

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie

Kandidát: **Mgr. Barbora Školová**

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

Název dizertační práce: **Syntéza a studium analogů ceramidů**

Ceramidy spolu s vyššími mastnými kyselinami a cholesterolem tvoří lamely mezibuněčné hmoty nejsvrchnější vrstvy kůže (*stratum corneum*, SC). Tato **lipidová hmota představuje vlastní kožní bariéru** – chrání organismus před vnějším prostředím a zároveň udržuje jeho vnitřní rovnováhu. Složení a uspořádání mezibuněčné hmoty SC jsou pro bariérové vlastnosti kůže zásadní, přesto její **organizace na molekulární úrovni stále není objasněna**. Cílem této práce bylo přispět k detailnějšímu popisu organizace kožní bariéry pomocí studia lipidových modelů SC, především najít **strukturální parametry v molekulách ceramidů**, které se na bariérových vlastnostech lipidové hmoty podílí. Modelové lipidové membrány SC představují užitečný nástroj ve studiu lipidů SC, jejich složení totiž napodobuje (pato)fyzilogický stav v kůži. Získané poznatky by mohly být využity v diagnostice a/nebo terapii onemocnění s poškozenou bariérovou funkcí kůže (např. atopická dermatitida nebo psoriáza).

Nejprve jsme se zaměřili na objasnění mechanismu ztráty bariérových vlastností kůže po **zkrácení acylového řetězce v molekule ceramidu**. Studovali jsme permeabilitu (propustnost) multivrstevných lipidových membrán a jejich biofyzikální vlastnosti pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC), infračervené (IR) spektroskopie, práškové rentgenové (X-ray) difrakce a hodnotili jsme i lipidové monovrstvy (Langmuirovými izotermami a atomovou silovou mikroskopií). **Řetězce lipidů jsou** při teplotě kožního povrchu (32 °C) **ve všech membránách** (i těch nejpropustnějších – obsahující ceramidy s délkou acylu 4 a 6 uhlíků) **uspořádané** (převážně v *all-trans* konformaci a v těsné orthorhombické mřížce). V membránách obsahující ceramidy s krátkým acylem však dochází k **separaci domén** a vytváření **více lamelárních fází** s krátkou periodicitou, což může být příčinou jejich zvýšené propustnosti. Směs s přirozeným ceramidem (s délkou acylu 24C) se ochotně uspořádává do monovrstev a po přenesení na pevný podklad tvoří souvislé domény, které zaujímají větší plochu.

Podnětem pro studium chování lipidových membrán SC obsahující 16C acyl byly studie poukazující na **zvýšené množství těchto zkrácených ceramidů na úkor přirozených ceramidů (s 24C acylem) v kůži pacientů s atopickou dermatitidou**. Lipidové membrány SC s uvedenými ceramidy jsme studovali pomocí DSC, IR a ²H NMR (nukleární magnetická rezonance) spektroskopie v pevné fázi. Jejich přípravě a hodnocení předcházela syntéza ceramidů s deuterovaným acylem – takto značené látky mohou být v membránách pozorovány současně s neznačenými, avšak odděleně díky odlišné poloze absorpčního pásu v IR spektrech. Zjistili jsme, že přirozený ceramid (s 24C acylem) v modelové membráně zaujímá **otevřenou konformaci** s řetězcem orientovanými naproti sobě. Tato konformace je poměrně nezvyklá, avšak může zvyšovat soudružnost lamel, což by mohlo vysvětlit nízkou permeabilitu těchto membrán. Při teplotě kožního povrchu (32 °C) je přirozený ceramid v modelové membráně SC **krystalický**, zatímco ceramid se zkráceným acylem (16C) je přítomen především v propustnější **gelové fázi**.

Dřívější studie ukázaly, že pro zachování bariérových vlastností kůže je důležitý **poměr sfingosinových (sphCer) a dihydrosfingosinových (dihydroCer) ceramidů**. Význam *trans*-dvojně vazby jsme studovali pomocí modelových membrán SC - permeačními pokusy, DSC, IR a ²H NMR spektroskopii a sledovali také vliv zkrácení délky acylového řetězce (na 2, 4, 6 a 8 uhlíků). Permeační pokusy ukázaly, že propustnost dihydroCer membrán obsahující zkrácený acylový řetězec je ve srovnání s membránami s přirozeným dihydroCer (acyl 24C) vyšší, ale bez statistické významnosti. Permeabilita membrán obsahující sphCer se zkráceným acylem je ve srovnání s membránami obsahující dihydroCer vyšší, především u sphCer s délkou acylu 4 a 6C. Avšak membrány obsahující přirozené dihydroCer jsou propustnější než membrány s přirozeným sphCer. Vysvětlením rozdílné permeability membrán může být odlišný **podíl velmi těsného orthorhombického uspořádání lipidů**, které je u sphCer s krátkým acylem nižší než u membrán obsahující dihydroCer analogy. Při teplotě kožního povrchu (32 °C) je v lipidových membránách patný nárůst méně uspořádané **izotropní fáze** na 27 % u přirozeného dihydroCer, u sphCer (acyl 24C) je izotropní fáze zastupena pouze v 1 %.

Délka sfingosinového řetězce má na bariérové vlastnosti kůže také vliv. Ceramidové analogy se zkráceným sfingosinovým (12 a 15C) a acylovým (2, 4 a 6C) řetězcem zvyšují propustnost kůže i modelových lipidových membrán SC. Biofyzikální vlastnosti těchto lipidových membrán hodnocené IR spektroskopii se však významně neliší, např. lipidové řetězce jsou v membránách dobře uspořádané. Rozdíly byly nalezeny v **amidové vibraci** a naznačují odlišné interakce lipidů v oblasti polární hlavy, přestože studované ceramidy se v této části molekuly strukturně neliší. Zároveň bylo zjištěno, že nejpropustnější membrány obsahují **větší počet krátkých lamelárních fází**, které by mohly být příčinou jejich zvýšené permeability.

Výsledky této práce rozšířily poznatky o vlastnostech lipidů SC, které přispěly k lepšímu porozumění bariérové funkce kůže, především byl objasněn vliv některých strukturálních prvků v molekule ceramidů na chování lipidových membrán SC. Tyto skutečnosti mohou být dále využity, např. v návrhu struktur látek obnovujících poškozenou kožní bariéru.