

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie

Kandidát: Mgr. Lukáš Opálka

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

Název disertační práce: Syntéza lidských ω -O-acylceramidů a hodnocení jejich vlivu na bariérové vlastnosti kožních lipidových membrán

Hlavním cílem této práce bylo připravit a dále studovat lidské acylceramidy (acylCer, ceramidy typu EO) se zaměřením na objasnění vztahu mezi koncentrací acylCer, strukturou jejich polární hlavy, schopností tvořit lamelární fáze a permeabilitou modelových lipidových membrán. Dalším cílem bylo připravit ceramid-1-fosfáty pro studium jejich signální role v kožní bariéře a analog gangliosidu GM1 s kratším acylem jako standard pro analýzu těchto lipidů.

Ceramidy (Cer) patří do rodiny sfingolipidů. Jsou to centrální molekuly v metabolismu sfingolipidů a podílejí se jak na regulačních procesech v buňkách, tak na bariérové funkci lidské kůže. Hlavní kožní bariéru představuje *stratum corneum* (SC), což je nejsvrchnější vrstva kůže. Účelem SC je udržet homeostázu vnitřního prostředí a zabránit průniku exogenních látek, alergenů a bakterií do organismu.

AcylCer se skládají ze sfingoidní báze, která je acylována ultra-dlouhou ($\geq 30C$) kyselinou, na jejíž ω -hydroxylové skupině je vázaná kyselina linolová. AcylCer jsou nejdelší Cer, které se v kůži vyskytují a pro její funkci jsou zcela nezbytné. Jejich úplný deficit není slučitelný se životem, protože dochází k obrovským ztrátám vody přes kůži. Zdravá kožní bariéra obsahuje přibližně 9% acylCer z celkového množství Cer. Výkyvy v hladině acylCer (většinou snížené množství) byly nalezeny u několika závažných kožních onemocnění, jako je atopická dermatitida, psoriáza nebo lamelární ichthyóza.

Jelikož acylCer nejsou komerčně dostupné, bylo potřeba vyvinout a optimalizovat jejich totální syntézu. Výchozí látkou pro přípravu acylCer se stala 16-bromhexadekanová kyselina. Z této kyseliny byla připravena jak fosfoniová sůl, tak aldehyd, dva reaktanty pro Wittigovu reakci, což je klíčový krok v této syntéze, který umožnil přípravu ultra-dlouhého řetězce. Vzniklá 32C

nenasycená kyselina byla posléze převedena na sukcinimidylester, který zvýšil její rozpustnost a zároveň posloužil jako chránící skupina při acylaci kyselinou linolovou. Navázání kyseliny linolové se podařilo s využitím Yamaguchiho esterifikační reakce. V posledním kroku reagoval sukcinimidylester kyseliny se sfingoidní bází za vzniku požadovaných acylCer. V konečném výsledku byla vyvinuta 12 kroková reakce s celkovým výtěžkem 11 % (pro množství v řádech desítek miligramů), případně 7 % (pro gramová množství).

Dále byly syntetizovány Cer-1-fosfáty a modifikované gangliosidy. Cer-1-fosfáty byly připraveny mezifázovou fosforylací pomocí $P(OCH_3)_3$, následovanou hydrolyzou methylových skupin za vzniku dvou Cer-1-fosfátů založených na sfingosinu a dihydrosfingosinu s celkovým výtěžkem 34 % a 45 %. Tyto látky budou dále využity pro studium jejich úlohy v buněčné signalizaci při tvorbě kožní bariéry a jejich chování v lipidových membránách. Jako standard pro kvantifikaci gangliosidů v biologickém materiálu byl připraven modifikovaný gangliosid GM1 se zkráceným acylovým řetězcem. Jako výchozí látka byl použit přírodní gangliosid GM1, který byl enzymaticky deacylován a následně opět acylován kyselinou s kratším řetězcem v celkovém výtěžku 40 %.

Připravené acylCer byly využity pro přípravu modelových lipidových membrán napodobujících kožní bariéru. Byly připraveny dvě série membrán – jednoduchý a složitý model. Jednoduchý model se skládal z jednoho acylCer (Cer EOS)/jednoho Cer (Cer NS)/lignocerové kyseliny/cholesterolu s přidavkem cholesteryl-sulfátu. Pomocí práškové rentgenové difrakce byla zkoumána potřebná koncentrace Cer EOS, při které je v modelových membránách pozorovatelná dlouhá periodická fáze (nezbytná pro správnou bariérovou funkci kůže). Bylo zjištěno, že tato fáze se objevuje od koncentrace 10 % Cer EOS a koexistuje s krátkou periodickou fází. Při 30 % Cer EOS se krátká fáze vytrácí. Při permeabilitních experimentech se však ukázalo, že tento model je příliš jednoduchý a že přidavek acylCer do membrány způsobuje zvýšení permeability pro modelové látky.

Abychom získali výsledky relevantní k poznatkům *in vivo*, byl jednoduchý model nahrazen složitějším modelem, který obsahoval kromě rozdílných acylCer (případně jejich směsi) také směs Cer, směs mastných kyselin, cholesterol a přidavek cholesteryl-sulfátu. Studium složitějšího modelu bylo zaměřeno na porovnání rozdílné struktury acylCer hlavy. Permeabilita všech membrán složitěho modelu s obsahem acylCer byla snížena oproti kontrole (bez acylCer), což mnohem lépe koreluje s experimenty na lidské kůži. Avšak měření práškové rentgenové difrakce ukázalo, že v tomto složitějším modelu dlouhou lamelární fázi tvoří pouze nejsložitější membrána s obsahem směsi acylCer. Tyto výsledky poprvé popisují vztahy mezi strukturou acylCer a jejich chováním v lipidových membránách. Tento model bude v budoucnu využit k přípravě modelů lipidové bariéry u kožních onemocnění a ke studiu látek s potenciální schopností regenerovat poškozené kožní bariéry.

Připravené acylCer byly také použity jako standardy pro kvantifikaci acylCer v biologickém materiálu. S použitím HPTLC se nám podařilo dokázat, že námi připravené acylCer se skutečně vyskytují v kůži a také se podařilo vylepšit jejich kvantitativní analýzu a dokázat, že pro kvantifikaci jsou nezbytné správné standardy, jinak dochází k chybě v řádech až stovek procent. AcylCer byly také použity při kvantifikaci lipidů v rekonstruované kůži se sníženou expresí filaggrinu jako modelu atopické dermatitidy, kde bylo zjištěno, že agonisté α -podtypu receptoru aktivovaného peroxizomovými proliferátory zlepšují homeostázu v kůži, zvyšují bariérovou funkci kůže a normalizují složení volných mastných kyselin.

Závěrem lze říci, že byla vyvinuta účinná a spolehlivá syntéza lidských ultra-dlouhých Cer, proveditelná i ve větším měřítku. Tyto připravené acylCer byly využity pro tvorbu modelových lipidových membrán simulujících zdravou, případně porušenou kožní bariéru, což otevírá nové možnosti *in vitro* hodnocení potenciálních léčiv pro závažná kožní onemocnění, jako je atopická dermatitida či psoriáza. Tyto acylCer byly rovněž využity ke zlepšení kvantitativní analýzy lipidů v kožních vzorcích.