

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra anorganické a organické chemie



**PŘÍPRAVA ANALOGŮ CERAMIDŮ  
A DIHYDROCERAMIDŮ A HODNOCENÍ JEJICH VLIVU  
NA BARIÉROVOU FUNKCI KŮŽE**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Doc. PhramDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

Květen 2012, v Hradci Králové

Kateřina Jandovská

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji především své školitelce Doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za ochotu, cenné rady a trpělivý přístup.

## ABSTRAKT

Jandovská, Kateřina: Příprava analogů ceramidů a hodnocení jejich vlivu na bariérovou funkci kůže.

Ceramidy patří mezi sfingolipidy, jejichž molekulu tvoří sfingoidní báze a dlouhá mastná kyselina. Jsou dosud známy nejenom jako důležití druzí poslové hrající významnou úlohu v buněčné diferenciaci, proliferaci a apoptóze, ale zároveň i jako podstatná složka funkční kožní bariéry. Ačkoli jsou tyto molekuly intenzivně studovány, přesný vliv jejich struktury na bariérovou funkci kůže není znám. Cílem mé práce bylo studovat vliv délky acylu a stereochemie na C3 u dihydroceramidů (tedy ceramidů bez dvojně vazby v poloze 4) na prostupnost modelových membrán simulujících kožní bariéru. Mým úkolem byla syntéza tří ceramidů s krátkým acylovým řetězcem o čtyřech uhlících (odvozených od dihydrosfingosinu (dS), *L-threo*-dihydrosfingosinu (L-dS), a *L-threo*-sfingosinu (L-S)), příprava modelových membrán stratum corneum (SC) obsahujících dihydroceramidy s délkami acylu C2, C4, C6, C8 a C24 a připravené stereoizomery C4-ceramidů a C4-dihydroceramidů a následné hodnocení jejich elektrické impedance a permeability pro dvě modelová léčiva. Vliv připravených produktů nanesených na modelové membrány na permeabilitu těchto membrán byl hodnocen ve Franzových difuzních celách pomocí měření elektrické impedance a dvou modelových léčiv – theofylinu (TH) a indometacinu (IND). Donorové vzorky představovaly suspenze TH (5%) či IND (2%) v 60% propylenglykolu. Analýza odebraných vzorků byla provedena metodou HPLC. Hodnocení vlivu zkoumaných analogů ceramidů na permeabilitu modelových membrán simulujících kůži ukázalo, že ceramidy a dihydroceramidy se chovají sice podobně, nicméně závislost délky acylu na permeabilitě membrán měla jiný charakter než u ceramidů. Nejmenší hodnoty impedance byly naměřeny pro dihydroceramidy s dvojuhlíkatým řetězcem. Maximálního zvýšení permeability bylo dosaženo aplikací analogu s dvojuhlíkatým acylem pro TH a se čtyřuhlíkatým acylem pro IND. Překvapivé bylo chování *L*-izomerů. Zatímco *L*-izomer ceramidu vykazoval nejvyšší impedanci, *L*-izomer dihydroceramidu nejnižší. Výsledky práce ukázaly některé společné a rozdílné vlastnosti ceramidů a dihydroceramidů a také upozornily na význam konfigurace na C3. Další vztahy mezi strukturou a účinkem ceramidů ovšem zůstávají předmětem zkoumání.

## ABSTRACT

Jandovská, Kateřina: Synthesis of ceramide and dihydroceramide analogues and evaluation of their effects on the skin barrier properties.

Ceramides belong to sphingolipids, their molecule is formed by a sphingoid base and long fatty acid. They are known not just as important second messengers playing a significant role in cell differentiation, proliferation and apoptosis, but also as essential part of functional skin barrier. Although these molecules are studied intensively, the exact effect of their structure on barrier function of the skin is poorly understood. The aim of my work was to study the effect of acyl chain length and stereochemistry on C3 of dihydroceramides (ceramides with single bond on C4) on the permeability of model membranes simulating the skin barrier. I have synthesized 3 ceramides with short acyl chain of 4 carbons (derived from dihydrosphingosine (dS), *L-threo*-dihydrosphingosine (L-dS) and *L-threo*-sphingosine (L-S)), and prepared model membranes of stratum corneum (SC) containing dihydroceramides with C2, C4, C6, C8 and C24 acyl chain length and stereoisomers of C4-ceramides and C4-dihydroceramides as well. I have evaluated their electrical impedance and permeability for two model drugs. The effects of the prepared ceramides on the model membrane permeability were evaluated in Franz diffusion cells using two model drugs – theophylline (TH) and indomethacin (IND). Donor samples contained suspension of theophylline (5%) or indomethacin (2%) in 60% propylene glycol. The amount of the model drugs in the acceptor phase samples was determined by HPLC. The evaluation of the effect of prepared ceramide analogues on model membrane permeability simulating skin showed that ceramides and dihydroceramides have similar properties, but the relationship between acyl chain length on membrane permeability had different character than in ceramides. The lowest values of impedance were measured for dihydroceramides with 2-carbon acyl chain. Maximum increase in permeability was achieved in the membrane containing the analogue with 2-carbon acyl chain for TH and with 4-carbon acyl chain for IND. The behaviour of *L-threo*-isomers was surprising. While *L-threo*-isomer of ceramide displayed the highest impedance, *L-threo*-isomer of dihydroceramide showed the lowest one. The results of this work showed some similar and some different features of ceramides and dihydroceramides and pointed out the impact of C3 configuration. Other structure-activity relationships in the ceramide molecule require further investigation.

# 1. OBSAH

PROHLÁŠENÍ.....	2
PODĚKOVÁNÍ.....	3
ABSTRAKT .....	4
ABSTRACT.....	5
1. OBSAH.....	6
2. CÍL PRÁCE .....	8
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	9
3.1 Vlastnosti kůže.....	9
3.2 Stratum corneum.....	10
3.3 Ceramidy a jejich strukturní typy .....	10
3.4 Biosyntéza ceramidů.....	13
3.5 Uspořádání lipidů SC.....	13
3.6 Poruchy bariérové funkce a onemocnění kůže .....	14
3.6.1 Atopická dermatitida (AD) .....	14
3.6.2 Psoriáza .....	15
3.6.3 Ichtyózy .....	15
3.6.4 Akné.....	15
3.6.5 Další stavy spojené s deficitem ceramidů.....	16
3.7 Ceramidy odvozené od dS .....	16
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	18
4.1 Chemikálie a přístroje .....	18
4.2 Syntéza.....	19
4.2.1 Syntéza <i>N</i> -[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )-1,3-dihydroxyoktadecan-2-yl]butyramidu ((2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> ) CerNdS4).....	19
4.2.2 Syntéza <i>N</i> -[(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )-1,3-dihydroxyoktadecan-2-yl]butyramidu ((2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> ) CerNdS4) .....	21
4.2.3 Syntéza <i>N</i> -[(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>E</i> )-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl]butyramidu ((2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> ) CerNS4).....	22

4.3 Příprava modelových lipidových membrán SC .....	24
4.4 Permeační pokusy .....	25
4.4.1 Modelová léčiva, složení donorových vzorků .....	25
4.4.2 Permeace .....	25
4.4.3 Měření elektrické impedance .....	26
4.4.4 Podmínky HPLC analýzy .....	26
5. VÝSLEDKY A DISKUSE .....	27
6. ZÁVĚR .....	30
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	31
8. LITERATURA .....	32

## 2. CÍL PRÁCE

Ceramidy patří mezi sfingolipidy, jejichž molekulu tvoří sfingoidní báze a dlouhá mastná kyselina. Výzkum těchto látek je v poslední době velmi intenzivní, odkrývání jejich rozmanitých úloh v organismu totiž poukazuje na jejich komplexnost a tedy i potřebu toto pole blíže zkoumat. Ceramidy jsou dosud známy nejenom jako důležité bioaktivní poslové hrající významnou úlohu v buněčné diferenciaci, proliferaci a apoptóze [1], ale také, jak se ukazuje, jako zásadně důležitá složka kůže umožňující život na Zemi [2].

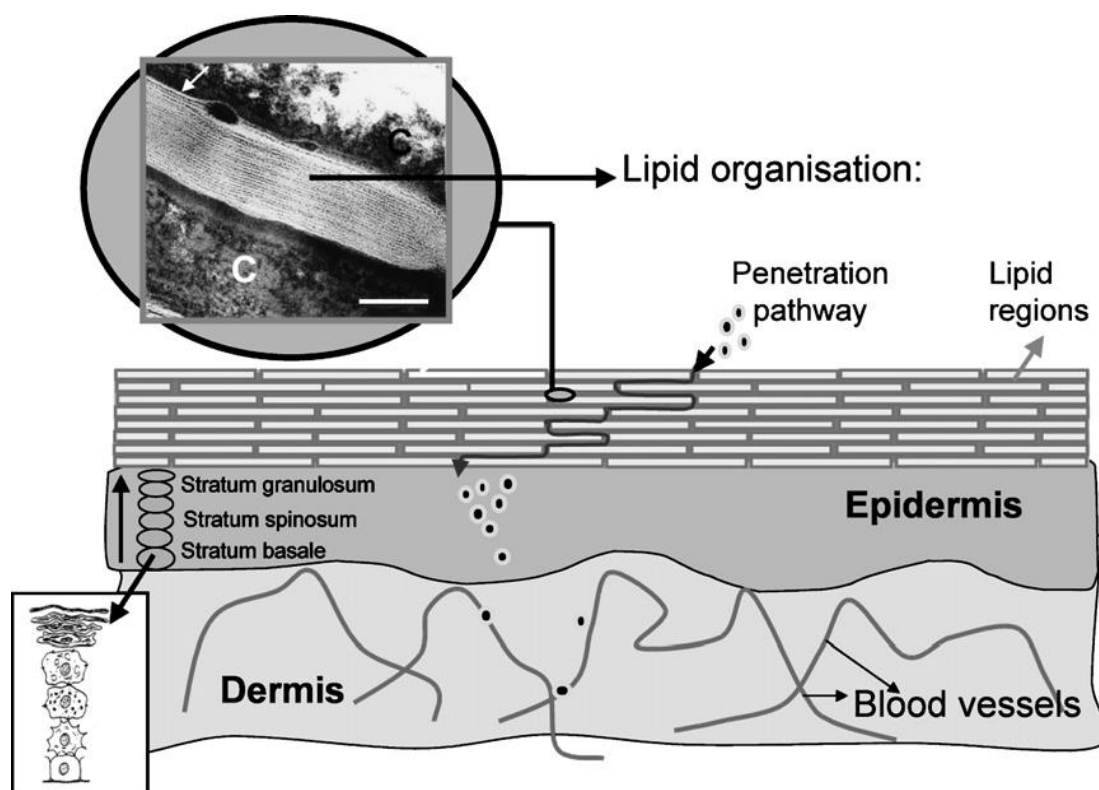
Dřívější studie poukazují na vliv délky acylové části těchto molekul na prostupnost kůže [3]. Cílem mé práce bylo studovat vliv délky acylu a stereochemie na C3 u dihydroceramidů (tedy ceramidů bez dvojné vazby v poloze 4) na prostupnost modelových membrán simulujících kožní bariéru. Mým úkolem byla syntéza tří fyziologicky se nevyskytujících ceramidů s krátkým acylovým řetězcem o čtyřech uhlících (odvozených od dS, L-dS a L-S), příprava modelových membrán SC obsahujících dihydroceramidy s délkami acylu C2, C4, C6, C8 a C24 a připravené stereoizomery C4-ceramidů a C4-dihydroceramidů a následné hodnocení jejich elektrické impedance a permeability pro dvě modelová léčiva.



### 3. TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1 Vlastnosti kůže

Primární funkcí kůže je chránit tělo před ztrátami vody a dalších fyziologicky důležitých složek a zabraňovat vstupu potenciálně toxickým sloučeninám, dráždivým látkám, alergenům a patogenům [3]. Bez této bariéry by přežití na Zemi bylo nemyslitelné [4]. Kůže je tvořena svrchní nevaskularizovanou epidermis a spodní vrstvou zvanou dermis, bohatě cévně zásobenou. Epidermis dále dělíme do 4 vrstev, a to směrem zevnitř k povrchu na stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum a SC, přičemž hlavní bariérové funkce a ochrana jsou zajišťovány vrstvou nejsvrchnější, tedy SC (obr. 1) [5].



Obr.1 Schématický nákres průřezu kůže [5].

Kůže sestává z dermis a epidermis. Dermis – spodní část - je tvořena fibroblasty a extracelulární matrix [6]. V bazální vrstvě epidermis buňky proliferují. Po opuštění této vrstvy se buňky začnou diferencovat a migrovat směrem k povrchu. Na rozhraní mezi stratum granulosum a SC dochází ke konečné diferenciaci, během které se živé buňky přetransformují na mrtvé, keratinem naplněné buňky - korneocyty. Ty jsou obklopeny buněčnou obálkou sestávající ze zesíťovaných proteinů a kovalentně vázaného lipidového

obalu [5]. SC bývá často strukturou připodobňováno ke zdi z cihel, kde korneocyty představují cihly a mezibuněčné lipidy zase reprezentují maltu [7]. Proces zrání epidermálních buněk, jehož výsledkem je kompetentní kožní bariéra, se nazývá keratinizace. Celkově se celá epidermis obnoví za 30 dní, z toho 15 dní trvá obnova SC [8]. Výsledkem tohoto procesu je vrstva 18 - 21 buněk (10 – 20  $\mu\text{m}$ ) na samém povrchu kůže. Tyto buňky se pak v průběhu času odlupují, hovoříme o tzv. deskvamaci [6].

### ***3.2 Stratum corneum***

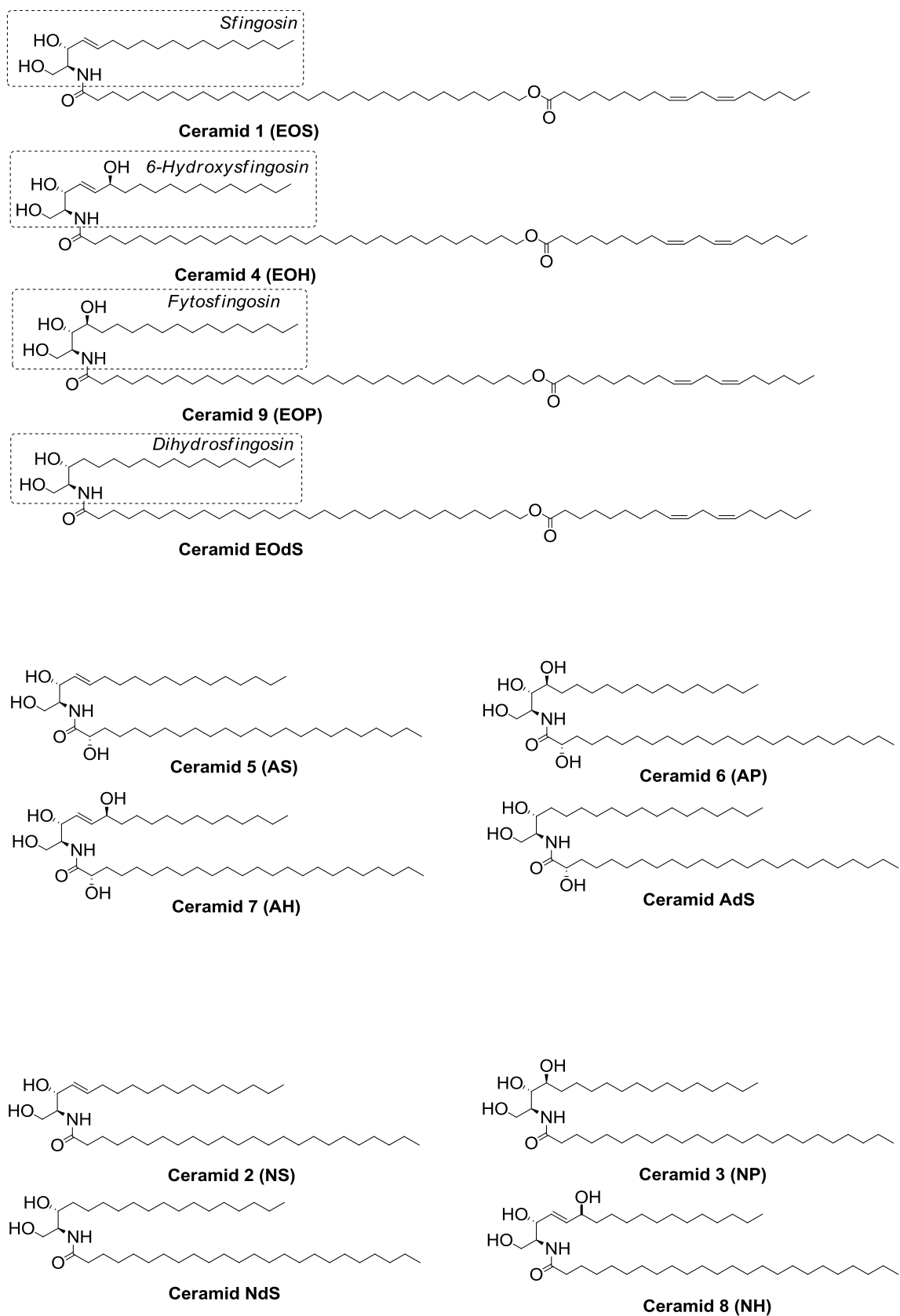
Pro pochopení bariérové funkce SC se detailněji podíváme na chemické složení této vrstvy, protože to do značné míry determinuje její fyzikálně-chemické vlastnosti a zapříčiňuje podstatu jejího chování. SC je složeno ze 75–80 % z proteinů, 5–15 % lipidů a zbytek tvoří další organické sloučeniny a voda, včetně přirozených zvlhčujících faktorů (aminokyseliny, močovina, laktamy aj.), které udržují kůži měkkou, poddajnou a vláčnou. Proteiny jsou obsaženy především v korneocytech (asi 70 %  $\alpha$ -keratinu a přibližně 10 %  $\beta$ -keratinu) a asi 15 % proteinů představuje jiné peptidické struktury, včetně kožních enzymů [8; 6]. Na soudržnosti SC se navíc podílí desmosomy, což jsou proteinové spojky mezi jednotlivými buňkami [9]. Korneocyty jsou vysoce nerozpustné a velmi rezistentní k působení chemikálií. Intercelulární prostor SC je vyplněn směsí specifických lipidů s malým množstvím vody. Lipidy tvoří lamely, složené z několika dvojrstev, které jsou uspořádány tak, že směřují svou hydrofobní částí dovnitř a hydrofilní, tvořenou hydroxylovými a karbonylovými skupinami vně, do vodného prostředí. Lamely jsou tvořeny přibližně z 50 % ceramidy, 25 % cholesterolem, 10 % volnými mastnými kyselinami. Zbytek tvoří organické estery cholesterolu a cholesterol sulfát [6].

### ***3.3 Ceramidy a jejich strukturní typy***

Hlavními polárními lipidy SC je 12 druhů ceramidů. Ty se od sebe liší stavbou polární hlavy. Když vezmeme v úvahu ještě průměrnou délku řetězců, je ceramidů přes 350 druhů. Bazický alkohol, kterým může být sfingosin (S), fytosfingosin (P), 6-hydroxysfingosin (H) nebo dihydrosfingosin (dS), je základem molekuly ceramidu. Na jejich primární aminoskupinu v poloze 2 se amidicky váže mastná kyselina (N), která může v poloze  $\alpha$  (A) anebo  $\omega$  (O) obsahovat hydroxyskupinu. Délka mastné kyseliny se pohybuje od 16 až po 34 uhlíků v  $\omega$ -hydroxylovaných ceramidech. Zvláště významné jsou

tří typy ceramidů, které obsahují  $\omega$ -hydroxykyselinu o délce přibližně 30 uhlíků, na jejíž koncový hydroxyl se estericky váže esenciální mastná kyselina, kyselina linolová (EO) [8]. Ceramidy patří mezi nejhydrofobnější membránové lipidy, což vysvětluje jejich velké množství ve SC, přičemž jejich rozpustnost ve vodě je zanedbatelná. Proto nemohou volně přirozeně ceramidy s dlouhým řetězcem existovat v roztocích biologických tekutin nebo v cytosolu [10]. Obecně molekula ceramidu obsahuje polární hlavu a dva hydrofobní řetězce, podobně jako fosfolipidy. Na rozdíl od fosfolipidů, tvořících běžné buněčné membrány, je však polární hlava ceramidů výrazně menší, což umožňuje těsnější uspořádání těchto lipidů v lamely. Ceramidy SC mají navíc podstatně delší hydrofobní řetězce a vytvářejí ne dvojvrstvy, ale několikavrstvé, vzájemně propojené lamelární struktury. Tyto strukturální znaky vysvětlují, proč je propustnost ceramidových lamel SC řádově tisíckrát nižší, než je tomu u fosfolipidových dvojvrstev [8].

Jak již bylo zmíněno výše, v lidské kůži se přirozeně vyskytuje 12 strukturálních typů ceramidů, které vznikají kombinací čtyř různých sfingoidních bází a 3 různých druhů acylů. Dříve se označovaly arabskými číslicemi podle pořadí eluce při chromatografii [11; 12]. S rostoucím počtem nově objevených ceramidů ovšem tato nomenklatura přestala vyhovovat, a tak bývá více využíván systém pojmenování ceramidů podle Motty, kde se používá označení pomocí kombinací písmen (obr. 2) [13].



Obr. 2 Strukturní typy ceramidů, Mottova nomenklatura v závorce.

### **3.4 Biosyntéza ceramidů**

Syntéza jednotlivých druhů ceramidů, ač je nacházíme napříč celou epidermis, se zvyšuje s epidermální buněčnou diferenciací [14].

Lamelární granula, vyplněná stohy lipidických disků, mají v procesu tvorby lipidových lamel zásadní význam. Prekurzory ceramidů, respektive jejich méně lipofilní transportní formy - glukosylceramidy a sfingomyeliny - jsou syntetizovány ze serinu a palmitoylkoenzymu A a skladovány v těchto granulech, dříve nazývaných také Odlandova tělíska. V pozdní fázi diferenciacie keratinocyty (na rozhraní stratum granulosum a SC) tělíska migrují k vnější části buňky, kde se jejich membrána spojí s plazmatickou membránou a lipidy jsou uvolněny do mezibuněčného prostoru. Glukocerebrosidáza a sfingomyelináza – současně uvolněné enzymy – zajistí, že dojde k metabolizaci prekurzorů lipidů, jednotlivé disky fúzí a vytvoří lipidové lamely, které zcela vyplní mezibuněčné prostory [15; 8]. Vně se dostanou také mastné kyseliny a cholesterol [8].

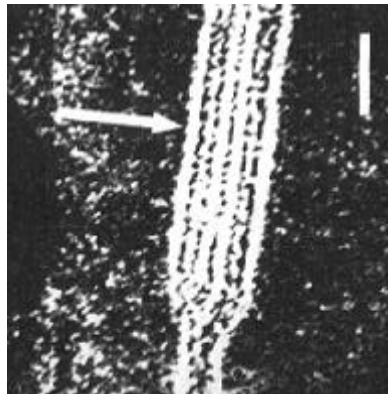
### **3.5 Uspořádání lipidů SC**

Ceramidy, podobně jako např. fosfolipidy, obsahují polární hlavu a dva hydrofobní řetězce. Ceramidy ale mají na rozdíl od fosfolipidů zřetelně menší polární hlavu a výrazně delší hydrofobní řetězce, to umožní těsnější uspořádání a současné vytvoření navzájem propojených několikvrstevných lamelárních struktur [16; 17].

Ceramidy, ve kterých je sfingosin nebo jeho derivát navázán na *O*-hydroxykyselinu s 30-34 uhlíky, jejíž hydroxyl je esterifikován kyselinou linolovou, hrají z hlediska stavby lamel a jejich organizace významnou roli. Tento typ ceramidu je jakousi matricí, okolo které jsou uspořádány ostatní ceramidy, jejichž acylová část je tvořena kyselinami s 20-24 uhlíky. Z mastných kyselin jsou ve SC přítomny především kyselina behenová ( $C_{22}$ ) a lignocerová ( $C_{24}$ ), v menším zastoupení pak palmitová, stearová aj. Významnou složkou lipidové matrix je cholesterol, který v SC funguje jako stabilizátor lipidických struktur [6].

Při analýze elektronovým mikroskopem (obr. 3) byly zaznamenány světlé proužky pravidelně se opakující v tomto algoritmu: široký pruh – úzký pruh – široký pruh. Existují skupiny po třech, šesti, devíti a dvanácti, přičemž nejčastější strukturou je ta se šesti pruhy. V širokých pásích na koncích mezibuněčného prostoru jsou lipidy kovalentně vázané na povrch buňky, jedná se o ceramidy s dlouhými řetězci. V úzkých pruzích, kterým

říkáme také molekulové zipy, se nachází cholesterol a jeho deriváty a zbytky kyseliny linolové [18].



Obr. 3 Snímek z elektronového mikroskopu se dvěma korneocyty (černě) a šestivrstvou lipidovou lamelou (světlá, označena šipkou); značka odpovídá 25 nm [19].

### ***3.6 Poruchy bariérové funkce a onemocnění kůže***

U mnoha onemocnění, která souvisí se sníženou funkcí kožní bariéry, lze nalézt prokazatelný úbytek ceramidů [20].

Mezi nejčastější stavy spojené s nedostatkem ceramidů řadíme atopickou dermatitidu, psoriázu, různé typy ichthyózy a jiné hyperkeratózy, dokonce i akné.

#### **3.6.1 Atopická dermatitida (AD)**

AD, neboli dermatitis atopica, je svědivé kožní onemocnění podmíněné atopickou diatézou, tedy zvýšeným sklonem k alergickým projevům, s výrazným podílem dědičnosti. Konstitučně bývá přítomna suchá, chladná, olupující se kůže, suché vlasy a bílý dermografismus [21]. Prevalence tohoto onemocnění je 15-20% a toto číslo stále roste. AD řadíme mezi onemocnění s imunologickým základem, výzkum na tomto poli ovšem také popisuje významné poruchy kožní bariéry. Alergenům, dráždivým látkám a mikrobům je umožněn vstup do kůže poškozenou kožní bariérou; zde dochází k aktivaci cytokinů a ke vzniku zánětu. Vlivem zánětlivých působků pak dochází k dalšímu poškození kožní bariéry a tzv. „bludný kruh AD“ se uzavírá. Předmětem četných diskuzí i nadále zůstává otázka, jestli je primární příčinou onemocnění porucha kožní bariéry nebo imunitní odpovědi. S největší pravděpodobností se na vzniku onemocnění podílejí oba mechanismy [8].

Byly identifikovány možné příčiny výše popsaného. U nemocných s AD se objevuje enzym glukosylceramid-sfingomyelin deacyláza, která degraduje oba prekurzory ceramidů, dále bylo popsáno, že sfingomyelináza produkující ceramidy vykazuje sníženou aktivitu a také byl zjištěn zvýšený výskyt bakterií produkujících ceramidázu [20; 22; 8].

### **3.6.2 Psoriáza**

Psoriasis vulgaris neboli lupénka - jde o chronické kožní onemocnění s poruchou keratinizace povrchových vrstev kůže. Její příčina je neznámá, značný význam má dědičnost a imunitní procesy v kůži [23]. Charakterizovaná je hyperproliferačí a poruchami diferenciace keratinocytů a vyšší propustností kůže. Podobně jako u AD bylo u této nemoci nalezeno nižší množství ceramidů, a to i kovalentně vázaných, zejména obsahujících fytosfingosin. Nedostatek ceramidů je zapříčiněn zřejmě nižší expresí glukocerebrosidázy, díky níž je v SC menší množství ceramidů, vznikajících z glukosylceramidů. Dalším důvodem pak může být také snížená syntéza ceramidů ze serinu. Kůži také významně ovlivňuje snížené množství prosaposinu, prekurzoru sfingolipidy-aktivujícího proteinu [20; 22; 8].

### **3.6.3 Ichtyózy**

Skupina kožních onemocnění s poruchou keratinizace, u nichž vzhled kůže připomíná rybí šupiny [24]. Ichtyózou se rozumí rozsáhlá skupina dědičných i získaných hyperkeratóz, které se typicky projevují ztlustělým a šupinatým SC. Důvodem této nemoci může být zvýšená proliferace keratinocytů, snížená deskvamace nebo poruchy metabolismu lipidů SC, zejména ceramidů [8]. Nedávné studie zabývající se genetickými příčinami specifické kongenitální ichtyózy dávají tuto vážnou poruchu kůže do souvislosti s chybným transportem lipidů (obzvláště sfingolipidů) [25].

### **3.6.4 Akné**

Akné je kožní onemocnění charakterizované zánětem mazových žláz [26]. I u akné najdeme změny ve složení ceramidů, především pak nižší množství ceramidu EOS, ve kterém je obsažena esenciální mastná kyselina linolová. K nejvýraznějšímu poklesu dochází v komedonech [8].

### 3.6.5 Další stavy spojené s deficitem ceramidů

Nižší výskyt ceramidů byl zaznamenán u suché a stárnoucí kůže, kde ve věkové kategorii 41-50 let byl výskyt ceramidů zejména v obličejové části až o polovinu nižší než u skupiny ve věkové kategorii 21-30. Stárnoucí kůže se také nedokáže dobře regenerovat, protože má zhoršenou schopnost syntézy ceramidů de novo [8]. Na jaře a v létě množství ceramidů stoupá, v zimě výrazně klesá [27]. U žen je množství ceramidů závislé na hladině hormonální [28]. Dále ovlivňuje množství ceramidů UV záření a to tak, že při malém množství se syntéza ceramidů zvyšuje (tento poznatek se využívá pro léčbu AD fototerapií), kdežto dávky vyšší vypůsobí poškození kožní bariéry, sníží množství ceramidů vázaných kovalentně a jsou schopné vyvolat zánět [29]. Také psychický stres negativně ovlivní kožní bariéru – zvyšuje se při něm propustnost kůže a snižuje schopnost regenerace [8].

### 3.7 Ceramidy odvozené od dS

Ve SC se vyskytují 3 základní třídy ceramidů, ve kterých je sfingoidní část tvořena dS, tedy dihydroceramidy. Jsou to NdS, AdS a EOdS, který byl objeven teprve nedávno [30]. Od těchto základních struktur je odvozeno mnoho dalších, např. ceramidy lidských vlasů obsahují mj. dihydrosfingosinové jednotky nejen s 18 uhlíky, ale i s počtem 16, 17, 19 nebo 20 uhlíků a nehydroxylované mastné kyseliny nejen se sudým počtem uhlíků, ale i s počtem lichým [31].

Existují dvě metabolické cesty tvorby ceramidů v organismu: tvorba nových ceramidů skrze degradaci již existujících a syntéza de novo. První zmíněná zahrnuje degradaci komplexních sfingolipidů v lysozomech a následnou tvorbu ceramidů a sfingosinu [32]. De novo syntéza ceramidů ve SC probíhá v tomto sledu:

1. tvorba 3-ketodS z palmitoylCoA a L-serinu serinpalmitoyltransferázou
2. tvorba dS z 3-ketodS 3-ketodSreduktázou
3. tvorba  $\alpha$ -hydroxy mastné kyseliny z nehydroxylované mastné kyseliny 2-hydroxylázou
4. tvorba ceramidu NdS a ceramidu AdS z dS a nehydroxylované mastné kyseliny a 2-hydroxy mastné kyseliny (ve formě koenzymu A) ceramidsyntázou 1-6
5. tvorba ceramidu NS a ceramidu AS z ceramidu NdS a ceramidu AdS dihydroceramididesaturázou



6. tvorba ceramidu NP a ceramidu AP z ceramidu NdS a ceramidu AdS  
hydroxylázou [31]

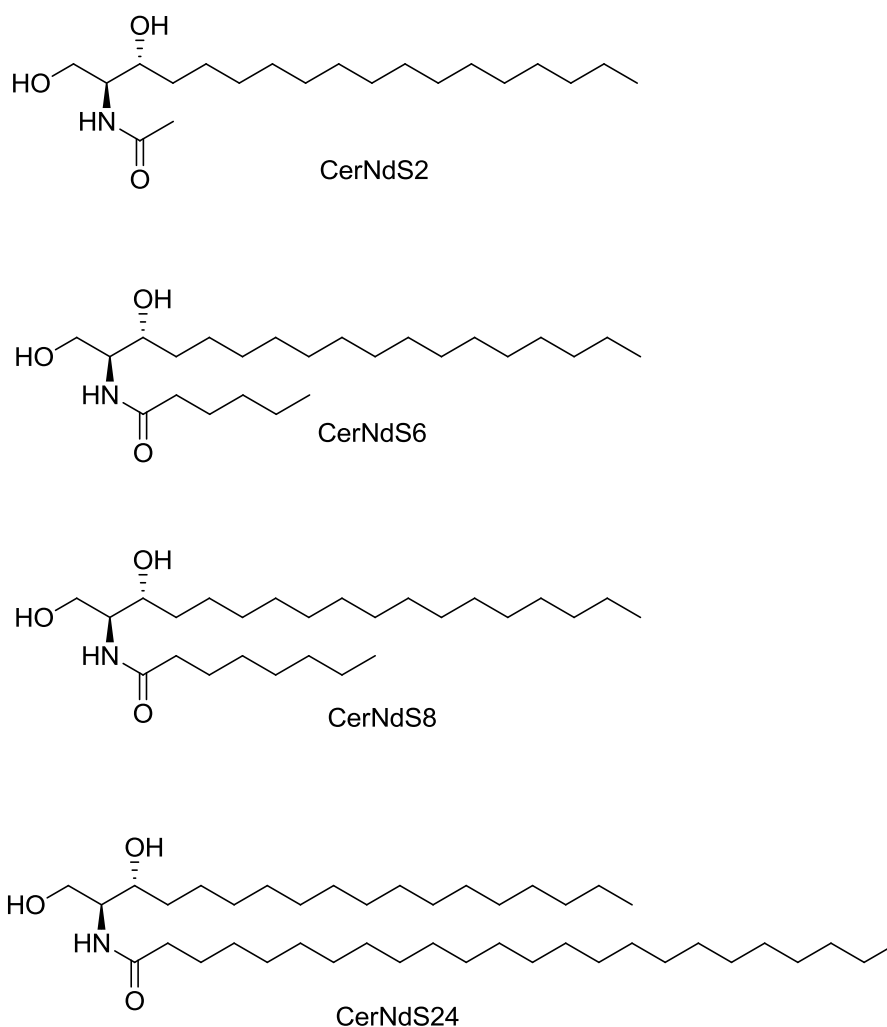
Vidíme tedy, že nejdříve vznikají dihydroceramidy (krok 4.), potom teprve ceramidy (krok 5., 6.).

Pověst dihydroceramidů jako lipidů postrádajících biologickou aktivitu pochází z některých studií z 90. let [33; 34]. Poslední studie však naznačují, že dihydroceramidy, ač je jejich aktivita odlišná od té zjištěné u ceramidů, se chovají jako bioaktivní lipidy, které dokonce snižují apoptotické vlivy ceramidů v buňkách [35]. Jejich role v kůži však známa není, proto jsme se v této práci zaměřili na jejich srovnání s ceramidy odvozenými od S.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Chemikálie a přístroje

Dihydroceramidy NdS2, NdS6, NdS8 a NdS24 (obr. 4) a sfingoidní báze (viz níže) byly zakoupeny od firmy Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Ostatní chemikálie a rozpouštědla pochází z firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo). Tenkovrstevné chromatografie byly provedeny na TLC deskách Silica gel 60 F254, výrobce firma Merck (Darmstadt, Německo). Na Koflerově přístroji byly změřeny teploty tání produktů. Připravené látky byly charakterizovány IČ spektry (spektrofotometr Nicolet FT-IR 6700) a spektry NMR (přístroj Varian Mercury-Vx BB),  $^1\text{H}$  při 300 MHz a  $^{13}\text{C}$  při 75 MHz.



Obr. 4 Dihydroceramidy s délkami acylu 2, 6, 8 a 24.

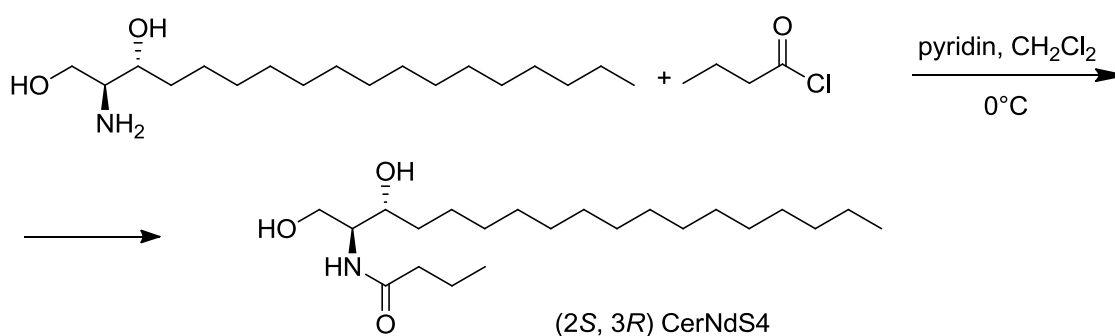
## 4.2 Syntéza

Mým úkolem bylo připravit tři ceramidy se stejnou čtyřuhlíkatou acylovou částí a různou sfingoidní bází. Sfingoidní báze byly komerčně dostupné, jednalo se o dS, L-dS a L-S.

Příprava spočívala v acylaci primární aminoskupiny báze. Tu jsem se pokusila při postupu A provést pomocí chloridu příslušné kyseliny v prostředí pyridinu a dichlormethanu. Při postupu B jsem nejdříve připravila z butyrylchloridu a *N*-hydroxysukcinimidu (SI) aktivovaný ester, kterým jsem acylovala sfingoidní bázi. Při postupu C jsem k bázi v prostředí dichlormethanu přidala kyselinu máselnou a poté byl současně přidán SI s 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidem (WSC). Postupem C byly nakonec připraveny všechny tři ceramidy.

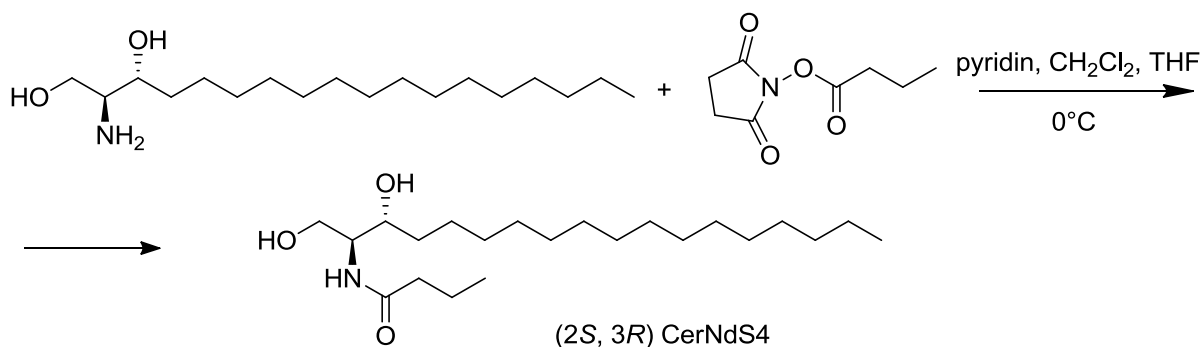
### 4.2.1 Syntéza *N*-[(2*S*,3*R*)-1,3-dihydroxyoktadekan-2-yl]butyramidu ((2*S*, 3*R*) CerNdS4)

Postup A spočíval v reakci dS s chloridem kyseliny máselné.



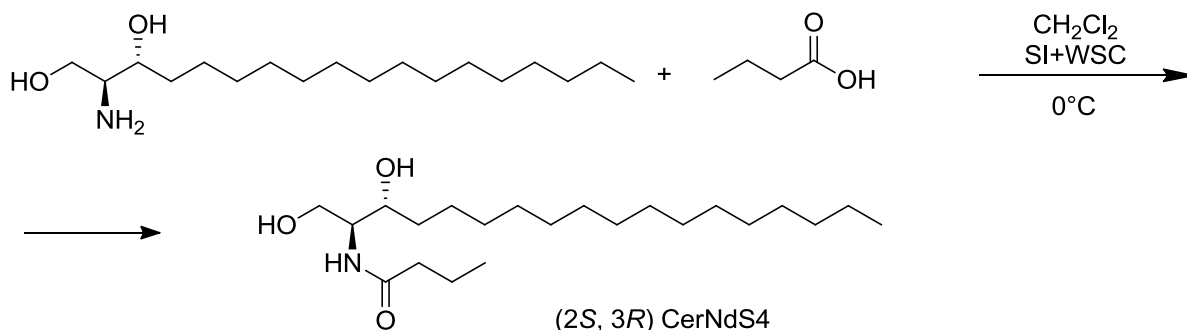
K 0,1 g (0,332 mmol) dS v prostředí suchého dichlormethanu pod atmosférou dusíku byly za stálého míchání přidány 2 ekvivalenty pyridinu, tedy 0,0525 g (0,664 mmol). Za chladu bylo ke směsi přidáno 0,0337 g (0,315 mmol) butyrylchloridu a směs byla dále 24 hodin míchána a monitorována TLC na silikagelu, mobilní fáze chloroform/methanol 20:1 ( $R_f$  CerNdS4 = 0,42). Reakční směs byla zředěna 20 ml chloroformu a vytřepána třikrát vodou. Vodné výtřepky byly poté ještě znovu vytřepány s chloroformem. Chloroformová fáze byla vysušena  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a zahuštěna na vakuové odparce. Produkt byl chromatograficky přečištěn na silikagelovém sloupci (mobilní fáze chloroform/methanol 20:1,  $R_f$  = 0,42). Produktem byla bezbarvá krystalická látka, výtěžek činil 0,0228 g (18,5 %).

Z důvodu nízké výtěžnosti byl vyzkoušen postup B.



0,0611 g (0,531 mmol) SI bylo rozpuštěno v prostředí 2 ml suchého dichlormethanu pod atmosférou dusíku a k této směsi bylo přidáno 0,0341 g (0,319 mmol) butyrylchloridu a 0,0412 g (0,531 mmol) pyridinu. Celá tato směs byla míchána 20 minut a pak přikapána k 0,080 g (0,265 mmol) dS rozpuštěného ve 3 ml bezvodého tetrahydrofuranu (THF) a 3 ml dichlormethanu při 0°C pod atmosférou dusíku a dalších 24 hodin míchána a monitorována TLC na silikagelu, mobilní fáze chloroform/methanol 20:1 ( $R_f$  Cer DS4 = 0,40). Reakční směs byla zředěna 20 ml chloroformu a vytřepána třikrát vodou. Vodné výtřepky byly poté ještě jednou vytřepány s chloroformem. Chloroformová fáze byla vysušena  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a zahuštěna na vakuové odparce. Produkt byl chromatograficky přečištěn na silikagelovém sloupci (mobilní fáze chloroform/methanol 20:1,  $R_f$  = 0,40). Produkt podle TLC nebyl čistý, a tak jsem provedla znovu sloupcovou chromatografii (mobilní fáze chloroform/methanol 50:1,  $R_f$  = 0,36). Produktem byla bezbarvá krystalická látka, výtěžek činil 0,0124 g (12,6 %).

Z důvodu nízké výtěžnosti bylo od postupu B upuštěno. Pro postup C byla zvolena reakce s kyselinou máselnou.



0,0812 g (0,269 mmol) dS bylo rozpuštěno v prostředí 5 ml suchého dichlormethanu pod atmosférou dusíku, ke směsi bylo za stálého míchání přidáno 0,0261 g (0,296 mmol)

kyseliny máselné. Při 0°C bylo k reakční směsi zároveň přidáno 0,0310 g (0,269 mmol) SI a 0,0460 g (0,296 mmol) WSC. Směs byla dále 24 hodin míchána a monitorována TLC na silikagelu, mobilní fáze chloroform/methanol 30:1 ( $R_f = 0,30$ ). Reakční směs byla zředěna 20 ml chloroformu a vytřepána vodou, pak vodou okyselenou kyselinou chlorovodíkovou a znovu vodou. Vodné výtřepky byly poté ještě jednou vytřepány s chloroformem. Chloroformová fáze byla vysušena  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a zahuštěna na vakuové odparce. Produkt byl chromatograficky přečištěn na silikagelovém sloupci.

Molekulová hmotnost: 371,6 g/mol

Výtěžek: 0,0505 g - 50,5 % (bezbarvá krystalická látka)

$R_f = 0,37$  (silikagel, mobilní fáze chloroform/methanol 30:1)

Teplota tání: 117-120°C

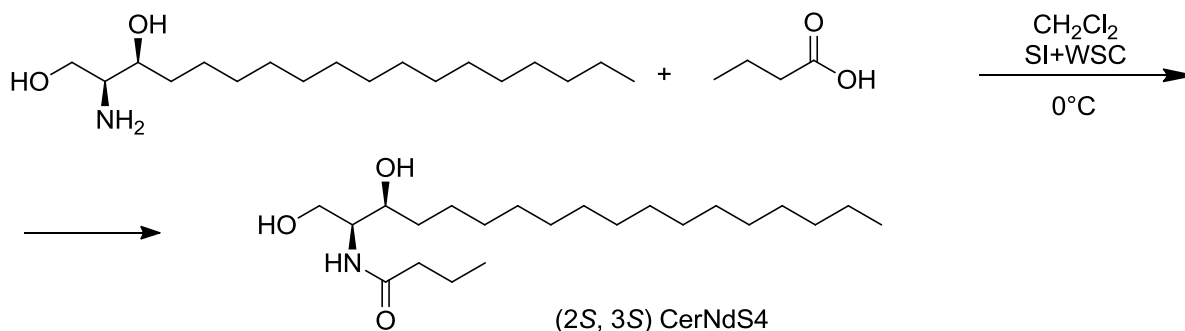
$[\alpha]_D^{26} = +4,1^\circ$  (c 0,37;  $\text{CHCl}_3$ )

IR (ATR):  $\nu$  3279, 2917, 2850, 1644, 1549, 1467, 721  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  6,65 – 6,48 (1H; d;  $J = 9,2$  Hz; NH), 4,01 (2H; d;  $J = 9,8$  Hz;  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3,81 (2H; d;  $J = 19,2$  Hz; CH-N, CH-O), 2,91 (1H; br s; OH), 2,78 (1H; br s; OH), 2,24 (2H; t;  $J = 16,0$  Hz;  $\text{CH}_2$ ), 1,69 (2H; dt;  $J_1 = 8,2$  Hz;  $J_2 = 8,0$  Hz;  $\text{COCH}_2$ ), 1,55-1,16 (26H; m;  $13 \times \text{CH}_2$ ), 0,97 (3H; t;  $J = 6,7$  Hz;  $\text{CH}_3$ ), 0,87 (3H; t;  $J = 5,4$  Hz;  $\text{CH}_3$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  173,8; 77,4; 77,0; 76,6; 74,1; 62,4; 53,9; 38,6; 34,5; 31,9; 29,7; 29,6; 29,4; 26,0; 22,7; 19,2; 14,1; 13,7 ppm.

#### 4.2.2 Syntéza *N*-[(2*S*,3*S*)-1,3-dihydroxyoktadekan-2-yl]butyramidu (**((2*S*, 3*S*) CerNdS4)**)



0,0395 g (0,131 mmol) L- dS bylo rozpuštěno v prostředí 5 ml suchého dichlormethanu pod atmosférou dusíku, ke směsi bylo za stálého míchání přidáno 0,0127 g (0,144 mmol) kyseliny máselné. Při 0°C bylo k reakční směsi zároveň přidáno 0,0151 g (0,131 mmol) SI a 0,0460 g (0,0144 mmol) WSC. Směs byla dále 24 hodin míchána a monitorována TLC na silikagelu, mobilní fáze chloroform/methanol 30:1 ( $R_f = 0,28$ ). Reakční směs byla zředěna 20 ml chloroformu a vytřepána vodou, pak vodou okyselenou kyselinou chlorovodíkovou a znovu vodou. Pro rozdělení fází byl použit roztok NaCl (Brine). Vodné výtřepky byly poté ještě jednou vytřepány s chloroformem. Chloroformová fáze byla vysušena  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a zahuštěna na vakuové odparce. Produkt byl chromatograficky přečištěn na silikagelovém sloupci.

Molekulová hmotnost: 371,6 g/mol

Výtěžek: 0,0305 g - 62,7 % (bezbarvá krystalická látka)

$R_f = 0,47$  (silikagel, mobilní fáze chloroform/methanol 10:1)

Teplota tání: 86-89°C

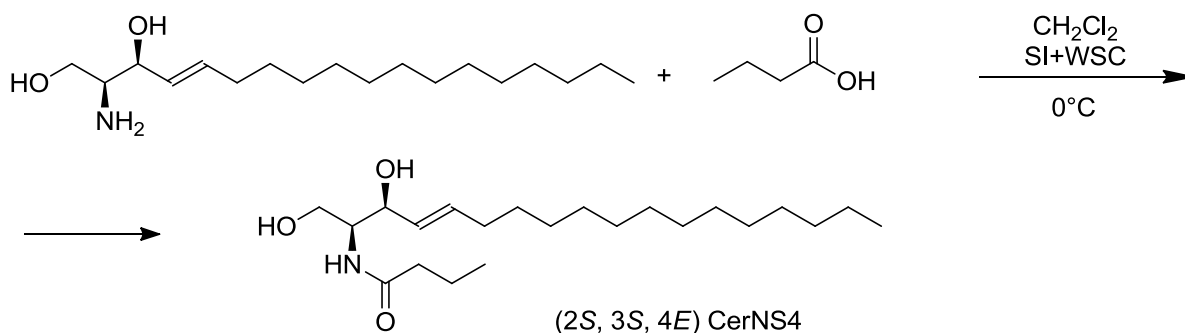
$[\alpha]_D^{26} = +2,7^\circ$  (c 0,37;  $\text{CHCl}_3$ )

IR (ATR):  $\nu$  3324, 2918, 2849, 1643, 1537, 1473, 1463, 730, 720  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  6,26 (1H; d;  $J = 8,2$  Hz; NH), 4,00 – 3,85 (2H; m;  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3,78 (2H; m; CH-N,CH-O), 3,20 (1H; br s; OH), 3,08 (1H; br s; OH), 2,22 (2H; t;  $J = 7,2$  Hz;  $\text{CH}_2$ ), 1,67 (2H; dt;  $J_1 = 7,6$  Hz;  $J_2 = 6,9$  Hz;  $\text{COCH}_2$ ); 1,55-1,05 (26H; m;  $13 \times \text{CH}_2$ ), 0,96 (3H; t;  $J = 6,2$ ;  $\text{CH}_3$ ), 0,87 (3H; t;  $J = 6,4$ ;  $\text{CH}_3$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  174,0; 72,5; 65,1; 53,2; 38,7; 34,3; 31,9; 29,7; 29,6; 29,5; 29,3; 25,6; 22,7; 19,2; 14,1; 13,7 ppm.

#### 4.2.3 Syntéza *N*-[(2*S*,3*S*,4*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl]butyramidu ((2*S*, 3*S*) CerNS4)



0,0415 g (0,139 mmol) L-S bylo rozpuštěno v prostředí 5 ml suchého dichlormethanu pod atmosférou dusíku, ke směsi bylo za stálého míchání přidáno 0,0134 g (0,152 mmol) kyseliny máselné. Při 0°C bylo k reakční směsi zároveň přidáno 0,0159 g (0,139 mmol) SI a 0,0270 g (0,152 mmol) WSC. Směs byla dále 24 hodin míchána a monitorována TLC na silikagelu, mobilní fáze chloroform/methanol 30:1 ( $R_f = 0,25$ ). Reakční směs byla zředěna 20 ml chloroformu a vytřepána vodou, pak vodou okyselenou kyselinou chlorovodíkovou a znovu vodou. Pro rozdělení fází byl použit roztok NaCl (Brine). Vodné výtřepky byly poté ještě jednou vytřepány s chloroformem. Chloroformová fáze byla vysušena  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a zahuštěna na vakuové odparce. Produkt byl chromatograficky přečištěn na silikagelovém sloupci.

Molekulová hmotnost: 369,6 g/mol

Výtěžek: 0,0178 g - 34,8 % (bezbarvá krystalická látka)

$R_f = 0,25$  (silikagel, mobilní fáze chloroform/methanol 30:1)

Teplota tání: 69-72°C

$[\alpha]_D^{26} = -3,9^\circ$  (c 0,25;  $\text{CHCl}_3$ )

IR (ATR):  $\nu$  3311, 2920, 2850, 1643, 1555, 1466, 969, 724  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  6,18 (1H; d;  $J = 7,3$  Hz; NH), 5,80-5,68 (1H; m; C=), 5,51-5,39 (1H; m; C=), 4,40-3,75 (4H; m; C1-C3); 2,93-2,30 (2H; 2  $\times$  br s; OH), 2,21 (2H; t;  $J = 7,2$  Hz;  $\text{CH}_2$ ), 1,97 (2H; m;  $\text{CH}_2$ ), 1,65 (2H; m;  $\text{CH}_2$ ), 1,45-1,11 (20H; m; 13  $\times$   $\text{CH}_2$ ), 0,96 (3H; t;  $J = 7,4$  Hz;  $\text{CH}_3$ ), 0,84 (3H; t;  $J = 6,3$  Hz;  $\text{CH}_3$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  174,2; 133,9; 128,9; 77,3; 77,2; 77,0; 76,7; 72,9; 64,3; 54,6; 38,7; 32,3; 31,9; 29,7; 29,6; 29,6; 29,5; 29,3; 29,2; 29,1; 22,7; 19,2; 14,1; 13,7 ppm.

### **4.3 Příprava modelových lipidových membrán SC**

Modelové SC lipidové membrány byly připraveny jako ekvimolární směsi studovaných ceramidů, cholesterolu a lignocerové kyseliny (hlavní zástupce mastných kyselin nacházejících se ve SC) s přídavkem 5 % (w/w) cholesterolsulfátu. Jednotlivé lipidy byly naváženy a rozpuštěny ve směsi chloroform/methanol v poměru 2:1 (v/v), byly připraveny lipidové směsi dle výpočtu za užití mikrolitrových stříkaček. Organická rozpouštědla pak byla odpařena pod proudem dusíku a vzorky byly uchovány přes noc v exikátoru, aby se rozpouštědlo odstranilo úplně. Potom byly lipidové směsi rozpuštěny ve směsi hexan/96% ethanol 2:1 (v/v) v koncentraci 4,5 mg/ml (pozn.: použití 96% ethanolu je nutné pro rozpuštění cholesterolsulfátu). 3×300 µl těchto lipidových roztoků bylo pomalu ze tří úhlů nastříkáno na Nuclepore polykarbonátové filtry s porozitou 15 nm (Whatman, Kent, Velká Británie) pod proudem dusíku za použití Linomatu IV (Camag, Muttenz, Švýcarsko) vybaveného dodatečným pohybem ve směru osy y. Tloušťka lipidové vrstvy byla průměrně 11 µm. Tyto lipidové filmy byly zahřáty na teplotu 90°C, což je nad teplotou hlavního fázového přechodu, takto udržovány po 20 minut a poté pomalu (~4 hodiny) ochlazovány na pokojovou teplotu. Potom byly uchovávány v termostatu při teplotě 32°C po dalších 24 hodin.



## 4.4 Permeační pokusy

### 4.4.1 Modelová léčiva, složení donorových vzorků

Jako modelová léčiva byla zvolena, stejně jako již v dřívějších pokusech [3] :

- Theofylin (TH),  $M = 180,17 \text{ g/mol}$ ,  $\log P = -0,1$ ,  $pK_a = 1,7$  a  $8,8$
- Indomethacin (IND),  $M = 357,79 \text{ g/mol}$ ,  $\log P = 3,7$ ,  $pK_a = 4,5$

Složení donorových vzorků:

Donorovými vzorky byly suspenze TH (5%) nebo IND (2%) v 60% propylenglykolu. Suspenze byly uchovávány v termostatu při  $32^\circ\text{C}$  a před pokusem byly homogenizovány na laboratorní třepačce.

Tyto látky byly vybrány kvůli svým výhodným vlastnostem pro pokus - jsou totiž za normálních okolností nedráždivé, kožní bariéru neovlivňují a samostatně jí ochotně nepronikají. Jsou také snadno stanovitelné běžnými analytickými metodami.

### 4.4.2 Permeace

Permeabilita modelových SC lipidových membrán byla hodnocena za použití Franzových difuzních cel s propustnou difuzní plochou  $0,5 \text{ cm}^2$  a objemem akceptorového kompartmentu cca 6 ml. Membrány byly nasazeny do difuzních cel filmem lipidů nahoru k donorovému kompartmentu a utěsněny silikonovým mazadlem. Spodní část cely byla naplněna fosfátovým pufrům (PBS, obsahující 10 mM fosfátového pufru, 137 mM NaCl a 2,7 mM KCl) o pH 7,4 s gentamicinem o koncentraci 50 mg/l jako konzervantem. Přesný objem akceptorové tekutiny byl měřen pro každou celu zvlášť a byl zahrnut do závěrečného výpočtu. Franzovy difuzní cely s připevněnými lipidovými membránami byly postaveny do vodní lázně s konstantní teplotou  $32^\circ\text{C}$ . Lázeň byla vybavena magnetickými míchadly. Po jedné hodině ustalování byla měřena elektrická impedance (viz níže). Potom bylo na membránu aplikováno 100  $\mu\text{l}$  vzorku (buď bylo použito 5% TH nebo 2% IND suspenze v 60% propylenglykolu) a aby se zabránilo vysychání, byly následně membrány zakryty sklíčkem. Spodní část Franzovy cely byla udržována při teplotě  $32^\circ\text{C}$  a míchána míchadlem. Vzorky z ní (300  $\mu\text{l}$ ) byly každé 2 hodiny po dobu 8 hodin odebírány injekční stříkačkou a byly nahrazeny stejným množstvím PBS. Kumulativní množství zkoumané látky, které prošlo skrz membránu, bylo v závislosti

na čase vyneseno do grafu, do výpočtu byl zahrnut přesný objem cel, odběry a doplňování akceptorové fáze. Ustálený flux léčiva byl vypočítán z lineární oblasti v grafu.

#### **4.4.3 Měření elektrické impedance**

Elektrická impedance modelových SC lipidových membrán byla měřena pomocí LCR přístroje 4080 (Conrad Electronic, Hirschau, Německo, měřící rozpětí  $20 \Omega - 10 M\Omega$ , chyba v  $k\Omega$  hodnotách  $< 0.5\%$ ), pracujícím v paralelním režimu s měnicí se frekvencí 120 Hz, která zajistila získání nejlepší citlivosti pro malé změny impedance. Pro toto měření byla donorová část Franzovy difuzní cely naplněna 0,5 ml akceptorové fáze a pak byly hroty sond z nerezavějící oceli opatrně ponořeny jedna do PBS v donorové a druhá do akceptorového kompartmentu difuzní cely.

#### **4.4.4 Podmínky HPLC analýzy**

TH a IND byly měřeny za izokratických podmínek na reverzní fázi HPLC přístrojem Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) skládající se z pumpy LC-20AD s odplyňovačem DGU-20A3, autosamplerem SIL-20A HT, kolonovým termostatem CTO-20AC, diode array detektorem SPD-M20A a komunikačním modulem CBM-20A. Data byla analyzována softwarem LCsolutions 1.22.

Separace TH byla provedena na koloně LiChroCART 250-4 (LiChrospher 100 RP-18,5  $\mu\text{m}$ , Merck) při  $35^\circ\text{C}$  s použitím mobilní fáze methanol/0,1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  4:6 (v/v) při průtoku 1,2 ml/min. Na kolonu jsme nastříkli 10  $\mu\text{l}$  vzorku a TH byl měřen při vlnové délce 272 nm. Retenční čas TH byl  $2.9 \pm 0.1$  min.

Vzorky IND byly analyzovány na koloně LiChroCART 250-4 (LiChrospher 100 RP-18, 5  $\mu\text{m}$ , Merck) s použitím mobilní fáze acetonitril/voda/kyselina octová 90:60:5 (v/v/v) při průtoku 1,5 ml/min. Na kolonu bylo nastříknuto 20  $\mu\text{l}$ , teplota bylo udržována na  $40^\circ\text{C}$ . UV absorpce byla monitorována při vlnové délce 270 nm a retenční čas byl  $3.9 \pm 0.1$  min. Obě metody byly validovány dříve [3].

## 5. VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem této práce bylo studovat vliv délky acylu a stereochemie na C3 u dihydroceramidů a ceramidů na prostupnost modelových membrán simulujících kožní bariéru.

Syntéza spočívala v acylaci primární aminoskupiny komerčně dostupného dS. Při postupu A byl dS acylován acylhalogenidem (butyrylchloridem) v prostředí suchého dichlormethanu a pyridinu, který vychytával vznikající HCl. Reakce proběhla s nízkým výtěžkem (18,5 %), proto bylo od tohoto postupu upuštěno.

V postupu B byl jako acylační činidlo použit sukcinimidylester kyseliny máselné, který vznikl reakcí SI s butyrylchloridem v prostředí suchého dichlormethanu. Sukcinimidylester byl pak přidán k dS rozpuštěnému v suchém dichlormethanu a bezvodém THF. Reakce opět proběhla s nízkým výtěžkem (12,6 %), zřejmě na to mělo vliv i dvojitě přečištění produktu na chromatografickém sloupci, a tak bylo od tohoto postupu také upuštěno a byl vyzkoušen postup C – acylace pomocí karbodiimidu.

Při postupu C byl dS nejprve rozpuštěn v suchém dichlormethanu, pak k němu byla přidána kyselina máselná, směs byla ochlazena na 0°C a poté bylo do reakce zároveň přidáno kondenzační činidlo WSC k aktivaci karboxylu. Výtěžnost reakce byla vyšší než u předchozích reakcí (50,5 %), a tak byl tento postup použit i pro přípravu ceramidů ze stereoizomerů – L-dS4 (62,7 %) a L-S4 (34,8 %).

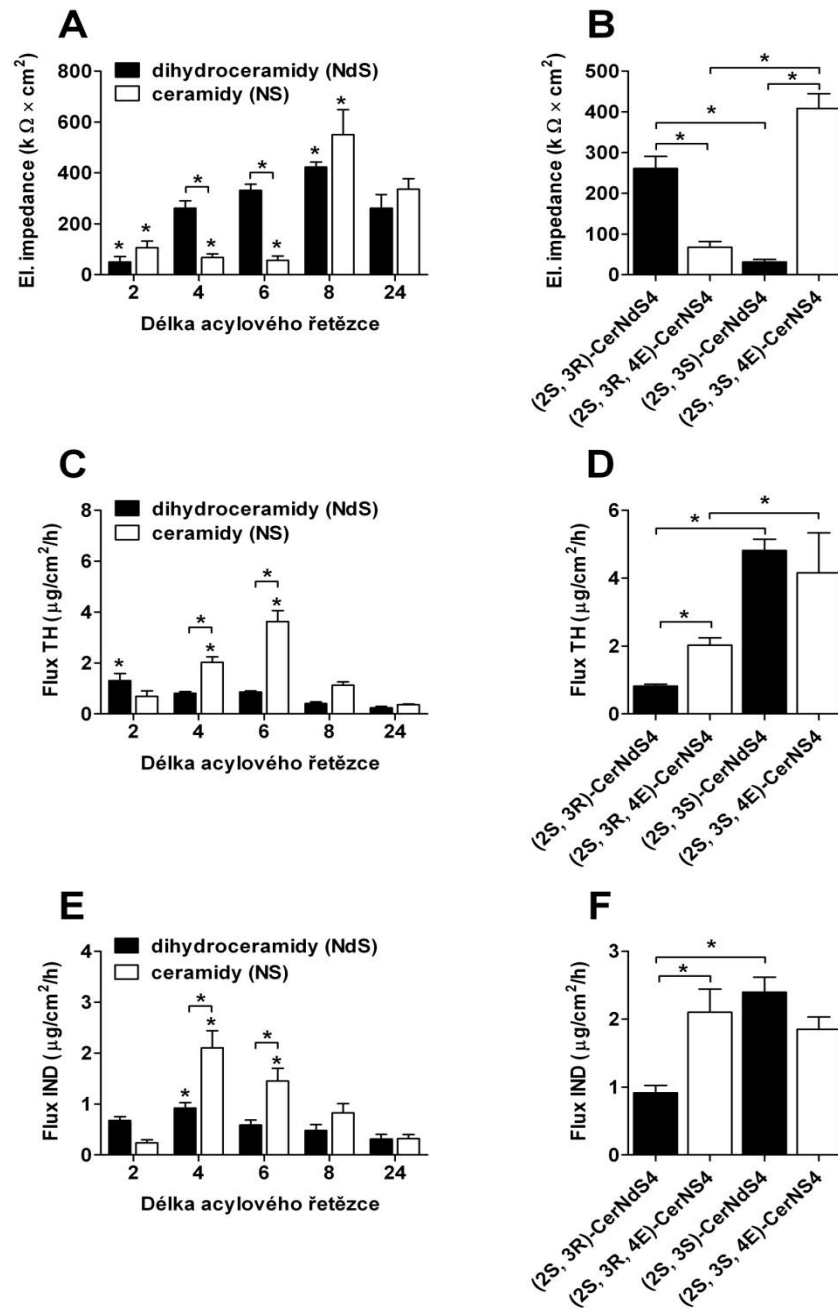
Vliv připravených analogů s acylem se 4C a dalších čtyř komerčně dostupných dihydroceramidů (CerNdS2, CerNdS6, CerNdS8, CerNdS24) na permeabilitu modelových membrán byl sledován ve Franzových difuzních celách. Jako ukazatele propustnosti modelové membrány sloužila:

- elektrická impedance, která monitoruje prostupnost membrány pro ionty
- léčivo TH s malou molekulou a vyváženou lipofilitou
- léčivo IND s molekulovou hmotností téměř 2 × větší než TH a s vyšším logP

Výsledky permeací dihydroceramidů byly porovnány s ceramidy, které byly zahrnuty do dřívějších pokusů, stereoizomery byly porovnávány také s daty z dřívějších pokusů pro (2S,3R)CerNS4 [36].

Jako akceptorovou fázi jsme použili izotonický fosfátový pufr o pH 7,4, který svými vlastnostmi napodobuje plazmu, a jsou v něm dobře rozpustná modelová léčiva, čímž se zaručují správné podmínky pro permeační pokus. Analytické hodnocení množství léčiva, které prošlo modelovou membránou, bylo provedeno metodou HPLC.

Jako první parametr propustnosti membrán byla měřena elektrická impedance (Graf A, B).



Obr. 5. Vliv délky acylového řetězce a konfigurace na C3 studovaných dihydroceramidů ve srovnání a příslušnými ceramidy na propustnost modelových membrán stratum corneum, měřenou pomocí elektrické impedance (A-B), fluxu theofylinu (C-D) a fluxu indomethacinu (E-F). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM,  $n = 6-15$ . \* značí statisticky významný rozdíl ve srovnání s C24 ceramidem, mezi izomery nebo jak je naznačeno. Data pro ceramidy z grafů A, C a E byla pro účely tohoto srovnání převzata z práce [36].

Výsledky permeačních pokusů dihydroceramidů byly podobné těm ceramidovým, nicméně projevíly se i některé rozdíly. Z hodnot impedancí na (obr. 5A) vidíme, že nejmenší impedanci, tedy nejvyšší prostupnost pro ionty, vykazují membrány s CerNdS2 a hodnoty impedancí s prodlužujícím se řetězcem stoupají až k CerNdS8, pak u CerNdS24 opět klesají. U ceramidů však byla nejnižší hodnota impedance naměřená u CerNS4 a CerNS6.

Flux TH (obr. 5C) měl v dřívějších pokusech u ceramidů charakter zvonovité závislosti, kdy největší flux byl zaznamenán u šestiuhlíkatého acylu, kdežto u dihydroceramidů vidíme, že flux klesá s délkou acylového řetězce. Tento trend v podstatě pozorujeme i u fluxu IND (obr. 5E), kde ale největší propustnost projevíly ceramidy i dihydroceramidy se čtyřuhlíkatým řetězcem.

Největší podobnost se projevíla u CerNS24 a CerNdS24, ze všech tří grafů (obr. 5A,C,E) jsme ani v jednom nezaznamenali statisticky významný rozdíl mezi těmito přirozeně se vyskytujícími ceramidy. Velmi podobné se jevíly i ceramidy a dihydroceramidy s délkou acylu 2 a 8. Statisticky významné rozdíly však lze vidět u těch s délkou acylu 4 a 6 uhlíků.

Hodnocení impedancí stereoizomerů je vyneseno do grafu na obr. 5B. Nejmenší, resp. největší impedanci jsme zaznamenali u nefyziologických stereoizomerů – u (2*S*, 3*S*) CerNdS4, resp. (2*S*, 3*S*, 4*E*) CerNS4.

Nejmenší impedanci a největší propustnost pro obě léčiva vykazoval (2*S*, 3*S*) CerNdS4. Jeho fyziologický stereoizomer přitom vykazoval impedanci poměrně vysokou – srovnatelnou s hodnotou impedance dihydroceramidu s délkou acylového řetězce 24. Nejvyšší impedanci jsme naměřili u (2*S*, 3*S*, 4*E*) CerNS4, avšak flux obou léčiv přes membránu s tímto ceramidem byl poměrně vysoký.

I v případě fyziologického ceramidu a dihydroceramidu pozorujeme statisticky významný rozdíl – dihydroceramid (2*S*, 3*R*) CerNdS4 vykazuje větší impedanci a nižší flux jak TH, tak i IND. Fyziologický dihydroceramid tedy projevil lepší bariérové vlastnosti než příslušný ceramid.

Výsledky poukázaly na to, že konfigurace na C3 a dvojná vazba na C4 u ceramidů se čtyřuhlíkatým řetězcem má na uspořádání v membráně vliv. Na tyto efekty mohou mít vliv jinak uspořádané vodíkové můstky a jiné nevazebné interakce.

## 6. ZÁVĚR

Cílem práce byla syntéza 3 analogů ceramidů s různou sfingoidní částí a s C4 acylovým řetězcem a hodnocení jejich vlivu a vlivu dalších 4 komerčně dostupných analogů dihydroceramidů s různou délkou acylu na bariérové vlastnosti modelových membrán SC. Jednokrokovou syntézou byly připraveny 3 analogy ceramidů, které byly spolu s komerčně dostupnými analogy použity k přípravě a studiu modelových membrán SC pomocí měření impedance a permeačních pokusů s využitím dvou modelových léčiv.

Výsledky práce ukázaly, že dihydroceramidy se chovají podobně jako ceramidy, nicméně u dihydroceramidů s délkou acylu 4 a 6 se projevily statisticky významné rozdíly oproti příslušným ceramidům, bude tedy třeba toto lépe prozkoumat. Stereoizomery se stejnou délkou acylového řetězce vykazovaly také statisticky významné rozdíly, konfigurace na uhlíku 3 a druh vazby na uhlíku 4 tedy ovlivňuje permeabilitu membrán, přesné vztahy mezi nimi však bude nutné dále zkoumat.

Závěrem můžeme říci, že tato práce potvrdila předpoklad vlivu délky acylového řetězce na permeabilitu modelové membrány i u dihydroceramidů, překvapivé na tom ovšem bylo, že závislost délky řetězce na permeabilitě membrán měla jiný charakter. Překvapivé bylo i chování stereoizomerů – L-izomery se chovaly odlišně než fyziologicky se vyskytující ceramidy a dihydroceramidy.

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A acylový řetězec mastné kyseliny s hydroxylovou skupinou na  $\alpha$ -uhlíku

AD atopická dermatitida

$\text{CDCl}_3$  deuterovaný chloroform

dS dihydrosfingosin

EO acylový řetězec mastné kyseliny esterifikovaný na  $\omega$ -uhlíku

H 6-hydroxysfingosin

HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IND indometacin

IR infračervená spektroskopie

L-dS L-threo-dihydrosfingosin

L-S L-threo-sfingosin

N acylový řetězec nehydroxylovaný

NMR nukleární magnetická rezonance

O acylový řetězec mastné kyseliny s hydroxylovou skupinou na  $\omega$ -uhlíku

P fytosfingosin

PBS fosfátový pufr

$R_f$  retenční faktor

S sfingosin

SI *N*-hydroxysukcinimid

SC stratum corneum

TH theofylin

THF tetrahydrofuran

TLC tenkovrstvá chromatografie

WSC 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid

## 8. LITERATURA

1. **Pandey, S.; Murphy, R. F.; Agrawal, D. K.** Recent advances in the immunobiology of ceramide. *Exp. Mol. Pathol.* 2007, Sv. 82, stránky 298–309.
2. **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. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011, Sv. 1811, stránky 129-137.
3. **Novotný, J.; Janůšová, B.; Novotný, M.; Hrabálek, A.; Vávrová, K.** Short-Chain Ceramides Decrease Skin Barrier Properties. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2009, Sv. 22, stránky 22:22-30.
4. **Feingold, K. R.** The Role of Epidermal Lipids in Cutaneous Cermeability. *J. Lipid Res.* 2007, Sv. 48, stránky 2531-2546.
5. **Bouwstra, J. A.; Ponc, M.** The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006, Sv. 1758, stránky 2080-2095.
6. **Hrabálek, A.; Vávrová, K.** Lze překonat kožní bariéru? *Prakt. Lékáren.* 2005, Sv. 1, stránky 8-11.
7. **Wartewig, S.; Neubert, R.H.H.** Properties of Ceramides and Their Impact on the Stratum Corneum Structure. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2007, Sv. 20, stránky 220-229.
8. **Vávrová, K.; Hrabálek, A.** Role ceramidů v kůži. *Prakt. Lékáren.* 2006, Sv. 2, stránky 55-58.
9. **Menon, G. K.** New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002, Sv. 54, stránky S3-S17.
10. **Novotný, J.; Hrabálek, A.; Vávrová, K.** Synthesis and Structure-Activity Relationships of Skin Ceramides. *Curr. Med. Chem.* 2010, Sv. 17, stránky 2301-2324.
11. **Squier, C. A.; Cox, P.; Wertz, P. W.** Lipid content and water permeability of skin and oral mucosa. *J. Invest. Dermatol.* 1991, Sv. 96, stránky 123-126.
12. **Wertz, P. W.; Downing, D. T.** Ceramides of pig epidermis: structure determination. *J. Lipid Res.* 1983, Sv. 24, stránky 759-765.



13. **Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Cerelli, S.; Ghidoni, R.** Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim. Biophys. Acta.* 1993, Sv. 1182, stránky 147-151.
14. **Holleran, W. M.; Gao, W. N.; Feingold, K. R.; Elias, P. M.** Localization of epidermal sphingolipid synthesis and serine palmitoyl transferase activity: alterations imposed by permeability barrier requirements. *Arch. Dermatol. Res.* 1995, Sv. 287, stránky 254-258.
15. **Wertzand, P. W.; van den Bergh, B.** The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chem. Physiol. Lipids.* 1998, Sv. 91, stránky 85-96.
16. **Wertz, P.W.** Lipids and barrier function of the skin. *Acta Derm. Venereol. Suppl.* 2000, Sv. 208, stránky 7-11.
17. **Madison, K. C.** Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 2003, Sv. 121, stránky 231-241.
18. **Suhonen, T. M.; Bouwstra, J. A.; Urtti, A.** Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *J. Control. Release.* 1999, Sv. 59, stránky 149-161.
19. **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, Sv. 92, stránky 251-257.
20. **Coderch, L.; López, O.; de la Maza, A.; Parra, J. L.** Ceramides and Skin Function. *American J. Clin. Dermatol.* 2003, Sv. 4, stránky 107-129.
21. **Maxdorf.** Velký lékařský slovník On-Line. *Velký lékařský slovník.* [Online] Maxdorf, 2008. [Citace: 4. duben 2012.] <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/eczema-atopicum>.
22. **Choi, M. J.; Maibach, H. I.** Role of Ceramides in Barrier Function of Healthy and Diseased Skin. *American J. Clin. Dermatol.* 2005, Sv. 6, stránky 215-223.
23. **Maxdorf.** Velký lékařský slovník On-Line. *Velký lékařský slovník On-Line.* [Online] 2008. [Citace: 4. duben 2012.] <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/psoriaza>.
24. —. Velký lékařský slovník On-Line. *Velký lékařský slovník On-Line.* [Online] 2008. [Citace: 4. duben 2012.] <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/ichtyzoza>.
25. **Holleran, W.M.; Takagi, Y.; Uchida, Y.** Epidermal sphingolipids: Metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Letters.* 2006, Sv. 580, stránky 5456–5466.
26. **Maxdorf.** Velký lékařský slovník On-Line. *Velký lékařský slovník On-Line.* [Online] 2008. [Citace: 4. duben 2012.] <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/akne>.

27. **Rogers, J.; Harding, C.; Mayo, A.; Banks, J.; Rawlings, A.** Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons. *Arch. Dermatol. Res.* 1996, Sv. 288, stránky 765-770.
28. **Denda, M.; Koyama, J.; Hori, J.; Horii, I.; Takahashi, M.; Hara, M.; Tagami, H.** Age- and sex-dependent change in stratum corneum sphingolipids. *Arch. Dermatol. Res.* 1993, Sv. 285, stránky 415-417.
29. **Wefers, H.; Melnik, B. C.; Flühr, M.** Influence of UV irradiation on the composition of human SC lipids. *J. Invest. Dermatol.* 1991, Sv. 96, stránky 959-962.
30. **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, Sv. 52(6), stránky 1211-1221.
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, Sv. 49, stránky 1466-1476.
32. **Grösch, S.; Schiffmann, S.; Geisslinger, G.** Chain length-specific properties of ceramides. *Prog. Lipid Res.* 2012, Sv. 51, stránky 50-62.
33. **Fishbein, J. D.; Dobrowsky, R. T.; Bielawska, A.; Garrett, S.; Hannun, Y. A.** Ceramide mediated growth inhibition and CAPP are conserved in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 1993, Sv. 268, stránky 9255-9261.
34. **Bielawska, A.; Crane, H. M.; Liotta, D.; Obeid, L. M.; Hannun, Y. A.** Selectivity of ceramide-mediated biology. Lack of activity of erythro- dihydroceramide. *J. Biol. Chem.* 1993, Sv. 268, stránky 26226-26232.
35. **Fabrias, G.; Muñoz-Olaya, J.; Cingolani, F.; Signorelli, P.; Casas, J.; Gagliostro, V.; Ghidoni, R.** Dihydroceramide desaturase and dihydrosphingolipids: Debutant players in the sphingolipid arena. *Prog. Lipid Res.* 2012, Sv. 51, stránky 82-94.
36. **Janůšová, B.** Nepublikované výsledky.
37. **Elias, P. M.; Brown, B. E.; Fritsch, P.; Goerke, J.; Gray, G. M.; White, R. J.** Localization and composition of lipids in neonatal mouse stratum granulosum and stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 1979, Sv. 73, stránky 339-348.
38. **Gray, G. M.; Yardley, H. J.** Different populations of pig epidermal cells: isolation and lipid composition. *J. Lipid Res.* 1975, Sv. 16, stránky 441-447.