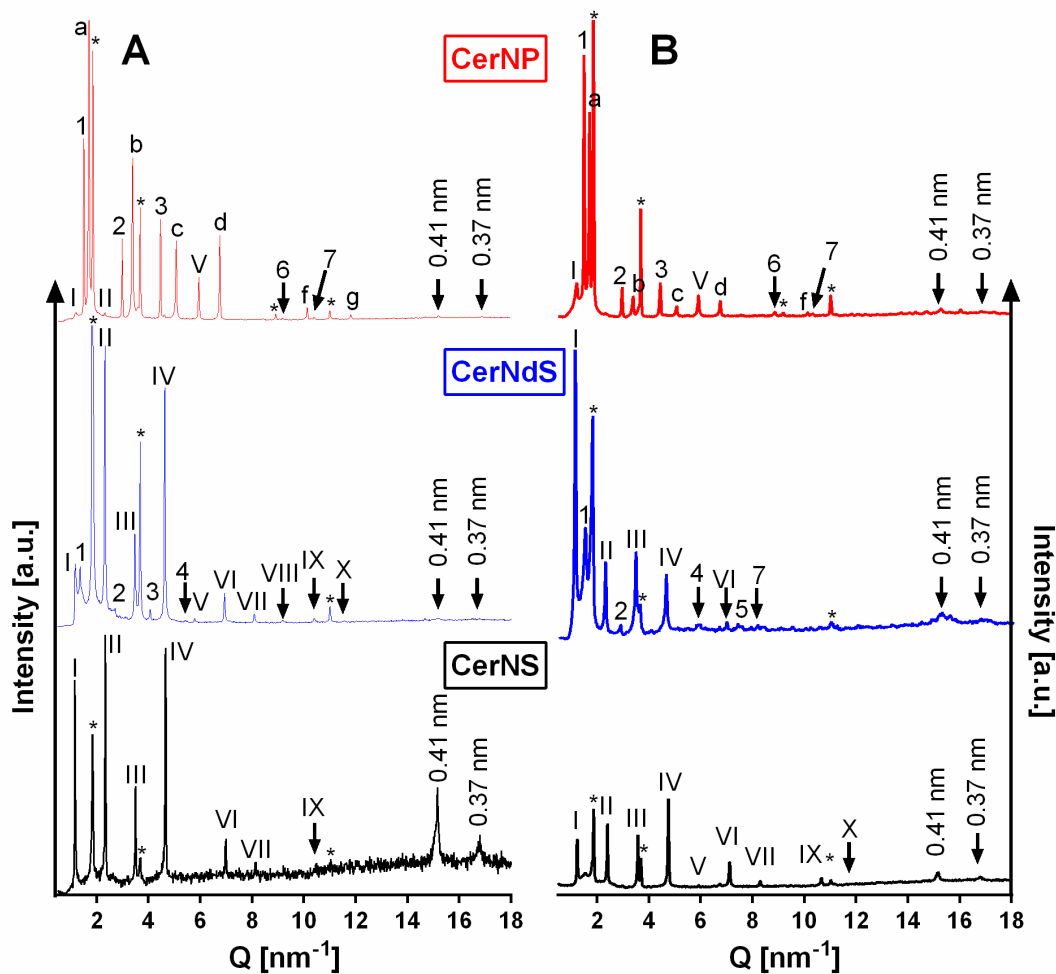
Kromě permeability modelových membrán obsahujících fytoCer byla hodnocena i jejich mikrostruktura, tj. **konformace řetězců, fázové chování, mísitelnost Cer řetězců s ostatními lipidy v modelu, laterální a lamelární uspořádání lipidů**. K hodnocení fázového chování byla použita termotropní IR spektroskopie (ATR-FTIR). Jednou z významných vibrací, jejichž pomocí byly lipidy SC v této práci studovány, jsou symetrické valenční methylenové vibrace. Z hodnot vlnočtů symetrických valenčních vibrací lze zjistit konformaci řetězců lipidů v modelových membránách SC. Posun CH_2 valenčních vibrací k vyšším hodnotám vlnočtů ($\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$) vypovídá o horším uspořádání studovaného řetězce ve směsi. Všechny studované modelové membrány SC mají lipidy uspořádány převážně v tzv. *all-trans* konformaci. Nicméně v případě modelové membrány ve složení Cer NP/LIG/Chol/CholS dochází k vzestupu vlnočtů symetrické CH_2 valenční vibrace, tj. nárůstu méně uspořádaných *gauche* konformerů (**Obrázek 14A, B**). **Teplota fázového přechodu** u membrán obsahujících Cer NP je však mnohem vyšší ($80 \text{ }^\circ\text{C}$) než v případě fázových teplot u Cer NdS- ($67 \text{ }^\circ\text{C}$) nebo Cer NS-membrán ($61 \text{ }^\circ\text{C}$). Tento fakt je dán přítomností kohezivních sil, které narůstají díky hydroxylaci v poloze 4 u modelových membrán obsahujících fytoCer.

Nahrazením nezačleněné LIG v modelových lipidových membránách (směsích) **deuterovanou LIG** (*d*-LIG) pak bylo možné v dané modelové membráně sledovat chování jak CH_2 řetězců (vyskytujících se převážně v Cer), tak CD_2 řetězců *d*-LIG, jelikož C-D vibrace jsou posunuty do oblastí nižších vlnočtů ($2086-2096 \text{ cm}^{-1}$) než v případě C-H vibrací (vlnočty $2846-2854 \text{ cm}^{-1}$). Použitím této izotopové substituce lze vyvodit několik závěrů. Při fyziologické teplotě jsou řetězce molekul Cer (**Obrázek 14C**) a řetězce *d*-LIG relativně dobře uspořádány, což plyne z hodnot nízkých vlnočtů symetrických CH_2 (CD_2) vibrací. Dále, hodnoty teplot fázových přechodů CH_2 (**Obrázek 14C**) a CD_2 (**Obrázek 14D**) vibrací u membrán obsahujících Cer NS a Cer NdS jsou relativně podobné, což naznačuje jejich dobrou mísitelnost. Avšak v případě modelových Cer NP-membrán je teplota fázového přechodu *d*-LIG snížena o $12 \text{ }^\circ\text{C}$, tj. na $68 \text{ }^\circ\text{C}$, ve srovnání s teplotou fázového přechodu řetězců Cer NP ($80 \text{ }^\circ\text{C}$). Tato skutečnost poukazuje na **fázovou separaci** Cer NP a *d*-LIG v modelové membráně.



Obrázek 14 – Vliv C-4 hydroxylace ceramidů (Cer) na fázové chování lipidů modelových membrán. Převzato z Školová *et al.*¹⁵⁰ Konformace řetězců a fázové přechody lipidů v modelových membránách obsahujících Cer NS (Cer NS24; černě) nebo Cer NdS (Cer NdS24; modře) nebo Cer NP (Cer NP24; červeně) s acylem odvozeným od kyseliny lignocerové (LIG; C24:0), (deuterovanou) kyselinu lignocerovou ((*d*)-LIG), cholesterol a cholesterol-sulfát. Panel A zobrazuje ATR-FTIR spektra symetrických valenčních vibrací při fyziologické teplotě (32 °C), panely B-D představují vývoj symetrických vibrací v závislosti na vzrůstající teplotě (25–100 °C). Pro studium chování řetězců lipidů byly použity neznačené lipidové směsi (vlnočty 2846–2854 cm⁻¹; panel B) nebo směsi, kde místo LIG byla použita *d*-LIG (LIG-*d*₄₇), čímž bylo možné pozorovat chování neznačených (panel C) a deuterovaných řetězců v modelové membráně SC (vlnočty 2086–2896 cm⁻¹; panel D). V jednotlivých grafech jsou rovněž uvedeny i teploty fázových přechodů.

Pomocí XRPD bylo možné studovat lamelární uspořádání lipidů v modelových membránách SC. Ve všech studovaných modelech byla přítomna fáze separovaného Chol s délkou mezirovinné vzdálenosti $d = 3,41 - 3,42$ nm. U modelových membrán ve složení Cer NS/LIG/Chol/CholS byla kromě fáze separovaného Chol přítomna *La* fáze s periodicitou 5,39 nm. Tato odpovídá lamelární fázi s krátkou periodicitou, tj. 5,3 – 5,6 nm.⁶¹⁻⁶² V případě, že v molekule Cer chybí dvojná vazba, dochází u modelových membrán obsahujících Cer NdS k fázové separaci. Kromě separovaného Chol⁶⁵ a *La* fáze s periodicitou 5,35 – 5,38 nm byla v modelu přítomna i *Lb* fáze s periodicitou 4,20 – 4,23 nm. Konečně v difraktogramech modelových membrán obsahujících fytoCer (Cer NP) byly nalezeny celkem čtyři samostatné lamelární struktury (fáze): separovaný Chol, *La* fáze ($d = 5,24 - 5,30$ nm) a další dvě fáze s periodicitami 4,23 – 4,25 nm (*Lb* fáze) a 3,71 – 3,72 nm (*Lc* fáze; **Obrázek 15**).



Obrázek 15 – Vliv C-4 hydroxylace ceramidů (Cer) na lamelární uspořádání lipidů modelových membrán. Převzato z Školová *et al.*¹⁵⁰ Práškové difraktogramy (XRPD) modelových membrán obsahujících Cer NS (černě) nebo Cer Nds (modře) nebo Cer NP (červeně) s acylem odvozeným od kyseliny lignocerové (C24:0), kyselinu lignocerovou, cholesterol a cholesterol-sulfát při 30% (panel A) a 100% hydrataci (panel B). Římské číslice označují reflexe *La* fáze, arabské číslice patří *Lb* fázi a písmena *Lc* fázi; * označuje reflexe separovaného cholesterolu. Úplná hydratace modelových membrán (panel B) nemá na lamelární uspořádání lipidů (až na změny relativních intenzit) zásadní vliv. Q [nm^{-1}] je vektor rozptylu (angl. *scattering vector*), úměrný difraktovanému úhlu θ [°].

V pravé části každého difraktogramu (oblast širokých úhlů; $Q = 14\text{--}18 \text{ nm}^{-1}$; **Obrázek 15**) lze získat informaci o laterálním uspořádání řetězců v modelových membránách. Ve všech difraktogramech byly nalezeny dva píky (0,41 – 0,42 nm a 0,37 – 0,38 nm), které vypovídají o těsném ortorombickém uspořádání,¹³ což je v souladu s výsledky ATR-FTIR.¹⁵⁰

Permeační a biofyzikální experimenty lze shrnout do několika závěrů. Hydroxylace v poloze 4 u fytoCer jednoznačně vede k poklesu bariérových vlastností modelových membrán SC použitých v této práci. Membrány obsahující Cer NP jsou více propustné pro ionty a malé i větší lipofilnější molekuly ve srovnání s membránami obsahujícími Cer NS nebo Cer Nds. Z výsledků ATR-FTIR lze pozorovat fázovou separaci řetězců *d*-LIG od Cer NP. Navíc pomocí XRPD bylo zjištěno, že hydroxylace v poloze 4 v molekulách fytoCer ovlivňuje lamelární uspořádání lipidů v modelových membránách SC (**Tabulka 3**).

	Cer NS	Cer NdS	Cer NP
rezistence vůči prostupu iontů	✓	×	×
bariéra pro malé polární látky	✓	✓	×
bariéra pro velké lipofilní látky	✓	✓	×
orthorhombické uspořádání řetězců	✓	✓	✓
tvorba fáze s krátkou periodicitou	✓	✓	✓
tvorba dalších fází	×	<i>Lb (d = 4.2 nm)</i>	<i>Lb (d = 4.2 nm) Lc (d = 3.7 nm)</i>

Tabulka 3 - Srovnání propustnosti (permeability) a mikrostruktury modelových membrán (jednoduchý model).⁵⁰ Membrány obsahující Cer NS (černé) nebo Cer NdS (modře) nebo Cer NP (červeně), kyselinu lignocerovou, cholesterol a cholesterol-sulfát. První tři parametry charakterizují propustnost membrán pro ionty, malé polární (theofylin) a větší lipofilní látky (indometacin). Další tři charakteristiky srovnávají mikrostrukturu modelových membrán, tj. laterální a lamelární uspořádání.

5.2. 6-HYDROXYCERAMIDY – OD SYNTÉZY K MODELOVÝM MEMBRÁNÁM

5.2.1. 6-HYDROXYCERAMIDY JAKO RELATIVNĚ NOVÁ SKUPINA SFINGOLIPIDŮ

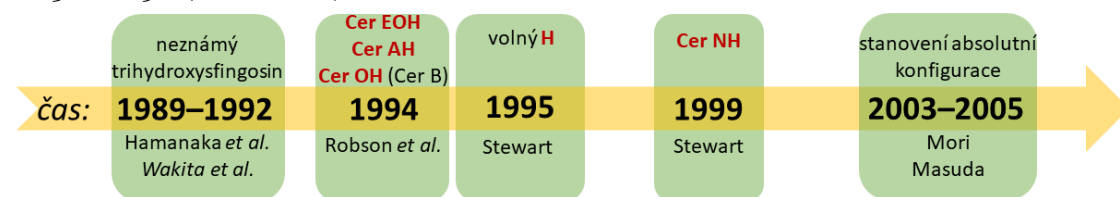
Rešeršní práce

❖ **Kováčik A**, Roh J, Vávrová K. The Chemistry and Biology of 6-Hydroxyceramide, the Youngest Member of the Human Sphingolipid Family. *ChemBioChem.* 2014, 15(11): 1555-1562 (IF₂₀₁₆ = 2,847; Příloha 2).

Komentář

6-hydroxyceramidy (6-hydroxyCer) jsou jednou z nejmladších rodin Cer. Jejich postavení a pravděpodobně i význam ve SC jsou zcela jedinečné. **6-hydroxyCer nebyly**, na rozdíl od jiných podrodin Cer, **nalezeny v žádných jiných tkáních kromě kůže**. Navíc nejsou typické pro všechny savčí druhy; 6-hydroxyCer nebyly nalezeny u některých ras psů,¹⁵¹ v prasečí epidermis nebyly nalezeny vůbec.³⁰ Dodnes není rovněž objasněna jejich biosyntéza (viz dříve).³² **Cílem této práce bylo shrnout dosavadní informace o biologickém významu a biosyntéze 6-hydroxyCer a o kožních onemocněních, u kterých bylo pozorováno snížení 6-hydroxyCer v epidermis.** Na rozdíl od (dihydro)Cer¹⁵²⁻¹⁵³ a fytoCer,⁴¹ syntéza 6-hydroxyCer nebyla zatím přehledně zpracována, proto bylo **cílem této práce také shrnout současné syntetické přístupy v přípravě 6-hydroxyCer.**

První zmínka o 6-hydroxyCer je z roku 1989.¹⁵⁴ Hamanaka izoloval frakci polárních prekurzorů Cer, mezi nimiž byl nalezen i doposud neznámý glukosylCer se třemi hydroxylovými skupinami. Nezávisle byla tato skutečnost potvrzena izolací „trihydroxysfingosinu“ v roce 1992.¹⁵⁵ Až v roce 1994 se objevuje práce,⁸ která potvrdila strukturu nových Cer – acylCer s esterově vázanou kyselinou linolovou (Cer EOH). Dále byl objeven nepolárnější 6-hydroxyCer typu A (Cer AH) a kovalentně vázaný Cer OH, dříve označovaný jako Cer B. O rok později byla objevena volná 6-hydroxylovaná sfingoidní báze (H), která tvoří přibližně 15 % volných sfingoidních bází ve SC.¹⁵⁶ Poslední chybějící podskupina 6-hydroxyCer byla objevena v roce 1999, a to izolací Cer NH z lidského SC.¹⁵⁷ Absolutní konfigurace na uhlíku 6 všech objevených podtypů 6-hydroxyCer byla konečně potvrzena v roce 2003⁹ a 2005¹⁵⁸ (Obrázek 16).



Obrázek 16 – Stručná historie objevu 6-hydroxyceramidů (6-hydroxyCer). Koncem osmdesátých let dvacátého století byl objeven neznámý sfingosin s hydroxylovou skupinou (Hamanaka *et al.*¹⁵⁴ a Wakita *et al.*¹⁵⁵), o několik let později byly izolovány α - (Cer AH) a ω -hydroxylované Cer (Cer OH a Cer EOH), jejichž hydroxylová skupina byla určena v poloze 6 (Robson *et al.*⁸). V roce 1995 byly nalezeny frakce volné sfingoidní báze (Stewart *et al.*¹⁵⁶) a rodina 6-hydroxyCer se v roce 1999 rozrostla o poslední chybějící Cer s nehydroxylovaným acylem (Cer NH; Stewart *et al.*¹⁵⁷). Konečně až na začátku jednadvacátého století byla potvrzena konfigurace (6R)- u všech kožních 6-hydroxyCer (Mori *et al.*^{9, 158}).

Doposud bylo publikováno několik prací, které se zabývaly syntézou buď volné sfingoidní 6-hydroxylované báze (H),¹⁵⁹ nebo 6-hydroxyCer^{9, 158} a jejich analogů.¹⁶⁰ Všechny práce jako klíčový krok v syntéze uvádí kondenzaci komerčně dostupného (S)-Garnerova aldehydu **1** s (R)-pentadecyolem **2** (Schéma 3). Z novějších prací byla publikována syntéza 6-hydroxyCer (Cer AH) Grubbsovou metatezí¹⁶¹ nebo pomocí aziridinových aldehydů.¹⁶²

Snížené hladiny 6-hydroxyCer byly pozorovány u mnoha kožních onemocnění, zejména u atopické dermatitidy.¹⁶³ Bylo prokázáno, že u pacientů s atopickým ekzémem byly nalezeny nižší hladiny některých 6-hydroxyCer (Cer AH) ve srovnání se zdravými jedinci.¹⁶⁴ Pacienti s psoriázou mají ve SC pětikrát méně volného H;¹⁵⁵ u pacientů s patologicky suchou kůží je výrazně snížena hladina Cer vázaných na bílkoviny včetně Cer EOH.¹⁶⁵ Z výsledků řady dermatologických studií^{45, 166-}

¹⁶⁷ Ize tedy tvrdit, že změny hladin 6-hydroxyCer přímo souvisí s poškozením funkce kůže jako bariéry.

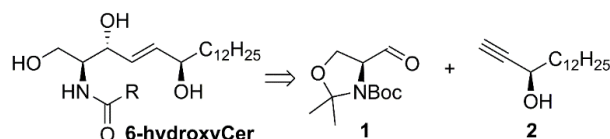


Schéma 3 - Retrosyntetická analýza 6-hydroxyceramidů (6-hydroxyCer). Východní látky v syntéze 6-hydroxyCer: (S)-Garnerův aldehyd (L-serinal) **1** a (R)-pentadecynol **2**; Boc, *tert*-butyloxykarbonyl.

5.2.2. SYNTÉZA 6-HYDROXYCERAMŮ

Původní práce

- ❖ **Kováčik A**, Opálka L, Šilarová M, Roh J, Vávrová K. Synthesis of 6-Hydroxyceramide Using Ruthenium-Catalyzed Hydrosilylation-Protodesilylation. Unexpected Formation of a Long Periodicity Lamellar Phase in Skin Lipid Membranes. *RSC Adv.* **2016**, 6(77): 73343-73350 (IF₂₀₁₆ = **3,108**; Příloha 3),
- ❖ Opálka L, **Kováčik A**, Sochorová M, Roh J, Kuneš J, Lenčo J, Vávrová K. Scalable Synthesis of Human Ultralong Chain Ceramides. *Org. Lett.* **2015**, 17(21): 5456-5459 (IF₂₀₁₆ = **6,579**; Příloha 4).

Komentář

Největší překážkou objasnění významu 6-hydroxyCer ve SC a vysvětlení příčiny jejich nižších hladin u mnoha kožních onemocnění je fakt, že 6-hydroxyCer nejsou, stejně jako ultradlouhé Cer, komerčně dostupné a jejich izolace z kůže je značně komplikovaná.^{8, 157} Proto bylo **cílem této práce připravit fyziologické 6-hydroxyCer, tj. Cer NH s dlouhým a Cer EOH s ultradlouhým acylovým řetězcem.**

Syntéza fyziologického Cer NH vycházela z reakce komerčně dostupného tridekanalu **3** a acetyleny s trimethylsilylovou (TMS) chránicí skupinou. Vzniklý (±)-TMS-pentadecynol **4** byl v dalším kroku podroben enzymatické reakci. Lipáza acetylovala pouze fyziologický (R)-enantiomer **5**, který byl pomocí sloupcové chromatografie oddělen od (S)-TMS-pentadecynolu.^{9, 158} U (R)-alkoholu **5** byly dále odstraněny chránicí skupiny (acetyl, TMS) a vzniklý (R)-pentadecynol **2** byl chráněn *tert*-butyldimethylsilylovou (TBS) skupinou.^{9, 158-160} Následovala alkynylace (S)-Garnerova aldehydu¹⁶⁸ **1** (R)-TBS-pentadecynolem **6**. U vzniklého meziprojektu **7** byla odstraněna TBS skupina a zredukována trojná vazba. V tomto kroku bylo vyzkoušeno několik postupů k redukci intermediátu **8**. Redukce použitím roztoku solvatovaných elektronů z alkalických kovů (Li, Na) v protickém prostředí amoniaku při nízké teplotě¹⁶⁰ vedla k nízkým výtěžkům (25 %) navzdory faktu, že tato metoda je hojně využívána v syntéze SL.⁹⁰ Proto byly pro redukci vazby trojné na *trans*-dvojnou použity podmínky **Trostovy hydrosilylace-protodesilylace**.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ Reakce je založena na adici triethoxysilanu na substrát **8** za katalýzy [Cp**Ru*(CH₃CN)₃]PF₆ v bezvodém acetonu a následovaná protodesilylací tetrabutylamonium-fluoridem (TBAF). Uvedená reakce poskytla chráněnou sfingoidní bázi **9** ve výtěžku 52 % (**Schéma 4**).

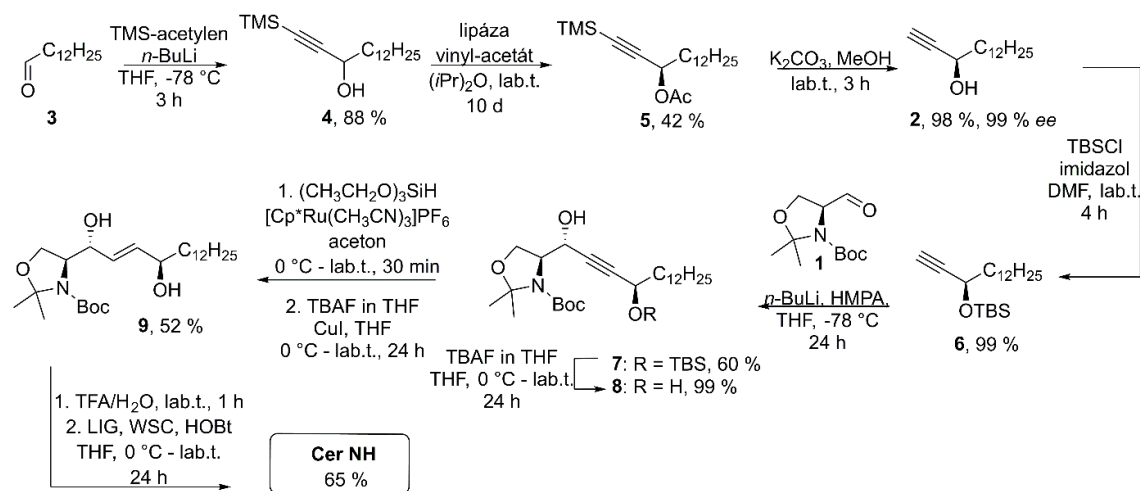


Schéma 4 – Syntéza Cer NH.⁴⁹ Boc, *tert*-butyloxykarbonyl; DMF, dimethylformamid; ee, enantiomerní přebytek (angl. *enantiomeric excess*); HMPA, hexamethylfosforamid; LIG, kyselina lignocerová; TBAF, tetrabutylamonium-fluorid; TBSCl, *tert*-butyldimethylsilylchlorid; TFA, trifluoroctová kyselina; THF, tetrahydrofuran; TMS, trimethylsilyl; WSC, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid.

Po odstranění *tert*-butyloxykarbonylové (Boc) chránící skupiny u substrátu **9** směsí kyseliny trifluoroctové a vody následovala acylace vzniklé sfingoidní báze s LIG (C24:o) za přítomnosti ve vodě rozpustného karbodiimidu (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu)¹⁷² s výtěžkem 65 % pro Cer NH (Schéma 4).

Cer EOH byl připraven acylací sfingoidní báze aktivovaným sukcinimidyl esterem ω -hydroxykyseliny esterifikované kyselinou linolovou. Tento ester byl připraven z komerčně dostupné 16-bromhexadekanové kyseliny.¹⁷³⁻¹⁷⁴ Tímto postupem, který je součástí práce Opálka *et al.*¹⁷⁵, byly připraveny i další z řady fyziologických acylCer nalezených ve zdravém SC, tj. Cer EOS, Cer EODs a Cer EOP.

Biosyntéza 6-hydroxyCer v savčí epidermis není doposud objasněna. Hypotéza, že **allylová pozice ve sfingoidní části Cer je náchylná k oxidaci** (pravděpodobný vznik 6-hydroxyCer, viz dříve), byla potvrzena reakcí komerčně dostupného Cer NS s oxidem seleničitým v přítomnosti *tert*-butylhydroperoxidu.¹⁷⁶⁻¹⁷⁹ Z této reakce byl získán Cer NH (10 %) a jeho nefyziologický diastereoizomer, který byl od fyziologického oddělen sloupcovou chromatografií.

5.2.3. C-6 HYDROXYLACE CERAMIDŮ MÁ SMÍŠENÝ VLIV NA PERMEABILITU A MIKROSTRUKTURU MODELOVÝCH MEMBRÁN. CERAMID NH STOJÍ ZA VZNIKEM LAMELÁRNÍ FÁZE S NEZVYKLE DLOUHOU PERIODICITOU

Původní práce

❖ **Kováčik A**, Šilarová M, Pullmannová P, Maixner J, Vávrová K. Effects of 6-Hydroxyceramides on the Thermotropic Phase Behavior and Permeability of Model Skin Lipid Membranes. *Langmuir*. 2017, 33(11): 2890-2899 (IF₂₀₁₆ = 3,833; Příloha 5).

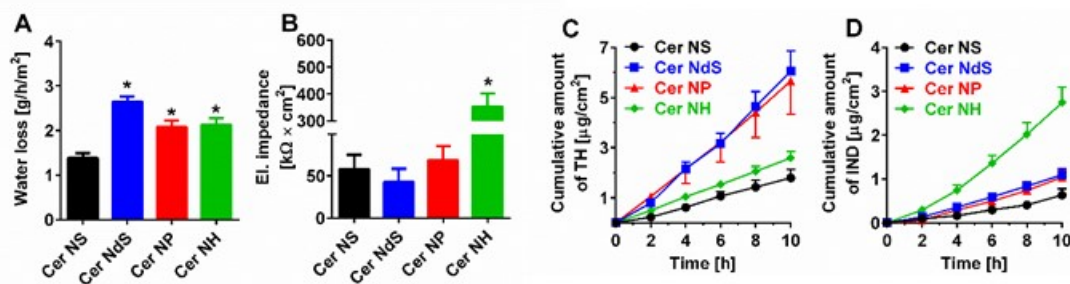
Komentář

Doposud není známo, proč příroda hydroxyluje kožní Cer v poloze 6 a jaký mají 6-hydroxyCer dopad na bariérovou funkci kůže. Proto bylo cílem této práce studovat vliv 6-hydroxyCer (Cer NH) na permeabilitu a mikrostrukturu modelových membrán SC. Abychom mohli popsat vztah struktura-účinek u kožních Cer, porovnali jsme chování Cer NH s chováním Cer NS, dihydroCer (Cer NdS) a fytoCer (Cer NP), všechny s acylem odvozeným od LIG (C24:o),

v modelových membránách SC. Byly připraveny čtyři typy modelových membrán, které obsahovaly jeden ze čtyř zmíněných Cer, dále Chol a VMK. Všechny tři složky (Cer/VMK/Chol) byly v modelových membránách SC zastoupeny ekvimolárně; k těmto směsím lipidů bylo dále přidáno 5 hmotnostních % CholS. Na rozdíl od předchozí práce, kde v modelových membránách byla použita pouze LIG (tzv. jednoduchý model, viz dříve), je v předkládané studii použita směs VMK v poměru, v jakém se vyskytují ve zdravém SC,¹⁸⁰ tj. 1,8 % palmitové (C16:o), 4,0 % stearové (C18:o), 7,6 % arachové (C20:o), 47,8 % behenové (C22:o) a 38,8 % LIG (C24:o) kyseliny (molární %). Tímto komplexnějším modelem byla vytvořena lipidová bariéra, která se více podobá skutečnému složení bariéry SC.

U připravených modelových membrán SC byla studována jejich permeabilita pro různé typy látek (permeantů). Prvním hodnoceným parametrem permeability byla **ztráta vody membránou**. Ztráta vody je velmi důležitou dermatologickou technikou využívanou v hodnocení bariérové funkce v modelech *in vivo*^{146, 181} a *in vitro*.¹⁴²⁻¹⁴⁵ Hodnoty naměřené ztráty vody u modelových membrán se pohybovaly v rozmezí od $1,4 \pm 0,1$ g/h/m² do $2,7 \pm 0,1$ g/h/m², což je podobné hodnotám ztráty vody u modelových membrán s izolovanými lipidy SC ($1,8 \pm 0,1$ g/h/m², Sochorová *et al.*¹⁸²). Z měření transmembránové ztráty vody bylo zjištěno, že modelové membrány obsahující jak prekurzory Cer (Cer NdS), tak hydroxylované Cer (Cer NP a Cer NH) jsou statisticky více propustné pro molekuly vody ve srovnání s kontrolou (Cer NS; **Obrázek 17A**).

Druhým parametrem, kterým byla hodnocena permeabilita modelových membrán SC, byla **elektrická impedance (Obrázek 17B)**.^{140, 183} Na rozdíl od ztráty vody membránou nebyly v případě elektrické impedance mezi modelovými membránami obsahujícími buď Cer NS, nebo Cer NdS, nebo Cer NP, nalezeny statisticky významné rozdíly. Avšak hydroxylace v poloze 6 dramatičtě zvyšuje hodnoty elektrické impedance, což znamená velmi omezenou permeabilitu dané modelové membrány pro průchod iontů. Hodnoty elektrické impedance byly u modelových membrán obsahujících Cer NH šestkrát vyšší ($p < 0,05$) než u kontrolních membrán ve složení Cer NS, VMK_{C16-C24}, Chol a CholS.

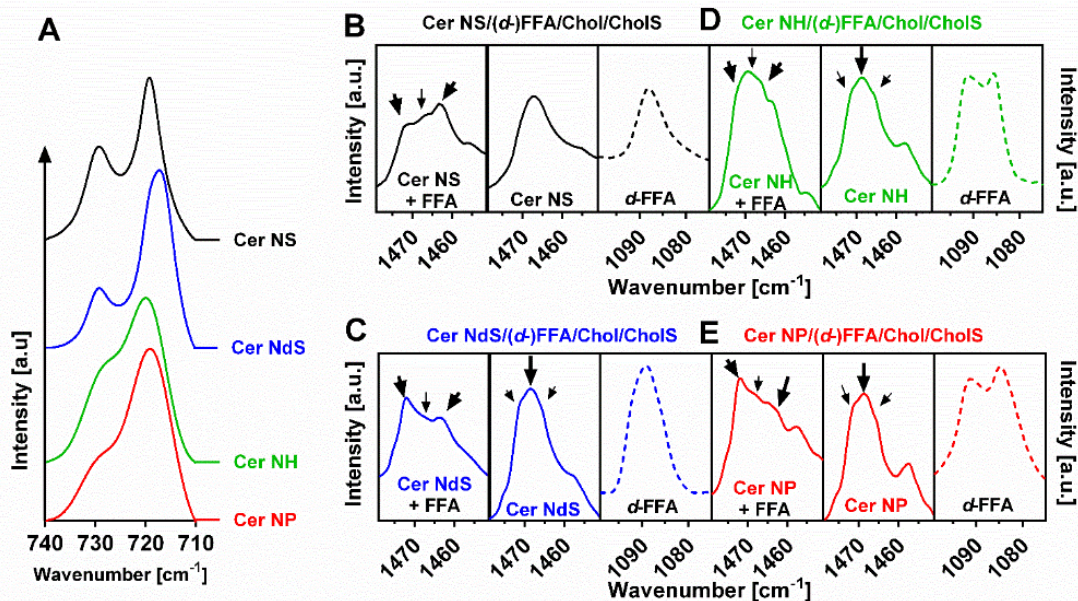


Obrázek 17 – Vliv C-6 hydroxylace ceramidů (Cer) na bariérové vlastnosti modelových membrán. Převzato z Kováčik *et al.*¹⁸⁴ Srovnání parametrů permeability modelových membrán SC obsahujících Cer NS (černě) nebo Cer NdS (modře) nebo Cer NP (červeně) nebo Cer NH (zeleně) s acylem odvozeným od kyseliny lignocerové (C24:o), směs volných mastných kyselin (VMK_{C16-C24}), cholesterol a cholesterol-sulfát. Graf A znázorňuje ztrátu vody membránou a graf B elektrickou impedanci. Grafy C a D reprezentují permeační profily pro theofylin (TH; graf C) a indometacin (IND; graf D). Data jsou prezentována jako průměry hodnot \pm standardní chyba průměru, $n = 8-37$; * značí statisticky významný rozdíl oproti membránám odvozeným od Cer NS ($p < 0,05$).

Dalším parametrem permeability modelových membrán SC bylo měření propustnosti modelových látek (TH a IND) membránou.^{87-90, 141} Z permeačních profilů lze pozorovat, že modelové membrány obsahující fyziologické prekurzory Cer (Cer NdS) a membrány ve složení Cer NP/VMK_{C16-C24}/Chol/CholS jsou statisticky více propustnější pro TH než kontrolní modelové membrány (Cer NS; **Obrázek 17C**). I zde lze pozorovat specifický efekt C-6 hydroxylace Cer na bariérové vlastnosti modelových membrán. Zatímco modelové membrány obsahující 6-hydroxyCer jsou v porovnání s kontrolou srovnatelně propustné pro TH, pro druhé modelové léčivo (IND) jsou statisticky významně propustnější. Studované parametry permeability modelových membrán SC jsou pro přehlednost uvedeny v **Obrázku 17**.

Mikrostruktura modelových membrán SC byla hodnocena pomocí IR spektroskopie (ATR-FTIR). Při **fyziologické teplotě 32 °C** (teplota povrchu lidské kůže) jsou lipidy modelových membrán obsahujících Cer NS, Cer NdS, Cer NP a Cer NH uspořádány převážně v *all-trans* konformaci, jelikož hodnoty vlnočtů symetrických valenčních vibrací nepřesahují hodnotu 2850 cm^{-1} .¹⁰⁸

Z hodnot vlnočtů deformačních nůžkových nebo kývavých CH₂ vibrací můžeme určit typ laterálního uspořádání řetězců v modelových membránách. Navíc použitím deuterovaných VMK (*d*-VMK) můžeme současně sledovat chování neznačených Cer řetězců a chování řetězců deuteriem značených *d*-VMK, jelikož vlnočty C-D vibrací se nachází v jiných oblastech IR spektra než vlnočty vibrací C-H (**Obrázek 18**).



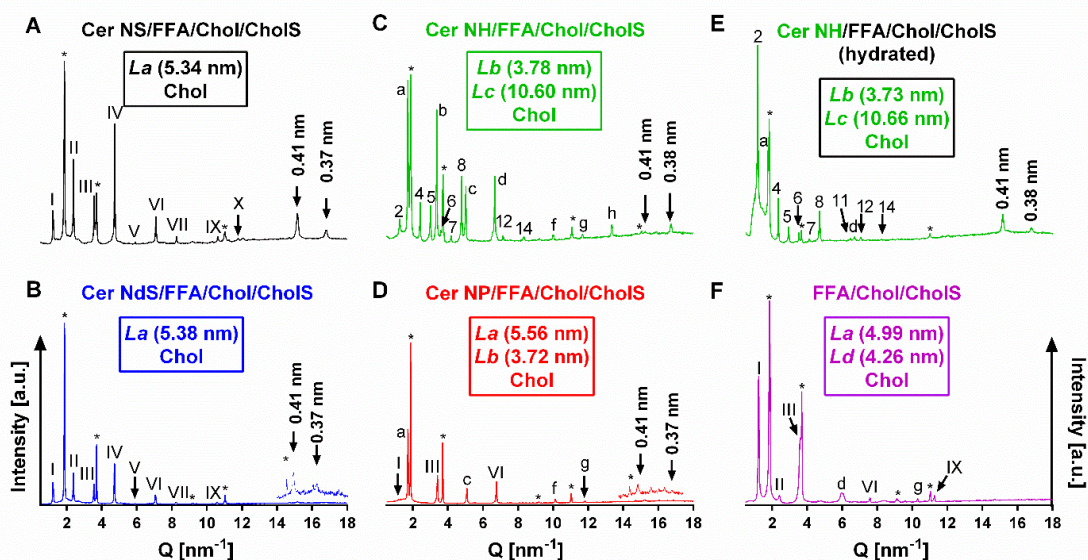
Obrázek 18 – Vliv C-6 hydroxylace ceramidů (Cer) na laterální uspořádání lipidů modelových membrán. Převzato z Kováčik *et al.*⁶⁴ ATR-FTIR spektra modelových membrán SC obsahujících Cer NS (černě) nebo Cer NdS (modře) nebo Cer NP (červeně) nebo Cer NH (zeleně) s acylem odvozeným od kyseliny lignocerové (C_{24:0}), směs (deuterovaných) volných mastných kyselin ((*d*-VMK)_{C₁₆-C₂₄}; angl. (*deuterated*)-free fatty acids; (*d*)-FFA), cholesterol a cholesterol-sulfát. Panely A-E představují ATR-FTIR spektra methylenových kývavých (710–740 cm⁻¹; panel A) a methylenových nůžkových vibrací (panely B-E) při teplotě 32 °C. U panelů B-E vždy první graf ukazuje spektrum neznačené lipidové směsi (1450–1480 cm⁻¹), druhý a třetí graf ukazují CH₂ vibrace (převážně Cer řetězců; druhý graf) a CD₂ vibrace *d*-VMK_{C₁₆-C₂₄} (1075–1100 cm⁻¹) značených lipidových směsí.

U modelových membrán obsahujících Cer NS byl při fyziologické teplotě ve spektru pozorován ortorombický dublet (vlnočty methylenové kývavé vibrace: 719,3 cm⁻¹ a 729,6 cm⁻¹). Tento fakt je vysvětlován skutečností, že dochází ke spřažení C-H vibrací sousedních izotopů řetězců lipidů. Relativní intenzita složky dubletu při hodnotě vlnočtu ~729 cm⁻¹ postupně klesá s absencí dvojné vazby u membrán ve složení Cer NdS/VMK_{C₁₆-C₂₄}/Chol/CholS. V případě membrán obsahujících hydroxylované Cer se složka dubletu mění v raménko (v případě Cer NH-membrány při hodnotě vlnočtu 729,3 cm⁻¹ a u membrány obsahující Cer NP při hodnotě vlnočtu 730,2 cm⁻¹; **Obrázek 18A**).

Přítomnost ortorombického uspořádání lipidů v modelových membránách lze pozorovat také z nůžkové vibrace (vlnočty dubletu ~1462 cm⁻¹ a ~1472 cm⁻¹). Nahrazením VMK jejich deuterovanými ekvivalenty (*d*-VMK_{C₁₆-C₂₄}) bylo možné v oblasti C-H nůžkových vibrací sledovat singlet (vlnočty ~1468 cm⁻¹). Stejně je tomu v případě nůžkových C-D vibrací u *d*-VMK_{C₁₆-C₂₄} (singlet při hodnotě ~1088 cm⁻¹). Přítomnost singletů naznačuje **dobrou mísitelnost Cer NS s *d*-VMK_{C₁₆-C₂₄}**, jelikož nemůže dojít ke spřažení vibrací stejných izotopů. K podobným závěrům lze dospět i u modelových membrán obsahujících Cer NdS/(*d*-VMK_{C₁₆-C₂₄}/Chol/CholS (**Obrázek 18B, C**). V případě, že modelová membrána SC obsahuje některý z hydroxylovaných Cer (Cer NP nebo Cer NH), lze v IR spektru pozorovat **fázovou separaci *d*-VMK** (**Obrázek 18D**). V oblasti nůžkových C-D vibrací byl pozorován zřetelný dublet (vlnočty ~1080 cm⁻¹ a ~1090 cm⁻¹), což značí nedokonalou mísitelnost *d*-VMK s řetězcí Cer NH a tvorbu samostatných (ortorombicky uspořádaných) domén VMK.

Modelové lipidové membrány byly dále hodnoceny pomocí XRPD. Ve všech modelových membránách byla nalezena fáze separovaného Chol s meziovinnou vzdáleností přibližně 3,4 nm, což odpovídá fázi separovaného Chol⁶⁶⁻⁶⁷ ve zdravém SC.⁶⁵ U kontrolních modelových membrán (Cer NS/VMK_{C₁₆-C₂₄}/Chol/CholS) byla nalezena *La* fáze s periodicitou 5,3 nm (**Obrázek 19A**), která odpovídá fázi známé jako fáze s krátkou periodicitou (SPP).^{62-63, 65} Podobné lamelární uspořádání (*La*

fáze) lze pozorovat rovněž u modelových membrán obsahujících Cer NdS nebo Cer NP/VMK_{C16-C24}/Chol/CholS (Obrázek 19B, D).



Obrázek 19 – Vliv C-6 hydroxylace ceramidů (Cer) na lamelární uspořádání lipidů modelových membrán. Převzato z Kováčik *et al.*¹⁸⁴ Práškové difraktogramy (XRPD) modelových membrán obsahujících Cer NS (černě) nebo Cer NdS (modře) nebo Cer NP (červeně) nebo Cer NH (zeleně) s acylem odvozeným od kyseliny lignocerové (C_{24:0}), směs volných mastných kyselin (angl. *free fatty acids*; FFA), cholesterol (Chol) a cholesterol-sulfát (CholS) při 30% (panely A-D a F) a 100% hydrataci (panel E). Římské číslice označují reflexe La fáze, písmena patří Lb a arabské číslice Lc fázi; * označuje reflexe separovaného Chol. Panel F ukazuje difraktogram modelové membrány neobsahující Cer složku, tj. směs volných mastných kyselin a Chol v ekvimolárním poměru s přidavkem CholS (fialově). V tomto difraktogramu lze pozorovat Ld fázi s periodicitou 4,3 nm. Q [nm⁻¹] je vektor rozptylu (angl. *scattering vector*), úměrný difraktovanému úhlu θ [°].

U modelových membrán obsahujících Cer NP byla také pozorována Lb fáze s periodicitou 3,7 nm (Obrázek 19D). Tato fáze odpovídá jedné ze šesti možných krystalických forem Cer NP, známé jako fáze F.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ Lb fáze z difraktogramu vymizí v případě, že modelová membrána postrádá Cer složku (Obrázek 19F). Lb fáze byla nalezena i v Cer NH-membránách; tato slábne na relativní intenzitě při 100% hydrataci modelových membrán (Obrázek 19E). V oblasti tzv. širokých úhlů ($Q = 14-18 \text{ nm}^{-1}$) lze nalézt dva píky (0,41 - 0,42 nm a 0,37 - 0,38 nm), které odpovídají těsnému ortorombickému uspořádání¹³ a potvrzují tak výsledky ATR-FTIR.¹⁸⁴

Nejzajímavějším výsledkem z hodnocení mikrostruktury modelových membrán je přítomnost lamelární fáze Lc s dlouhou periodicitou ($d = 10,7 \text{ nm}$) v modelových membránách obsahujících 6-hydroxyCer, tj. membránách tvořených Cer NH/VMK_{C16-C24}/Chol/CholS (Obrázek 19C), a to dokonce bez přítomnosti ultradlouhých Cer (např. Cer EOS).¹⁴¹ **Hydroxylace Cer v poloze 6 pravděpodobně stojí za vznikem LPP** (na rozdíl od hydroxylace v poloze 4 u fytoCer), avšak mezivinná vzdálenost je poněkud kratší, než LPP vyskytující se ve zdravém SC. Podobné závěry lze nalézt v práci, která potvrdila přítomnost lamelární fáze s periodicitou 11,0 nm.⁹⁶ V případě membrán obsahujících 6-hydroxyCer lze tedy vyslovit hypotézu, že tyto Cer by mohly podporovat nebo udržovat (stabilizovat) LPP ve zdravém SC.

Z výše jmenovaných výsledků lze vyvodit závěr, že hydroxylace Cer v poloze 6 má smíšený vliv na permeabilitu, ale také na mikrostrukturu modelových membrán SC. **Membrány obsahující Cer NH jsou více propustné pro vodu a větší lipofilnější molekuly ve srovnání s membránami obsahujícími Cer NS.** Cer NH-membrány jsou však velmi dobrou bariérou pro ionty. Z výsledků ATR-FTIR lze pozorovat fázovou separaci d-VMK v modelových membránách na bázi Cer NH (a také Cer NP). Zajímavým výsledkem této studie je rovněž zjištění, že Cer NH tvoří lamelární fázi s dlouhou periodicitou (Tabulka 4).

	Cer NS	Cer NdS	Cer NP	Cer NH
bariéra pro vodu	✓	×	×	×
rezistence vůči prostupu iontů	×	×	×	✓
bariéra pro malé polární látky	✓	×	×	✓
bariéra pro velké lipofilní látky	✓	✓	✓	×
mísitelnost Cer s VMK	✓	✓	×	×
tvorba fáze s krátkou periodicitou	✓	✓	✓	×
tvorba fáze s dlouhou periodicitou	×	×	×	✓

Tabulka 4 - Srovnání propustnosti (permeability) a mikrostruktury modelových membrán.¹⁸⁴ Membrány obsahující Cer NS (černě) nebo Cer NdS (modře) nebo Cer NP (červeně) nebo Cer NH (zeleně), směs volných mastných kyselin (VMK_{C16-C24}), cholesterol a cholesterol-sulfát. První čtyři parametry charakterizují propustnost membrán pro vodu, ionty, malé polární (teofylin) a větší lipofilní látky (indometacin). Další tři charakteristiky srovnávají mikrostrukturu modelových membrán, tj. mísitelnost ceramidů (Cer) s VMK, přítomnost fáze s krátkou nebo dlouhou periodicitou.

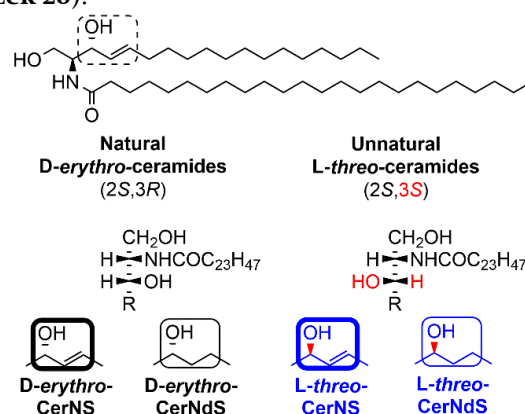
5.3. VLIV STEREOCHEMIE CERAMIDŮ NA PERMEABILITU A MIKROSTRUKTRU MODELOVÝCH MEMBRÁN

Původní práce

❖ **Kováčik A**, Pullmannová P, Maixner J, Vávrová K. Effects of Ceramide and Dihydroceramide Stereochemistry at C-3 on the Microstructure, Thermotropic Phase Behavior and Permeability of Skin Lipid Membranes. *V recenzním řízení*. (Příloha 6).

Komentář

Polární hlava Cer obsahuje několik center chirality. Sfingosinové ceramidy (S-Cer) a dihydroceramidy (dihydroCer) sdílejí společnou *D-erythro*, tj. (2*S*,3*R*)-konfiguraci. Konfigurace v poloze (2*S*)- je dána přirozeným prekurzorem Cer, tedy aminokyselinou L-serinem. Dalším krokem v syntéze Cer *de novo* (viz dříve) je redukce 3-ketodihydrosfingosinu příslušnou reduktázou, což vede k tvorbě hydroxylové skupiny v (3*R*)-konfiguraci.¹⁸⁸ Je známo, že nefyziologická *L-threo* konfigurace Cer má jiný dopad na různé procesy v buněčné signalizaci než konfigurace přirozená.¹⁸⁹ Význam fyziologické *D-erythro* konfigurace pro bariérové vlastnosti SC však zatím zjištěn nebyl. Doposud byla publikovaná pouze jedna studie, která studovala vliv stereochemie u kožních Cer. Práce se zabývala lamelárním uspořádáním lipidů modelových membrán obsahujících *L-threo*-dihydroCer.¹⁹⁰ Proto bylo cílem této práce připravit nefyziologické *L-threo*-(dihydro)Cer, jmenovitě *L-threo*-Cer NS a *L-threo*-Cer NdS s konfigurací sfingoidní báze pozměněnou na (2*S*,3*S*)- a objasnit vliv stereochemie na C-3 na mikrostrukturu a permeabilitu modelových membrán obsahujících nefyziologické *L-threo*-(dihydro)Cer. Modelové membrány SC byly připraveny jako ekvimolární směs (dihydro)Cer/VMK_{C16-C24}/Chol s přidavkem CholS (komplexnější model dosažen použitím směsi VMK¹⁸⁰). Cer složka obsahovala buď nefyziologické (dihydro)Cer, tj. *L-threo*-Cer NS nebo *L-threo*-Cer NdS, nebo jejich fyziologické diastereoizomery, tj. *D-erythro*-Cer NS nebo *D-erythro*-Cer NdS (Obrázek 20).

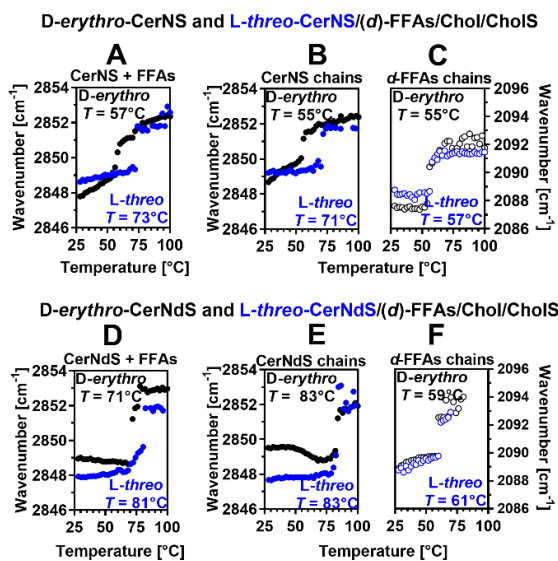


Obrázek 20 - Stereochemie polární hlavy ceramidů (Cer) a dihydroceramidů (dihydroCer). Převzato z Kováčik *et al.*, v recenzním řízení. Na obrázku jsou zobrazeny Cer NS a Cer NdS ve fyziologické *D-erythro* (2*S*,3*R*)- (černě) a nefyziologické *L-threo* (2*S*,3*S*)-konfiguraci (modře). Změna stereochemie v poloze 3 sfingoidní báze je naznačena červeně.

Nefyziologické *L-threo*-(dihydro)Cer, které byly připraveny reakcí komerčně dostupné sfingoidní báze a LIG (C₂₄:0) v přítomnosti 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu a 1-hydroxybenzotriazolu,⁹¹ byly převedeny do modelových membrán. Nejdříve bylo hodnoceno fázové chování obsažených lipidů. Pomocí XRPD bylo zjištěno, že změna stereochemie v poloze 3 sfingoidní báze nemá (až na nepatrné změny v relativní intenzitě reflexí v difraktogramech) vliv na lamelární uspořádání modelových membrán použitých v této práci. Ve všech studovaných

vzorcích byly pozorovány *La* fáze s periodicitou 5,3 – 5,4 nm^{61, 64-65} a fáze separovaného Chol ($d = 3,4$ nm).⁶⁶

Změna konfigurace v poloze 3 se však projevila na fázovém chování lipidových směsí v závislosti na stoupající teplotě. Z výsledků ATR-FTIR spektroskopie lze vyvodit několik zajímavostí. Lipidy ve směsi *D-erythro*-Cer NS/VMK_{C16-C24}/Chol/CholS jsou velmi dobře uspořádány (hodnoty vlnočtů symetrické methylenové vibrace jsou nižší než 2850 cm⁻¹). V případě směsi s *L-threo*-Cer NS jsou lipidy uspořádány hůře (vlnočet 2848,7 cm⁻¹) ve srovnání s *D-erythro*-Cer NS-membránami (2847,9 cm⁻¹), ale u těchto lipidů nastává fázový přechod při vyšší teplotě než u směsi s fyziologickým *D-erythro*-Cer NS (**Obrázek 21A**). Řetězce *L-threo*-Cer NS se navíc separují od *d*-VMK_{C16-C24}, o čemž vypovídají jak rozdílné teploty fázových přechodů (71 °C u neznačených a 57 °C u deuterovaných řetězců; **Obrázek 21B, C**), tak přítomnost ortorombického dubletu (nůžková CD₂ vibrace) při fyziologické teplotě 32 °C (viz Příloha 6).

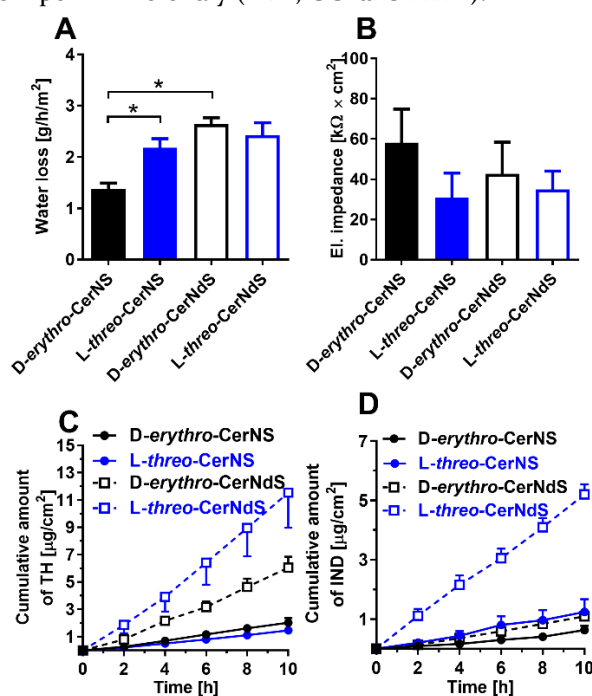


Obrázek 21 – Vliv stereochemie ceramidů (Cer) na fázové chování lipidů modelových membrán. Převzato z Kováčik *et al.*, v recenzním řízení. Konformace řetězců (vývoj symetrických vibrací v závislosti na teplotě) a fázové přechody lipidů v modelových membránách obsahujících Cer NS (panely A-C) a Cer NdS (panely D-F), a to v *D-erythro* (černě) nebo *L-threo* konfiguraci (modře) s acylem odvozeným od kyseliny lignocerové (LIG; C_{24:0}), směs (deuterovaných) volných mastných kyselin ((*d*)-VMK_{C16-C24}; angl. (*deuterated*)-free fatty acids; (*d*)-FFAs), cholesterol (Chol) a cholesterol-sulfát (CholS). Panely A a D zobrazují chování neznačených lipidových směsí (vlnočty 2846–2854 cm⁻¹) nebo směsí (panely B, C a E, F), kde místo VMK byla použita směs *d*-VMK (*d*-FFAs), čímž bylo možné pozorovat chování neznačených (panely B a E) a deuterovaných řetězců v modelových membránách (vlnočty 2086–2896 cm⁻¹; panely C a F). V jednotlivých grafech jsou rovněž uvedeny i teploty fázových přechodů.

Vliv *trans*-dvojně vazby a změna konfigurace v polární hlavě (dihydro)Cer se značně projeví na fázovém chování lipidů modelových membrán SC. Lipidy v modelových membránách obsahujících *L-threo*-Cer NdS jsou více uspořádány ve srovnání s lipidy v *D-erythro*-Cer NdS-membránách (vlnočty 2848,9 cm⁻¹ oproti 2847,9 cm⁻¹). **Hodnoty teplot fázových přechodů jsou obecně vyšší** než u jejich satureovaných analogů (Cer NS); v případě *L-threo*-Cer NdS je teplota fázového přechodu opět vyšší (81 °C) než u membrány s fyziologickým *D-erythro*-Cer NdS (71 °C; **Obrázek 21D**). Použitím *d*-VMK v modelových membránách bylo také možné sledovat **fázovou separaci** deuterovaných (**Obrázek 21E**) a neznačených řetězců (**Obrázek 21F**), jelikož teploty fázových přechodů sledovaných teplotních vývoji symetrických CH₂/CD₂ vibrací se značně lišily. V oblasti CD₂ nůžkových vibrací byly u *L-threo*-Cer NS a *L-threo*-Cer NdS-membrán navíc pozorovány dublety, což potvrzuje fázovou separaci *d*-VMK v membránách (viz Příloha 6).

K objasnění chování *L-threo*-(dihydro)Cer v modelových membránách SC byly tyto membrány hodnoceny v permeačních experimentech. *L-threo* konfigurace negativně ovlivňuje propustnost

modelových membrán pro vodu (Obrázek 22A), malé permeanty s vyváženou lipofilitou (TH; Obrázek 22C) nebo větší lipofilní molekuly (IND; Obrázek 22D).



Obrázek 22 – Vliv stereochemie ceramidů (Cer) na bariérové vlastnosti modelových membrán. Převzato z Kováčik *et al.*, v recenzním řízení. Srovnání parametrů permeability modelových membrán obsahujících D-erythro-Cer NS (černě) nebo L-threo-Cer NS (modře) nebo D-erythro-Cer NdS (černo-bíle) nebo L-threo-Cer NdS (modro-bíle), směs volných mastných kyselin (VMK_{C16-C24}), cholesterol (Chol) a cholesterol-sulfát (ChoS). Graf A znázorňuje ztrátu vody membránou a graf B elektrickou impedanci. Grafy C a D reprezentují permeační profily pro theofylin (TH; graf C) a indometacin (IND; graf D). Data jsou prezentována jako průměry hodnot ± standardní chyba průměru, $n = 6-12$; * značí statisticky významný rozdíl mezi membránami, jak je zobrazeno v obrázku ($p < 0,05$).

V této práci byl zjištěn vliv změny stereochemie Cer (náhrada fyziologické D-erythro nefyziologickou L-threo konfigurací) na hodnocené parametry modelových membrán. L-threo konfigurace vede ke **zvýšení teplot fázového přechodu** a tedy k **větší soudržnosti lipidů** v membráně. **Lamelární uspořádání** lipidů v modelových membránách nefyziologická L-threo konfigurace Cer **významně neovlivňuje** (u všech studovaných modelů byla nalezena fáze s krátkou periodicitou a separovaný Chol). Naproti tomu L-threo konfigurace **snižuje mísitelnost L-threo-(dihydro)Cer s d-VMK** a **zvyšuje permeabilitu** modelových membrán, jak ukazuje Tabulka 5.

	D-erythro-Cer NS	L-threo-Cer NS	D-erythro-Cer NdS	L-threo-Cer NdS
bariéra pro vodu	✓	×	×	×
rezistence vůči prostupu iontů	✓	×	✓	×
bariéra pro malé polární látky	✓	✓	×	×
bariéra pro velké lipofilní látky	✓	×	✓	×
mísitelnost Cer s VMK	✓	×	✓	×
tvorba fáze s krátkou periodicitou	✓	✓	✓	✓

Tabulka 5 - Srovnání propustnosti (permeability) a mikrostruktury modelových membrán (vliv stereochemie). Membrány obsahující D-erythro-Cer NS (černě) nebo L-threo-Cer NS (modře) nebo D-erythro-Cer NdS (černo-bíle) nebo L-threo-Cer NdS (modro-bíle), směs volných mastných kyselin (VMK_{C16-C24}), cholesterol a cholesterol-sulfát. První čtyři parametry charakterizují propustnost membrán pro vodu, ionty, malé polární (theofylin) a větší lipofilní látky (indometacin). Další dvě charakteristiky srovnávají mísitelnost ceramidů (Cer) s VMK v membráně a přítomnost fáze s krátkou periodicitou.

6. ZÁVĚR

Ceramidy mají nezastupitelnou funkci v regulaci životního cyklu každé eukaryotické buňky. Mimo to se ceramidy nachází v nejsvrchnější vrstvě savčí epidermis, kde společně s dalšími lipidy plní funkci kožní bariéry. Doposud však není objasněno, proč se v mezibuněčných prostorech epidermis nachází tak různorodá skupina ceramidů. Tato různorodost plyne nejenom z délky řetězců acylů či sfingoidních bází, ale také z jejich typu. Kromě nejčastěji zastoupených sfingosinových nebo dihydrosfingosinových bází jsou v rohové vrstvě epidermis přítomné i ceramidy odvozené od fytosfingosinu nebo 6-hydroxysfingosinu. Zajímavé je, že 6-hydroxysfingosin, na rozdíl od (dihydro)sfingosinových bází vyskytujících se v organismu ubikvitárně, je přítomen pouze v lipidové kožní matrix.

U ceramidů odvozených od hydroxylovaných sfingoidních bází (fytosfingosin a 6-hydroxysfingosin) nebyly doposud hodnoceny jejich bariérové vlastnosti. Zásadním problémem ve studiu 6-hydroxyceramidů je skutečnost, že žádný jejich zástupce není komerčně dostupný. Proto bylo cílem této práce připravit ceramidy odvozené od 6-hydroxysfingosinu. Byl připraven 6-hydroxyceramid s nehydroxylovaným acylem o délce 24 uhlíků (Cer NH) využitím redukce trojné vazby na *trans*-dvojnou pomocí modifikované **Trostovy hydrosilylace-protodesilylace** za katalýzy $[\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{CH}_3\text{CN})_3]\text{PF}_6$ v bezvodém acetonu. Tímto způsobem byl dále připraven ultradlouhý 6-hydroxyceramid Cer EOH. Byly rovněž připraveny i další fyziologické acylceramidy, tj. Cer EOS, Cer EODS a Cer EOP.

Hlavním cílem této disertační práce bylo **studium vlivu hydroxylace ceramidů na bariérové vlastnosti modelových lipidových membrán**. Z výsledků hodnocení permeability a mikrostruktury modelových membrán obsahujících fytoceramidy lze dospět k několika závěrům. Bylo zjištěno, že modelové membrány obsahující **fytoeramidy mají horší bariérové vlastnosti** než membrány odvozené od sfingosinových ceramidů. Tento závěr byl potvrzen zjištěním, že v modelech s fytoceramidy dochází **k fázové separaci přítomných lipidů**. Lze tedy vyvodit hypotézu, že fytoceramidy v epidermis mají jinou než ryze bariérovou funkci (např. podílejí se na diferenciaci keratinocytů).

Pokud jsou v modelové membráně přítomné 6-hydroxyceramidy, vliv hydroxylace na bariérové vlastnosti modelových membrán není jednoznačný. **Hydroxylace ceramidů v poloze 6 vede ke zvýšení propustnosti membrán pro vodu nebo lipofilní molekuly**. Na druhou stranu membrány obsahující ceramidy odvozené od 6-hydroxysfingosinu jsou **velmi dobrou bariérou prostupu iontů**. Zajímavým závěrem této studie je zjištění, že **Cer NH pravděpodobně usnadňuje vznik lamelární fáze s neobvykle dlouhou periodicitou**. Lamelární fáze s dlouhou periodicitou je esenciální pro bariérovou funkci kůže. To by mohlo vysvětlovat otázku, proč příroda syntetizuje tyto ceramidy pouze v kožní tkáni.

V této disertační práci byl rovněž studován význam stereochemie **v poloze 3** v molekulách ceramidů. Změna přirozené *D-erythro* konfigurace sfingosinových nebo dihydrosfingosinových ceramidů na nepřirozenou *L-threo* konfiguraci působí **pozitivně na přitažlivé síly v membránách (zvýšuje teploty fázových přechodů lipidů), neutrálně na lamelární uspořádání a konečně negativně na mísitelnost lipidů, jejich laterální uspořádání a také permeabilitu modelových membrán**.

Navzdory skutečnosti, že modelové membrány použité v této práci do značné míry zjednodušují složení skutečné lipidové matrix (postrádají kožní buňky i kovalentně vázané ceramidy), staly se **vhodným a užitečným nástrojem** pro hodnocení chování studovaných ceramidů. Použité modely přispěly k lepšímu pochopení významu vztahu **struktury a účinku ceramidů v bariérové funkci kůže**. Objasnění významu strukturálních prvků v polární hlavě ceramidů (hydroxylace a/nebo dvojná vazba) může vést k lepšímu porozumění roli jednotlivých ceramidů v patofyziologii kůže a najít využití v terapii kožních onemocnění. Je obecně známo, že zejména atopická dermatitida je doprovázena nedostatkem ceramidů v epidermis a topická **aplikace** některých zástupců (např. Cer NH) je **slibným přístupem v terapii** této choroby. Přestože topické podávání ceramidů nemůže toto onemocnění zcela vyléčit, může **zlepšit bariérovou funkci kůže, tím zmírnit projevy onemocnění a snížit spotřebu jiných lokálně podávaných léčiv s vyšším rizikem nežádoucích účinků** (např. kortikoidů).

7. SEZNAM PŘÍLOH

1. Školová B, **Kováčik A**, Tesař O, Opálka L, Vávrová K. Phytosphingosine, Sphingosine and Dihydrosphingosine Ceramides in Model Skin Lipid Membranes: Permeability and Biophysics. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*. 2017, 1859(5): 824-834 (IF₂₀₁₆ = 3,498).
Podíl na práci (druhý autor):
 - syntéza Cer NP a jeho analogů,
 - prášková rentgenová difrakce,
 - spoluúčast na sepsání rukopisu včetně jeho revizí.
2. **Kováčik A**, Roh J, Vávrová K. The Chemistry and Biology of 6-Hydroxyceramide, the Youngest Member of the Human Sphingolipid Family. *ChemBioChem*. 2014, 15(11): 1555-1562 (IF₂₀₁₆ = 2,847).
Podíl na práci (první autor):
 - sepsání rešerše.
3. **Kováčik A**, Opálka L, Šilarová M, Roh J, Vávrová K. Synthesis of 6-Hydroxyceramide Using Ruthenium-Catalyzed Hydrosilylation-Protodesilylation. Unexpected Formation of a Long Periodicity Lamellar Phase in Skin Lipid Membranes. *RSC Adv*. 2016, 6(77): 73343-73350 (IF₂₀₁₆ = 3,108).
Podíl na práci (první autor):
 - syntéza Cer NH, včetně charakterizace všech připravených látek,
 - sepsání rukopisu.
4. Opálka L, **Kováčik A**, Sochorová M, Roh J, Kuneš J, Lenčo J, Vávrová K. Scalable Synthesis of Human Ultralong Chain Ceramides. *Org. Lett*. 2015, 17(21): 5456-5459 (IF₂₀₁₆ = 6,579).
Podíl na práci (druhý autor):
 - syntéza 6-hydroxysfingosinu,
 - spoluúčast na sepsání rukopisu včetně jeho revizí.
5. **Kováčik A**, Šilarová M, Pullmannová P, Maixner J, Vávrová K. Effects of 6-Hydroxyceramides on the Thermotropic Phase Behavior and Permeability of Model Skin Lipid Membranes. *Langmuir*. 2017, 33(11): 2890-2899 (IF₂₀₁₆ = 3,833).
Podíl na práci (první autor):
 - permeabilita a mikrostruktura modelových membrán,
 - sepsání rukopisu.
6. **Kováčik A**, Pullmannová P, Maixner J, Vávrová K. Effects of Ceramide and Dihydroceramide Stereochemistry at C-3 on the Microstructure, Thermotropic Phase Behavior and Permeability of Skin Lipid Membranes. *V recenzním řízení*.
Podíl na práci (první autor):
 - syntéza L-threo ceramidů, včetně jejich charakterizace,
 - permeabilita a mikrostruktura modelových membrán,
 - sepsání rukopisu.

8. SEZNAM OBRÁZKŮ, SCHÉMAT A TABULEK

- Obrázek 1 Schématické znázornění základních vrstev lidské kůže. Převzato z *eucerin.cz*.¹⁵
- Obrázek 2 Schématické znázornění jednotlivých vrstev lidské pokožky. Převzato z *eucerin.cz*.¹⁵
- Obrázek 3 Schématické znázornění lidské rohové vrstvy (*stratum corneum*; SC), nejsvrchnější vrstvy kůže. Převzato z *eucerin.cz*.¹⁵
- Obrázek 4 Bariérové lipidy *stratum corneum* (SC) – ekvimolární směs cholesterolu (Chol), vyšších mastných kyselin (VMK) a ceramidů (Cer).
- Obrázek 5 Procentuální zastoupení ceramidů (Cer) ve zdravé rohové vrstvě epidermis. Převzato z Breiden *et al.*⁴
- Obrázek 6 Schématické znázornění kovalentně vázaných ceramidů (Cer).
- Obrázek 7 Lamelární uspořádání lipidů *stratum corneum* (SC).
- Obrázek 8 Dvě možné konformace ceramidů (Cer) v kožní lipidové bariéře.
- Obrázek 9 Laterální uspořádání lipidů rohové vrstvy epidermis.
- Obrázek 10 Konformace řetězců lipidů. Převzato z Maroncelli *et al.*⁷⁷
- Obrázek 11 Schématické znázornění Braggovy rovnice.
- Obrázek 12 Obrázek 12 – Schématické znázornění Franzovy difuzní cely.
- Obrázek 13 Vliv C-4 hydroxylace ceramidů (Cer) na bariérové vlastnosti modelových membrán. Převzato z Školová *et al.*¹⁵⁰
- Obrázek 14 Vliv C-4 hydroxylace ceramidů (Cer) na fázové chování lipidů modelových membrán. Převzato z Školová *et al.*¹⁵⁰
- Obrázek 15 Vliv C-4 hydroxylace ceramidů (Cer) na lamelární uspořádání lipidů modelových membrán. Převzato z Školová *et al.*¹⁵⁰
- Obrázek 16 Stručná historie objevu 6-hydroxyceramidů (6-hydroxyCer).
- Obrázek 17 Vliv C-6 hydroxylace ceramidů (Cer) na bariérové vlastnosti modelových membrán. Převzato z Kováčik *et al.*¹⁸⁴
- Obrázek 18 Vliv C-6 hydroxylace ceramidů (Cer) na laterální uspořádání lipidů modelových membrán. Převzato z Kováčik *et al.*¹⁸⁴
- Obrázek 19 Vliv C-6 hydroxylace ceramidů (Cer) na lamelární uspořádání lipidů modelových membrán. Převzato z Kováčik *et al.*¹⁸⁴
- Obrázek 20 Stereochemie polární hlavy ceramidů (Cer) a dihydroceramidů (dihydroCer). Převzato z Kováčik *et al.*, v recenzním řízení.
- Obrázek 21 Vliv stereochemie ceramidů (Cer) na fázové chování lipidů modelových membrán. Převzato z Kováčik *et al.*, v recenzním řízení.
- Obrázek 22 Vliv stereochemie ceramidů (Cer) na bariérové vlastnosti modelových membrán. Převzato z Kováčik *et al.*, v recenzním řízení.
- Schéma 1 Biosyntéza dihydroceramidů (dihydroCer).
- Schéma 2 Biosyntéza hydroxylovaných ceramidů (Cer).
- Schéma 3 Retrosyntetická analýza 6-hydroxyceramidů (6-hydroxyCer).
- Schéma 4 Syntéza Cer NH.
- Tabulka 1 Názvosloví ceramidů (Cer) podle nomenklatury dle Motty.
- Tabulka 2 Charakteristické vibrace v infračervené (IR) spektroskopii kožních lipidů.
- Tabulka 3 Srovnání propustnosti (permeability) a mikrostruktury modelových membrán (jednoduchý model).
- Tabulka 4 Srovnání propustnosti (permeability) a mikrostruktury modelových membrán.
- Tabulka 5 Srovnání propustnosti (permeability) a mikrostruktury modelových membrán (vliv stereochemie).

9. LITERATURA

1. Futerman, A. H.; Hannun, Y. A., The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* **2004**, *5* (8), 777-82.
2. Bartke, N.; Hannun, Y. A., Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J. Lipid Res.* **2009**, *50 Suppl*, 91-6.
3. Hannun, Y. A.; Obeid, L. M., Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9* (2), 139-50.
4. Breiden, B.; Sandhoff, K., The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1841* (3), 441-52.
5. 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.
6. Feingold, K.; Elias, P., The important role of lipids in the epidermis and their role in the formation and maintenance of the cutaneous barrier. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1841* (3), 279.
7. Uchida, Y., Ceramide signaling in mammalian epidermis. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1841* (3), 453-62.
8. Robson, K. J.; Stewart, M. E.; Michelsen, S.; Lazo, N. D.; Downing, D. T., 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *J. Lipid Res.* **1994**, *35* (11), 2060-8.
9. Mori, K.; Masuda, Y., Synthesis and stereochemistry of ceramide B, (2S,3R,4E,6R)-N-(30-hydroxytriacontanoyl)-6-hydroxy-4-sphingenine, a new ceramide in human epidermis. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (51), 9197-9200.
10. Kováčik, A.; Roh, J.; Vávrová, K., The chemistry and biology of 6-hydroxyceramide, the youngest member of the human sphingolipid family. *ChemBioChem.* **2014**, *15* (11), 1555-62.
11. Novotný, J.; Hrabálek, A.; Vávrová, K., Synthesis and structure-activity relationships of skin ceramides. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17* (21), 2301-24.
12. Čihák, R., *Anatomie 3*, 1. vydání, 1997. Praha: Grada Publishing, s. 672, ISBN: 80 247 1132 X.
13. Bouwstra, J. A.; Ponc, M., The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758* (12), 2080-95.
14. Williams, A., *Transdermal and dermal drug delivery: From theory to clinical practice*, 1. vydání, 2003. London: Pharmaceutical Press. ISBN 0 85369 489 3.
15. Eucerin.cz, Struktura a funkce kůže. <http://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze> (k 09. 10. 2017).
16. Elias, P. M.; Goerke, J.; Friend, D. S., Mammalian Epidermal Barrier Layer Lipids: Composition and Influence on Structure. *J. Invest. Dermatol.* **1977**, *69* (6), 535-46.
17. Holleran, W. M.; Takagi, Y.; Uchida, Y., Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Lett.* **2006**, *580* (23), 5456-66.
18. Rabionet, M.; Gorgas, K.; Sandhoff, R., Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1841* (3), 422-34.
19. Candi, E.; Schmidt, R.; Melino, G., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 328.
20. Lampe, M. A.; Burlingame, A. L.; Whitney, J.; Williams, M. L.; Brown, B. E.; Roitman, E.; Elias, P. M., Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J. Lipid Res.* **1983**, *24* (2), 120-30.
21. Elias, P. M., Epidermal lipids, membranes, and keratinization. *Int. J. Dermatol.* **1981**, *20* (1), 1-19.
22. Mojumdar, E. H.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., Phase behavior of skin lipid mixtures: the effect of cholesterol on lipid organization. *Soft Matter.* **2015**, *11* (21), 4326-36.
23. Long, S. A.; Wertz, P. W.; Strauss, J. S.; Downing, D. T., Human stratum corneum polar lipids and desquamation. *Arch. Dermatol. Res.* **1985**, *277* (4), 284-7.
24. Norlén, L.; Nicander, I.; Lundsjo, A.; Cronholm, T.; Forslind, B., A new HPLC-based method for the quantitative analysis of inner stratum corneum lipids with special reference to the free fatty acid fraction. *Arch. Dermatol. Res.* **1998**, *290* (9), 508-16.
25. van Smeden, J.; Hoppel, L.; van der Heijden, R.; Hankemeier, T.; Vreeken, R. J.; Bouwstra, J. A., LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *J. Lipid Res.* **2011**, *52* (6), 1211-21.

26. t'Kindt, R.; Jorge, L.; Dumont, E.; Couturon, P.; David, F.; Sandra, P.; Sandra, K., Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (1), 403-11.
27. 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.
28. Rabionet, M.; Bayerle, A.; Marsching, C.; Jennemann, R.; Grone, H. J.; Yildiz, Y.; Wachten, D.; Shaw, W.; Shayman, J. A.; Sandhoff, R., 1-O-acylceramides are natural components of human and mouse epidermis. *J. Lipid Res.* **2013**, *54* (12), 3312-21.
29. Pruett, S. T.; Bushnev, A.; Hagedorn, K.; Adiga, M.; Haynes, C. A.; Sullards, M. C.; Liotta, D. C.; Merrill, A. H., Jr., Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols. *J. Lipid Res.* **2008**, *49* (8), 1621-39.
30. Wertz, P. W.; Downing, D. T., Ceramides of pig epidermis: structure determination. *J. Lipid Res.* **1983**, *24* (6), 759-65.
31. 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.
32. Mizutani, Y.; Mitsutake, S.; Tsuji, K.; Kihara, A.; Igarashi, Y., Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie* **2009**, *91* (6), 784-90.
33. Levy, M.; Futerman, A. H., Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life* **2010**, *62* (5), 347-56.
34. Jakobsson, A.; Westerberg, R.; Jacobsson, A., *Prog. Lipid Res.* **2006**, *45*, 237.
35. Wertz, P. W., Lipids and barrier function of the skin. *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh)* **2000**, *208*, 7-11.
36. Ternes, P.; Franke, S.; Zahringer, U.; Sperling, P.; Heinz, E., Identification and characterization of a sphingolipid delta 4-desaturase family. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (28), 25512-8.
37. Goñi, F. M.; Contreras, F.-X.; Montes, L.-R.; Sot, J.; Alonso, A. In *Biophysics (and sociology) of ceramides*, Biochemical Society Symposia, Portland Press Limited: 2005; 177-88.
38. Morales, A.; Fernandez-Checa, J. C., Pharmacological modulation of sphingolipids and role in disease and cancer cell biology. *Mini Rev. Med. Chem.* **2007**, *7* (4), 371-82.
39. Ogretmen, B.; Hannun, Y. A., Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4* (8), 604-16.
40. van Blitterswijk, W. J.; Veldman, R. J.; Verheij, M.; Borst, J., Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem. J.* **2003**, *369* (2), 199-211.
41. Howell, A. R.; Ndakala, A. J., The preparation and biological significance of phytosphingosines. *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6* (4), 365-91.
42. Zellner, J., Zur Chemie des Fliegenpilzes (*Amanita muscaria* L.). *Chem. Month.* **1911**, *32* (2), 133-42.
43. Mizutani, Y.; Kihara, A.; Igarashi, Y., Identification of the human sphingolipid C4-hydroxylase, hDES2, and its up-regulation during keratinocyte differentiation. *FEBS Lett.* **2004**, *563* (1-3), 93-7.
44. Di Nardo, A.; Wertz, P.; Giannetti, A.; Seidenari, S., Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol.* **1998**, *78* (1), 27-30.
45. Macheleidt, O.; Kaiser, H. W.; Sandhoff, K., Deficiency of epidermal protein-bound omega-hydroxyceramides in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **2002**, *119* (1), 166-73.
46. Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Mellesi, L.; Ghidoni, R.; Caputo, R., Abnormality of water barrier function in psoriasis. Role of ceramide fractions. *Arch. Dermatol.* **1994**, *130* (4), 452-6.
47. Maccioni, H. J.; Daniotti, J. L.; Martina, J. A., Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1999**, *1437* (2), 101-18.
48. Voelker, D. R.; Kennedy, E. P., Cellular and enzymic synthesis of sphingomyelin. *Biochemistry* **1982**, *21* (11), 2753-9.
49. Tafesse, F. G.; Ternes, P.; Holthuis, J. C., The multigenic sphingomyelin synthase family. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (40), 29421-5.
50. Wu, J.; Cheng, Y.; Jönsson, B. A.; Nilsson, Å.; Duan, R.-D., Acid sphingomyelinase is induced by butyrate but does not initiate the anticancer effect of butyrate in HT29 and HepG2 cells. *J. Lipid Res.* **2005**, *46* (9), 1944-52.
51. Dressler, K.; Kolesnick, R., Ceramide 1-phosphate, a novel phospholipid in human leukemia (HL-60) cells. Synthesis via ceramide from sphingomyelin. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265* (25), 14917-21.

52. Kolter, T.; Sandhoff, K., Sphingolipids—Their Metabolic Pathways and the Pathobiochemistry of Neurodegenerative Diseases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1532-68.
53. Lannert, H.; Bünning, G.; Jeckel, D.; Wieland, F. T., Lactosylceramide is synthesized in the lumen of the Golgi apparatus. *FEBS Lett.* **1994**, *342* (1), 91-6.
54. Zhou, Q.; Hakomori, S.-i.; Kitamura, K.; Igarashi, Y., GM₃ directly inhibits tyrosine phosphorylation and de-N-acetyl-GM₃ directly enhances serine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, independently of receptor-receptor interaction. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (3), 1959-65.
55. Pettus, B. J.; Bielawska, A.; Subramanian, P.; Wijesinghe, D. S.; Maceyka, M.; Leslie, C. C.; Evans, J. H.; Freiberg, J.; Roddy, P.; Hannun, Y. A., Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (12), 11320-26.
56. Gangoiti, P.; Granada, M. H.; Arana, L.; Ouro, A.; Gomez-Muñoz, A., Activation of protein kinase C- α is essential for stimulation of cell proliferation by ceramide 1-phosphate. *FEBS Lett.* **2010**, *584* (3), 517-24.
57. Kim, C.; Schneider, G.; Abdel-Latif, A.; Mierzejewska, K.; Sunkara, M.; Borkowska, S.; Ratajczak, J.; Morris, A. J.; Kucia, M.; Ratajczak, M. Z., Ceramide-1-Phosphate Regulates Migration of Multipotent Stromal Cells and Endothelial Progenitor Cells—Implications for Tissue Regeneration. *Stem. Cells* **2013**, *31* (3), 500-10.
58. Hou, S. Y.; Mitra, A. K.; White, S. H.; Menon, G. K.; Ghadially, R.; Elias, P. M., Membrane structures in normal and essential fatty acid-deficient stratum corneum: characterization by ruthenium tetroxide staining and x-ray diffraction. *J. Invest. Dermatol.* **1991**, *96* (2), 215-23.
59. Madison, K. C.; Swartzendruber, D. C.; Wertz, P. W.; Downing, D. T., Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* **1987**, *88* (6), 714-8.
60. de Sousa Neto, D.; Gooris, G.; Bouwstra, J., Effect of the omega-acylceramides on the lipid organization of stratum corneum model membranes evaluated by X-ray diffraction and FTIR studies (Part I). *Chem. Phys. Lipids* **2011**, *164* (3), 184-95.
61. 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), 3725-32.
62. 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.
63. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Downing, D. T., Lipid organization in pig stratum corneum. *J. Lipid Res.* **1995**, *36* (4), 685-95.
64. de Jager, M.; Gooris, G.; Ponec, M.; Bouwstra, J., Acylceramide head group architecture affects lipid organization in synthetic ceramide mixtures. *J. Invest. Dermatol.* **2004**, *123* (5), 911-6.
65. Mojumdar, E. H.; Kariman, Z.; van Kerckhove, L.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., The role of ceramide chain length distribution on the barrier properties of the skin lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1838* (10), 2473-83.
66. Craven, B., Pseudosymmetry in cholesterol monohydrate. *Acta Crystallogr. Sect. B* **1979**, *35* (5), 1123-8.
67. Shieh, H.-S.; Hoard, L. G.; Nordman, C. E., The structure of cholesterol. *Acta Crystallogr. Sect. B* **1981**, *37* (8), 1538-43.
68. Corkery, R. W., The anti-parallel, extended or splayed-chain conformation of amphiphilic lipids. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2002**, *26* (1-2), 3-20.
69. Groen, D.; Poole, D. S.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., Is an orthorhombic lateral packing and a proper lamellar organization important for the skin barrier function? *BBA - Biomembranes* **2011**, *1808* (6), 1529-37.
70. Ohta, N.; Hatta, I., Interaction among molecules in mixtures of ceramide/stearic acid, ceramide/cholesterol and ceramide/stearic acid/cholesterol. *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *115* (1-2), 93-105.
71. Norlén, L., Skin barrier structure and function: the single gel phase model. *J. Invest. Dermatol.* **2001**, *117* (4), 830-6.
72. 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.

73. 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.
74. Mendelsohn, R.; Flach, C. R.; Moore, D. J., Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758* (7), 923-33.
75. de Jager, M.; Groenink, W.; Bielsa i Guivernau, R.; Andersson, E.; Angelova, N.; Ponec, M.; Bouwstra, J., A novel in vitro percutaneous penetration model: evaluation of barrier properties with p-aminobenzoic acid and two of its derivatives. *Pharm. Res.* **2006**, *23* (5), 951-60.
76. Stahlberg, S.; Školová, B.; Madhu, P. K.; Vogel, A.; Vávrová, K.; Huster, D., Probing the role of the ceramide acyl chain length and sphingosine unsaturation in model skin barrier lipid mixtures by (2)H solid-state NMR spectroscopy. *Langmuir.* **2015**, *31* (17), 4906-15.
77. Maroncelli, M.; Qi, S. P.; Strauss, H. L.; Snyder, R. G., Nonplanar conformers and the phase behavior of solid n-alkanes. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104* (23), 6237-6247.
78. Schmook, F. P.; Meingassner, J. G.; Billich, A., Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int. J. Pharm.* **2001**, *215* (1-2), 51-6.
79. Simon, G. A.; Maibach, H. I., The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations--an overview. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **2000**, *13* (5), 229-34.
80. Jung, E. C.; Maibach, H. I., Animal models for percutaneous absorption. *J. Appl. Toxicol.* **2015**, *35* (1), 1-10.
81. Welss, T.; Basketter, D. A.; Schroder, K. R., In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol. In Vitro* **2004**, *18* (3), 231-43.
82. Mathes, S. H.; Ruffner, H.; Graf-Hausner, U., The use of skin models in drug development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *69-70*, 81-102.
83. Friberg, S. E.; Kayali, I.; Beckerman, W.; Rhein, L. D.; Simion, A., Water Permeation of Reaggregated Stratum Corneum with Model Lipids. *J. Invest. Dermatol.* **1990**, *94* (3), 377-80.
84. Smith, W. P.; Christensen, M. S.; Nacht, S.; Gans, E. H., Effect of lipids on the aggregation and permeability of human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* **1982**, *78* (1), 7-11.
85. de Jager, M. W.; Gooris, G. S.; Dolbnya, I. P.; Bras, W.; Ponec, M.; Bouwstra, J. A., The phase behaviour of skin lipid mixtures based on synthetic ceramides. *Chem. Phys. Lipids* **2003**, *124* (2), 123-134.
86. 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), 2649-56.
87. Školová, B.; Jandovská, K.; Pullmannová, P.; Tesař, O.; Roh, J.; Hrabálek, A.; Vávrová, K., The role of the trans double bond in skin barrier sphingolipids: permeability and infrared spectroscopic study of model ceramide and dihydroceramide membranes. *Langmuir.* **2014**, *30* (19), 5527-35.
88. Školová, B.; Janůšová, B.; Zbytovská, J.; Gooris, G.; Bouwstra, J.; Slepíčka, P.; Berka, P.; Roh, J.; Palát, K.; Hrabálek, A.; Vávrová, K., Ceramides in the skin lipid membranes: length matters. *Langmuir.* **2013**, *29* (50), 15624-33.
89. 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. *BBA - Biomembranes* **2014**, *1838* (8), 2115-26.
90. Školová, B.; Janůšová, B.; Vávrová, K., Ceramides with a pentadecasingosine chain and short acyls have strong permeabilization effects on skin and model lipid membranes. *BBA - Biomembranes* **2016**, *1858* (2), 220-32.
91. Novotny, J.; Pospěchova, K.; Hrabálek, A.; Cap, R.; Vavrova, K., Synthesis of fluorescent C24-ceramide: evidence for acyl chain length dependent differences in penetration of exogenous NBD-ceramides into human skin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (24), 6975-7.
92. Marks, D. L.; Singh, R. D.; Choudhury, A.; Wheatley, C. L.; Pagano, R. E., Use of fluorescent sphingolipid analogs to study lipid transport along the endocytic pathway. *Methods* **2005**, *36* (2), 186-195.
93. Hrazdira, I.; Mornstein, V., *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. 1. vydání, 2001. Brno: Neptun, s. 395, ISBN: 80 902896 1 4.

94. Glombitza, B.; Muller-Goymann, C. C., Influence of different ceramides on the structure of in vitro model lipid systems of the stratum corneum lipid matrix. *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *117* (1-2), 29-44.
95. Swartzendruber, D. C.; Wertz, P. W.; Kitko, D. J.; Madison, K. C.; Downing, D. T., Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* **1989**, *92* (2), 251-7.
96. 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.; Norlén, 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.
97. Landmann, L., Epidermal Permeability Barrier: Transformation of Lamellar Granule-Disks into Intercellular Sheets by a Membrane-Fusion Process, a Freeze-Fracture Study. *J. Invest. Dermatol.* **1986**, *87* (2), 202-9.
98. Lafleur, M., Phase behaviour of model stratum corneum lipid mixtures: an infrared spectroscopy investigation. *Can. J. Chem.* **1998**, *76* (11), 1501-11.
99. Raith, K.; Farwanah, H.; Wartewig, S.; Neubert, R. H., Progress in the analysis of stratum corneum ceramides. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106* (8), 561-71.
100. 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.
101. Stahlberg, S.; Lange, S.; Dobner, B.; Huster, D., Probing the Role of Ceramide Headgroup Polarity in Short-Chain Model Skin Barrier Lipid Mixtures by ²H Solid-State NMR Spectroscopy. *Langmuir*. **2016**, *32* (8), 2023-31.
102. Engelbrecht, T. N.; Schroeter, A.; Hauß, T.; Demé, B.; Scheidt, H. A.; Huster, D.; Neubert, R. H., The impact of ceramides NP and AP on the nanostructure of stratum corneum lipid bilayer. Part I: neutron diffraction and ²H NMR studies on multilamellar models based on ceramides with symmetric alkyl chain length distribution. *Soft Matter*. **2012**, *8* (24), 6599-6607.
103. Rowat, A. C.; Kitson, N.; Thewalt, J. L., Interactions of oleic acid and model stratum corneum membranes as seen by ²H NMR. *Int. J. Pharm.* **2006**, *307* (2), 225-231.
104. Leung, S. S.; Busto, J. V.; Keyvanloo, A.; Goñi, F. M.; Thewalt, J., Insights into sphingolipid miscibility: separate observation of sphingomyelin and ceramide N-acyl chain melting. *Biophys. J.* **2012**, *103* (12), 2465-74.
105. Brief, E.; Kwak, S.; Cheng, J. T.; Kitson, N.; Thewalt, J.; Lafleur, M., Phase behavior of an equimolar mixture of N-palmitoyl-D-erythro-sphingosine, cholesterol, and palmitic acid, a mixture with optimized hydrophobic matching. *Langmuir*. **2009**, *25* (13), 7523-32.
106. Chen, X.; Kwak, S.; Lafleur, M.; Bloom, M.; Kitson, N.; Thewalt, J., Fatty acids influence "solid" phase formation in models of stratum corneum intercellular membranes. *Langmuir*. **2007**, *23* (10), 5548-56.
107. Schroeter, A.; Stahlberg, S.; Školová, B.; Sonnenberger, S.; Eichner, A.; Huster, D.; Vávrová, K.; Hauss, T.; Dobner, B.; Neubert, R. H.; Vogel, A., Phase separation in ceramide[NP] containing lipid model membranes: neutron diffraction and solid-state NMR. *Soft Matter*. **2017**, *13* (10), 2107-19.
108. Mendelsohn, R.; Moore, D. J., Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *96* (1-2), 141-57.
109. Moore, D. J.; Rerek, M. E., Insights into the molecular organization of lipids in the skin barrier from infrared spectroscopy studies of stratum corneum lipid models. *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh)* **2000**, *208*, 16-22.
110. 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.
111. Flach, C. R.; Moore, D. J., Infrared and Raman imaging spectroscopy of ex vivo skin. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2013**, *35* (2), 125-35.
112. 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), 774-84.
113. Kiselev, M.; Ryabova, N. Y.; Balagurov, A.; Dante, S.; Hauss, T.; Zbytovská, J.; Wartewig, S.; Neubert, R., New insights into the structure and hydration of a stratum corneum lipid model membrane by neutron diffraction. *Eur. Biophys. J.* **2005**, *34* (8), 1030-40.

114. Schröter, A.; Kessner, D.; Kiselev, M. A.; Hauß, T.; Dante, S.; Neubert, R. H., Basic nanostructure of stratum corneum lipid matrices based on ceramides [EOS] and [AP]: a neutron diffraction study. *Biophys. J.* **2009**, *97* (4), 1104-14.
115. Moore, D. J.; Rerek, M. E.; Mendelsohn, R., Lipid domains and orthorhombic phases in model stratum corneum: evidence from Fourier transform infrared spectroscopy studies. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1997**, *231* (3), 797-801.
116. Horák, M.; Vítek, A., *Zpracování a interpretace vibračních spekter*. 1. vydání, 1980. Praha: SNTL, s. 43.
117. Kania, P., *Infračervená spektrometrie*. 1. vydání, 2007. Praha: VŠCHT v Praze, Ústav analytické chemie.
118. MacPhail, R.; Strauss, H.; Snyder, R.; Elliger, C., Carbon-hydrogen stretching modes and the structure of n-alkyl chains. 2. Long, all-trans chains. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88* (3), 334-41.
119. Boncheva, M.; Damien, F.; Normand, V., Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. *BBA - Biomembranes* **2008**, *1778* (5), 1344-55.
120. Janssens, M.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., Infrared spectroscopy studies of mixtures prepared with synthetic ceramides varying in head group architecture: coexistence of liquid and crystalline phases. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788* (3), 732-42.
121. Wang, X.; Ujihara, M.; Imae, T.; Ishikubo, A.; Sugiyama, Y.; Okamoto, T., Characterization of mimetic lipid mixtures of stratum corneum. *Coll. Surf. B: Biointerfaces* **2010**, *78* (1), 92-100.
122. Arseneault, M.; Lafleur, M., Cholesterol sulfate and Ca 2+ modulate the mixing properties of lipids in stratum corneum model mixtures. *Biophys. J.* **2007**, *92* (1), 99-114.
123. Rerek, M. E.; Van Wyck, D.; Mendelsohn, R.; Moore, D. J., FTIR spectroscopic studies of lipid dynamics in phytosphingosine ceramide models of the stratum corneum lipid matrix. *Chem. Phys. Lipids* **2005**, *134* (1), 51-8.
124. Snyder, R. G.; Schachtschneider, J. H., Vibrational analysis of the n-paraffins—I: Assignments of infrared bands in the spectra of C₃H₈ through n-C₁₉H₄₀. *Spectrochim. Acta* **1963**, *19* (1), 85-116.
125. Snyder, R. G., Vibrational spectra of crystalline n-paraffins: II. Intermolecular effects. *J. Mol. Spectrosc.* **1961**, *7* (1), 116-44.
126. Snyder, R. G., Vibrational spectra of crystalline n-paraffins: Part I. Methylene rocking and wagging modes. *J. Mol. Spectrosc.* **1960**, *4* (1-6), 411-34.
127. Borchardt-Ott, W., The Interrelationship of Point Groups and Space Groups. 1. vydání, 1995. In *Crystallography*, Springer, s. 213.
128. McIntosh, T.; Stewart, M.; Downing, D., X-ray diffraction analysis of isolated skin lipids: reconstitution of intercellular lipid domains. *Biochemistry* **1996**, *35* (12), 3649-53.
129. McIntosh, T. J., Organization of Skin Stratum Corneum Extracellular Lamellae: Diffraction Evidence for Asymmetric Distribution of Cholesterol. *Biophys. J.* **2003**, *85* (3), 1675-81.
130. Hatta, I.; Ohta, N.; Inoue, K.; Yagi, N., Coexistence of two domains in intercellular lipid matrix of stratum corneum. *BBA - Biomembranes* **2006**, *1758* (11), 1830-6.
131. Bouwstra, J. A.; Dubbelaar, F. E.; Gooris, G. S.; Ponc, M., The lipid organisation in the skin barrier. *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh)* **2000**, *208*, 23-30.
132. Kittel, C.; Matyáš, M., *Úvod do fyziky pevných látek*. 1. vydání, 1985. Praha: Academia, s. 598.
133. Kuempel, D.; Swartzendruber, D. C.; Squier, C. A.; Wertz, P. W., In vitro reconstitution of stratum corneum lipid lamellae. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1372* (1), 135-40.
134. Abraham, W.; Downing, D. T., Preparation of model membranes for skin permeability studies using stratum corneum lipids. *J. Invest. Dermatol.* **1989**, *93* (6), 809-13.
135. Friberg, S. E.; Kayali, I., Water evaporation rates from a model of stratum corneum lipids. *J. Pharm. Sci.* **1989**, *78* (8), 639-43.
136. Kittayanond, D.; Dowton, S.; Ramachandran, C.; Flynn, G.; Weiner, N., Development of a model of the lipid constituent phase of the stratum corneum: II. Preparation of artificial membranes from synthetic lipids and assessment of permeability properties using in vitro diffusion experiments. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1993**, *43*, 237-49.
137. Matsuzaki, K.; Imaoka, T.; Asano, M.; Miyajima, K., Development of a model membrane system using stratum corneum lipids for estimation of drug skin permeability. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1993**, *41* (3), 575-9.
138. Miyajima, K.; Tanikawa, S.; Asano, M.; Matsuzaki, K., Effects of absorption enhancers and lipid composition on drug permeability through the model membrane using stratum corneum lipids. *Chem. Pharm. Bul.* **1994**, *42* (6), 1345-7.

139. Lieckfeldt, R.; Villalain, J.; Gomez-Fernandez, J. C.; Lee, G., Diffusivity and structural polymorphism in some model stratum corneum lipid systems. *BBA - Biomembranes* **1993**, *1150* (2), 182-8.
140. Janůšová, B.; Zbytovská, J.; Lorenc, P.; Vavryšová, H.; Palát, K.; Hrabálek, A.; Vávrová, K., Effect of ceramide acyl chain length on skin permeability and thermotropic phase behavior of model stratum corneum lipid membranes. *BBA - Biomembranes* **2011**, *1811* (3), 129-37.
141. Opálka, L.; Kováčik, A.; Maixner, J.; Vávrová, K., Omega-O-Acylceramides in Skin Lipid Membranes: Effects of Concentration, Sphingoid Base, and Model Complexity on Microstructure and Permeability. *Langmuir*. **2016**, *32* (48), 12894-904.
142. Netzlaff, F.; Kostka, K.-H.; Lehr, C.-M.; Schaefer, U. F., TEWL measurements as a routine method for evaluating the integrity of epidermis sheets in static Franz type diffusion cells in vitro. Limitations shown by transport data testing. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, *63* (1), 44-50.
143. Fokuhl, J.; Müller-Goymann, C. C., Modified TEWL in vitro measurements on transdermal patches with different additives with regard to water vapour permeability kinetics. *Int. J. Pharm.* **2013**, *444* (1-2), 89-95.
144. Chilcott, R. P.; Dalton, C. H.; Emmanuel, A. J.; Allen, C. E.; Bradley, S. T., Transepidermal Water Loss Does Not Correlate with Skin Barrier Function In Vitro. *J. Invest. Dermatol.* **2002**, *118* (5), 871-5.
145. Vávrová, K.; Hrabálek, A.; Mac-Mary, S.; Humbert, P.; Muret, P., Ceramide analogue 14S24 selectively recovers perturbed human skin barrier. *Br. J. Dermatol.* **2007**, *157* (4), 704-12.
146. Rerek, M. E.; Chen; Markovic, B.; Van Wyck, D.; Garidel, P.; Mendelsohn, R.; Moore, D. J., Phytosphingosine and Sphingosine Ceramide Headgroup Hydrogen Bonding: Structural Insights through Thermotropic Hydrogen/Deuterium Exchange. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (38), 9355-62.
147. Raudenkolb, S.; Hubner, W.; Rettig, W.; Wartewig, S.; Neubert, R. H., Polymorphism of ceramide 3. Part 1: an investigation focused on the head group of N-octadecanoylphytosphingosine. *Chem. Phys. Lipids* **2003**, *123* (1), 9-17.
148. Raudenkolb, S.; Wartewig, S.; Neubert, R. H., Polymorphism of ceramide 3. Part 2: a vibrational spectroscopic and X-ray powder diffraction investigation of N-octadecanoyl phytosphingosine and the analogous specifically deuterated d(35) derivative. *Chem. Phys. Lipids* **2003**, *124* (2), 89-101.
149. Kováčik, A.; Opálka, L.; Šilarová, M.; Roh, J.; Vávrová, K., Synthesis of 6-hydroxyceramide using ruthenium-catalyzed hydrosilylation-protodesilylation. Unexpected formation of a long periodicity lamellar phase in skin lipid membranes. *RSC Adv.* **2016**, *6* (77), 73343-50.
150. Školová, B.; Kováčik, A.; Tesař, O.; Opálka, L.; Vávrová, K., Phytosphingosine, sphingosine and dihydrosphingosine ceramides in model skin lipid membranes: permeability and biophysics. *BBA - Biomembranes* **2017**, *1859* (5), 824-34.
151. Popa, I.; Thuy, L. H.; Colsch, B.; Pin, D.; Gatto, H.; Haftek, M.; Portoukalian, J., Analysis of free and protein-bound ceramides by tape stripping of stratum corneum from dogs. *Arch. Dermatol. Res.* **2010**, *302* (9), 639-44.
152. Howell, A. R.; So, R. C.; Richardson, S. K., Approaches to the preparation of sphingamines. *Tetrahedron* **2004**, *60* (50), 11327-47.
153. Devant, R., Chemische totalsynthese von sphingosin, dem zentralen baustein der sphingolipide. *Kontakte (Darmstadt)* **1992**, *3*, 11-28.
154. Hamanaka, S.; Asagami, C.; Suzuki, M.; Inagaki, F.; Suzuki, A., Structure determination of glucosyl beta 1-N-(omega-O-linoleoyl)-acylsphingosines of human epidermis. *J. Biochem.* **1989**, *105* (5), 684-90.
155. Wakita, H.; Nishimura, K.; Takigawa, M., Composition of free long-chain (sphingoid) bases in stratum corneum of normal and pathologic human skin conditions. *J. Invest. Dermatol.* **1992**, *99* (5), 617-22.
156. Stewart, M. E.; Downing, D. T., Free sphingosines of human skin include 6-hydroxysphingosine and unusually long-chain dihydrosphingosines. *J. Invest. Dermatol.* **1995**, *105* (4), 613-8.
157. Stewart, M. E.; Downing, D. T., A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin. *J. Lipid Res.* **1999**, *40* (8), 1434-9.
158. 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), 4789-800.

159. Yadav, J. S.; Geetha, V.; Krishnam Raju, A.; Gnaneshwar, D.; Chandrasekhar, S., The first total synthesis of the 6-hydroxy-4E-sphingenes. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (14), 2983-5.
160. Chun, J.; Byun, H. S.; Bittman, R., First asymmetric synthesis of 6-hydroxy-4-sphingene-containing ceramides. Use of chiral propargylic alcohols to prepare a lipid found in human skin. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (2), 348-54.
161. Wisse, P.; de Geus, M. A. R.; Cross, G.; van den Nieuwendijk, A. M. C. H.; van Rooden, E. J.; van den Berg, R. J. B. H. N.; Aerts, J. M. F. G.; van der Marel, G. A.; Codée, J. D. C.; Overkleeft, H. S., Synthesis of 6-Hydroxysphingosine and α -Hydroxy Ceramide Using a Cross-Metathesis Strategy. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (14), 7258-65.
162. Liew, S. K.; Kaldas, S. J.; Yudin, A. K., A Linchpin Synthesis of 6-Hydroxyceramides from Aziridine Aldehydes. *Org. Lett.* **2016**, *18* (24), 6268-71.
163. Imokawa, G.; Abe, A.; Jin, K.; Higaki, Y.; Kawashima, M.; Hidano, A., Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J. Invest. Dermatol.* **1991**, *96* (4), 523-6.
164. Bleck, O.; Abeck, D.; Ring, J.; Hoppe, U.; Vietzke, J. P.; Wolber, R.; Brandt, O.; Schreiner, V., Two Ceramide Subfractions Detectable in Cer(AS) Position by HPTLC in Skin Surface Lipids of Non-Lesional Skin of Atopic Eczema. *J. Invest. Dermatol.* **1999**, *113*, 894.
165. Schreiner, V.; Gooris, G. S.; Pfeiffer, S.; Lanzendorfer, G.; Wenck, H.; Diembeck, W.; Proksch, E.; Bouwstra, J., Barrier characteristics of different human skin types investigated with X-ray diffraction, lipid analysis, and electron microscopy imaging. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *114* (4), 654-60.
166. Jungersted, J. M.; Scheer, H.; Mempel, M.; Baurecht, H.; Cifuentes, L.; Hogh, J. K.; Hellgren, L. I.; Jemec, G. B.; Agner, T.; Weidinger, S., Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema. *Allergy* **2010**, *65* (7), 911-8.
167. 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.
168. Garner, P.; Park, J. M.; Malecki, E., A stereodivergent synthesis of D-erythro-sphingosine and D-threo-sphingosine from L-serine. *J. Org. Chem.* **1988**, *53* (18), 4395-8.
169. Trost, B. M.; Ball, Z. T.; Joge, T., A chemoselective reduction of alkynes to (E)-alkenes. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (27), 7922-3.
170. Steinmetz, B.; Schenk, W. A., Convenient Synthesis of $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)\text{Ru}(\text{NCMe})_3]\text{PF}_6$ and the Phosphine Derivatives $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)\text{Ru}(\text{PR}_3)_2(\text{NCMe})]\text{PF}_6$. *Organometallics* **1999**, *18* (5), 943-6.
171. Beemelmans, C.; Woznica, A.; Alegado, R. A.; Cantley, A. M.; King, N.; Clardy, J., Synthesis of the rosette-inducing factor RIF-1 and analogs. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (29), 10210-3.
172. Novotný, J.; Janušová, B.; Novotný, M.; Hrabálek, A.; Vávrová, K., Short-chain ceramides decrease skin barrier properties. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2009**, *22* (1), 22-30.
173. Müller, S.; Schmidt, R. R., Synthesis of two Unique Compounds, a Ceramide and a Cerebroside, Occurring in Human Stratum Corneum. *J. Prakt. Chem.* **2000**, *342* (8), 779-84.
174. Mori, K.; Matsuda, H., Synthesis of sphingosine relatives, X. Synthesis of (2S,3R,4E)-1-O-(β -D-glucopyranosyl)-N-[30'-(linoleoyloxy)triacontanoyl]-4-icosasphingene, a new esterified cerebroside isolated from human and pig epidermis. *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, *1991*, 529-35.
175. Opálka, L.; Kováčik, A.; Sochorová, M.; Roh, J.; Kuneš, J.; Lenčo, J.; Vávrová, K. i., Scalable synthesis of human ultralong chain ceramides. *Org. Lett.* **2015**, *17* (21), 5456-9.
176. Knothe, G.; Weisleder, D.; Bagby, M. O.; Peterson, R. E., Hydroxy fatty acids through hydroxylation of oleic acid with selenium dioxide/tert.-butylhydroperoxide. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1993**, *70* (4), 401-4.
177. Knothe, G.; Bagby, M. O.; Weisleder, D.; Peterson, R. E., Allylic mono- and di-hydroxylation of isolated double bonds with selenium dioxide-tert-butyl hydroperoxide. NMR characterization of long-chain enols, allylic and saturated 1,4-diols, and enones. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 2* **1994**, (7), 1661-9.
178. Stephenson, L. M.; Speth, D. R., Mechanism of allylic hydroxylation by selenium dioxide. *J. Org. Chem.* **1979**, *44* (25), 4683-9.
179. Singleton, D. A.; Hang, C., Isotope effects and the mechanism of allylic hydroxylation of alkenes with selenium dioxide. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (22), 7554-60.
180. Groen, D.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., Model membranes prepared with ceramide EOS, cholesterol and free fatty acids form a unique lamellar phase. *Langmuir.* **2010**, *26* (6), 4168-75.

181. 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.
182. Sochorová, M.; Staňková, K.; Pullmannová, P.; Kováčik, A.; Zbytovská, J.; Vávrová, K., Permeability Barrier and Microstructure of Skin Lipid Membrane Models of Impaired Glucosylceramide Processing. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 6470.
183. 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.
184. Kováčik, A.; Šilarová, M.; Pullmannová, P.; Maixner, J.; Vávrová, K., Effects of 6-hydroxyceramides on the thermotropic phase behavior and permeability of model skin lipid membranes. *Langmuir.* **2017**, *33* (11), 2890-9.
185. Dahlén, B.; Pascher, I., Molecular arrangements in sphingolipids. Thermotropic phase behaviour of tetracosanoylphytosphingosine. *Chem. Phys. Lipids* **1979**, *24* (2), 119-33.
186. Dahlén, B.; Pascher, I., Molecular arrangements in sphingolipids. Crystal structure of N-tetracosanoylphytosphingosine. *Acta Crystallogr. Sect. B* **1972**, *28* (8), 2396-404.
187. Pascher, I., Molecular arrangements in sphingolipids Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *BBA - Biomembranes* **1976**, *455* (2), 433-51.
188. Shapiro, D.; Flowers, H. M., Studies on Sphingolipids. VII. Synthesis and Configuration of Natural Sphingomyelins. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84* (6), 1047-50.
189. Coward, J.; Ambrosini, G.; Musi, E.; Truman, J. P.; Haimovitz-Friedman, A.; Allegood, J. C.; Wang, E.; Merrill, A. H., Jr.; Schwartz, G. K., Safingol (L-threo-sphinganine) induces autophagy in solid tumor cells through inhibition of PKC and the PI3-kinase pathway. *Autophagy* **2009**, *5* (2), 184-93.
190. Ishida, K.; Obata, Y.; Akagi, C.; Onuki, Y.; Takayama, K., Practical syntheses of D-erythro and L-threo-ceramide [NDS] and difference in contribution of each isomer in microstructure of stratum corneum intercellular lipids. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2014**, *24* (6), 689-93.

10. CURRICULUM VITAE

Mgr. Andrej KOVÁČIK

OSOBNÍ ÚDAJE

- narozen: 28. března 1989 (Nové Zámky, Slovenská republika)
- současná pozice: student doktorského studia, člen vědecké skupiny Skin Barrier Research Group, Katedra organické a bioorganické chemie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové
- telefon: +420 775 140 299
- E-mail: kovacika@faf.cuni.cz

VZDĚLÁNÍ

- od října 2013 – studium prezenční formy doktorského studia na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové, program Organická chemie, obor Bioorganická chemie na Katedře organické a bioorganické chemie (školitel: prof. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.)
- 2008–2013 – studium prezenční formy magisterského studia na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové; diplomová práce na Katedře organické a bioorganické chemie (vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.)
- 2004–2008 – Gymnázium Nové Zámky

OCENĚNÍ

- 2017: 3. místo v soutěži Interpretace vibračních spekter (VŠCHT, Praha)
- 2012: 1. místo na Mezinárodní studentské vědecké konferenci (Zentiva, Praha)

ČLENSTVÍ V ODBORNÝCH SPOLEČNOSTECH

- od 2015: Česká chemická společnost
- od 2014: Česká farmaceutická společnost (sekce: chemická léčiva, klinická farmacie, dějiny farmacie)

ODBORNÉ A PRACOVNÍ STÁŽE

- 2017 (6 měsíců): Institut lékařské fyziky a biofyziky Lékařské fakulty Univerzity Lipsko (prof. Daniel Huster, Lipsko, Spolková republika Německo)
- 2015 (10 dnů): Frankova laboratoř neutronové fyziky (Dr. Norbert Kučerka, JINR, Dubna, Ruská federace)

GRANTY

- od 2016: Grantová agentura České republiky (GAČR) a Grantová agentura Spolkové republiky Německo (16-25687): „Interdependencies between Inflammatory Processes and Barrier Lipids in Diseased Skin“ (ve spolupráci s prof. Sarah Hedtrich, Freie Universität Berlin) – spolupracovník
- 2014–2017: Grantová agentura Univerzity Karlovy (GAUK 1868214) – **hlavní řešitel**
- od 2013: GAČR: „Lipid membrane models – a new tool for studying pathophysiology of skin diseases at a molecular level“ (13-23891S) – spolupracovník
- 2011–2013: GAČR: „Synthesis and structure-activity relationships of skin ceramides and compounds targeting them“ (207/11/0365) – spolupracovník

ODBORNÉ PUBLIKACE

- počet citací (bez autocitací) – **32**, **h-index 4** (Web of Science, 03. 10. 2017)

1. Svoboda M, Hlobilová M, Marešová M, Sochorová M, **Kováčik A**, Vávrová K, Dolečková I. Comparison of Suction Blistering and Tape Stripping for Analysis of Epidermal Genes, Proteins and Lipids. *Arch. Dermatol. Res.* **2017**, v tisku, DOI: 10.1007/s00403-017-1776-6.
2. Stahlberg S, Eichner A, Sonnenberger S, **Kováčik A**, Lange S, Schmitt T, Demé B, Hauss T, Dobner B, Neubert RHH, Huster D. The Influence of a Novel Dimeric Ceramide Molecule on the Nanostructure and the Thermotropic Phase Behavior of a Stratum Corneum Model Mixture. *Langmuir.* **2017**, 33(36):9211-9221 (IF₂₀₁₆ = 3,833).
3. Sochorová M, Staňková K, Pullmannová P, **Kováčik A**, Zbytovská J, Vávrová K. Permeability Barrier and Microstructure of Skin Lipid Membrane Models of Impaired Glucosylceramide Processing. *Sci. Rep.* **2017**, 7(1):6470 (IF₂₀₁₆ = 4,259).
4. Vávrová K, **Kováčik A**, Opálka L. Ceramides in the Skin Battier. *Eur. Pharm. J.* **2017**, 64 (1):1-8.
5. Pullmannová P, Pavlíková L, **Kováčik A**, Sochorová M, Školová B, Slepíčka P, Maixner J, Zbytovská J, Vávrová K. Permeability and Microstructure of Model Stratum Corneum Lipid Membranes Containing Ceramides With Long (C16) and Very Long (C24) Acyl Chains. *Biophys. Chem.* **2017**, 224:20-31 (IF₂₀₁₆ = 2,402).
6. **Kováčik A**, Šilarová M, Pullmannová P, Maixner J, Vávrová K. Effects of 6-Hydroxyceramides on the Thermotropic Phase Behavior and Permeability of Model Skin Lipid Membranes. *Langmuir.* **2017**, 33(11):2890-2899 (IF₂₀₁₆ = 3,833).
7. Školová B, **Kováčik A**, Tesař O, Opálka L, Vávrová K. Phytosphingosine, Sphingosine and Dihydrosphingosine Ceramides in Model Skin Lipid Membranes: Permeability and Biophysics. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes.* **2017**, 1859(5):824-834 (IF₂₀₁₆ = 3,498).
8. Opálka L, **Kováčik A**, Maixner J, Vávrová K. Omega-O-acylceramides in Skin Lipid Membranes: Effects of Concentration, Sphingoid Base and Model Complexity on Microstructure and Permeability. *Langmuir.* **2016**, 32(48):12894-12904 (IF₂₀₁₆ = 3,833).
9. **Kováčik A**, Opálka L, Šilarová M, Roh J, Vávrová K. Synthesis of 6-Hydroxyceramide Using Ruthenium-Catalyzed Hydrosilylation-Protodesilylation. Unexpected Formation of a Long Periodicity Lamellar Phase in Skin Lipid Membranes. *RSC Adv.* **2016**, 6(77):73343-73350 (IF₂₀₁₆ = 3,108).
10. Opálka L, **Kováčik A**, Sochorová M, Roh J, Kuneš J, Lenčo J, Vávrová K. Scalable Synthesis of Human Ultralong Chain Ceramides. *Org. Lett.* **2015**, 17(21):5456-59 (IF₂₀₁₆ = 6,579).
11. Wallmeyer L, Lehnen D, Eger N, Sochorová M, Opálka L, **Kováčik A**, Vávrová K, Hedtrich S. Stimulation of PPARalpha Normalizes the Skin Lipid Ratio and Improves the Skin Barrier of Normal and Filaggrin Deficient Reconstructed Skin. *J. Dermatol. Sci.* **2015**, 80(2):102-110 (IF₂₀₁₆ = 3,733).
12. **Kováčik A**, Roh J, Vávrová K. The Chemistry and Biology of 6-Hydroxyceramide, the Youngest Member of the Human Sphingolipid Family. *ChemBioChem.* **2014**, 15(11):1555-1562 (IF₂₀₁₆ = 2,847).
13. Školová B, Hudská K, Pullmannová P, **Kováčik A**, Palát K, Roh J, Fleddermann J, Estrela-Lopis I, Vávrová 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**, 18(35):10460-70 (IF₂₀₁₆ = 3,177).

ODBORNÉ PUBLIKACE V RECENZNÍM ŘÍZENÍ

1. **Kováčik A**, Pullmannová P, Maixner J, Vávrová K. Effects of Ceramide and Dihydroceramide Stereochemistry at C-3 on the Microstructure, Thermotropic Phase Behavior and Permeability of Skin Lipid Membranes. *V recenzním řízení*.
2. Čuříková B A, Procházková K, Filková B, Diblíková P, Svoboda J, **Kováčik A**, Vávrová K, Zbytovská J. Simplified Stratum Corneum Model Membranes for Studying the Effects of Permeation Enhancers. *V recenzním řízení*.

PREZENTACE NA KONFERENCÍCH

- 2017:
 - European Epidermal Barrier Research Network, Salzburg, Rakousko (přednáška)
 - Sphingolipid Club Meeting, Trabia, Sicílie, Itálie (poster)
- 2016:
 - Postgraduální a postdoktorandská konference, Hradec Králové, ČR (přednáška)
 - Perspectives in Percutaneous Penetration, La Grande Motte, Francie (poster)

- Česká lipidomická konference, Praha, ČR (poster)
- Syntéza a analýza léčiv, Hradec Králové, ČR (přednáška)
- European Joint Theoretical/Experimental Meeting on Membranes, Bratislava, Slovensko (poster)
- 2015:
 - Postgraduální a postdoktorandská konference, Hradec Králové, ČR (přednáška)
 - Gordon Research Conference: Barrier Function of Mammalian Skin, Waterville, New Hampshire, USA (poster)
 - Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, Olomouc, ČR (poster)
- 2014:
 - Postgraduální a postdoktorandská konference, Hradec Králové, ČR (přednáška)
 - Perspectives in Percutaneous Penetration, La Grande Motte, Francie (poster)
 - Skin Forum (Percutaneous Penetration – Measurement, Modulation and Modelling), Praha, ČR (poster)
 - Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, Lázně Bělohrad, ČR (poster)
- 2013:
 - Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, Špindlerův Mlýn, ČR (poster)
- 2012:
 - Mezinárodní studentská vědecká konference, Praha, ČR (přednáška, 1. místo)

JINÉ AKTIVITY

- 2016: spoluautor na dni otevřených dveří Katedry anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové
- od 2016: spolupráce s firmou SCIO – řešitel a korektor testů z chemie pro studenty středních škol
- 2015: hlavní autor a koordinátor expozice Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové na akci „Nábřeží vysokých škol“ (Hradec Králové)
- 2014: hlavní autor a koordinátor expozice Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové na akci „Nábřeží vysokých škol“ (Hradec Králové); tisková zpráva – **Kováčik A.** *Čas. čes. lék.* 2014, 86(10): 29
- 2013: spoluautor expozice Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové na akci „Den vědy“ (Praha); tisková zpráva – **Kováčik A.**, Pilařová V. *Čas. čes. lék.* 2013, 85(12): 26
- od 2011: brigádník a průvodce v Českém farmaceutickém muzeu v Kuksu

PŘÍLOHY
